

María Isabel Bahamonde Santos

Tesis Doctoral

Barcelona, 2003



**ESTUDIO FUNCIONAL Y MOLECULAR  
DEL CANAL MAXI-Cl- ACTIVADO  
POR ANTIESTROGENOS**

**Departamento de Ciencias Experimentales  
y de la Salud**

**Programa de Doctorado en Ciencias  
de la Salud y la Vida**

**Universidad Pompeu Fabra**

**María Isabel Bahamonde Santos**

**Tesis Doctoral**

**Barcelona, 2003**



**ESTUDIO FUNCIONAL Y MOLECULAR  
DEL CANAL MAXI-CI<sup>+</sup> ACTIVADO  
POR ANTIESTROGENOS**

**Memoria presentada para optar al título de Doctor por la**

**Universidad Pompeu Fabra (UPF)**

**Trabajo dirigido por el Dr. Miguel A. Valverde**

**Unidad de Señalización Celular. Laboratorio de Fisiología**

**Departamento de Ciencias Experimentales**

**y de la Salud (CEXS)**

**Programa de Doctorado de la UPF 1999-2001**

Dipòsit legal: B.14867-2004  
ISBN: 84-688-6644-X

*A mis abuelos Chimbo y Pancho*

*Y a mis abuelas María e Irma*

---

## PROLOGO

La identificación de nuevos mecanismos de acción de las hormonas esteroideas ha supuesto un gran reto para un número reducido de investigadores empeñados en explicar numerosos efectos de los esteroides que no podían ser explicados atendiendo a la secuencia clásica:

hormona ➡ receptor ➡ cambios en la expresión génica

La demostración de la existencia de otras vías alternativas, implicando la presencia de sitios de unión en la membrana plasmática, la generación de señales intracelulares y nuevas dianas para los esteroides ha sido difícil.

La dificultad principal ha residido en la ausencia de un mecanismo molecular, salvo alguna excepción, que explique el proceso que acontece cuando los mecanismos de acción alternativos de los esteroides se disparan. En este sentido, especialmente frustrante ha sido la incapacidad para identificar molecularmente el receptor de estrógenos presente en la membrana celular y que aparentemente media muchas de las respuestas rápidas de los estrógenos.

El objetivo principal de mi trabajo experimental se ha centrado en el estudio de una de estas respuestas rápidas de los estrógenos ( $E_2$ ) y antiestrógenos (AE): la modulación de un canal de cloruro de alta conductancia, conocido como Maxi-Cloruro (Maxi-Cl<sup>-</sup>), que se encuentra en la membrana plasmática de numerosas células.

El abordaje de este objetivo ha tenido que realizarse desde numerosos, quizá demasiados frentes, pues aunque desde el punto de vista electrofisiológico se conocía la modulación de este canal de Cl<sup>-</sup> por estrógenos y antiestrógenos (Hardy y Valverde, 1994), la participación de señales intracelulares en dichas respuestas, así como la

identificación molecular de dicho canal, eran muy imprecisas en el momento de comenzar mi tesis doctoral.

Precisamente estos dos puntos, la regulación y caracterización molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> regulado por estrógenos y antiestrógenos han sido los objetivos de mi trabajo experimental. Los logros obtenidos en dicho proyecto quedan reflejados en tres artículos científicos incluidos en esta Tesis Doctoral. En el primero (Díaz, Bahamonde y cols., 2001) amplía un poco más el conocimiento existente sobre las señales intracelulares que parecen estar participando en la activación/inhibición del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por antiestrógenos y estrógenos. Dicho trabajo presenta un gran componente de análisis electrofisiológico, así como ensayos bioquímicos para determinar la actividad de ciertas proteínas fosfatasas aparentemente implicadas en la regulación del canal por E<sub>2</sub> y AE. El segundo trabajo (Bahamonde y cols., 2003) aborda la identificación molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>, la cual parece corresponder con la de una isoforma del canal VDAC mitocondrial que se localiza en la membrana plasmática (VDACpl). El tercer trabajo (Bahamonde y Valverde, 2003) profundiza en la localización intracelular y membranal del VDAC en diferentes tipos celulares.

Además de los trabajos arriba mencionados, se incluyen dos capítulos más. El primero de ellos hace referencia a la clonación del VDAC plasmático de dos tipos celulares en los que la cinética de las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup> presentan diferencias. El otro, estudia la posible implicación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en la salida de ATP de la célula.

La diversidad de abordajes experimentales que se exponen en esta tesis doctoral no ha hecho fácil escribir una Introducción que mantenga un hilo conductor. De todas formas, mi intención ha sido exponer, al menos, unas pinceladas referentes a todos los aspectos mencionados en esta tesis.

## REFLEXIONES Y AGRADECIMIENTOS

### ESPAÑA

A Barcelona llegué en diciembre de 1999 para comenzar con mi doctorado, esta era la ciudad española que me acogería en los próximos cuatro años. No imaginaba como podría ser mi vida aquí, ni cuanto podría cambiar, solamente venía con la ilusión de comenzar con un nuevo proyecto profesional.

El camino al comienzo no fue fácil, algo que ya me esperaba, ya que sabía muy bien lo que significaba trabajar y estudiar lejos de la familia y de los amigos/as. Sin embargo, lo que creo haber comprendido en estos años es que más allá de aferrarte a aquellas cosas y personas que tienes lejos, debes aprender a apoyarte y luchar con las personas que te rodean en ese momento. Cada persona llega a tu vida en el momento preciso, solamente debes ser consciente de que está allí y que enriquecerá tu vida de una u otra forma.

### *Mis compañeros de doctorado.....*

La mezcla cultural y profesional con la que me encontré en el curso de doctorado era bastante curiosa, además de lo que fue el doctorado en si, era interesante el intercambio a nivel personal entre los estudiantes (la mayoría becarios). Pasamos momentos muy divertidos juntos y momentos muy difíciles también, gracias a todos por estar allí. Sin embargo, de una forma especial quiero agradecer a aquellos compañeros en un principio y amigos ahora, que han estado conmigo de manera más cercana. Gracias a David de Semir, Anita, Susana, Clara, Aida, Sergi, Nuria, David Gimeno y finalmente a Armando<sup>†</sup>. Además, quiero decir que me siento orgullosa de haber participado en todos los momentos de lucha para que nuestro doctorado sea mejor y para que se nos reconozcan nuestros derechos de estudiantes y trabajadores

de la ciencia. Viví muchos años en dictadura y estoy completamente convencida de que no se puede permitir bajo ninguna circunstancia el abuso de poder ni las injusticias a ningún nivel.

***El laboratorio de fisiología.....***

A este laboratorio llegué gracias a la oportunidad que me dio Miguel para hacer mi tesis de doctorado. Más conocido como el "Party Lab" ,en este laboratorio encontré a gente muy alegre, muy valiosa y que me apoyó y ayudó constantemente, gracias a Esther, Chema (por la paciencia que has tenido conmigo tanto a nivel personal como profesional), Yolanda, Paco, Mireia, Maite, Yaniré, Jacqueline y por supuesto a Miguel por confiar en mi, y por poner en mis manos este proyecto de doctorado, que a pesar de haber tenido sus altos y sus bajos, ha dado finalmente muy buenos frutos.

***Otros laboratorios.....***

Indudablemente ha sido mucha la gente a la que he tenido que recurrir para aprender las técnicas utilizadas en esta tesis. Por esta razón quiero agradecer por su ayuda a los Drs. J. Aramburu, Joan Sayós, Arrate Mallabiabarrena y especialmente a los laboratorios de los Drs. Antonio Felipe y Carles Solsona.

***Mis amigos.....***

También de una manera particular llegaron a mi vida algunas personas que me brindaron su amistad incondicional y que compartieron conmigo momentos que recordaré siempre, gracias Tana, Luis y Sonia (gracias por acogerme como una más de la familia), Aoife (tu amistad ha sido muy importante y especial para mi, gracias por tu cariño), Hagar (me siento muy feliz de haberte conocido y de ser tu amiga, gracias



por tu apoyo incondicional), Miguel (el calvo), Peluffo y Damiana (esta uruguayana llegó a mi vida cuando menos lo esperaba, pero cuando más lo necesitaba, Dami eres una persona increíble y realmente eres una verdadera y gran amiga).

## CHILE

### *Mis amigas y amigos a la distancia.....*

Una vez más he comprobado que las relaciones verdaderas son las que duran en el tiempo, no importa donde estén, porque ustedes amigos míos son los responsables de que aún yo crea en esto. Quiero dar las gracias a Rodrigo y Carla, Jorge Mario, Ricardo, Gonzalo, Lalo, Malona, Marcela, Pitu, Karen, Cecilia , Marisol, Claudia, Cecilia Vergara y Were, ustedes me han acompañado a distancia en este camino, gracias por creer que lo podía lograr y por estar siempre presentes.

### *Mi familia.....*

Es obvio que nada de esto habría sido posible sin el apoyo incondicional y el cariño y amor de mis padres, mi hermano (gracias por tu amor y tu fe en mi) y mi familia, especialmente mi tía Mirna (que más que una tía ha sido una segunda madre) y mi mami Irma<sup>†</sup> (el perderla ha sido una de las tristezas más grande que he tenido que superar). Quiero agradecer especialmente a mis padres por todo el esfuerzo que han hecho por mi desde siempre, y quiero que sepan que a pesar de nuestras diferencias son las personas que más quiero en el mundo. Mi pensamiento y corazón siempre están con ustedes. La confianza que siempre han tenido en mi, el amor que me han dado siempre y todos sus ejemplos han hecho de mi una persona fuerte y luchadora. Indirectamente esta tesis va dedicada a ustedes también.

---

<sup>†</sup> Estas personas han fallecido en Julio de este año.

## FRANCIA

Desde Grenoble, llegó a mi vida una persona que me ha llenado de tranquilidad, paz, felicidad y amor. Conocí a Fabien en octubre del año 2000, sin hablar español y en principio como un compañero de doctorado, fue conquistando rápidamente mi corazón. Él ha sido la fuerza necesaria que yo necesité para continuar en este camino. Gracias Fabien por todo tu cariño, apoyo, fe en mí, compañía, paciencia, comprensión, amistad y amor. Tú le has dado un sentido especial a todo lo que estoy haciendo y sin ti creo que no hubiera podido llegar hasta aquí. Me siento realmente afortunada de haberte conocido, de estar contigo y de poder amarte. Además quiero agradecerte por haber diseñado la portada de esta tesis y por estar siempre dispuesto a escuchar y opinar sobre mi trabajo de investigación.

## INDICE

<b>PROLOGO</b>	<b>i</b>
<b>REFLEXIONES Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE</b>	<b>vii</b>
<b>ABREVIACIONES</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1. Canal Maxi-Cloruro (Maxi-Cl <sup>-</sup> )	7
1.1.1. Canales de cloruro	7
1.1.2. Canal de Cl <sup>-</sup> de alta conductancia o Maxi-Cl <sup>-</sup>	9
1.2. La porina VDAC ( <i>Voltaje-dependent anionic channel</i> )	12
1.2.1. Distribución celular del VDAC	14
1.2.2. Importe del VDAC hacia la membrana externa de la mitocondria	14
1.2.3. El papel del VDAC en el proceso de apoptosis	16
1.2.3.1. Principales vías involucradas en el proceso de apoptosis celular	16
1.2.4. Participación del VDAC en la formación del poro de transición y su función en el proceso apoptótico	19
1.3. Vía alternativa (no genómica) del mecanismo de acción de los esteroides	21
1.3.1. Receptores de estrógenos clásicos	21
1.3.2. Vía alternativa del mecanismo de acción de los estrógenos	22
1.4. Microdominios de transducción de señales: <i>Lipid Rafts</i> y <i>Caveolas</i>	27
	<b>vii</b>

---

1.4.1. Microdominios de la membrana plasmática: <i>lipid rafts</i> y caveolas	27
1.5. Mecanismo de acción de los antiestrógenos	31
1.5.1. Elementos asociados a los efectos no genómicos de los antiestrógenos	34
1.5.1.1. Proteínas fosfatasa	34
1.5.1.2. Clasificación de las familias de fosfatasa PPP y PPM	35
1.5.1.3. Características estructurales y funcionales de la PP2A	37
1.5.1.4. Proteína fosfatasa 2A y su implicación en la apoptosis	39
<b>2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS (ARTICULOS)</b>	<b>40</b>
2.1. <i>Okadaic acid-sensitive activation of Maxi-Cl<sup>-</sup> channels by triphenylethylene antioestrogen in C1300 mouse neuroblastoma cells. Journal of Physiology (2001)</i>	41
2.2. <i>Plasma membrane voltage-dependent anionic channel mediates antiestrogen-activated Maxi-Cl<sup>-</sup> currents in C1300 neuroblastoma cells. The Journal of Biological Chemistry (2003)</i>	51
2.3. <i>Voltage-dependent anionic channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria. European Journal of Physiology (2003)</i>	57
<b>3. METODOLOGIA Y RESULTADOS ANEXOS</b>	<b>62</b>
3.1. Ensayo luciferina/luciferasa para la determinación de la liberación del ATP	62
3.1.1. Purificación de la luciferina/luciferasa	63
3.1.2. Tratamiento de las células para observar la liberación del ATP estimulado por toremifeno	64
3.1.3. Medición del ATP liberado a través del Maxi-Cl <sup>-</sup>	65

---

3.2. Clonación del canal VDAC plasmático	70
3.2.1. Cultivos celulares	70
3.2.2. Extracción del ARN, RT-PCR y purificación del ADN	70
3.2.3. Ligación, transformación y siembra de bacterias transformadas en placas de agar	72
3.2.4. Cuantificación del ADN	75
3.2.5. Digestión y secuenciación del ADN clonado	75
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
4.1. Caracterización del canal Maxi-Cl <sup>-</sup>	81
4.2. Identificación molecular del canal Maxi-Cl <sup>-</sup>	83
4.3. Regulación del canal Maxi-Cl <sup>-</sup> por estrógenos y antiestrógenos	89
4.4. Relevancia fisiopatológica del Maxi-Cl <sup>-</sup>	94
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>99</b>

## Abreviaciones

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**ADP:** Difosfato de adenosina

**AE:** Antiestrógeno

**AMPc:** Monofosfato de adenosina ciclico

**ANT:** Proteína translocadora del nucleótido de adenina (*Adenine nucleoside translocator*)

**Apaf-1:** *Apoptosis protease activating factor-1*

**AO:** Acido okadaico

**ARNm:** Acido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BSA:** Albúmina de suero de bovino (*Albumin serum bovine*)

**[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>:** Calcio intracelular libre

**DIDS:** *4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid*

**dNTPs:** Deoxinucleótidos fosfatos

**DPC:** *Diphenylamine-2-carboxylate*

**E<sub>2</sub>:** Estrógenos

**eNOS:** *Endotelial Nitric Oxide Synthase*

**ER $\alpha$ :** Receptor de estrógeno alfa

**ER $\beta$ :** Receptor de estrógenos beta

**FADD:** *Fas-associated death domain*

**GABA:** Acido  $\gamma$ -aminobutírico ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

**GDP:** Difosfato de guanosina

**GDP  $\beta$ -S:** Difosfato de guanosina  $\beta$ -S

**GMPc:** Monofosfato de guanosina cíclico

**GppNHp:** Guanosina 5'-[β-imido] trifosfato (*Guanosine 5'-[β-imido] triphosphate*)

**GTP:** Guanosina trifosfato

**GTP γS:** Sal de guanosina trifosfato (*Guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate salt*)

**IL-1:** Interleuquina 1

**IMM:** Membrana mitocondrial interna (*Inner Membrane Mitochondrial*)

**INFγ:** Interferón gama

**IP3:** Fosfatidilinositol 3

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno

**MEK:** Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno

**MITO:** Mitocondria

**NOS:** Oxido nítrico sintasa

**NPPB:** *5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid*

**OMM:** Membrana externa de la Mitocondria (*Outer Membrane Mitochondrial*)

**pH:** Potencial de hidrógeno

**P<sub>i</sub>:** Fosfato libre

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinasa

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PKG:** Proteína quinasa G

**PLC:** Fosfolipasa C

**PM:** Membrana plasmática

**PTP:** Poro de transición (*Permeability transition pore*)

**RT-PCR:** Transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa.

**SERMs:** *Selective estrogen receptor modulators*

**SITS:** *4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid*

**TOM:** *Translocase of the outer mitochondrial membrane*

**TIM:** *Translocase of the inner mitochondrial membrane*

**VDAC:** Canal aniónico dependiente de voltage (*voltage-dependent anionic channel*)



## RESUMEN

El descubrimiento en nuestro laboratorio de la modulación por E<sub>2</sub> y AE del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> ha permitido abordar el estudio y la relevancia funcional de dicho canal. La exposición de células de origen fibroblástico (NIH3T3) y neuroblástico (C1300) a antiestrógenos (AE, toremifeno y tamoxifeno) activan el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en la configuración electrofisiológica de célula entera (*whole cell*), permitiendo así el estudio del Maxi-Cl<sup>-</sup> en membranas celulares sin escindir. El pretratamiento de las células con 17β-estradiol o AMPc previene la activación por AE de las corrientes del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>. Este efecto inhibitor fue anulado en presencia de estaurosporina, un inhibidor de proteínas quinasas que fosforilan residuos del tipo serina/treonina. La activación del canal por AE también se puede prevenir por la adición intracelular de ácido okadaico (AO, 1 nM), una toxina que a esta concentración inhibe completamente la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Sin embargo, la actividad total de la PP2A no cambia en células expuestas tanto a estradiol como a antiestrógenos, por lo que aun no está totalmente esclarecido el proceso mediante el cual la fosfatasa 2A actúa modulando el canal. Nuestra hipótesis es que el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se mantiene cerrado mediante un evento de fosforilación del canal o de una proteína reguladora asociada a éste. En presencia del AE, el canal es activado por un proceso de desfosforilación a través de la acción de una fosfatasa tipo PP2A.

Un gran obstáculo en el estudio de la regulación por E<sub>2</sub> y AE del Maxi-Cl<sup>-</sup> era el desconocimiento de la identidad molecular del Maxi-Cl<sup>-</sup>. Las propiedades electrofisiológicas del Maxi-Cl<sup>-</sup> se asemejan a aquellas descritas para el canal aniónico VDAC, una proteína integral de membrana que abunda en la membrana externa de la mitocondria. Esta proteína proporciona la vía principal para el transporte de

diferentes sustratos tales como ATP y colesterol y ha sido involucrada en el proceso de apoptosis mitocondrial. La hipótesis de que el VDAC podría corresponder al correlato molecular del canal de membrana Maxi-Cl<sup>-</sup> ha sido discutida y cuestionada por varios investigadores. Observaciones recientes apoyan la presencia de la proteína VDAC en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares. Los resultados experimentales expuestos en esta tesis demuestran la presencia de una isoforma del VDAC (VDACpl) en la membrana plasmática de las células C1300 y NIH3T3. Para ello se utilizaron diferentes técnicas tales como RT-PCR, utilizando cebadores que hibridan directamente con la secuencia completa del VDACpl; inmunodetección de proteínas en soporte de nitrocelulosa, utilizando el anticuerpo monoclonal comercial contra el péptido del VDAC humano (31HL, Ab-2); inmunofluorescencia indirecta utilizando el mismo anticuerpo monoclonal comercial Ab-2.

Los experimentos de inmunolocalización del VDAC mediante microscopia confocal también permitieron identificar por primera vez una localización preferencial del VDAC en un conjunto de mitocondrias periféricas –no en las perinucleares– tanto en los fibroblastos NIH3T3 como en los neuroblastos C1300.

La relación entre la proteína VDAC y el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> activado por antiestrógenos, se investigó utilizando oligonucleótidos antisentido frente al VDACpl. La incubación de las células C1300 con el antisentido dirigido contra la secuencia líder del VDACpl, reduce marcadamente la expresión del VDAC y las corrientes del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> activadas por el antiestrógeno toremifeno. Una vez demostrada la asociación entre la proteína VDAC y el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se inició la clonación del canal VDACpl en los dos tipos celulares donde se había documentado la activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por AE (C1300 y NIH3T3). El análisis de las dos secuencias obtenidas reveló que eran idénticas, y que por lo tanto se trataría de la misma proteína, a pesar de que alguna de las características electrofisiológicas del Maxi-Cl<sup>-</sup> difiere en los dos tipos celulares.

Finalmente, mediante un ensayo de ATP (reacción luciferina/luciferasa), se demostró que el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> activado por antiestrógenos podría servir como una vía de salida del ATP citosólico.

En resumen, los datos confirman la presencia de la proteína VDAC en la membrana plasmática, así como en las mitocondrias más periféricas, no en las mitocondrias perinucleares de las células C1300 y NIH3T3. La función del VDAC en la membrana plasmática aun no es clara. Basados en los experimentos electrofisiológicos y de liberación del ATP, se postula que este canal está implicado en la salida del ATP y, por tanto, en la privación metabólica de las células expuestas a AE. Sin embargo, se desconoce si este canal de la membrana plasmática podría estar funcionalmente acoplado al VDAC mitocondrial o si este canal aniónico podría estar involucrado en el proceso de apoptosis celular mediado por antiestrógenos.

# INTRODUCCIÓN 1

## 1.1 CANAL MAXI-CLORURO (MAXI-Cl)

### 1.1.1. Canales de cloruro

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo pasivo de iones a través de diversas membranas biológicas. Pueden ser selectivos para un tipo particular de ión y aún mantener una alta tasa de transporte (Ackerman y Clapham, 1997; Jentsch, 2002; Nilius y Droogmans, 2003). Los canales clásicamente se han clasificado de acuerdo al tipo principal de ión que permea a través de sus poros, pudiendo ser iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) o cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), y en algunos casos no tan selectivos, permitiendo el paso de cationes o aniones. Más recientemente se han comenzado a clasificar en función de su secuencia molecular (Sheppard y Valverde, 1997; Valverde, 1999; Jentsch y cols., 2002; Nilius y Droogmans, 2003).

Los canales de interés en el presente trabajo son los aniónicos. Estos forman poros en la membrana plasmática y membranas intracelulares, siendo permeables a varios tipos de aniones, tales como yoduro ( $\text{I}^-$ ), bromuro ( $\text{Br}^-$ ), pero también a nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y aminoácidos cargados negativamente (Nilius y Droogmans, 2003). Normalmente, a los canales aniónicos se les denomina canales de  $\text{Cl}^-$ , ya que el cloruro es el anión más abundante a nivel fisiológico en todas las especies de organismos (Sheppard y Valverde, 1997; Nilius y Droogmans, 2003). Los canales de  $\text{Cl}^-$  se expresan en una amplia variedad de tejidos de mamíferos, incluyendo el muscular, nervioso, endocrino, exocrino y epitelial (Blatz, 1994; Sheppard y Valverde, 1997). Los

canales de Cl<sup>-</sup> son esenciales para ejecutar una amplia gama de funciones celulares. Tienen un rol vital en procesos fisiológicos tales como la regulación del volumen celular, el transporte epitelial, la excitabilidad neuronal y muscular, y la regulación del pH intracelular, manteniendo así la homeostasis celular (Jentsch y cols., 2002), con lo cual la disfunción de estos canales conlleva alteraciones en la función de muchos órganos, causando enfermedades tales como la fibrosis quística y las miotonías.

Desde un punto de vista funcional y atendiendo al mecanismo primario de activación, se han descrito distintos tipos de canales de Cl<sup>-</sup>: (1) los que dependen de los cambios en el campo eléctrico transmembranal (canales de Cl<sup>-</sup> dependientes de voltaje); (2) los canales sensibles a cambios en el volumen celular (canales aniónicos regulados por volumen, VRAC o ICl<sub>swell</sub>); (3) los activados por proteínas quinasas/nucleótidos; (4) los dependientes de un incremento en el Ca<sup>+2</sup> intracelular (canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>+2</sup>, CaCC); (5) y los canales de Cl<sup>-</sup> activados por ligandos o asociados a receptores (receptores GABA o glicina) (Sheppard y Valverde, 1997; Nilius y Droogmans, 2003).

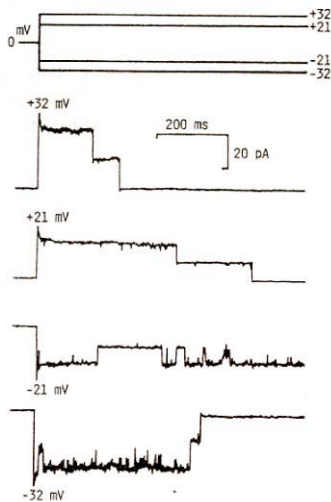
Desde el punto de vista estructural se conocen varias familias de canales de cloruro: la familia CIC o de canales formados por homodímeros, la familia CaCl o canales de cloruro activados por Ca<sup>+2</sup> que presentan una única proteína con multidominios transmembrana y la familia de la CFTR con 12 segmentos transmembrana (Sheppard y Valverde, 1997; Valverde, 1999; Jentsch y cols., 2002; Nilius y Droogmans, 2003).

### 1.1.2. Canal de Cl<sup>-</sup> de alta conductancia o Maxi-Cl<sup>-</sup>.

Dentro de los canales de Cl<sup>-</sup> dependientes de voltaje, existe un tipo de canal que presenta alta conductancia al Cl<sup>-</sup>, alrededor de 250-430 pS, y que comúnmente es denominado Maxi-Cl<sup>-</sup>. Este canal fue originalmente estudiado con la técnica de potencial controlado bajo la modalidad de parche escindido (*excised patch clamp recording*) en cultivos de miotubos de rata (ver Fig. 1) (Blatz y Magleby, 1983). El hecho de que este canal solamente se abriera al escindir el parche desde la membrana celular, indicaba la existencia de algún componente o mecanismo intracelular que mantendría al canal cerrado en estado basal (Blatz y Magleby, 1983). Posteriormente se ha descrito este canal en una amplia gama de células y tejidos (Schwarze y Kolb, 1984; Brown y cols., 1993; Forshaw y cols., 1993; Hardy y Valverde, 1994; Dermietzel y cols., 1994; Riquelme y cols., 1995; Díaz y cols., 2001).

Algunas de sus características generales son: presentar una secuencia de permeabilidad a aniones monovalentes  $I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^-$  (Nobile y Galletta, 1988; Schlichter y cols., 1990); ser bloqueado por SITS, DIDS, NPPB y DPC (Pahapill y Schlichter, 1992; Sheppard y Valverde, 1997; O' Donnell y cols., 2001); ser regulado por GTP $\gamma$ S (Alexander y cols., 2001); y modulado por estrógenos y antiestrógenos (Hardy y Valverde, 1994; Li y cols., 2000; Díaz y cols., 2001; Henriquez y Riquelme, 2002; Bahamonde y cols., 2003). El Maxi-Cl<sup>-</sup> presenta una peculiar cinética de apertura y cierre del canal, observándose una marcada inactivación tanto a potenciales positivos como negativos. Esto es, el canal permanece más tiempo abierto a potenciales próximos a 0 mV (ver Fig. 1) (Blatz y Magleby, 1983; Blatz, 1994). Sin embargo, existen excepciones a este comportamiento, es decir, canales Maxi-Cl<sup>-</sup> que no inactivan, como por ejemplo el de la línea celular de colon T84 (Vaca y Kunze, 1992), las células epiteliales alveolares (Kemp y cols., 1993) y los de neuroblastos C1300

que exhiben poca o nula inactivación a potenciales hiperpolarizantes (Díaz y cols., 2001).



**Fig. 1-** Registro original de canal único de Blatz y Magleby en un parche excindido en la membrana plasmática de células musculares de rata<sup>1</sup>.

Las primeras evidencias de la regulación del Maxi-Cl<sup>-</sup> fueron la modulación de este canal por GTP, GDP y algunos de sus análogos en registros de parches escindidos (McGill y cols., 1993), y el registro en membranas intactas (*cell attached*) donde tras la incubación con H7 (un inhibidor de quinasas como PKC) se activaba el canal (Saigusa y Kokubun, 1988). Además, en el año 1994 se registró por primera vez la corriente macroscópica de este canal en una célula entera y su regulación por E<sub>2</sub> y AE (Hardy y Valverde, 1994). La activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> fue descrita en fibroblastos NIH3T3, tras la exposición extracelular a compuestos antiestrogénicos tales como el toremifeno y el tamoxifeno, fármacos que son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama (Parker, 1993; Haskell, 2003). Hardy y Valverde (1994) también demostraron que esta activación se podía prevenir previa incubación de las células

<sup>1</sup>Reproducido de Blatz y Magleby, 1983.

con  $17\beta$ -estradiol, no así con  $17\alpha$ -estradiol ni progesterona. Las corrientes de cloruro activadas por antiestrógenos en los fibroblastos presentaban una cinética similar a las descritas en miotubos, con una marcada inactivación tanto a potenciales positivos como negativos (Hardy y Valverde, 1994; Valverde y cols., 2002). La activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por antiestrógenos ocurría rápidamente (segundos-minutos), descartándose por tanto la participación de una vía genómica en el mecanismo de acción de los AE (Ver apartado: Vía alternativa del mecanismo de acción de los estrógenos)

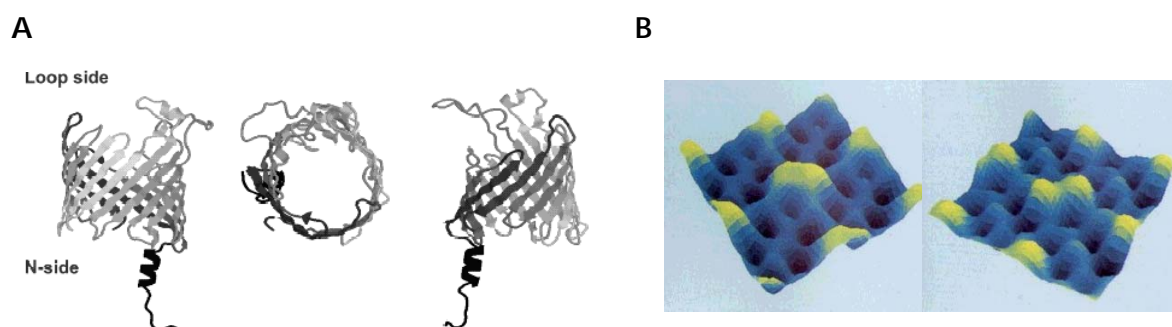
La función del Maxi-Cl<sup>-</sup> aun es desconocida, aunque se ha especulado que puede contribuir a la regulación del volumen celular (Coulombe y Coraboeuf, 1992; Sabirov y cols., 2001), a la comunicación eléctrica entre célula y célula (Blatz, 1990), al transporte epitelial (Anderson y cols., 1992), a la regulación de la excitabilidad neuronal y muscular, a la regulación del pH intracelular, así como participar en los procesos de apoptosis celular (Valvede y cols., 1995; Sheppard y Valverde, 1997; Shimizu y cols., 2001).

Las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas del Maxi-Cl<sup>-</sup> se asemejan a las de una proteína mitocondrial conocida como VDAC (*voltaje-dependent anionic channel*) (Colombini, 1979; Blatz, 1994). Por esta razón desde el año 1992 (Thinnes, 1992; Dermietzel y cols., 1994; Bathori y cols., 2000) se ha planteado la hipótesis de que el VDAC podría corresponder al correlato molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>. Sin embargo, hasta el momento la evidencia experimental de dicha asociación no ha sido convincentemente demostrada.



## 1.2. LA PORINA VDAC (*VOLTAGE-DEPENDENT ANIONIC CHANNEL*)

La porina VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), es una proteína pequeña (30-34 kDa), pero la más abundante en la membrana externa de la mitocondria (Song y cols., 1998; Yu y cols., 1995; Blachly-Dyson y cols., 1993; Dermietzel y cols., 1994 Schwarzer y cols., 2002). Esta proteína pertenece a una familia peptídica cuya principal característica es formar poros en la membrana de la mitocondria (porinas) y encontrarse evolutivamente conservada en las células del reino eucariótico (Song y cols., 1998; Yu y cols., 1995; Blachly-Dyson y cols., 1993; Buettner y cols., 2000; Schwarzer y cols., 2002). El estudio bioquímico y de microscopía electrónica de la porina VDAC, predice un modelo estructural conformado principalmente por 16 láminas  $\beta$  y al menos una hélice alfa en el extremo N-terminal (ver Fig. 2), capaz de separar un medio ambiente apolar de uno polar (Manella, 1984; Colombini, 1989; Thomas y cols., 1991; Colombini y cols., 1992; Sorgato y Moran, 1993; Benz, 1994; Yu y cols., 1995; Forte y cols., 1987; Song y cols., 1998; Dolder y cols., 1999; Casadio y cols., 2002)



**Fig. 2-** (A) Estructura 3D predicha para el canal VDAC mitocondrial en *Neurospora crassa*, siendo muy parecidos los modelos 3D de levadura y ratón<sup>2</sup>. (B) Representación tridimensional de una reconstrucción de superficie del canal VDAC mitocondrial en la especie *N. crassa*<sup>3</sup>

---

<sup>2</sup> Reproducido de Casadio y cols., 2002.

