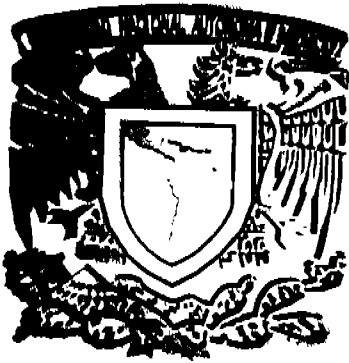


11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**ARP2 una novedosa molécula que interviene en el mecanismo
de apoptosis en una Línea Celular de Cáncer de Próstata
Humano (LNCaP)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M.en C. JUANA VIRGINIA TAPIA VIEYRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME MAS OLIVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F., 2005

m 339798



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

pdcb/grad/188Jur/2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
Presente.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juana Virginia Tapia Vieyra

FECHA: 10 de Enero de 2005

FIRMA: [Firma]

Por medio del presente informamos a usted que el Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas en su reunión 146ª del 26 de septiembre del 2004, **acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas** de Juana Virginia Tapia Vieyra, con número de cuenta 95800475 y número de expediente 30951130, con la tesis titulada: *ARP2 una novedosa molécula que interviene en el mecanismo de apoptosis en una línea celular de cáncer de próstata humano (LNCaP)*, dirigida por el Dr. Jaime Mas Oliva.

Presidente:	Dr.	Alejandro Mohar Betancourt
Secretario:	Dr.	Alejandro Manuel García Carrancá
Vocal:	Dra.	Martha Patricia Ostrosky Shejet
Vocal:	Dr.	Ataulfo Martínez Torres
Vocal:	Dr.	Arturo Hernández Cruz
Suplente:	Dr.	Alejandro Zentella Dehesa
Suplente:	Dr.	Ángel Zarain Herzberg

Agradeciendo de antemano la atención que se sirva prestar a la presente le reiteramos nuestra consideración más distinguida.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universidad, D. F., a 10 de noviembre de 2004

Dr. Julio Moran Andrade
Responsable de la Entidad Académica

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Coordinador

c.c.p. Dr. Jaime Mas Oliva, Tutor Académico.

Teléfono 56-23-01-71 y fax: 56-23-01-70 <http://www.pdcb.unam.mx>. E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

A la memoria de mi Padre por el gran apoyo y cariño que me dió hasta el último instante y quien a través de la sinceridad, la franqueza de sus actos, y su optimista filosofía, me enseñó que la vida debe disfrutarse a cada momento y que debemos recibir cada uno de ellos sin importar cual se trate con la mejor actitud.

A mi Madre mi mejor amiga, quien siempre ha estado a mi lado de manera incondicional, quien a través de su apoyo, amor, constancia, tenacidad y lucha ha sabido darle luz y fuerza a mis momentos débiles y ha festejado conmigo desde muy dentro todos los felices.

A mis hermanos José Antonio y Carmen por todo su cariño, su apoyo, así como el respeto y la comprensión que siempre me han demostrado.

A todos mis amigos por la confianza que me brindan y por todo su apoyo.

A Luis por sus palabras de aliento y por su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Jaime Mas Oliva por dirigirme en el proyecto, por todo el apoyo brindado, por su inagotable entusiasmo y por la confianza y libertad conferidos para proponer y llevar a cabo la realización del presente trabajo.

Al Comité Tutorial integrado por el Dr. Jaime Mas Oliva, el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá y el Dr. Rogelio Arellano Ostoa.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoa por el apoyo académico y experimental que permitió la realización de todo lo que se refiere a la electrofisiología del trabajo.

Al Comité de Jurado de Examen por el trabajo efectuado en la revisión de la tesis, así como por la emisión de sus valiosas opiniones y sugerencias.

A la M. en C. Blanca Alicia Delgado Coello por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A María Elena Gutiérrez por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Fisiología Celular: Lucía, Juan, Maggy, Blanca, Salvador, Ernesto, Rodrigo, Juan Antonio, Silvia, Marco la Sra. Lupita, Malena, Chayo por todos los momentos compartidos.

A todo el grupo de trabajo del Dr. Rogelio Arellano Ostoa por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el financiamiento recibido como becaria (# de becaria CONACyT 90284) durante el desarrollo del doctorado, así como al Sistema Nacional De Investigadores (SNI) por el apoyo recibido como ayudante de investigador y que me permitió concretar la última etapa del doctorado.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM y que se encuentra a cargo del Dr. Paul Gaytán.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM coordinando la Dra. Laura Ongay.

A la Unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM a cargo de Federico Jandete García.

Al Dr. Silvestre Alavez del laboratorio del Dr. Julio Morán del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el apoyo brindado en la obtención de imágenes histológicas.

Y finalmente agradezco a todos aquellos que contribuyeron de manera indirecta para la realización del presente trabajo.

THE UNENDING GIFT

Un pintor nos prometió un cuadro.

Ahora, en New England, sé que ha muerto. Sentí,
como otras veces, la tristeza y la sorpresa de comprender
que somos como un sueño. Pensé en el hombre
y en el cuadro perdidos.

(Sólo los dioses pueden prometer, porque son inmortales)

Pensé en un lugar prefijado que la tela no ocupará.

Pensé después: si estuviera ahí, sería con el tiempo

esa cosa más, una cosa, una de las vanidades o hábitos de mi casa;

ahora es ilimitada, incesante, capaz de cualquier forma y cualquier color y no atada a
ninguno.

Existe de algún modo. Vivirá y crecerá como una música, y estará conmigo hasta el fin.

Gracias, Jorge Larco.

(También los hombres pueden prometer, porque en la promesa hay algo inmortal.)

Jorge Luis Borges

ÍNDICE

<i>Lista de abreviaturas</i>	VII
<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introducción</i>	3
<i>Apoptosis y Cáncer de Próstata</i>	8
<i>Hipótesis</i>	13
<i>Objetivo General</i>	13
<i>Objetivos Específicos</i>	13
<i>Materiales y Métodos</i>	15
<i>Cultivo Celular</i>	16
<i>Viabilidad Celular</i>	17
<i>Fragmentación de DNA</i>	17
<i>Citometría de Flujo</i>	18
<i>Western Blots</i>	18
<i>Extracción de RNA Total y Reacciones de Transcripción Reversa</i>	19
<i>Clonación de arp1 y arp2</i>	20
<i>Experimentos de Expresión</i>	25
<i>Tinción de cortes histológicos con naranja de acridina</i>	27
<i>Medición de Actividad de Caspasas 3 y 7</i>	27
<i>Resultados y Discusión</i>	29
<i>Apoptosis en Células LNCaP</i>	29
<i>Western Blots</i>	32
<i>Clonación de arp1 y arp2</i>	34
<i>Experimentos de Expresión</i>	42
<i>Discusión</i>	48
<i>Referencias</i>	52
<i>Publicaciones</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	ampicilina
Apaf-1	factor 1 de activación de proteasa apoptótica
arp1	cDNA de la proteína 1 reguladora de apoptosis
arp2	cDNA de la proteína 2 reguladora de apoptosis
ARP1	proteína 1 reguladora de apoptosis
ARP2	proteína 2 reguladora de apoptosis
ATP	adenosina trifosfato
ATCC	colección americana para células en cultivo
BCA	ácido bicinconínico
Ca²⁺	calcio
CCE	entrada capacitativa de Ca ²⁺
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CO₂	dióxido de carbono
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino-tetra acético
EF-1α	factor de elongación-1 α
E2F-1	factor de transcripción-1
FSC	dispersión de luz frontal (forward scatter)
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
h	horas

HEPES	ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico
Kb	kilobase
KDa	kilodaltones
ICRAC	corriente activada por liberación de Ca^{2+} intracelular
LNCaP	línea celular de cáncer de próstata de nódulo linfoide
min	minutos
mg	miligramos
ml	mililitro
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
μl	microlitro
μg	microgramo
mRNA	ácido ribonucléico mensajero
mV	milivoltios
MuLV	virus de la leucemia murina
N_2	nitrógeno molecular
ng	nanogramos
nl	nanolitros
nm	nanómetros
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius
PBS	buffer de fosfatos salino
PCR	reacción en cadena de la DNA polimerasa
PMSF	fluoruro fenil metil-sulfonil
pS	picosiemens

RESUMEN

El mecanismo de apoptosis es un tipo de muerte celular programada, que ha sido reconocido como un evento de gran importancia en procesos tales como el desarrollo celular y la homeostasis, así como en condiciones degenerativas como el cáncer. En mamíferos los mecanismos que disparan y controlan el proceso de apoptosis son complejos, porque se ha observado que involucra muchas moléculas que actúan en distintas vías dependiendo del tipo celular. Existen mensajeros específicos como el Ca^{2+} que actúan tanto en la proliferación celular como en apoptosis. Existe la evidencia suficiente de que un aumento sostenido en los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma puede activar mecanismos de muerte celular en algunos tipos celulares. Tal es el caso de las células de cáncer de próstata, las cuales durante sus etapas avanzadas de proliferación celular, desarrollan células independientes de andrógeno que continúan su crecimiento de manera descontrolada promoviendo la metástasis. Considerando esta propiedad de este tipo celular, en el grupo del Dr. Jaime Mas-Oliva mediante el empleo de una línea celular de cáncer de próstata humana (LNCaP) independientes de andrógeno y hallazgos electrofisiológicos, se propuso previamente que estas células inducidas a apoptosis sobreexpresan una molécula semejante a un canal de calcio de muerte celular, por lo que en el presente trabajo de tesis se reporta la clonación a partir de células LNCaP del cDNA *arp2* que codifica para una novedosa proteína reguladora de apoptosis 2 (ARP2) y su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. ARP2 es sobreexpresada en células LNCaP inducidas a apoptosis y tiene la capacidad de inducir corrientes entrantes de calcio, cambios morfológicos y bioquímicos típicos de apoptosis en ovocitos inyectados con el mRNA del cDNA *arp2*. Nuestros resultados también indican que el cDNA *arp2* (1.3Kb) comparte homología del 99% con un fragmento de secuencia nucleotídica que corresponde al 18% de la secuencia completa del cDNA Prp8 (7.0 Kb). La proteína para la cual codifica este cDNA tiene una función importante en el ensamblaje del "spliceosome" ya que participa en el procesamiento de corte y empalme de pre-mRNAs. De acuerdo con lo anterior en la presente tesis proponemos que ARP2 como una proteína homóloga de la proteína Prp8, corresponde a una molécula con una nueva función en procesos relacionados con apoptosis.

ABSTRACT

The mechanism of apoptosis has been recognized as an important event in processes such as cellular development and homeostasis as well as degenerative conditions like cancer. Prostate cancer during its advanced stages develops androgen independent cells that ultimately overgrow and promote metastatic events. Our group employing androgen independent LNCaP cells have previously proposed based on electrophysiological findings, that apoptosis induced cells overexpress a cell death calcium channel-like molecule. Here we report the cloning and expression in *Xenopus laevis* oocytes of cDNA that encode for Apoptosis Regulated Protein 2 (ARP2), a protein overexpressed in apoptosis induced LNCaP cells capable to induce calcium inward currents and apoptosis typical morphology changes in oocytes injected with *arp2* mRNA. Our results also indicate that clone *arp2* cDNA (1.3Kb) shares a 99% homology with a small fragment that corresponds to 18% of the complete sequence of Prp8 cDNA (7.0 Kb), a molecule that codifies for an important protein in the assembly of the spliceosome. We propose that protein ARP2 as a fragment of protein Prp8, corresponds to a molecule with a new function in apoptosis related phenomena.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo de apoptosis es una forma de muerte celular programada distinta de la muerte celular accidental o necrosis. El proceso apoptótico aparece a través de la activación de un programa suicida celular intrínseco (1-3) y se efectúa por medio de señales internas así como externas similares a las que originan la diferenciación celular y la proliferación (4,5) (Figura 1). Los sistemas de segundo mensajero asociados con la inducción de apoptosis dependen del tipo celular así como de las señales de inducción (4), las cuales son conservadas desde gusanos e insectos hasta vertebrados (2). El proceso de muerte celular apoptótica se divide en varias fases, que inician con las señales que dan origen al proceso hasta los eventos finales de fragmentación celular (2,6) (Figura 2).

El mecanismo de apoptosis se caracteriza también por una pérdida de la función mitocondrial (7). Este organelo es importante en el control de la vida y la muerte celular y presenta por lo menos tres mecanismos generales de actividad asociados con apoptosis: 1) alteración de la fosforilación oxidativa, transporte de electrones, y producción de adenosina trifosfato (ATP); 2) liberación de moléculas que inician la activación de la familia de proteasas conocidas como caspasas, y 3) la interrupción del potencial de oxidación-reducción (redox) de las células (7). La activación de caspasas tales como la caspasa 9 (caspasa iniciadora) parece ser regulada por la salida de citocromo c de la mitocondria, en la cual el factor 1 de activación de proteasa apoptótica que promueve la apoptosis (Apaf-1) participa como un intermediario. Aunque la manera en la cual el citocromo c se libera de la mitocondria continúa en discusión, algunos miembros de la familia bcl-2, tales como como bax, se han reportado como participantes en la liberación de citocromo c de la mitocondria (8-10). Actualmente se conocen alrededor de catorce proteínas caspasa las cuales pueden ser sintetizadas como proenzimas inactivas (3,11).

La muerte celular puede inhibirse mediante la interferencia de la función proteasa de las proteínas caspasa y sus precursores, los cuales son convertidos a la enzima activa a través del procesamiento proteolítico específico o por autocatálisis disparada por la unión de cofactores y la eliminación de inhibidores (3). Estas proenzimas pueden encontrarse en células de mamífero para desarrollar apoptosis, las cuales deben ser cortadas en los aminoácidos aspártico y ensamblados a heterotretámeros. En la mayoría de estas proteasas existe un aminoácido cisteína activo localizado en medio de un motivo común conservado

QACRG (6). Ha sido reportado que durante la apoptosis, las células inician su propia muerte a través de la activación de estas proteasas endógenas (3). Thornberry y Lazebnik en 1998 (3) reportaron que las caspasas pueden activarse por dos mecanismos distintos, debido a que todas las estas proteínas tienen sitios específicos de corte similares, la forma más simple de activar una procaspasa es a través de la exposición de estas moléculas a una caspasa previamente activada. Esta cascada de activación de las caspasas es usada por las células en la activación de caspasas efectoras corriente abajo (caspasas 3, 6, y 7). La segunda estrategia se conoce como proximidad inducida, en la cual algunos cofactores reúnen caspasas zimógenos y luego las caspasas son activadas por interacción intermolecular (3,12). Las caspasas han sido definidas como iniciadoras y efectoras. La activación de caspasas efectoras es llevada a cabo usando dos vías: la vía de citocromo c que activa la caspasa iniciadora 9, y la vía de receptores de muerte que activa la caspasa iniciadora 8; las caspasas 3, 6, y 7 son conocidas como caspasas efectoras (3,9).

La función del Ca^{2+} como un regulador en la fisiología celular ha sido establecido y sustentado por muchos reportes, de los cuales se concluye que un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} activa varios mecanismos que pueden ser tóxicos en algunos tipos celulares (13-15) (Figura 3). Por muchos años, el Ca^{2+} ha sido considerado como un activador de procesos celulares involucrados en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos, y ácidos nucleicos. Existen varios genes presentes en mamíferos cuya estructura es similar a bcl-2 y que actúan de manera similar inhibiendo la apoptosis, así como otros genes que antagonizan la función antiapoptótica de bcl-2 como bax (16) (Figura 1).

Existen reportes que sugieren que la sobrevivencia celular depende de señales que provienen de las células que forman el tejido así como de la matriz extracelular. Se sabe que la mayoría de las células son programadas para morir si las señales de sobrevivencia no son recibidas del medio ambiente a intervalos regulares (2-3).

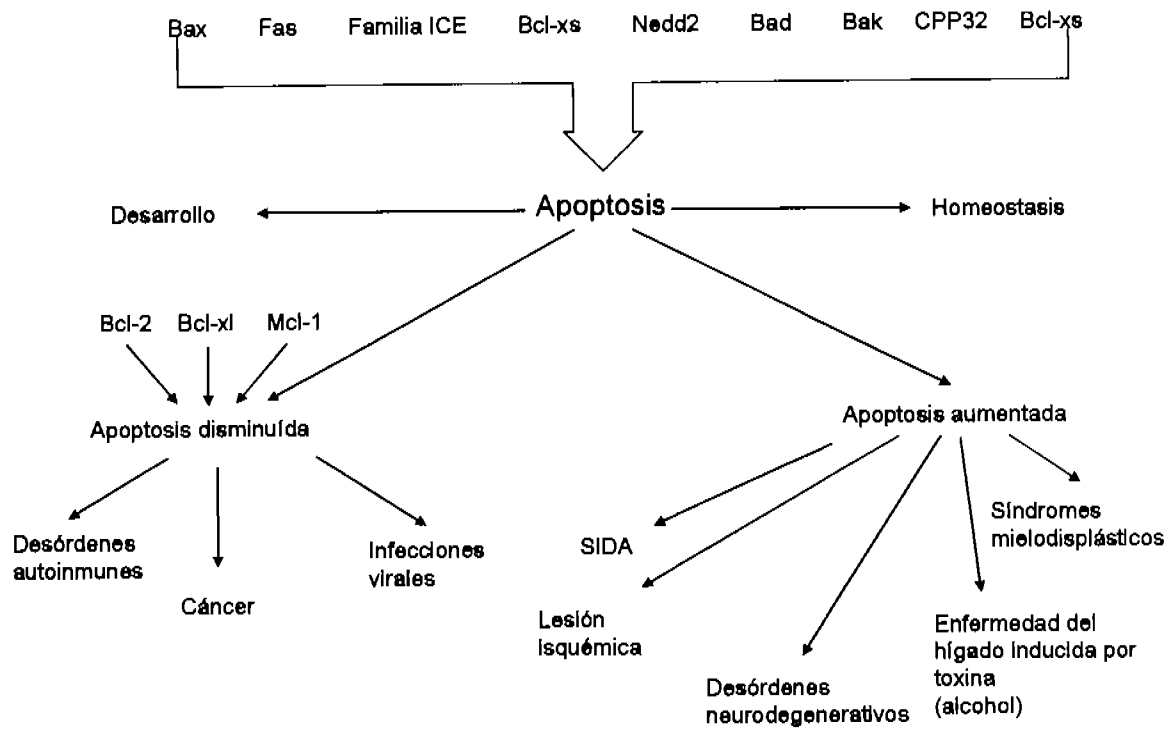


Figure 1. Moléculas que regulan el proceso de apoptosis y su relación con la enfermedad.

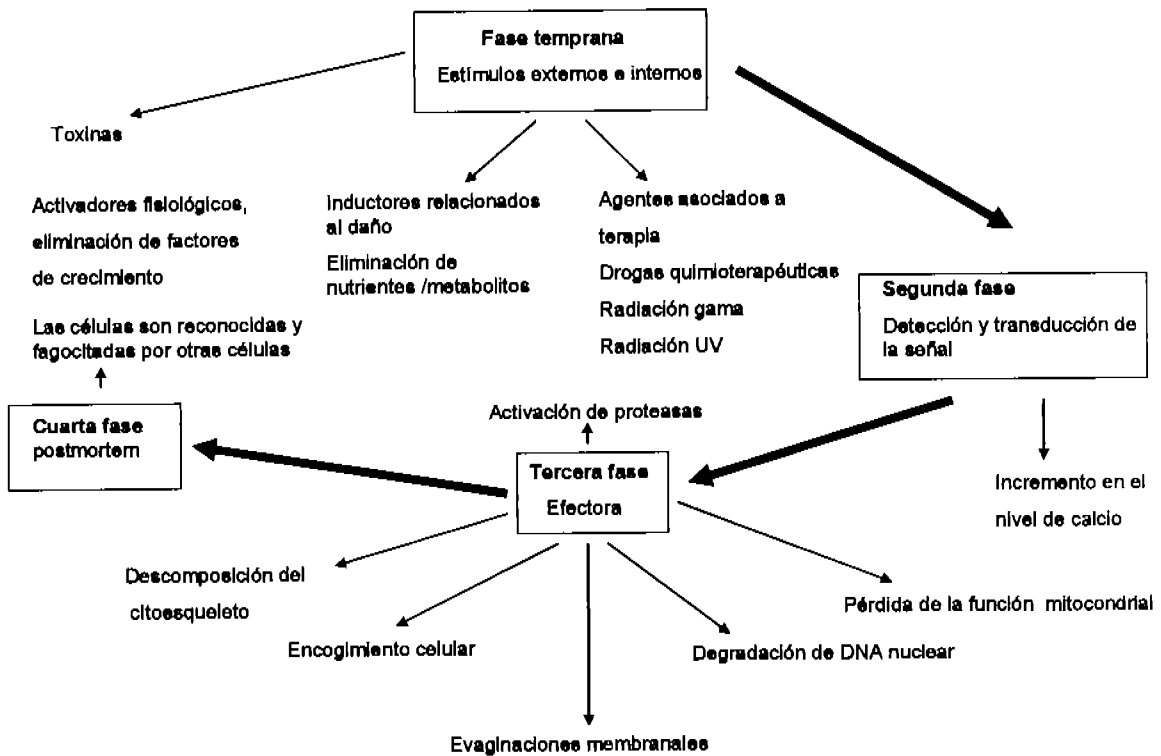


Figura 2. Eventos celulares que aparecen durante las diferentes fases de la apoptosis.

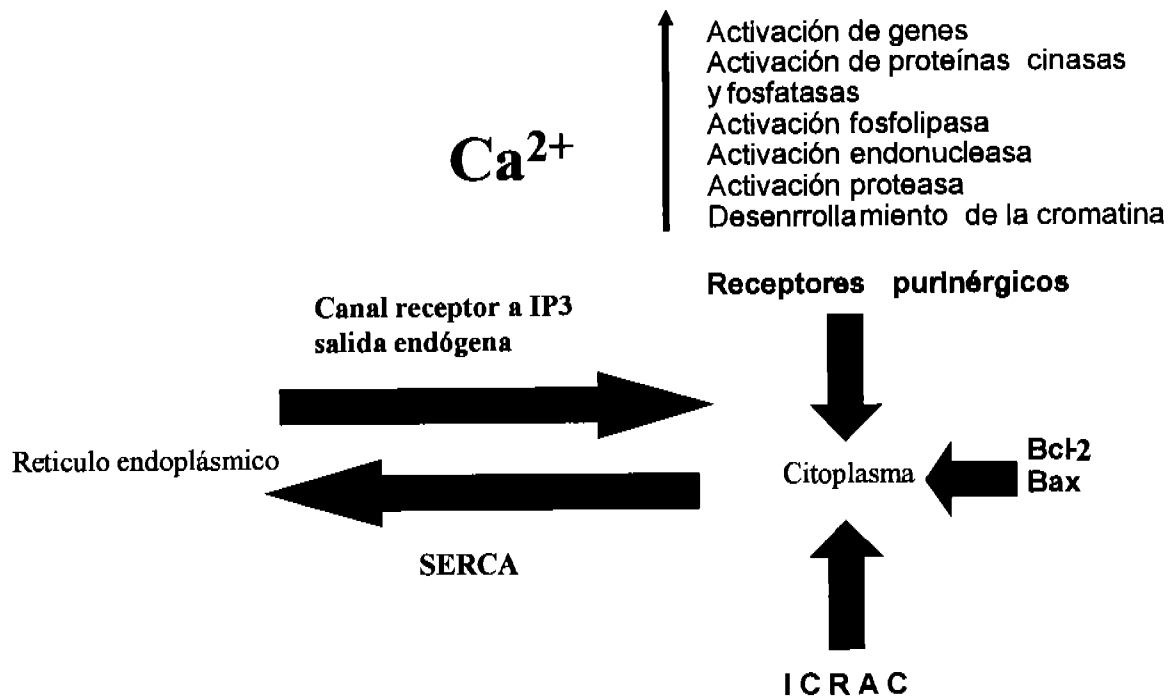


Figura 3. Moléculas de membrana que participan en el transporte de Ca^{2+} y sus funciones en la modulación de la apoptosis.

Apoptosis y Cáncer de Próstata

La reparación del DNA dañado es la única vía para asegurar la sobrevivencia en los organismos unicelulares. Sin embargo, en los metazoarios, la vía óptima para controlar el daño al DNA celular es más compleja, debido a que un número importante de mutaciones como las que ocurren en genes cuya función se involucra con la regulación de la proliferación celular y con el mecanismo de apoptosis, pueden dar origen a diferentes neoplasias. La reparación, el arresto del crecimiento celular, y la muerte celular apoptótica, pueden considerarse como una respuesta al daño del DNA, aunque la proporción en que se manifiesta en la mayoría de los casos depende del tipo celular, de la localización de las células, del medio ambiente y de la expansión del daño. Por lo tanto, las alteraciones en la maquinaria que detecta el daño al DNA o en los mecanismos encargados de implementar una respuesta a este evento son considerados importantes en la predisposición al cáncer (17). Hay dos puntos principales de monitoreo celular en el control de la progresión del ciclo celular: La fase G1/S previa al proceso de replicación del DNA, y la fase G2/M el cual precede el mecanismo de mitosis (10). A lo largo de estas transiciones, el daño en el DNA es detectado y en respuesta algunas moléculas como es el caso de p53 son activadas, lo que es seguido por el arresto del ciclo celular y la activación del proceso de apoptosis (18).

La activación de la proteína p53 se lleva a cabo a través de un mecanismo de fosforilación que regula su afinidad por la unión al DNA. La fosforilación parece regular cambios conformacionales que aparecen en el dominio regulatorio del carboxilo terminal. La interacción con otras moléculas se lleva a cabo con otros dominios de la proteína. Se ha observado que un cambio en la serina 20 de p53 impide su respuesta a la radiación ionizante y a la luz ultravioleta (18). p53 ha sido establecido como un supresor tumoral y las alteraciones en su funcionamiento son la causa de un alto porcentaje de tumores humanos (19-20).

Las células que conforman la mayoría de los tumores humanos, presentan una disminución en su capacidad para efectuar apoptosis como respuesta a distintos estímulos fisiológicos (5). En particular, la sobreexpresión de bcl-2 evita que las células inicien el mecanismo apoptótico en respuesta a estímulos diversos, y su expresión es comúnmente asociada con diagnósticos poco alentadores en enfermedades como el cáncer de próstata y de colon (5,21).

El proceso de apoptosis está involucrado en el control proliferativo de tumores de próstata y mama, lo cual se induce por la eliminación de andrógenos y estrógenos respectivamente. Para la investigación biomédica la apoptosis se considera un mecanismo protector contra carcinogénesis (22). Debido a que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos normalmente utilizados, matan a las células por mecanismos distintos a apoptosis, el aumento del proceso apoptótico en eventos de malignidad pudiera ser terapéuticamente muy valioso (23). Las proporciones de incidencia de cáncer de próstata y de la mortalidad varía en las diferentes partes del mundo. Sin embargo, en Estados Unidos este es el tipo de enfermedad maligna más común en hombres y también la segunda causa de muerte por cáncer. El riesgo de padecer la enfermedad está dado por diferentes razones, como son la edad avanzada, rasgos étnicos africo-americanos, antecedentes familiares, así como hábitos alimenticios desfavorables para el organismo (24).

Existe la evidencia de que la terapia por castración promueve la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} así como la fragmentación del DNA nuclear (25). La eliminación de andrógeno se considera una terapia raramente curativa en el cáncer de próstata, ya que el cáncer metastásico en cada uno de los pacientes se considera heterogéneo, debido a que incluye ambos tipos celulares dependientes e independientes de andrógeno. Más aún, aunque un esfuerzo enorme se ha estado realizando, no se han descubierto agentes quimioterapéuticos que pudieran ser efectivos en el control de la proliferación de células de cáncer de próstata independientes de andrógeno. La relación entre la proporción de la proliferación y de la muerte es el principal factor que determina la proliferación de las células cancerosas. Solamente cuando la proporción de muerte celular supera la proliferación celular las células cancerosas pueden ser eliminadas (26).

Considerando este argumento, una terapia importante para las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno pudiera ser realizada llevando a cabo la disminución de la proliferación y el aumento de la proporción de muerte celular hasta un punto en que ésta última exceda el crecimiento celular (26).

Existen varios agentes quimioterapéuticos antiproliferativos citostáticos y/o citotóxicos para las células blanco. Sin embargo, estos agentes frecuentemente originan la muerte celular de las células malignas cuando la proliferación está en progreso. Las células cancerosas que no están proliferando al tiempo en que se aplica el tratamiento, son resistentes a los agentes citotóxicos, es por ello que tienen el tiempo suficiente para reparar

el daño celular que probablemente ha ocurrido de manera previa al siguiente ciclo de proliferación. Se conoce que la mayoría (>90%) de las células de cáncer de próstata en los pacientes no están proliferando activamente, por lo que se tiene como resultado que sean resistentes a la quimioterapia citotóxica estándar (26). Por lo tanto, se requiere urgentemente de algún tipo de terapia citotóxica que induzca a la muerte a las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno, sin que para ello sea necesario que las células se encuentren en proliferación activa (26). Debe tenerse en cuenta que la expresión aumentada de bcl-2 y la inactivación de p53 es importante en el progreso de la enfermedad (27).

La eliminación de andrógenos produce un proceso dependiente de energía de muerte programada en las células de cáncer de próstata dependientes de andrógeno, en condiciones no proliferativas; este proceso involucra la fragmentación de DNA a multímeros nucleosomales catalizada por elevación de Ca^{2+} nuclear. En contraste, las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno no son inducidas a la muerte celular programada por eliminación de andrógeno. Una explicación es que el procedimiento no permite un aumento sostenido en la concentración intracelular de Ca^{2+} (26). Este fenómeno probablemente apoya la idea de que las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno pueden ser inducidas a sufrir muerte celular programada si un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular es sostenido por otros medios sin el uso de hormonas. El grupo de Martikainen *et al.* en 1991 (26) evidenciaron que algunas líneas celulares de cáncer de próstata humano independientes de andrógeno al ser expuestas al ionóforo ionomicina (28-29), presentaron niveles aumentados y sostenidos de Ca^{2+} intracelular e indujeron a estas células a la muerte celular programada. Estas observaciones identificaron al Ca^{2+} intracelular como un blanco potencial para la terapia contra las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno (26,30). Se conoce que el Ca^{2+} se acumula dentro del retículo endoplásmico de las células a través de la función catalítica de la ATPasa de Ca^{2+} , el equilibrio resultante regula funciones muy importantes (Figura 3). El grupo de Furuya *et al* en 1994 (31) llevaron a cabo el tratamiento de las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno humanas con un sesquiterpeno- γ -lactona (tapsigargina), el cual inhibe de manera selectiva la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, dando como resultado un incremento importante del Ca^{2+} intracelular minutos después de la exposición (31). Ellos encontraron que las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno paran la progresión del ciclo celular cuando son tratadas con tapsigargina, por lo que demostraron

que es capaz de inducir la muerte celular programada en células de cáncer de próstata independientes de andrógeno y que este proceso es críticamente dependiente de la elevación sostenida del Ca^{2+} intracelular. Teniendo en cuenta estos estudios, se ha identificado a la ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplásmico, como un nuevo blanco terapéutico para la activación de muerte celular programada de las células de cáncer de próstata independientes de andrógeno, no proliferativas (31). Considerando que el incremento sostenido en la concentración de Ca^{2+} intracelular probablemente puede ser considerado como una consecuencia del influjo de calcio a través de la membrana plasmática (26,31), fue importante evaluar la participación de los flujos de Ca^{2+} en estas células de cáncer. En este sentido, estudios electrofisiológicos previos en nuestro grupo han demostrado la actividad de una molécula semejante a un canal de Ca^{2+} activado durante la apoptosis en una línea celular de cáncer de próstata humano (LNCaP) (32). Por lo que llevamos acabo una revisión exhaustiva de los diferentes grupos de canales y receptores membranales que pudieran estar asociados con el mecanismo de apoptosis en distintos grupos celulares, y los comparamos entre ellos así como con el canal previamente reportado (33) (Tabla 1).