Estudios funcionales de la porina VDAC han permitido su caracterización electrofisiológica en varios tipos celulares, observándose propiedades biofísicas tales como: una conductancia alrededor de 450 pS; una selectividad iónica preferentemente a Cl<sup>-</sup> en su estado de alta conductancia (que ocurre a un voltaje de 0 mV); y una respuesta simétrica en relación a su apertura y cierre, es decir, el canal permanece más tiempo abierto a potenciales cercanos a 0 mV (estado de alta conductancia) y se cierra rápidamente al aplicar potenciales tanto positivos como negativos (estado de baja conductancia). La dependencia de voltaje de la apertura y cierre del canal y la preferencia aniónica a bajos potenciales eléctricos han llevado a denominar a este canal iónico como VDAC (*voltaje-dependent anionic channel*) (Schein y cols., 1976; Colombini, 1979; Dermietzel y cols., 1994).

El VDAC tiene como función fisiológica principal, ser la vía para el movimiento de nucleótidos de adenina a través de la membrana externa de la mitocondria (Blachly-Dyson y cols., 1993; Rostovtseva y Colombini, 1997; Buettner y cols., 2000), controlando así el tráfico de estos compuestos esenciales hacia y desde la mitocondria, así como la entrada de otras sustancias involucradas en diferentes vías metabólicas (Schein y cols., 1976; Colombini, 1979; Roos y cols., 1982; Blachly-Dyson y cols., 1993). Varios estudios bioquímicos han mostrado que el VDAC es el punto de coordinación de un gran complejo proteico, cuyos componentes se asocian a la superficie de la membrana externa de la mitocondria mediante la unión a la porina VDAC, modulando en algunos casos la función de este canal. La porina VDAC es un componente clave del complejo de proteínas que constituyen el poro de transición PTP (*permeability transition pore*), que permite la interacción de la membrana interna y externa de la mitocondria, jugando así un importante rol en la regulación del proceso de apoptosis

---

<sup>3</sup> Reproducido de Thomas y cols., 1991

celular (Shimizu y cols, 2001; Blachly-Dyson y Forte, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001; Mayer y Oberbauer, 2003).

### 1.2.1. Distribución celular del VDAC

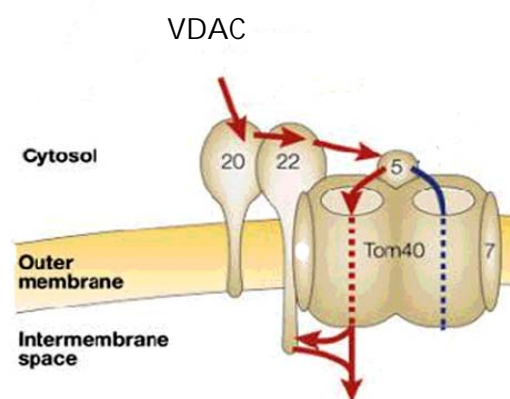
Tradicionalmente, la proteína VDAC ha sido localizada exclusivamente en la membrana externa de la mitocondria (Colombini, 1979; Yu y Forte, 1996; Hodge y Colombini, 1997), donde controla la homeostasis celular mediante el transporte de ATP y ADP (Rostovtseva y Colombini, 1997). Sin embargo, desde el año 1989, también se ha apuntado a su localización extramitocondrial, sugiriendo la presencia de la porina en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares (Thinnes y cols., 1989; Kayser y cols., 1989; Dermietzel y cols., 1994; Jakob y cols., 1995; Bathori y cols., 2000; Buettner y cols., 2000) y en microdominios de membrana tales como las caveolas y los *lipid raft* (Lisanti y cols., 1994; Bathori y cols., 1999; Bathori y cols., 2000; Schwarzer y cols., 2002). A pesar de estos estudios, en el momento de comenzar mi tesis doctoral, no existía un consenso total respecto a la presencia extramitocondrial de esta proteína. Se postula que la presencia del VDAC en la membrana plasmática podía ser un artefacto debido a una inmunoreacción no específica y redistribución de la porina entre las fracciones subcelulares tratadas con los detergentes (Yu y cols., 1995).

### 1.2.2. Importe del VDAC hacia la membrana externa de la mitocondria.

El 98-99% de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en el citosol, distribuidas hacia sus destinos finales a través de la acción

secuencial de varias señales guía, e importadas por la mitocondria. Este último proceso lo lleva a cabo la mitocondria mediante una maquinaria de translocación que consta de dos complejos: por una parte el complejo TOM (receptores de la membrana externa) y por otra parte el complejo TIM (receptores de la membrana interna) (Neupert, 1997; Bauer y cols., 2000; Rehling y cols., 2001; Krimmer y cols., 2001). Entre las proteínas transportadas hacia la mitocondria se encuentra el VDAC, el cual se inserta en la membrana externa de la mitocondria a través del complejo de importe proteico TOM. Se sabe que el importe y el ensamblaje de esta porina es dependiente del receptor de superficie de la membrana externa, denominado TOM20, el cual integra en la bicapa lipídica de la mitocondria el nuevo VDAC citosólico recién sintetizado (Schleiff y cols., 1999). Sin embargo, recientemente algunos investigadores han demostrado que TOM20 por si sólo, no es suficiente para el importe de esta porina, lo que implicaría que la integración del VDAC dentro de la mitocondria dependería de varias proteínas del complejo TOM, incluyendo el poro TOM40, el receptor central TOM22, además de las proteínas del complejo de importe general TOM5 y TOM7 (Krimmer y cols., 2001; Motz y cols., 2002) (ver Fig. 3).

**Fig. 3-** Importe del VDAC hacia la mitocondria, mediante el complejo de translocasas TOM presente en la membrana externa de la mitocondria<sup>4</sup>.



---

<sup>4</sup> Reproducido y modificado de <http://www.ochoa.fib.es>

### 1.2.3 El papel del VDAC en el proceso de apoptosis.

#### 1.2.3.1. Principales vías involucradas en el proceso de apoptosis celular

La supervivencia de los seres vivos depende del funcionamiento correcto y coordinado de diferentes tipos celulares. Para cada estirpe celular el control del número de células es el resultado de un balance dinámico entre la proliferación y la muerte celular. La muerte celular se puede producir de dos formas diferentes: por necrosis y por apoptosis. La necrosis es la muerte celular pasiva que sigue a una agresión celular con daño severo de las membranas. La apoptosis es en cambio, un proceso de muerte celular activo, controlado genéticamente y que constituye un proceso de autodestrucción celular que ocurre como parte del desarrollo normal y como respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos (Diez, 2000).

En el proceso apoptótico se pueden considerar tres fases principales: iniciación; ejecución, y degradación celular. Las dos primeras fases pueden ser reversibles gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores. En un primer estadio, los mediadores genéticos y bioquímicos intracelulares se activan para intentar reparar los daños celulares. Si este mecanismo falla, se inicia la fase de ejecución, en la cual las células sufren alteraciones estructurales que conducen a su muerte. Los cambios morfológicos que ocurren en la célula apoptótica se verifican a nivel de la disminución del volumen celular con una característica alteración de la arquitectura membranal o *blebbing* (debido a los cambios en la función y estructura de la membrana y en el citoesqueleto), alteraciones nucleares (condensación de la cromatina y fraccionamiento del ADN), y principalmente, alteraciones de la morfología y función de las mitocondrias (Diez, 2000).

Existen dos vías principales involucradas en el proceso de apoptosis, la vía extrínseca o de los receptores de muerte celular y la vía intrínseca o vía mitocondrial.

La vía de señalización clásica o vía extrínseca, dispara el inicio de la apoptosis a través de la familia de los denominados receptores de muerte celular (DRs), tales como CD95 (o Fas) y el receptor I del factor de necrosis tumoral (TNF-1). Estos receptores son proteínas transmembrana que se encuentran en la superficie de la célula y que son activados por ligandos tales como el ligando de Fas (Fas-L), TNF  $\alpha$ , IL-1 o INF  $\gamma$  (Madge y cols., 1999; Bernabei y cols., 2001; Gulbins, 2003; Lacour y cols., 2003). Una vez activados, reclutan múltiples moléculas que luego transfieren la información al interior celular mediante un complejo sistema de interacciones proteína-proteína que determinan la activación de diversas cascadas intracelulares, principalmente la de las caspasas, una familia de proteasas específicas entre las que destacan por su importancia las Caspasas-8, -3 y -9 (Hengartner, 2000; Le y cols., 2002; Bossenmeyer-Pourie y cols., 2002; Wang y cols., 2002).

La activación de los DRs también desencadena procesos intracelulares de fosforilación y defosforilación, cambios en el potencial redox, disminución del metabolismo energético, reorganización de la estructura de canales iónicos en las distintas membranas (induciendo así alteraciones de la homeostasis iónica), cambios en el pH intracelular, activación de diferentes factores de transcripción (con la expresión de programas genéticos que intervienen en este proceso) y disfunción mitocondrial (Diez, 2000; Gulbins y cols., 2000).

Por otra parte, además de los clásicos receptores en la membrana plasmática involucrados en la apoptosis, existen otras proteínas que también han sido asociadas con este proceso de muerte celular, incluyendo algunos canales iónicos presentes en la membrana plasmática. Entre estos canales destaca un canal de cloruro cuya identidad molecular se desconoce, pero que comparte características con los canales regulados

por aumento del volumen celular. Este canal de cloruro parece ser un elemento clave en la regulación de las cascadas intracelulares apoptóticas (Gulbins y cols., 2000).

La vía mitocondrial o vía intrínseca es activada en respuesta a señales extracelulares e insultos internos tales como daños en el ADN. Dentro del amplio número de eventos claves en la apoptosis que convergen en las mitocondrias, se incluyen: la liberación de activadores de caspasas (citocromo c), alteración del transporte de electrones, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminución de la producción de ATP, alteración del potencial redox que conduce a un incremento de la producción de superóxidos y regulación de proteínas pro- y antiapoptóticas como, Bcl-2, Bim, Bid, Bax y Bad (ver Anexo: Glosario) (Kourie, 1998; Gulbins y cols., 2000; Hengartner, 2000). A diferencia de la proteína Bcl-2, que se encuentra en la membrana mitocondrial, las formas citosólicas de algunas de las proteínas pro- y antiapoptóticas, representan un conjunto de proteínas inactivas, pero listas para entrar en acción. Las señales pro-apoptóticas redireccionan estas proteínas hacia la mitocondria, donde realizan su función, interviniendo en el destino final de la célula (Hengartner, 2000).

Las vías apoptóticas mitocondrial y de los receptores de muerte, convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. La conexión e integración entre las dos vías apoptóticas es proporcionada por Bid. La división o corte de Bid, mediante la caspasa-8, incrementa enormemente la actividad pro-muerte, y provoca la translocación de esta proteína truncada hacia la mitocondria, donde promueve la salida de citocromo c. Cabe señalar que, en la mayoría de los casos, esta interacción entre las dos vías es mínima, ya que normalmente operan independientes una de la otra (Hengartner, 2000).

#### 1.2.4. Participación del VDAC en la formación del poro de transición y su función en el proceso apoptótico.

En la apoptosis, el potencial de la membrana mitocondrial interna se colapsa, induciendo la apertura de un canal conocido como el poro PT (*Permeability Transition*) (Bernardi y cols, 1994; Zoratti y Szabo, 1995; Hirsch y cols., 1997; Zamzami y Kroemer, 2001; Szewczyk y Wojtczak, 2002). La estructura y composición de este poro no están definidos por completo. Se sabe que está formado por proteínas de la membrana interna como la proteína translocadora del nucleótido de adenina (ANT) (Bernardi y cols., 1994; Halestrap, 1999), y proteínas de la membrana externa, como la porina VDAC, las que presumiblemente operan concertadamente en puntos de contacto, creando un canal a través del cual pasan determinadas moléculas tales como el ATP (ver Fig. 4) (Shoshan-Barmatz y cols., 1996; Bathori y cols., 2000; Szewczyk y Wojtczak, 2002). La apertura de este megacanal no selectivo disipa el gradiente de iones hidrógeno ( $H^+$ ) a través de la membrana interna desacoplando la cadena respiratoria (Shimizu y cols., 1999; Shimizu y cols., 2001). Se considera que el evento más importante resultante de la apertura del poro es una desregulación del volumen de las mitocondrias debida a la hiperosmolaridad de la matriz, lo que causa la expansión del espacio interno. Debido a que la membrana interna con sus pliegues posee mayor área que la membrana externa, esta expansión del volumen de la matriz puede ocasionar la ruptura de la membrana externa, liberando al citosol las proteínas activadoras de las caspasas (citocromo c) localizadas en el espacio intermembrana (Martinou, 1999; Shimizu y cols., 2001; Szewczyk y Wojtczak, 2002). El citocromo C en asociación con Apaf-1 y la procaspasa-9 (y posiblemente con otras proteínas) forman el apoptosoma capaz de activar al efector de las caspasas tales como la caspasa-3 (Hengartner, 2000; Yu y cols., 2001).



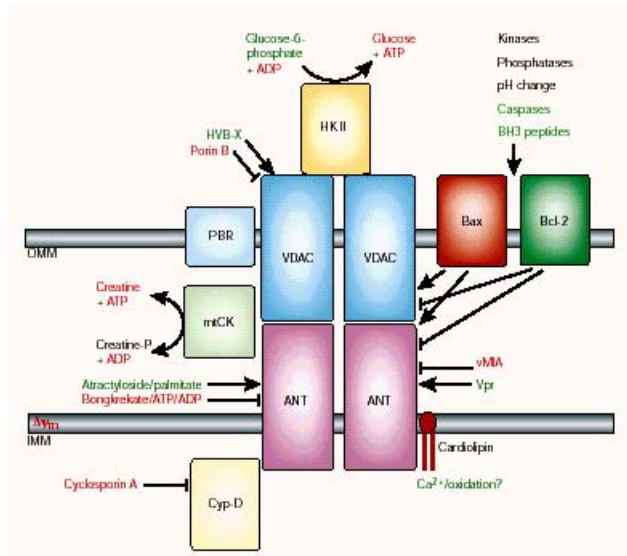


Fig. 4 - Arquitectura molecular hipotética del complejo PTP<sup>5</sup>. Este megacanal mitocondrial está formado por el contacto entre la membrana externa (OMM) y la membrana interna de la mitocondria (IMM), e incluye varias proteínas transmembrana, siendo las principales, la proteína ANT y el VDAC.

<sup>5</sup> Reproducido de Zamzami y Kroemer, 2001

### 1.3. VIA ALTERNATIVA (NO GENOMICA) DEL MECANISMO DE ACCION DE LOS ESTEROIDES

Los estrógenos son hormonas con un papel fundamental en el establecimiento del fenotipo femenino, aunque cada vez son más las evidencias de su papel en el control de diferentes funciones en el varón. Las respuestas a los estrógenos son mediadas por receptores intracelulares solubles (receptores de estrógeno, ER) que funcionan como factores de transcripción cuando se unen a determinados ligandos (Beato, 1989; Parker, 1993). Además de estimular o reprimir la transcripción de genes específicos, los estrógenos también pueden regular eventos post-transcripcionales y otros eventos no genómicos (Parker, 1993; Nadal y cols., 2001; Kelly y Levin, 2001; Losel y Wehling, 2003).

#### 1.3.1. Receptores de estrógenos clásicos

Los receptores de estrógenos clásicos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) son miembros de una gran superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas cuya actividad depende de la unión a un ligando hormonal (Parker, 1993). Estos ER poseen una estructura modular con dominios funcionales comunes. Mientras los dominios funcionales (denominados dominios de unión a ADN y dominios de unión a ligando) de los ER $\alpha$  y ER $\beta$  presentan un alto grado de homología (97% y 60% respectivamente), existe una considerable divergencia en el extremo N-terminal de estos ER (18% de homología) (Hall y cols., 2001; Olefsky, 2001). Así, estos ER interactúan con idénticos elementos de respuesta al ADN y presentan una afinidad similar por los estrógenos

naturales y sintéticos. El patrón de expresión es distinto para cada receptor, ya que mientras el ER $\alpha$  se expresa predominantemente en mama, útero, vagina, y otros órganos dianas, ER $\beta$  presenta un patrón de expresión más delimitado y es detectado principalmente en ovarios, próstata, testículos, bazo, pulmón, hipotálamo y timo (Couse y cols., 1997; Hall y cols., 2001).

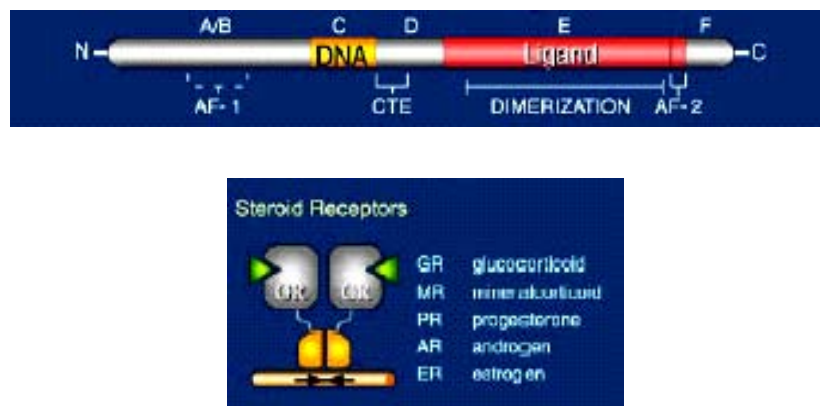


Fig. 5- Organización de la estructura/función de un receptor nuclear, especificando la familia de receptores esteroideos<sup>6</sup>.

### 1.3.2. Vía alternativa del mecanismo de acción de los estrógenos

También, recientemente se han descrito en tejidos y varias líneas celulares otros sitios de unión a estrógenos distintos a los ER clásicos (Falkenstein y cols., 2000a; Kelly y Levin, 2001).

Además de la regulación directa de la transcripción, algunas funciones celulares pueden estar controladas por el mecanismo de acción alternativo (acción no genómica) de los estrógenos, a través del cual, una respuesta celular rápida se

<sup>6</sup> Reproducido y modificado de Olefsky, 2001

activa tras la interacción de los compuestos estrogénicos con un sitio de unión específico a veces seguido de la generación de señales intracelulares (McEwen, 1991; Hardy y Valverde, 1994; Revelli y cols., 1998; Kelly y Wagner, 1999; Valverde y cols., 1999; Falkenstein y cols., 2000a; Nadal y cols., 2000; Kelly y Levin, 2001; Nadal y cols., 2001; Roper y cols., 2002; Díaz, 2002; Losel y Wehling, 2003).

En general, los efectos alternativos de los estrógenos presentan las siguientes características: (1) el efecto es tan rápido que no puede involucrar cambios en el ARNm y síntesis de proteínas, pudiendo observarse incluso en células altamente especializadas que no efectúan síntesis de ARNm y proteínas (ej. espermatozoides donde la síntesis de proteínas es limitada y solamente ocurre en la mitocondria) o en clones celulares que pierden los receptores esteroidales nucleares; (2) son insensibles a inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas; (3) en algunos casos son reproducidos utilizando esteroides acoplados a moléculas que no pueden atravesar la membrana plasmática (por ejemplo BSA); (4) pueden ser insensibles a antagonistas de los receptores de esteroides genómicos clásicos; (5) la especificidad es variable, ya que esteroides con una estructura química muy similar, pero no idéntica, pueden mostrar distintos grados de potencia sobre la célula diana (Revelli y cols., 1998; Falkenstein y cols., 2000a).

La gran diversidad de mecanismos descritos, instó a un grupo de investigadores a proponer en el año 1998 la Clasificación de Mannheinen<sup>7</sup> en la cual se intentó organizar los efectos esteroidales rápidos en distintas categorías, dependiendo del mecanismo que éstos involucren (Wehling, 1997; Falkenstein y cols., 2000a; Falkenstein y cols., 2000b). Sólo se tiene evidencia experimental de algunas de estas categorías, por

---

<sup>7</sup> Propuesta en el *First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones*, Mannheim, Alemania. <http://steroid-rapid-responses.ucr.edu>

lo que el resto de las categorías son hipotéticas (Falkenstein y cols., 2000a; Falkenstein y cols., 2000b; Nadal y cols., 2001).

**Tabla 1-** Clasificación Manneheim de la acción no genómica de los esteroides<sup>8</sup>.

<p><b>A. Directo</b> (donde los esteroides son los únicos agonistas que actúan para generar una respuesta rápida)</p> <p><b>I. Inespecífico</b> (no involucra receptor; podría incluir posibles efectos de los esteroides sobre la fluidez de la membrana)</p> <p><b>II. Específico</b> (involucra un receptor de esteroides con especificidad de ligando)</p> <p><b>a. Receptor nuclear de esteroides clásico</b> (pertenecientes a la superfamilia de los receptores de hormonas esteroideas)</p> <p><b>b. Receptor de esteroides no clásico</b></p>	<p><b>B. Indirecto</b> (donde los esteroides necesitan otro agonista para poder generar una respuesta rápida)</p>
--	---

Dentro de las diferentes categorías para las que ya se poseen evidencias experimentales, se encuentran las siguientes:

**Categoría AI:** La interacción directa entre el esteroide y la membrana que no involucra un receptor, altera las propiedades fisicoquímicas de la membrana como la fluidez y el microdominio de los receptores de membrana. La inserción del esteroide en la bicapa lipídica puede ocurrir a altas concentraciones del mismo (no fisiológicas). Ejemplos de este efecto inespecífico a concentraciones micromolares de estradiol y progesterona se han descrito en varios tipos celulares (Reddy y cols., 1989; Shivaji y Jagannadham, 1992; Swain y cols., 1993; Falkenstein y cols., 2000b).

**Categoría Alla:** Estudios recientes han sugerido que los receptores de esteroides clásicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  podrían estar involucrados no solamente en la acción genómica de los estrógenos, sino también en las respuestas que involucran la generación de señales

---

<sup>8</sup> Reproducido y modificado de Falkenstein y cols., 2000b.

rápidas (Migliaccio y cols, 1996; Latin-Hermoso y cols., 1997; Pappas y cols., 1995; Monje y Boland, 1999; Falkenstein y cols., 2000b; Clarke y cols., 2000).

**Categoría AIIb:** La mayoría de los efectos rápidos de los esteroides sobre la señalización y función celular se transmiten por receptores de membrana no relacionados con los receptores esteroidales intracelulares clásicos. Las características farmacológicas de estos receptores son claramente distintas de los receptores nucleares clásicos. Ejemplos de esta acción rápida son los efectos de la aldosterona en varios mecanismos de transporte iónico y sistemas de segundos mensajeros (Wehling y cols., 1993; Wehling, 1997; Gekle y cols., 1997; Falkenstein y cols., 2000b), el efecto de la  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  en una variedad de sistemas que incluyen una estimulación rápida del transporte de calcio en células epiteliales intestinales, activación rápida de PKC (Wali y cols., 1990; Sylvia y cols., 1996; Sylvia y cols., 1998; Norman y cols., 2002) y MAPK (De Boland y Norman, 1998; Song y cols., 1998; Norman y cols., 2002), la acción de xenoestrógenos y estrógenos sobre la liberación de insulina en células  $\beta$  pancreáticas (Nadal y cols., 2000) y la modulación por estrógeno y antiestrógenos del canal Maxi- $\text{K}^+$  (Valverde y cols., 1999).

**Categoría BIIb:** Se ha descrito la modulación indirecta de la función celular en el sistema nervioso central debido a la acción de los esteroides como coagonistas, por medio de esteroides neuroactivos que pueden alterar rápidamente la excitabilidad de las neuronas mediante la modulación de los efectos GABAérgicos (Paul y Purdy, 1992; Falkenstein y cols., 2000b). Estos esteroides neuroactivos incluyen los esteroides endógenos (neuroesteroides) y esteroides sintéticos (Paul y Purdy, 1992; Baulieu, 1997; Kelly y Levin, 2001).

Las señales intracelulares activadas en la vía alternativa dependen del tipo de esteroide de la célula, tejido o especie utilizada. Estas señales son muy diversas, incluyendo entre otras, cambios en el calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ), en la producción de

AMPC, en el pH, o incremento de la actividad quinasa inducida por esteroides (PKC, PKA, PKG y MAPK) (Nordeen y cols., 1994; Christ y cols., 1999; Roper y cols., 1999; Falkenstein y cols., 2000a; Falkenstein y cols., 2000b).

En algunos casos, la generación de estas señales intracelulares podría ser el resultado de la interacción entre los compuestos esteroidales, vía receptores nucleares clásicos u otros receptores de estrógenos, y ciertas proteínas en microdominios de membrana denominados caveolas. Un ejemplo de esta vía de señalización es la activación estimulada por estrógenos, vía ER clásicos, de las proteínas G u otras proteínas asociadas a estos microambientes (Mendelsohn, 2000; Levin, 2001; Kelly y Levin, 2001).

Hasta el momento muchos aspectos de la acción alternativa de los estrógenos requieren de una mayor investigación, principalmente aquellos relacionados con la clonación y caracterización de los nuevos receptores de membrana implicados en la señalización rápida de los esteroides. Uno de los puntos más importantes a considerar estaría relacionado con la relevancia fisiológica, fisiopatológica y clínica de esta nueva acción rápida de los esteroides y el aporte que estos estudios podrían tener en la aplicación de nuevos compuestos para el tratamiento de ciertas enfermedades.

Un claro ejemplo de aplicación terapéutica es el efecto antiapoptótico de los esteroides sexuales sobre los osteoblastos y los osteocitos, a través de un mecanismo alternativo de la acción de los estrógenos y andrógenos, convirtiendo a estos esteroides en posibles agentes farmacoterapéuticos para el tratamiento de la osteoporosis (Kousteni y cols., 2001).

#### 1.4. MICRODOMINIOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES:

##### *LIPID RAFTS Y CAVEOLAS*

Como ya se había mencionado en la sección anterior, la señalización por estrógenos en algunos tipos celulares, se ha localizado en las caveolas, siendo esta señalización dependiente o independiente de los receptores nucleares clásicos, también asociados a estos microdominios (Mendelsohn, 2000; Levin, 2001).

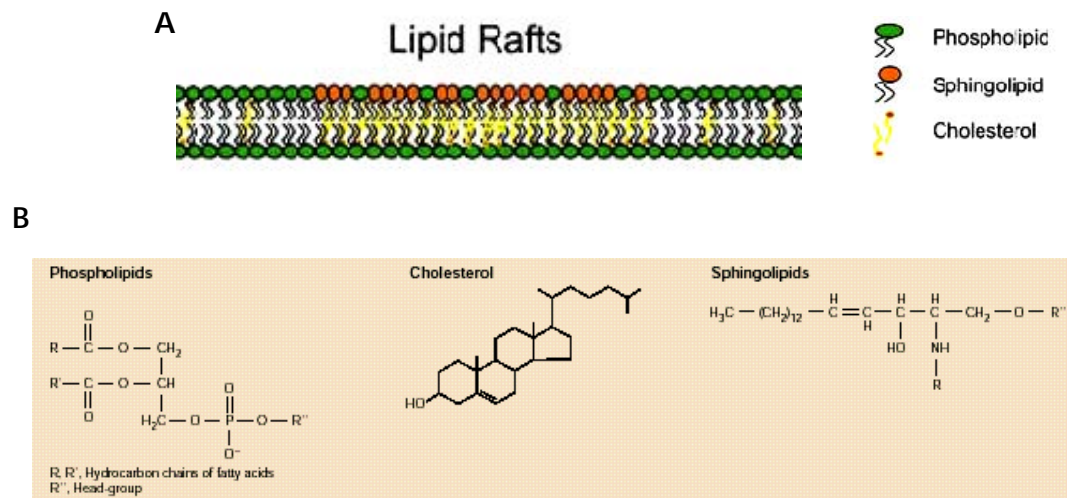
Además, dentro de estos dominios especializados (*lipid rafts* y caveolas) de la membrana plasmática se ha descrito la presencia del VDAC (Lisanti y cols., 1994; Bathori y cols., 1999; Bathori y col., 2000), hecho que determinó mi interés en la caracterización de estos microdominios en las células C1300 y NIH3T3.

##### 1.4.1. Microdominios de la membrana plasmática: *Lipid rafts* y Caveolas

La visión tradicional de que la bicapa lipídica de la membrana plasmática actúa como un mosaico fluido de dos dimensiones se mantuvo por varios años. Este modelo implicaba que todas las proteínas de la membrana plasmática se dispersaban uniformemente en un solvente lipídico. Lo cierto es que la membrana actúa de esta manera cuando está formada solamente por fosfolípidos (Rasani y Lisanti, 2002). Algunos investigadores, basados en numerosos análisis biofísicos y bioquímicos de la membrana plasmática, han demostrado en los últimos años que existen otros estados más ordenados en la bicapa lipídica (Galbiati y cols., 2001). La membrana celular se comporta diferente cuando está compuesta de colesterol, esfingolípidos, lípidos modificados y proteínas transmembrana, ya que dependiendo de la concentración



local de colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos (ver Fig. 6B), se pueden formar parches más rígidos en las membranas celulares. Estos parches o microdominios de la membrana plasmática se denominan *Lipid Rafts* (ver Fig. 6A) (Galbiati y cols., 2001; Rasani y Lisanti, 2002).

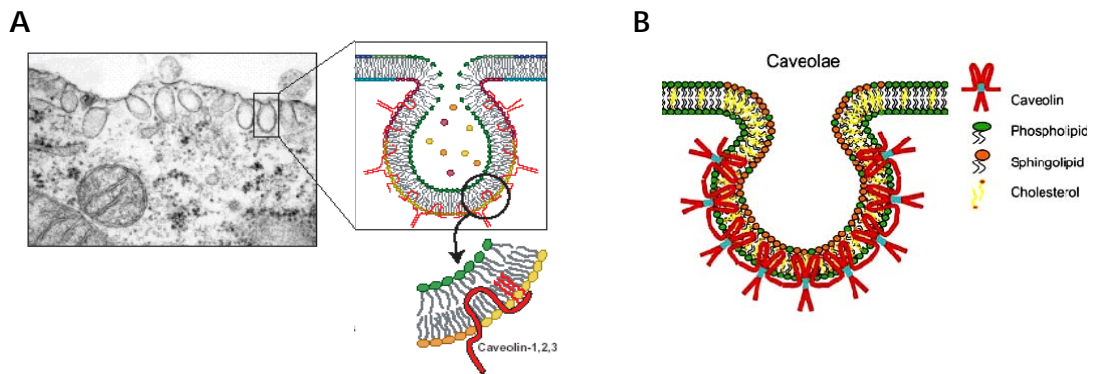


**Fig. 6-** (A) Diagrama que muestra la composición de los *lipid rafts*<sup>9</sup>. (B) Glosario de las estructuras de los lípidos que conforman un *raft*<sup>10</sup>.(ver Anexo: Glosario).

Existen diferentes clases de *lipid rafts* en las células de mamífero, por una parte el *lipid raft* clásico carente de un componente proteico estructural y por otra parte, microdominios que pueden estar enriquecidos con un grupo de proteínas únicas, cambiando la morfología y/o la función del *lipid rafts*. Este componente proteico fue identificado como una familia de proteínas denominadas caveolinas, las cuales se integran dentro del microambiente del *lipid raft*. Este microdominio se invagina y forma una estructura comúnmente denominada *Caveola* (ver Fig. 7) (Galbiati y cols., 2001).

<sup>9</sup> Reproducido de Razani y Lisanti, 2002.

<sup>10</sup> Reproducido de Simons y Toomre, 2000.



**Fig. 7-** (A) Micrografía electrónica de una caveola en la membrana plasmática de un fibroblasto humano<sup>11</sup>. (B) Diagrama que muestra la composición de una caveola<sup>12</sup>.

Las caveolas se encuentran en varios tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y musculares, entre otras. Dentro de la familia de las caveolinas, se distinguen tres proteínas diferentes: caveolina-1, -2 y -3 (Okamoto y cols., 1998; Galbiati y cols., 2001; Parton, 2001; Razani y Lisanti, 2002). Las caveolinas -1 y -2 se coexpresan y forman un complejo heterooligomérico en varios tipos celulares. La expresión de estos dos tipos de proteínas ha sido descrita, entre otras, en células endoteliales, adipocitos, neumocitos del tipo I, neuronas y fibroblastos (Scherer y cols., 1997; Okamoto y cols., 1998; Galbiati y cols., 1998; Smart y cols., 1999; Galbiati y cols., 2001), mientras que la caveolina-3 se expresa exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco, además de células del músculo liso (Tang y cols., 1996; Rasani y Lisanti, 2002).

La distribución de los *lipid rafts* sobre la superficie celular depende del tipo celular. En células epiteliales polarizadas y neuronas, los *lipid rafts* se acumulan en la membrana plasmática apical y axonal, respectivamente. Las membranas basolaterales y somatodendríticas también contienen *rafts*, pero en pequeñas

<sup>11</sup> Reproducido de Parton, 2001

<sup>12</sup> Reproducido de Razani y Lisanti, 2002

cantidades. En linfocitos y fibroblastos, los *rafts* se distribuyen sobre la superficie celular sin una polaridad determinada. Los *rafts* son más abundantes en la membrana plasmática, pero también se pueden encontrar en las vías biosintéticas y endocítica. Mientras el colesterol es sintetizado en el retículo endoplásmico, la síntesis de los esfingolípidos y la modificación de los *head-group* se completan en el Golgi, prediciendo que los *rafts* colesterol-esfingolípidos primero se ensamblan en el Golgi (Simons y Toomre, 2000).

El rol más importante de los *rafts* en la superficie celular podría ser su función en la transducción de señales. En general, los *rafts* reclutan proteínas en un nuevo microambiente, donde los estados de fosforilación pueden ser modificados por proteínas quinasas y fosfatasas locales, dando lugar a procesos de señalización intracelular.

La función general de las caveolas no es clara, aunque se las ha implicado en endocitosis, homeostasis de lípidos, tumorigénesis, transporte/regulación de calcio, transporte/regulación de colesterol, transcitosis de albúmina y otras proteínas a través del endotelio. (Simons y Toomre, 2000; Parton, 2001; Razani y Lisanti, 2002). Las caveolas también tienen una función en la transducción de señales, aunque en algunos tipos celulares no son absolutamente requeridas, como por ejemplo en linfocitos y neuronas, que pierden las caveolinas y sin embargo, la señal puede ser mediada a través de los *rafts* (Masserini y cols., 1999; Simons y Toomre, 2000; Rasani y Lisanti, 2002). Además, existen un gran número de estudios que apoyan la hipótesis de que las caveolinas interaccionan con las proteínas que residen en las caveolas. Estas interacciones proteína-proteína, incluyen la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G, Ha-Ras, la familia Src de las tirosinas quinasas, la sintasa del óxido nítrico (NOS), receptores de estrógenos, EGF-R y receptores con actividad tirosinas-quinasa, e isoformas de la proteína quinasa C (Lisanti y cols., 1994; Okamoto y cols., 1998; Smart y cols., 1999; Mendelsohn, 2000; Rasani y Lisanti, 2002).

### 1.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIESTRÓGENOS

La acción biológica multifacética de los estrógenos se ha corroborado en los últimos años a través del uso de compuestos sintéticos con actividad antiestrogénica y otros que presentan tanto actividad agonista como antagonista, convirtiéndolos en importantes herramientas farmacológicas para el estudio de la acción de los estrógenos (Parker, 1993; Hall y cols., 2001).

El principal interés para el desarrollo de nuevos ligandos sintéticos (agonistas y antagonistas) de los ER, es la búsqueda de compuestos que conserven las características beneficiosas de los estrógenos sobre los tejidos diana (huesos, cerebro y tejidos cardiovasculares), sin presentar efectos adversos, generalmente relacionados con la acción proliferativa de los E<sub>2</sub> en tejidos como el mamario y el uterino (Hall y cols., 2001).

La función clásica de los agonistas de los estrógenos es convertir los receptores de estrógenos en formas activas, de igual forma que los estrógenos, mientras los antagonistas (antiestrógenos) compiten con el agonista por la unión al receptor de estrógenos y dejan a este receptor en un estado inactivo. Además, la actividad de estos ligandos sintéticos (estrógenos y antiestrógenos) depende del tejido diana en donde actúen, induciendo alteraciones en la estructura de los receptores y por ende cambios en la función del receptor (Hall y cols., 2001). Por otra parte, estudios en relación a la farmacología molecular de los antiestrógenos han determinado que existen algunas excepciones al modelo clásico de acción de estos compuestos, ya que además de su función antagonista, en algunos casos también presentan una función agonista (Hall y cols., 2001).

Actualmente, sobre la base de datos estructurales y actividades biológicas, se conocen al menos tres clases diferentes de antiestrógenos (Jordan y Morrow, 1999; Hall y cols., 2001). Los antiestrógenos Tipo I, como los compuestos ICI 182,780 e ICI 164384, funcionan como antagonistas de los ER puros, es decir, presentan una actividad opuesta a los estrógenos en todos los contextos. Los tipos de antiestrógenos II y III, como el raloxifeno (derivado del benzotiofeno) y tamoxifeno respectivamente (ver Fig. 8), son denominados SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) (McDonnell, 1999), y se diferencian de los antiestrógenos puros, en que mimetizan el efecto biológico de los estrógenos en determinados tejidos, pero presentan una acción opuesta en otros.

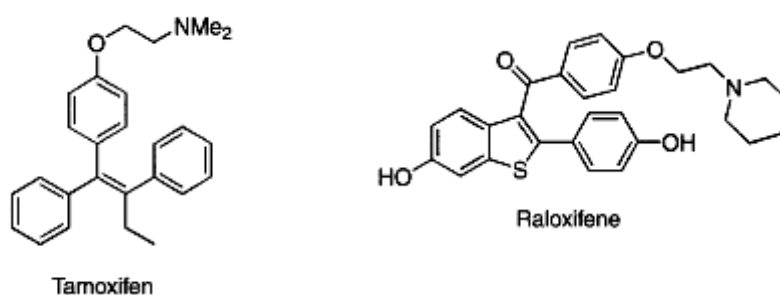


Fig. 8- Estructura de los antiestrógenos tamoxifeno y raloxifeno, utilizados ampliamente en el tratamiento de cáncer de mama y osteoporosis respectivamente<sup>13</sup>.

El principal antiestrógeno usado con fines terapéuticos en la actualidad es el tamoxifeno, fármaco de elección para el tratamiento del cáncer de mama (Parker, 1993; Hall y cols., 2001). Desafortunadamente este fármaco también presenta actividad estrogénica (proliferativa) en el útero y algunos cánceres mamarios. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que un compuesto derivado del tamoxifeno, el GW5638, no presenta esta acción dual, lo que indica que estos SERMs

<sup>13</sup> Reproducido de McDonnell, 1999.

son los compuestos con mayor potencial de aplicación en clínica, ya que podrían mantener los efectos beneficiosos de los estrógenos en algunos tejidos, mientras funcionan como antagonistas en otros tejidos como mama y útero (Connor y cols., 2001; Hall y cols., 2001). En este sentido, por ejemplo el raloxifeno, ha sido aprobado recientemente para el tratamiento de la osteoporosis (McDonnell, 1999; Hall y cols., 2001).

De mayor interés en el contexto de mi trabajo experimental ha sido la observación de que el tamoxifeno también puede activar vías alternativas desde una diana situada en la membrana plasmática (Aronica y cols., 1994; Campbell y cols., 2001), actuando como un agente antiproliferativo y pro-apoptótico en ciertos tipos celulares tanto ER-positivos como ER-negativos (Lee y cols., 1998; Kim y cols., 1999; Ferlini y cols., 1999; Diel y cols., 1999; Campbell y cols., 2001; Strohmeier y cols., 2002; Salami y Karami-Tehrani, 2003; Lehenkari y cols., 2003). Este hecho, ha generado recientemente un gran interés en el estudio de los mecanismos de señalización implicados en la activación de respuestas alternativas por antiestrógenos.

### 1.5.1. Elementos asociados a los efectos no genómicos de los antiestrógenos

#### 1.5.1.1. *Proteínas fosfatasas*

La modulación por estrógenos y/o antiestrógenos de muchos canales iónicos puede responder a cambios en el balance de los procesos de fosforilación y desfosforilación de la célula, implicando tanto cambios en la actividad de proteínas quinasas como de las fosfatasas (Kennely, 1998). La acción de los estrógenos puede estar mediada por la generación de señales intracelulares, incluyendo un aumento en la actividad quinasa dependiente de la producción de AMPc intracelular (Aronica y cols., 1994; Doolan y cols., 2000). También, se ha descrito que los antiestrógenos pueden inducir la actividad de ciertas proteínas fosfatasas (Freiss y Vignon, 1994).

La clasificación más reciente de las fosfoproteínas fosfatasas (PPPs) se basa en la homología de sus secuencias de aminoácidos y la similitud de sus estructuras tridimensionales. Estas proteínas fosfatasas presentes en las células eucariotas están divididas en tres grandes familias de proteínas, denominadas como PPP (fosfoproteína fosfatasa), PPM (proteínas serina/treonina fosfatasas dependientes de manganeso ( $Mn^{+2}$ ) o magnesio ( $Mg^{+2}$ )) y PTP (proteína tirosina fosfatasa) (Barford, 1996; Tonks y Neel, 1996; Obuchowski y cols., 2000; Lubert y cols., 2001). Las familia PPP y PPM están compuestas de enzimas específicas fosfoserina (desfosforilan sustratos en serinas) y fosfotreonina (desfosforilan sustratos en treonina), mientras que la familia PTP está compuesta de enzimas específicas fosfotirosina (defosforilan sustratos en tirosina) y/o fosfatasas específicas duales, es decir, fosfatasas que pueden defosforilar los tres tipos de residuos fosforilados (Cohen, 1991; Keyse, 1995; Lubert y col., 2001)

### *1.5.1.2. Clasificación de las familias de fosfatasas PPP y PPM.*

La primera clasificación de las proteínas PPP y PPM fue hecha considerando a estas dos familias de proteínas como una única clase de fosfatasas denominadas Serina/Treonina (Ser/Thr)-proteínas fosfatasas. En las células eucariotas, esta clasificación se realizó teniendo como criterio algunas de sus características funcionales, dividiéndose entonces en dos superfamilias. La primera superfamilia incluía la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1), la proteína fosfatasa tipo 2A (PP2A) y la proteína fosfatasa tipo 2B (PP2B) (Ingebritsen y Cohen, 1983; Cohen, 1991; Barton y cols., 1994; Kennely, 1998), también denominada calcineurina (Enan y Matsumura, 1992; Liu y col., 1991; Schönthal, 1998) y la segunda superfamilia incluía la familia de proteínas fosfatasas 2C (PP2C) (ver Tabla 2) (Ingebritsen y Cohen, 1983; Cohen, 1991; Duncan y cols., 1995; Bork y cols., 1996; Kennely, 1998). Esta clasificación se estableció por la preferencia de estas proteínas por defosforilar las subunidades  $\alpha$  vs  $\beta$  de fosforilasas quinasas; por su sensibilidad a las proteínas inhibidoras I-1 e I-2; por la (in)dependencia de su actividad catalítica a la presencia de iones metálicos divalentes tales como  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  o calcio ( $Ca^{+2}$ ); y por su sensibilidad a potentes toxinas tales como microcistina, ácido okadaico (AO) y tautomicina, entre otros compuestos inhibidores (Ingebritsen y Cohen, 1983; Schuchard y Killilea, 1989; Cohen, 1991; Kennely, 1998).



**Tabla 2-** Propiedades para distinguir entre las diferentes proteínas fosfatasa de la familia Ser/Thr-  
proteínas fosfatasa. Clasificación de Cohen, 1989, modificada en 1991.

	PP1	PP2A	PP2B	PP2C
<b>Preferencia por las subunidades <math>\alpha</math> vs <math>\beta</math> de quinasas/fosforilasas.</b>	$\beta$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
<b>Inhibición por I-1 e I-2.</b>	si <sup>a</sup>	no <sup>b</sup>	no	no
<b>Requerimiento absoluto de cationes divalentes.</b>	no <sup>c</sup>	no <sup>c</sup>	si (Ca <sup>+2</sup> )	si (Mg <sup>+2</sup> )
<b>Estimulación por calmodulina.</b>	no	no	si	no
<b>Inhibición por trifluoperazina.</b>	no	no	si	no
<b>Inhibición por AO.</b>	si (IC <sub>50</sub> =10-20nM)	si (IC <sub>50</sub> =0.1-0.2 nM)	si (débil) (IC <sub>50</sub> =5 $\mu$ M)	no
<b>Actividad fosforilasa/fosfatasa.</b>	alta	alta	muy baja	Muy baja
<b>Afinidad por la caseína fosforilada por una proteína quinasa dependiente de AMPc.</b>	muy baja	alta	muy baja	alta

<sup>a</sup> PP1<sub>c</sub> (subunidad catalítica) es inhibida instantáneamente por I-1 o I-2, pero la inhibición de las formas nativas de alta masa molecular de PP1 son dependientes del tiempo, mientras otras formas (en músculo liso) pueden ser resistentes a I-2.

<sup>b</sup> Se ha descrito que PP2A<sub>c</sub> es inhibida por I-2 a concentraciones extremadamente altas (micromolar), aunque otros investigadores no confirman estos resultados.

<sup>c</sup> PP1 y PP2A pueden llegar a ser dependientes de Mn<sup>+2</sup>.

En la clasificación actual, la familia de fosfatasa PPP comprende las fosfatasa PP2A, PP1, PP2B (o calcineurina), PP4, PP5, PP6 y PP7 (Cohen, 1997; Lubert y cols, 2001),

mientras que la familia PPM comprende las proteínas fosfatasas dependientes de  $Mg^{+2}$  que incluyen PP2C y la fosfatasa piruvato deshidrogenasa (Cohen, 1997).

### ***1.5.1.3. Características estructurales y funcionales de la PP2A.***

Dentro de la familia Ser/Thr-proteínas fosfatasas, la PP2A además de ser una proteína muy abundante (0.05-0.1% de las proteínas de la célula), es considerada como una de las enzimas más importante en la regulación de las funciones básicas celulares, siendo indispensable para la supervivencia de los organismos eucarióticos (Cohen, 1989; Zolneirowicz, 2000). Además de regular algunas enzimas metabólicas, la fosfatasa PP2A modula varias proteínas involucradas en la transducción de señales, incluyendo receptores de la superficie celular, proteínas quinasas citosólicas y factores de transcripción (Mayer-Jaekel y Hemmings, 1994; Millward y cols., 1999; Van Hoof y Goris, 2003), siendo por otro lado fundamental en procesos como diferenciación, desarrollo embrionario y control del crecimiento (Zhou y cols., 2003).

Esta proteína consiste en un complejo oligomérico entre una subunidad catalítica común, frecuentemente asociada con diferentes subunidades reguladoras para estructurar distintas holoenzimas. Así, la PP2A aparece en las células de mamífero bien como dímeros o trímeros (Cohen, 1989; Goldberg, 1999; Zolneirowicz, 2000). La actividad enzimática de la PP2A está conferida por su subunidad catalítica (C), que está ampliamente conservada en la evolución de las especies. No se conoce la forma libre de la subunidad C en la célula, pero si se conoce que esta subunidad forma complejos con un gran variedad de otras proteínas (Dagda y cols., 2003). Esta subunidad catalítica es una metaloenzima que contiene zinc ( $Zn^{+2}$ ) y hierro ( $Fe^{+2}$ ) (Nishito y cols, 1999; Zolneirowicz, 2000).

El dímero central de la PP2A (PP2A<sub>D</sub>) está compuesto de la subunidad catalítica C (PP2A<sub>C</sub>) (isoformas C $\alpha$  y C $\beta$ ) y la subunidad estructural A (o PR65) (isoformas A $\alpha$  y A $\beta$ ) (Cohen, 1989; Murata y cols., 1997; Nanahoshi y cols., 1998; Goldberg, 1999; Zolneirowicz, 2000; Janseens y Goris, 2001), el cual puede unirse además a una tercera proteína o subunidad reguladora B (Lubert y cols., 2001; Dagda y cols., 2003) para formar una holoenzima trimérica (ver Fig. 9). Existen diferentes subunidades reguladoras B, encontrándose en cada familia de subunidad B, varias isoformas o *splice variants* que presentan a su vez una distribución tejido-específicas. Estas subunidades se clasifican en cuatro familias (ver Fig. 9) designadas como: (a) familia B (o PR55) codificada por cuatro genes relacionados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), teniendo como función la de regular la señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Silverstein y cols., 2002; Dagda y cols., 2003); (b) familia B' (PR61, B56) codificada por cinco genes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) e involucrada en diferentes funciones, entre las que se incluyen regulación de la señalización wnt/ $\beta$ -catenina (Seeling y cols., 1999; Yamamoto y cols., 2001; Dagda y cols., 2003) y protección de la célula frente a la apoptosis (Silverstein y cols., 2002; Li y cols., 2002; Dagda y cols., 2003); (c) la familia B'' (PR48, PR59, PR72/130) que son proteínas nucleares que unen Ca<sup>+2</sup> y que han sido implicadas en la regulación de la transición del ciclo celular G<sub>1</sub>/S (Yan y cols., 2000; Dagada y cols., 2003; Janssens y cols., 2003); (d) y por último la familia B''' que incluye las proteínas estriatina y SG2NA (Strack y cols., 1999; Yan y cols., 2000; Zolneirowicz, 2000; Janseens y Goris, 2001; Zhou y cols., 2003; Dagda y cols., 2003). La gran versatilidad de esta fosfatasa 2A, radica en la existencia de un gran número de subunidades y de todas sus combinaciones posibles que darán origen a diversas holoenzimas PP2A con distintas funciones y especificidad diferencial según el sustrato.

Las funciones propuestas para estas subunidades reguladoras de PP2A, incluyen la regulación de la actividad catalítica, la especificidad de sustratos y la

localización subcelular de las diferentes holoenzimas PP2A (Hubbard y Cohen, 1993; Millward y cols., 1999; Zolneirowicz, 2000; Dagda y cols., 2003).

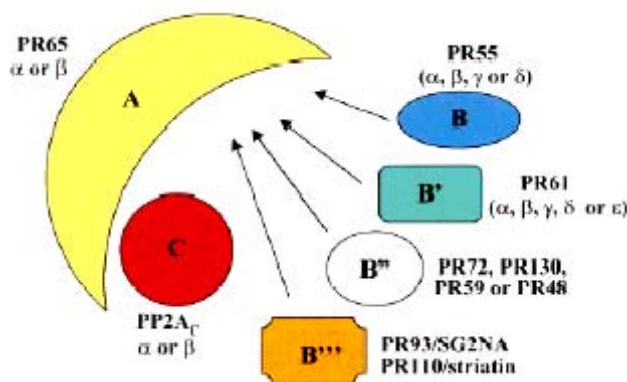


Fig. 9- Estructura de PP2A <sup>14</sup>. C es la subunidad catalítica, A es la segunda subunidad reguladora o estructural y B/ B'/ B''/ B''' son la tercera subunidad variable que no están estructuralmente relacionadas entre si.

#### 1.5.1.4. Proteína fosfatasa 2A y su implicación en la apoptosis.

La proteína fosfatasa 2A cumple un rol fundamental en la señalización apoptótica, activando proteínas pro-apoptóticas, inhibiendo proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (función reguladora positiva al fosforilar Bcl-2 y regular así su actividad anti-apoptótica) (Deng y cols., 1998; Van Hoof y Goris, 2003) o sirviendo como sustrato de los efectores de caspasas (Li y cols., 2002; Van Hoof y Goris, 2003). Sin embargo, en otros casos algunas holoenzimas PP2A en *Drosophila* son inhibidores del proceso de apoptosis (Okamoto y cols., 1996; Okamoto y cols., 2002; Van Hoof y Goris, 2003), lo que indica un mecanismo regulador diferente y sustratos diferentes en distintas especies. Así PP2A, está involucrada tanto en la regulación, como en la respuesta celular del proceso apoptótico (Van Hoof y Goris, 2003).

<sup>14</sup> Reproducido de Janssens y Goris, 2001

## METODOLOGIA Y RESULTADOS 2

### **Artículo 1**

*Okadaic acid-sensitive activation of Maxi Cl(-) channels by triphenylethylene antioestrogens in C1300 mouse neuroblastoma cells.* Diaz M; Bahamonde MI; Lock H; Muñoz FJ; Hardy SP; Posas F; Valverde MA, **Journal of physiology** 2001 Oct 1; 536 (Pt 1), pp. 79-88.

### **Artículo 2**

*Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated maxi Cl- currents in C1300 neuroblastoma cells.* Bahamonde MI; Fernández-Fernández JM; Guix FX; Vázquez E; Valverde MA, **Journal of biological chemistry**, 2003 Aug 29; 278 (35), pp. 33284-9.

### **Artículo 3**

**Pflugers Archiv : European journal of physiology**, *Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria.* Bahamonde MI; Valverde MA, 2003 Jun; 446 (3), pp. 309-13.  
© Springer-Verlag 2003

## Okadaic acid-sensitive activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by triphenylethylene antioestrogens in C1300 mouse neuroblastoma cells

Mario Diaz\*, Maria I. Bahamonde†, Hagar Lock†, Francisco J. Muñoz†, Simon P. Hardy‡, Francesc Posas† and Miguel A. Valverde†

\**Departamento de Biología Animal, Universidad de la Laguna, Tenerife, Spain,*  
 †*Unitat de Senyalització Cel·lular, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain and* ‡*Department of Pharmacy, University of Brighton, Brighton, UK*

(Received 2 February 2001; accepted after revision 5 June 2001)

1. The regulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by 17β-oestradiol and non-steroidal triphenylethylene antioestrogens represents a rapid, non-classical effect of these compounds. In the present study we have investigated the signalling pathways used for the regulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channel activity by oestrogens and antioestrogens in C1300 neuroblastoma cells.
2. Whole-cell Maxi Cl<sup>-</sup> currents were readily and reversibly activated by tamoxifen, toremifene and the membrane-impermeant ethyl-bromide tamoxifen, only when applied to the extracellular medium.
3. Pre-treatment of C1300 cells with oestrogen or cAMP prevented the antioestrogen-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels. The inhibitory effect of 17β-oestradiol and cAMP was abolished by the kinase inhibitor staurosporine.
4. Current activation was unaffected by the removal of intracellular Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, but was completely abolished in the presence of okadaic acid. These results are consistent with the participation of an okadaic acid-sensitive serine/threonine protein phosphatase in the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels. However, neither oestrogen or antioestrogen treatment modified the total activity of the two major serine/threonine phosphatases, PP1 and PP2A, in C1300 cells.
5. Although the role of these Maxi Cl<sup>-</sup> channels remains unknown, our findings suggest strongly that their modulation by oestrogens and antioestrogens is linked to intracellular signalling pathways.

The function of Maxi Cl<sup>-</sup> channels in cell physiology remains unresolved. Single-channel events were first described in skeletal muscle and subsequently in many different cell types, including epithelia (Hanrahan *et al.* 1985; Velasco *et al.* 1989; Vaca & Kunze, 1992; Brown *et al.* 1993; Riquelme *et al.* 1995), muscle (Blatz & Magleby, 1983; Saigusa & Kokubun, 1988), macrophages (Schwarze & Kolb, 1984), nerve cells (Forshaw *et al.* 1993; Bettendorff *et al.* 1993) and glial cells (Dermietzel *et al.* 1994). Almost all Maxi Cl<sup>-</sup> channel recordings have been made following excision of the membrane patch containing the channel. The need for membrane excision might indicate the involvement of intracellular inhibitory factors rather than artefactual activation by membrane disruption. An early indication of Maxi Cl<sup>-</sup> channel modulation came from experiments showing that protein kinase C regulates Maxi Cl<sup>-</sup> channels (Saigusa & Kokubun, 1988),

and that excised Maxi Cl<sup>-</sup> channels can be modulated by GTP, GDP and some of their analogues (McGill *et al.* 1993). Subsequently, the observations that Maxi Cl<sup>-</sup> channels could be reversibly activated under whole-cell (Hardy & Valverde, 1994; Diaz *et al.* 1999) and cell-attached (Hardy & Valverde, 1994; Li *et al.* 2000) recording conditions by triphenylethylene antioestrogens such as toremifene or tamoxifen provided a method of studying these channels in intact cells.

Oestrogens exert most of their actions by binding and activating their receptors, which function as transcription factors (Beato, 1989). Antioestrogens are generally considered to act by competing with the binding of oestrogens to the oestrogen receptors (Jordan, 1984). In addition to the classical effect of oestrogen and antioestrogen, some of their actions are related to their

interaction with binding sites, which generally determine a rapid effect (seconds to minutes) as opposed to the long-term genomic effect ( $> 30$  min). In most cases, the rapid effects represent the interaction of oestrogens with a plasma membrane target and/or the generation of intracellular signals (Ropero *et al.* 1999; Falkenstein *et al.* 2000; Nadal *et al.* 2000, 2001).

Oestrogens have been found to exert rapid effects on the electrical activity of cells in the central nervous system (Minami *et al.* 1990), vascular system (Ruehlmann *et al.* 1998) and endocrine system (Nadal *et al.* 1998), and in non-excitable cells such as fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994). Some of these actions can be either mimicked (Ruehlmann *et al.* 1998) or antagonised (Wong & Moss, 1991) by antioestrogens. However, the mechanisms underlying the rapid modulation of membrane excitability by oestrogens and antioestrogens are still poorly understood. Recently, both the direct interaction of steroids with the subunits forming channel structures (Valverde *et al.* 1999) and the generation of intracellular signals which, in turn, would modulate the activity of different ion channels have been described (Ropero *et al.* 1999).

In the study presented here we have demonstrated that triphenylethylene antioestrogens activate Maxi Cl<sup>-</sup> currents by binding to an extracellular plasma membrane site. Such activation depends upon the activity of an okadaic acid-sensitive protein phosphatase. On the other hand, the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antioestrogens can be prevented by the extracellular application of 17 $\beta$ -oestradiol, a process that appears to be dependent upon a phosphorylation step.

## METHODS

### Cell culture

C1300 mouse neuroblastoma cells, obtained from the Imperial Cancer Research Fund Laboratories, Clare Hall, UK, were maintained in culture using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured into 35 or 60 mm culture dishes when confluent and used for patch-clamp experiments within 48 h.

### Electrophysiology

The intracellular solution contained (in mM) 140 *N*-methyl-D-glucamine chloride (NMDGCl), 1 EGTA, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, pH 7.3, 2 Na<sub>2</sub>ATP and 0.5 Na<sub>2</sub>GTP, unless indicated otherwise. Mg<sup>2+</sup>-free intracellular solution ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> 50–100 nM; calculated using EqCal from Biosoft, Cambridge, UK, assuming an initial intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration of 100–200  $\mu$ M) was obtained by removing MgCl<sub>2</sub> and adding 5 mM EDTA to the standard pipette solution. The presence of intracellular nucleotides was required for channel activation by antioestrogens. Cells were bathed in a solution containing (in mM): 140 NMDGCl, 10 Hepes, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. For anion substitutions experiments, NaI, NaF and sodium gluconate replaced NMDGCl in the bathing solution. Whole-cell patch-clamp recordings (Hardy & Valverde, 1994) were carried out at room temperature. Borosilicate pipettes were pulled and polished to a final resistance of 2–5 M $\Omega$ . Drugs were applied to the bathing solution using a U-tube applicator, as described previously (Bond *et al.* 1998). Data were

recorded and analysed using WCP software (J. Dempster, Strathclyde University, UK).

With the exception of toremifene, okadaic acid and ethyl-bromide tamoxifen (EB-tamoxifen), all chemicals were obtained from Sigma. Toremifene was obtained from Farnos, Torquay (Finland), okadaic acid was obtained from (Calbiochem) and EB-tamoxifen was synthesised at the University of Brighton (UK). Toremifene and tamoxifen were dissolved in dimethylsulphoxide and ethanol (5 mM stock solutions), respectively, and kept in the fridge for up to 5 days. 17 $\beta$ -Oestradiol was freshly prepared in ethanol. Occasionally, water-soluble 17 $\beta$ -oestradiol was used. Statistical comparisons were made using Student's *t* test.

### Preparation of cell lysates

Plastic dishes containing cells at approximately 70–80% confluency were washed three times with 2 ml of phosphate-free DMEM (Sigma). After the final wash, 3 ml of phosphate-free DMEM was added and the plates were incubated for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 30 min, the phosphate-free medium was replaced with 2 ml of fresh medium and the cells were exposed to one of the following protocols. Toremifene (5  $\mu$ M) was added to the plates for 8 min before cell lysis. The plates were then washed three times with 2 ml of washing buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH 7.4), while kept on ice. After the final wash, 600  $\mu$ l of ice-cold cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% (v/v) Brij-35, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> phenylmethylsulphonyl fluoride, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin and 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> aprotinin, pH 8.0) was added per 60 mm plate (Li & Damuni, 1998). The cell lysate was transferred to a 2.0 ml Eppendorf tube, rocked for 15 min at 4°C and subsequently centrifuged at 10 000 *g* for 10 min at 4°C. A 100  $\mu$ l aliquot taken from the supernatant was stored at -20°C for later determination of protein concentration, following the manufacturer's instructions for the Method DC Protein Assay (Bio-Rad). The remaining 500  $\mu$ l was divided into aliquots and transferred to cryotubes, frozen rapidly in liquid nitrogen, and then stored at -70°C.

### Phosphatase assays

Phosphate substrate, myelin basic protein (MBP, 0.1–0.5 nmol mg<sup>-1</sup> protein), was phosphorylated by protein kinase A (50 U) in the presence of 0.2 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (5.5  $\times$  10<sup>6</sup> c.p.m. nmol<sup>-1</sup>), 50 mM Tris-HCl, 0.1 M magnesium acetate and pH 7.5. The phosphatase assays were carried out for 30 min (at 30°C), according to methods described previously (Posas *et al.* 1995) in a final volume of 30  $\mu$ l, in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free conditions and in the absence or presence of 1 nM okadaic acid. The final concentration of substrate was 135  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and the protein concentration of the cell lysate was between 0.5 and 15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. One unit of phosphatase activity is defined as 1  $\mu$ mol of phosphate released from MBP per minute. Phosphatase assays were also carried out in the presence of divalent cations (1 mM Mg<sup>2+</sup> and/or 2.5 mM Mn<sup>2+</sup>). All experiments were carried out in quintuplicate for all conditions.

## RESULTS

### Activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by extracellular antioestrogens

C1300 mouse neuroblastoma cells were studied using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Under control conditions, with Cl<sup>-</sup> as the main charge carrier, currents were negligibly low (4.1  $\pm$  3.9 pA pF<sup>-1</sup>, *n* = 49; measured at +80 mV). The addition of the triphenylethylene antioestrogen toremifene (Fig. 1A) or tamoxifen (Fig. 1B) induced a reversible activation of a Cl<sup>-</sup> current in 44 out of 49 cells. The current was

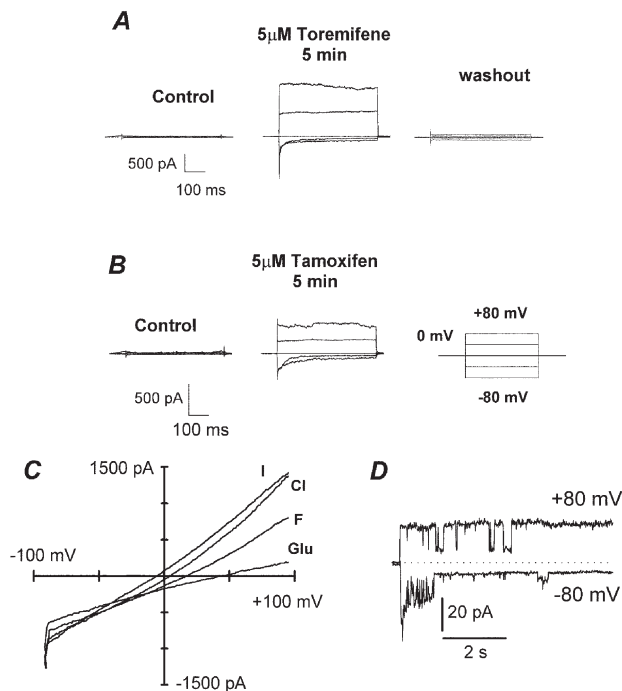


characterised by inactivation at negative potentials and, unlike the Maxi Cl<sup>-</sup> currents that have been activated by antioestrogens in fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994), presented little inactivation at positive potentials. The ionic selectivity of the whole-cell Cl<sup>-</sup> current (Fig. 1C) followed the same ionic selectivity as the Maxi Cl<sup>-</sup> current that is activated by antioestrogens in fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994). Single-channel analysis of excised patches of C1300 cells revealed the presence of a Maxi Cl<sup>-</sup> channel with a single-channel conductance of  $305 \pm 16$  pS (Fig. 1D,  $n = 12$ ), which, like the antioestrogen-activated whole-cell currents, exhibited inactivation at negative potentials only. These observations are consistent with the antioestrogen-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels in C1300 cells.