TABLA 1. Canales permeables a Ca^{2+} - involucrados en apoptosis

Tipo de Canal	Forma de Activación	Tipo de Corriente	Conductancia	Bloqueo	Expresión	Referencias
P2X	Canal catiónico disparado por ligando ATP, pH bajo y iones divalentes Zn^{2+} aumentan la afinidad por el agonista	Transportan corrientes de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , depolarización	12-20pS	Cationes trivalentes	Rata, ratón, tejidos neurales y neuromusculares humanos hP2X1 y hP2X7 expresados en próstata	34-42
ICRAC CCE Entrada Capacitativa de Ca^{2+}	Mensajero difusible e interacción proteína-proteína entre la membrana del retículo endoplásmico y membrana citoplásmica	No selectivo; Ca^{2+} , Na^+ , Ba^{2+} hiperpolarización	24fS	Trivalente y bivalente	Fotoreceptores Trp de: <i>Drosophila</i> , mamíferos, <i>Xenopus laevis</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , Htrp3 en cerebro, ovario, colon, Intestino delgado, pulmón, próstata, placenta, y testículos, TRPC1 (humano) cerebro fetal, corazón adulto, cerebro, testículos, y ovarios, próstata, genes de mamífero trp-3, Trp-4, trp-5 y trp-6 en cerebro. Co-expresado en el mismo tipo de células, aunque en niveles variados.	43-50
Bcl-2	Actividad formadora de poro con dependencia de pH bajo y membranas lipídicas ácidas	Canales selectivos a cationes Translocación selectiva de proteínas	18±2pS más frecuente 41±2pS y 90±10pS	pH actúa como un modulador	Membrana citoplásmica, membrana mitocondrial, envoltura nuclear, y partes del retículo endoplásmico	51
Bax	Actividad formadora de poro con dependencia a pH bajo		Predominan 250±25pS 80±25pS y 180±25pS	pH actúa como un modulador	Membrana citoplásmica, membrana mitocondrial	52
23pS	Ionomicina Remoción de suero	Canal catiónico no selectivo permeable a Ca^{2+}	23pS		Membrana citoplásmica de células LNCaP Inducidas a apoptosis	32

Partiendo de estos antecedentes en el presente trabajo de tesis presentamos el aislamiento y la caracterización del cDNA *arp2* proveniente de la línea celular de cáncer de próstata de nódulo linfoide humana (LNCaP) independiente de andrógeno inducidas a la apoptosis, el cual codifica para una novedosa proteína reguladora de apoptosis ARP2, la cual al ser expresada en un sistema heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis* fue capaz de promover corrientes entrantes de Ca^{2+} así como de desarrollar cambios morfológicos y bioquímicos asociados con el mecanismo de apoptosis.

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta el trabajo previo de nuestro grupo (32), consideramos que la activación del canal descrito así como de otras proteínas relacionadas de membrana corresponde a un evento central en el inicio y desarrollo del proceso de apoptosis en células LNCaP hormono-independientes.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar el cDNA que codifica para el canal catiónico permeable a Ca^{2+} ó para proteínas asociadas con éste que se expresa en una línea celular de cáncer de próstata humano (LNCaP) independiente de andrógeno inducidas a la apoptosis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir mediante técnicas de viabilidad celular, fragmentación de DNA y citometría de flujo el tiempo mínimo en el que las células LNCaP pueden ser inducidas al proceso apoptótico a través de la eliminación de suero del medio de cultivo.
- Definir la diferencia en los niveles de expresión de miembros representativos de los canales iónicos asociados al canal de Ca^{2+} como son receptores purinérgicos, canales de entrada capacitativa de calcio y moléculas proapoptóticas, en lisados celulares totales de células LNCaP inducidas a la apoptosis y en células control, a través del reconocimiento con anticuerpos aplicando la técnica de Western Blot.
- Diseñar los oligonucleótidos con base en regiones consenso y regiones específicas del grupo de canales que muestre la mayor expresión en condiciones apoptóticas, para amplificar cDNAs que codifican para el canal de Ca^{2+} o proteínas asociados con éste, por medio de de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- Llevar a cabo la expresión de los mensajeros correspondientes a los cDNAs aislados y caracterizados, en el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis* y realizar los registros electrofisiológicos que permitan demostrar su participación directa o indirecta en la entrada de Ca^{2+} .
- Utilizar la técnica de congelación y corte de tejido con un crióstato para la obtención de cortes histológicos de ovocitos de *Xenopus laevis*, los cuales serán teñidos con naranja de acridina para evidenciar la condensación de la cromatina; evento característico del mecanismo apoptótico.
- Evidenciar la actividad de caspasas efectoras 3 y 7 en los ovocitos inyectados con los mensajeros de los cDNAs en estudio, mediante el uso del sustrato fluorescente específico Z-DEVD-AFC para el corte molecular con caspasas.

Materiales y Métodos

La línea celular de cáncer de próstata de nódulo linfoide humano, LNCaP (hormono independiente) (53), fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). El medio RPMI 1640 con glutamina y bicarbonato de sodio 0.2%, suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomina, verseno, tripsina, azul tripano, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, agarosa, sistema de extracción de DNA de geles Concert y gentamicina fueron obtenidos de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA). El material plástico para uso en cultivo celular fue obtenido de Nunc (Roskilde, Denmark). La acrilamida, nitrocelulosa y Tween de Bio-Rad Laboratories (Hércules, CA, USA). La bisacrilamida, $MgCl_2$, Tris-HCl, detergente NP40, bromuro de etidio, ácido etilendiamino-tetra acético (EDTA), aprotinina, fluoruro fenil metil – sulfonil (PMSF), Benzamidina, Ditiotreitól (DTT), dietilpirocarbonato (DEPC), Sarcosil, β -mercaptoetanol, acetato de sodio, isopropanol, ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico (HEPES), cloruro de potasio, cloruro de sodio, colagenasa, citocromo c, taspigargina, buffer de fosfatos salino (PBS) y naranja de acridina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El reactivo de ensayo proteico BCA, Sustrato Quimioluminiscente Super Signal y Reactivo Proteico Acido Bicinconírico (BCA) de Pierce (Rockford, IL, USA). Material para autoradiografía OMAT de Kodak, (Rochester, NY USA). Acetato de amonio, citrato de sodio, hidróxido de sodio, etanol, cloruro de calcio, bicarbonato de sodio, nitrato de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio de J.T. Baker (Phillipsburg, N.J), Etanol y NaCl de Merck (Darmstadt, Alemania). El tiocianato de guanidina de Fluka Chemie (Switzerland). Gendarmes de Costar (Cambridge, MA). RNA PCR Core Kit; enzima polimerasa aislada de la eubacteria termofílica *Thermus thermophilus* con actividad de transcriptasa reversa en la presencia de $MnCl_2$ (rTth) DNA Polimerase XL, fosfatasa alcalina de intestino de ternera de Roche Molecular Systems (Branchburg, N J, USA); Desoxirribonucleótidos dNTPs de Boehringer Mannheim (GmbH, Germany). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de síntesis y secuenciación de macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México que se encuentra a cargo del Dr. Paul Gaytán. Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing , fragmento grande de la DNA polimerasa I, T4 DNA ligasa de Invitrogen life technologies (California USA) . Estuche para purificación de plásmido a mediana escala de QIAGEN (Stanford USA). Enzimas de Restricción Pme I y Not I, Nco I, Pst I de New England BioLabs, Inc (Beverly MA USA). El vector de expresión Pxenex1 fue amablemente

proporcionado por Dr. Michael Jeziorski del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Las ranas de *Xenopus laevis* obtenidas de Ann Arbor Michigan. Estuche T7 mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription y Factor de elongación-1 α (EF-1 α) de Ambion (Austin, TX, USA). Z-DEVD-AFC de Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA).

Cultivo Celular

La línea celular utilizada fue un tipo de carcinoma de nódulo linfoide de próstata humano LNCaP (53). Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con glutamina y bicarbonato de sodio al 0.2% (w/v), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v), penicilina-estreptomina 1% (v/v). Para iniciar el cultivo celular hubo que descongelar los criotubos que contenían las células LNCaP y que eran mantenidos en tanques de N₂ líquido para su conservación; esto se llevó a cabo colocando los criotubos en baño maría a 37°C en el cuarto de cultivo, lo mismo ocurrió con el medio y el suero, el antibiótico permaneció a temperatura ambiente. La preparación del medio de cultivo así como el manejo celular fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar, la cual debió permanecer encendida quince ó veinte minutos antes de comenzar a trabajar. Las células después de ser descongeladas en baño maría a 37°C fueron extraídas de los criotubos y colocadas en tubos cónicos, entonces se agregaron 10 ml de medio de cultivo ya preparado y se centrifugó a 1500-3000 r.p.m. durante 3-5 min, a temperatura ambiente; ésto se llevó a cabo con el propósito de lavar las células y eliminar posibles restos de DMSO; se extrajo el medio del tubo dejando un pequeño volumen y se agregaron 10 ml del medio de cultivo y suavemente se resuspendieron las células, colocando el volumen total en una caja Petri, donde se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Estas alcanzaron la alta confluencia después de las 48h de incubación.

Las células fueron retiradas de la incubadora para su manejo y colocadas en la campana de flujo laminar; el medio fue aspirado de las cajas, se agregaron 2ml de verseno 10X a cada caja para enjuagar las células, el cual fue eliminado, entonces se agregaron 2 ml de tripsina 1X a cada una y se agitaron suavemente con movimientos laterales, las células poco a poco se fueron desprendiendo; se agregaron 2 ml del medio de cultivo, se volvió a agitar con movimientos laterales, se juntó el contenido de dos cajas colocándolo en un tubo

falcon de 50 ml; se centrifugó durante 3-5 min a 1500-3000 r.p.m. a temperatura ambiente. La pastilla obtenida se resuspendió en 4 ml del medio de cultivo; se colocaron 9 ml del medio de cultivo a cada caja y se agregó 1 ml del volumen (por cada caja utilizada previamente) correspondiente a la pastilla resuspendida; se agitó suavemente con movimientos laterales sobre la superficie de la campana y se mantuvieron las células a 37°C y 5% de CO₂; revisando al siguiente día las células para efectuar el cambio de medio y eliminar las células muertas (células flotando).

Las células LNCaP independientes de andrógeno fueron inducidas a apoptosis mediante la eliminación del suero del medio de cultivo agregando únicamente al medio de cultivo penicilina-estreptomicina 1% (v/v) (32,54); y para evidenciar el mecanismo de apoptosis y poder definir el tiempo más adecuado en el que las células además de encontrarse en apoptosis, estuvieran en buenas condiciones de manejo y no fueran fácilmente lisables, se emplearon las técnicas de viabilidad celular, patrón de degradación de DNA en escalera típico de apoptosis y citometría de flujo. El control que se utilizó en estos ensayos fueron células mantenidas con suero.

Viabilidad Celular

Los experimentos de viabilidad celular se llevaron a cabo mediante la tinción con azul tripano 0.1% (v/v) de las células sometidas al mecanismo de apoptosis a través de eliminación de suero a los diferentes tiempos (16, 24, 48, 72, 96, 120, 144h); esto se llevó a cabo tripsinizando las células, las cuales fueron resuspendidas en verseno y colocadas en una cámara de Neubauer, a las que les fue agregado aproximadamente 50 µl de azul tripano 0.1% (v/v); entonces fueron contadas las células vivas utilizando un microscopio óptico Motic, que fueron aquellas que no dejaron pasar el colorante, debido a que su membrana celular se encontró en buenas condiciones, a diferencia de las células apoptóticas que son permeables al mismo, por el daño que han sufrido en la membrana.

Fragmentación de DNA

Las células LNCaP a alta confluencia fueron sometidas a apoptosis por eliminación del suero durante 0,16,24,72h. Estas fueron lavadas con Verseno y lisadas en 0.5 ml del buffer de lisis (140mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris/HCl pH, 7.4, 0.5% (w/v) NP40 detergente)

por 30 min a 4°C. Los núcleos fueron obtenidos en la pastilla la cual se obtuvo por centrifugación a 10, 000 g por 10 min a 4°C y fueron resuspendidos en solución hipertónica (350mM NaCl , 1.5mM MgCl₂, 1mM DTT, 10mM Tris/HCl pH 7.4) por 30 min a 4°C. La extracción de DNA se llevó a cabo con fenol-cloroformo-álcool isoamílico. El DNA fue precipitado con acetato de amonio 7.5M y etanol absoluto, y lavado con etanol 70% (v/v) y separado por electroforesis en geles de agarosa al 2% (w/v), los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio.

Citometría de Flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), y se emplearon un millón de células inducidas al mecanismo de apoptosis a través de la eliminación de suero del medio y las células control. Los tiempos de inducción a apoptosis fueron 16h y 72h. Cabe mencionar que para llevar a cabo los experimentos de citometría de flujo fueron considerados los siguientes parámetros: cambios físicos en las células, tales como granularidad aumentada, encogimiento celular y fragmentación celular típica del proceso de apoptosis (55). Las células mantenidas con suero funcionaron como control y fueron procesadas de la manera descrita.

Western blots

Un grupo de proteínas involucradas en apoptosis y relacionadas con el flujo de calcio fueron seleccionadas. La base de datos Swiss Prot <http://us.expasy.org/sprot/> (56) y el programa FASTA <http://fasta.bioch.virginia.edu/> (57) fueron utilizados para la selección de epítopes y cuyas secuencias se utilizaron en el diseño de anticuerpos policlonales. Estos se muestran en la Tabla 2.

Table 2. Péptidos seleccionados para la producción de anticuerpos policlonales

Epítoto	Peso Molecular (kDa)	# de residuos	Diluciones	Referencia
Receptor Purinérgico P2X1	44.980	380-399	1:25	[58]
Receptor Purinérgico P2X7	68.539	576-595	1:100	[59]
Receptor Potencial Transiente TRPC1	92.376	774-793	1:75	[60]
Proteína Proapoptótica Bax	21.184	80-98	1:100	Comercial

Las secuencias de los epítopos fueron usados para la síntesis de los péptidos y la producción de anticuerpos policlonales en conejo, lo cual fue llevado a cabo por Alpha Diagnostic Internacional (San Antonio, TX). Bax fue obtenido como un anticuerpo comercial proveniente de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California). Las células después de ser incubadas durante 16h en medio con suero (células control) y sin suero, fueron lisadas en el buffer de lisis (NaCl 100mM, Tris/HCl 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM, pH 8.0, aprotinina 1µg/ml, fluoruro fenil metilsulfonil (PMSF) 100 µg/ml, benzamidina 1 µg/ml). Las células fueron sonicadas y la cuantificación de la proteína se llevó a cabo mediante el método de detección y cuantificación de ácido bicinonínico (BCA), las concentraciones de proteína usadas para la electroforésis fueron de 100 µg. Se utilizaron geles de poliacrilamida donde el gel resolutivo fue del 12.5% (w/v) y el gel concentrador del 5% (w/v), para ser posteriormente transferidos a nitrocelulosa. Las membranas fueron saturadas con Tris Buffer Salino (TBS) pH 7.6 (Tris/HCl, pH 7.4 20mM, NaCl 100mM, Tween 20 0.05% (v/v), leche descremada 2.5% (w/v) e incubadas con anticuerpos primarios Tabla 2. El anticuerpo secundario usado fue un anticuerpo anticonejo producido en cabra marcado con peroxidasa a una dilución de 1:500. Se utilizó como control de carga el anticuerpo de actina a una dilución de 1:500 y se usó como anticuerpo secundario un anticuerpo de ratón producido en cabra (Santa Cruz). La reacción fue visualizada a través del sustrato quimioluminiscente Super Signal System.

Extracción de RNA total y Reacciones de Transcripción Reversa

El templado utilizado para la reacción de PCR consistió de la mezcla de cDNAs de las células LNCaP mantenidas sin suero y con suero (control) durante 16h. Esta mezcla fue obtenida a través de la extracción del RNA total de las células LNCaP mediante la técnica del tiocianato de guanidina (61). Esta técnica consistió en llevar a cabo la lisis celular utilizando una solución de (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio pH 7.0 25mM, sarcosyl 0.5% (w/v), beta mercaptoetanol 100mM), después se efectuó la extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se precipitó con isopropanol, se agregó solución de tiocianato de guanidina, se precipitó, se lavó y resuspendió. La mezcla de cDNAs fue obtenida mediante una reacción de transcripción reversa, para lo cual fue utilizado el sistema de transcripción reversa de RNA PCR Core Kit. Las condiciones de desnaturalización y alineamiento de oligonucleótidos al azar y oligonucleótido dT para 5µg de RNA total extraído (usando el protocolo ya mencionado) fueron 1 ciclo 65°C 10 min hasta alcanzar 25°C;

entonces se adicionó la mezcla de $MgCl_2$ 5mM, Amortiguador II 1X, dNTPs 1mM, MuLV transcriptasa reversa 2.5 U, 1 ciclo de 42°C 45 min, 1 ciclo de 99°C 5 min hasta alcanzar los 5°C. El control utilizado en esta reacción fue la amplificación específica de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las condiciones de reacción fueron: 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 45 seg, 55°C 45 seg, 72°C 2 min, 1 ciclo de 72°C 10 min.

Clonación de *arp1* y *arp2*

Los templados para las reacciones de PCR consistieron de una mezcla de cDNAs de células LNCaP mantenidas en presencia y ausencia de suero fetal bovino (SFB) al 10% durante 16h. El RNA total de las células LNCaP fue extraído usando el método de guanidina-fenol-cloroformo (61) y usado para sintetizar la mezcla de cDNAs con un sistema de transcripción reversa RNA PCR Core Kit. Los cDNAs sintetizados fueron amplificados (62) con el oligonucleótido sentido

5'- TGACAGTGATGCGGGAGAAGG- 3' cuya secuencia es específica para la proteína htrp3 (47) y un oligonucleótido degenerado antisentido que corresponde a una región conservada de la familia Trp de proteínas con secuencia EWKFAR (63) 5'- TGY-TCK-MGC-AAA-YTT-CCA-YTC- 3' (Figura 4). La síntesis de los oligonucleótidos estuvo a cargo del Dr. Paul Gaytán de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las T_m fueron calculadas de acuerdo con las siguientes fórmulas $Tm1 = (2(A+T)) + (4(C+G))$ y $Tm2 = 67.5 + 0.34(\%(C+G)) - 395/\text{longitud}$. Estas secuencias fueron seleccionadas con el programa de análisis Mac Vector 6.5.3 (64). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada con el siguiente programa: 30 ciclos a 94° C usando 45 seg/ciclo, 60° C por 45 seg y 72° C por 2 min y un ciclo a 72° C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (w/v) y purificados con el sistema de extracción de gel Concert de Gibco BRL (Gaithersburg Maryland). Los oligonucleótidos para amplificar Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) fueron usados como un estándar interno, donde el oligonucleótido sentido 5'- TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT- 3' (posición 71-95) y oligonucleótido antisentido 5'- CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC - 3' fueron elegidos (65). Los productos de PCR fueron clonados en el vector TOPO4 (Estuche de clonación de PCR TOPO Zero Blunt para secuenciación Invitrogen, Life Technologies) para la determinación de la secuencia de nucleótidos, la cual se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de

Fisiología Celular de la UNAM,este estuche de clonación utiliza la enzima DNA topoisomerasa I (enzima de restricción y ligasa), la cual reconoce la secuencia pentamérica 5'-(C/T) CCTT-3', el vector se encuentra linearizado con la topoisomerasa covalentemente unida a cada fosfato 3' esto capacita al vector para ligar secuencias de DNA con extremos compatibles ya sean rasos ó cohesivos.

```

1   agagagtgct cttggaatat tgttgaggca gattgcatga actgaaagct ccttctaatt
61  aacctggagc caagtgaacc tgaatactgg atatctcatg ttctaacacg ggataaattc
121 aagttagaaa aagacaaaat attgaaatgc ttctctaggt ccatggaggg aagcccatcc
181 ctgagacgca tgacagtgat ggggagaaag ggccggcgcc aggctgtcag gggcccggcc
241 ttcattgttca atgaccgcgg caccagcctc accgccgagg aggagcgctt cctcgacgcc
301 gccgagtacg gcaacatccc agtgggtgccc aagatgctgg aggagtccaa gacgctgaac
361 gtcaactgcg tggactacat gggccagaac gcgctgcagc tggctgtggg caacgagcac
421 ctggaggtga ccgagctgct gctcaagaag gagaacctgg cgcgcattgg cgacgcctg
481 ctgctcgcca tcagcaaggg ctactgtgccc attgtagagg ccatcctcaa ccacctggc
541 ttctcggcca gcaagcgtct cactctgagc cctgtgagc aggagctgca ggacgacgac
601 ttctacgctt acgatgagga cggcacgcgc ttctcggcgg acatcccccc catcatcctg
661 gcggcgcact gccagaaata cgaagtgggtg cacatgctgc tgatgaaggg tgccaggatc
721 gagcggccgc acgactatct ctgcaagtgc ggggactgca tggagaagca gaggcacgac
781 tccttcagcc actcacgctc gaggatcaat gcctacaagg ggctggccag cccggcttac
841 ctctcattgt ccagcgagga cccgggtgctt acggccctag agctcagcaa cgactggcc
901 aagctggcca acatagagaa gtagtcaagc aatgactatc ggaagctca catgcaatgc
961 aaagactttg tagtgggtg gctggatctc tgccgagact cagaagaggt agaagccatt
1021 ctgaatggag atctggaatc agcagagcct ctggagggtac acaggcacia agcttcatta
1081 agtcgtgtca aacttgccat taagtatgaa gtcaaaaagt ttgtggctca tcccaactgc
1141 cagcagcagc tcttgacgat ctggtatgag aacctctcag gcctaaagga gcagaccata
1201 gctatcaagt gtctcgtttg gctggctgctg gccctgggccc ttcattctct ggccattggc
1261 tactggatcg caccttgca gactctgggg aaaattctgc gaagcccttt tatgaagttt
1321 gtgacacatg cagcttcttt catcatcttc ctgggtctgc ttgtgttcaa tgccctagac
1381 aggttcgaag gcataccacc gctgcccatt atcacagtta ctgactatcc caaacagatc
1441 ttcagggtga aaaccaccca gtttacatgg actgaaatgc taattatggg ctgggttctt
1501 ggaatgatgt ggtctgaatg taagagagctc tggctggaag gacctagggg atacattttg
1561 cagttgtgga atgtgcttga ctttgggatg ctgtccatct tcattgctgc tttcacagcc
1621 agattcctag ctttccttca ggcaacgaa gcaaacagat atgtggacag ttacttcaa
1681 gatagtgacc tcagtgaagt ccagctccca ccagagatac agtatttcac ttatgctaga
1741 gataaatggc tcccttctga cctcagatt atatctgaag gcctttatgc catagctgtt
1801 gtgctcagct tctctcggat tgcgtacatc ctccctgcaa atgagagctt tggccctctg
1861 cagatctctc ttggaaggac tgtaaaggac atattcaagt tcatggctct ctttattatg
1921 gtgttttttg cttttatgat tggcatgttc atactttatt cttactacct tggggctaaa
1981 gttaatgctg cttttaccac tgtagaagaa agtttcaaga ctttattttg ctttattttt
2041 gggttgtctg aagtgacttc cgttgtgctc aaatatgatc acaattctat agaaaatatt
2101 ggatacgttc tttatggaat atacaatgta actatggtgg tcgttttact caacatgcta
2161 attgctatga ttaatagctc atatcaagaa attgaggatg acagtgatgt agaatggaag
2221 tttgctcgtt caaaactttg gttatcctat tttgatgatg gaaaaacatt acctccacct
2281 ttcagtctag ttccatgtcc aaaatcattt gtttatttca tcatgcgaa tgttaacttt
2341 cccaaatgca gaaggagaag acttcagaag gataagaaa tgggaatggg tggtcaaaag
2401 tccaggttaa acctcttac tcaagttaac tcaagagttt ttgaatcaca cagttttaac
2461 agcattctca atcagccaac acgttatcag cagataatga aaagacttat aaagcgggat
2521 gtcttgaaag cacaagtaga caaagaaaat gatgaagtta atgaagggtg attaaaagaa
2581 atcaagcaag atatctccag ccttcgttat gaacttttgg aagacaagag ccaagcaact
2641 gaggaattag ccattcta atcataaactt agtgagaaac tgaatcccag catgctgaga
2701 tgtgaatgat gcagcaacct ggatttggct ttgactatag cacaaatgtg gccaataata
2761 tttctaagta tgaataactt gaaaaactat gatgtaaat tttagtatta actaccttta
2821 tcatgtgaac ctttaaaagt tagctcttaa tggtttattg tttatcacat gaaaatgcat
2881 tttatttgtc tgctttgaca ttacagtggc ataccattgt gttgaaaagc ccaatattac
2941 tatattattg aaacttttat tcattttaga gtaaacctca catctttgca ctacctgttt
3001 gcctccaaga gactatcagt tccttgggga caggaccat gtcttattca tctttgtgtc
3061 tccagcatct agtacagtgc ctggtatata gtagggtgctc aataaatggt gaaaccaact
3121 gaactgccaa caaataaaaa ataaaaagtc ttcactatgt agcatacctt ccttgtcca
3181 agttctgaag aggttttttt tttttttttt ttaatagaaa ctgaagacat tttacaacca
3241 gctatgactt ggtaagacat tcttagaatt ttaggtgtca ctgataatcc tagaaccact
3301 gagccccaag tgaagaattt aacaacaaaa tgggttaatg aaaaatataa ttacattgta
3361 tatttaagtt tcatagaatt atttaaaaaa acacattaaa gatttttcta aaatatg

```

Figura 4. cDNA que codifica para la proteína htrp3, el color verde representa los codones de inicio para la metionina y de término, el color azul el oligonucleótido sentido, el color rojo la secuencia antisentido para el diseño del oligonucleótido degenerado (47,63)

Nosotros también llevamos a cabo la clonación de estos productos en el vector pxenex1 el cual fue amablemente proveído por el Dr. Michael Jeziorsky (Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México), considerando que este vector contiene el promotor T7 así como algunas señales para modificaciones postranscripcionales tales como la secuencia poliA la cual al ser adicionada al mRNA le confiere mayor estabilidad y favoreció de esta forma la óptima expresión en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Para efectuar la clonación en el vector pxenex1, se digirió el plásmido recombinante TOPO 4 para la liberación de los productos de PCR. Se usaron 10 µg del plásmido recombinante, 10 µl del buffer de reacción para la enzima Pme I (concentración final 1X) y 1 µl (10 unidades) para mantener por reacción 1U/µg de DNA de cada una de las enzimas Pme I (extremos rasos) y Not I (extremos cohesivos) de New England BioLabs y BSA 100 µg/ml ajustando el volumen final con agua estéril a 100 µl e incubando la reacción a 37°C durante toda la noche.

Los productos de la digestión se cargaron en geles de electroforesis de 1%, se cortaron las bandas de 1.3 Kb correspondientes a los insertos, y fueron purificadas por columna para la purificación del DNA con el sistema de extracción de DNA de geles Concert de GIBCO, que consistió en el corte de la banda de interés del gel de agarosa, se pesó la banda tratando que no excediera los 400 mg, se solubilizó el pedacito de gel en buffer de solubilización (perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio, y solubilizador TBE) incubando a 50°C por 30-45 min, se mezcló frecuentemente para asegurar la disolución del gel, después de ser disuelto se incubó 5 min más. Se colocó una columna sobre un tubo de lavado del mismo estuche de trabajo, se transfirió la mezcla disuelta, se centrifugó en una microfuga a $\geq 12,000x$ g por 1 min, se llevó a cabo este paso hasta que se terminó la mezcla y el volumen de lavado se desechó en cada paso centrifugación, se agregaron 500 µl del buffer de solubilización a la columna, se incubó durante 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a $\geq 12,000x$ g por 1 min. Se descargó el volumen de desecho. Se agregaron 700 µl del buffer de lavado (NaCl, EDTA y Tris-HCl) que contenía etanol y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a $\geq 12,000x$ g por 1 min. Se eliminó el volumen de desecho. Se centrifugó de nuevo por 1 min para remover el residuo del buffer de lavado. Se colocó la columna en un tubo limpio para la recuperación para obtener finalmente el eluido, el cual se obtuvo agregando 30 µl de agua estéril (mantenida a una temperatura de entre 70-80°C) a la columna, se centrifugó a $\geq 12,000x$ g por 2 min, este último paso se repitió hasta

cinco veces, el volumen final que se recuperó fue concentrado hasta 30-50 μ l. El DNA fue cuantificado en un espectrofotómetro, y fueron consideradas las lecturas a 260 y 280 nm en espectro de luz UV, para lo cual se consideró que $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 = \mu\text{g/ml}$ DNA y el cociente de 260/280 debe ser 1.8 para considerar la muestra de buena calidad, ya que por encima de este valor estaría contaminada con RNA y por debajo del mismo con proteínas. En el sitio polilinker del vector pxenex1 se eligieron los sitios de restricción Nco I y Not I para hacer la digestión enzimática necesaria para preparar el vector e integrar el inserto. Debido a que la enzima de restricción Nco I al digerir el DNA deja extremos cohesivos, hubo que llevar a cabo una reacción de rellenamiento o polimerización de los extremos, para hacerlos compatibles con extremos de la enzima Pme I (extremos rasos), una de las cuales se usó para la liberación de los insertos. Las reacciones de digestión (2-3) con la enzima Nco I se hicieron usando 1-3 μ g de DNA (vector pxenex1), buffer de la enzima a una concentración final 1X y 1 μ l (10 unidades) de la enzima de restricción Nco I en un volumen final de 20 μ l y se incubó a 37°C durante 4h, el vector digerido se hizo pasar por un gel de electroforésis y la banda fue cortada y el DNA recuperado utilizando el kit de purificación de DNA de Concert (protocolo ya mencionado).

Una vez recuperado el DNA fue cuantificado en un espectrofotómetro, y fueron consideradas las lecturas a 260 y 280 nm en espectro de luz UV, como se mencionó anteriormente. Las reacciones de rellenamiento (2-3) de extremos cohesivos se efectuaron utilizando por reacción 1 μ g de DNA, buffer de la enzima a una concentración final de 1X, 0.5mM dNTPs, 0.5 U de enzima Klenow a un volumen final de 30 μ l, se incubó a 30° C durante 30 min, se juntaron las reacciones y se llevó a cabo la extracción de DNA por el método fenol-cloroformo, se precipitó con acetato de Na^+ 3M pH 5.2 y dos volúmenes y medio de etanol absoluto a -20° C durante toda la noche o bien durante 30 min a -70° C, se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en agua estéril, se llevó a cabo la cuantificación del DNA. El mismo procedimiento se efectuó para cortar ahora el vector pxenex1 con la enzima Not I siendo este extremo compatible con el otro extremo Not I del inserto liberado del vector TOPO 4, para lo cual se efectuaron reacciones de 1-3 μ g del DNA del vector pxenex1 digerido con la enzima Nco I y relleno, buffer de la enzima a una concentración final de 1X, enzima Not I 1 μ l (10 unidades/ μ l), se agregó agua estéril ajustando a un volumen final de 20 μ l. Por último el vector fue defosforilado (1-3 reacciones) usando por reacción 1-3 μ g de DNA y 1-2 U de enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera, y buffer de reacción de la enzima a una concentración final de 1 X, ajustando a un

volumen final de 20 μ l, se incubó a 37°C durante toda la noche, la reacción fue inhibida con dos décimos del volumen de EGTA 100mM y se mantuvo a 65-70°C durante 15 min, se juntaron las reacciones, se hizo la extracción fenol-cloroformo, se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH 5.0 a -20°C, se lavó con etanol 70% y se resuspendió como ya se mencionó, el DNA fue cuantificado. Tanto el inserto como el vector se hicieron pasar por un gel de electroforesis de 1% para correlacionar la limpieza y la cuantificación con el espectrofotómetro. Las reacciones de ligación se hicieron utilizando relaciones vector-inserto de 1:3 y 1:5 respectivamente, procurando no exceder en la reacción una concentración total de DNA de 1 μ g y considerando la relación que existe entre el tamaño del inserto y el vector para plantear estas relaciones, para ello se utilizó la enzima T4 DNA ligasa y el buffer de la enzima a una concentración final de 1X y a un volumen final de 20 μ l. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente. Para la preparación y transformación de células competentes DH5 α se utilizó el protocolo de Hiroaki and Hiroshi 1990 (66) y las bacterias fueron inoculadas en cajas Petri con LB agarosa y Amp 200 μ g /ml .

Las colonias recombinantes fueron recuperadas y sembradas en cajas petri, para hacer inóculos en cultivo líquido LB agar y Amp 200 μ g/ml, permitiendo el aislamiento de los plásmidos por el método de lisis alcalina de acuerdo con el protocolo del kit para aislamiento de plásmido de QIAGEN. Una vez purificado el plásmido se sometió a análisis de restricción a través de la digestión de los sitios que flanquearon el inserto integrado a la secuencia del plásmido. Se determinó la secuencia de los plásmidos recombinantes para verificar la presencia del inserto, así como el marco de lectura. Para preservar las clonas se prepararon cultivos líquidos de las cepas recombinantes usando volúmenes de 5ml con antibiótico Amp 200 μ g/ml y mantenidos con agitación a 37°C para el crecimiento bacteriano, después se emplearon volúmenes de 1ml para preservar adicionando glicerol al 15% y manteniendo las alícuotas a una temperatura de -70°C.

Experimentos de expresión

Se llevaron a cabo expresiones transitorias empleando ovocitos de *Xenopus laevis* (67). Las técnicas de inyección del mRNA para los registros electrofisiológicos de ovocitos han sido previamente descritas (68-70). Los ovarios de las ranas de *Xenopus laevis* (obtenidas de Ann Arbor Michigan) fueron disectados por incisión ventral en donadores anestesiados por hipotermia. Los ovocitos (etapa VI) fueron removidos y mantenidos en

solución de Barth Normal (NaCl 88mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2.4mM, CaNO₃ 0.33mM, CaCl₂ 0.41mM, MgSO₄ 0.82mM, HEPES 5mM, gentamicina 70 µg/ml, pH 7.4 con NaOH). Los ovocitos fueron tratados con colagenasa 0.5 mg/ml en una solución Ringer Normal (NaCl 115mM, KCl 1mM, CaCl₂ 1.8mM, HEPES 5mM, pH 7.0 con NaOH) por 45 minutos, y todas las capas foliculares fueron removidas usando pinzas de punta fina. Los cRNAs fueron preparados usando el sistema de alta producción de Transcripción T7 RNA mMESSAGEmMACHINE y disueltos en H₂O (c.a. 1ng/ml), este consistió fundamentalmente en cuatro etapas, la purificación del plásmido por el método ya mencionado, la reacción de linearización de los vectores que se llevó a cabo utilizando 10 µg del DNA por reacción, el buffer de reacción de la enzima a una concentración final de 1X, 1µl (10 unidades) de enzima Pme I (vector TOPO 4) Pst I (vector pxenex1) en un volumen de 100 µl. Para la reacción de transcripción *in vitro* se adicionó 2X NTP/Cap, buffer de reacción a una concentración final de 1X, DNA templado lineal 1 µg, enzima 2 µl, se mezcló por centrifugación y se incubó durante 2h a 37°C, se centrifugó y adicionó 1 µl de DNasa I, y se mezcló bien, se incubó durante 15 min. Se adicionó agua libre de nucleasa y solución stop de acetato de amonio, se mezcló, se llevó a cabo la extracción con un volumen de fenol cloroformo y luego de cloroformo, se precipitó con un volumen de isopropanol, se congeló por al menos 15 min a -20°C, se recuperó la pastilla y sin lavar se resuspendió en agua libre de nucleasa. Se almacenó a -20°C ó -70°C, se llevó a cabo la cuantificación utilizando la fórmula $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$. El RNAm fue cargado en geles de agarosa al 1% en presencia de formaldehído.

Los ovocitos inyectados con 50 nl fueron mantenidos en medio de Barth Normal a temperatura ambiente por 36h. Las corrientes iónicas fueron registradas y los cambios morfológicos fotografiados. Después que este tiempo ha transcurrido los ovocitos fueron separados en tres grupos e incubados en: 1) Medio de Barth Normal, 2) Medio de Barth libre de Ca²⁺ (NaCl 88mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2.4mM, MgSO₄ 0.82mM, MgCl₂ 4.2mM, HEPES 5mM, gentamicina 70 µg/ml, pH 7.4 con NaOH) y 3) Medio de Barth libre de Ca²⁺ con 5µM de tapsigargina (compuesto sesquiterpeno y lactona bloqueador de la ATPasa de Ca²⁺ de la membrana del retículo endoplásmico). Además, los grupos de ovocitos control incluyeron ovocitos que no fueron sometidos a inyecciones. Para cada una de las condiciones mencionadas previamente, tres ovocitos de cada grupo fueron fijados en medio de Barth Normal con glutaraldehído 4% a diferentes tiempos y visualizados con un microscópio

estereoscópico digital. Para evaluar el flujo de Ca^{2+} los registros electrofisiológicos de los ovocitos de cada grupo fueron realizados después de 2-5 h de incubación en tapsigargina usando la técnica voltage-clamp de dos electrodos (71) y aplicando pulsos de 10mM CaCl_2 sustituido por MgCl_2 en solución Ringer- Mg^{2+} (MgCl_2 75mM, HEPES 5mM pH 5). Todos los datos son presentados como la media \pm SEM y las diferencias entre dos grupos fueron analizadas para significancia estadística usando pruebas estadísticas. Los valores $p \geq 0.05$ fueron aceptados indicando significancia estadística.

Tinción de Cortes Histológicos con Naranja de Acridina

Algunos de los ovocitos obtenidos de las diferentes condiciones experimentales fueron fijados en solución de glutaraldehído 4 % (v/v) en medio de Barth Normal a diferentes tiempos: 0h de inyección, 36h de inyección y 60h de inyección. Estos fueron utilizados para tomar fotografías mediante microscopía estereoscópica y tratados por la técnica de cortes por congelación con un crióstato en la Unidad de Histología que está a cargo de Federico Jandete García del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los cortes fueron colocados en portaobjetos y teñidos con naranja de acridina (200 $\mu\text{g/ml}$) (72), para ser fijados con Dako. Las imágenes fueron obtenidas usando microscopía de fluorescencia.

Medición de actividad de caspasas 3 y 7

Después de completar 36h de inyección y 8-9h de incubación con tapsigargina 5 μM , 12 ovocitos de cada grupo fueron congelados a -70°C , para llevar a cabo los experimentos de medición de actividad de caspasas 3 y 7, lo cual se hizo utilizando el reactivo Z-DEVD-AFC de Molecular Probes; el cual es un sustrato de corte para las caspasas, estos experimentos consistieron en el siguiente procedimiento:

El reactivo Z-DEVD-AFC de Molecular Probes (5mg) fue resuspendido en 0.5 ml de DMSO para tener una concentración 12mM, el cual fue protegido de la luz y almacenado a -20°C . Los ovocitos se sacaron de -70°C y se mantuvieron en hielo, cada tubo contuvo 12 ovocitos. Los ovocitos fueron homogenizados en buffer de lisis (50mM buffer HEPES pH 7.5; el cual contuvo 10% (w/v) de sacarosa y 0.1% (v/v) de tritón X-100); se agregó a cada tubo 150 μl del buffer de lisis, se agitó suavemente cada uno de los tubos permitiendo

descongelar totalmente los ovocitos; con ayuda de la micropipeta se rompieron los ovocitos y se mezclaron con el buffer de lisis; éstos son mantenidos en hielo. Se centrifugaron los tubos conteniendo el lisado celular de ovocitos en una microfuga a 5000-7000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C; se recuperó la fase acuosa (150-200 µl), la cual se diluyó diez veces con PBS agregando 1350 µl; se homogenizó agitando suavemente los tubos de 4-6 veces; se agregaron 1.5 µl de DTT 1 M para tener una concentración final de 1mM; se agitó suavemente por inversión de 4-6 veces. Del reactivo Z-DEVD-AFC descongelado en hielo se tomaron 3.75 µl para tener una concentración final del mismo de 30 µM, y se agregó éste volumen a cada tubo, se agitaron los tubos por inversión y se colocaron a 37°C durante 30-60 minutos. Se sacaron los tubos de 37°C y se midió la fluorescencia, de acuerdo con el protocolo de Molecular Probes, fueron considerados 400 nm de absorción y 505 nm de emisión, nosotros encontramos que la longitud de onda máxima de absorción fue de 488 nm.

Resultados y Discusión

Apoptosis en Células LNCaP

Tomando en cuenta que la eliminación de factores de crecimiento del medio de cultivo puede generar muerte celular programada, este procedimiento ha sido probado como una forma efectiva para activar apoptosis. Durante el desarrollo de este estudio empleamos este mismo estímulo para inducir la apoptosis en las células LNCaP. Este evento fue evidenciado utilizando los siguientes parámetros: viabilidad celular, patrón de degradación en escalera típico de apoptosis y cambios en la morfología celular medidos por citometría de flujo, análisis morfológico de ovocitos de *Xenopus laevis*, registros electrofisiológicos y mediciones de actividad de caspasas. La viabilidad celular comenzó a decaer a un tiempo mínimo de incubación sin suero de 16h y se acentuó a las 72h (Figura 5A).

El patrón en escalera del DNA fragmentado típico de apoptosis fue evidente a partir de las 16h (Figura 5B). Estos experimentos permitieron llevar a cabo los ensayos de citometría de flujo, para los que se emplearon solamente tiempos de incubación sin suero de 16 y 72h. Las células control presentan dos poblaciones mayoritarias la primera de 58.6 (cuadrante inferior izquierdo) y la segunda de 29.8% (cuadrante superior derecho) (Figura 6A) y si comparamos con las células en suspensión inducidas a apoptosis existe un aumento en la primera población de 89% (cuadrante inferior izquierdo) y una disminución en la segunda a 3.5% (cuadrante superior derecho) (Figura 6B). Sin embargo, cabe mencionar que las células inducidas por 72h mostraron las mismas poblaciones, sólo que presentaron mayor fragilidad desde que fueron tripsinizadas y por lo tanto presentaron un porcentaje aún más bajo de viabilidad celular. A los tiempos de 16 y 72h de la eliminación del suero del medio de cultivo, el incremento en dispersión de luz lateral (SSC-H) (cuadrante inferior izquierdo) (Figura 6B) reveló granularidad celular aumentada. La disminución en dispersión de luz directa (FSC-H) (cuadrante superior derecho) fue el resultado del encogimiento y la fragmentación celular (Figura 6B). Estos cambios morfológicos son característicos del mecanismo apoptótico (55).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, las células son inducidas al mecanismo de apoptosis a partir de las 16h en que son incubadas en la ausencia de suero.

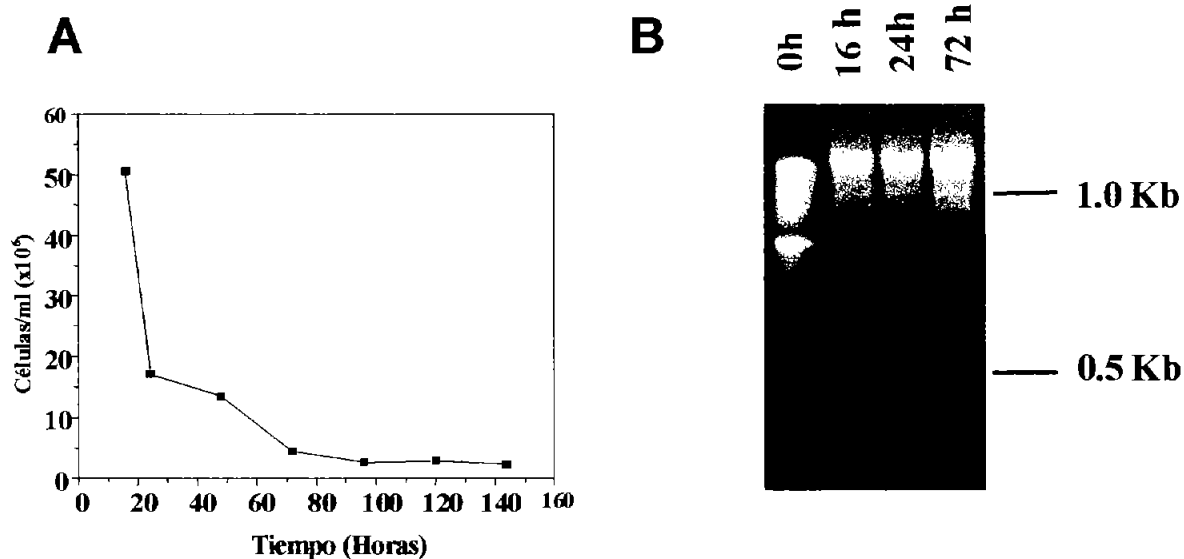


Figura 5. Progresión de apoptosis en células LNCaP. (A) Viabilidad celular de células inducidas a apoptosis por remoción de suero durante el cultivo celular por 16, 24, 48, 72, 96, 120 y 144h. (B) Electroforesis gel de agarosa 2% (w/v) mostrando degradación de DNA. Control (carril 1); remoción de suero del medio de cultivo de células LNCaP a 16, 24, 72h (carriles 2-4). Marcador de Peso Molecular (GIBCO BRL DNA).

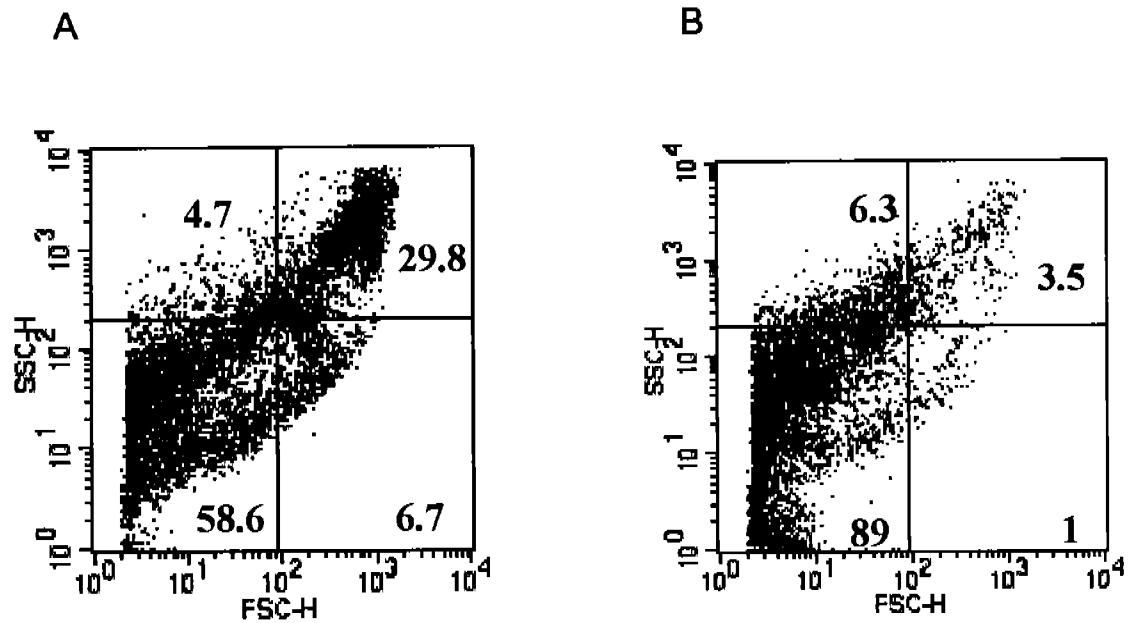


Figura 6. Experimentos de Citometría de Flujo. A) Citometría de flujo de células control. B) Citometría de flujo de células mantenidas sin suero durante 16h.

Western blots

Las células LNCaP incubadas durante 16h en la ausencia de suero fueron usadas para estudiar los niveles de expresión de diferentes proteínas membranales asociadas con apoptosis. Por lo que para detectar miembros representativos de grupos de canales o receptores asociados con el mecanismo apoptótico con estructuras similares a canales permeables a Ca^{2+} (33), se midieron los niveles de expresión de dos tipos de receptores purinérgicos, el receptor P2X1, que no presentó diferencia alguna en los niveles de expresión entre las células inducidas a apoptosis y células control (Figura 7A). El otro tipo de receptor purinérgico que se consideró fue el receptor purinérgico P2X7, que presentó mayor expresión en las células control que en células inducidas a apoptosis (Figura 7B). Estos resultados correlacionan con los hallazgos de Slater *et al.* 2000 (73), quienes encontraron que los receptores P2X1, 2, 5, 7 son regulados en forma negativa durante el proceso de apoptosis. Sin embargo Nihei *et al.* en el año 2000 (74), reportaron el posible papel de P2X7 en la inducción a apoptosis de células dendríticas murinas. En cambio receptores como P2X3, 4 y 6 son regulados positivamente durante el mecanismo de apoptosis en la próstata de rata de edad avanzada (73). Para algunos tipos celulares, P2X7 podría tener un papel importante en la inducción a apoptosis y entonces probablemente P2X7 sea de importancia sólo durante las primeras horas del evento apoptótico. Los resultados obtenidos con el anticuerpo antibax demostraron mayor expresión en las células inducidas, evidenciando y apoyando el desarrollo del mecanismo de apoptosis en este tipo celular (Figura 7C).

El canal de entrada capacitativa de Ca^{2+} TRPC1 considerado como un miembro representativo y arquetípico de este grupo de canales presentó un nivel de expresión mayor en condiciones de apoptosis al ser comparado con el control (Figura 7D) (60).

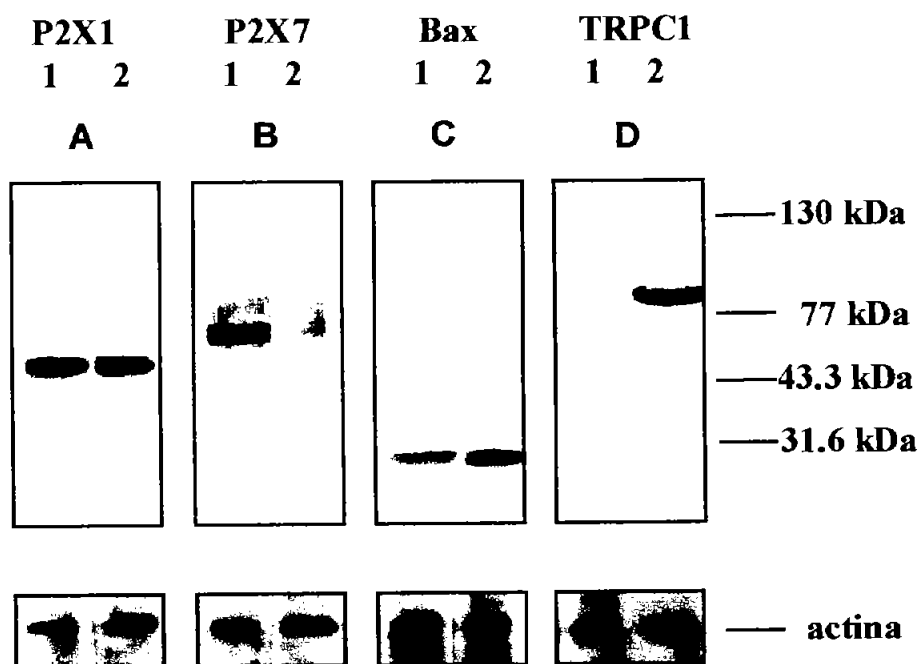


Figura 7. Western blot usando anticuerpos producidos contra moléculas relacionadas a apoptosis. (A) Anticuerpo Anti- P2X1. (B) Anticuerpo Anti-P2X7. (C) Anticuerpo Anti-bax. (D) Anticuerpo Anti-TRPC1. Carril 1; Lisado celular de células LNCaP incubadas en medio RPMI 1640 conteniendo suero fetal bovino. Carril 2; Lisado celular de células LNCaP incubadas en medio RPMI 1640 sin suero durante 16h. El anticuerpo para actina fue usado como un control de carga en todas las condiciones. Este es un experimento representativo de al menos cinco repeticiones.

Esto nos permite destacar la probable participación de estos canales de entrada capacitativa de Ca^{2+} , en el mantenimiento de los niveles aumentados de calcio durante etapas tempranas del mecanismo de apoptosis en la línea celular LNCaP independiente de andrógeno. Sin embargo, cabe considerar que en los estudios del grupo de Wertz and Dixit (75) así como del grupo de Skryma *et al.* (76) ambos publicados en el año 2000, se demostró que las células LNCaP dependientes de andrógeno desarrollan apoptosis por liberación de calcio de los almacenes intracelulares sin que niveles aumentados de calcio promovidos por canales de membrana citoplásmica sean necesariamente un prerrequisito para efectuar el evento apoptótico. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, el grupo de canales de entrada capacitativa de Ca^{2+} pudiera estar asociado con el canal reportado originalmente por nuestro grupo (32), siendo de gran importancia la participación de los canales semejantes a TRPC1 en la génesis y desarrollo del mecanismo de apoptosis en las células LNCaP independientes de andrógeno. En consecuencia esta familia de canales fue considerada para la selección de regiones específicas y regiones consenso para efectuar la clonación de nuevos canales o proteínas asociadas.

Clonación de *arp1* y *arp2*

Los oligonucleótidos para las reacciones de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron elegidos de secuencias de nucleótidos específicas y degeneradas de miembros de canales de entrada capacitativa de calcio (47,63). Dos productos de PCR de aproximadamente 1.3 Kb denominados "*apoptosis regulated protein*" 1 y 2 (*arp1* y *arp2*) fueron amplificados, clonados, aislados y secuenciados. Originalmente, debido a la diferencia mínima en el tamaño de las dos clonas aisladas *arp1* y *arp2* pensamos que éstas correspondían a una misma molécula. La secuenciación evidenció la posibilidad de estudiar los cambios pequeños pero críticos entre los cDNAs *arp1* y *arp2*. Aunque los niveles de *arp1* no cambian entre condiciones control y apoptóticas, *arp2* mostró un incremento en su concentración cuando las condiciones apoptóticas fueron empleadas (Figura 8).

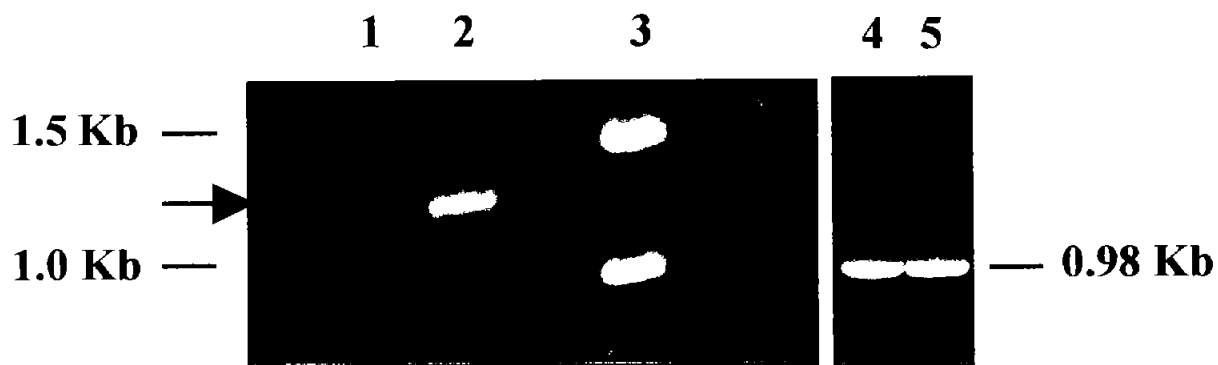


Figura 8. Productos de PCR de las clonas *arp1* y *arp2*. Electroforésis en gel de agarosa 1% (w/v). Carril 1; producto de PCR de *arp2* de las células creciendo en la presencia de suero (control). Carril 2 ; Producto de PCR de *arp2* de las células creciendo en la ausencia de suero. Carril 3; Marcador de peso molecular (GIBCO BRL, DNA 1Kb). Carril 4; producto de PCR de GAPDH de las células creciendo en la presencia de suero. Carril 5; producto de PCR de GAPDH de las células creciendo en la ausencia de suero.

Las proteínas codificadas por estos cDNAs fueron nombradas ARP1 y ARP2. El número de acceso del GenBank para la Proteína Reguladora de Apoptosis 2 (ARP2) es AY486134 y para la Proteína Reguladora de Apoptosis 1 (ARP1) es, AY486135. El programa FASTA fue empleado para efectuar la comparación de los cDNAs *arp1* y *arp2* con el banco de datos (57), donde las clonas *arp1* y *arp2* mostraron homología con un fragmento del factor de procesamiento de corte y empalme del pre-mRNA (splicing) Prp8 (7.0 Kb) que corresponde a un 18% de la secuencia nucleotídica completa del cDNA Prp8. Lo cual de manera específica corresponde del nucleótido 13 de *arp1* y *arp2* con el nucleótido 4591 del factor de splicing Prp8 (77). La homología finaliza con el nucleótido 1309 de nuestras clonas y el nucleótido 5887 del Prp8 humano (Figura 9).

Dentro de este intervalo que aproximadamente corresponde al 18% de la molécula Prp8 completa, *arp1* y *arp2* comparten homología del 99% (Figura 10).

Aunque la homología entre las clonas *arp1* y *arp2* corresponde al 99%, varios cambios entre su secuencia nucleotídica (Figura 10) causan que las proteínas presenten diferencias que parecen ser relevantes cuando la función es estudiada (Figura 11). De forma interesante, el análisis de secuencia de aminoácidos para el tercer marco de lectura de las proteínas ARP1 y ARP2 también mostraron una homología del 99% con el mismo fragmento del factor de splicing humano Prp8 (77). La predicción de hélices transmembranales y el análisis de hidrofiliidad de ARP1 y ARP2 usando el tercer marco de lectura, nos permitió evidenciar regiones específicas ricas en alfa hélices hidrofóbicas que probablemente se asocian a la membrana celular en una forma similar a como lo hacen los canales de membrana citoplasmática (Figura 12 y 13). Aunque no hay correlación directa entre las regiones membranales de una proteína tipo canal como htrp3 y ARP1 y ARP2, la predicción de hélices transmembrana y el análisis de hidrofiliidad de ambas proteínas, muestran varios segmentos de secuencia que probablemente sean compatibles con una proteína de membrana (Figura 13).

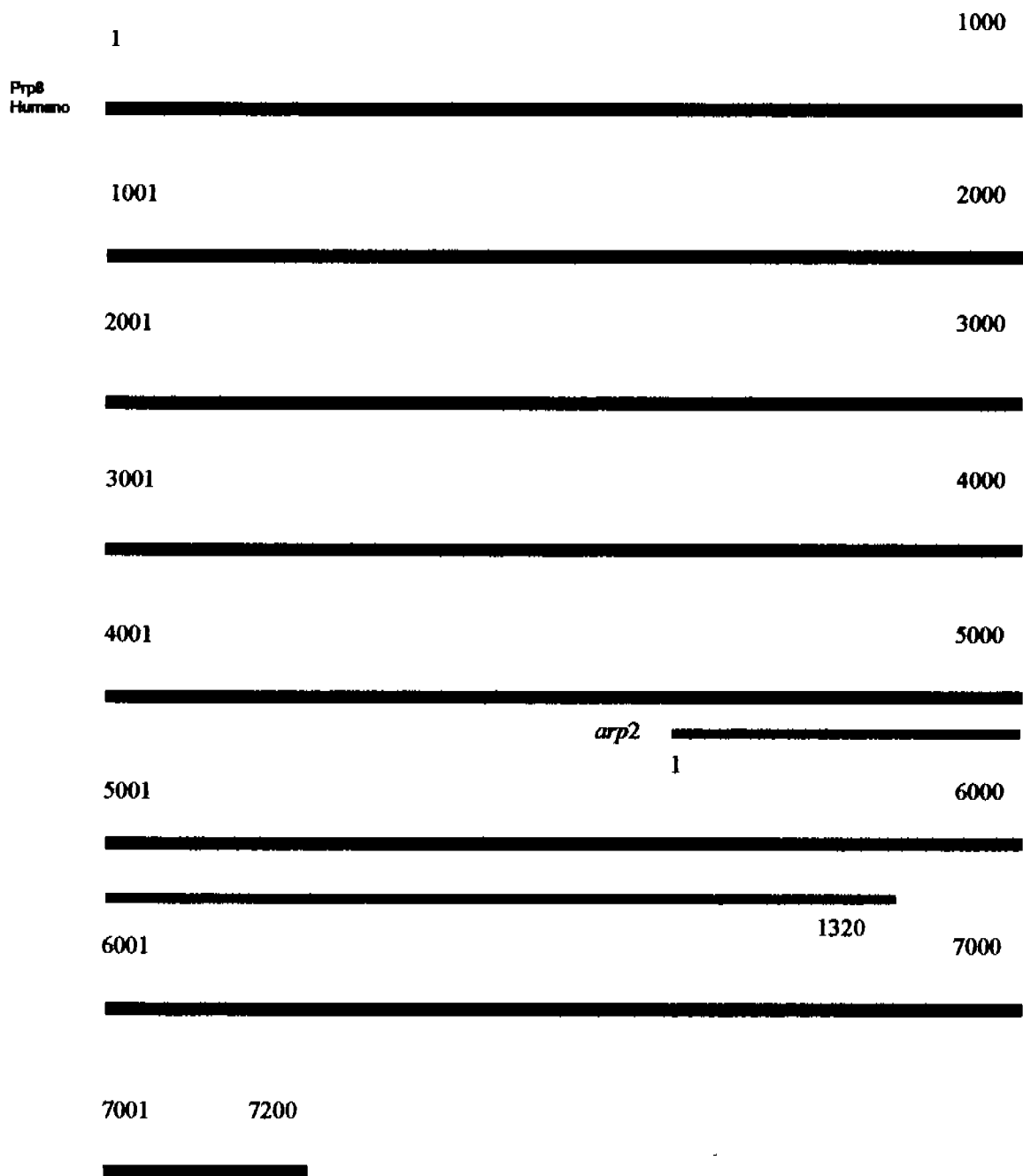


Figura 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de *arp2* y Prp8 representando que *arp2* corresponde a un fragmento pequeño de Prp8.