The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by antioestrogens was rapid (Fig. 2A) and dose dependent (Fig. 2B). Similarly to the dose-response curve obtained for antioestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> currents in fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994), toremifene was more potent than

tamoxifen. The response to toremifene was also evaluated in the absence of intracellular Mg<sup>2+</sup> ( $[Mg^{2+}]_{free}$  50–100 nM) or in the presence of 1 mM adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imino) triphosphate (AMP-PCP), a non-hydrolysable analogue of ATP, instead of ATP. After 5 min in the whole-cell recording condition with an ATP/Mg<sup>2+</sup>-free or AMP-PCP/Mg<sup>2+</sup>-free pipette solution, the cells were exposed to 5  $\mu$ M toremifene. The mean increase in current was  $91 \pm 9$  pA pF<sup>-1</sup> ( $n = 4$ ) and  $78 \pm 17$  pA pF<sup>-1</sup> ( $n = 3$ ), respectively.

The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents could not be reproduced when the antioestrogens were added to the intracellular compartment via the pipette solution (Fig. 3), suggesting the need for an intracellular binding site to trigger Maxi Cl<sup>-</sup> channel activation. This hypothesis was corroborated by the use of the non-permeant antioestrogen EB-tamoxifen (Jarman *et al.* 1986). Intracellular EB-tamoxifen did not trigger the activation of the current for up to 5 min after breaking into the whole-cell configuration (Fig. 3A and B). Subsequent

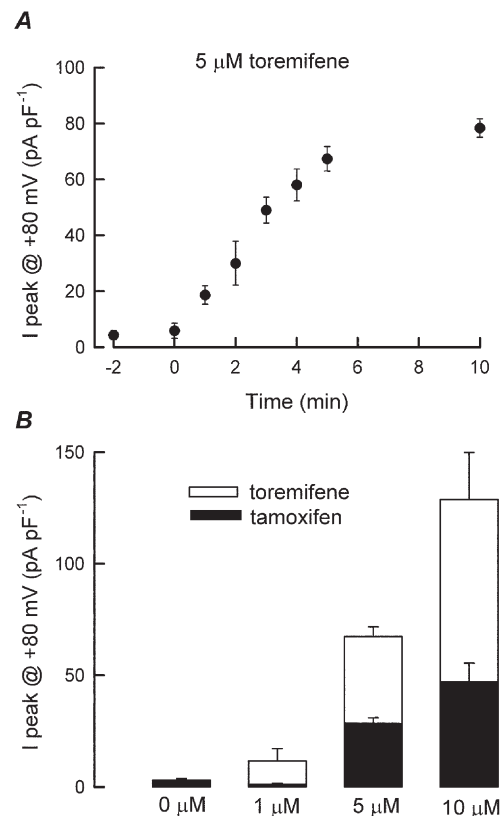


**Figure 1.** Activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by toremifene (A) and tamoxifen (B) in C1300 neuroblastoma cells

Cl<sup>-</sup> currents were obtained under control conditions and 5 min after exposure of the cells to the antioestrogens toremifene (A) and tamoxifen (B).

Whole-cell currents were measured in response to voltage pulses from -80 to +80 mV in 40 mV increments from a holding potential of 0 mV.

C, effect of ion replacements on toremifene-induced Maxi Cl<sup>-</sup> currents. The current-voltage curves were obtained by applying a ramp of voltage from -80 mV to +80 mV over a 1 s period. D, excised single-channel recording obtained from a C1300 cell.



**Figure 2.** Time course of toremifene-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents, and demonstration of their concentration dependence

A, time course of toremifene-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents following addition of 5  $\mu$ M toremifene at time = 0 min ( $I_{peak}$ , peak current).

B, concentration-dependent activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by antioestrogens. Current amplitude was measured 5 min after addition of the antioestrogens ( $n \geq 3$  for each concentration).

addition of EB-tamoxifen to the bathing solution resulted in the rapid activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels (Fig. 3C). These experiments suggest the presence of an external antioestrogen binding site that triggers the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels.

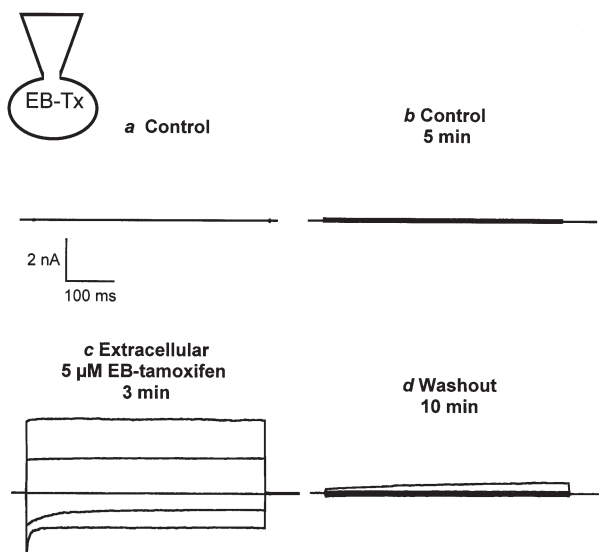
### Intracellular signals involved in Maxi Cl<sup>-</sup> channel activation by antiestrogens

**Role of protein phosphatases.** The activity of many ion channels can be modulated by changes in the phosphorylation–dephosphorylation balance of the cell. In that respect, it is interesting to note that antioestrogens have been shown to induce phosphatase activity (Freiss & Vignon, 1994). Therefore, we tested the possibility that a dephosphorylation step could be involved in the antioestrogen-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels.

A series of preliminary experiments indicated that, unlike general inhibitors of protein tyrosine phosphatases such as vanadate (Gordon, 1991) or Zn<sup>2+</sup> (Brautigam *et al.* 1981), inhibitors of protein serine/threonine phosphatases (S/T PP) such as F<sup>-</sup> (Hawkinson *et al.* 1997) were effective in preventing the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antioestrogens (Diaz *et al.* 1999). The participation of divalent cation-dependent phosphatases (of the family of PP2B and PP2C; Mumby & Walter, 1993; Cohen, 1997) could be excluded because intracellular Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> chelation to low nanomolar concentrations ( $n = 5$ ) did not prevent the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents. Furthermore, cyclosporin A at 100  $\mu\text{M}$ , an inhibitor of PP2B (Hunter, 1995), was also ineffective ( $n = 7$ ). Consequently, we examined the use of okadaic acid at a concentration that

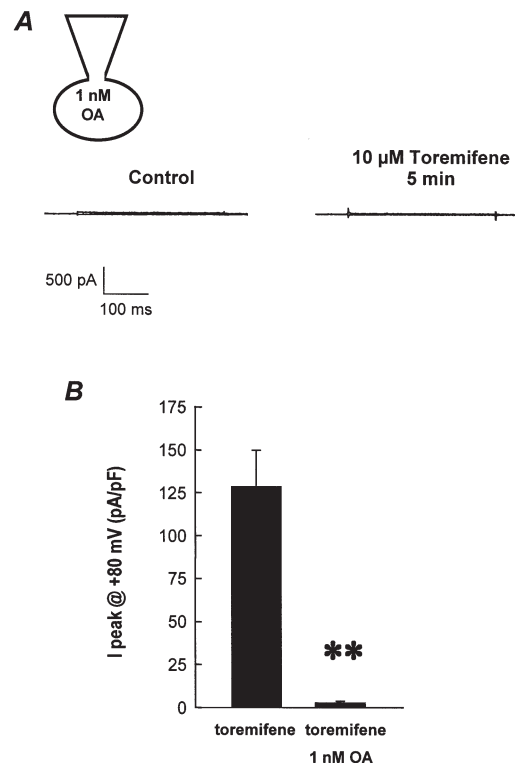
would distinguish between the two divalent cation-independent phosphatases, PP1 and PP2A. The IC<sub>50</sub> for okadaic acid inhibition of PP1 is 60–600 nM, and that for PP2A is 0.1–2 nM (Cohen, 1991).

Figure 4A shows whole-cell currents obtained from a cell dialysed with the standard pipette solution containing 1 nM okadaic acid. The presence of intracellular okadaic acid prevented the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by antioestrogens. Figure 4B summarises the mean Cl<sup>-</sup> current amplitudes obtained in response to the application of 10  $\mu\text{M}$  toremifene in the absence and presence of 1 nM okadaic acid in the pipette solution. From these experiments it could be postulated that protein phosphatases, possibly PP2A-like, are involved in the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> by antioestrogens. Therefore, we studied further the protein phosphatase activity of C1300 cells. Figure 5A shows the percentage of phosphatase activity of cell extracts obtained from control cells and cells treated with 5  $\mu\text{M}$  toremifene for 8 min. The overall phosphatase activity did not change with antioestrogen treatment. These assays were performed in the absence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. When the assays were performed under



**Figure 3.** Effect of the membrane-impermeant antioestrogen ethyl-bromide tamoxifen (EB-Tx)

Whole-cell currents recorded consecutively in a C1300 cell dialysed with an intracellular solution containing 5  $\mu\text{M}$  EB-Tx (a and b). Cl<sup>-</sup> currents could only be activated when EB-Tx was added to the extracellular solution (c).

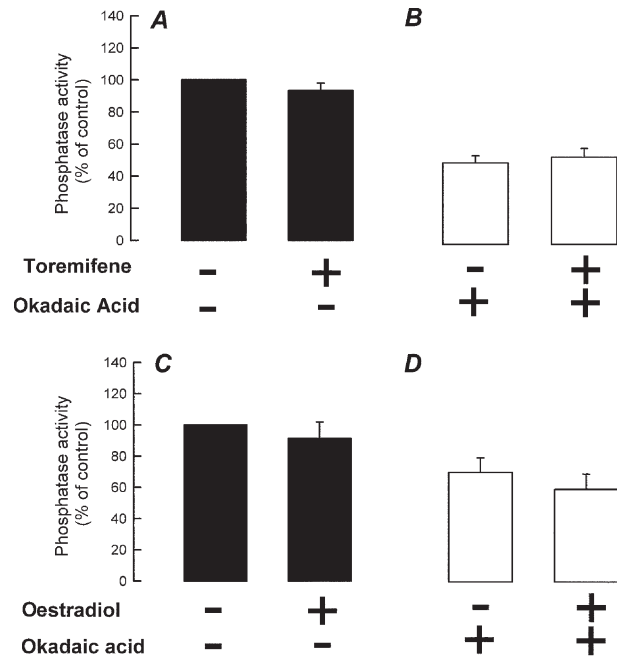


**Figure 4.** Okadaic acid (OA) prevents the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by toremifene

A, whole-cell Cl<sup>-</sup> currents recorded in a C1300 cell dialysed with an intracellular solution containing 1 nM OA. B, mean response to 10  $\mu\text{M}$  toremifene in the presence of OA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$  for each experimental condition) of normalised peak currents measured at +80 mV. \*\* Statistically different from control conditions with a probability value of  $P < 0.001$ .

**Figure 5. Phosphatase activity in C1300 cells**

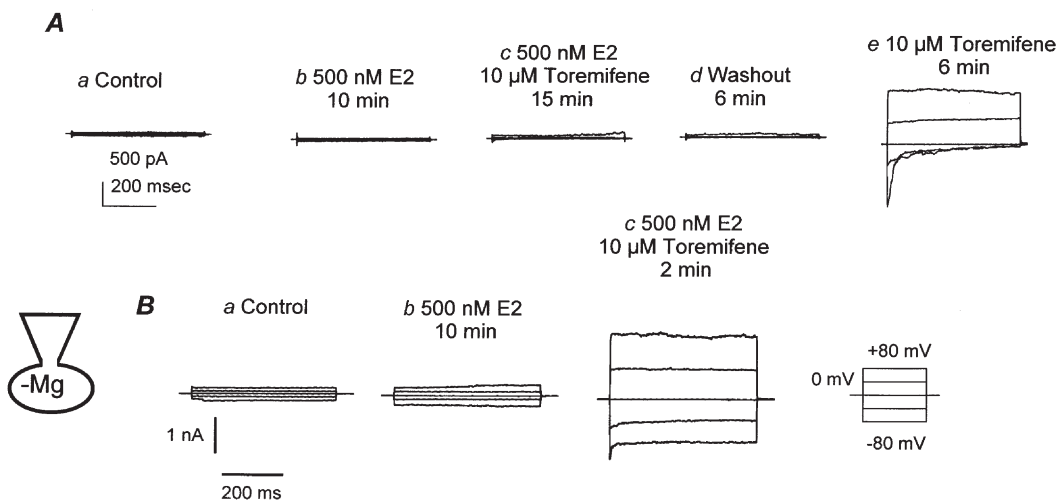
*A*, effect of 5 μM toremifene on phosphatase activity in the absence (-) of OA. *B*, effect of 5 μM toremifene on phosphatase activity in the presence of 1 nM OA (+). *C*, effect of 500 nM 17β-oestradiol on the phosphatase activity in C1300 cells in the absence (-) of OA. *D*, effect of 500 nM 17β-oestradiol on the phosphatase activity in C1300 cells in the presence of 1 nM OA (+). Phosphatase activity is presented as the percentage of that of control (untreated) cells. Bars represent the mean of quintuplicate determinations ± S.E.M. (*n* = 3). *P* > 0.05.



conditions that support the activity of cation-dependent phosphatases (i.e. in the presence of Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>), similar responses were obtained (results not shown). The effect of okadaic acid on phosphatase activity in cell extracts was also tested (Fig. 5*B*). In the presence of 1 nM okadaic acid (a concentration at which it only blocks PP2A-like phosphatases) the activity was reduced to around 60% of that observed in the control, untreated cells (see also Fig. 5*D*). No difference was observed between the okadaic acid-insensitive fraction (mostly PP1-like phosphatase activity) and the okadaic acid-sensitive fraction (which is the difference between control and okadaic acid-treated cells and represents mainly the PP2A-like phosphatase activity) in control and toremifene-treated cells (Fig. 5*B*).

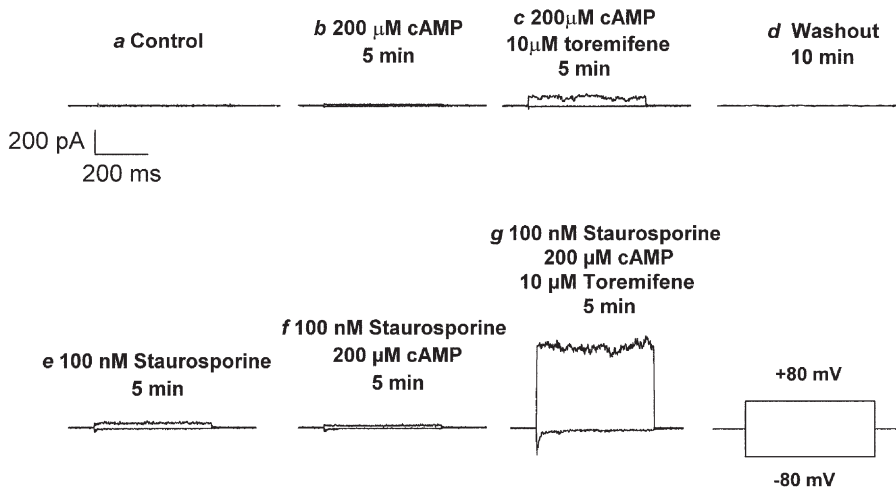
**Modulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channel activation by oestrogens**

The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antioestrogen can be prevented by pre-treatment with 17β-oestradiol in NIH3T3 fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994) and endothelial cells (Li *et al.* 2000). This modulatory action of oestradiol was also investigated in C1300 neuroblastoma cells in the present study (Fig. 6*A*). Pre-exposure to 100–500 nM oestradiol in the bathing solution 5–10 min prior to the addition of toremifene did not modify the resting Cl<sup>-</sup> currents (Fig. 6*Ab*), but inhibited the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents (Fig. 6*Ac*) by toremifene (in 10 out of 19 cells). In the cells in which Maxi Cl<sup>-</sup> currents were prevented by the presence of oestradiol, subsequent removal of oestradiol resulted in the prompt development



**Figure 6. Modulation of toremifene-activated Maxi Cl<sup>-</sup> channels by 17β-oestradiol**

*A*, pre-exposure of C1300 cells to 500 nM 17β-oestradiol prevented the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by toremifene. *B*, lack of effect of oestradiol in cells dialysed with Mg<sup>2+</sup>-free (50–100 nM) intracellular solutions.



**Figure 7.** Effects of cAMP and staurosporine on toremifene-activated Maxi Cl<sup>-</sup> channels

Representative current tracings taken from a single cell held at 0 mV and pulsed from -80 mV to +80 mV.

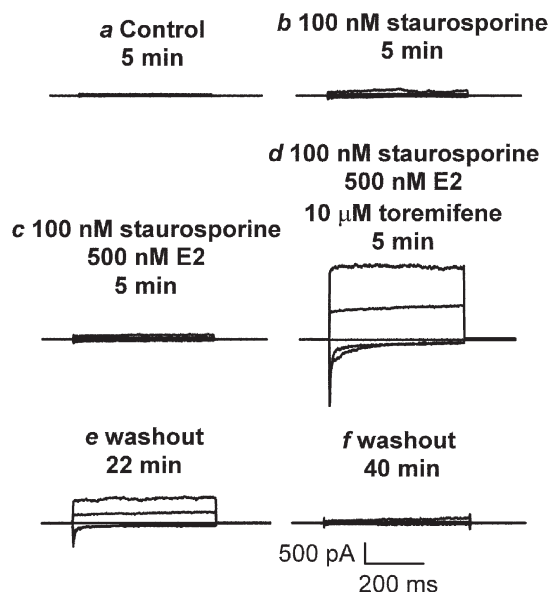
of sizeable Maxi Cl<sup>-</sup> currents (Fig. 6*Ae*). The inhibitory effect of oestradiol was also checked in cells dialysed with Mg<sup>2+</sup>-free solutions ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> 50–100 nM; Fig. 6*B*). Under this condition, oestradiol did not prevent the toremifene-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents.

The effect of 17β-oestradiol on phosphatase activity in C1300 cells was also tested. 17β-Oestradiol did not modify either the overall phosphatase activity (Fig. 5*C*) or the okadaic-acid-sensitive fraction (Fig. 5*D*).

#### Role of cAMP and phosphorylation on the oestrogen-mediated modulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels

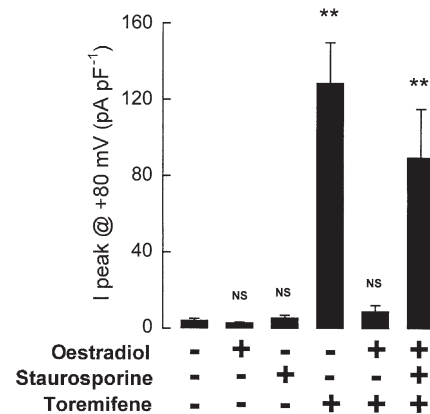
Many of the actions of oestrogens can be mediated by the generation of intracellular signals, including the production of intracellular cAMP (Aronica *et al.* 1995;

Doolan *et al.* 2000). We used a membrane-permeable cAMP derivative to try to mimic the effect of 17β-oestradiol. As shown in Fig. 7, a protocol similar to that described in Fig. 6 was used, but with dibutyl-cAMP instead of oestradiol. As with oestradiol, pre-incubation with cAMP significantly reduced the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by toremifene (Fig. 7*a–c*). To check whether the effect was due to an increase in cAMP levels or an increase in cAMP-dependent protein kinase activity, we repeated the experimental protocol in the same cell (Fig. 7*d–g*) but in the continuous presence of staurosporine,



**Figure 8.** Effects of staurosporine on 17β oestradiol-induced modulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channel activation

Consecutive recordings were obtained from a single cell. E2, 17β-oestradiol.



**Figure 9.** Bar chart summarising the results of the incubation with 17β-oestradiol, and/or staurosporine on Maxi Cl<sup>-</sup> channel currents recorded under control conditions or in the presence of 10 μM toremifene

The results are presented as the mean ± S.E.M. for  $I_{\text{peak}}$  data obtained at +80 mV and normalised to cell capacitance. \*\* Statistically different from control conditions (in the absence of any drug) with a probability value of  $P < 0.001$ . NS, no significant differences with respect to the control conditions. The number of cells examined under each of the conditions is as follows: control (49), oestradiol (5), staurosporine (6), toremifene (18), oestradiol + toremifene (5) and staurosporine + oestradiol + toremifene (4).

a general S/T protein kinase inhibitor (Werz *et al.* 1993). In the presence of cAMP and staurosporine, activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by 10  $\mu$ M toremifene was unaffected ( $90 \pm 14$  pA pF<sup>-1</sup>,  $n = 5$ ). Staurosporine was also used in conjunction with oestradiol (Fig. 8), and similar results were obtained; in the presence of staurosporine, oestradiol did not prevent the toremifene-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents. The mean responses to different experimental conditions are summarised in Fig. 9.

## DISCUSSION

In the present study we report the modulation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels in C1300 mouse neuroblastoma cells by both oestrogens and antioestrogens. Antioestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> channels in C1300 cells exhibited a similar conductance ( $\sim 300$  pS) and ionic selectivity ( $I^- > Cl^- > F^-$ ) to the Maxi Cl<sup>-</sup> channels activated by antioestrogens in fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994), although the voltage-dependent inactivation differed slightly from one cell type to another. While the channel in the fibroblasts shows marked inactivation at positive and negative potentials (Hardy & Valverde, 1994), the channel in the neuroblastoma cell line (this study) only presented inactivation at negative potentials, although the inactivation constant varied greatly from cell to cell. A Maxi Cl<sup>-</sup> channel activated by antioestrogens has also been described in endothelial cells, although its voltage dependence was not reported (Li *et al.* 2000). Differences in the voltage-dependent inactivation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels have been observed among different cell types (Blatz & Magleby, 1983; Schwarze & Kolb, 1984; Kolb *et al.* 1985; Forshaw *et al.* 1993; Riquelme *et al.* 1995). In this respect, it is interesting to note that the mitochondrial voltage-dependent anionic channel (VDAC), also known as mitochondrial porin, exhibits bell-shaped voltage dependence, a property associated with the presence of different protein modulators (Liu & Colombini, 1991) or polyamines (Horn *et al.* 1998). VDAC have also been identified in the plasma membrane (Dermietzel *et al.* 1994). Thus, although there is still much debate regarding the molecular identification of plasma membrane Maxi Cl<sup>-</sup> channels and whether they can be considered members of the VDAC family, it would be interesting to investigate whether the differences in voltage-dependent inactivation between fibroblast and neuroblastoma Maxi Cl<sup>-</sup> channels are due to the presence of different structural features, regulatory subunits, or associations with low molecular-weight molecules such as polyamines.

Maxi Cl<sup>-</sup> channel activity has been seen in intact cells only rarely, although it generally appears following membrane-patch excision. This observation has suggested the existence of regulatory mechanisms that keep the channel closed under non-stimulatory conditions. Early evidence of such intracellular regulation came from Saigusa & Kokubun (1988), who showed the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by inhibiting protein kinase activity

with H7. That work suggested that phosphorylation of the Maxi Cl<sup>-</sup> channel or a regulatory subunit kept the channel closed. The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels under the whole-cell and cell-attached patch-clamp configurations by the addition of extracellular antioestrogens is interesting for two reasons. First, it supports the hypothesis that activation of the channel following patch excision is most likely the result of altered intracellular regulatory mechanisms rather than merely a physical disruption of the membrane caused by the process of patch excision itself. Second, the fact that activation of the channels only occurs when triphenylethylene antioestrogens were added to the extracellular solution indicates the presence of an antioestrogen binding site on the plasma membrane that is accessible from the external side. This is supported by the use of the membrane-impermeant derivative EB-tamoxifen (Jarman *et al.* 1986), which was only effective when applied to the extracellular solution. The presence of both oestrogen (Pietras & Szego, 1977; Bression *et al.* 1986; Pappas *et al.* 1995; Nadal *et al.* 2000) and antioestrogen (Sudo *et al.* 1983; Klinge *et al.* 1992) binding sites in the plasma membrane has been characterised in several cell preparations. We have demonstrated previously that the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels in fibroblasts is independent of the activity of the so-called antioestrogen binding site (Hardy & Valverde, 1994).

The possibility that the activation of the Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antioestrogens is related to the alteration of the phosphorylation–dephosphorylation balance was also investigated. We hypothesised that if phosphorylation of the channel, or a regulatory factor, keeps the channel closed under non-stimulatory conditions, as suggested by Saigusa & Kokubun (1988), the activation of the channel may be linked to a dephosphorylation reaction. The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> currents by antioestrogens appears to be related to the activity of S/T PP, since general inhibitors of S/T PP (20 mM NaF), but not tyrosine phosphatases (2 mM ZnCl<sub>2</sub> or 100  $\mu$ M vanadate), prevented it. Of the four major S/T PPs, PP1, PP2A, PP2B and PP2C (reviewed by Cohen, 1991), the involvement of the divalent cation-dependent phosphatases, 2B and 2C, was excluded because current activation was preserved in the absence of intracellular Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> or in the presence of cyclosporin A, an inhibitor of PP2B (Hunter, 1995). The phosphatases PP1 and PP2A are both divalent cation independent and can be distinguished by their respective sensitivity to okadaic acid. PP2A is inhibited by 1 nM okadaic acid ( $IC_{50} < 1$  nM; Cohen, 1991, 1997), while PP1 is unaffected by 1 nM okadaic acid, but is completely inhibited at 1  $\mu$ M ( $IC_{50} \approx 60$ – $600$  nM; Cohen, 1991, 1997). The fact that 1 nM okadaic acid totally inhibited the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antioestrogens is consistent with the participation of a PP2A-like phosphatase. In accordance with this hypothesis, we detected phosphatase activity in C1300 cells that was inhibited by 1 nM okadaic acid. The okadaic acid-sensitive phosphatase activity represented

around 30% of the total cation-independent phosphatase activity. However, we did not observe changes in okadaic acid-sensitive or -insensitive phosphatase activity with either oestrogen or antioestrogens. The okadaic acid-sensitive PP2A-like phosphatases are heterotrimeric enzymes that are composed of a catalytic subunit (C) and two regulatory subunits (A and B: Mumby & Walter, 1993; Mayer-Jaekel & Hemmings, 1994; Price & Mumby, 2000). The characteristics of PP2A phosphatase (e.g. localisation, substrate specificity and kinetic properties) can be modulated by changes in the regulatory subunits, without a concomitant change in the total PP2A activity (Goldberg, 1999; Price & Mumby, 2000), that may represent a more subtle modulation of the enzyme than its massive activation. We speculate that the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels, which depends upon an okadaic acid-sensitive step, represents a change in the substrate specificity by PP2A-like phosphatases in response to antioestrogens, enabling them to dephosphorylate Maxi Cl<sup>-</sup> channels or as yet unknown regulatory subunits of the channel.

Many of the rapid, non-genomic effects of oestrogens, including the modulation of ion channels, have been associated with increases in protein kinase activity via the activation of a membrane G-protein-coupled receptor (Minami *et al.* 1990; Lagrange *et al.* 1997; Gu & Moss, 1998; Kelly & Wagner, 1999). The effect of oestradiol on the prevention of Maxi Cl<sup>-</sup> activation by antioestrogens also appears to be linked to protein phosphorylation events. Several pieces of evidence support this assumption. First, the oestradiol effect can be mimicked by cAMP. Second, the effect of both cAMP and oestradiol can be prevented in the presence of staurosporine, a broad-spectrum S/T protein kinase inhibitor. Third, the Maxi Cl<sup>-</sup> channel activation effected by toremifene can be greatly reduced by including 100  $\mu$ M GDP $\beta$ S, a non-hydrolysable GDP analogue, in the pipette solution, and slightly increased by including 100  $\mu$ M GppNHp (guanosine 5'-( $\beta$ -imido) triphosphate), a non-hydrolysable analogue of GTP (Diaz *et al.* 1999). Finally, the inhibitory effect of oestradiol can be prevented by loading cells with Mg<sup>2+</sup>-free (50–100 nM) solutions, a situation in which transfer of the  $\gamma$  phosphate from ATP to the receptor protein by the kinase(s) is impaired. However, since no specific kinase inhibitors have been used we have no indication as to whether oestrogens use more than one kinase pathway to prevent channel activation, or whether they induce phosphorylation of the channel protein or other elements involved in the activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels.

The facts that antioestrogen-induced activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels depends upon the presence of intracellular GTP and is modulated by GDP $\beta$ S and GppNHp suggest the participation of a G-protein in the signalling cascade. However, channel activation by antioestrogens is retained in Mg<sup>2+</sup>-free intracellular solutions, despite the fact that G-protein activation requires Mg<sup>2+</sup>. The different Mg<sup>2+</sup> requirements of these two processes (G-protein activation

and protein phosphorylation) might explain this apparent contradiction. While the concentration of Mg<sup>2+</sup> required for the activation of many G-proteins (GTP hydrolysis and GTP binding in the presence of a ligand) is in the range of 10<sup>-9</sup>–10<sup>-8</sup> M (Brandt & Ross, 1986; Gilman, 1987; Higashijima *et al.* 1987), the [Mg<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> required by different protein kinases is typically > 10<sup>-5</sup> M (Pickett-Gies & Walsh, 1985; Sun & Budde, 1997; Vinals *et al.* 1997; Rodriguez-Zavala & Moreno-Sanchez, 1998; Harvengt *et al.* 2000; Srivenugopal *et al.* 2000). Therefore, it is plausible that the actual intracellular [Mg<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> ( $\sim$  10<sup>-7</sup> M) present in the Mg<sup>2+</sup>-free solution is sufficient to activate G proteins but insufficient to support a phosphorylation process.

In summary, we propose that under non-stimulatory conditions the Maxi Cl<sup>-</sup> channels are kept closed by phosphorylation of the channel protein or a regulator of its activity. Upon the addition of triphenylethylene antioestrogens, a PP2A-like phosphatase is activated, probably via a G-protein-coupled receptor, leading to the dephosphorylation of the channel (or a regulatory subunit) and channel opening. On the other hand, oestrogen prevents channel activation by promoting phosphorylation of the channel or a key element in the channel activation pathway.

- ARONICA, S. M., KRAUS, W. L. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1995). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase activity and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 8517–8521.
- BEATO, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335–344.
- BETTENDORFF, L., KOLB, H. A. & SCHOFFENIELS, E. (1993). Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells. *Journal of Membrane Biology* **136**, 281–288.
- BLATZ, A. L. & MAGLEBY, K. L. (1983). Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophysical Journal* **43**, 237–241.
- BOND, T. D., HIGGINS, C. F. & VALVERDE, M. A. (1998). P-Glycoprotein and swelling-activated chloride channels. *Methods in Enzymology* **292**, 359–370.
- BRANDT, D. R. & ROSS, E. M. (1986). Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by beta-adrenergic receptor and Mg<sup>2+</sup> studied in reconstituted receptor-Gs vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 1656–1664.
- BRAUTIGAN, D. L., BORNSTEIN, P. & GALLIS, B. (1981). Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 6519–6522.
- BRESSON, D., MICHARD, M., LE DAFNIET, M., PAGESY, P. & PEILLON, F. (1986). Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinology* **119**, 1048–1051.
- BROWN, P. D., GREENWOOD, S. L., ROBINSON, J. & BOYD, R. D. H. (1993). Chloride channels of high conductance in the microvillous membrane of term human placenta. *Placenta* **14**, 103–115.