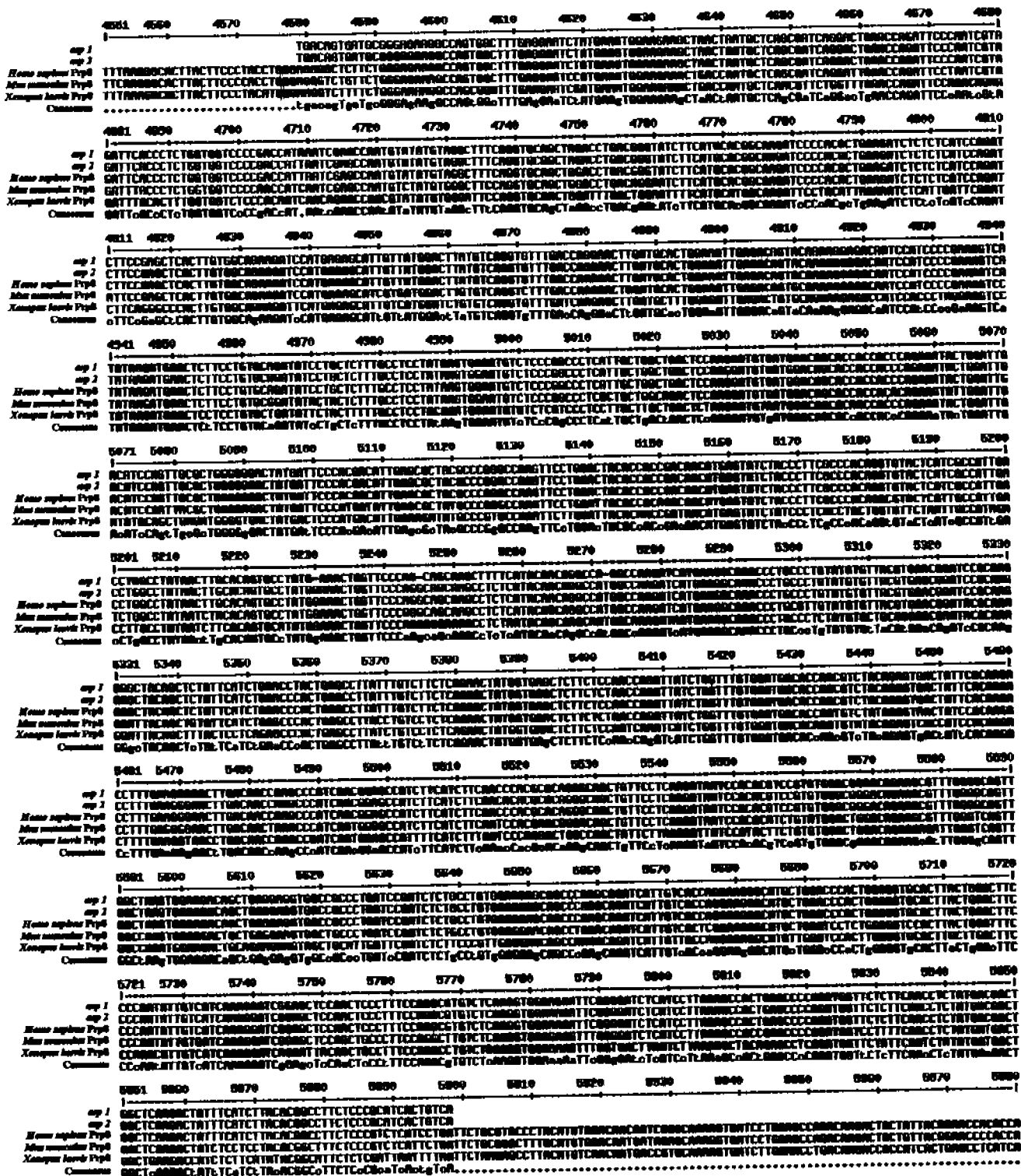


Figura 10. Alineamiento de secuencia nucleotídica para *arp1*, *arp2* y *Prp8* de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Xenopus laevis*. Región presentada en rojo representa un alineamiento perfecto entre las secuencias. La región presentada en azul muestra los nucleótidos parcialmente similares entre secuencias, y regiones mostradas en negro representan nucleótidos diferentes.


```

ARP1  1  MREKASGFEE SMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60
MREKASGFEE SMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60
ARP2  1  MREKASGFEE SMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60

ARP1  61  MHGKIPTLKI SLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120
MHGKIPTLKI SLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120
ARP2  61  MHGKIPTLKI SLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120

ARP1 121  MNSSCADILLEFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDS TTTQKYWIDIQLRWGDYDSDHDIERYAR 180
MNSSCADILLEFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDS TTTQKYWIDIQLRWGDYDSDHDIERYAR 180
ARP2 121  MNSSCADILLEFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDS TTTQKYWIDIQLRWGDYDSDHDIERYAR 180

ARP1 181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLLAIDLAYNLHSAYET---GSQ---QQA FHTTGQAKIMKA 234
AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLLAIDLAYNLHSAY   GS+   QQA   AKIMKA
ARP2 181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLLAIDLAYNLHSAYGNWFPGSKPLIQQA-----MAKIMKA 235

ARP1 235  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPT EPYLSSQNYGELF'SNQI IWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 294
NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPT EPYLSSQNYGELF'SNQI IWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 294
ARP2 236  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPT EPYLSSQNYGELF'SNQI IWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 295

ARP1 295  NLTTKPINGAIFIFNPRTGQFLKLIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEEVAALIRSLPVEE 354
NLTTKPINGAIFIFN RTGQFLKLIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEEVAALIRSLPVEE
ARP2 296  NLTTKPINGAIFIFNTRTGQFLKLIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEEVAALIRSLPVEE 355

ARP1 355  QPKQIIVTRKGM LDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEEFGDLILKATEPQMV L 414
QPKQIIVTRKGM LDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVE+FGDLILKATEPQMV L
ARP2 356  QPKQIIVTRKGM LDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEKFGDLILKATEPQMV L 415

ARP1 415  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 436
FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV
ARP2 416  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 437

```

Figura 11. Alineamiento de aminoácidos entre ARP1 y ARP2. Secuencias mostradas en azul representan una región de 20 aminoácidos donde las secuencias no presentan similitudes.

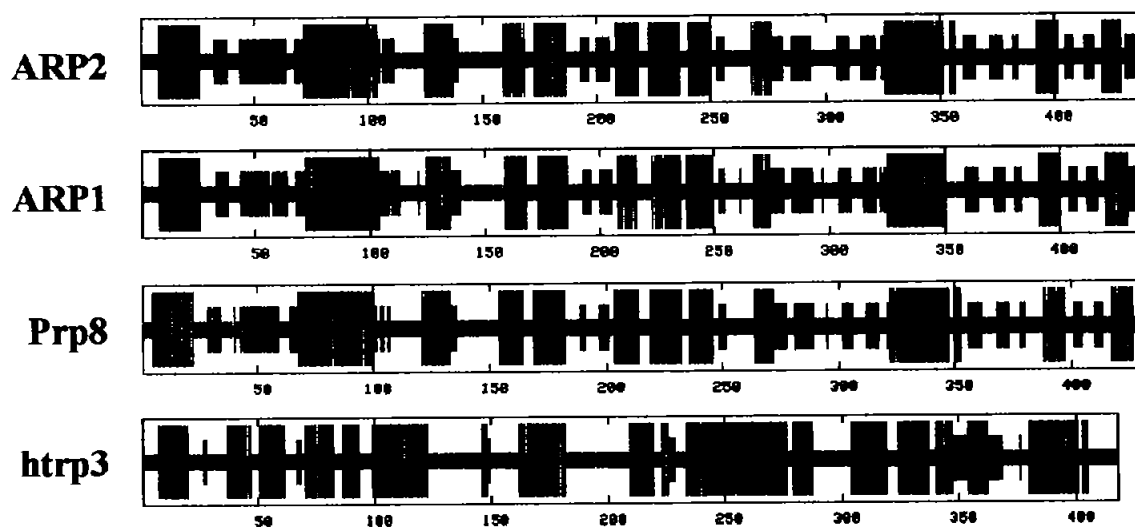


Figura 12. Análisis de predicción de estructura secundaria y alineamiento de secuencia de ARP2, ARP1, Prp8 y htrp3. Barras azules (α -hélice), barras rojas (Lámina- β) y barras moradas (estructura al azar).

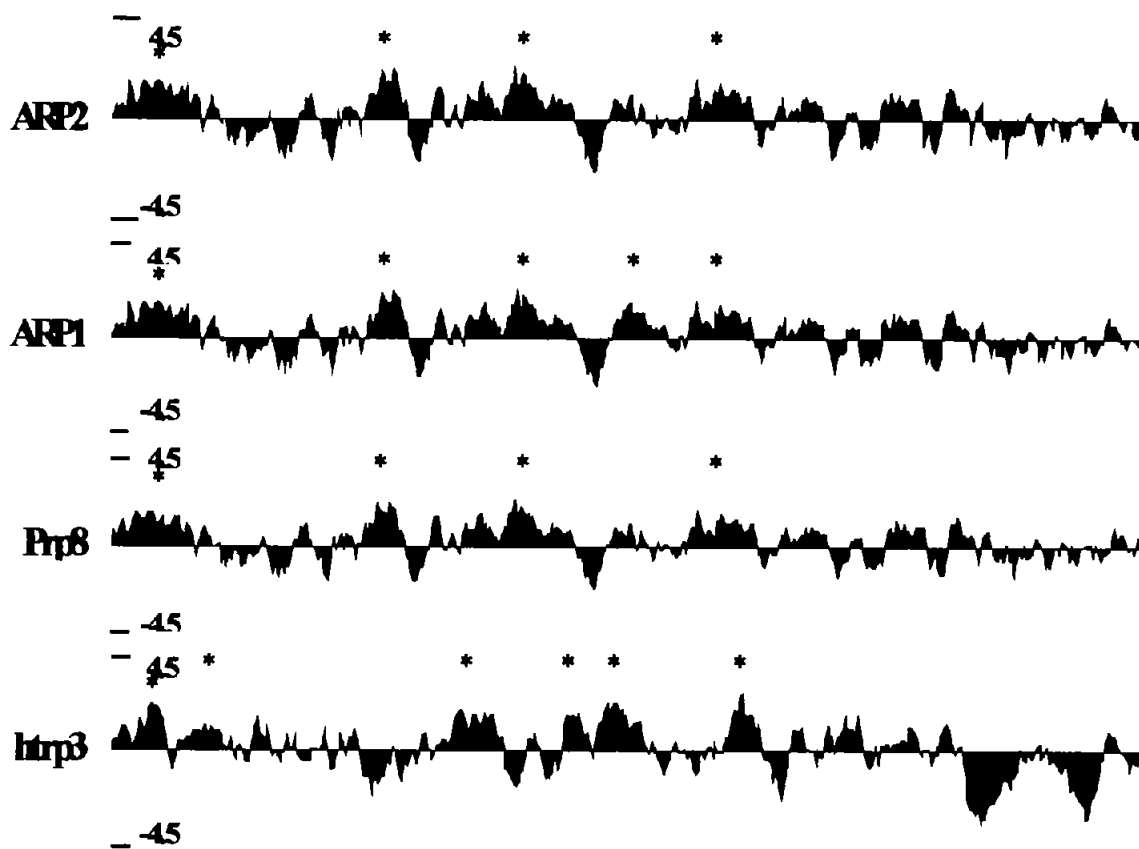


Figura 13. Análisis de hidrofiliidad de proteínas ARP2, ARP1, Prp8 y trp3. Regiones con aminoácidos mostrando valores entre 0 y 4.5 son considerados hidrofóbicos, mientras que los aminoácidos localizados entre los valores de 0 y -4.5 son considerados hidrofílicos. Los asteriscos representan probables sitios transmembranales con 26.4 aminoácidos en promedio, de acuerdo con Bowie JU en 1997 (78).

Experimentos de expresión heteróloga

Los cambios morfológicos en los ovocitos incluyeron la formación de ampollas, a partir de las 12h después de la inyección (Figura 14A) la pérdida en la definición de los polos animal y vegetal, y la formación de cuerpos apoptóticos desde las 36h de inyección más 24-48h de incubación con taspigargina (Figura 14B). Los cambios morfológicos fueron observados de manera consistente en todos los grupos de ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* (Figura 14A) y resultaron ser más evidentes en ovocitos tratados con taspigargina (Figura 14B). De manera simultánea a estos cambios morfológicos, los ovocitos presentaron una fuerte disminución en el potencial de reposo de la membrana, cambiando de un valor control de -46.8 ± 6.6 mV a -5.9 ± 3.4 mV (5-8 ovocitos, 2 ranas).

El grupo de ovocitos (n=3) inyectados con el mRNA *arp1* no mostró disminución en el potencial de membrana (-43 ± 5 mV) ni cambios morfológicos. Cabe mencionar que estos datos no se muestran debido a que se trata de los primeros experimentos de inyección en ovocitos que llevamos a cabo, los cuales inicialmente nos indujeron a pensar que la expresión del mensajero *arp1* era inocua para los ovocitos, sin embargo dados estos resultados fue que decidimos iniciar con los experimentos de inyección del mRNA *arp2*. Los cambios observados en ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* se potenciaron cuando las células fueron incubadas con taspigargina, acelerando el proceso de daño, el cual fue evidente por la pérdida de la definición de los polos animal y vegetal que como ya había sido mencionado aparecen alrededor de las 36h después de la inyección del mRNA *arp2* y 8 h después de la incubación con taspigargina (Figura 14B). Algunos cambios similares de tipo morfológico y bioquímico asociados con el mecanismo de apoptosis así como datos de depolarización de la membrana celular han sido descritos en ovocitos de *Xenopus* cuando fueron inyectados con citocromo c (79).

Este reporte establece que la inyección de esta molécula es una forma de inducir a estas células al mecanismo apoptótico, de la misma manera como sucede a los ovocitos inyectados con la molécula pro-apoptótica Bcl-xs (80). Es importante señalar que la inyección del mRNA *arp1* a los ovocitos no mostró los efectos morfológicos y eléctricos generados por el mRNA *arp2*. A pesar de la gran homología de secuencia observada entre ARP2 y ARP1 desde un punto de vista de estructura secundaria, los cambios encontrados entre ambas proteínas resultaron ser críticos, dado que ARP1 parece no desarrollar el fenómeno de apoptosis tan eficientemente como ARP2 como ya antes había sido mencionado. Mediante el uso de la técnica de tinción con naranja de acridina (72), se

evidenciaron cambios morfológicos en el núcleo de los ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* como se muestra en la figura 14C. Estos núcleos mostraron formas elongadas y la condensación de la cromatina estuvo presente desde 36h hasta 60h de inyección, mientras que los ovocitos control de las mismas ranas (los ovocitos no inyectados) no mostraron estas características (n=2, 2 ranas). La inyección del mRNA *arp2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, produjo un ligero aumento en el flujo de calcio a través de la membrana plasmática cuando los reservorios intracelulares de Ca^{2+} fueron vaciados por la incubación con tapsigargina. Los ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* luego de la aplicación de pulsos de Ca^{2+} generaron corrientes membranales que mostraron ser ligeramente aumentadas a $122\pm 90\%$ cuando se compararon con los ovocitos control (Figura 15). Los ovocitos inyectados con el mRNA *arp1* no mostraron alguna diferencia con respecto a los ovocitos control no inyectados.

Las corrientes observadas fueron aparentemente debido a la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} lo cual se explica debido a que los datos del potencial de inversión denotan este tipo de corrientes, las cuales se activan sólo después de que canales de membrana permeables a Ca^{2+} han sido activados y la concentración de este ión se incrementa dando origen a la activación de los canales de Cl^- . Dadas las condiciones del experimento proponemos que la tapsigargina aumentó la activación de corrientes capacitativas en los ovocitos inyectados. Estos resultados apoyan la idea de que *arp2* codifica para una molécula semejante a un canal Trp asociada al vaciamiento de almacenes del retículo endoplásmico (47,63), o que ARP2 pudiera corresponder a una molécula que indirectamente modula un canal nativo.

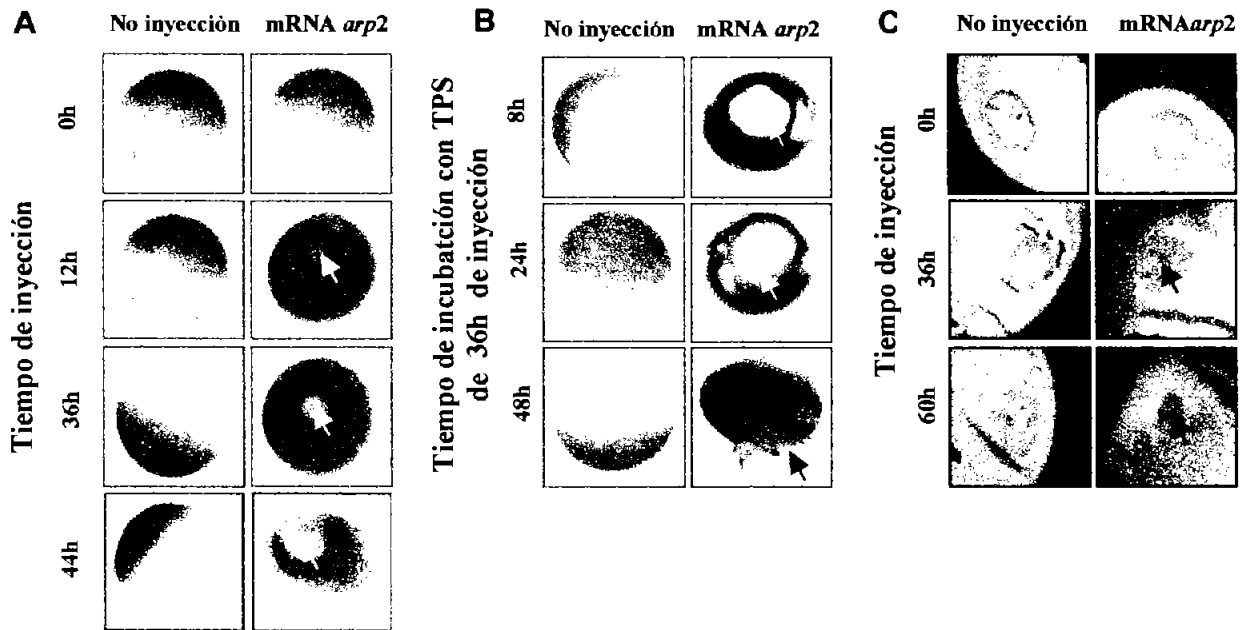


Figura. 14. Cambios morfológicos de ovocitos de *Xenopus laevis* relacionados con apoptosis después de la inyección del mRNA *arp2*. (A) Inducción de muerte celular en ovocitos de *Xenopus laevis* por microinyección del mRNA *arp2*. Las columnas verticales corresponden a ovocitos que no recibieron inyección y ovocitos inyectados con el mRNA *arp2*. Las líneas horizontales muestran tiempos de inyección (0h, 12h, 36h, 44h). Las flechas amarillas muestran la formación de ampollas. (B) Progresión de muerte celular en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el mRNA *arp2* e incubados con taspargina (5µM). Las columnas verticales muestran ovocitos sin inyección e inyectados con el mRNA *arp2*. Las líneas horizontales muestran tiempos de incubación con taspargina 5µM desde 36h de inyección y 8, 24 y 48h de incubación con taspargina. Las flechas amarillas muestran la formación de ampollas y la flecha negra probables cuerpos apoptóticos. (C) Cambios morfológicos en el núcleo de ovocitos de *Xenopus laevis* observados después de la inyección del mRNA *arp2*. Las columnas verticales muestran secciones histológicas de ovocitos no inyectados, y ovocitos inyectados con el mRNA *arp2*. Las líneas horizontales muestran el tiempo de incubación después de la inyección de los mRNAs (0, 36, 60h). Las flechas negras muestran la condensación de la cromatina.

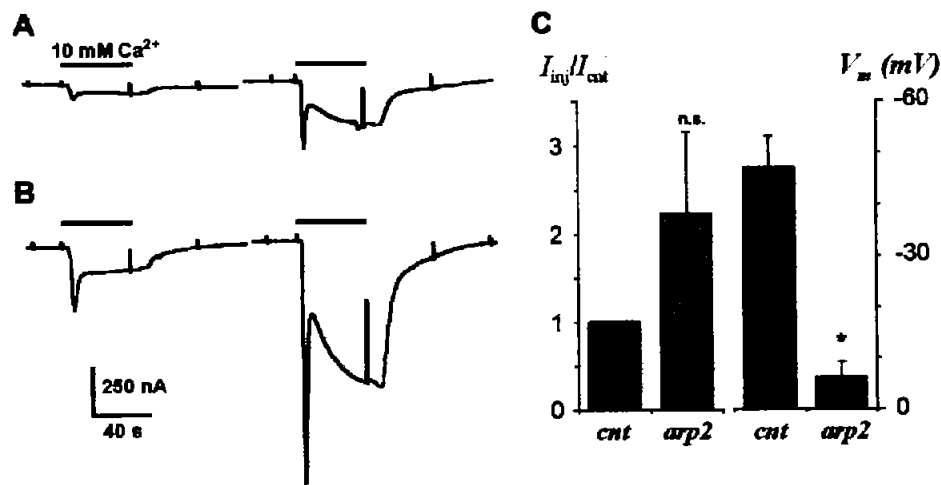


Figura 15. Expresión funcional del mRNA *arp2* en ovocitos de *Xenopus laevis*. Activación de corrientes generadas por dos pulsos consecutivos de 10 mM Ca²⁺ en medio-Ringer Mg²⁺, después de la incubación de los ovocitos en la ausencia de calcio y la presencia de 5 μM tapsigargina. (A) Ovocitos control sin inyección. (B) Ovocitos inyectados con el mRNA *arp2*. (C) Histograma mostrando el promedio de la corriente generada por los ovocitos control (n=3) y ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* (n=6), así como el cambio en el potencial de reposo (V_m ; 8 ovocitos no inyectados) llevado a cabo en relación directa con el conjunto de cambios en morfología.

Dado que este aumento en corriente no fue estadísticamente significativo con el número de experimentos realizados, el efecto probablemente también esté relacionado a un cambio secundario producido por el disparo del mecanismo apoptótico.

Un análisis para conocer el estado metabólico de ovocitos inyectados consistió en la medición de la actividad presentada por las caspasas efectoras 3 y 7, las cuales es bien sabido están involucradas en el proceso de apoptosis (81). La figura 16 muestra la actividad de caspasas 3 y 7 en ovocitos no inyectados, y ovocitos inyectados con el mRNA *arp2*, así como el mRNA correspondiente al factor de elongación EF-1 α de *Xenopus laevis* el cual se asocia con el mecanismo apoptótico (82-84).

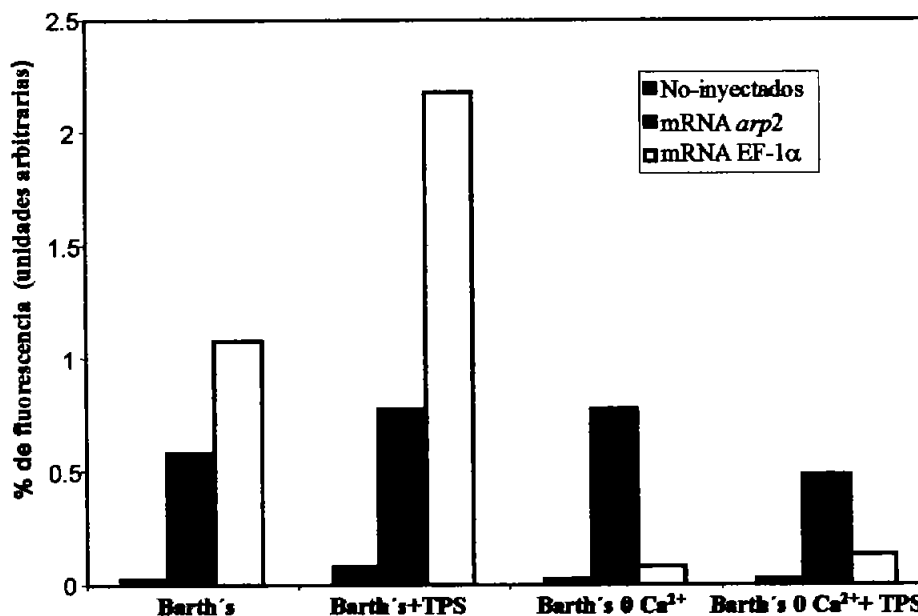


Figura 16. Actividad de caspasas 3 y 7 en ovocitos de *Xenopus laevis* inducidos a apoptosis por inyección del mRNA *arp2* y mRNA EF-1 α . Promedio de dos experimentos usando 3 ovocitos en cada una de las condiciones. Los experimentos fueron realizados en medio Barth's con o sin la presencia de calcio y tapsigargina.

Como se esperaba, los ovocitos no inyectados independientemente de la presencia o ausencia de calcio o taspigargina en el medio de incubación no expresan ninguna actividad de caspasas. Los ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* mostraron mayor actividad enzimática independientemente del protocolo de incubación (taspigargina, calcio, etc). En contraste, los ovocitos inyectados con el mRNA EF-1 α , mostraron la activación más alta de caspasas sensible a ambos taspigargina y calcio. Dado que en la ausencia de calcio la inyección del mRNA EF-1 α totalmente pierde la capacidad para activar caspasas (Figura 16). La sensibilidad a calcio probablemente indica que el proceso apoptótico causado por la expresión de ARP2 y la proteína expresada por el mRNA EF-1 α está relacionado a diferencias en sus vías de transducción apoptóticas. A este respecto, se ha reportado que la sobreexpresión del factor de transcripción E2F-1 promueve apoptosis en varios tipos celulares (85-86), y se ha propuesto que regula Apaf-1, una molécula crítica en la expresión de la vía apoptótica disparada por citocromo c (87-88).

DISCUSIÓN

La investigación molecular de una proteína semejante a un canal fue estimulada por hallazgos previos de nuestro laboratorio obtenidos mediante registros electrofisiológicos y mediciones simultáneas de calcio intracelular en células de cáncer de próstata de humano (línea celular LNCaP independiente de andrógeno) (32). Estos resultados originalmente nos permitieron identificar una proteína semejante a un canal catiónico no selectivo que fué permeable a calcio, y que solamente fué activado cuando dos inductores no relacionados de apoptosis fueron empleados (32) por lo que teniendo en cuenta las características electrofisiológicas reportadas del canal, proponemos que pudiera tratarse de un canal asociado con alguno de los grupos de canales catiónicos independientes de voltaje como lo son receptores purinérgicos, canales de entrada capacitativa de Ca^{2+} y algunas moléculas proapoptóticas como bax y que se asocian con el mecanismo de apoptosis (33), y que de acuerdo con nuestros resultados de Western blot evidenciamos que el grupo de canales más cercano al canal reportado previamente por el grupo (32) pudiera ser el de entrada capacitativa de Ca^{2+} , y es por esto que fueron considerados a los miembros de este grupo para orientar el desarrollo del proyecto hacia la caracterización molecular de canales nuevos y que pudieran asociarse con el mecanismo apoptótico en este tipo celular.

En esta tesis el cDNA *arp2* de una nueva proteína 2 reguladora de apoptosis (ARP2) semejante a un canal de células de cáncer de próstata independientes de andrógeno ha sido clonado y expresado el mRNA de este cDNA producido *in vitro* de manera exitosa en ovocitos de *Xenopus laevis*. En principio a través de este estudio establecimos que las células LNCaP independientes de andrógeno pueden ser inducidas a la muerte celular programada o apoptosis mediante la eliminación de suero del medio de cultivo, a partir de 16h de incubación, donde el cDNA *arp2* fué identificado en células inducidas a la apoptosis, aunque las células control bajo condiciones de cultivo normal parecen expresarlo en muy bajas concentraciones. En cambio, *arp1* fue expresado también en condiciones control como apoptóticas, en bajas concentraciones. Sin embargo, únicamente la expresión del mRNA *arp2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, a partir de las 36h de expresión más 4-5h de incubación con taspigargina promovió cambios en el potencial de membrana, corrientes de calcio provenientes del espacio extracelular a través de la membrana citoplásmica. Así como cambios morfológicos en los ovocitos, actividad de caspasas 3 y 7, los cuales son asociados con apoptosis (79,81). El cDNA *arp2* presentó una alta homología con un fragmento que corresponde al 18% de la

secuencia de nucleótidos del cDNA del factor de "splicing" Prp8. Prp8 reconoce el snRNA U5 , y se sabe que se une al RNA en el "spliceosoma", por lo que se reporta como crítico en los arreglos catalíticos del RNA (77,89). La homología de las clonas *arp1* y *arp2* con el fragmento de *Prp8* de diferentes especies tales como *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Xenopus laevis* existe entre el nucleótido 13 de nuestras clonas y el nucleótido 4591 de *Prp8*; finalizando con el nucleótido 1309 de nuestras clonas y el nucleótido 5887 de *Prp8* (Figuras 9 y 10). Dado que *arp1* y *arp2* fueron obtenidos usando oligonucleótidos de secuencias específicas y secuencias conservadas degeneradas del *trp3* humano (*htrp3*), existe la posibilidad de que la proteína ARP2 semejante a un canal y cuyo cDNA comparte una similitud importante a un fragmento de *Prp8* así como a un canal tipo *trp3* pudiera ser directamente responsable del aumento en corrientes de cloro dependientes de calcio observadas después de la inyección del ovocito y que de manera indirecta estas corrientes activadas de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ demuestran la activación previa de canales de Ca²⁺ en la membrana citoplásmica.

Alternativamente, ARP2 pudiera modular una proteína endógena que activa el mecanismo de apoptosis, sin embargo también es posible pensar que el aumento en el influjo de Ca²⁺ observado, es de hecho un efecto secundario durante este proceso, donde la proteína ARP2 participa en la activación de apoptosis en una etapa previa a la entrada de Ca²⁺. Entre los datos que sustentan nuestra hipótesis de que la proteína ARP2 se integra a la membrana estamos considerando el hecho de que teniendo en cuenta el tercer marco de lectura las estructuras secundarias de ARP1 y ARP2, son altamente relacionadas a proteínas de unión a calcio y en general a proteínas asociadas a la membrana plasmática dado que los sitios transmembrana consisten de regiones α -hélice bien definidas (78). Las gráficas de hidropatía demostraron que ARP2 presenta varias regiones hidrofóbicas compatibles en estructura secundaria y características de aminoácidos a secuencias transmembrana en una forma similar a la encontrada en canales (Figura 13).

También es importante notar que, el influjo de calcio en ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* probablemente ha sido subestimada debido al hecho que las células analizadas fueron aquellas en las cuales fué técnicamente posible realizar registros electrofisiológicos debido a una expresión baja de ARP2, i.e. no se consideraron ovocitos severamente dañados. En conclusión, nuestros resultados son consistentes con el hecho de que desde el punto de vista de secuencia de nucleótidos la proteína ARP2 corresponde a una forma trunca de *Prp8* y que presenta una estructura secundaria

compatible a una proteína semejante a un canal o proteína asociada a la membrana (47). Aún queda por comprobar si esta molécula funciona como un canal independiente o como una proteína asociada a la membrana que modula un canal endógeno del ovocito. Independientemente de ésta última posibilidad, los ovocitos inyectados con el mRNA *arp2* promovieron activamente el mecanismo de apoptosis al cual se asocian cambios morfológicos, bioquímicos y electrofisiológicos lo cual se cree que es favorecido por corrientes entrantes de calcio y evidenciado estrictamente por la activación de caspasas, ambos eventos relacionados a la progresión de apoptosis. En contraste, la inyección del mRNA *arp1* a ovocitos no promovió corrientes de calcio entrantes, disminución en el potencial de membrana, cambios morfológicos y bioquímicos asociados a apoptosis, ni activación de caspasas.

Desde el punto de vista de los cambios de secuencia observados entre ARP1 y ARP2 que pudieran originar rearrreglos de estructura secundaria, nosotros sugerimos que la isoforma ARP1 no es funcional por si misma debido probablemente a estos cambios. Sin embargo, dada la asociación sinérgica de las subunidades que componen los canales de entrada capacitativa de Ca^{2+} a través de la formación de homómeros o heterómeros de estas subunidades que conforman a los miembros de este grupo de canales (63), probablemente la proteína ARP1 requiere de la asociación de otras subunidades para ser funcional; por lo que proponemos para comprobarlo llevar a cabo la inyección simultánea de ambos mensajeros *arp1* y *arp2* en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Estos datos junto con el hecho de que el factor de elongación EF-1 α empleado por nosotros como un control positivo y que ha sido propuesto para modular la síntesis de proteínas (en particular mecanismos de traducción) y estar asociado con apoptosis, sugiere que los efectos sinérgicos de ARP2 probablemente sean llevados a cabo, primero, a través de la formación de un canal de membrana, o un complejo entre ARP2 y una molécula asociada a la membrana; y segundo, a través de los mecanismos de procesamiento del RNA asociados a la progresión de muerte celular apoptótica, debido al alto grado de homología encontrado entre ARP2 y un fragmento de Prp8. Creemos que ARP2 derivado de Prp8 corresponde a una molécula con una nueva función en eventos asociados a membrana y fenómenos relacionados a apoptosis o bien un fragmento de la proteína Prp8 el cual por si solo desencadena la muerte celular programada en este tipo celular.

Considerando que la proteína Prp8 es una proteína conservada y expresada de manera constitutiva en los organismos aún queda por demostrar si la sobreexpresión de

la proteína Prp8 induce a las células al mecanismo de apoptosis como es el caso de otras proteínas que intervienen en mecanismos que se relacionan con la producción de proteínas, y cuya expresión aumentada induce a la muerte celular a algunos tipos celulares, tal es el caso del factor de elongación-1 α (EF-1 α) (82-84) y el factor de transcripción 1 (EF-1) (85-86). Finalmente cabe mencionar que debido a que fueron inyectados en los ovocitos mRNAs producidos *in vitro* los cuales se encontraron insertados en el vector TOPO 4 que contiene el promotor para T7 y que evidentemente no contenía las señales postranscripcionales como el poli A, no se observaron cambios en los ovocitos.

Debido a las diferencias en los cambios promovidos por el mensajero del factor de elongación-1 α (EF-1 α) si comparamos con el mensajero para la proteína ARP2, consideramos que nuestra hipótesis inicialmente planteada ha sido demostrada, ya que el cDNA que codifica para esta proteína ha sido aislada de células LNCaP inducidas a la apoptosis y cuyo mensajero al ser inyectado en ovocitos de *Xenopus laevis* es capaz de inducir este mecanismo en estas células lo cual ha sido demostrado con múltiples evidencias. Sin embargo es preciso dilucidar la secuencia completa de nucleótidos del cDNA *arp2* que codifica para la proteína ARP2 para aclarar su relación con la proteína Prp8, esto puede ser llevado a cabo mediante el rastreo de una biblioteca de cDNAs (90) diseñada de las células LNCaP independientes de andrógeno inducidas a la apoptosis por eliminación de suero del medio de cultivo, o bien a través de la técnica de amplificación de extremos finales de cDNA (RACE) (91).

Así mismo otros experimentos que pudieran adicionar evidencias a la comprobación de nuestra hipótesis de trabajo es la inyección en ovocitos de *Xenopus laevis* de RNAs de interferencia (92) que permitan la inhibición de la expresión de la proteína ARP2 y por lo tanto comprobar la relevancia de su función en el mecanismo apoptótico en este tipo celular y probablemente otros. Para evidenciar el papel apoptótico de ARP2 en otros tipos celulares proponemos la transfección del cDNA en estos y el estudio de actividad de caspasas. Mientras tanto, los datos obtenidos durante el desarrollo del presente proyecto y que han dado origen a esta tesis señalan que ARP2 es una nueva proteína que se relaciona de manera muy importante en el desarrollo del mecanismo apoptótico en células cancerosas de próstata independientes de andrógeno (LNCaP). La continuación de nuestro estudio permitirá definir el papel de esta nueva proteína como marcadora de daño celular e inductora de muerte celular programada.

REFERENCIAS

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
2. Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995
3. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases Enemies Within. *Science* 281:1312-1316, 1998.
4. Williams GT, Smith CA: Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777-779, 1993
5. Thompson C: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995
6. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2239-2244, 1996
7. Green DR, Reed JC: Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998
8. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4997-5002, 1998
9. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.
10. O'Connor L, Huang D C, O'Reilly LA, Strasser A: Apoptosis and cell division. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 257-263, 2000
11. Fuentes-Prior P, Salvesen GS: The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem J.* (in press) 2004.
12. Salvesen GS, Dixit VM: Caspase activation the induced proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10964-10967, 1999

13. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S: Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 449-470, 1992
14. Demaurex N, Distelhorst C: Cell biology. Apoptosis-the calcium connection. *Science* 300: 65-7, 2003
15. McConkey DJ, Orrenius S: The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 357-366, 1997
16. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236:1, 1996
17. Evan G, Littkewood T: A Matter of Life and Cell Death. *Science* 281: 1317-1322, 1998
18. Caspari T: How to activate p53. *Current Biology* 10:R315-7, 2000
19. Wang XW: Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Research* 19: 4759-4771, 1999
20. Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495, 2000
21. Williams GT: Programmed Cell Death: Apoptosis and Oncogenesis. *Cell* 65: 1097-8, 1991
22. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R: Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13: 245-51, 1992
23. Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-30, 1993
24. Crawford ED: Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 62: 3-12, 2003
25. Connor J, Sawczuk IS, Benson MC, Tomashefsky P, O'Toole KM, Olsson CA, Buttyan R: Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell death. *Prostate* 13: 119-30, 1988

26. Martikainen P, Kyprianou N, Tucker RW, Isaacs JT: Programmed Death of Nonproliferating Androgen-Independent Prostatic Cancer Cells. *Cancer Research* 51: 4693-4700, 1991
27. Bruckheimer EM, Gjertsen, BT, Mc Donnell TJ: Implications of cell death regulation in the pathogenesis and treatment of prostate cancer. *Semin Oncol* 26: 382-398, 1999
28. Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E: Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot* 31: 815-9, 1978
29. Morgan AJ, Jacob R: Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 300: 665-72, 1994
30. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y: Ca^{2+} homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322: 1326-1335, 2004
31. Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT: The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 54: 6167-75, 1994
32. Gutiérrez A, Arias JM, García L, Mas-Oliva J, Guerrero A: Activation of a Ca^{2+} -permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line. *J Physiol* 517: 99-107, 1999
33. Tapia-Vieyra JV, Mas-Oliva J: Apoptosis and Cell Death Channels in Prostate Cancer. *Arch Med Res* 32: 175-185, 2001
34. Humphrey PPA, Buell G, Kennedy I, Khakh BS, Michel AD, Surprenant A, Trezise DJ: New insights on P2x purinoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 585-596, 1995
35. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D: Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5113-5117, 1993

36. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell GN: A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519, 1994
37. Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA, Buell GN: Characterization and Chromosomal Localization of a Human P2x Receptor from the Urinary Bladder. *Receptors and Channels* 3: 283-289, 1995
38. Nakazawa K, Liu M, Inoue K, Ohno Y: Potent inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *European Journal of Pharmacology* 325: 237-243, 1997
39. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN: A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-431, 1995
40. Soto F, García-Guzmán M, Gómez-Hernández JM, Hollmann M, Karschin Ch, Stuhmer W: P2x4: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad* 93: 3684-3688, 1996
41. García-Guzmán M, Soto F, Laube B, Stuhmer W: Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2x purinoceptor. *FEBS Letters* 388: 123-127, 1996
42. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: The Cytolytic P2z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2x Receptor (P2x7). *Science*. 272: 735-738, 1996
43. Parekh AB, Penner R: Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930, 1997
44. Putney JW: Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium* 21:257-61, 1997
45. Putney JW: TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14669-71, 1999
46. Berridge MJ: Capacitative calcium entry. *Biochem. J* 312: 1-11, 1995

47. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L: trp a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85: 661-671, 1996
48. Xu XZ, Li HS, Guggino WB, Montell C: Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89: 1155-64, 1997
49. García RL, Schilling WP: Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 279-83, 1997
50. Sinkins WG, Estacion M, Schilling WP: Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J* 331:331-9, 1998
51. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5113-8, 1997
52. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A.M, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277:370-2, 1997
53. Horoszewics JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43: 1809-1818, 1983
54. Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, Prentki M, Roche E: Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 144: 335-345, 2003
55. Khan A, Soloski M, Sharp A, Schilling G, Sabatini D, Li S, Ross Ch, Snyder S: Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1 4 5-trisphosphate receptor. *Science* 273: 503-507, 1996
56. Bairoch A, Apweiler R: The swiss-prot protein sequence data bank and its new supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res* 24: 21-25, 1996

57. Pearson WR, Lipman DJ: Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2444-2448, 1988
58. Longhurst PA, Schwegel T, Folander K, Swanson R: The human P2X1 receptor: molecular cloning tissue distribution and localization to chromosome 17. Biochim Biophys Acta 1308: 185-188, 1996
59. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, Alan North R, Surprenant A: The Permeabilizing ATP Receptor P2X7 Cloning and Expression of a Human cDNA. J Biol Chem 272: 5482-5486, 1997
60. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C: TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proc Natl Acad Sci USA 92: 9652-6, 1995
61. Chomezynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987
62. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 1 and 2: 14- 5, 1989
63. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C: The TRP ion channel family. Nat Rev Neurosci 2: 387-396, 2001
64. Rastogi PA: MacVector Integrated sequence analysis for the Macintosh. Methods Mol Biol 132: 47-69, 2000
65. Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler E.E: Quantitative analysis of alternative splicing options for human plasma membrane calcium pump genes. J Biol Chem 268: 25993-26003, 1993
66. Hiroaki I, Hiroshi N: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96: 23-28, 1990

67. Sumikawa K, Parker I, Miledi R: Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channel from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. In: *Methods in Neurosciences*, 1989, pp 30-45
68. Miledi R: A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc London B Biol Sci* 215: 491-497, 1982
69. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J: Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol* 328: 143-170, 1982
70. Miledi R, Parker I, Sumikawa K: Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1: 1307-1312, 1982
71. Arellano RO, Woodward RM, Miledi R: Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels* 4: 203-259, 1996
72. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: *Methods in Cell Biol* 46: 153-185, 1995
73. Slater M, Barden JA, Murphy CR: The purinergic calcium channels P2X1, 2, 5, 7 are down-regulated while P2X3, 4, 6 are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. *Histochem J* 32: 571-580, 2000
74. Nihei OK, de Carvalho AC, Savino W, Alves LA: Pharmacologic properties of P(2Z)/P2X(7) receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood* 96: 996-1005, 2000
75. Wertz IE, Dixit VM: Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 275: 11470-7,2000
76. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Abeele FV, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N: Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527: 71-83, 2000

77. Luo HR, Moreau GA, Levin N, Moore MJ: The human Prp8 protein is a component of both U2-and U12-dependent spliceosomes. *RNA* 5: 893-908, 1999
78. Bowie JU: Helix packing in membrane proteins. *J Mol Biol* 272: 780-789, 1997
79. Bhuyan A, Varshney A, Mathew MK: Resting membrane potential as a marker of apoptosis: studies of *Xenopus* oocytes microinjected with cytochrome c. *Cell Death Differ* 8: 63-69, 2001
80. Braun T, Dar S, Vorobiov D, Lindenboim L, Dascal N, Stein R: Expression of Bcl-*xs* in *Xenopus* oocytes induces BH3-dependent and caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. *Mol Cancer Res* 1: 186-194, 2003
81. Yu K, Kennedy A, O'Neill MM, Barton RW, Tataka RJ: Disparate cleavage of poly-(ADP-ribose)-polimerase (PARP) a synthetic tetrapeptide DEVD by apoptotic cells. *Apoptosis* 6: 151-160, 2001
82. Krieg PA, Varnum SM, Wormington WM, Melton DA: The mRNA encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the midblastula transition in *Xenopus*. *Dev Biol* 133: 93-100, 1989
83. Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL, Wang E: Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1alpha. *Exp Cell Res* 238: 168-176, 1998
84. Chen E, Proestou G, Bourbeau D, Wang E: Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 259: 140-148, 2000
85. DeGregory J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR: Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7245-7250, 1997
86. Mundle SD, Saberwal G: Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *FASEB J* 17: 569-574, 2003

87. Furukawa Y, Nishimura N, Furukawa Y, Satoh M, Endo H, Iwase S, Yamada H, Matsuda M, Kano Y, Nakamura M: Apaf-1 is a mediator of E2F-1 induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 39760-39768, 2002
88. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996
89. Collins CA, Guthrie C: The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol* 7: 850-854, 2000
90. Clegg N, Ferguson C, True LD, Arnold H, Moorman A, Quinn JE, Vessc RL, Nelson PS: Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *Prostate* 55: 55-64, 2003
91. Cross D, Reding DJ, Salzman SA, Zhang KQ, Catalona WJ, Burke J, Burmester JK: Expression and initial promoter characterization of PCAN1 in related tissue and prostate cell lines. *Med Oncol* 21: 145-53, 2004
92. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV : RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research* 63: 3799-3804, 2003

REVIEW ARTICLE

Apoptosis and Cell Death Channels in Prostate Cancer

Juana V. Tapia-Vieyra and Jaime Mas-Oliva

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Received for publication September 18, 2000; accepted February 16, 2001 (00/136).

Apoptosis, a type of programmed cell death, is a decisive mechanism in cell processes such as homeostasis, development, and many diseases including cancer. In mammals, the mechanisms that trigger and control the process of apoptosis are complex, because it has been observed that many molecules might be involved, acting in distinct ways and depending on the cellular type. The process of apoptosis is characterized by specific biochemical and morphologic changes. However, important specific messengers such as Ca^{2+} act in active proliferation as well as in apoptosis. At present, there is convincing evidence that a sustained increase in intracellular Ca^{2+} can activate cytotoxic mechanisms in various cells and tissues. Several ionic channels located in the cytoplasmic membrane might participate in the entry of calcium into the cytosol during apoptosis. Among these ionic channels, the purinoreceptors P2X and the channels of capacitative entry of calcium have been described. Pro- and anti-apoptotic molecules such as bax and bcl-2, respectively, have also been shown to participate in the process. We have recently found the activation of a Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channel of 23 pS conductance in prostatic cancer (LNCaP) exclusively in cells previously induced to apoptosis. Our findings are discussed taking into account the different ion channels that might participate in programmed cell death in prostate cancer. © 2001 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Prostate cancer, Apoptosis, Calcium channels.

Introduction

Apoptosis is a form of programmed cell death that is distinct from accidental cell death or necrosis. It occurs through the activation of a cell-intrinsic suicide program (1–3) and is carried out by means of internal as well as external signals similar to those leading to cell differentiation and proliferation (4,5) (Figure 1). A variety of different second messenger systems associated with the induction of apoptosis depends on cell type as well as several induction signals (4), some conserved among worms, insects, and vertebrates (1). The process of apoptotic cell death can be divided into various phases from the signals that initiate the process to the final events of cellular fragmentation (3,5,6) (Figure 2). In many cell types, DNA is degraded into fragments the size of oligonucleosomes, whereas in others larger DNA frag-

ments are produced (2). Apoptosis is also characterized by a loss of mitochondrial function (2). This important organelle controlling cell life and death presents at least three general mechanisms of activity associated with apoptosis: 1) alteration of oxidative phosphorylation, electron transport, and adenosine triphosphate (ATP) production; 2) liberation of molecules that initiate activation of the caspase family of proteases, and 3) in general, disruption of cellular reduction-oxidation (redox) potential (7). Activation of caspases such as caspase 9 (initiator caspase) appears to be regulated by the exit of cytochrome c from the mitochondria, in which Apaf-1 participates as an intermediate. Although the manner in which cytochrome c is released from the mitochondria is still under discussion, members of the bcl-2 family, such as bax, have been proposed to participate in the release of cytochrome c from the mitochondria (8–10).

In *Caenorhabditis elegans*, the cysteine protease Ced-3 is important in the activation of programmed cell death (4,11,12), which can be blocked by the bcl-2 homolog ced-9. According to their function, at least 12 different homologs of Ced-3 have been reported and classified into two

Address reprint requests to: Dr. Jaime Mas Oliva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-243, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México. Tel.: (+525) 622-5584; FAX: (+525) 622-5611; E-mail: jmas@ifcsun1.ifisol.unam.mx

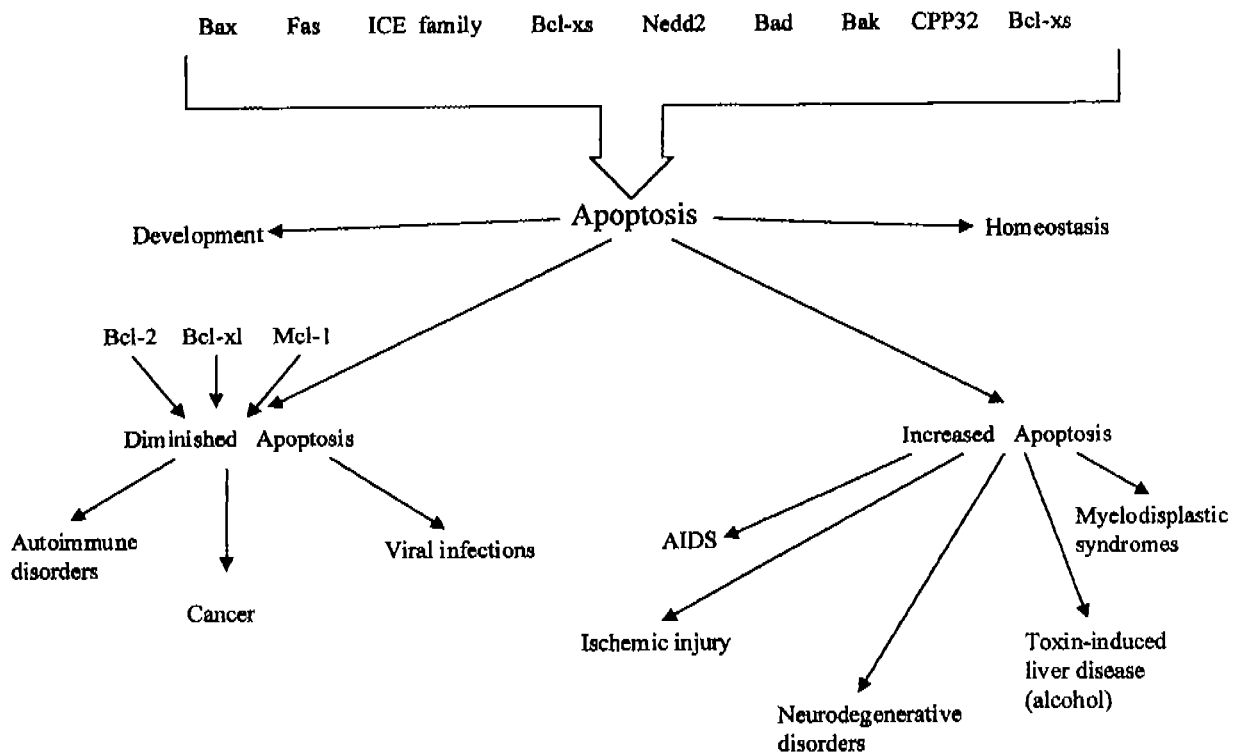


Figure 1. Molecules that regulate the process of apoptosis and their relationship to disease.

main groups (13): caspases related to the interleukin- β converting enzyme (ICE) (caspase-1, -4 and -5) (14) and caspases whose functions are directly related to the apoptotic machinery (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, and 10) (13-17). Some of these cysteine proteases or caspases are originally synthesized as inactive proenzymes (4,11,18,19).

Cell death can be inhibited by interfering with the protease function of these proteins and precursors, which are converted into the active enzyme through specific proteolytic processing or by autocatalysis triggered by union of cofactors and elimination of inhibitors (20). These proenzymes can be found in nucleated mammalian cells; to cause apoptosis, they must be cleaved at aspartate residues and assembled into heterotetramers. The active cysteine is located in the middle of a conserved QACRG motif common in most proteases (21). Although the final activation of these proteases is posttranslational, some pathways leading to their activation may involve steps that are transcriptionally controlled. In the apoptotic process, cells appear to initiate their own apoptotic death through activation of these endogenous proteases (20). Thornberry and Lazebnik in 1998 reported that caspases can be activated by two distinct mechanisms (20). Because all caspases have similar cleavage specificities, the simplest way to activate a procaspase has been to expose the molecules to a previously activated caspase. This caspase cascade is extensively used by cells in

activation of downstream effector caspases (caspase-3, -6, and -7). The second strategy is known as induced proximity, in which some cofactors reunite zymogen caspases and by intermolecular interaction in which the caspases are activated (20,22). Caspases have been defined as initiator and effector caspases. The activation of effector caspases is carried out using two pathways: via cytochrome c that activates initiator caspase 9, and via death receptors that activate initiator caspase 8; caspases 3, 6, and 7 are known as effector caspases (9,10,20).

The function of Ca^{2+} as an intracellular regulator in cell physiology is well established based on many reports concluding that an increase in intracellular Ca^{2+} activates several deleterious mechanisms proven to be toxic in some cell types (23,24) (Figure 3). For many years, Ca^{2+} has been considered an activator of mechanisms involved in the catabolism of proteins, phospholipids, and nucleic acids. A sustained intracellular Ca^{2+} concentration above the physiologic level has been related to an uncontrolled breakdown of macromolecules, critical in the maintenance of cell structure and function. A number of cytoskeletal proteins including spectrin, fodrin, caldesmon, aduccin, tubulin, MAP-2, tau factor, vimentin, and cytokeratin has been shown to be susceptible to proteolytic attack (24). Two cytoskeletal proteins, vinculin, and the actin-binding protein, reported to be directly involved in the stabilization of microfilaments asso-

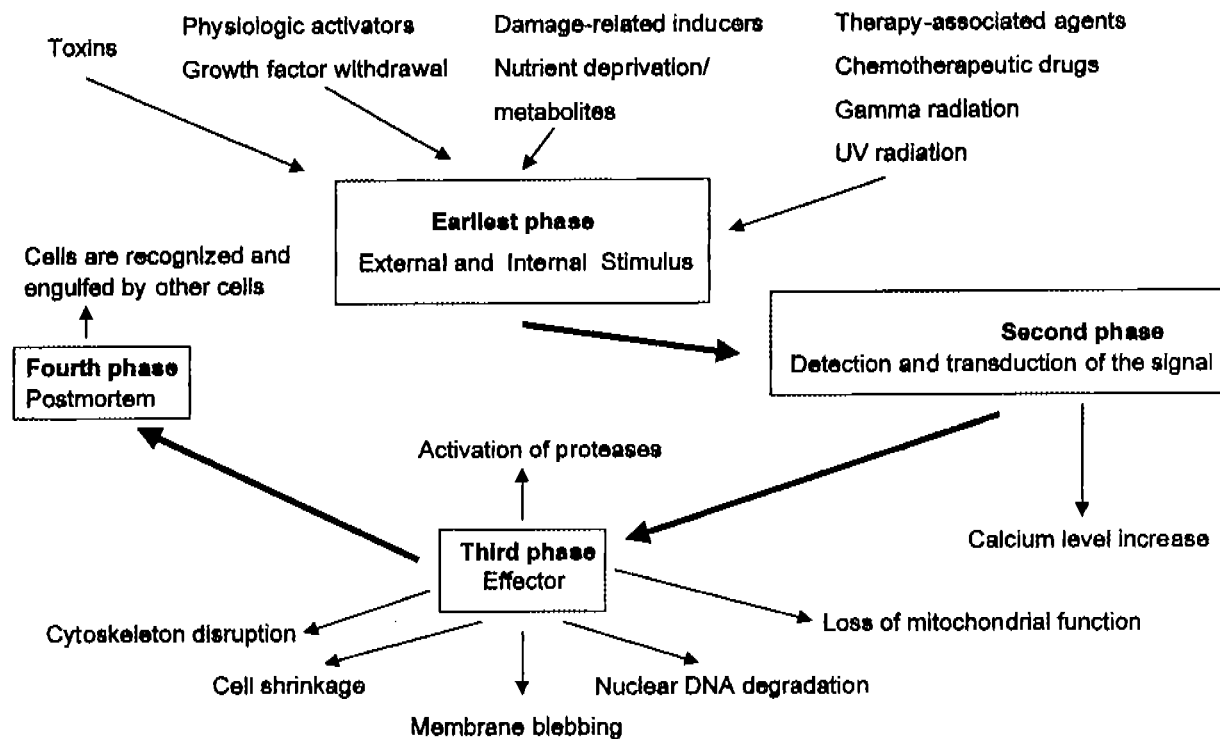


Figure 2. Cellular events occurring during the different phases of apoptosis.

ciated with the plasma membrane, have been shown as preferred substrates for Ca^{2+} -dependent proteases (24). The breakdown of the intermediate filament-rich nuclear envelope secondary to a transient increment in the intracellular-free calcium concentration can be prevented when the Ca^{2+} increase is buffered with Ca^{2+} chelators. Activation of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase has shown to be essential during breakdown of the nuclear envelope (24). The Ca^{2+} -dependent regulatory cofactor calmodulin may link these Ca^{2+} alterations to the effector machinery, as calmodulin antagonists can interfere with apoptosis in some of these systems (24).

There are various mammalian genes similar in structure to bcl-2 that act in a similar manner to protect cells, as well as others that antagonize the protection offered by bcl-2 (4,11,18) (Figure 1). In different tissues tested, cell survival depends on the presence of survival signals given by the different cells forming the tissue as well as the extracellular matrix. Because death occasionally occurs in the absence of protein synthesis, proteins that mediate apoptosis are thought to be constitutively expressed in several cell types (5,25). It can be considered that most cells are programmed to kill themselves if survival signals are not received from the environment at regular intervals (5,25). Moreover, viruses have developed strategies to inhibit the process of apoptosis and to receive optimal replication through the ex-

pression of viral genes following the induction of cellular suppressors (4).

Apoptosis and Prostate Cancer

Repair of damaged DNA is the only natural way to ensure survival in unicellular organisms. In metazoans, however, the optimal way to control occurring cell DNA damage is much more complex because a number of mutations, such as those expressed in genes controlling cell proliferation and apoptosis, often lead to neoplasms. Repair, growth arrest, and cell suicide (apoptosis) at present can be considered a response to DNA damage, although their fate in many cases depends on cell type, location, environment, and extent of damage. Therefore, alterations either in the machinery that senses DNA damage or in the mechanisms that implement a response to DNA damage are considered important in predisposition to cancer (26). There are two main checkpoints in the control of cell cycle progression: G1/S prior to the replication process of DNA, and G2/M preceding the process of mitosis (10). Along these transitions, damage to DNA is sensed and molecules such as p53 activated as a response, followed by cell cycle arrest and activation of apoptosis (27).

Activation of p53 is carried out through a phosphoryla-

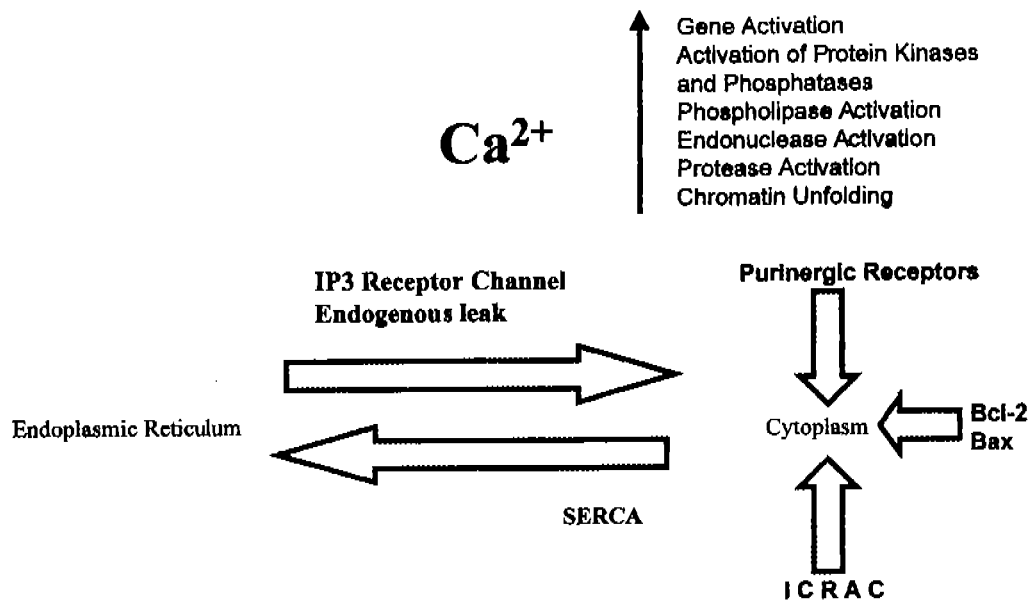


Figure 3. Membrane molecules that participate in the influx of Ca^{2+} and their roles in the modulation of apoptosis.

tion process that regulates its DNA-binding affinity. Phosphorylation appears to regulate conformational changes occurring in the carboxy-terminal regulatory domain. Interaction with other molecules appears to be carried out with domains located proximate to the amino end. It has been observed that a change in serine 20 to alanine abrogates p53 stabilization as a response to ionizing radiation and ultraviolet light (UV) (27). p53 has been considered a tumor suppressor because the lack of its function has been found in a high percentage in human primary tumors. Moreover, p53 undergoes other types of mutations as a consequence of binding to several cellular and viral oncoproteins (28,29).

Different cell types from human tumors have been described as having a decreased ability to undergo apoptosis in response to a physiologic stimulus (5). Specifically, overexpression of Bcl-2 prevents cells from initiating the process of apoptosis in response to a number of different stimuli, and its expression is commonly associated with a poor prognosis in prostate and colon cancer (5,30). The process of apoptosis has been implicated in the regression of prostate and mammary tumors induced by removal of androgens and estrogens. Therefore, activation of this process could provide a form of protection against carcinogenesis (6). In hormone-dependent tumors, induction of apoptosis by hormonal ablation has been associated with tumor regression (6). Because most of our current chemotherapeutic agents kill cells by mechanisms other than apoptosis, enhancement of apoptosis in malignancy could be therapeutically valuable (31).

With castration, the presence of a Ca^{2+} -dependent endonuclease in rat prostate nucleus extracts appears to be coordinated with increase in fragmentation of nuclear DNA

(32). Androgen ablation is considered a rarely curative therapy in prostate cancer because metastatic cancer within individual patients is heterogeneous, including both androgen-dependent and -independent prostatic cancer cells. Therefore, androgen ablation does not eliminate preexisting androgen-independent cancer cells. Moreover, although an enormous effort is being made, there are no chemotherapeutic agents discovered to date that could be effective in controlling proliferation of androgen-independent prostatic cancer cells. The relationship between rate of proliferation and death is the main factor that determines the proliferation of any cancer cell. Only when the rate of cell death is greater than cell proliferation are cancer cells eliminated. Based on this argument, an important therapy for androgen-independent cancer cells could be obtained either by lowering the rate of proliferation and/or by raising the rate of cell death to a point where the latter exceeds the rate of cell proliferation.

Several antiproliferative chemotherapeutic agents that are cytostatic and/or cytotoxic to sensitive target cells have been reported (33). However, these agents frequently lead to cancer cell death only when cell proliferation is in progress. Cancer cells that are not proliferating at the time of treatment are resistant to these cytotoxic agents. This is based on the fact that cells have sufficient time to repair cellular damage that might have occurred prior to the next cell proliferation cycle. Nevertheless, it is known that the majority (>90%) of prostatic cancer cells in an individual patient is not actively proliferating and is thus resistant to standard cytotoxic chemotherapy. Therefore, some type of cytotoxic therapy that induces death of androgen-independent pros-

tatic cancer cells without the requirement of having cells in active proliferation is urgently needed (33). However, it is known that increased expression of bcl-2 and inactivation of p53 is important in progression of the disease (34).

Androgen ablation produces an energy-dependent process of programmed death in nonproliferating, androgen-dependent prostatic cancer cells; this process involves fragmentation of DNA into nucleosomal multimers catalyzed by nuclear Ca^{2+} . In contrast, androgen-independent prostatic cancer cells are not induced to undergo such a programmed cell death by androgen ablation. One possibility for explaining the inability of androgen ablation to induce programmed death of androgen-independent prostatic cancer cells is that the procedure does not permit a steady increase in their intracellular Ca^{2+} concentration (33). This phenomenon might support the idea that androgen-independent prostatic cancer cells can be induced to undergo programmed death if an increase in cytoplasmic calcium is sustained by other means without the use of hormones. Therefore, androgen-independent, highly metastatic Dunning R-3327 AT-3 rat prostatic cancer cells have been chronically exposed *in vitro* to the calcium ionophore ionomycin to sustain elevation in their intracellular Ca^{2+} concentration. Ionomycin is a polyether ionophore that chelates calcium (and cadmium) in the form of dibasic acids (35). Its site of action is initially found at the level of internal Ca^{2+} stores (36), inducing an elevation of intracellular Ca^{2+} three- to sixfold above baseline. If induction is sustained for more than 12 h, cell death occurs. These observations identify intracellular Ca^{2+} as a potential target for therapy against androgen-independent prostatic cancer cells (33).