- COHEN, P. (1991). Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods in Enzymology* **201**, 389–398.
- COHEN, P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 245–251.
- DERMIETZEL, R., HWANG, T.-K., BUETTNER, R., HOFER, A., DOTZLER, E., KREMER, M., DEUTZMAN, R., THINNES, F. P., FISHMAN, G. I., SPRAY, D. C. & SIEMEN, D. (1994). Cloning and *in situ* localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 499–503.
- DIAZ, M., HARDY, S. P. & VALVERDE, M. A. (1999). Modulation of Maxi-Cl channels by oestrogen and antioestrogens. *Journal of Physiology* **517.P**, 7S–8S.
- DOOLAN, C. M., CONDLIFFE, S. B. & HARVEY, B. J. (2000). Rapid nongenomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by 17β-oestradiol in female rat distal colon. *British Journal of Pharmacology* **129**, 1375–1386.
- FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H. C., CHRIST, M., FEURING, M. & WEHLING, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews* **52**, 513–556.
- FORSYTH, P. J., LISTER, T. & RAY, D. E. (1993). Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. *Neuropharmacology* **32**, 105–111.
- FREISS, G. & VIGNON, F. (1994). Antiestrogens increase protein tyrosine phosphatase activity in human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* **8**, 1389–1396.
- GILMAN, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 615–649.
- GOLDBERG, Y. (1999). Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochemical Pharmacology* **57**, 321–328.
- GORDON, J. A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods in Enzymology* **201**, 477–482.
- GU, Q. & MOSS, R. L. (1998). Novel mechanism for non-genomic action of 17β-oestradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurones. *Journal of Physiology* **506**, 745–754.
- HANRAHAN, J. W., ALLES, W. P. & LEWIS, S. A. (1985). Single anion-selective channels in basolateral membrane of a mammalian tight epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 7791–7795.
- HARDY, S. P. & VALVERDE, M. A. (1994). Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB Journal* **8**, 760–765.
- HARVENGT, P., VLERICK, A., FUKS, B., WATTIEZ, R., RUYSSCHAERT, J. M. & HOMBLE, F. (2000). Lentil seed aquaporins form a heterooligomer which is phosphorylated by a Mg<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-regulated kinase. *Biochemical Journal* **352**, 183–190.
- HAWKINSON, J. E., ACOSTA-BURRUEL, M., TA, N. D. & WOOD, P. L. (1997). Novel phosphoserine phosphatase inhibitors. *European Journal of Pharmacology* **337**, 315–324.
- HIGASHIJIMA, T., FERGUSON, K. M., STERNWEIS, P. C., SMIGEL, M. D. & GILMAN, A. G. (1987). Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 762–766.
- HORN, A., REYMANN, S. & THINNES, F. P. (1998). Studies on human porin. XVI: Polyamines reduce the voltage dependence of human VDAC in planar lipid bilayers – spermine and spermidine inducing asymmetric voltage gating on the channel. *Molecular Genetics and Metabolism* **63**, 239–242.
- HUNTER, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–236.
- JARMAN, M., LEUNG, O. T., LECLERCQ, G., DEVLEESCHOUWER, N., STOESSEL, S., COOMBS, R. C. & SKILTON, R. A. (1986). Analogues of tamoxifen: the role of the basic side-chain. Applications of a whole-cell oestrogen-receptor binding assay to N-oxides and quaternary salts. *Anticancer Drug Design* **1**, 259–268.
- JORDAN, V. C. (1984). Biochemical pharmacology of antiestrogens action. *Pharmacological Reviews* **36**, 245–276.
- KELLY, M. J. & WAGNER, E. J. (1999). Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **10**, 369–374.
- KLINGE, C. M., BAMBARA, R. A. & HILF, R. (1992). What differentiates antioestrogen-liganded vs. estradiol-liganded estrogen receptor action? *Oncology Research* **4**, 145–150.
- KOLB, H. A., BROWN, C. D. A. & MURER, H. (1985). Identification of a voltage-dependent anion channel in the apical membrane of a Cl<sup>-</sup>-secretory epithelium (MDCK). *Pflügers Archiv* **403**, 262–265.
- LAGRANGE, A. H., RONNEKLEIV, O. K. & KELLY, M. J. (1997). Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Molecular Pharmacology* **51**, 605–612.
- LI, M. & DAMUNI, Z. (1998). I1PP2A and I2PP2A. Two potent protein phosphatase 2A-specific inhibitor proteins. In *Protein Phosphatase Protocols: Methods in Molecular Biology*, ed. LUDLOW, J. W., pp. 59–66. Humana, Totowa.
- LI, Z., NIWA, Y., SAKAMOTO, S., CHEN, X. & NAKAYA, Y. (2000). Estrogen modulates a large conductance chloride channel in cultured porcine aortic endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **35**, 506–510.
- LIU, M. Y. & COLOMBINI, M. (1991). Voltage gating of the mitochondrial outer membrane channel VDAC is regulated by a very conserved protein. *American Journal of Physiology* **260**, C371–374.
- MCGILL, J. M., GETTYS, T. W., BASAVAPPA, S. & FITZ, J. G. (1993). GTP-binding proteins regulate high conductance anion channels in rat bile duct epithelial cells. *Journal of Membrane Biology* **133**, 253–261.
- MAYER-JAEKEL, R. E. & HEMMINGS, B. A. (1994). Protein phosphatase 2A – a ‘menage a trois’. *Trends in Cell Biology* **4**, 287–291.
- MINAMI, T., OOMURA, Y., NABEKURA, J. & FUKUDA, A. (1990). 17β-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Research* **519**, 301–307.
- MUMBY, M. C. & WALTER, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological Reviews* **73**, 673–699.
- NADAL, A., DIAZ, M. & VALVERDE, M. A. (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News in Physiological Sciences* (in the Press)
- NADAL, A., ROPERO, A. B., LARIBI, O., MAILLET, M., FUENTES, E. & SORIA, B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xeniestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 11603–11608.

- NADAL, A., ROVIRA, J. M., LARIBI, O., LEON-QUINTO, T., ANDREU, E., RIPOLL, C. & SORIA, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17 $\beta$ -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB Journal* **12**, 1341–1348.
- PAPPAS, T. C., GAMETCHU, B. & WATSON, C. S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB Journal* **9**, 404–410.
- PICKETT-GIES, C. A. & WALSH, D. A. (1985). Subunit phosphorylation and activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by the cAMP-dependent protein kinase. Divalent metal ion, ATP, and protein concentration dependence. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 2046–2056.
- PIETRAS, R. J. & SZEGO, C. M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**, 69–72.
- POSAS, F., BOLLEN, M., STALMANS, W. & ARINO, J. (1995). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Letters* **368**, 39–44.
- PRICE, N. E. & MUMBY, M. C. (2000). Effects of regulatory subunits on the kinetics of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* **39**, 11312–11318.
- RIQUELME, G., STUTZIN, A., BARROS, L. F. & LIBERONA, J. L. (1995). A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **173**, 733–738.
- RODRIGUEZ-ZAVALA, J. S. & MORENO-SANCHEZ, R. (1998). Modulation of oxidative phosphorylation by Mg<sup>2+</sup> in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7850–7855.
- ROPERO, A. B., FUENTES, E., ROVIRA, J. M., RIPOLL, C., SORIA, B. & NADAL, A. (1999). Non-genomic actions of 17 $\beta$ -oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *Journal of Physiology* **521**, 397–407.
- RUEHLMANN, D. O., STEINERT, J. R., VALVERDE, M. A., JACOB, R. & MANN, G. E. (1998). Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. *FASEB Journal* **12**, 613–619.
- SAIGUSA, A. & KOKUBUN, S. (1988). Protein kinase C may regulate resting anion conductance in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **155**, 882–889.
- SCHWARZE, W. & KOLB, H. A. (1984). Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes. *Pflügers Archiv* **402**, 281–291.
- SRIVENUGOPAL, K. S., MULLAPUDI, S. R., SHOU, J., HAZRA, T. K. & ALI-OSMAN, F. (2000). Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Research* **60**, 282–287.
- SUDO, K., MONSMA, F. J. JR & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1983). Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: subcellular localization, ligand specificity, and distribution in tissues of the rat. *Endocrinology* **112**, 425–433.
- SUN, G. & BUDDE, R. J. (1997). Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases. *Biochemistry* **36**, 2139–2146.
- VACA, L. & KUNZE, D. L. (1992). Anion and cation permeability of a large conductance anion channel in the T84 human colonic cell line. *Journal of Membrane Biology* **130**, 241–249.
- VALVERDE, M. A., ROJAS, P., AMIGO, J., COSMELLI, D., ORIO, P., BAHAMONDE, M. I., MANN, G. E., VERGARA, C. & LATORRE, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* **285**, 1929–1931.
- VELASCO, G., PRIETO, M., ALVAREZ-RIERA, J., GASCON, S. & BARROS, F. (1989). Characteristics and regulation of a high conductance anion channel in GBK kidney epithelial cells. *Pflügers Archiv* **414**, 304–310.
- VINALS, F., CAMPS, M., TESTAR, X., PALACIN, M. & ZORZANO, A. (1997). Effect of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor: inhibition by fluoride is magnesium dependent. *Molecular Cell Biochemistry* **171**, 69–73.
- WERZ, M. A., ELSMLIE, K. S. & JONES, S. W. (1993). Phosphorylation enhances inactivation of N-type calcium channel current in bullfrog sympathetic neurons. *Pflügers Archiv* **424**, 538–545.
- WONG, M. & MOSS, R. L. (1991). Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 $\beta$ -estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Research* **543**, 148–152.

#### Acknowledgements

This work was supported by CICYT/FEDER 1FD97-1065-C03-01 (M.D.), Human Frontiers Science Program (M.A.V.) and Distinció de la Generalitat de Catalunya per a la Promocio de la Recerca Universitaria (M.A.V.).

#### Corresponding author

M. A. Valverde: Unitat de Senyalització Celular, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/ Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

Email: miguel.valverde@cexs.upf.es



# Plasma Membrane Voltage-dependent Anion Channel Mediates Antiestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> Currents in C1300 Neuroblastoma Cells\*

Received for publication, March 19, 2003, and in revised form, May 16, 2003  
Published, JBC Papers in Press, June 5, 2003, DOI 10.1074/jbc.M302814200

Maria I. Bahamonde, José M. Fernández-Fernández, Francesc X. Guix, Esther Vázquez, and Miguel A. Valverde‡

From the Unitat de Senyalització Cel·lular, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/ Dr. Aiguader 80, Barcelona 08003, Spain

The cell membrane large conductance voltage-dependent chloride channel (Maxi Cl<sup>-</sup> channel) has been recorded in different cell types following excision of membrane patches or stimulation by antiestrogens under whole-cell recording conditions. However, both its molecular nature and relevance to cell physiology await elucidation. Its electrophysiological properties resemble those of the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane. This observation has led to the controversial hypothesis that VDAC could be the molecular correlate of the plasma membrane Maxi Cl<sup>-</sup> channel. We have investigated the cellular localization of VDAC and its relationship with the antiestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> current in C1300 neuroblastoma cells. The presence of a plasma membrane VDAC was demonstrated by immunoblotting of membrane fractions with monoclonal antibodies against the VDAC and by reverse transcription-PCR using primers that hybridize to a VDAC sequence coding for an N-terminal leader peptide required for its plasma membrane sorting. Besides, VDAC colocalized with markers of plasma membrane lipid rafts (cholera toxin  $\beta$  subunit) but not caveolin-1. Transfection of C1300 cells with an antisense oligonucleotide directed against the specific membrane leader sequence of VDAC markedly reduced both VDAC immunostaining and antiestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> currents, suggesting that VDAC forms the plasma membrane Maxi Cl<sup>-</sup> channel or a part thereof.

Chloride channels of large conductance were first identified in excised patches from the plasma membrane of skeletal muscle 20 years ago (1). The search for their functional relevance, regulation, and molecular identity has continued, with irregular success, over all these years. Among the different roles associated with their function, the most frequently mentioned are the regulation of cell volume (2, 3) and apoptosis (4, 5). This channel has also been activated by extracellular antiestrogens (6–9) and modulated by intracellular GTP (10).

\* This work was supported by the Human Frontiers Science Program, Spanish Ministry of Science and Technology, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Comisió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica 2002SGR/109, and Distínció de la Generalitat de Catalunya per a la Promoció de la Recerca Universitària. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-93-542-2832; Fax: 34-93-542-2802; E-mail: miguel.valverde@cexs.upf.es.

The molecular identity of Maxi Cl<sup>-</sup> channels<sup>1</sup> has been even more difficult to prove. The fact that Maxi Cl<sup>-</sup> channel electrophysiological properties resemble those of the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) (11) encouraged some investigators to assume that the two channels were one and the same protein (12, 13). This hypothesis was based on early observations suggesting the presence of VDAC protein on the plasma membrane (12, 14) but was questioned by others (15). The proposal suggesting the presence of VDAC in extra-mitochondrial locations has received recent strong support from two independent reports: 1) the identification of a VDAC isoform (pl-VDAC) that contains a leader sequence for its trafficking to the plasma membrane (16) and 2) the presence of VDAC in caveolae (17). In the present study, we have evaluated the presence of VDAC in the plasma membrane of C1300 neuroblastoma cells and, more interestingly, its contribution to the Maxi Cl<sup>-</sup> currents activated by antiestrogens in these cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

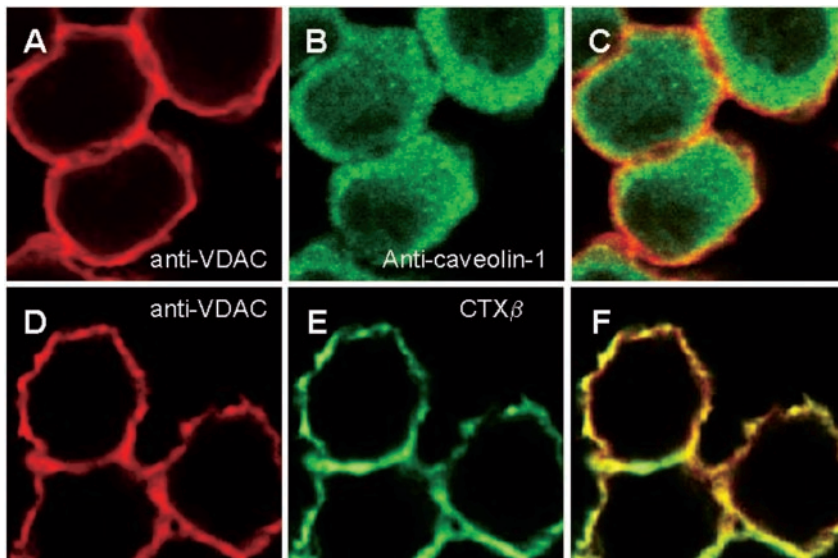
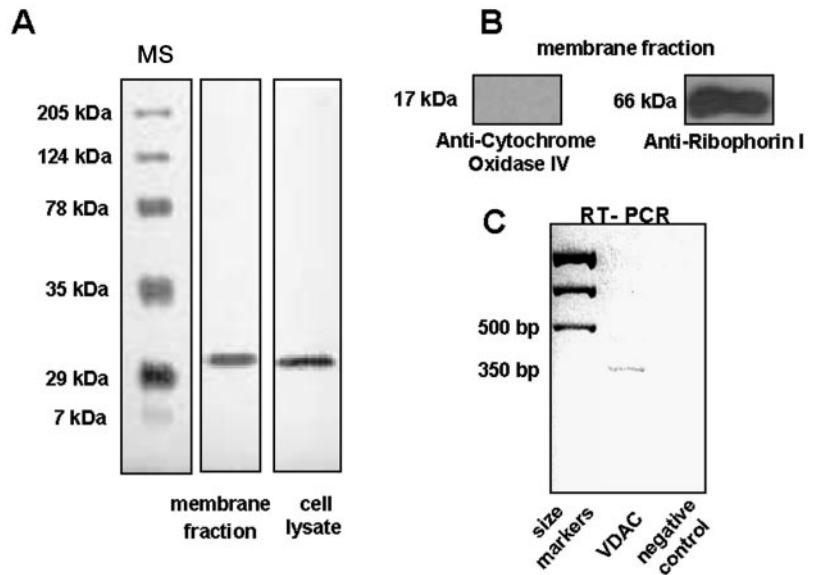
**Cell Culture and Chemicals**—C1300 mouse neuroblastoma cells, obtained from the Imperial Cancer Research Fund Laboratories, Clare Hall, Herts, UK, were cultured as described previously (8). For experimental procedures, cells were plated onto 35-mm culture dishes (NUNC) or 13-mm glass coverslips treated with poly-D-lysine (10  $\mu$ g/ml for 1 h). All chemicals were obtained from Sigma unless otherwise indicated. Toremifene was obtained from Farnos, Turku, Finland.

**Preparation of Cell Lysates and Plasma Membrane Fractions**—T-75 flasks containing confluent cells were washed three times with 5 ml of PBS without calcium, magnesium, and sodium bicarbonate (Invitrogen). After the final wash, 600–1,000  $\mu$ l of ice-cold cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Brij-35, 10  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml aprotinin) was added per T-75 flask. The cell lysate was transferred to a 2-ml Eppendorf tube, rocked for 30 min at 4 °C, and subsequently centrifuged at 10,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C. A 50- $\mu$ l aliquot was removed from the supernatant and stored at –20 °C for subsequent determination of protein concentration (Method DC protein assay, Bio-Rad). The remaining supernatant was aliquoted into cryotubes and frozen rapidly in liquid nitrogen before being stored at –70 °C. Plasma membrane proteins were isolated using a previously described protocol (18, 19).

**Immunoblotting**—Proteins were resolved by SDS-PAGE (12%) and blotted onto nitrocellulose. The primary antibodies used were: monoclonal mouse anti-porin 31 HL (Calbiochem) raised against the N terminus of human VDAC1 (1:2,000 dilution), monoclonal mouse anti-cytochrome oxidase subunit IV (1:1,000; Molecular Probes) to the

<sup>1</sup> The abbreviations used are: Maxi Cl<sup>-</sup> channel, large conductance voltage-dependent chloride channel; Maxi K<sup>+</sup> channels, large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels; CTX $\beta$ , cholera toxin  $\beta$  subunit; DIDS, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; EGFP, enhanced green fluorescent protein; VDAC, voltage-dependent anion channel; pl-VDAC, plasma membrane VDAC; FITC, fluorescein isothiocyanate; RT, reverse transcription.

**FIG. 1. VDAC detection in C1300 cells.** As shown in *A*, 10  $\mu$ g of plasma membrane proteins or total protein lysate from C1300 neuroblastoma cells was analyzed by Western blotting of VDAC. *MS*, molecular size. *B*, Western blot analysis of mitochondrial Cytochrome oxidase subunit IV and endoplasmic reticulum ribophorin I membrane proteins. Western blots shown in *A* and *B* are representative of at least five replicates. *C*, RT-PCR analysis of pl-VDAC, which recognizes a band of 350 bp that includes the leader sequence. Negative control was performed removing the cDNA from the reaction.



**FIG. 2. Colocalization of VDAC to membrane microdomains.** *A* and *D*, C1300 cells were permeabilized and immunostained with anti-porin 31 HL (VDAC) antibody and Cy3-coupled secondary antibody (red). *B*, immunostaining with anti-caveolin-1 antibody and Alexa Fluor 488 secondary antibody (green). *C*, overlapping images (*A* and *B*). Note the lack of clear yellow color, indicating no colocalization of VDAC and caveolin-1. *E*, staining with FITC-CTX $\beta$  (green). *F*, overlapping images (*D* and *E*) showing extensive colocalization of GM $_1$  (receptor for CTX $\beta$ ) and VDAC (yellow). Images were obtained by confocal laser scanning microscopy. They are representative of at least 10 different immunolocalizations.

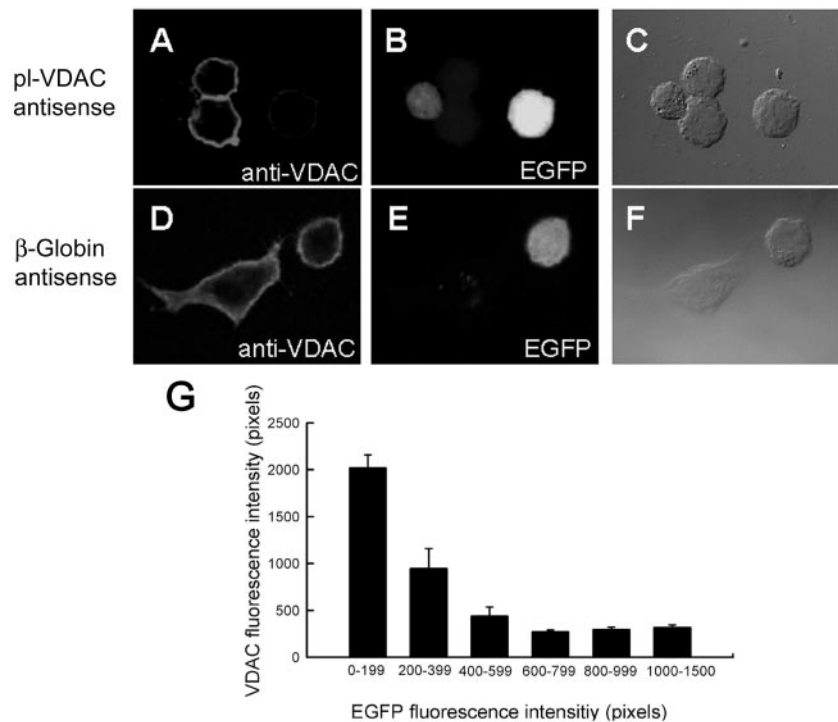
corresponding complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system, and goat polyclonal anti-ribophorin I (1:100; Santa Cruz Biotechnology) that recognizes integral membrane glycoproteins that localize exclusively to the rough endoplasmic reticulum. Non-specific binding was avoided by incubating the nitrocellulose membranes in a blocking solution consisting of Tween 20-Tris buffer solution (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) supplemented with 5% non-fat milk for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. Mouse and rabbit antibodies were detected either with alkaline-phosphatase-conjugated antibodies (goat anti-mouse IgG at a 1:500 dilution (Calbiochem)) or peroxidase-conjugated antibodies (sheep anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG, both at a 1:2,000 dilution (Amersham Biosciences)). The membranes were then washed, and the bands were visualized by using the enhanced chemiluminescence substrate Super Signal (Pierce) and autoradiographed on either Amersham Biosciences Hyperfilm ECL or nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt solution for detection of alkaline phosphatase.

**Confocal Microscopy**—Double-label analysis was carried out on C1300 cells adhered to glass coverslips coated with poly-D-lysine. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde, 0.15 M sucrose, and 0.1% glutaraldehyde for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton for 10 min. Prior to antibody incubation, cells were treated with  $NH_4Cl$  for 30 min to minimize the number of reactive aldehyde groups and blocked for 30–60 min (room temperature) with 5% fetal bovine serum and 1% bovine serum albumin in washing buffer. Cells were then incubated with anti-porin 31 HL (20)(1:80) or rabbit anti-caveolin-1 (N20, Santa Cruz Biotechnology) for 2 h at room temperature. Unbound antibody

was removed by washing the cells three times with 1 ml of blocking solution for 10 min each time. Staining with FITC-labeled cholera toxin  $\beta$  subunit (CTX $\beta$ ) was performed under non-permeabilized conditions by incubating the cells with blocking solution for 30 min and then staining them with FITC-CTX $\beta$  for 30 min at room temperature. Subsequently, cells were washed, fixed, and permeabilized as described above. Following several washes in blocking solution, cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500) and/or goat anti-mouse IgG coupled to the fluorochrome Cy3 (1:2,000) for 1 h at room temperature. Prior to incubation, the secondary antibody was centrifuged at  $13,000 \times g$  for 15 min at 4 °C to pellet any precipitated constituents. Negative controls were performed in which the cells were solely incubated with the secondary antibody. Digital images were taken with a Leica TCS SP confocal microscope and analyzed with Leica confocal software (Heidelberg, Germany).

**Antisense Oligonucleotides**—Cells were seeded in 24-well dishes (NUNC) at a concentration of  $10^4$  cells/well 2 days before transfection. On reaching 60% confluency, the cells were exposed to an antisense oligonucleotide hybridizing to the pl-VDAC specific leader sequence (5'-CAC GAG AAA GAA TGA ACA C-3') and then plated onto poly-D-lysine-coated coverslips.  $\beta$ -Globin antisense oligonucleotide (5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3') was used as the negative control. Immediately before transfection, cells were washed and placed in 200  $\mu$ l of fresh serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium. Each well received 200 ng of antisense pl-VDAC plus 100 ng of pEGFP plasmid (Clontech) diluted into 25  $\mu$ l of serum-free DMEM. Cells were transfected by a LipofectAMINE Plus (Invitrogen) procedure following

**FIG. 3. pl-VDAC antisense treatment of C1300 cells.** *A*, confocal VDAC immunofluorescence images of C1300 cells treated with antisense oligonucleotides against pl-VDAC. *B*, EGFP fluorescence signal in the same cells as in *A*. *C*, transmitted light image of the cells. *D*, VDAC immunofluorescence analysis of C1300 cells transiently transfected with  $\beta$ -globin antisense oligonucleotides. *E*, EGFP fluorescence signal in the same cells as in *D*. *F*, transmitted light image of the cells. *G*, bar chart plot of VDAC immunofluorescence intensity versus EGFP signal intensity in C1300 cells transfected with pl-VDAC antisense.



the manufacturer's instructions. Each transfection experiment was carried out in triplicate, and the cells were used for both patch-clamp and immunofluorescence experiments.

**RNA Extraction and RT-PCR**—RNA extraction and RT-PCR were performed as described previously (19). In brief, RNA was isolated from C1300 cells using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed to cDNA. We used the following primer pair for PCR amplification of pl-VDAC (16): forward, 5'-TGT GTT CAT TCT TTC TCG TGC-3', and reverse, 5'-CCA GTG TTC GGC GAG AAT GAC-3'. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel containing a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

**Electrophysiology and Statistics**—C1300-transfected cells were plated on 13-mm poly-D-lysine-coated glass coverslips and mounted on the stage of an inverted Olympus IX70 microscope. Ion currents were recorded 48–72 h after transfection using the inside-out or whole-cell patch clamp modes as described previously (8). The pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA) was used for pulse generation, data acquisition through an Axon Digidata A/D interface, and subsequent analysis. Borosilicate glass patch pipettes had 3–5 megaohms resistance and were filled with a solution containing 140 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride, 1.2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, and 10 mM HEPES (295 mosmol/liter, pH 7.3). ATP (4 mM) and GTP (0.1 mM) were added to the pipette solution for whole-cell experiments. Cells were bathed in a solution containing 140 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride, 1.3 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES (305 mosmol/liter, pH 7.4), which was also the solution bathing the cytoplasmic face of the patch membrane in inside-out experiments. Data were collected using a List Medical d-6100 Darmstadt or Axopatch 200A amplifier. Inside-out currents were acquired at 1 kHz and low pass-filtered at 1 kHz. Membrane patches were clamped at 0 mV and pulsed for 5 s to both  $-80$  mV and  $+80$  mV. Whole-cell currents were acquired at 5 kHz and low pass-filtered at 1 kHz. Cells were clamped at 0 mV and pulsed for 500 ms from  $-80$  to  $+80$  mV in 40-mV steps before and after addition of toremifene (10  $\mu$ M) to the bath solution. All experiments were performed at room temperature (22–26 °C). Data are expressed as means  $\pm$  S.E. Differences between the three different groups were compared by one-way analysis of variance followed by the Bonferroni post-test for multiple comparisons. Data are taken as significant at a probability of 0.05.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The presence of VDAC protein on C1300 cells was tested by Western blot (Fig. 1). The monoclonal anti-VDAC antibody used (anti-31HL, in particular Ab-2) was raised against an N-terminal synthetic peptide (21). Fig. 1A shows a Western

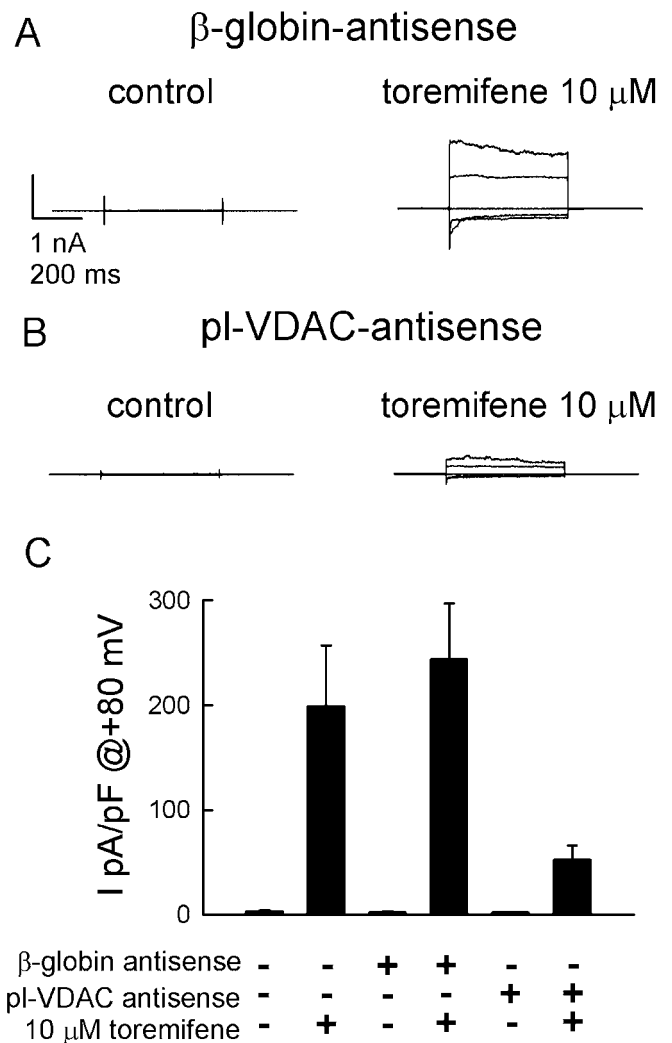
blot obtained from a membrane fraction or whole lysate of C1300 cells. A single band of  $\sim 32$  kDa, which is the expected size for VDAC, was obtained from both preparations, indicating the absence of cross-reactivity with other cellular proteins. Contamination of the membrane fraction with organelle membranes was tested with antibodies against the cytochrome oxidase IV (a mitochondrial marker) or ribophorin I (endoplasmic reticulum marker). Fig. 1B shows that our membrane preparation is negative for the mitochondrial marker but positive for the marker of the endoplasmic reticulum, an organelle where the presence of VDAC has already been reported (22).

The experiments shown in Fig. 1, A and B, are consistent with the targeting of VDAC through two different pathways: the plasma membrane (via the endoplasmic reticulum/golgi pathway) and the mitochondria. The lack of a mechanism to explain how this protein is selected for its targeting to the plasma membrane, instead of the outer mitochondrial membrane, has fuelled the reticence to accept its extramitochondrial localization (15). However, the recent identification of an alternative exon in the murine *vdac-1* gene evidenced a plasmalemmal form of VDAC (pl-VDAC) with an N-terminal leader sequence for its targeting to the plasma membrane (16). The presence of a pl-VDAC form in C1300 cells was confirmed by RT-PCR using primers specific to the pl-VDAC, including the leader sequence (Fig. 1C). A band of the expected size (350 bp) was identified and confirmed to be pl-VDAC by sequencing.

Another piece of evidence suggesting the presence of VDAC in the plasma membrane has been its isolation from liquid-ordered membrane microdomains called lipid rafts and functional reconstitution in artificial bilayers (17). To test whether VDAC was also present in such specialized membrane microdomains in C1300 cells, we carried out colocalization experiments using confocal microscopy. Two markers for lipid raft microdomains were used: the  $\beta_1$  subunit of cholera toxin, which binds to  $GM_1$  ganglioside, with which lipid rafts are enriched, and caveolin-1, a protein present in more structured lipid rafts with flask-shaped membrane invaginations termed caveolae (23, 24). Fig. 2 shows confocal images of C1300 cells probed with anti-VDAC antibody (Fig. 2, A and D, in red) and shows anti-caveolin 1 antibody (Fig. 2B, in green) or cholera toxin  $\beta_1$

subunit (CTX- $\beta_1$ ) conjugated to FITC (Fig. 2E, in green). Merged images (Fig. 2, C and F) show an almost complete overlap of CTX- $\beta_1$  and VDAC at the plasma membrane level, whereas no clear VDAC overlapping was observed with caveolin-1. These results reinforced previous observations suggesting the presence of VDAC at the plasma membrane, and similar to other cell types (17), VDAC in C1300 cells segregates to GM<sub>1</sub>-containing lipid rafts. Caveolin-1 has been detected in cells from neuronal origin such as pheochromocytoma PC12 cells (25), although its localization varies with the degree of cell differentiation, mainly appearing in the soma of undifferentiated PC12 cells, similar to the pattern observed in our study with C1300 neuroblastoma cells. The apparent lack of colocalization of VDAC with caveolin-1 in C1300 cells might be related to the undifferentiated state of the cells and, therefore, the low presence of the caveolin-1 at the plasma membrane. However, experiments using differentiated C1300 cells, confirmed by the appearance of well developed neurites, did not modify the localization pattern of either caveolin-1 or VDAC.<sup>2</sup> Further immunolocalization experiments using antibodies against other caveolin proteins expressed in neuronal cells will be necessary to elucidate the presence of VDAC in caveolae of C1300 cells.