It has been known for some time that calcium accumulates within the endoplasmic reticulum of cells through the function of sarcoplasmic reticulum and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, the catalytic function of the calcium pump (37). The resulting equilibrium regulates important functions (Figure 3). Treatment of androgen-independent prostatic cancer cells of both rat and human origin with thapsigargin (TG), a sesquiterpene γ -lactone that selectively inhibits sarcoplasmic reticulum and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, results in an important increase of intracellular Ca^{2+} within minutes of exposure (37). A secondary influx of extracellular Ca^{2+} results in morphologic (cell-rounding) and biochemical changes within 6 to 12 h. This influx of Ca^{2+} also increases tissue transglutaminase expression and calmodulin concentration associated with decreased expression of the G1 cyclins (37). Androgen-independent prostatic cancer cells stop progression through the cell cycle when treated with TG. It appears that G_0 -arrested cells undergo double-strand DNA fragmentation in parallel to a loss of plasma membrane integrity and cell fragmentation. These authors demonstrate that TG induces programmed cell death in androgen-independent prostatic cancer cells and that this process is critically dependent upon a

sustained elevation of intracellular Ca^{2+} (37). Taken in conjunction, these studies have identified the ER Ca^{2+} -ATPase as a new therapeutic target for activating programmed cell death of nonproliferating, androgen-independent prostatic cancer cells (37). Considering that a sustained increase in the concentration of intracellular calcium might be considered as a consequence of the influx of calcium through the plasma membrane (33,37), it was important to evaluate the participation of Ca^{2+} fluxes through the plasma membrane in these cancer cells. In this sense, our research group has demonstrated the activation of a Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channel of 23 pS conductance in prostatic cancer cells (LNCaP) (androgen-independent) exclusively during apoptosis onset, using two different inducers of apoptosis, i.e., ionomycin and serum removal (38). In perforated patch recordings of single LNCaP cells, a membrane potential of -40 mV and an intracellular calcium concentration (Ca^{2+i}) of 90 nM were found. Application of 10 μM ionomycin produced a biphasic increase in Ca^{2+i} . The initial rise in Ca^{2+} was due to release of Ca^{2+} from internal stores and was associated with membrane hyperpolarization to -77 mV. The latter was probably due to the activation of high conductance, Ca^{2+} , and voltage-dependent K^+ channels (maxi-K). Moreover, the second rise in Ca^{2+i} was always preceded by and strictly associated with membrane depolarization.

Simultaneous recordings of Ca^{2+i} and ion channel activity in the cell-attached configuration of patch clamp revealed a Ca^{2+} -permeable channel of 23 pS conductance. This channel did not require membrane depolarization for its activation. The 23 pS channel did not open at rest or on the first increment in Ca^{2+i} . However, activity of this channel was evident during the second increment in Ca^{2+i} . The absence of serum also activated the 23 pS channel, albeit with a lower frequency than ionomycin. Thus, the 23 pS channel activated by two unrelated inducers of apoptosis might be considered an important molecule in the Ca^{2+} influx mechanism in programmed cell death of androgen-independent LNCaP cells (38).

It has also been demonstrated that oxidative stress activates a Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channel in endothelial cells, suggesting a role for oxidative stress in apoptosis (39). Because this channel shares important characteristics with the new 23 pS channel as well as with others related to the apoptotic mechanism emphasizing the capacitative entry of calcium, it is important to evaluate the novelty of the 23pS channel based on the properties of several well-known channels present in healthy as well as in neoplastic cells most probably associated with the process of apoptosis. However, it should be mentioned that two research groups have recently proposed that the release of store-retained calcium in androgen-dependent LNCaP cells might be sufficient to trigger the apoptotic process without the apparent need to activate store-operated channels (SOC channels) or a sustained entry of calcium (40,41).

Table 1. Purinergic receptors

Purinoreceptor	Subtype	Isolation	Activity	Distribution	Molecular and biochemical characteristics	Electrophysiological characteristics	References
P2T			G protein-coupled	Numerous cultured cell lines			44
P2U							
P2Y	P2Y1				Coupling with apoptosis		44
P2Z							44
P2X	P2X1-P2X7		ATP ligand-gated cation channel	Mast cells, macrophages, fibroblasts Neural and neuromuscular tissues	1119 bp, 373 aa, 42172 K, coupling with apoptosis	Carry Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ currents	45
P2R			G protein-coupled	Mouse tissues spleen, testis, kidney, liver, lung, heart, brain	1827 bp, 399 aa, 62 K, coupling with apoptosis		48
P2X1		Rat <i>vas deferens</i>		<i>vas deferens</i> , bladder, lung, liver, low levels in dorsal root ganglion	2900 bp, 399 aa, identity primary structure,	19 pS between -140 and -80 mV, depolarization, entry of Ca ²⁺	
	P2X1	Human bladder		Leukocytes, pancreas, spleen, testis, prostate, ovary, small intestine, colon, fetal liver	Rat P2X1 89% P2X2-P2X4 40-50%		
P2X2				Bladder, brain, spinal cord, intestine, <i>vas deferens</i> , pituitary gland, adrenal gland	1416 bp, 472 aa, 52557 K, identity primary structure	La ³⁺ , Cd ²⁺ and other trivalent cations inhibited the activated current for ATP in PC12 cells	49
P2X3				Dorsal root ganglion	RP-2 40% 3800 bp, 397 aa, 47 K, identity primary structure with other P2X receptors 40/47%		52
hP2X				Urinary bladder (human tumor), spleen, lung, thymus, liver, adrenal gland, human promyelocytic cell line, HL60	2643 bp, 399 aa, identity primary structure, P2X1 41%		47
P2X4				Central nervous system neurons, blood vessels, leukocytes	1164 bp, 388 aa, 43 K, identity primary structure, rP2X1 50%, P2X2 44%, P2X3 44%		54
P2X5				Rat heart, brain, spinal cord, adrenal gland	455 aa, identity primary structure, P2X1 41%, P2X2 45%, P2X3 43%		57
rP2X7(P2Z)				Macrophages, microglia, brain, spinal cord, lung, spleen	595 aa, carboxyl-terminus is longer and important for the lytic actions for ATP		58
	hP2X7			Pancreas, liver, heart, thymus, brain, skeletal muscle, lung, placenta, testis, leukocytes, prostate, spleen	Identity primary structure, rP2X7 80%	ATP EC ₅₀ value was approximately 10-fold greater than that of rP2X7	59

Ligand-Gated Ion Channels

It has been proposed that ATP might function as an extracellular messenger in addition to its essential role as a molecular energy source (42,43). ATP has been shown to be stored within secretory vesicles, and solely in response to well-defined stimuli appears to interact with purinergic receptors (P2 receptors) (43). Purinergic receptors called P2 purinoreceptors include receptors of the ligand-gated ion channel type as well as the G protein-linked superfamily of receptors. Historically, these receptors have been termed P2X and P2Y for the first group (42) and P2T, P2U, and P2Z for the G protein-coupled receptors (44) (Table 1). To study the biophysical characterization of the P2X purinoreceptor, the electrophysiologic approach has been valuable for studying a number of ATP-gated membrane currents in several cell types (42). When optimal recording conditions are employed in the presence of ATP, smooth muscle and cardiac muscle cells show an inward current at a resting membrane potential that corresponds to -50 to -70 mV. These currents have been demonstrated to be inwardly rectifying and supported by channels that are permeable

not only to K⁺ and Na⁺ but also to Ca²⁺. No purinoreceptor has shown a significant homology with any other known ligand-gated ion channel or receptor superfamily (42). Therefore, the mechanism by which extracellular ATP interacts with these P2X purinoreceptors is still unknown. It is important to mention that the consensus sequence region (G)(X4)GK(X7)(I/V) for ATP binding is absent in these receptors (42).

Based on the potent growth inhibition shown by ATP on a variety of human and murine tumor cells, administration of AMP or ATP to tumor-bearing murine hosts has been shown to be associated with dramatic cytostatic and cytotoxic effects. Such anticancer activity is likely to be related to the activation of P2Z purinoreceptors that mediate cell death through apoptosis (44,45-59) (Table 1). The rat P2X7 receptor (rP2X7) functions as a channel permeable to small cations and as a cytolytic pore. It is important to point out that in this channel, the carboxyl-terminus corresponds to 239 aa, compared to 27-120 aa in other purinergic receptors (Table 2). Channel activation does not occur if rP2X7 lacks the last 177 residues of its carboxyl terminus (59). Brief (1-2 sec) applications of ATP open the channel transiently,

Table 2. Ca²⁺-permeable channels involved in apoptosis

Channel type	Activation way	Current type	Conductance	Blockade	Expression	References
P2X	ATP ligand-gated cation channel low pH and divalent ions Zn ²⁺ increased the affinity for the agonist	Carry Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ currents, depolarization	12-20 pS	Trivalent cations	Rat, mouse, human neural and neuromuscular tissues hP2X1 and hP2X7 expressed in prostate	42, 44, 45, 47, 50, 52, 54, 57, 58, 78
ICRACCE Store-operated Ca ²⁺ entry	Diffusible messenger and interaction protein-protein between endoplasmic reticulum membrane and cytoplasmic membrane	Unselective; Ca ²⁺ , Na ⁺ , Ba ²⁺ , Hyperpolarization	24fS	Trivalent and bivalent	<i>Drosophila</i> , mammals, <i>Xenopus laevis</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> Trp photoreceptors, Htrp3 in brain, ovary, colon, small intestine, lung, prostate, placenta, and testis, TRPC1 (human) fetal brain, adult heart, brain, testis, and ovaries, prostate, mammalian genes trp-3, Trp-4, trp-5 and trp-6 in brain. Co-expressed in the same type cell, although varied levels	62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71
Bcl-2	Pore-forming activity with dependence on low pH and acidic lipid membranes	Cation-selective channels protein translocation-selective	18 ± 2 pS most frequent 41 ± 2 pS and 90 ± 10 pS	pH acts as modulator	Cytoplasmic membrane, mitochondrial membrane, nuclear envelope, and parts of the endoplasmic reticulum	72
Bax	Pore-forming activity with dependence on low pH		Pred 250 ± 25 pS, 80 ± 25 pS and 180 ± 25 pS	pH acts as a modulator	Cytoplasmic membrane, mitochondrial membrane	75
23 pS	Ionomycin serum removal	Ca ²⁺ -permeable, non-selective cation channel	23 pS		Cytoplasmic membrane of LNCaP cells induced to apoptosis	38

similar to other P2X receptors. Some important differences have been shown between rP2X7 and the human purinoreceptor hP2X7, because high concentrations of agonists are required to activate the latter group. The half-maximal concentration (EC_{50}) of 2'-3'-(O)-(4-benzoyl benzoyl) ATP (BzATP) (60) to activate hP2X7 receptors is 25-fold greater than that observed for the rP2X7 receptor; the ATP EC_{50} value is approximately 10-fold greater (59) (Table 2).

ATP apparently induces cell death in thymocytes, hepatocytes, and several lymphocytic cell lines by increasing intracellular calcium concentration. Although P2Z and P2Y purinoreceptors appear to be involved in this calcium entry, P2X receptors have been those related to the apoptotic process (Table 1). These results might indicate that the P2X receptor and related molecules present active functions in programmed cell death as well as in synaptic transmission (46).

Ionic Channels Involved in the Capacitative Entry of Calcium

Inositol 1,4,5-trisphosphate production provokes a biphasic Ca^{2+} signal in many cells: the first phase is effected through the mobilization of Ca^{2+} from internal stores that drive the initial burst, and the second phase by a store-operated Ca^{2+} entry (formerly capacitative Ca^{2+} entry) (61,62). Store-operated Ca^{2+} channels (SOC), which require decrements of Ca^{2+} in the endoplasmic reticulum (ER), are a subfamily of receptor-activated calcium channels (RACCs) (63). A signal for activation of calcium entry at the level of the plasma membrane is provided through depletion of intracellular Ca^{2+} pools. Depletion of intracellular Ca^{2+} pools is capable of activating a nonvoltage-sensitive plasma membrane Ca^{2+} conductance (62,64). The transmitting signal from intracellular stores to the membrane could be afforded by the following three main mechanisms: vesicle secretion, diffusible messages, and conformational coupling (61,65).

Closely resembling a capacitor from an electric circuit, calcium stores do not allow the entry of more cation when they are charged. However, they begin to promote entry as soon as stored calcium is discharged. This capacitative entry mechanism (CCE) is present in many cell types (66) and describes the influx of Ca^{2+} into cells. Therefore, this process that replenishes Ca^{2+} stores appears to be emptied through the action of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3), in that CCE is an essential component for the cellular response to hormones and growth factors (67). To distinguish this from other calcium entry channels, the term calcium-release-activated calcium currents (ICRAC) has been used to refer to the current flowing through these capacitative calcium entry channels (Table 2).

The protein named as transient receptor potential or Trp has been found to be involved with functions of CCE in *Drosophila* photoreceptors. Trp is considered a member of a family of store-operated channels (SOCs) conserved from *Caenorhabditis elegans* to mammalian organisms (66,68).

Trp could be similar to voltage-gated Ca^{2+} channel in the regions named S3-S6, including the S5-S6 linker that forms the ion-selective pore. It has been observed that the positively charged residues in S4 that confer voltage sensitivity to voltage-gated channels are absent in Trp (66,67). Several homologs of Trp are known to be present in man as well as in mouse and *Xenopus*. This fact provides evidence that Trp might be the functional analog of the mammalian ICRAC channel (Table 2). Although these two channels do not present identical permeability properties, the Trp channel presents a higher conductance than the ICRAC channel, while also being much less specific.

As soon as stores have been partially or completely depleted, entry is initiated by a sudden hyperpolarization of the membrane. These series of experiments reveal that entry is importantly biphasic and switches on and off very quickly (66). The existence of six Trp-related genes has been reported in the mouse genome in which the expression in L cells of small portions of these genes in antisense orientation suppressed CCE. cDNAs encoding the human Trp homologs Htrp1 and 3 expressed in COS cells increased CCE. The activity of Htrp1 and 3 increases Ca^{2+} entry into COS cells by 75 and 230%, respectively. Northern analysis detected an Htrp3 mRNA of 4 Kb predominantly in brain and at much lower levels in several other tissues (67). The model of transmembrane topology for a monomeric Trp protein is proposed to be a six-spanning transmembrane protein with a 350-amino acid cytosolic N-terminus and a 200-amino acid cytosolic C-terminus. In analogy to voltage-gated Ca^{2+} channels, six consensus glycosylation sites are encoded in Htrp, none predicted to be extracellular (67).

There is evidence of tissue- and cell-specific co-expression of multiple Trp forms, implying that the subunit composition of a particular CCE channel may vary depending on cell type. Several Trp homologs of mammalian cells are involved in CCE, demonstrating that expression of antisense Trp sequences abolishes capacitative Ca^{2+} entry. This leads to speculation that the six Trp homologs are subunits of CCE channels (67). García and Schilling in 1997 (69) showed a distribution pattern for Trp mammalian genes (trp-1, -3, -4, -5, and -6). These are expressed in brain and are barely detectable in liver. These results also showed that several genes could be co-expressed in the same cell type at different levels of expression. However, interpretation of these results is difficult to assess because mRNA levels do not always equal protein levels and amounts of protein encoded by these genes may be required at varied levels by each cellular type. Mammalian Trp genes are ubiquitously expressed albeit at varying levels (69). This situation additionally suggests that these genes encode for subunits of distinct channels in the same cell, suggesting that the subunit composition of a particular CCE channel, for instance ICRAC, might be different according to the type of cell. Taking into account the very low expression of mammalian Trp genes in liver compared to other tissues, there is the

possibility that there are other genes coding for CCE channel subunits that might not have similarity to other Trp family members (69).

One of the most common characteristics of ion currents associated with CCE is the activation they demonstrate upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores induced by inhibitors of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, such as thapsigargin, removal of extracellular Ca^{2+} , or Ca^{2+} ionophores (70). Nevertheless, several differences have been found in ion permeability and unitary conductance that support the possibility that ion channels associated with CCE are encoded by closely related genes. The native currents that can be activated by Ca^{2+} -store depletion in various non-excitable cells are characterized by inward rectification (70). Wes et al. (61) described the molecular characterization of the human homolog of Trp. TRPC1 (human transient receptor potential channel-related protein 1) was 40% identical to *Drosophila* Trp; this molecule lacked the S4 transmembrane region required as a voltage sensor in many voltage-gated ion channels. TRPC1 is expressed at different levels in several tissues. Although expression levels of TRPC1 are observed in prostate, they are lower than those in testis and ovaries. Additionally, the authors identified a second human gene that encodes for a Trp homolog protein, named TRPC3 (61).

Although thapsigargin activates Trp channels selective for $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^{+} > \text{Ba}^{2+}$, Trp1 channels are nonselective with respect to Ca^{2+} , Na^{+} , and Ba^{2+} and are not activated by thapsigargin or Ca^{2+} -store depletion. Experiments employing channel chimeras in which C-terminal domains of Trp and Trp1 have been exchanged led to the conclusion that the carboxy-terminal of Trp seems important for thapsigargin sensitivity. When Trp1 is expressed in Sf9 cells under basal conditions, it is constitutively active and its selectivity corresponds to $\text{Na}^{+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$. Moreover, Trp1 is not activated by store depletion and is known to initiate membrane currents. TRPC1 appears to correspond to characteristics shown by Trp1, with the exception of the type of membrane currents both present (71).

Bcl-2 and Bax-Forming Pores on the Cellular Membrane

Bcl-2 is the most characteristic member of the family of apoptosis-regulating proteins, regulating the homeostasis of blockers and promoters of cell death (72-74) (Table 2). Because many homologs of bcl-2 have been described, several of which form homo- or heterodimers, this might indicate that these molecules become organized and function through protein-protein interactions (73).

Purified recombinant bcl-2 exhibits pore-forming activity with dependence on low pH and acidic lipid membranes. Nevertheless, a mutant of bcl-2 not presenting the two-core hydrophobic α -helices (helices 5 and 6) essential for its insertion into the membrane only showed nonspecific effects

(72). Employing planar lipid bilayers, bcl-2 was shown to form discrete ion-conducting channels selective to cations. This property was totally lost when the bcl-2 mutant was tested (72).

The most frequent conductance shown to be related to bcl-2 is 18 ± 2 pS in 0.5 M KCl at pH 7.4. Nevertheless, higher channel conductances (41 ± 2 pS and 90 ± 10 pS) have been shown with progressively lower occurrence, indicating that generation of larger multimers of bcl-2 might occur (72). Bcl-2 and the majority of its homologs show a series of hydrophobic residues near their carboxy-terminal, which closely associates them with several intracellular membranes (72).

Channels formed by bcl-2 are principally voltage-independent because current conducted over a wide range exhibits a linear current-voltage relation. Recordings at low pH demonstrated that acidity promotes bcl-2-channel insertion into planar bilayers. For instance, at pH 5.4, membrane conductance moved from high to low values, a phenomenon supporting the progressive insertion of more channels into the membrane, indicating that pH might be considered a modulator (72). Bcl-2 has been shown to be abundant at contact sites that approximate inner and outer mitochondrial membranes. Single-channel conductances of 20, 40, and 90 pS have been found at pH 5.4 appearing as bursts (72).

Bcl-x as well as bax has shown to present pore-forming activity in synthetic lipid membranes (75,76) (Table 2). Bax, a pro-apoptotic member of the family, was added to neuronal cultures at a concentration of 10 μM , which showed to be lytic within 3-6 h. Nevertheless, addition of bax and bcl-2 together delayed neuronal lysis by 12 h (75,76). To determine whether bax might also be considered a pore-forming protein, the hypothesis that bax could allow liberation of the carboxyfluorescein contained in liposomes was tested. It was shown that bax induces dye efflux from these liposomes in a concentration-dependent manner at neutral pH. The release of dye was also demonstrated to be pH-dependent (75,76). Because bcl-2 was as efficient as bax at pH 4 and the channel-forming ability of only bcl-2 decreased at pH 5, it was concluded that the pore-forming properties of bax and bcl-2 are most probably different.

Bax predominantly opens at 250 ± 25 pS with sporadic changes at two main sublevels (80 ± 25 pS and 180 ± 25 pS) (75,76). Due to the localization of bax in mitochondrial membranes, permeability changes and therefore disruption of transmembrane potential might be considered as important events in the genesis of apoptosis (75,76).

The process of apoptosis in several cell types occurs frequently on removal of cytokines and several growth factors. It has been proposed that these molecules could trigger a response in the nucleus with the activation of apoptotic-related genes such as c-myc, bcl-2, and p53 that might be directly involved through several pathways in initiation of apoptosis (21,77). In contrast, during the final stage of apoptosis a series of common processes such as fragmentation of

DNA and changes in the structure of cells is frequently observed. Between the process of initiation and the final events of the apoptotic pathway, a picture begins to emerge of how the basic properties of several plasma-membrane Ca^{2+} channels might be shared to elucidate common characteristics related to the delivery of a specific intracellular Ca^{2+} signal appearing to participate in the initiation and/or support of apoptosis. As described previously, such Ca^{2+} fluxes play a central role in the regulation of apoptosis, directly associated with normal and malignant cell proliferation. Therefore, understanding the molecular mechanisms of apoptotic cell death should lead to fundamental advances in the therapy of many diseases, including prostate cancer.

Acknowledgments

The experimental work mentioned in this review and carried out by our group was supported by grants from DGAPA-UNAM and CONACYT to Jaime Mas-Oliva. We are grateful to Mrs. Ma. Elena Gutiérrez for her secretarial assistance.

References

- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267:1445.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Am J Pathol* 1995;146:3.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131.
- Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993;74:777.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456.
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:245.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4997.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770.
- O'Connor L, Huang DCS, O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:257.
- Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305.
- Nicholson D. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810.
- Karanewsky DS, Bai Xu, Linton SD, Krebs JF, Wu J, Pham B, Tomaselli KJ. Conformationally constrained inhibitors of caspase-1 (interleukin-1 beta converting enzyme) and of the human CED-3 homologue caspase-3 (CPP32, apopain). *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:2757.
- Colussi PA, Harvey NL, Kumar S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem* 1998;273:24535.
- Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998;274:F587.
- Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr Biol* 1996;6:555.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996;236:1.
- Hengartner M. Apoptosis: death by crowd control. *Science* 1998; 281:1298.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312.
- Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10964.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397.
- Nicotra P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32:449.
- McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:357.
- Evan G, Littkewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317.
- Caspari T. How to activate p53. *Curr Biol* 2000;10:R315.
- Wang XW. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999;19:4759.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485.
- Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991;65:1097.
- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126.
- Connor J, Sawczuk IS, Benson MC, Tomashefsky P, O'Toole KM, Olsson CA, Buttyan R. Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell death. *Prostate* 1988;13:119.
- Martikainen P, Kyprianou N, Tucker RW, Isaacs JT. Programmed death of nonproliferating androgen-independent prostatic cancer cells. *Cancer Res* 1991;51:4693.
- Bruckheimer EM, Gjertsen BT, Mc Donnell TJ. Implications of cell death regulation in the pathogenesis and treatment of prostate cancer. *Semin Oncol* 1999;26:382.
- Liu WC, Slusarchyk DS, Asle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E. Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot* 1978;31:815.
- Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 1994;300:665.
- Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 1994;54:6167.
- Gutiérrez AA, Arias JM, García L, Mas-Oliva J, Guerrero-Hernández A. Activation of a Ca^{2+} permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line. *J Physiol* 1999;517:95.
- Koliwad SK, Kunze DL, Elliott SJ. Oxidant stress activates a non-selective cation channel responsible for membrane depolarization in calf vascular endothelial cells. *J Physiol* 1996;491:1.
- Wertz IE, Dixit VM. Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2000;275:11470.
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Abele FV, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N. Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 2000;527:71.
- Humphrey PP, Buell G, Kennedy I, Khakh BS, Michel AD, Surprenant A, Trezise DJ. New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995;352:585.
- Murgia M, Pizzo P, Zanovello P, Zambon A, Di Virgilio F. *In vitro* cytotoxic effects of extracellular ATP. *ATLA* 1992;20:66.
- Lustig KD, Shlau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5113.

45. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994;371:516.
46. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994;64:445.
47. Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA, Buell GN. Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 1995; 3:283.
48. Longhurst PA, Schwegel T, Folander K, Swanson R. The human P2x1 receptor: molecular cloning, tissue distribution, and localization to chromosome 17. *Biochim Biophys Acta* 1996;1308:185.
49. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994;371:519.
50. Nakazawa K, Liu M, Inoue K, Ohno Y. Potent inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 1997;325:237.
51. King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G. Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol* 1996;117:1371.
52. Chen CC, Abopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995;377:428.
53. Souslova V, Ravenall S, Fox M, Wells D, Wood JN, Akopian AN. Structure and chromosomal mapping of the mouse P2X3 gene. *Gene* 1997;195:101.
54. Soto F, García-Guzmán M, Gómez-Hernández JM, Hollmann M, Karschin CH, Stuhmer W. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3684.
55. Soto F, García-Guzmán M, Stuhmer W. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol* 1997;160:91.
56. Dhullipala PDK, Wang YX, Kotlikoff MI. The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced. *Gene* 1998;207:259.
57. García-Guzmán M, Soto F, Laube B, Stuhmer W. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett* 1996;388:123.
58. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996;272:735.
59. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 1997;272:5482.
60. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X 7 receptor. *Neuropharmacology* 1997;36:1285.
61. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9652.
62. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997;77:901.
63. Barritt GJ. Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem J* 1999;337:153.
64. Putney JW Jr. General aspects of calcium signaling. In: Putney JW Jr, Capacitative calcium entry. Austin, TX, USA: Landes Bio-science;1997. p 1.
65. Putney JW, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 1999;21:38.
66. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995;312:1.
67. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 1996;85:661.
68. Xu XZ, Li HS, Guggino WB, Montell C. Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 1997; 89:1155.
69. García RL, Schilling WP. Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:279.
70. Philipp S, Cavalié A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 1996;15:6166.
71. Sinkins WG, Estación M, Schilling WP. Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J* 1998;331:331.
72. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5113.
73. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395.
74. Lang F, Lepple-Wienhues A, Paulmichl M, Szabó I, Siemen D, Gulbins E. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem* 1998;8:285.
75. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997;277:370.
76. Matsuyama S, Schendel SL, Xie Z, Reed JC. Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore forming $\alpha 5$ and $\alpha 6$ helices. *J Biol Chem* 1998; 273:30995.
77. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TO, Yand H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992;69:119.

1 ARP2 a novel protein involved in apoptosis 2 of LNCaP cells shares a high degree homology 3 with splicing factor Prp8

4 J. V. Tapia-Vieyra,¹ R. O. Arellano² and J. Mas-Oliva¹

5 ¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México; ²Instituto de
6 Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Q1 7 Received; accepted

8 Abstract

9 The mechanism of apoptosis has been recognized as an important event in processes such as cellular development and homeosta-
10 sis, as well as degenerative conditions like cancer. Prostate cancer during its advanced stages develops androgen independent
11 cells that ultimately overgrow and promote metastatic events. Our group employing androgen independent LNCaP cells have
12 previously proposed, based on electrophysiological findings, that apoptosis induced cells overexpress a cell death calcium
13 channel-like molecule. Here we report the cloning and expression in *Xenopus laevis* oocytes of apoptosis regulated protein 2
14 (ARP2), a protein overexpressed in apoptosis induced LNCaP cells capable to induce calcium inward currents and apoptosis
15 typical morphology changes in oocytes injected with *arp2* mRNA. Our results also indicate that clone *arp2* cDNA (1.3Kb) shares
16 a 99% homology with a small fragment that corresponds to 18% of the complete sequence of Prp8 cDNA (7.0 Kb), a molecule
17 that codifies for an important protein in the assembly of the splicesome. We propose that protein ARP2 as a fragment of protein
18 Prp8, corresponds to a molecule with a new function in apoptosis related phenomena. (Mol Cell Biochem xxx: 1–13, 2004)

19 **Key words:** cancer, apoptosis, membrane, channel, calcium, splicesome

20 Introduction

21 Programmed cell death or apoptosis [1] executes an important
22 function in processes such as embryonic development, cell
23 homeostasis, and in diseases such as cancer [2]. The mech-
24 anism of apoptosis originates from activation of a suicide
25 program proper to each cell [3]. The process of programmed
26 cell death is divided into several phases [4], the earliest one
27 associated with the stimulus that triggers the apoptotic re-
28 sponse. The second phase is related to the mechanisms of
29 signal transduction, while the third phase corresponds to the
30 effectors mechanisms, in which the apoptotic machinery ac-
31 tivates a series of caspases [5]. The fourth phase of apoptotic
32 cell death involves chromatin condensation, DNA degrada-
33 tion and eventually cell death [4].

Tumor cells possess the inability to promote apoptosis 34
in response to several physiological stimuli [6]. Nonethe- 35
less, due to the fact that calcium is an intracellular reg- 36
ulator [7], its increased and sustained levels can activate 37
a series of cytotoxic mechanisms associated with apopto- 38
sis in various cell types [7]. Since apoptosis has been pro- 39
posed as a control mechanism of tumor growth, the mod- 40
ulation of its activation mechanisms has been considered 41
as an adequate way to find a novel pathway to study and 42
counteract carcinogenesis [8–10]. In human prostate cancer 43
[11], elimination of androgens generates increased intracel- 44
lular levels of Ca²⁺ and cells die via apoptosis [11]. How- 45
ever, in advanced stages, the disease develops a group of 46
androgen-independent cells [12] unresponsive to chemother- 47
apeutic agents. Our group, demonstrated the activation of a 48

Address for offprints: J. Mas-Oliva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circ. Ext. Cd. Universitaria, Col. Copilco, Apdo. Postal 70-243, 04510 México, D.F., México (E-mail: jmas@ifc.unam.mx)

49 Ca^{2+} -permeable, non-selective cationic channel or channel-
 50 associated molecule in androgen-independent lymphoid nod-
 51 ular prostate cancer cells (LNCaP), by two different induc-
 52 tors of apoptosis: ionomycin and elimination of serum from
 53 cell culture media [13]. Several reports have previously
 54 shown that other types of ionic channels might be also di-
 55 rectly or indirectly involved with the process of apopto-
 56 sis [13–15]. Either the activation or *de novo* synthesis of
 57 these channels during the initiation of an apoptotic event
 58 has been proposed to be of central importance when defin-
 59 ing the survival rates of a cancer cell. In this study using
 60 androgen-independent LNCaP cells, we carried out an anal-
 61 ysis of expression of different Ca^{2+} -permeable membrane
 62 channels, and based on this analysis cloned two cDNAs
 63 of molecules synthesized during an apoptosis-induced event
 64 such as serum elimination during cell culture. Expression of
 65 one of these clones in *Xenopus laevis* oocytes suggests that
 66 ARP2 (for apoptosis regulated protein 2) a TRP channel-
 67 like protein related in structure to splicing factor Prp8 [16],
 68 increases the influx of calcium through the plasma mem-
 69 brane and induces the process of apoptosis in the oocyte
 70 itself.

71 Materials and methods

72 Materials

73 The human lymphoid nodule prostate cancer cell line
 74 LNCaP (hormone-independent) [17] was obtained from the
 75 American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA,
 76 U.S.A.). RPMI 1640 medium containing glutamine and
 77 0.2% (w/v) sodium bicarbonate and the bovine fetal serum
 78 (BFS) were obtained from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD,
 79 U.S.A.). Disposable materials for cell culture were obtained
 80 from Nunc (Roskilde, Denmark). Acrylamide and nitrocel-
 81 lulose membranes were obtained from Bio-Rad Laboratories
 82 (Hercules, CA, U.S.A.). Bis-Acrylamide, NP40 detergent,
 83 ethidium bromide, aprotinin, phenylmethylsulphonyl fluo-
 84 ride (PMSF), benzamide, dithiothreitol (DTT), diethyl py-
 85 rocarbonate (DEPC), thapsigargin and acridine orange were
 86 obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Supersignal
 87 chemiluminescent substrate and bicinchoninic acid (BCA)
 88 protein reagent were obtained from Pierce (Rockford, IL,
 89 U.S.A.). OMAT auto X-ray material was purchased from
 90 Kodak (Rochester, NY U.S.A.). Guanidine thiocyanate from
 91 Fluka Chemie (Switzerland). Additional materials included
 92 RNA PCR Core Kit, *rTth* DNA polymerase XL from Roche
 93 Molecular Systems (Branchburg, NJ, U.S.A.), and deoxyri-
 94 bonucleotide dNTPs from Boehringer Mannheim (GmbH,
 95 Germany). Oligonucleotides utilized were synthesized at
 96 the Synthesis Unit, Institute of Biotechnology (UNAM). In
 97 addition, we employed the T7 mMESSAGE mMACHINE

High Yield Capped RNA Transcription Kit and EF-1 α from 98
 Ambion (Austin, TX, U.S.A.) 99

Cell culture 100

LNCaP cells were cultured in RPMI 1640 medium with glu- 101
 tamine and 0.2% (w/v) sodium bicarbonate, supplemented 102
 with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) 103
 penicillin-streptomycin. These cells reached high confluence 104
 after 48 h of incubation. Androgen-independent LNCaP cells 105
 were induced to apoptosis by serum elimination from the cul- 106
 ture medium [13, 18]. 107

Flow cytometry 108

A FACScan flow cytometry apparatus (Becton Dickinson) 109
 was used. We employed 1 000 000 cells either induced to 110
 apoptosis by serum elimination from the culture media or 111
 control cells (induction times were 16 and 72 h). We con- 112
 sidered the following parameters: physical changes such as 113
 increased granularity in cells, cell shrinkage, and cell frag- 114
 mentation [19]. The control used in these assays was serum- 115
 maintained cells. 116

Cell viability experiments 117

Cell viability experiments were carried out to follow exclu- 118
 sion of trypan blue by control cells and cells induced to apop- 119
 tosis by serum elimination during cell culture for 16, 24, 48, 120
 72, 96, 120, and 144 h. 121

DNA fragmentation 122

LNCaP cells at high confluence were induced to apoptosis 123
 by serum elimination during 16, 24, 72 h. These cells were 124
 washed with versene and lysed in 0.5 mL of lysis buffer 125
 (140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 126
 0.5% (w/v) NP40 detergent) for 30 min at 4°C. Nuclei 127
 were obtained in the pellets after centrifugation at 10 000 g 128
 for 10 min at 4°C and resuspended in hypertonic solution 129
 (350 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10 mM 130
 Tris/HCl, pH 7.4) for 30 min at 4°C. DNA extraction was 131
 carried out with phenol-chloroform-iso-amyl alcohol and 132
 precipitated with 7.5 M ammonium acetate and absolute 133
 ethanol. Washed in 70% (v/v) ethanol and separated by 134
 electrophoresis in 2% (w/v) agarose gels using ethidium 135
 bromide. 136

Western blots 137

A group of membrane proteins involved in apoptosis and re- 138
 lated with the influx of Ca^{2+} were selected. The Swiss Prot 139

Table 1. Selected peptides for polyclonal antibody production

Epitope	Molecular weight (kDa)	No. of residues	Dilutions	Reference
Purinergic receptor P2X1	44.980	380-399	1:25	[22]
Purinergic receptor P2X7	68.539	576-595	1:100	[23]
Transient receptor potential TRPC1	92.376	774-793	1:75	[24]
Proapoptotic protein Bax	21.184	80-98	1:100	Commercial

140 data base [20] and the FASTA [21] programs were utilized
 141 for the selection of peptides from these proteins. The selected
 142 peptides were employed to produce the polyclonal antibodies
 143 shown in Table 1 [22-24]. Peptide synthesis and polyclonal
 144 antibody production in rabbits were carried out by Alpha
 145 Diagnostic International (San Antonio, TX). Anti-bax was
 146 obtained as a commercial antibody from Santa Cruz Biotech-
 147 nology (Santa Cruz, California). Dr. Manuel Hernández,
 148 CINVESTAV, México provided the anti-actin antibody em-
 149 ployed in this study. After being incubated for 16 h in medium
 150 with or without serum, cells were harvested in a lysis buffer
 151 (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH
 152 8.0, 1 µg/mL aprotinin, 100 µg/mL phenylmethylsulfonyl
 153 fluoride [PMSF], 1 µg/mL benzamide) and sonicated. Pro-
 154 tein quantification was carried out using bicinchoninic acid
 155 (BCA) and concentrations of 100 µg used throughout. 12.5%
 156 (w/v) polyacrylamide gels were utilized and transferred to
 157 nitrocellulose. Membranes were saturated with Tris-buffered
 158 saline (TBS), pH 7.6 (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM
 159 NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 2.5% (w/v) skimmed milk) and
 160 incubated with primary antibodies (Table 1). The secondary
 161 antibody used was a goat-produced anti-rabbit antibody la-
 162 belled with peroxidase at a dilution of 1:5000. In the case
 163 of the experiments where actin was used as a loading con-
 164 trol, we used as secondary antibody an anti-mouse antibody
 165 produced in goat in a dilution of 1:5000. The reaction was
 166 visualized by means of the chemiluminescent substrate super
 167 signal system.

168 *arp1 and arp2 cloning*

169 Templates for PCR reactions consisted of a mixture of
 170 cDNAs of LNCaP cells maintained with or without serum
 171 during 16 h. Total RNA from LNCaP cells maintained with
 172 or without serum during 16 h was extracted using the guan-
 173 idinium/phenol/chloroform method [25], and used to synthe-
 174 size cDNA with a MuLV reverse transcription system. Syn-
 175 thesized cDNAs were amplified [26] with the following sense

176 primer 5'-TGACAGTGATGCGGGAGAAGG-3' and an
 177 antisense degenerated primer that corresponds to a conserved
 178 region of the Trp family of proteins with sequence EWKFAR
 179 [24, 27] 5'TGY-TCK-MGC-AAA-YTT-CCA-YTC 3'. These
 180 sequences were selected with the Mac Vector Analysis 6.5.3.
 181 [28]. PCR was performed 30 cycles at 94 °C using 45 s/cycle,
 182 60 °C for 45 s, and 72 °C for 2 min and one cycle at 72 °C for
 183 10 min. PCR products were visualized in 1% (w/v) agarose
 184 gels and purified with the Concert gel extraction system
 185 from Gibco BRL (Gaithersburg Maryland). Glyceraldehyde-
 186 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers were used
 187 as an internal standard, where sense oligonucleotide 5'-
 188 TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT3' (position 71-
 189 95) and antisense oligonucleotide 5'-CATGTGGGCCATG-
 190 AGGTCCACCAC-3' were chosen. These products were
 191 cloned in TOPO 4 vector (zero blunt TOPO PCR cloning kit
 192 for sequencing invitrogen, life technologies) for sequence
 193 determination. We also carried out the cloning of these
 194 products in the pXenx1 vector kindly provided by Dr.
 195 Michael Jeziorski (Instituto de Neurobiología, Universidad
 196 Nacional Autónoma de México) in order to be able to add
 197 posttranscriptional modifications such as the tail of poly A,
 198 designed to obtain optimal expression when using *Xenopus*
 199 *laevis* oocytes.

Expression experiments

200
 201 Transient expressions were carried out using *Xenopus laevis*
 202 oocytes [29]. Techniques for injection of mRNA for electro-
 203 physiological recordings from oocytes have been previously
 204 described [30-32]. Briefly, ovaries were dissected from *Xeno-*
 205 *pus laevis* frogs (obtained from Ann Arbor Michigan) by
 206 ventral incision in donors anesthetized by hypothermia. The
 207 oocytes (stage VI) were removed and maintained in Nor-
 208 mal Barth's solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM
 209 NaHCO₃, 0.33 mM CaNO₃, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM
 210 MgSO₄, 5 mM HEPES, 70 µg/mL gentamicin, pH 7.4 with
 211 NaOH). Oocytes were treated with collagenase 0.5 mg/mL
 212 in a normal Ringer solution (115 mM NaCl, 1 mM KCl,
 213 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0 with NaOH) for
 214 45 min, and all follicular layers were removed using for-
 215 cepts. cRNAs were prepared using the high production T7
 216 RNA transcription mMMESSAGE mMACHINE system, and
 217 dissolved in H₂O (c.a. 1 ng/mL). Oocytes injected with 50 nL
 218 were maintained in Barth's medium at room temperature for
 219 36 h. Ion currents were registered and morphological changes
 220 photographed. After this time had elapsed, oocytes were sep-
 221 arated in three groups and incubated in: (1) Normal Barth's
 222 medium, (2) Barths Ca²⁺-free solution (88 mM NaCl, 1 mM
 223 KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 4.2 mM MgCl₂,
 224 5 mM HEPES, 70 µg/mL gentamicin, pH 7.4 with NaOH)
 225 and (3) Barths Ca²⁺-free solution with 5 µM thapsigargin.

226 In addition, groups of control oocytes included oocytes that
227 were not subjected to injections.

228 For each of the previously mentioned conditions, three
229 oocytes in each group were fixed in 4% (v/v) glutaraldehyde
230 in Barth's solution at different times and visualized with a
231 digital stereoscopic microscope. In order to evaluate Ca^{2+}
232 influx, electrophysiological recordings of oocytes from each
233 group were performed after 2–5 h incubation in thapsigargin
234 using the two-electrode voltage-clamp technique [33] and
235 applying pulses of 10 mM CaCl_2 substituted by MgCl_2 in
236 Ringer- Mg^{2+} solution (75 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES pH 5).
237 All data are presented as mean \pm SEM and, differences be-
238 tween two groups were analyzed for statistical significance
239 using paired *t*-test statistical. *p* values ≥ 0.05 were accepted
240 to indicate statistical significance.

241 *Acridine orange staining*

242 Oocytes obtained from the different experimental conditions
243 were fixed in normal Barth's solution containing 4% (v/v)
244 glutaraldehyde and cryofractured. Samples were placed in
245 slides, stained with acridine orange (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [34] and
246 fixed with Dako. Images were obtained using a digital stereo-
247 scopic microscope (Motic).

248 *Caspases 3 and 7 activity measurements*

249 Oocytes injected with the *Xenopus laevis* elongation fac-
250 tor (EF-1 α) [35] shown to be involved in apoptosis [36,
251 37], were used as a positive apoptotic control. Briefly, after
252 oocyte injection and thapsigargin treatment, 12 oocytes
253 from each group were frozen at -70°C . After homogeniza-
254 tion in lysis buffer containing Triton X-100, samples were
255 allowed to thaw and maintained on ice. Samples were cen-
256 trifugated in a refrigerated microfuge at 5000–7000 rpm for
257 5 min at 4°C and the supernatant diluted 10 times with
258 PBS adding DTT (1 mM final concentration). Reagent Z-
259 DEVD-AFC thawed and placed on ice was added to each
260 sample (30 μM final concentration) mixed and incubated
261 30 min at 37°C . Fluorescence was measured according to a
262 Molecular Probes protocol using 400 nm absorption and 505
263 nm emission. Maximal absorption wavelength was found at
264 488 nm.

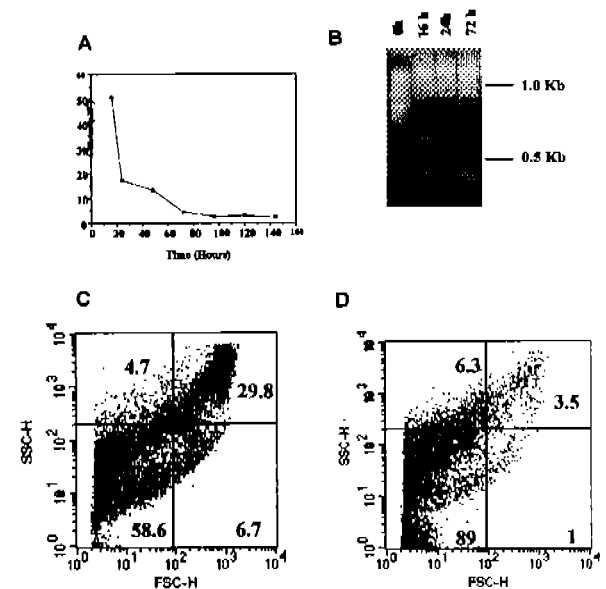
265 Results

266 *Apoptosis in LNCaP cells*

267 Taking into account the fact that elimination of nutrients gen-
268 erates programmed cell death [13, 18]; this procedure has

269 proven to be an effective way to activate apoptosis. There-
270 fore, in the present study we have continued to use this stim-
271 ulus in order to induce apoptosis in LNCaP cells. This event
272 was evidenced using the following parameters: cell viabil-
273 ity, ladder patterns for fragmented DNA, morphological cell
274 changes studied by flow cytometry, *Xenopus laevis* oocyte
275 morphological analysis, electrophysiological recordings, and
276 caspases activation measurements.

277 Cell viability almost immediately began to fade when
278 cells were incubated in the absence of serum (Fig. 1A).
279 Nevertheless, the typical fragmented DNA pattern usually
280 associated to apoptosis was only evident after 16 h or
281 more (Fig. 1B). Employing flow cytometry assays and in-
282 cubation times without serum that ranged from 16 up to
283 72 h, apoptosis-induced cells in suspension clearly showed
284 a decrease at forward scatter (FSC-H) and an increase
285 at side light scatter (SSC-H) (Fig. 1D) which were re-
286 lated to shrinkage and cellular fragmentation compared with
287 control samples (Fig. 1C). Both morphological changes
288 have been associated with mechanisms related to apopto-
289 tic cell death [19]. Although cells incubated without
290 serum for 72 h demonstrated a population of undamaged
291 cells, they presented low viability values due to a greater
292 fragility shown during handling. Therefore, our results show



269 *Fig. 1.* Progression of apoptosis in LNCaP cells. (A) Cellular viability of
270 apoptosis induced cells by removal of serum during cell culture for 16, 24,
271 48, 72, 96, 120 and 144 h. (B) 2% (w/v) agarose gel electrophoresis showing
272 DNA degradation. Control (lane 1); serum removal from LNCaP cell culture
273 media at 16, 24, 72 h (lanes 2–4). Size standards (GIBCO BRL DNA). (C)
274 Flow cytometry of control cells. (D) Flow cytometry of cells maintained in
275 culture without serum during 16 h.

293 that LNCaP cells generated a well-defined process of pro-
 294 grammed cell death at 16 h in culture in the absence of
 295 serum.

296 Recognition experiments with antibodies

297 In order to detect representative members of proposed apop-
 298 tosis associated molecules with similar structures to calcium
 299 permeable channels involved in apoptosis [13], LNCaP cells
 300 incubated during 16 h in the absence of serum were used to
 301 study the levels of expression of different membrane proteins
 302 associated with apoptosis. Expression levels for the P2X1
 303 purinergic receptor showed no difference in expression be-
 304 tween apoptosis-induced and control cells (Fig. 2A). In con-
 305 trast, the purinergic receptor P2X7 showed a larger expres-
 306 sion in control cells than in apoptosis induced cells (Fig. 2B).
 307 These results are in agreement with previous reports showing
 308 that P2X7, 2 and 5 are negatively regulated during apopto-
 309 sis in the ageing rat prostate [38]. Although there are reports
 310 showing that P2X7 receptors might be involved in the induc-
 311 tion of apoptosis in several other cell types [39, 40], accord-
 312 ing to our results employing LNCaP cells, P2X7 might be of im-
 313 portance only during the first hours of the apoptotic event.
 314 Protein bax showed a slight increase in expression when ana-
 315 lyzed in apoptotic LNCaP cells (Fig. 2C), and TRPC1, a
 316 representative molecule of the capacitative calcium channels
 317 family [24] showed a dramatic difference with the control and
 318 the highest increase in expression among proteins apoptotic
 319 related produced by serum removal (Fig. 2D). This suggested
 320 an important participation of TRPC1-like channels in the gen-

321 esis and development of apoptosis in androgen-independent
 322 LNCaP cells; therefore, experiments were designed in order
 323 to further test this possibility.

Cloning

324
 325 On the basis of our Western blot experiments, and the use
 326 of both specific and degenerated oligonucleotides chosen
 327 from the previously reported family of capacitative calcium
 328 uptake channels [27], several PCR products were ampli-
 329 fied. Two PCR products of approximately 1.3 Kb denomi-
 330 nated *apoptosis regulated protein 1* and 2 (*arp1* and 2)
 331 were isolated and sequenced. Originally the two isolated
 332 clones were thought to correspond to the same molecule,
 333 since from the technical point of view it was not possible to
 334 appreciate any changes using agarose gels due to the min-
 335 imal sequence changes between *arp1* and *arp2*. Sequenc-
 336 ing gave us the possibility to study the small but critical
 337 changes between *arp1* and *arp2*. Although *arp1* levels did
 338 not change between control and apoptotic condition, *arp2*
 339 showed a concentration increase when an apoptotic condi-
 340 tion was employed (Fig. 3A). Proteins encoded by these
 341 cDNAs were named ARP1 and ARP2. The GenBank ac-
 342 cession number for Apoptosis Regulated Protein 2 (ARP2)
 343 is AY486134 and apoptosis regulated protein 1 (ARP1),
 344 AY486135. Using FASTA program [21], clones *arp1* and
 345 *arp2* showed homology with a fragment of human splic-
 346 ing factor Prp8 (7.0 Kb) that corresponds to 18% of the
 347 complete nucleotide sequence of Prp8 cDNA. This specifi-
 348 cally corresponds from nucleotide 13 of *arp1* and *arp2*
 349 with nucleotide 4591 of the splicing factor Prp8 [16] (Ap-
 350 pendix A and B). Homology ends with nucleotide 1309 of
 351 our clones and nucleotide 5887 of human Prp8 (Fig. 3B)
 352 (Appendix A and B). Within this interval that roughly cor-
 353 responds to 18% of the whole Prp8 molecule, *arp1* and *arp2*
 354 share a 99% homology (Fig. 3B) (Appendix B). Although
 355 homology between clones *arp1* and *arp2* corresponds to
 356 99%, several changes in their nucleotide sequence (Fig. 3B)
 357 cause the proteins to present differences that seem to be
 358 relevant when function is studied (Appendix C). Interest-
 359 ingly, the amino acid sequence analysis encoded by the
 360 third reading frame of these specific cloned sequences also
 361 showed a 99% homology with the same small fragment of
 362 the human splicing factor Prp8 [16]. Transmembrane helix
 363 prediction and hydrophilicity analysis of ARP1 and ARP2
 364 using the third reading frame, allowed us to reveal spe-
 365 cific regions rich in hydrophobic α -helices that might as-
 366 sociate to the cell membrane in a similar way channels do
 367 (Figs. 3C and 3D). Although there is no direct correlation be-
 368 tween potential membrane associated regions with a channel
 369 protein such as htrp3, the transmembrane helix prediction
 370 and hydrophilicity analysis of ARP proteins show several

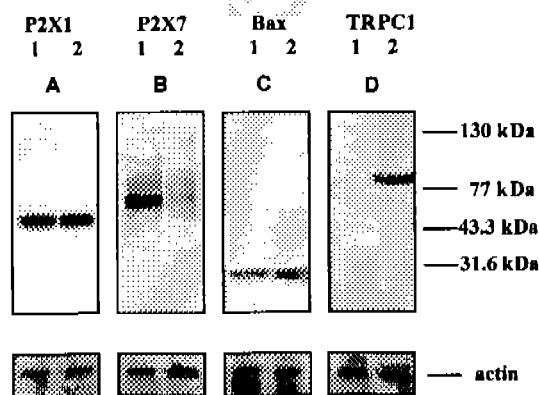


Fig. 2. Recognition experiments using antibodies raised against apoptosis related molecules. (A) Anti-P2X1 antibody. (B) Anti-P2X7 antibody. (C) Anti-bax antibody. (D) Anti-TRPC1 antibody. Lower panels correspond to actin used as a loading control. Lane 1; Cell lysate of LNCaP cells incubated in RPMI 1640 medium containing calf fetal serum. Lane 2; Cell lysate of LNCaP cells incubated in RPMI 1640 medium without serum during 16 h.

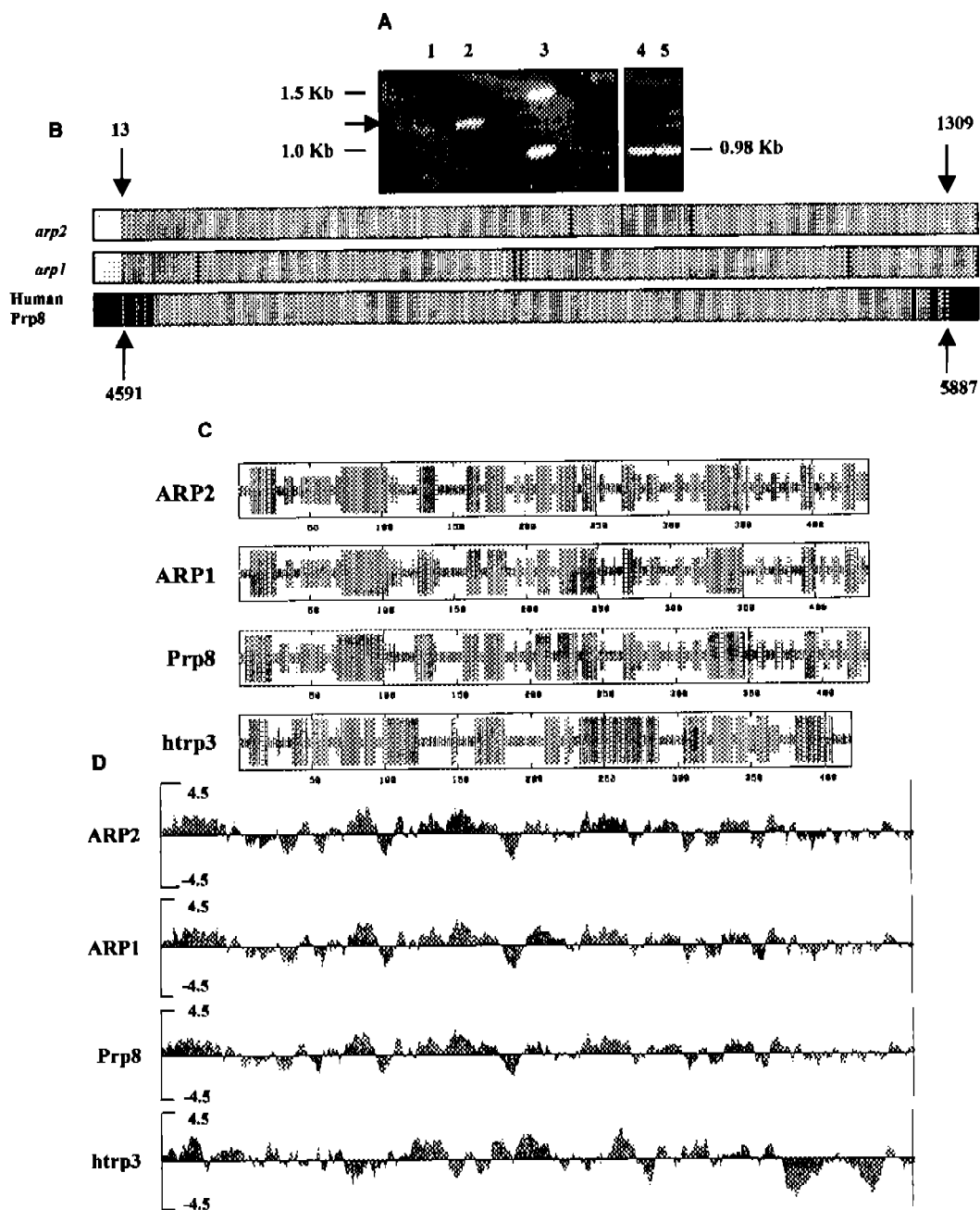


Fig. 3. Cloning of *arp1* and *arp2*. (A) 1% (w/v) agarose PCR products of *arp2* clones. Lane 1; PCR product of *arp2* from cells grown in the presence of serum (control). Lane 2; PCR product of *arp2* from cells grown in the absence of serum. Lane 3; Molecular size standards (GIBCO BRL, DNA 1Kb). Lanes 4 and 5 correspond to GAPDH controls. (B) Multiple alignment of *arp1* and *arp2* cDNAs with human Prp8 cDNA. Nucleotides 4591–5887 correspond to the region of human Prp8 that overlaps with sequences from *arp1* and *arp2* cDNAs. Black lines indicate nucleotides that do not show homology between cDNAs. Yellow spaces in between red lines correspond to nucleotide gaps between cDNAs. Black arrows point nucleotides 13 and 1309 from *arp1* and *arp2* and nucleotides 4591 and 5887 from Prp8. (C) Secondary structure prediction analysis and sequence alignment for ARP2, ARP1, Prp8 and htrp3. Blue bars (α helix), red bars (β -sheet) and purple bars (random structure). (D) Hydrophilicity analysis of proteins ARP2, ARP1, Prp8 and trp3. Regions with aminoacid residues showing values between 0 and 4.5 are considered hydrophobic, while aminoacid residues between values of 0 and -4.5 are considered hydrophilic.

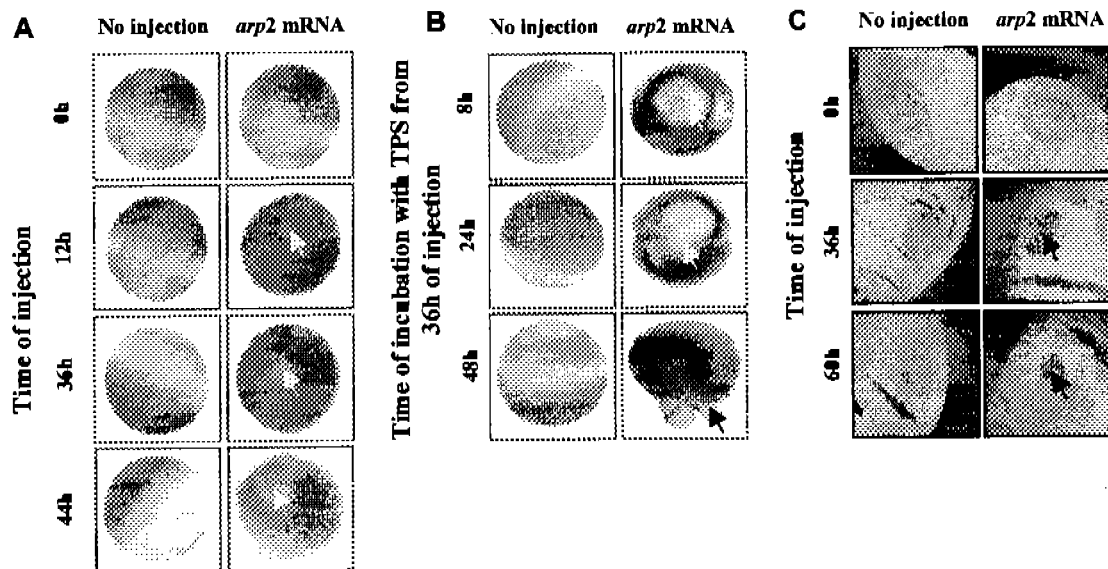


Fig. 4. Morphological changes of *Xenopus laevis* oocytes related to apoptosis after the injection of *arp2* mRNA. (A) Induction of cell death in *Xenopus laevis* oocytes by microinjection of *arp2* mRNA. Vertical columns correspond to oocytes that received no injection and oocytes injected with *arp2* mRNA. Horizontal lines show times of injection (0, 12, 36, 44 h). Yellow arrows show the formation of blisters. (B) Progression of cell death in oocytes of *Xenopus laevis* injected with the *arp2* mRNA and incubation with thapsigargin (5 μ M). Vertical columns show control oocytes that received no injection, and injected oocytes with *arp2* mRNA. Horizontal lines show times of incubation with thapsigargin 5 μ M from 36 h of injection and 8, 24 and 48 h of incubation with TPS. Arrows show the formation of blisters. (C) Morphological changes in the nucleus of *Xenopus laevis* oocytes observed after the injection of *arp2* mRNA. Vertical columns show histological sections of non-injected oocytes, and oocytes injected with *arp2* mRNA. Horizontal lines show incubation time after injection of mRNA (0, 36, 60 h). Black arrows show condensation of chromatin.

371 sequence segments that might be compatible to a channel
372 protein.

373 Functional expression

374 Morphological changes were consistently observed in all
375 groups of *arp2* mRNA-injected oocytes (Fig. 4A) and re-
376 sulted to be more evident in treated oocytes with thapsigargin
377 (Fig. 4B). Concomitantly to these morphological changes,
378 oocytes presented a strong decrease in resting membrane po-
379 tential, changing from a control value of -46.8 ± 6.6 mV to
380 -5.9 ± 3.4 mV (5–8 oocytes, 2 frogs). In general, morpho-
381 logical changes in oocytes included the formation of blisters,
382 which were evident from 12 h after injection (Fig. 4A). A
383 group of oocytes ($n = 3$) injected with *arp1* mRNA did not
384 show neither decrease in membrane potential (-43 ± 5 mV)
385 nor morphological changes (data not shown). These changes
386 observed in *arp2* mRNA injected-oocytes were potentiated
387 when cells were incubated with thapsigargin, accelerating the
388 damage process evident by the loss of definition of the animal
389 and vegetable poles occurring around 36 h after *arp2* mRNA
390 injection and 8 h of incubation with thapsigargin (Fig. 4B).

Similar morphological changes and cell membrane depo- 391
larization results have been described in *Xenopus* oocytes, 392
when injected with cytochrome *c* as a measure to trigger the 393
apoptotic process [4] as well as in oocytes injected with 394
the proapoptotic molecule Bcl-xs [42]. It is important that 395
injection of *arp1* mRNA did not show the same effects on 396
the oocytes compared with those generated by *arp2* mRNA, 397
this included both morphological or electrical changes. In 398
fact, despite the important sequence homology observed be- 399
tween ARP2 and ARP1, from a secondary structure point 400
of view, the few changes found between them resulted to be 401
critical, since ARP1 seems not to develop the phenomenon 402
of apoptosis as efficiently as ARP2 (data not shown). As 403
shown in Fig. 4C, using acridine orange staining [34], re- 404
vealed that morphological changes were also observed in the 405
nuclei of oocytes injected with *arp2* mRNA. These nuclei 406
showed elongated forms and condensation of chromatin from 407
36 up to 60 h of injection, while control oocytes from the same 408
frogs, non-injected oocytes did not show these characteristics 409
($n = 2, 2$ frogs). 410

Injection of *arp2* mRNA in *Xenopus laevis* oocytes, pro- 411
duced a slightly increase in calcium influx through the plasma 412
membrane when the intracellular reservoirs were depleted 413

8

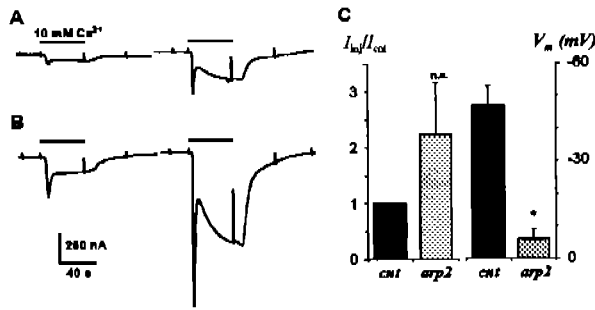


Fig. 5. Functional expression of *arp2* mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. Ionic currents generated by two consecutive pulses of 10 mM Ca^{2+} in Ringer- Mg^{2+} solution after oocyte incubation in absence of calcium and the presence of 5 μ M thapsigargin. (A) Inward current generated in a control oocyte (non-injected). (B) Current in an oocyte injected with *arp2* mRNA. (C) Histogram showing the mean (\pm S.E.) current generated in control oocytes ($n = 3$) and *arp2* mRNA-injected oocytes ($n = 6$). Also is shown the change in resting potential (V_m) observed between the different groups of oocytes (8 control oocytes, 6 injected oocytes). All oocytes in this figure were from the same donor, and similar results were obtained in oocytes from a second frog. (n.s.: not significant, * $p \leq 0.05$).

414 by incubation with thapsigargin. Followed by the application
 415 of calcium pulses, *arp2* mRNA injected oocytes generated
 416 membrane currents that were shown to be slightly increased to
 417 $122 \pm 90\%$ when compared with control oocytes (Fig. 5). The
 418 injected oocytes with *arp1* mRNA in these experiments did
 419 not show any difference with respect to the non-injected control
 420 oocytes (data not shown). Currents observed were apparently
 421 due to the activation of Ca^{2+} -dependent Cl^- channels,
 422 suggesting that thapsigargin increased the activation of capacitative
 423 currents in injected oocytes. These results support the idea that
 424 *arp2* codifies for a Trp channel-like molecule associated to depletion
 425 of endoplasmic reticulum stores [27, 43], or that ARP2 might correspond
 426 to a molecule that indirectly modulates a native channel. Since this
 427 current increase was statistically not significant with the number of
 428 experiments performed, the effect might be also related to an ancillary
 429 change produced by the triggering of the apoptosis process.