The large conductance chloride channel, Maxi Cl<sup>-</sup> channel, has been recorded under both cell-attached and whole-cell patch clamp conditions from C1300 cells exposed to triphenylethylene antiestrogens such as tamoxifene and toremifene (8). The activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels appears to involve the interaction of antiestrogens with an external plasma membrane binding site and the generation of intracellular signals (8). The plasma membrane Maxi Cl<sup>-</sup> channel shares many of the electrophysiological and pharmacological characteristics of the mitochondrial VDAC (11), implying that VDAC might be the molecular correlate of Maxi Cl<sup>-</sup> channels (13). This hypothesis received additional experimental support from excised-patch recording studies of Maxi Cl<sup>-</sup> channels from cells expressing heterologous VDAC protein (16, 26) and their functional inhibition with VDAC antibodies (26). However, these approaches can be criticized based on the fact that control cells used for transfection already express the channel of interest and, secondly, the absence of a correlation between immunodetection of VDAC protein and Maxi Cl<sup>-</sup> channel activity in VDAC-transfected cells. Therefore, we set out to investigate whether endogenous pl-VDAC might underlie the antiestrogen-activated Maxi Cl<sup>-</sup> current in C1300 cells. For that purpose, we transfected C1300 cells with antisense oligonucleotides against the 5' end of the murine *vdac-1* gene. The oligonucleotide hybridized with the leader sequence required for targeting VDAC to the plasma membrane (16). The control antisense oligonucleotide was directed against an unrelated protein,  $\beta$ -globin. The use of an EGFP-expressing plasmid served as a reporter gene for the identification of transfected cells. Fig. 3 shows images of cells transfected with pl-VDAC antisense/EGFP (Fig. 3, A–C) or  $\beta$ -globin antisense/EGFP (Fig. 3, D–F). VDAC levels in transfected cells were determined by immunofluorescence confocal microscopy with the anti-VDAC antibody (Fig. 3, A and D) and the efficiency of the transfection by the production of EGFP protein (shown as the fluorescence signal in Fig. 3, B and E). From the images shown in Fig. 3 and the graph presented in Fig. 3G, a clear inverse correlation can be seen between the EGFP and VDAC signals in those cells transfected with pl-VDAC antisense and EGFP but not in those cells transfected with  $\beta$ -globin antisense/EGFP. Once we demonstrated that the pl-VDAC antisense oligonucleotide



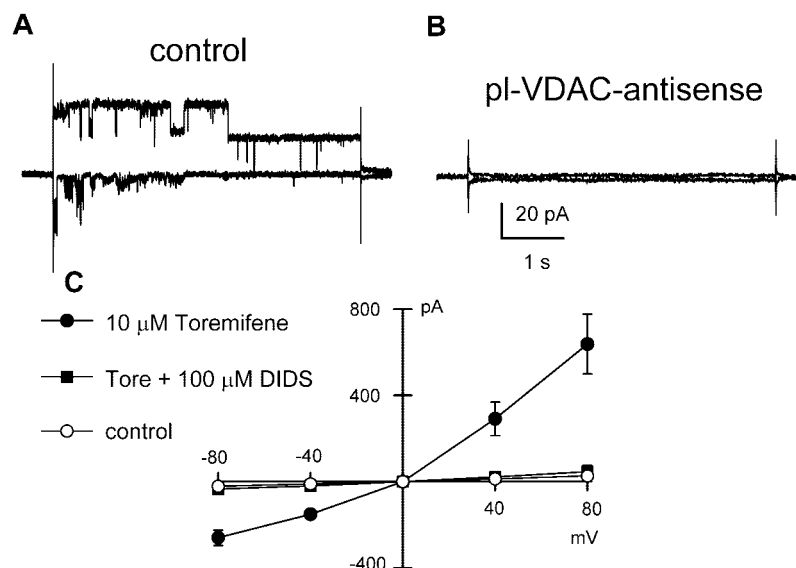
**FIG. 4. pl-VDAC antisense inhibition of toremifene-activated Maxi Cl<sup>-</sup> currents.** A, whole-cell Cl<sup>-</sup> currents recorded from a C1300 cell (8 picofarads) transfected with  $\beta$ -globin antisense/EGFP-expressing plasmid before and 5 min after the addition of 10  $\mu$ M toremifene to the bathing solution. B, whole-cell Cl<sup>-</sup> currents recorded from a C1300 cell (9 picofarads) transfected with pl-VDAC antisense/EGFP-expressing plasmid before and 5 min after the addition of 10  $\mu$ M toremifene to the bathing solution. The cells selected for measurement of ion currents were those showing the highest EGFP signal. C, summary of Maxi-Cl<sup>-</sup> peak current densities obtained at +80 mV under the conditions shown. Data are presented as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 7-11$ ).  $p > 0.05$  for untransfected versus  $\beta$ -globin antisense-transfected cells,  $p = 0.02$  for untransfected versus pl-VDAC antisense-transfected cells, and  $p = 0.01$  for  $\beta$ -globin antisense-transfected versus pl-VDAC antisense-transfected cells.

reduced VDAC levels, we proceeded to analyze the activity of Maxi Cl<sup>-</sup> channels.

Whole-cell Maxi Cl<sup>-</sup> currents were recorded under control conditions and following the addition of 10  $\mu$ M toremifene to the bathing solution in cells transfected with either  $\beta$ -globin antisense (Fig. 4A) or pl-VDAC antisense oligonucleotides (Fig. 4B). Transfection with the latter greatly reduced the magnitude of the toremifene-activated Maxi Cl<sup>-</sup> currents, whereas transfection with  $\beta$ -globin antisense oligonucleotides did not modify the channel response. The mean Maxi Cl<sup>-</sup> channel activity recorded from untransfected,  $\beta$ -globin antisense-, and pl-VDAC antisense-transfected cells exposed to toremifene is shown in Fig. 4C. We also tested by Western blot and confocal microscopy that VDAC expression was not affected by the treatment of C1300 cells with antiestrogens (results not shown).

<sup>2</sup> M. I. Bahamonde, unpublished observations.

**FIG. 5. pl-VDAC antisense inhibition of excision-activated Maxi  $\text{Cl}^-$  channels.** Excised inside-out single-channel recordings obtained from a control cell (A) and a pl-VDAC antisense-treated cell (B). Traces were obtained at +80 mV and -80 mV, from a holding potential of 0 mV. C, current-voltage relationships of whole-cell Maxi  $\text{Cl}^-$  currents recorded from C1300 cells under control conditions ( $\circ$ ), in the presence of 10  $\mu\text{M}$  toremifene (tore,  $\bullet$ ), and following the superfusion of toremifene plus 100  $\mu\text{M}$  DIDS ( $\blacksquare$ ).



Maxi  $\text{Cl}^-$  channels can also be activated following the excision of the membrane patch containing the channel (1, 8). This stimulus was also used to evaluate the Maxi  $\text{Cl}^-$  channel activity in cells exposed to pl-VDAC antisense. Fig. 5 shows representative excised inside-out single channel recordings obtained from control cells (Fig. 4A) or pl-VDAC antisense-treated cells (Fig. 5B). In the control cells, typical Maxi  $\text{Cl}^-$  channel transitions of about 300 picosiemens were present. The voltage dependence was identical to the whole-cell currents described above with rapid inactivation at negative potentials. On the traces obtained from pl-VDAC antisense-treated cells, no such channel activity was observed. The probability of finding Maxi  $\text{Cl}^-$  channels in the excised patches should decrease with reduction in the amount of VDAC protein. Accordingly, Maxi  $\text{Cl}^-$  channel activity was detected in 100% (8/8) of patches obtained from control cells but also in 60% (10/16) of patches obtained from pl-VDAC-treated cells, without changes in the single channel conductance ( $280 \pm 15$  picosiemens in control cells,  $n = 8$ , and  $270 \pm 10$  picosiemens in pl-VDAC antisense-treated cells,  $n = 10$ ;  $p = 0.5$ ) or the open probability (results not shown). However, we acknowledge that these experiments are less representative than the whole-cell experiments described above, where the activity of all channels present in the plasma membrane was studied. Nevertheless, the Maxi  $\text{Cl}^-$  channel activity was reduced in pl-VDAC antisense-treated cells, regardless of the stimuli used (activation by toremifene or membrane excision). Mitochondrial VDAC is inhibited by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). Therefore, we carried out experiments to check whether the plasma membrane Maxi  $\text{Cl}^-$  channel was also inhibited by DIDS. Fig. 5C shows current-voltage relationships obtained from control cells treated with toremifene in the presence or absence of 100  $\mu\text{M}$  DIDS. Addition of DIDS completely abolished the toremifene-activated Maxi  $\text{Cl}^-$  currents of C1300 cells.

Voltage-dependent anion channels (VDAC), also known as porins, are integral membrane proteins that form a pore slightly more permeable to anions than cations and also permeable to small solutes. They have been identified in the mitochondrial outer membrane, where they provide a major pathway for the transport of metabolites, e.g. ATP (27) and cholesterol (28), among others. They have also been involved in the mitochondrial events leading to apoptosis (4, 5). Besides their mitochondrial location, several reports claim the presence of VDAC in the plasma membrane of different cell types (13, 14, 16, 17). In the present study, in addition to demonstrating the

association of VDAC with membrane lipid rafts of C1300 neuroblastoma cells, we have provided the first molecular evidence relating VDAC with plasma membrane Maxi  $\text{Cl}^-$  channels activated by antiestrogens. The identification of the molecular nature of the Maxi  $\text{Cl}^-$  channel will allow us to study whether its regulation by estrogen and antiestrogens presents a double pathway, involving the generation of intracellular signals and a direct interaction of the hormones with the channel protein, similar to the modulation of Maxi  $\text{K}^+$  channels by estrogens (29, 30).

*Acknowledgment*—We thank A. Currid for proofreading the manuscript.

#### REFERENCES

- Blatz, A. L., and Magleby, K. L. (1983) *Biophys. J.* **43**, 237–241
- Coulombe, A., and Carboeuf, E. (1992) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **422**, 143–150
- Schwiebert, E. M., Mills, J. W., and Stanton, B. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7081–7089
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999) *Nature* **399**, 483–487
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 237–250
- Hardy, S. P., and Valverde, M. A. (1994) *FASEB J.* **8**, 760–765
- Li, Z., Niwa, Y., Sakamoto, S., Chen, X., and Nakaya, Y. (2000) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**, 506–510
- Diaz, M., Bahamonde, M. I., Lock, H., Muñoz, F. J., Hardy, S. P., Posas, F., and Valverde, M. A. (2001) *J. Physiol. (Lond.)* **536**, 79–88
- Valverde, M. A., Hardy, S. P., and Diaz, M. (2002) *Steroids* **67**, 439–445
- McGill, J. M., Gettys, T. W., Basavappa, S., and Fitz, J. G. (1993) *J. Membr. Biol.* **133**, 253–261
- Colombini, M. (1994) *Curr. Top. Membr.* **42**, 73–101
- Thinnes, F. P. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 71–75
- Reymann, S., Florke, H., Heiden, M., Jakob, C., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Lalk, V. E., Pardowitz, I., and Thinnes, F. (1995) *Biochem. Mol. Med.* **54**, 75–87
- Bathori, G., Parolini, I., Szabo, I., Tombola, F., Messina, A., Oliva, M., Sargiacomo, M., De, P., V., and Zoratti, M. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 79–89
- Yu, W. H., and Forte, M. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 93–100
- Buettner, R., Papoutsoglou, G., Scemes, E., Spray, D. C., and Dermietzel, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3201–3206
- Bathori, G., Parolini, I., Tombola, F., Szabo, I., Messina, A., Oliva, M., De Pinto, V., Lisanti, M., Sargiacomo, M., and Zoratti, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29607–29612
- Graeser, D., and Neubig, R. R. (1992) in *Signal Transduction: A Practical Approach* (Milligan, G., ed) First Edition, pp. 23–35, IRL Press, Oxford
- Fernandez-Fernandez, J. M., Nobles, M., Currid, A., Vazquez, E., and Valverde, M. A. (2002) *Am. J. Physiol.* **283**, C1705–C1714
- Reymann, S., Kiafard, Z., Rohm, B., Strutz, N., Hesse, D., Kratzin, H. D., Zimmermann, B., Thinnes, F. P., and Hilschmann, N. (1999) *Anal. Biochem.* **274**, 289–295
- Babel, D., Walter, G., Gotz, H., Thinnes, F. P., Jurgens, L., König, U., and Hilschmann, N. (1991) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **372**, 1027–1034
- Lewis, T. M., Roberts, M. L., and Bretag, A. H. (1994) *Neurosci. Lett.* **181**, 83–86
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. (2002) *Trends Neurosci.* **25**, 412–417

24. Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001) *Cell* **106**, 403–411
25. Galbiati, F., Volonte, D., Gil, O., Zanazzi, G., Salzer, J. L., Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Engelman, J. A., Schlegel, A., Parenti, M., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10257–10262
26. Dermietzel, R., Hwang, T.-K., Buettner, R., Hofer, A., Dotzler, E., Kremer, M., Deutzman, R., Thinnes, F. P., Fishman, G. I., Spray, D. C., and Siemen, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 499–503
27. Rostovtseva, T., and Colombini, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28006–28008
28. Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A. S., Reversa, J. L., Bernassau, J. M., and Drieu, K. (1997) *Steroids* **62**, 21–28
29. White, R. E., Darkow, D. J., and Lang, J. L. (1995) *Circ. Res.* **77**, 936–942
30. Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C., and Latorre, R. (1999) *Science* **285**, 1929–1931

Maria I. Bahamonde · Miguel A. Valverde

## Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria

Published online: 16 April 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** Activity of the antioestrogen-activated maxi-Cl<sup>-</sup> channel has been recorded in different cell types, including fibroblasts, vascular smooth muscle, endothelial and neuroblastoma cells. Its electrophysiological properties resemble those of the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane, a channel of particular relevance to the physiology and pathophysiology of mitochondria. The hypothesis that VDAC could be the molecular correlate of the plasma membrane maxi-Cl<sup>-</sup> channel has been debated over the last few years, with the lack of clear evidence for the presence of VDAC in the plasma membrane constituting the main argument of the detractors. In the present study, we investigated the cellular localisation of VDAC in NIH3T3 fibroblasts. The presence of a plasma membrane VDAC was demonstrated by immunoblotting of membrane fractions with monoclonal antibodies against the VDAC and by RT-PCR using primers that hybridise to a VDAC sequence coding for a N-terminal leader peptide required for its plasma membrane sorting. In addition, confocal microscopy studies showed the colocalisation of VDAC with caveolin-1. As expected, VDAC also localised to mitochondria. Colocalisation studies with TOM-20, a protein also present in the outer mitochondrial membrane, showed that VDAC proteins localised only to peripheral and not to perinuclear mitochondria.

**Keywords** VDAC · Maxi-Cl<sup>-</sup> channel · Lipid rafts · Caveolin · Antioestrogen · Mitochondria · Fibroblasts · Neuroblastoma

### Introduction

Voltage-dependent anion channels (VDACs), also known as porins, are integral membrane proteins which form a pore slightly more permeable to anions than cations, and are also permeable to small solutes [1]. They have been identified in the mitochondrial outer membrane where they provide a major pathway for the transport of metabolites, e.g. ATP [2] and cholesterol [3], among others. They are also involved in the mitochondrial events leading to apoptosis [4, 5]. Besides their mitochondrial location, several reports claim the presence of VDAC in the plasma membrane of different cell types [6, 7, 8, 9]. The fact that its electrophysiological properties [1] resemble those of the plasma membrane maxi-Cl<sup>-</sup> channel [10, 11, 12] has encouraged some investigators to assume that the two channels were one and the same protein [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. This hypothesis was based on early observations suggesting the presence of VDAC protein on the plasma membrane [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13] but has been questioned by others [14]. The extra-mitochondrial location of VDAC has recently received strong support from two independent reports: the identification of a VDAC isoform (pl-VDAC) that contains a leader sequence for its trafficking to the plasma membrane [9] and the presence of VDAC in caveolae [8].

In the present study, in addition to demonstrating the plasma membrane location of VDAC and its association with caveolae in NIH3T3 fibroblasts, we provide the first evidence suggesting its preferential localisation to a peripheral pool of mitochondria.

### Materials and methods

#### Cell culture

NIH3T3 mouse fibroblasts permanently transfected with the *MDR1* gene were cultured as previously described [11]. When confluent, cells were either subcultured into T-75 flasks (Nunc) and used either for immunoblotting or plated on to treated glass cover-slips for immunofluorescence experiments.

M. I. Bahamonde · M. A. Valverde (✉)  
Unitat de Senyalització Cel·lular,  
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,  
Universitat Pompeu Fabra, C/Dr. Aiguader 80,  
08003 Barcelona, Spain  
e-mail: miguel.valverde@cexs.upf.es  
Fax: +34-93-5422802

## Immunoblotting

Plasma membrane proteins and cell lysate were prepared using a previously described protocol [15, 16]. Proteins were resolved by SDS-PAGE (12%) and blotted onto nitrocellulose. The primary antibody used was the monoclonal mouse anti-porin 31 HL (VDAC1) (Ab-2 antibody, Calbiochem; 1:2,000 dilution). Non-specific binding was avoided by incubating the nitrocellulose membranes in a blocking solution consisting of TTBS buffer (100 mM TRIS-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) supplemented with 5% non-fat milk for 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The mouse antibody was detected with alkaline-phosphatase-conjugated antibody (goat anti-mouse IgG, 1:500; Calbiochem). The membranes were then washed and the bands visualised using nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluene salt solution for detection of alkaline phosphatase.

## Confocal microscopy

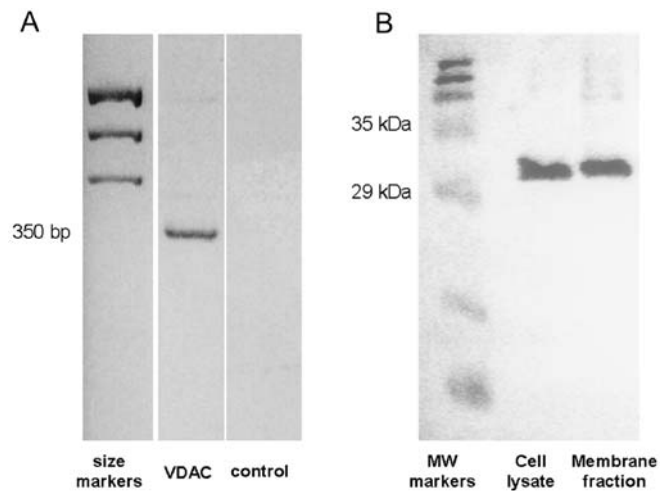
Double-label analysis was carried out on NIH3T3 cells adhered to 12 mm glass cover-slips coated with poly-D-lysine (10 µg/ml for 1 h). Cells were fixed in 2% paraformaldehyde, 0.15 M sucrose and 0.1% glutaraldehyde for 10 min and were permeabilised by incubation with 0.1% Triton X-100 for 10 min. The Triton treatment was omitted in the case of non-permeabilised cells. Prior to antibody incubation, cells were treated with NH<sub>4</sub>Cl for 30 min to minimise the number of reactive aldehyde groups and blocked for 30 min (room temperature) with 5% fetal bovine serum and 1% BSA in washing buffer. Cells were then incubated with anti-porin 31 HL (1:80), rabbit anti-caveolin-1 (N20, Santa Cruz Biotechnology; 1:1,000) or rabbit anti-Tom20 (FL-145, Santa Cruz Biotechnology; 1:100) for 2 h at room temperature. Unbound antibody was removed by washing the cells 3 times with 1 ml of blocking solution for 10 min each time. Following several washes in blocking solution, cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes; 1:500) and goat anti-mouse IgG coupled to the fluorochrome Cy3 (Amersham; 1:1,000) or sheep anti-mouse Texas Red (Amersham; 1:100), for 1 h at room temperature. Prior to incubation, the secondary antibody was centrifuged at 13,000 g for 15 min at 4 °C in order to pellet any precipitated constituents. Negative controls were performed in which the cells were solely incubated with the secondary antibody. Digital images were taken with a Leica TCS SP confocal microscope and analysed with Leica confocal software (Heidelberg, Germany).

## RNA extraction and RT-PCR

RNA extraction and RT-PCR were performed as described previously [16]. In brief, RNA was isolated from C1300 cells using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed to cDNA. We used the following primer pair for PCR amplification of pl-VDAC [9]: forward 5'-TGTGTTTCATTC-TTCTCTCGTGC-3' and reverse 5'-CCAGTGTTCGGCAGAAATGAC-3'. PCR products were analysed on a 2% agarose gel containing a final concentration of 0.5 µg/ml ethidium bromide.

## Results and discussion

The recent identification of an alternative exon in the murine VDAC-1 gene provided evidence of a plasma-membral form of VDAC (pl-VDAC) with an N-terminal leader sequence for its targeting to the plasma membrane [9]. The presence of a pl-VDAC form in NIH3T3 fibroblasts was confirmed by RT-PCR using primers specific to the pl-VDAC, including the leader sequence

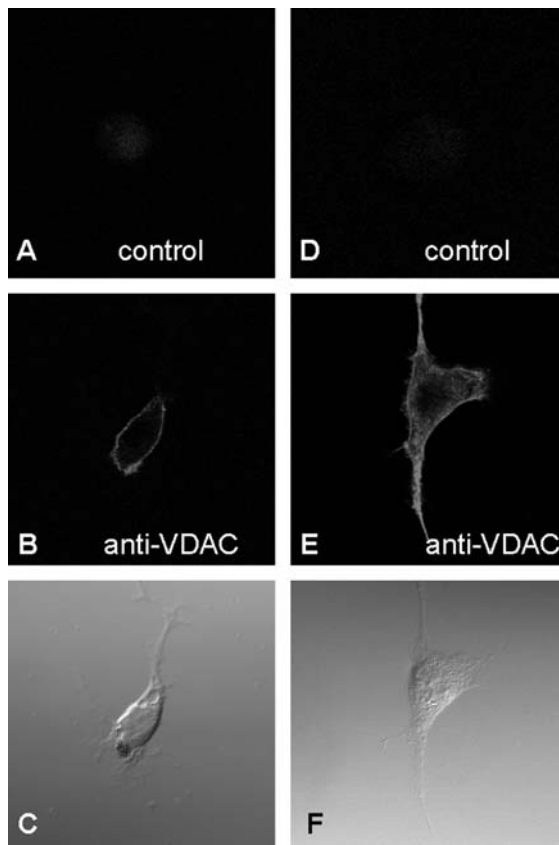


**Fig. 1A, B** Voltage-dependent anion channel (VDAC) detection in NIH3T3 cells. **A** Aliquots (10 µg) of plasma membrane proteins or total protein lysate from NIH3T3 fibroblasts were used to detect VDAC by Western blot analysis. **B** RT-PCR analysis of pl-VDAC, which recognises a band of 350 bp that includes the leader sequence. For the negative control the cDNA was omitted from the reaction. Western blot and RT-PCR data are representative of at least 4–10 different experiments

(Fig. 1A). A band of the expected size (350 bp) was identified and confirmed to be pl-VDAC by sequencing. The presence of VDAC protein on NIH3T3 cells was tested by Western blot (Fig. 1B). The monoclonal anti-VDAC antibody used (anti-31HL, in particular Ab-2), was raised against an N-terminal synthetic peptide [17]. Figure 1B shows a Western blot obtained from a membrane fraction or whole lysate of NIH3T3 cells. A single band of ~32 kDa, which is the expected size for VDAC, was obtained from both preparations, indicating the absence of cross-reactivity with other cellular proteins. Immunolocalisation of VDAC to the plasma membrane was confirmed by confocal microscopy (Fig. 2). Non-permeabilised NIH3T3 cells (Fig. 2B) show membrane delimited staining, consistent with antibody recognition of the external N-terminal globular  $\alpha$ -helix of the VDAC protein [18]. Permeabilisation of NIH3T3 cells (Fig. 2E) resulted in staining of the cytosol, most likely reflecting its organelle localisation, and a reinforcement of the membrane signal.

Another piece of evidence suggesting the presence of VDAC in the plasma membrane has been its isolation from liquid-ordered membrane microdomains called lipid rafts and its functional reconstitution in artificial bilayers [8]. To establish whether VDAC was also present in such specialised membrane microdomains in NIH3T3 cells, we carried out colocalisation experiments using confocal microscopy. An antibody against caveolin-1, a protein present in structured lipid rafts with flask-shaped membrane invaginations termed caveolae [19, 20], was used. Figure 3 shows confocal images of NIH3T3 cells probed with anti-VDAC antibody in red (Fig. 3A), and anti-caveolin-1 antibody in green (Fig. 3B). The merged image

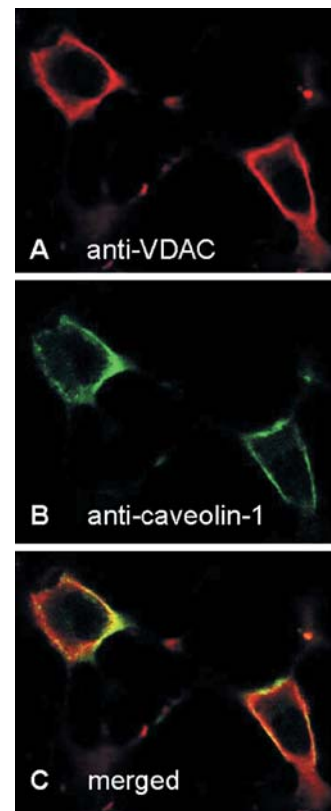




**Fig. 2A–F** Confocal microscopy imaging of VDAC. Non-permeabilised (**A**, **B** and **C**) and permeabilised (**D**, **E** and **F**) NIH3T3 cells immunostained with anti-porin 31 HL (VDAC) antibody and Cy3-coupled secondary antibody (*red*). Controls (**A** and **D**) were obtained by incubation solely with the secondary antibody. **C**, **F** Transmitted light images of the cells. They are representative of at least three different immunolocalisations

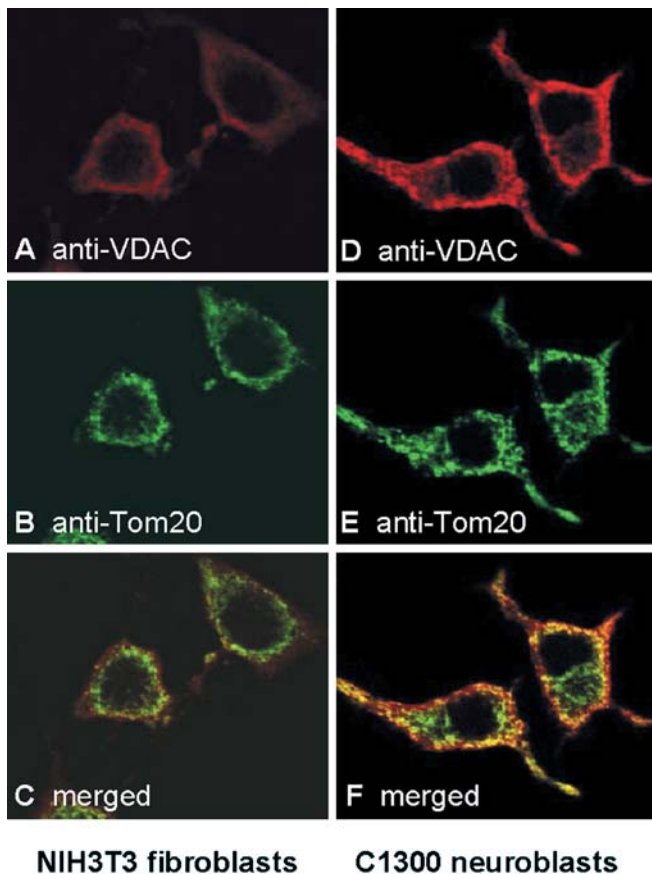
(Fig. 3C) shows a marked overlapping of caveolin-1 and VDAC at the plasma membrane level. These results reinforced previous observations suggesting the presence of VDAC at the plasma membrane and, similar to other cell types [8], VDAC in NIH3T3 fibroblasts also segregates to the caveolin-1-containing lipid rafts.

As mentioned above, eukaryotic VDAC was first discovered in the outer membrane of mitochondria [1] where it forms part of the mitochondrial permeability transition pore (reviewed in [21]). Mitochondria have always been seen as a homogeneous population of organelles, the main task of which is the production of the cell's energy [21]. Over the last few years, this view has changed tremendously. Mitochondria contribute to the shaping and regulation of  $Ca^{2+}$  signals [22] and mitochondrial dysfunction leads to different forms of cell death [21]. Moreover, it seems that, at least in certain cell types, different pools of mitochondria exist [23]. Therefore, we evaluated whether VDAC was uniformly expressed in NIH3T3 mitochondria (Fig. 4). As a marker of mitochondria we used an anti-Tom20 antibody. Tom20 is an outer mitochondrial membrane protein that forms



**Fig. 3A–C** Localisation of VDAC and caveolin-1-containing lipid rafts in NIH3T3 cells. **A** Permeabilised NIH3T3 cells immunostained with anti-porin 31 HL (VDAC) antibody and Cy3-coupled secondary antibody (*red*). **B** Immunostaining with anti-caveolin-1 antibody and Alexa Fluor 488 secondary antibody (*green*). **C** Merged image of **A** and **B** showing extensive colocalisation of caveolin-1 and VDAC (*yellow*). Images were obtained by confocal laser scanning microscopy and are representative of at least 10 different immunolocalisations

part of the translocation machinery involved in the recognition and translocation of proteins targeted to the mitochondria. Tom20 has also been proposed as the receptor protein responsible for the insertion of VDAC in the outer membrane of the mitochondria [24]. Overlapping of images obtained with anti-VDAC and anti-Tom20 antibodies (Fig. 4C) revealed a perinuclear pool of mitochondria positive for Tom20 (green) and a peripheral pool of mitochondria where VDAC and Tom20 colocalised (yellow), surrounded by the red signal provided by the membrane localisation of VDAC. Such differential localisation of mitochondrial VDAC has not been reported before. We established whether this pattern is unique for the NIH3T3 fibroblasts or reflects a more general pattern. The same colocalisation studies were repeated in another cell line, the C1300 neuroblastoma cell line, that also expresses maxi- $Cl^-$  channel activity in the plasma membrane [25]. Figure 4F shows an even more vivid tricolour pattern: green (perinuclear mitochondria stained with Tom20 antibody), yellow (colocalisation of Tom20 and VDAC in peripheral mitochondria) and red (membrane localisation of VDAC). The existence of different



**Fig. 4A–F** Localisation of VDAC and Tom20 in NIH3T3 and C1300 mitochondria. Detection of VDAC and Tom20 in NIH3T3 cells (**A** and **B**, respectively) and C1300 cells (**D** and **E**, respectively). **C**, **F** Merged images. Images were obtained by confocal laser scanning microscopy and are representative of at least four different immunolocalisations

functional pools of mitochondria has been identified in chromaffin [22] and pancreatic acinar cells [23]. Based on the differential expression of Tom20 and VDAC proteins we now demonstrate that in NIH3T3 fibroblasts and C1300 neuroblastoma cells, at least two pools of mitochondria are present.

VDAC appears to be involved in both apoptotic release of cytochrome *c* [5] and  $Ca^{2+}$  signalling [26]. The relevance of this observation is still far from clear. While there is no evidence suggesting the involvement of a specific pool of mitochondria in the events leading to apoptotic cell death, there are several studies reporting the presence of a peripheral “ring” of mitochondria which would protect the inner environment from massive increases in  $Ca^{2+}$  [22, 23]. It would be interesting to evaluate the precise part played by the two pools of mitochondria in apoptotic cell death and to establish whether there is any link between the plasma membrane VDAC and mitochondrial VDAC in the events leading to cell apoptosis.

**Acknowledgements** This work was supported by the Human Frontiers Science Program, Spanish Ministry of Science and Technology, Fondo de Investigaciones Sanitarias and Distinció de la Generalitat de Catalunya per a la Promoció de la Recerca Universitària. We thank E. Vazquez and J.M. Fernández-Fernández for critical discussion and A. Currid for proof reading the manuscript.