432 A further analysis in order to know the metabolic state of
 433 injected oocytes consisted in the measurement of the activity
 434 displayed by caspases 3 and 7, well known to be involved in the
 435 process of apoptosis [44]. Fig. 6 shows the activity of caspases 3
 436 and 7 in non-injected oocytes, and oocytes injected with *arp2* mRNA,
 437 as well as mRNA corresponding to the *Xenopus laevis* elongation factor
 438 EF-1 α [35–37]. As expected, non-injected oocytes independently of
 439 being in the absence or the presence of calcium or thapsigargin,
 440 do not express any caspase activity. Oocytes injected with
 441 *arp2* mRNA showed enzyme activation independently of the
 442

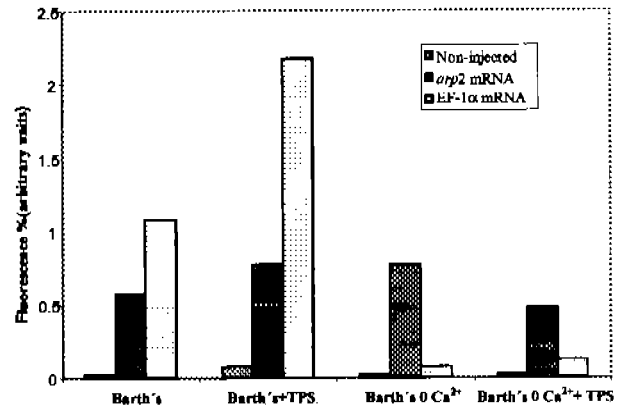


Fig. 6. Activity of caspases 3 and 7 in *Xenopus laevis* oocytes induced to apoptosis by injection of *arp2* mRNA and EF-1 α mRNA. Average of two experiments using 3 oocytes in each condition. Experiments were performed in Barth's medium with or without the presence of calcium and thapsigargin.

incubation protocol (thapsigargin, calcium, etc). In contrast, 443
 EF-1 α mRNA injected oocytes, showed the highest caspase 444
 activation sensitive to both thapsigargin and calcium. Since in 445
 the absence of calcium the injection of EF-1 α mRNA totally 446
 loses the capability to activate caspases (Fig. 6), calcium 447
 sensitivity must probably show that the apoptotic process 448
 caused by the expression of ARP2 and the protein expressed 449
 by the EF-1 α mRNA might be related to differences in their 450
 apoptotic transduction pathways. In this respect, it has been 451
 reported that overexpression of transcription factor E2F-1 452
 promotes apoptosis in several cell types [45, 46], and proposed 453
 to regulate Apaf-1 [47], an important molecule critical 454
 in the expression of the apoptotic pathway triggered by cy- 455
 tochrome *c* [48]. 456

Discussion 457

The molecular search of a channel-like protein was stim- 458
 ulated by previous findings from our laboratory obtained 459
 when combining electrophysiological recordings with simulta- 460
 neous intracellular calcium measurements in single human 461
 prostate cancer cells (hormone independent LNCaP cell line). 462
 These results originally allowed us to identify using elec- 463
 trophysiological evidence, a non-selective cationic channel- 464
 like protein that was calcium permeable, and only activated 465
 when two unrelated inducers of apoptosis were employed 466
 [13]. In this report, a novel channel-like protein (ARP2) from 467
 prostate cancer cells has been cloned and successfully ex- 468
 pressed in *Xenopus laevis* oocytes. *arp2* was identified mostly 469
 in cells that had become apoptotic, since control cells under 470

471 normal culture conditions seem to express it in very low con-
 472 centrations. *arp1* in either control or apoptotic conditions
 473 was shown to be expressed also in very low concentrations.
 474 *arp2* presented a high homology with a fragment that cor-
 475 responds to 18% of the cDNA nucleotide sequence of hu-
 476 man splicing factor Prp8. Prp8 recognizes U5 snRNA, and
 477 since it binds to RNA in the splisosome, it has been sug-
 478 gested to be critical in the catalytic arrangements of RNA
 479 [16, 49].

480 Homology of clones *arp1* and *arp2* with the fragment
 481 of Prp8 from different species such as *Homo sapiens*, *Mus*
 482 *musculus* and *Xenopus laevis*, was achieved from nucleotide
 483 13 of our clones and nucleotide 4591 of Prp8; ending with
 484 nucleotide 1309 of our clones and nucleotide 5887 of Prp8
 485 (Appendix B). Since *arp1* and *arp2* were obtained using as
 486 primers specific sequences and conserved degenerated se-
 487 quences of human *trp3* (*htrp3*), thus the possibility exists that
 488 the channel-like protein sharing an important similarity to a
 489 fragment of Prp8 as well as to a *trp3* is directly responsible
 490 for the increase in our calcium dependent chloride currents
 491 observed after oocyte injection. Alternatively, ARP2 could
 492 modulate an endogenous protein that in turn might activate
 493 the apoptosis mechanism. It is also possible to think that the
 494 increase in Ca^{2+} influx observed is in fact an ancillary effect
 495 to this process.

496 Supporting results include: Secondary structures for ARP1
 497 and ARP2 using the third reading frame, are highly related to
 498 calcium binding proteins and in general to plasma membrane
 499 associated proteins. A series of hydropathy plots demon-
 500 strated that ARP2 presented several hydrophobic regions
 501 compatible in general to secondary structure and aminoacid
 502 characteristics to transmembrane sequences in a similar fash-
 503 ion as found in channels. Also, it is important to note that,
 504 influx of calcium in *arp2* mRNA injected oocytes might have
 505 been underestimated due to the fact that analyzed cells were
 506 those in which it was technically possible to perform electri-
 507 cal recordings, i.e., oocytes that necessarily were still alive,
 508 due to a low ARP2 expression.

509 In conclusion, our results are consistent with the fact that
 510 protein ARP2 corresponds to a truncated form of Prp8 that
 511 presents a secondary structure compatible to a channel-like
 512 protein or membrane associated protein. It remains to be
 513 proven if this molecule functions as an independent channel
 514 or as a membrane associated protein that in turn modulates
 515 an oocyte endogenous channel. Nevertheless, independently
 516 of this last possibility, oocytes injected with *arp2* mRNA ac-
 517 tively promoted important apoptosis associated morphology
 518 and electrophysiological changes believed to be favoured by
 519 inward calcium currents as well as the activation of caspases,
 520 both associated to the progression of apoptosis. In contrast,
 521 injection of *arp1* mRNA into oocytes was not capable to pro-
 522 mote inward calcium currents, membrane potential decrease,

apoptosis associated morphology changes, nor caspases ac- 523
 524 tivation. From the point of view of the sequence changes
 525 observed that most probably led to secondary structure re-
 526 arrangements, we suggest that ARP1 lacks the ability to be
 527 functional. These data together with the fact that elongation
 528 factor EF-1 α employed by us as a positive control has been
 529 proposed to modulate protein synthesis, suggest that syner-
 530 gistic effects of ARP2 might be also achieved: first, through
 531 the formation of a membrane channel, or a complex between
 532 ARP2 and a membrane associated molecule; and second,
 533 through RNA splicing mechanisms associated to the progres-
 534 sion of apoptotic cell death, due to the high homology degree
 535 found between ARP2 and a fragment of Prp8. We believe
 536 ARP2 derived from Prp8 corresponds to a molecule with a
 537 new function in membrane associated events and apoptosis
 538 related phenomena.

Acknowledgements

We thank Prof. Ricardo Miledi for his comments and valuable 540
 scientific advice, Blanca Delgado-Coello for excellent tech- 541
 nical assistance, Ma. Elena Gutiérrez for word processing and 542
 Mrs. Margaret Brunner for editorial services. This work was 543
 supported by grants from the National Council for Science 544
 and Technology (CONACyT) and the National Autonomous 545
 University of Mexico (DGAPA-UNAM) to JM-O. 546

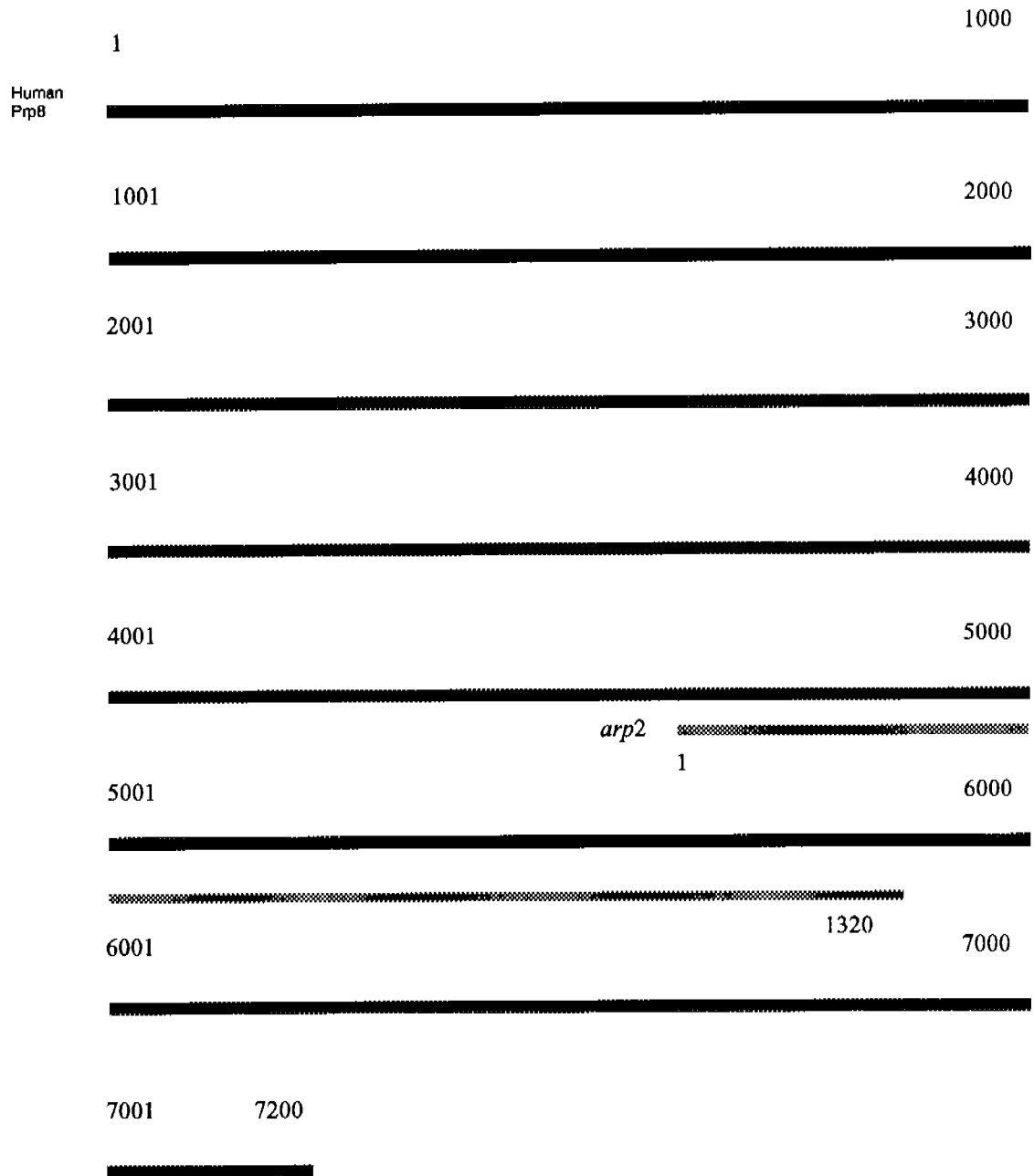
References

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phe- 548
 nomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 549
 26: 239-257, 1972 550
2. Thompson C: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. 551
Science 267: 1456-1462, 1995 552
3. Chen M, Wang J: Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. 553
Apoptosis 7: 313-319, 2002 554
4. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl* 555
Acad Sci U.S.A. 93: 2239-2244, 1996 556
5. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 557
 2000 558
6. Hoffman B, Liebermann DA: Molecular controls of apoptosis: Differ- 559
 entiation/growth arrest primary response genes proto-oncogenes and 560
 tumor suppressor genes as positive & negative modulators. *Oncogene* 561
 9: 1807-1812, 1994 562
7. Nicoletta P, Bellomo G, Orrenius S: Calcium-mediated mechanisms in 563
 chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 449- 564
 470, 1992 565
8. Negoescu A: Apoptosis in cancer: Therapeutic implications. *Histol* 566
Histopathol 15: 281-297, 2000 567
9. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Abeeel FV, 568
 Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N: Store depletion and 569
 store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: 570
 Involvement in apoptosis. *J Physiol* 527: 71-83, 2000 571

- 572 10. Evan GI, Vousden KH: Proliferation cell cycle and apoptosis in cancer. 635
 573 Nature 411: 342-348, 2001 636
 574 11. Huggins C, Hodges CV: Studies on prostatic cancer: I The effect 637
 575 of castration of estrogen and of androgen injection on serum phos- 638
 576 phatases in metastatic carcinoma of the prostate. J Urol 168: 9-12, 639
 577 2002 640
 578 12. Lepor H, Ross A, Walsh PC: The influence of hormonal therapy on 641
 579 survival of men with advanced prostatic cancer. J Urol 128: 335-340, 642
 580 1982 643
 581 13. Gutiérrez A, Arias JM, García L, Mas-Oliva J, Guerrero A: Activa- 644
 582 tion of a Ca²⁺-permeable cation channel by two different inducers of 645
 583 apoptosis in a human prostatic cancer cell line. J Physiol 517: 99-107, 646
 584 1999 647
 585 14. Tapia-Vieyra JV, Mas-Oliva J: Apoptosis and cell death channels in 648
 586 prostatic cancer. Arch Med Res 32: 175-185, 2001 649
 587 15. Parokh AB, Penner R: Store depletion and calcium influx. Physiol Rev 650
 588 77: 901-930, 1997 651
 589 16. Luo HR, Moreau GA, Levin N, Moore MJ: The human Prp8 protein 652
 590 is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. RNA 5: 653
 591 893-908, 1999 654
 592 17. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, 655
 593 Mirand EA, Murphy GP: LNCaP model of human prostatic carcinoma. 656
 594 Cancer Res 43: 1809-1818, 1983 657
 595 18. Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, Prentki M, Roche 658
 596 E: Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum 659
 597 withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. Endocrinology 660
 598 144: 335-345, 2003 661
 599 19. Khan A, Soloski M, Sharp A, Schilling G, Sabatini D, Li S, 662
 600 Ross Ch, Snyder S: Lymphocyte apoptosis: Mediation by increased 663
 601 type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Science 273: 503-507, 664
 602 1996 665
 603 20. Bairoch A, Apweiler R: The swiss-prot protein sequence data bank 666
 604 and its new supplement TREMBL. Nucleic Acids Res 24: 21-25, 667
 605 1996 668
 606 21. Pearson WR, Lipman DJ: Improved tools for biological sequence com- 669
 607 parison. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 85: 2444-2448, 1988 670
 608 22. Longhurst PA, Schwegel T, Folander K, Swanson R: The human 671
 609 P2X1 receptor: Molecular cloning, tissue distribution and localiza- 672
 610 tion to chromosome 17. Biochim Biophys Acta 1308: 185-188, 673
 611 1996 674
 612 23. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, Alan North R, Surprenant 675
 613 A: The permeabilizing ATP Receptor P2X7 Cloning and Expression of a 676
 614 Human cDNA. J Biol Chem 273: 5482-5486, 1997 677
 615 24. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C: 678
 616 TRPC1 a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proc 679
 617 Natl Acad Sci U.S.A. 92: 9652-9656, 1995 680
 618 25. Chomezynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid 681
 619 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 682
 620 162: 156-159, 1987 683
 621 26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: In: Molecular Cloning: A Laboratory 684
 622 Manual 1 and 2: 14-5, 1989 685
 623 27. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer 686
 624 L: trp a novel mammalian gene family essential for agonist-activated 687
 625 capacitative Ca²⁺ entry. Cell 85: 661-671, 1996 688
 626 28. Rastogi PA: MacVector integrated sequence analysis for the Macintosh. 689
 627 Methods Mol Biol 132: 47-69, 2000 690
 628 29. Sumikawa K, Parker I, Miledi R: Expression of neurotransmitter 691
 629 receptors and voltage-activated channel from brain mRNA in 692
 630 *Xenopus* oocytes. In: Methods in Neurosciences, 1989, pp. 30- 693
 631 45 694
 632 30. Miledi R: A calcium-dependent transient outward current in *Xeno-* 695
 633 *pus laevis* oocytes. Proc R Soc London B Biol Sci 215: 491-497, 696
 634 1982 697
 31. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J: Cholinergic and catecholaminergic 635
 receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. J Physiol 328: 143-170, 636
 1982 637
 32. Miledi R, Parker I, Sumikawa K: Properties of acetylcholine receptors 638
 translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. EMBO J 1: 1307- 639
 1312, 1982 640
 33. Arellano RO, Woodward RM, Miledi R: Ion channels and membrane 641
 receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. Ion Channels 4: 203- 642
 259, 1996 643
 34. McGahon AJ, Martin SJ, Blissonette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil 644
 RJ, Nishioka WK, Green DR: The end of the (cell) line: Methods 645
 for the study of apoptosis in vitro. Methods Cell Biol 46: 153-185, 646
 1995 647
 35. Kriegl PA, Varnum SM, Worthington WM, Melton DA: The mRNA 648
 encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major tran- 649
 script at the midblastula transition in *Xenopus*. Dev Biol 133: 93-100, 650
 1989 651
 36. Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL, Wang E: Apoptosis rate can be 652
 accelerated or decelerated by overexpression or reduction of 653
 the level of elongation factor-1alpha. Exp Cell Res 238: 168-176, 654
 1998 655
 37. Chen E, Proestou G, Bourbeau D, Wang E: Rapid up-regulation of 656
 peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early 657
 event during oxidative stress-induced apoptosis. Exp Cell Res 259: 140- 658
 148, 2000 659
 38. Slater M, Barden JA, Murphy CR: The purinergic calcium channels 660
 P2X1, 2, 5, 7 are down-regulated while P2X3, 4, 6 are up-regulated 661
 during apoptosis in the ageing rat prostate. Histochem J 32: 571-580, 662
 2000 663
 39. Nihel OK, de Carvalho AC, Savino W, Alves LA: Pharmacologic 664
 properties of P(2Z)/P2X(7) receptor characterized in murine den- 665
 dritic cells: Role on the induction of apoptosis. Blood 96: 996-1005, 666
 2000 667
 40. Harada H, Chan CM, Loesch A, Unwin R, Burnstock G: Induction 668
 of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors 669
 respectively in rat glomerular mesangial cells. Kidney Int 57: 949-958, 670
 2000 671
 41. Bhuyar A, Varshney A, Mathew MK: Resting membrane potential as 672
 a marker of apoptosis: studies of *Xenopus* oocytes microinjected with 673
 cytochrome c. Cell Death Differ 8: 63-69, 2001 674
 42. Braun T, Dar S, Vorobiov D, Lindenholm L, Dascal N, Stein R: Ex- 675
 pression of Bcl-x_s in *Xenopus* oocytes induces BH3-dependent and 676
 caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. Mol Cancer 677
 Res 1: 186-194, 2003 678
 43. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C: The TRP ion channel family. 679
 Nat Rev Neurosci 2: 387-396, 2001 680
 44. Yu K, Kennedy A, O'Neill MM, Barton RW, Tatake RJ: Disparate cleav- 681
 age of poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) a synthetic tetrapeptide 682
 DEVD by apoptotic cells. Apoptosis 6: 151-160, 2001 683
 45. DeGregory J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR: Distinct roles for 684
 E2F proteins in cell growth control and apoptosis. Proc Natl Acad Sci 685
 U.S.A. 94: 7245-7250, 1997 686
 46. Mundle SD, Sabherwal G: Evolving intricacies and implications of E2F1 687
 regulation. FASEB J 17: 569-574, 2003 688
 47. Furukawa Y, Nishimura N, Furukawa Y, Satoh M, Endo H, Iwase 689
 S, Yamada H, Matsuda M, Kano Y, Nakamura M: Apaf-1 is a medi- 690
 ator of E2F-1 induced apoptosis. J Biol Chem 277: 39760-39768, 691
 2002 692
 48. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic 693
 program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. 694
 Cell 86: 147-157, 1996 695
 49. Collins CA, Guthrie C: The question remains: Is the spliceosome a 696
 ribozyme? Nat Struct Biol 7: 850-854, 2000 697

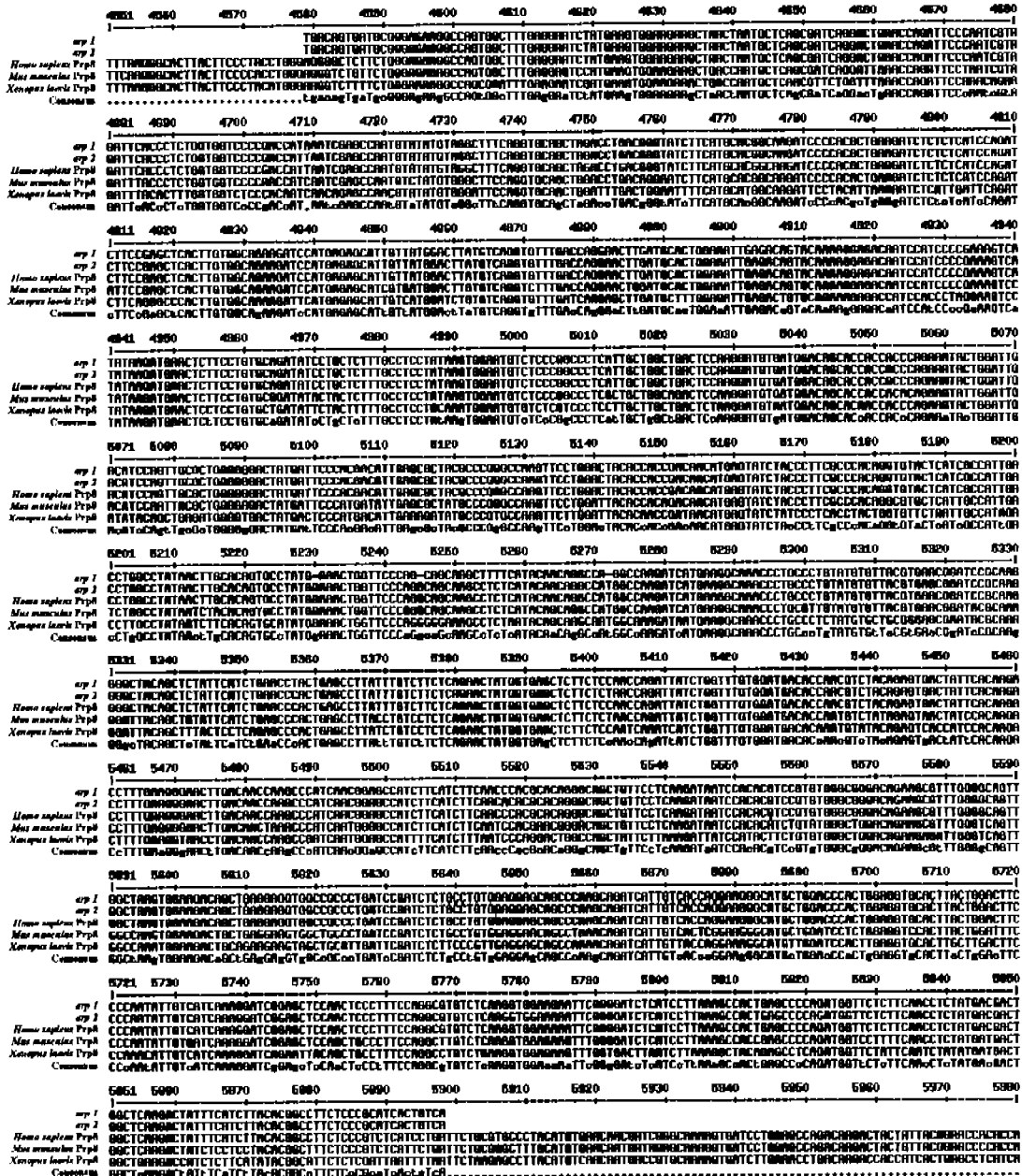
698 **Appendix A**

699 Nucleotide sequence alignment for *arp2* and Prp8 presented to stress the fact that *arp2* corresponds to a small fragment of
 700 Prp8.



Appendix B

Nucleotide sequence alignment for arp1, arp2 and Prp8 from Homo sapiens, Mus musculus and Xenopus laevis. Region presented in red represents a perfect match between sequences. Regions presented in blue show nucleotides partially similar between sequences, and regions shown in black represent different individual nucleotides.



705 **Appendix C**

706 Aminoacid alignment between ARP1 and ARP2. Sequences shown in blue represent a region of 20 aminoacids where the
 707 sequences present no similarities.

```

ARP1  1  MREKASGFEESMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60
ARP2  1  MREKASGFEESMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60

ARP1  61  MHGKIPTLKISLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120
ARP2  61  MHGKIPTLKISLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120

ARP1  121  MNSSCADILLFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDSTTTQKYWIDIQLRWGDYDSHDIERYAR 180
ARP2  121  MNSSCADILLFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDSTTTQKYWIDIQLRWGDYDSHDIERYAR 180

ARP1  181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLIAIDLAYNLHSAYET---GSQ---QQAFHTTGQAKIMKA 234
ARP2  181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLIAIDLAYNLHSAY    GS+  QQA    AKIMKA 235

ARP1  235  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPTEPYLSSQNYGELFSNQIIWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 294
ARP2  236  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPTEPYLSSQNYGELFSNQIIWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 295

ARP1  295  NLTTKPINGAIFIFNRTGQLFLKIIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEVAALIRSLPVEE 354
ARP2  296  NLTTKPINGAIFIFNRTGQLFLKIIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEVAALIRSLPVEE 355

ARP1  355  QPKQIIVTRKGMLDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEEFGDLLILKATEPQMVL 414
ARP2  356  QPKQIIVTRKGMLDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEE+FGDLLILKATEPQMVL 415

ARP1  415  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 436
ARP2  416  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 437

```

Queries

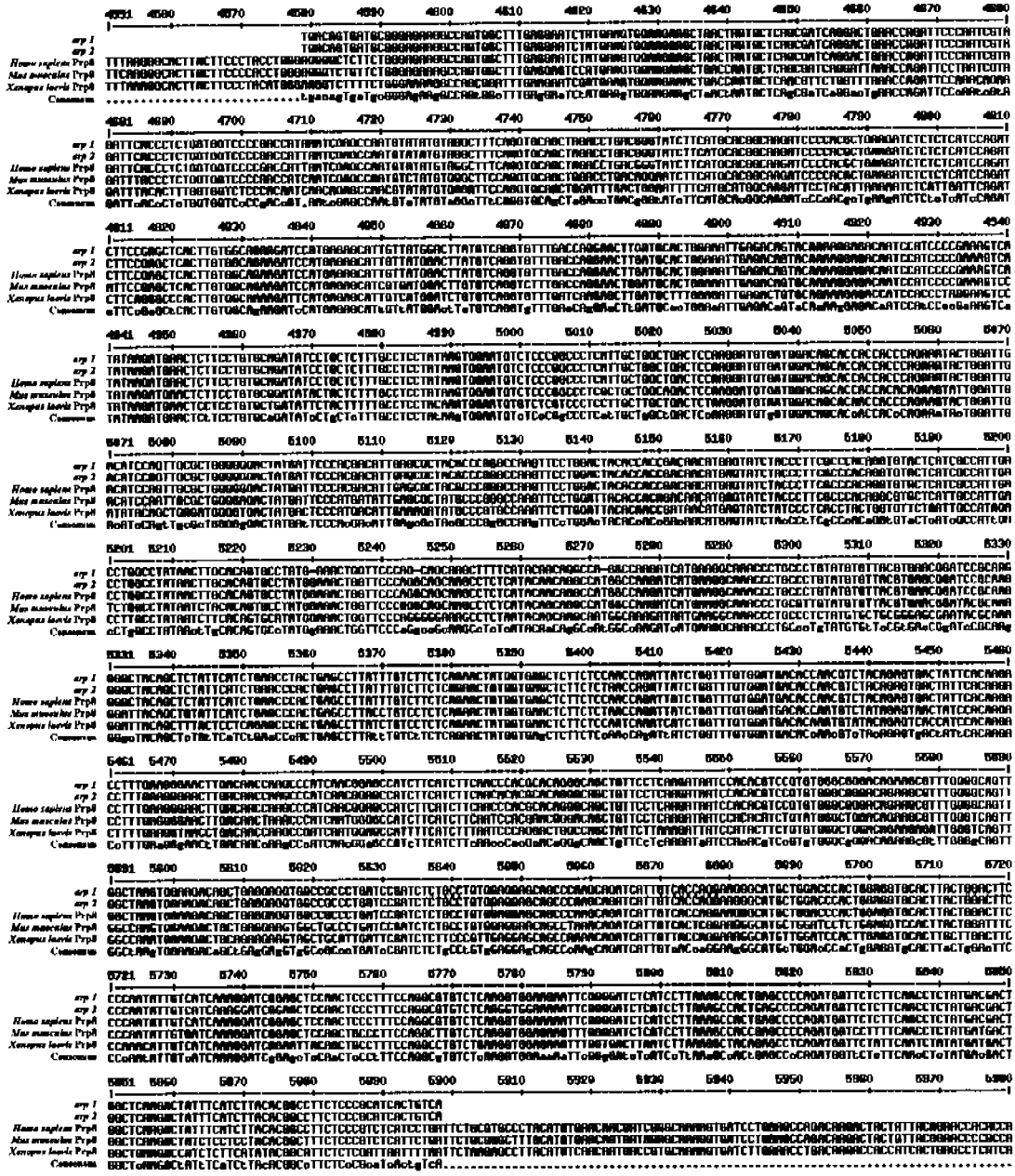
Q1. Au: Please provide received and accepted dates.

Q2. Au: Please provide the name and place of publisher.

UNCORRECTED PROOF

Appendix B

Nucleotide sequence alignment for arp1, arp2 and Prp8 from Homo sapiens, Mus musculus and Xenopus laevis. Region presented in red represents a perfect match between sequences. Regions presented in blue show nucleotides partially similar between sequences, and regions shown in black represent different individual nucleotides. 702 703 704



705 **Appendix C**

706 Aminoacid alignment between ARP1 and ARP2. Sequences shown in blue represent a region of 20 aminoacids where the
 707 sequences present no similarities.

```

ARP1  1  MREKASGFEESMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60
ARP2  1  MREKASGFEESMKWKKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGIF 60

ARP1  61  MHGKIPTLKISLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120
ARP2  61  MHGKIPTLKISLIQIFRAHLWQKIHESIVMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPRKSYK 120

ARP1 121  MNSSCADILLFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDSTTTQKYWIDIQLRWGDYDSHDIERYAR 180
ARP2 121  MNSSCADILLFASYKWNVSRPSLLADSKDVMDSTTTQKYWIDIQLRWGDYDSHDIERYAR 180

ARP1 181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLIAIDLAYNLHSAYET---GSQ---QQAFHTTGQAKIMKA 234
ARP2 181  AKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLIAIDLAYNLHSAY      GS+  QQA      AKIMKA 235

ARP1 235  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPTEPYLSSQNYGELFSNQIIWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 294
ARP2 236  NPALYVLRERIRKGLQLYSSEPTEPYLSSQNYGELFSNQIIWFVDDTNVYRVTIHKTFEG 295

ARP1 295  NLTTKPINGAIFIFNPRTGQLFLKIIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEEVAALIRSLPVEE 354
ARP2 296  NLTTKPINGAIFIFNRTGQLFLKIIHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEEVAALIRSLPVEE 355

ARP1 355  QPKQIIVTRKGMLDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEEFGDLILKATEPQMVL 414
ARP2 356  QPKQIIVTRKGMLDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEEFGDLILKATEPQMVL 415

ARP1 415  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 436
ARP2 416  FNLYDDWLKTISSYTAFSRITV 437

```

Queries

- Q1. Au: Please provide received and accepted dates.
- Q2. Au: Please provide the name and place of publisher.

Author's Proof