## References

- Colombini M (1994) Anion channels in the mitochondrial outer membrane. In Guggino WR (ed.) Chloride channels. Academic Press, San Diego, pp. 73–101
- Rostovtseva T, Colombini M (1996) ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 271:28006–28008
- Papadopoulos V et al. (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62:21–28
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483–487
- Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 152:237–250
- Reymann S, et al. (1995) Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem Mol Med* 54:75–87
- Bathori G, et al. (2000) Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr* 32:79–89
- Bathori G, et al. (1999) Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 274:29607–29612
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3201–3206
- Blatz AL, Magleby KL (1983) Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys J* 43:237–241
- Hardy SP, Valverde MA (1994) Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB J* 8:760–765
- Valverde MA, Hardy SP, Diaz M (2002) Activation of Maxi  $Cl^-$  channels by antiestrogens and phenothiazines in NIH3T3 fibroblasts. *Steroids* 67:439–445
- Thinnes FP (1992) Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eukaryotic cells. *J Bioenerg Biomembr* 24:71–75
- Yu WH, Forte M (1996) Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? *J Bioenerg Biomembr* 28:93–100
- Graeser D, Neubig RR (1992) In Milligan G (ed.) Signal transduction: a practical approach, IRL Press, Oxford, pp 1–29
- Fernandez-Fernandez JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E, Valverde MA (2002) Maxi  $K^+$  channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol* 283:C1705–C1714
- Babel D et al. (1991) Studies on human porin. VI. Production and characterization of eight monoclonal mouse antibodies against the human VDAC “Porin 31HL” and their application for histotopological studies in human skeletal muscle. *Biol Chem Hoppe Seyler* 372:1027–1034
- Casadio R, Jacoboni I, Messina A, De Pinto V (2002) A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* 520:1–7

19. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25:412–417
20. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106:403–411
21. Krieger C, Duchen MR (2002) Mitochondria,  $Ca^{2+}$  and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* 447:177–188
22. Villalobos C et al. (2002) Redistribution of  $Ca^{2+}$  among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16:343–353
23. Park MK, Ashby MC, Erdemli G, Petersen OH, Tepikin AV (2001) Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J* 20:1863–1874
24. Schleiff E, Silviu JR, Shore GC (1999) Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J Cell Biol* 145:973–978
25. Diaz M et al. (2001) Okadaic acid-sensitive activation of Maxi  $Cl^-$  channels by triphenylethylene antioestrogens in C1300 neuroblastoma cells. *J Physiol (Lond)* 536:79–88
26. Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89:1145–1153

## METODOLOGIA Y RESULTADOS ANEXOS 3

### 3.1. ENSAYO LUCIFERINA/LUCIFERASA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DEL ATP

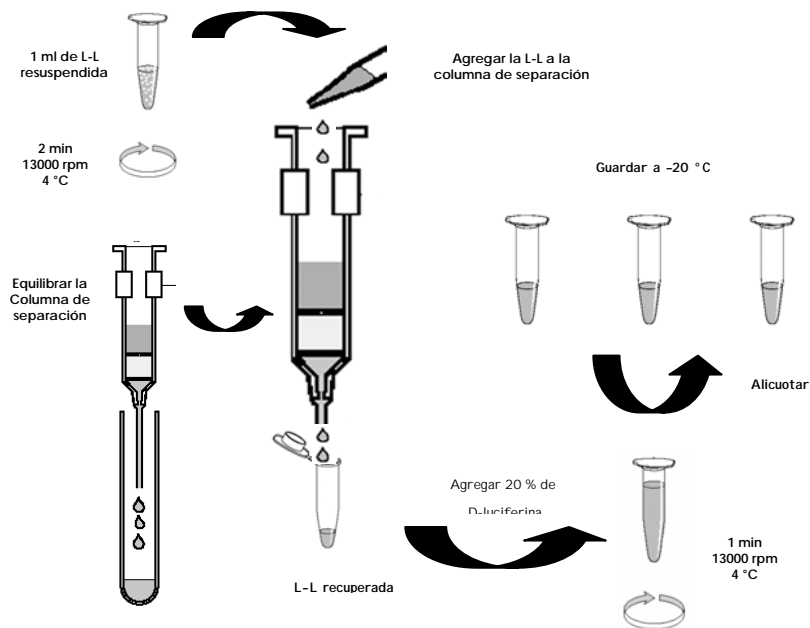
Dentro de los mecanismos generales por los cuales el ATP intracelular puede ser liberado al espacio extracelular, se encuentra la salida del ATP a través de proteínas transportadoras insertadas en la membrana plasmática de la célula. Uno de estos mecanismos de transporte son los canales aniónicos, que mediante determinados estímulos permiten el flujo de ATP (Rostovtseva y Colombini, 1997; Rostovtseva y Bezrukov, 1998; Bodas y cols., 2000; Hazama y cols., 2000; Sabirov y cols., 2001).

De las técnicas empleadas para la medición del flujo de ATP, las más utilizadas son los ensayos bioluminiscentes. Uno de los principales sistemas usados desde el punto de vista analítico, es el basado en la reacción luciferina-luciferasa, utilizándose la luciferasa de la luciérnaga, como la proteína bioluminiscente que es el sensor de ATP (Leach, 1981; Beigi y cols., 1999; García-Campaña y cols., 2001). En este sistema, la enzima hidrofóbica luciferasa cataliza, en presencia de oxígeno ( $O_2$ ) y de ATP, la oxidación de la luciferina, para transformarla en un producto excitado que emite luz. En el caso de la luciérnaga, la luciferina es un benzotiazol que reacciona enzimáticamente con ATP (en presencia de  $Mg^{+2}$ ) para dar un derivado luciferil-adenilato que es el que reacciona con el  $O_2$ , dando lugar a AMP y un compuesto cíclico que al liberar  $CO_2$ , se transforma en el producto emisor de luz (García-Campaña y cols., 2001). Este sistema de medición puede detectar concentraciones de ATP en el rango picomolar-micromolar. Este método, además puede ser utilizado

en experimentos tanto con células en suspensión como en células que forman una monocapa. En los cultivos en monocapa, después de haber expuesto las células a determinados estímulos, se valora el contenido de ATP de fracciones del medio celular midiendo la luz emitida al mezclarlas con la luciferasa (Beigi y cols., 1999).

### 3.1.1. Purificación de la luciferina/luciferasa

Un vial de extracto crudo de luciferasa (SIGMA) se diluye en 1 ml de tampón de trabajo: 140 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7.4 y 2 mM MgCl<sub>2</sub>. La suspensión resultante se centrifuga en un tubo eppendorf por 2 minutos a 13000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se traspara a un nuevo tubo que se mantiene a 4 °C, trasladando seguidamente el sobrenadante a una columna de separación por tamaño (10 ml, 10DG Bio-Rad), previamente equilibrada 3 veces con el mismo tampón de trabajo. Esto permite que se separen las impurezas (iones como arsénico y proteínas de menor tamaño) de la luciferasa (de tamaño grande) contenidas en el extracto original liofilizado y luego resuspendido. Una vez que la luciferasa es eluida, desde la columna de separación, se agrega 20% más de D-luciferina (concentración final de 1 mg/ml) (Sigma) y se vuelve a centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad y 4°C, para remover la D-luciferina no disuelta. Una vez obtenida la luciferina/luciferasa (L-L) final, se alícuota y se guarda a -20° C hasta el momento de ser utilizada (ver Fig. 10).



**Fig. 10-** Esquema resumen de los pasos a seguir en la purificación de la luciferina/luciferasa de un extracto crudo de luciérnaga.

### 3.1.2. Tratamiento de las células para observar la liberación del ATP estimulado por toremifeno.

Las células que se utilizaron para el ensayo L-L fueron las células NIH3T3 (fibroblastos de ratón, obtenidas desde *Imperial Cancer Research Fund Laboratories*) y las células Hela (línea celular deriva de un tumor del cuello del útero, donadas por el Dr. Francesc Posas). Las células Hela fueron utilizadas como un control negativo, ya que en experimentos electrofisiológicos no se registró actividad del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> al escindir el parche desde la membrana, ni en experimentos en la modalidad de célula entera, tras la exposición a toremifeno (datos no presentados en esta tesis). Estas células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (10 cm<sup>2</sup>, Corning) con el medio

*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma), suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal y 1% de penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml). Las células fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Al alcanzarse el 100% de confluencia, las células fueron lavadas 3 veces con la solución de trabajo utilizada en la medición de ATP y luego fueron tratadas con 50 µM de toremifeno (Farnos, Torqu, Finlandia). Se obtuvieron alícuotas de 100 µl, cada minuto, por un periodo de 20 minutos tras el tratamiento. Estas alícuotas fueron congeladas a -80 °C hasta el momento de ser utilizadas para la medición de ATP extracelular en el ensayo L-L. Los controles se refirieron a células sin el tratamiento con el antiestrógeno.

### 3.1.3. Medición del ATP liberado a través del Maxi-Cl

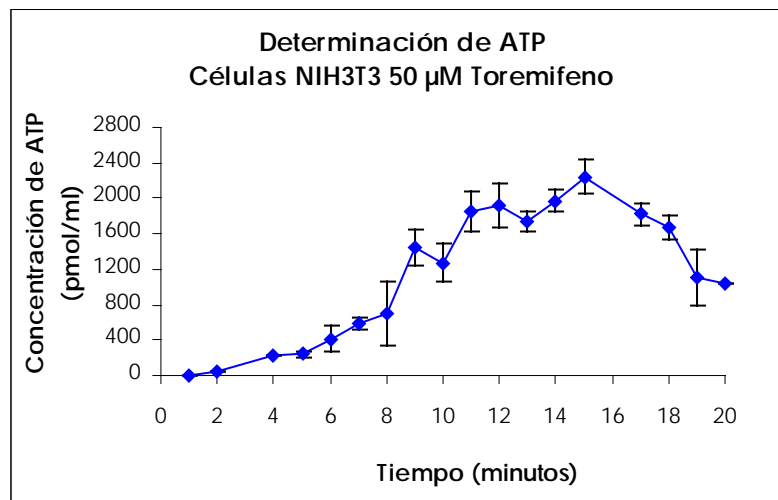
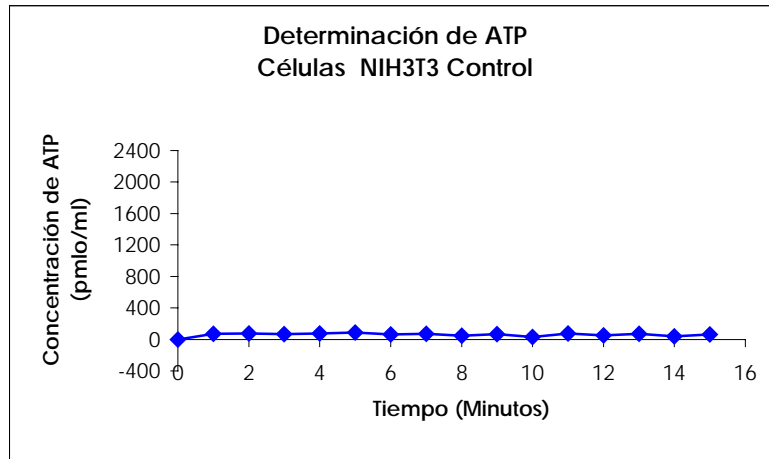
El ATP extracelular liberado desde las células NIH3T3 y Hela, fue medido con la reacción luminiscente L-L de la siguiente forma: en un tubo de ensayo con 400 µl de solución de trabajo se le agregaron 10µl de la solución L-L final, 2 pmoles y 4 pmoles de ATP subsecuentemente y la muestra a medir (mezcla de trabajo). En resumen, dos dosis conocidas de ATP se utilizaron en cada medición, para calcular la cantidad de ATP liberado desde las diferentes líneas celulares hacia el medio extracelular. La concentración de cada muestra se obtuvo mediante una extrapolación de las alturas de los picos obtenidos en cada medición a los diferentes minutos del tratamiento, en comparación con la obtención de una regresión lineal efectuada a partir de las alturas máximas de los picos de ATP ya conocidos.

Las mediciones de ATP de cada muestra se efectuaron en un tubo de ensayo introducido en una cámara oscura, donde la mezcla de trabajo está en constante agitación gracias a un magneto que se encuentra en el interior del tubo de ensayo. La

luz desde la reacción luminiscente se capturó mediante un fotomultiplicador (*R374, Hamamatsu Photonics, Iberia, Spain*), se amplificó en un amplificador operacional (*5A22N Tektronix*), se filtró con un filtro tipo *Bessel* a 1-6 Hz (*Frequency Devices 901*) y se digitalizó en un PC 486 mediante una tarjeta *Labmaster TL-1 (Axon Instruments, Foster City, CA)* comandada por el programa *AXOTAPE 1.2.01 (Axon Instruments)* (Reigada y cols., 2003). Los datos en forma ASCII fueron analizados y las alturas de las mediciones fueron calculadas a través del mismo programa *AXOTAPE 1.2.01*. Los datos fueron posteriormente procesados y graficados con el programa *Microsoft Excel 2000*.

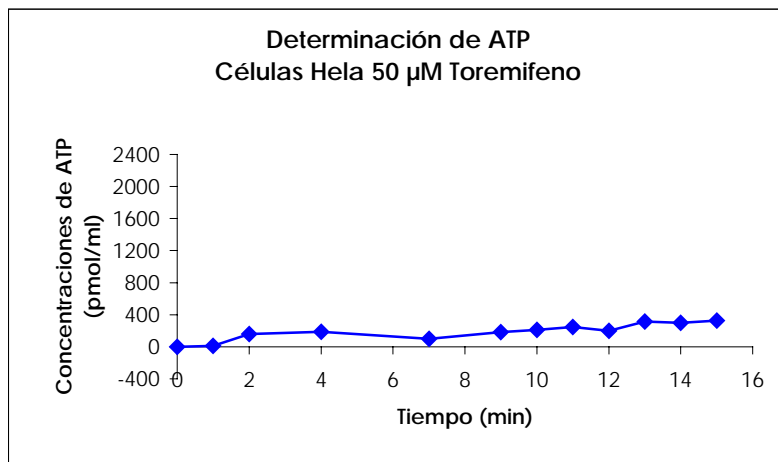
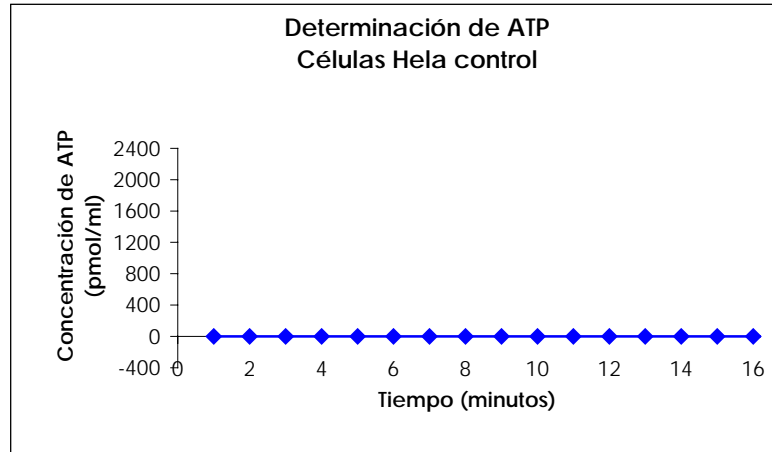
Los resultados obtenidos con este ensayo muestran claramente que sólo en las células *NIH3T3* se visualizó un aumento considerable de la salida del ATP al tratar las células con toremifeno (50  $\mu\text{M}$ ). Este aumento fue progresivo y se inició después de algunos minutos de tratamiento, lo que concuerda con el tiempo de activación del canal Maxi-Cl al exponer las células a un tratamiento con toremifeno. Al cabo de 15 minutos aproximadamente empezó a producirse un decrecimiento en el flujo de ATP, posiblemente debido a una disminución o agotamiento del ATP intracelular (ver gráfico 1). Por el contrario, el toremifeno no activó una salida de ATP significativa en las células *Hela* (ver Fig. 2).





**Gráfico 1-** Resultados de la medición del ATP promedio de cuatro experimentos, en las células NIH3T3 (de cada experimento se obtuvieron 20 muestras). El gráfico superior muestra las células controles sin el tratamiento con el antiestrógeno y el gráfico inferior muestra las células tratadas con 50 µM de toremifeno. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n=4).

El flujo de ATP en estos dos modelos celulares se trató de inhibir mediante un tratamiento previo de las células con diferentes bloqueadores de canales de cloruro, ya que no existen inhibidores específicos del Maxi-Cl<sup>-</sup>, y a diferentes concentraciones de los mismos (SITS, DIDS, Zn<sup>+2</sup>, NPPB). A pesar de que se observó una tendencia a disminuir la cantidad de ATP liberado en presencia de los bloqueadores, no se pudieron extrapolar los resultados ni obtener una conclusión clara, debido a que estos compuestos a las concentraciones utilizadas interfieren notablemente con la reacción luminiscente del ensayo luciferina/luciferasa.



**Grafico 2.-** Resultados de la medición de ATP promedio de tres experimentos, en las células Hela (de cada experimento se obtuvieron 20 muestras). El gráfico superior muestra las células controles sin el tratamiento con el antiestrógeno y el gráfico inferior muestra las células tratadas con 50 µM de toremifeno.

### 3.2. CLONACION DEL CANAL VDAC PLASMATICO

#### 3.2.1. Cultivos celulares

Para la clonación del VDAC1 plasmático se utilizaron las líneas celulares C1300 y NIH3T3 de ratón. Estas líneas fueron cultivadas de acuerdo a los protocolos previamente descritos en Díaz y cols. (2001) y en Hardy y Valverde (1994), respectivamente. Las células fueron subcultivadas en placas de 60 mm hasta alcanzar la confluencia adecuada (100%).

#### 3.2.2. Extracción del ARN, RT-PCR y purificación del ADN

El ARN fue aislado de los dos tipos celulares de acuerdo a las instrucciones del kit *Nucleospin RNA II* (Macherey-Nagel, Germany) (ver Fig. 11). Del total de ARN extraído, 500 ng se retrotranscribieron a ADN de la secuencia completa del VDAC plasmático, usando unos cebadores (*primers*) específicos del VDAC de membrana plasmática que lo distinguen del mitocondrial. Dicha retrotranscripción fue obtenida de acuerdo a las instrucciones establecidas en el kit *OneStep RT-PCR* (Qiagen), utilizando los cebadores (*primers*) sentido (*forward*): VDACpIFLfa 5' cct atg tgt tca ttc ttt ctc gtg 3' (SIGMA) y antisentido (*reverse*) VDACpIFLr2a 5' tca ttt atg ctt gaa att cca gtc c 3' (SIGMA) a una concentración final de 0.6  $\mu$ M cada uno. Estos cebadores fueron diseñados a partir la secuencia mitocondrial (VDACmt) con número de acceso NM-011694 de ratón (*GenBank*) y la secuencia del péptido líder del VDACpl de ratón publicada por Buettner en el año 2000 (Buettner y cols., 2000). La concentración final

de los dNTPs utilizados fue de 400  $\mu$ M para cada uno de ellos. Las condiciones de la RT-PCR fueron: una reacción de transcripción reversa de 30 min a 50 °C; una activación de la Taq polimerasa *HotStar* e inactivación de la transcriptasa reversa a 95 °C durante 15 min; 40 ciclos de desnaturalización por 1 min a 94 °C, hibridación por 1 min a 65 °C y extensión de 1 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C.

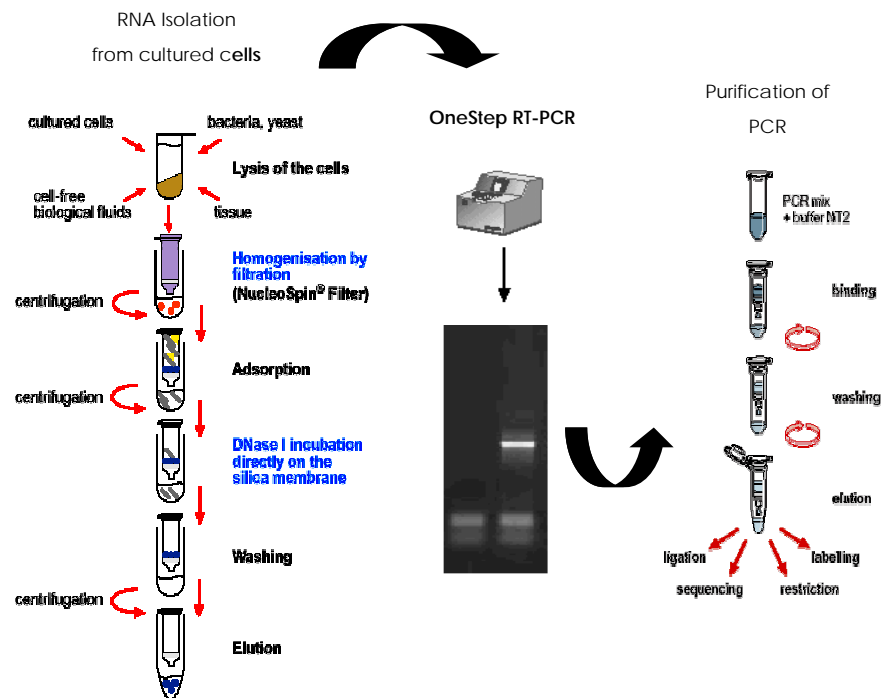
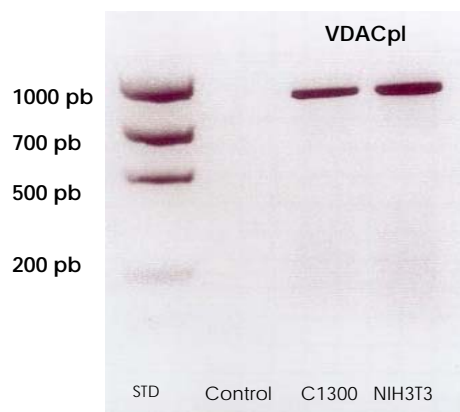


Fig. 11- Esquema que resume los primeros pasos a seguir en el proceso de clonación, describiendo la purificación del ARN, la retrotranscripción del mismo hacia el ADN del VDACpl y por último la purificación del producto de la RT-PCR.

El amplicón era de 898 pares de bases (pb) que se correspondían a los 298 aminoácidos del VDACpl y que equivalía al tamaño de la secuencia esperada. Esta única banda de aproximadamente 900 nt se obtuvo tanto de las células C1300 como de las NIH3T3, mientras que no aparecía en el control negativo (sin poner ARN en la

reacción) (ver Fig. 12). Tras la amplificación, se realizó una confirmación del amplicón mediante un análisis con enzimas de restricción.

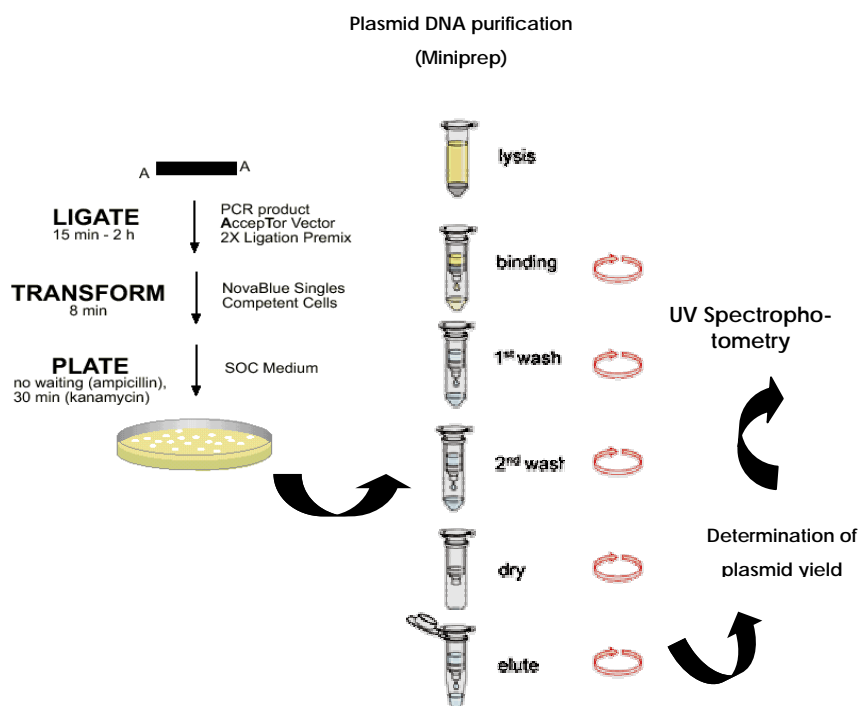


**Fig. 12-** Gel de agarosa al 1% donde es analizada la RT-PCR del VDACpl de las células C1300 y NIH3T3. Se reconoce una única banda de 898 pb que incluye la secuencia líder.

Una vez concluida la RT-PCR, el producto de PCR de cada tipo celular fue purificado con el kit *Nucleospin Extract* (Macherey-Nagel, Germany), utilizando el protocolo de purificación señalado en el mismo kit (ver Fig 11).

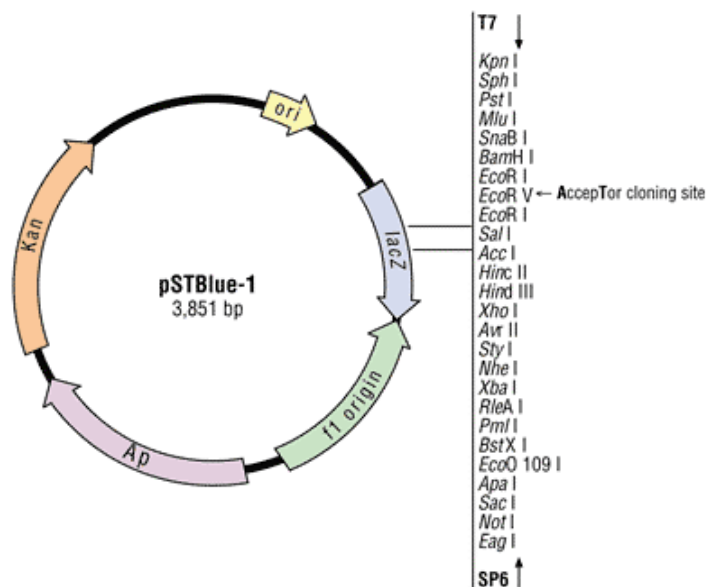
### 3.2.3. Ligación, transformación y siembra de las bacterias transformadas en placas de agar.

La ligación del ADN del VADCpl purificado de las células C1300 y NIH3T3 y la posterior transformación de células bacterianas competentes, se realizó mediante el kit de clonación *pSTBlue-1 Acceptor Vector Kits* (Novagen) (ver Fig. 13). Este kit proporciona el vector pSTBlue-1 que tiene una región para la clonación, dos promotores opuestos T7/SP6 y una resistencia dual a kanamicina y ampicilina (ver Fig. 14).



**Fig. 13-** Diagrama resumen de los pasos a seguir a partir de la ligación del ADN de las células C1300 y NIH3T3 con el vector pSTBlue-1 hasta la preparación de miniprep.

El protocolo se realizó de forma paralela para las dos líneas celulares en estudio y consistió en una reacción que contenía 50 ng del vector de clonación y 50 ng del ADN del VDAC1pl en un volumen final de 10  $\mu$ l. La ligación se incubó 2 horas a 16 °C.



**Fig. 14-** Diagrama que muestra el vector de clonación pSTBlue-1, con el sitio de clonación y los sitios de restricción del vector<sup>15</sup>

Seguidamente al paso de ligación, se transformaron 25  $\mu$ l de las células bacterianas competentes *NovaBlue Singles Competent Cells* (proporcionadas también por el kit de clonación) con 1  $\mu$ l del ADN ligado. Tras 5 min de incubación a 4 °C con el ADN ligado, las células competentes se incubaron consecutivamente 30 segundos a 42 °C y 2 min a 4 °C, agregándoles finalmente 125  $\mu$ l de medio S.O.C. (medio de cultivo bacteriano enriquecido en glucosa, Invitrogen) e incubándolas nuevamente por 1 hora a 37 °C.

Finalizada la transformación de las células competentes, esta mezcla de transformación se distribuye homogéneamente sobre una placa que contiene medio

<sup>15</sup> Reproducido de Acceptor Vector Kits, Novagen ([www.novagen.com](http://www.novagen.com)).



LB, agar-agar y 100 µg/ml de ampicilina (ver Fig. 13). Tras la absorción por la placa del exceso de líquido, éstas se invierten y se incuban durante 15-18 horas a 37 °C. Al término del crecimiento de las colonias bacterianas, se escogieron al azar 10 de ellas y usando el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel, Germany), se realizó una extracción a pequeña escala o "miniprep" de los plásmidos con el inserto del VDACpl (ver Fig. 13).

#### 3.2.4. Cuantificación del ADN

La concentración del ADN (plásmido/inserto) purificado se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Absorbancia}}{\epsilon \times L} \times \text{Dilución}$$

La lectura de la absorbancia se realizó a 260 nm y los parámetros de la ecuación se refirieron a:

L : Longitud de la cubeta de cuarzo utilizada (cm<sup>-1</sup>).

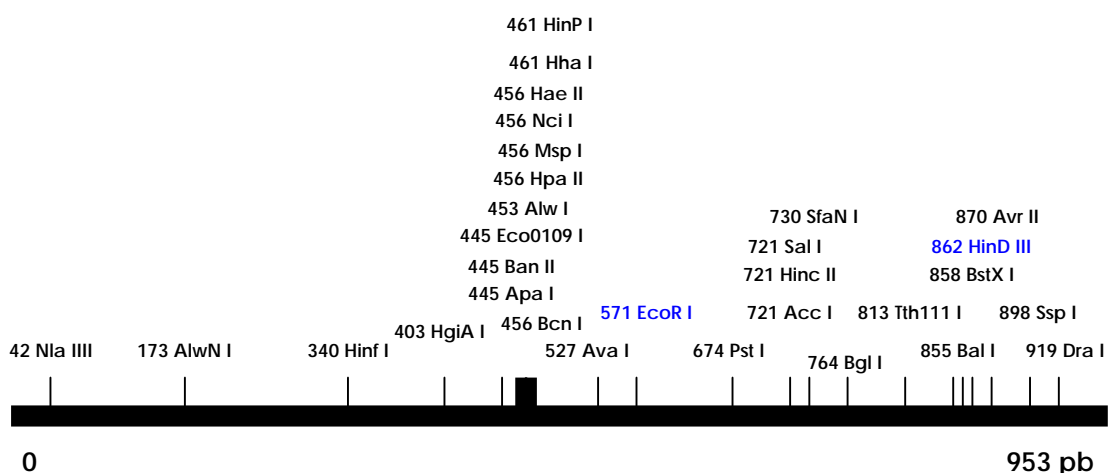
ε : Referido al ADN es 20

Dilución : Normalmente 1:100

#### 3.2.5. Digestión y secuenciación del ADN clonado

Una vez calculada la concentración del ADN (plásmido/inserto) para cada tipo celular, se verifica que la ligación no haya sido un falso positivo y que el inserto esté en

el sentido correcto, es decir, en la dirección desde el promotor T7 hacia el promotor SP6. Lo primero fue establecer un mapa de restricción correspondiente al VDACpl teórico de ratón, asumiendo que su secuencia de nucleótidos sería semejante al VDACmt, más la secuencia líder (ver Fig. 15). Esto se llevó a cabo mediante el programa *DNA Strider*.



**Fig. 15-** Mapa de restricción teórico del VDACpl donde se muestran las enzimas que sólo cortan en un sitio a la secuencia de ADN. Los números indican la posición del sitio de corte de cada enzima.

De todos los sitios de restricción encontrados, se escogieron las enzimas de restricción EcoRI y HindIII para realizar los cortes, ya que además de que estas enzimas sólo cortan en un sitio al inserto, también cortan al vector, en dos sitios y un solo sitio respectivamente. Este patrón de corte da la posibilidad de conseguir tres tamaños de bandas (ver Fig. 16) en el caso del corte con EcoRI (3836, 570 y 383 pb) y dos bandas en el caso del corte con HindIII (4701 y 103 bp), permitiendo comprobar así cual es la dirección en la que se ha insertado el ADN en el plásmido. Para el protocolo de la digestión del plásmido/inserto con las enzimas de restricción, se consideró que 3 U de enzima cortan 1 µg de ADN, dejando la reacción de digestión durante 2 horas a 37 °C.



**Fig. 16-** Digestión con EcoRI del plásmido con el inserto para el VDAC1pl en las células C1300. A la derecha se encuentra el estándar *Precision Molecular Mass Standard* (Bio-Rad). Las estrellas rojas marcan los falsos positivos de la transformación, es decir, los plásmidos donde no se insertó el ADN del VDACpl.

Finalmente se secuenciaron los plásmidos con los insertos del VDAC1pl que tenían la orientación correcta, para poder establecer la secuencia de nucleótidos real del VDACpl clonado de las células C1300 y NIH3T3. Mediante una PCR de secuenciación, que consistió en amplificar 500 ng de las miniprep con los cebadores del promotor T7 5' taa tac gac tca cta tag gg 3', del promotor SP6 5' gat tta ggt gac act ata g 3', del VDAC1plFLr2a 5' tca ttt atg ctt gaa att cca gtc c 3' y el VDAC1plFb 5' cca gaa ggt gaa caa gaa g 3', en reacciones de PCR independientes, se consiguió obtener la secuencia completa del canal VDAC plasmático para las dos líneas celulares. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un *HotStar* de 94 °C durante 3 min; 25 ciclos de desnaturalización por 10 segundos a 96 °C, hibridación por 5 min a 50 °C y extensión de 4 min a 62 °C. Una vez finalizada la amplificación del ADN, las muestras fueron sometidas a un protocolo de precipitación del ADN, en donde cada muestra fue precipitada con etanol al 95%/3M de acetato de sodio, incubadas 15 min a temperatura ambiente, centrifugadas a 14000 rpm por 20 min, lavadas con etanol al 70%, centrifugadas a 14000 rpm por 5 min, secadas y guardadas a -20 °C hasta el

momento de la secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo con un secuenciador ABIPRISM Modelo 3100 y las secuencias posteriormente fueron comparadas y alineadas con el VDACpl teórico en el programa BioEdit 5.0.6. (ver Fig. 17)



**Fig. 17-** Parte de la secuencia del VDAC1pl en las células NIH3T3, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.

Los resultados mostraron que la única diferencia que existe entre el VDACmt de ratón y el VDACpl de ambas líneas celulares (células C1300 y NIH3T3) fue la secuencia líder en el extremo N-terminal de cada secuencia de nucleótidos, formándose esta secuencia líder por 34 nt. La secuencia nucleotídica total del VDACpl resultó ser de 898 nt que se traducen en 298 aminoácidos. El codon de inicio (ATG) se encuentra entre los nucleótidos 3-5 y el codon de término (TAA) entre los nucleótidos 892-894. Cuando se compararon las secuencias del VDCApI obtenidas de las células NIH3T3 y C1300, no se observó ninguna diferencia entre ambas secuencias (ver Fig. 18).

1	CCT	★ ATG	TGT	TCA	TTC	TTT	CTC	GTG	CTT	TTG	TTG	TGG	CAG	AAC	ATG	45
1	P	M	C	S	F	F	L	V	L	L	L	W	Q	N	M	15
46	GCC	GTG	CCT	CCC	ACA	TAC	GCC	GAT	CTT	GGC	AAG	TCC	GCC	AGG	GAT	90
16	A	V	P	P	T	Y	A	D	L	G	K	S	A	R	D	30
91	GTC	TTC	ACC	AAG	GGC	TAC	GGC	TTT	GGC	TTA	ATA	AAA	CTT	GAT	TTG	135
31	V	F	T	K	G	Y	G	F	G	L	I	K	L	D	L	45
136	AAA	ACG	AAG	TCA	GAG	AAT	GGA	TTG	GAA	TTT	ACC	AGC	TCA	GGC	TCT	180
46	K	T	K	S	E	N	G	L	E	F	T	S	S	G	S	60
181	GCC	AAC	ACG	GAA	ACC	ACC	AAA	GTG	AAC	GGC	AGC	CTG	GAA	ACC	AAG	225
61	A	N	T	E	T	T	K	V	N	G	S	L	E	T	K	75
226	TAC	AGA	TGG	ACT	GAG	TAT	GGG	CTG	ACG	TTT	ACA	GAG	AAG	TGG	AAC	270
76	Y	R	W	T	E	Y	G	L	T	F	T	E	K	W	N	90
271	ACA	GAC	AAC	ACC	CTG	GGC	ACT	GAG	ATC	ACT	GTG	GAA	GAC	CAG	CTT	315
91	T	D	N	T	L	G	T	E	I	T	V	E	D	Q	L	105
316	GCT	CGT	GGA	CTG	AAG	CTC	ACC	TTT	GAT	TCG	TCA	TTC	TCG	CCG	AAC	360
106	A	R	G	L	K	L	T	F	D	S	S	F	S	P	N	120
361	ACT	GGG	AAA	AAA	AAT	GCT	AAA	ATC	AAG	ACA	GGG	TAC	AAG	AGG	GAG	405
121	T	G	K	K	N	A	K	I	K	T	G	Y	K	R	E	135
406	CAC	ATC	AAC	CTC	GGC	TGT	GAC	GTG	GAC	TTT	GAC	ATC	GCT	GGG	CCC	450
136	H	I	N	L	G	C	D	V	D	F	D	I	A	G	P	150
451	TCG	ATC	CGG	GGC	GCT	CTG	GTG	CTT	GGC	TAT	GAG	GGT	TGG	CTG	GCT	495
151	S	I	R	G	A	L	V	L	G	Y	E	G	W	L	A	165
496	GGC	TAC	CAG	ATG	AAT	TTT	GAG	ACC	TCG	AAG	TCC	CGA	GTG	ACC	CAG	540
166	G	Y	Q	M	N	F	E	T	S	K	S	R	V	T	Q	180
541	AGC	AAC	TTC	GCA	GTT	GGC	TAT	AAG	ACG	GAT	GAA	TTC	CAG	CTT	CAT	585
181	S	N	F	A	V	G	Y	K	T	D	E	F	Q	L	H	195
586	ACT	AAT	GTG	AAT	GAC	GGG	ACA	GAG	TTT	GGT	GGC	TCC	ATT	TAC	CAG	630
196	T	N	V	N	D	G	T	E	F	G	G	S	I	Y	Q	210
631	AAG	GTG	AAC	AAG	AAG	TTG	GAG	ACT	GCT	GTC	AAT	CTC	GCC	TGG	ACT	675
211	K	V	N	K	K	L	E	T	A	V	N	L	A	W	T	225
676	GCA	GGA	AAC	AGT	AAC	ACT	CGC	TTC	GGA	ATA	GCA	GCC	AAG	TAT	CAG	720
226	A	G	N	S	N	T	R	F	G	I	A	A	K	Y	Q	240
721	GTC	GAC	CCT	GAT	GCC	TGC	TTT	TCG	GCC	AAA	GTG	AAC	AAC	TCT	AGC	765
241	V	D	P	D	A	C	F	S	A	K	V	N	N	S	S	255
766	CTG	ATT	GGC	TTA	GGG	TAC	ACT	CAG	ACC	CTA	AAA	CCA	GGT	ATC	AAA	810
256	L	I	G	L	G	Y	T	Q	T	L	K	P	G	I	K	270
811	CTG	ACG	TTG	TCA	GCC	CTG	CTC	GAT	GGC	AAG	AAC	GTC	AAT	GCG	GGT	855
271	L	T	L	S	A	L	L	D	G	K	N	V	N	A	G	285
856	GGC	CAC	AAG	CTT	GGC	CTA	GGA	CTG	GAA	TTT	CAA	GCA	TAA	ATG	AAT	900
286	G	H	K	L	G	L	G	L	E	F	Q	A	*	M	N	300

Fig. 18- Secuencia completa del VDACpl de las células C1300 y NIH3T3. En negro se expone la secuencia de nucleótidos y en rojo la secuencia de aminoácidos, traducida desde el *Frame 1*.

Los nt marcados en azul muestran la secuencia líder del VDACpl y las estrellas en este mismo color determinan los codones de inicio y término de la secuencia.

---

## DISCUSIÓN 4

En mi trabajo de tesis doctoral he abordado el estudio funcional y molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> regulado por estrógenos (E<sub>2</sub>) y antiestrógenos (AE) en dos líneas celulares: fibroblastos (NIH3T3) y neuroblastos (C1300) de ratón. Los resultados del trabajo de investigación se han presentado por una parte en forma de artículos ya publicados, donde en cada uno de ellos se discuten de forma independiente los resultados y por otro lado como dos capítulos anexos, que son comentados en esta discusión. A continuación discutiré e intentaré integrar los aspectos más relevantes de mi trabajo de investigación.

### 4.1. CARACTERIZACION DEL CANAL MAXI-Cl<sup>-</sup>

Blatz y Magleby describieron por primera vez en el año 1983 las corrientes unitarias del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en parches escindidos de miotubos de rata. En general, este canal muestra una conductancia de 250-430 pS y presenta una peculiar dependencia de voltaje. A potenciales cercanos a 0 mV el canal permanece más tiempo abierto, inactivándose al aplicar tanto pulsos de voltajes despolarizantes como hiperpolarizantes. En otras palabras, si se grafica la probabilidad de apertura ( $P_o$ , la fracción de tiempo que el canal permanece abierto durante un periodo determinado) del canal frente al potencial (mV), se obtiene una curva en forma de campana de Gauss. El hecho de que este canal sólo se activara tras la escisión del parche de la membrana celular, parecía indicar la existencia de algún componente o

mecanismo intracelular que mantendría al canal cerrado. Sin embargo, otros investigadores postulaban que sólo se trataba de un artefacto introducido por la excisión del parche de membrana.

Pasaron aproximadamente 10 años desde la descripción por Blatz y Magleby hasta que Hardy y Valverde (1994) describieran por primera vez la modulación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en una célula entera (configuración electrofisiológica de célula entera o *whole cell*), es decir, esta vez era posible registrar en los fibroblastos NIH3T3, las corrientes de cloruro totales a través de la membrana celular, sin necesidad de escindir el parche desde la membrana plasmática. En esta ocasión, el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> era activado tras la exposición extracelular a compuestos antiestrogénicos como el tamoxifeno y el toremifeno.

La primera vez que se describió la modulación de este canal fue en el año 1988, siendo los investigadores Saigusa y Kokubun los pioneros en el estudio de la regulación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en una célula intacta mediante el registro de su actividad con la técnica de *patch clamp* en su modalidad de *cell attached*. Ellos mostraron que el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> podía activarse gracias a la inhibición de la actividad de proteínas quinasas, sugiriendo así que un proceso de fosforilación sería el responsable de mantener al canal cerrado. Posteriormente, también se ha descrito que este canal puede ser modulado por aumentos del volumen celular (Schwiebert y cols., 1994; Okada y Maeno, 2001; Sabirov y cols., 2001; Dutta y cols., 2002); por GTP y GDP (McGill y cols., 1993; Mangel y cols., 1993; Kemp y cols., 1993; Alexander y cols., 2001); por estrógenos y antiestrógenos (Hardy y Valverde, 1994; Li y cols., 2000; Díaz y cols., 2001; Henriquez y Riquelme, 2002; Bahamonde y cols., 2003); por ácido araquidónico (Zachar y Hurnak, 1994; Riquelme y Parra, 1999; Dutta y cols., 2002); y más recientemente se ha publicado su modulación por cambios en las concentraciones de NaCl en las células mesangiales del riñón (Bell y cols., 2003)



El canal activado por AE presenta una conductancia de aproximadamente 300 pS (Hardy y Valverde, 1994; Díaz y cols., 2001; Valverde y cols., 2002), pero sólo en los fibroblastos la dependencia de voltaje de la inactivación corresponde a la descrita por Blatz y Magleby (Hardy y Valverde, 1994; Valverde y cols., 2002). La selectividad de este canal en estos fibroblastos NIH3T3 y neuroblastos C1300, presenta una secuencia de permeabilidad a aniones monovalentes del tipo (cianato)  $\text{SNC}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$  (Hardy y Valverde, 1994; Díaz y cols., 2001), similar a las descritas para estos canales en otros tipos celulares (Schneider y cols., 1985; Schlichter y cols., 1990; Morris y Frizzell, 1993; Dixon y cols., 1993). El estudio farmacológico del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> ha revelado que este canal puede ser bloqueado a concentraciones micromolares por SITS, DIDS, NPPB y DPC (Pahapill y Schlichter, 1992; Sheppard y Valverde, 1997; O'Donnell y cols., 2001).

#### 4.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL CANAL MAXI-Cl<sup>-</sup>

La proteína VDAC (*voltage-dependent anionic channel*) es una porina que representa una de las proteínas más abundantes en la membrana externa de la mitocondria (Colombini, 1979; Song y cols., 1998; Yu y cols., 1995; Blachly-Dyson y cols., 1993; Schwarzer y cols., 2002). No obstante, desde el año 1989 también se ha propuesto su localización extramitocondrial, incluida la membrana plasmática de distintos tipos celulares (Thinnes y cols., 1989; Kayser y cols., 1989; Dermietzel y cols., 1994; Jakob y cols., 1995; Bathori y cols., 2000). Esta observación supuso la base para una interesante hipótesis que postulaba que el VDAC mitocondrial podría corresponder al correlato molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> (Thinnes, 1992; Dermietzel y cols., 1994; Bathori y cols., 2000). Esta hipótesis se basaba en la similitud de las características electrofisiológicas que presentan ambos canales. Sin embargo, otros

estudios postulaban que la presencia de esta porina en otros compartimentos distintos de la mitocondria era un artefacto experimental (Yu y cols., 1995).

La falta de experimentos claros que localizaran el VDAC en la membrana de células intactas, por ejemplo mediante el empleo de microscopia confocal, o de registros electrofisiológicos convincentes que asociaran el VDAC con el Maxi-Cl<sup>-</sup> en la membrana plasmática, alimentó el excepticismo de los detractores de la presencia del VDAC en la membrana. Sin desalentarnos en exceso por el estado de opinión reinante a la hora de comenzar mi tesis doctoral, decidimos, partiendo de la hipótesis de que el VDAC está en la membrana celular, demostrar que dicha proteína es el correlato molecular del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> activado por AE.

El primer abordaje experimental se dirigió a demostrar la presencia del VDAC en la membrana celular de las células NIH3T3 y C1300.

La inmunodetección de esta proteína en preparaciones de membrana plasmática, mediante la utilización de un anticuerpo comercial que reconoce el extremo N-terminal de la porina humana (VDAC1 humano), permitió detectar una única banda de 32 kDa. Esta banda correspondía al peso molecular esperado de la proteína VDAC al utilizar el anticuerpo monoclonal Anti-31HL (Ab-2) (Calbiochem). Además, estos resultados eran concordantes con los expuestos por otros investigadores, que describían un peso molecular similar (Babel y cols., 1991; Shimizu y cols., 2001).

Durante mucho tiempo no se supo cual era el mecanismo por el cual el canal VDAC podía llegar hasta la membrana plasmática e insertarse en ella, lo que supuso un gran obstáculo para los defensores de su presencia en la membrana plasmática. Fueron varias las hipótesis propuestas, hasta que en el año 2000, Buettner y sus colaboradores demostraron la expresión diferencial de dos porinas de ratón, el canal VDAC1 mitocondrial y el canal VDAC1 plasmático. La diferencia entre estas proteínas

se encontraba en el extremo N-terminal de la secuencia de la porina, y consistía en que el VDAC1 plasmático (VDAC1pl) presentaba un péptido líder hidrofóbico que guiaría a la proteína hacia la membrana plasmática de la célula, previo paso por el retículo endoplasmático y el golgi (Buettner y cols., 2000). Empleando en un par de cebadores (p13/V2) utilizados por Buettner y cols., nosotros amplificamos por PCR una banda de 350 pares de bases, tanto en las células C1300 como en las NIH3T3. Esta banda correspondía al tamaño esperado cuando se amplificaba una parte de la secuencia de nucleótidos del canal VDAC1pl de ratón, que incluía la región N-terminal donde se encontraba la secuencia líder. Estos experimentos apoyan mi observación inicial que demostraba la presencia de una señal específica para el VDAC en la membrana celular de los fibroblastos NIH3T3 y los neuroblastos C1300.

Con el mismo anticuerpo (anti-VDAC) comercial citado anteriormente, pero esta vez realizando experimentos de inmunofluorescencia indirecta con células no permeabilizadas y permeabilizadas, también logré obtener una señal clara del VDAC en la membrana plasmática de los neuroblastos C1300 y los fibroblastos NIH3T3. Es justo mencionar que ya se había descrito en varias publicaciones la presencia del VDAC en la membrana plasmática de otros tipos celulares (Thinnes y cols., 1989; Cole y cols., 1992; Puchelle y cols., 1993; Dermietzel y cols., 1994; Reymann y cols., 1998; Schwarzer y cols., 2002). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las imágenes expuestas en estos trabajos mostraban una señal de membrana difusa y difícilmente concluyente, comparada con la nitidez de las imágenes de microscopía confocal obtenidas en el estudio de los fibroblastos NIH3T3 y los neuroblatos C1300.

Una vez comprobada la presencia de este canal en la membrana plasmática, abordé su distribución en la membrana. Algunos investigadores ya habían propuesto la presencia del VDAC en caveolas y *lipid raft* de ciertos tipos celulares (Lisanti y cols., 1994; Bathori y cols., 1999), por lo que decidí estudiar la posibilidad de que en las

---

células NIH3T3 y C1300, esta proteína también se pudiera encontrar en microdominios especializados de la membrana. El primer paso consistió en colocalizar esta proteína, mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta, con un marcador típico de *lipid rafts*, este marcador fue la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica. En el caso de las células C1300, se observó una clara colocalización de la proteína VDACpl con la toxina colérica, lo que demostraba que además de estar en la membrana plasmática de los neuroblastos, esta porina también se encontraba preferentemente en estos microdominios de membrana enriquecidos en colesterol. El segundo paso a seguir fue la búsqueda de este canal en *lipid rafts* especializados, tales como los microdominios denominados caveolas. Para esto también recurrimos a experimentos de inmunofluorescencia indirecta, en esta ocasión utilizamos un anticuerpo comercial que reconocía a la caveolina-1, este anticuerpo fue seleccionado porque la caveolina-1 se expresa mayoritariamente en las caveolas de varios tipos neuronales (Galbiati y cols., 1998; Masserini y cols., 1999). A pesar de que en el interior de los neuroblastos C1300 se visualizó una señal difusa de la caveolina 1, no se observó una clara señal en la membrana celular ni la colocalización con el VDAC en la membrana plasmática. Este patrón de localización de la caveolina-1 es típico de las neuronas (Galbiati y cols., 1998). Algunos investigadores han demostrado que el patrón de distribución de la caveolina en las neuronas depende del grado de diferenciación en las que éstas se encuentren (Galbiati y cols., 1998). Sin embargo, aunque se realizaron experimentos diferenciando las células C1300 (experimentos no mostrados en esta tesis), no se observó ningún cambio respecto al patrón de localización de la caveolina-1 en las células control (células no diferenciadas). Por el contrario, en las células NIH3T3 la presencia de la caveolina-1 en la membrana plasmática fue clara. El patrón de distribución que esta proteína presentaba era en forma de parche y además colocalizaba intensamente con la proteína VDACpl. Este patrón de distribución, era

concordante con los resultados publicados por otros investigadores donde se evidenciaba la presencia de la caveolina-1 en fibroblastos (Scherer y cols., 1997; Okamoto y cols., 1998; Smart y cols., 1999).

Una vez demostrada de forma inequívoca la presencia del VDAC en la membrana plasmática de las células C1300 y NIH3T3, se abordó el estudio de su papel en la generación de las corrientes del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>. Para ello se utilizó la técnica de los oligonucleótidos antisentidos. El oligonucleótido antisentido frente al VDACpl fue diseñado para hibridar con la secuencia de nucleótidos del péptido líder publicado por Buettner y cols., (2000). Las células C1300 se incubaron con este antisentido (o con oligonucleótido control frente a la  $\beta$ -globina) y un plásmido de expresión de la proteína EGFP (marcador positivo para la captación del oligonucleótido). Las corrientes del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se registraron mediante la técnica de potencial controlado bajo su modalidad de parche excindido. En estos registros se observó una actividad del canal en un 100% de las células C1300 no tratadas, disminuyendo a un 60% en las células tratadas con el antisentido frente al VDACpl. Por otra parte, utilizando la configuración de célula entera y activando el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> con toremifeno, se demostró que en las células tratadas con el antisentido VDACpl, la corriente macroscópica disminuía significativamente respecto a los controles utilizados (células no tratadas o células tratadas con un oligonucleótido antisentido para la  $\beta$ -globina). La reducción de las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup> activadas por AE, concordaba con la disminución de la intensidad de inmunofluorescencia del canal VDAC (determinada mediante microscopia confocal) en las células expuestas al oligonucleótido antisentido frente al VDACpl. Estos resultados demostraban una correlación entre el VDACpl y el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> activado por AE. Sin embargo, en estos momentos no tenemos pruebas suficientes para asegurar si el VDACpl es responsable de la formación del canal propiamente

---

dicho, esto es, si forma el poro para el paso de los iones, o si es una proteína auxiliar del complejo que determina la actividad del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>.

La cinética de inactivación del Maxi-Cl<sup>-</sup> activado por toremifeno en las células C1300 (Díaz y cols., 2001) es diferente a la descrita en fibroblastos (Hardy & Valverde, 1994). La inactivación de las corrientes de cloruro en estos neuroblastos, sólo se presenta a potenciales negativos, ya que al aplicar distintos pulsos de voltaje a potenciales positivos, el canal permanece abierto o ligeramente inactivado. Esta diferencia en la cinética de las corrientes entre las células C1300 y NIH3T3 llamó nuestra atención por lo que decidimos abordar su explicación. Los cambios en la cinética de activación e inactivación de los canales de iones se han asociado a elementos intrínsecos al canal, véase el sensor de voltaje o las bolas de inactivación (Levinson, 1995), el bloqueo dependiente de voltaje por iones (Levinson, 1995), la participación de subunidades reguladoras (Meera y cols., 2000), o de otros factores intracelulares como por ejemplo una diferencia en los estados de óxido reducción de esta proteína, siendo el caso por ejemplo del canal mitocondrial PTP, donde se ve afectado el sensor de voltaje de este canal, incrementando así su probabilidad de apertura (Petronilli y cols., 1994) y las poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) que interactúan con diferentes tipos de canales iónicos ya sea bloqueando o modulando su actividad (Scott y cols., 1992; Scott y cols., 1993; Uehara y cols., 1996; Williams, 1997). Al respecto, es interesante el hecho de que ya se ha descrito que la dependencia de voltaje del canal VDAC mitocondrial está asociada a la presencia de diferentes proteínas y moléculas moduladoras, entre ellas, las poliaminas (Liu y Colombini, 1991; Heiden y cols., 1996; Horn y cols., 1998) y diferentes cationes (Szabó y cols., 1992).

El primer paso llevado a cabo para evaluar las diferencias en la cinética de activación a potenciales positivos entre las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup> de los fibroblastos y neuroblastos, consistió en la clonación del VDACpl de estos dos tipos celulares. La

hipótesis de partida fue que si dicha diferencia era debida a una propiedad intrínseca de la proteína VDACpl debían encontrarse diferencias entre las secuencias del VDAC de los neuroblastos C1300 y de los fibroblastos NIH3T3.

El resultado de dicho abordaje se ha descrito en el capítulo 3 (Clonación del VDAC plasmático, Sección 3.2.), donde se muestra que la secuencia del VDACpl es idéntica en las dos líneas celulares.

En el momento de escribir esta tesis se están desarrollando experimentos encaminados a evaluar la contribución de otros factores (diferentes estados de óxido-reducción o niveles de poliaminas entre las células NIH3T3 y C1300) que puedan explicar esta diferencia.

#### **4.3. REGULACION DEL CANAL MAXI-Cl<sup>-</sup> POR ESTROGENOS Y ANTIESTROGENOS**

El canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se activa de forma rápida y reversible por los antiestrógenos toremifeno y tamoxifeno. Este patrón temporal sugiere un mecanismo de acción diferente al clásicamente propuesto para estas moléculas, la inhibición y la consiguiente alteración de la expresión génica. Por el contrario, la rapidez de la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> (segundos-minutos) es indicativa de la participación de los mecanismos de acción alternativa de hormonas esteroideas (Wehling y cols., 1993, Nadal y cols., 2000). La magnitud de la activación es dependiente de la dosis de AE empleada con un ligero desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta del toremifeno, frente a la del tamoxifeno (Hardy y Valverde, 1994; Díaz y cols., 2001; Valverde y cols., 2002). Este efecto contrasta con los estudios previos de unión al ER $\alpha$ , que no muestran diferencias entre el tamoxifeno y el toremifeno (Kangas, 1990).

---

Varias de las acciones alternativas de los esteroides involucran un sitio de unión extracelular en la membrana plasmática (Wehling, 1997; Valverde y cols., 1999; Falkenstein y cols., 2000a; Nadal y cols., 2001). Los antiestrógenos tales como el tamoxifeno a su vez presentan un sitio de unión denominado AEBS (*antiestrogen binding site*) (Sutherland y cols., 1980; Sudo y cols., 1983; Klinge y cols., 1992; Ojasso y cols., 1993), además de unirse a los ER clásicos (Parker, 1993; Jordan y Morrow, 1999), receptores muscarínicos (Ben-Baruch y cols., 1982; Hardy y Valverde, 1994), receptores de histidina (Brandes y Bogdanovic, 1986) y receptores de dopamina (Hiemke y Gharf, 1984; Valverde y cols., 2001). La participación de estos sitios de unión en la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por los antiestrógenos ha sido descartada con anterioridad (Hardy y Valverde, 1994; Valverde y cols., 2002). Sin embargo, se ha demostrado la activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> en las células NIH3T3 por compuestos tricíclicos como las fenotiazinas (clorpromazina y triflupromazina) (Valverde y cols., 2002). Este efecto mimético entre fenotiazinas y AE ya había sido descrito en otros sistemas celulares (Weiss y Gurskii, 1998).

Estos resultados apuntan a la intervención de un receptor para los AE distinto a los conocidos hasta ahora. Teniendo en cuenta que los AE permean la membrana celular, el siguiente paso en la caracterización del sitio de unión a los AE que media la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se dirigió a identificar si la diana de los AE se encuentra a nivel de la membrana celular o en el interior de la célula. Para ello se empleó un derivado del tamoxifeno que no atraviesa la membrana celular, el etilbromuro de tamoxifeno (EB-tamoxifeno). La presencia de EB-tamoxifeno en el interior de las células C1300 (cargadas a través de la pipeta de registro) no activó las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup>. Sin embargo, su aplicación a la solución del baño reprodujo la activación observada con el tamoxifeno o con el toremifeno (Díaz y cols., 2001). La posibilidad de que los AE se unieran directamente al canal, al igual que ocurre en el caso de la modulación del



---

canal Maxi-K<sup>+</sup> por los estrógenos (Valverde y cols., 1999), fue descartada inicialmente en las células NIH3T3 por Hardy y Valverde (1994) mediante la realización de experimentos en la configuración de *cell attached* y añadiendo el AE a la solución del baño. En estas condiciones, se produjo la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup>, a pesar de que el canal no estaba expuesto directamente al AE. Dado que el canal no se activa por la presencia intracelular de los AE y sin embargo se activa en la configuración de *cell attached*, la activación podría implicar la generación de señales intracelulares difusibles (Hardy y Valverde, 1994). Esta hipótesis ganó peso con la demostración de que la activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por AE requiere la presencia de ATP y se modula con análogos del GTP (GTP β-S y Gpp NHp) (Díaz y cols., 2001; Valverde y cols., 2002). La modulación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por análogos del GTP ya se había descrito anteriormente (Mangel y cols., 1993; Kemp y cols., 1993; McGill y cols., 1993), aunque en este caso la activación del canal acontecía tras la escisión del parche de membrana, sirviendo de base para postular que la modulación de estos canales podría estar mediada por proteínas G.

En nuestro intento de dilucidar las señales intracelulares asociadas a la activación de los canales Maxi-Cl<sup>-</sup> por los AE, y teniendo en cuenta observaciones previas que señalaban la inhibición del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en respuesta al estado de fosforilación celular basal (Saigusa y Kobukum, 1998), evaluamos si la actividad de alguna proteína fosfatasa podría estar implicada en la activación del canal por AE. Existe una amplia literatura relacionada con la modulación por los E<sub>2</sub> y AE de vías de señalización intracelular que implican a proteínas quinasas (Migliaccio y cols., 1993; Kirk y Kirk, 1994; Aronica y cols., 1994; Hardcastle y cols., 1996; Migliaccio y cols., 1996; Mandlekar y Kong, 2001). Sin embargo, en el momento de iniciar mi tesis doctoral sólo existía un trabajo que hubiera evaluado la activación de proteínas fosfatasas por AE (Freiss y Vignon, 1994).

---

En una serie de experimentos preliminares, Díaz y cols. (1999) habían demostrado que un inhibidor de las proteínas fosfatasa que defosforilan residuos serina y treonina, el fluoruro (F<sup>-</sup>), previene la activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por los AE. Nuestros experimentos electrofisiológicos en las células C1300 demostraron que la activación por los AE del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> se puede prevenir con un inhibidor de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), el ácido okadaico utilizado a una concentración (1 nM) a la cual es un inhibidor específico de la PP2A (Díaz y cols., 2001). Sin embargo, los resultados de los ensayos realizados para evaluar la actividad de la fosfatasa PP2A, indicaron que el efecto del toremifeno sobre la actividad de esta proteína fosfatasa no era producido por un cambio en la actividad total, sino que podría deberse a una diferencia en la distribución de las isoformas de la fosfatasa PP2A y/o a diferencias en la actividad local de estas isoformas. Desafortunadamente, por este momento aun no contamos con las herramientas experimentales necesarias para poder discriminar cual es el cambio a nivel local que afecta a esta fosfatasa, situación en la que también se encuentran otros investigadores que han descrito la modulación de los canales Maxi-K<sup>+</sup> por glucocorticoides, un proceso que está mediado por una PP2A, pero sin cambios en la actividad total de la enzima (Tian y cols., 1998).

La activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> por los AE puede prevenirse previa incubación con 17 $\beta$ -estradiol (Hardy y Valverde, 1994; Li y cols., 2000; Díaz y cols., 2001). El efecto inhibitor del 17 $\beta$ -estradiol sólo acontece cuando el esteroide se añade al medio extracelular, y no se reprodujo ni con 17 $\alpha$ -estradiol ni con progesterona (Hardy y Valverde, 1994). Estos resultados sugieren la participación de un lugar de unión a estrógenos, disponible desde el exterior celular. Sin embargo, estudios de inmunodetección de los ER $\alpha$  y ER $\beta$  en la membrana plasmática de las células C1300 ofrecieron un resultado negativo (datos no mostrados en esta tesis). Resultados similares se han descrito en otros modelos celulares en los cuales los estrógenos

modulan de forma rápida alguna función celular, implicando su interacción con un receptor de membrana de naturaleza desconocida y activando vías de señalización intracelular (Minami y cols., 1990; White y cols., 1991; Lagrange y cols., 1997; Gu y Moss, 1998; Kelly y Wagner, 1999). A falta de la identificación molecular del ER de membrana, y salvo alguna excepción como es el caso de la identificación de la subunidad  $\beta_1$  del Maxi-K<sup>+</sup> como sitio de unión de E<sub>2</sub> en la membrana celular (Valverde y cols., 1999), una de las más completas caracterizaciones del elusivo ER de membrana se ha realizado en las células  $\beta$  pancreáticas (Nadal y cols., 1998; Nadal y cols., 2000). Este receptor de membrana presenta un perfil farmacológico similar al del receptor  $\gamma$ -adrenérgico (Nadal y cols., 2000) y conlleva la activación de una vía de señalización intracelular mediada por el GMPc y la proteína quinasa G (Ropero y cols., 1999). Sin embargo, no parece posible que un receptor similar este implicado en la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> ya que los perfiles farmacológicos de ambas respuestas no concuerdan.

El efecto inhibitorio del E<sub>2</sub> sobre la activación del Maxi-Cl<sup>-</sup> en las células C1300 y NIH3T3 si que presenta un aspecto común con numerosas descripciones de efectos alternativos de estos esteroides: el efecto del E<sub>2</sub> se mimetiza con AMPc y se previene inhibiendo la actividad quinasa celular (Aronica y cols., 1994; Doolan y cols., 2000). Así, tanto en las células C1300 (Díaz y cols., 2001) como en las células NIH3T3 (Valverde y cols., 2002) la activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por los AE se previno en presencia de AMPc, o de análogos del ATP que no permiten la transferencia de los grupos fosfato necesarios para el proceso de fosforilación. Por otra parte, la utilización de un inhibidor inespecífico de las proteínas quinasas de residuos serina/treonina (la estaurosporina) previno el efecto inhibitorio del E<sub>2</sub> (Díaz y cols., 2001).

En el momento de escribir esta Tesis Doctoral tan sólo se posee información parcelada sobre el mecanismo exacto de regulación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por los AE y los

E2. Nuestra hipótesis es que el canal permanece cerrado en condiciones basales, debido a presentarse en un estado de fosforilación constitutiva. Esta hipótesis esta respaldada por diferentes evidencias experimentales: (1) numerosos estudios que describen la ausencia de actividad Maxi-Cl<sup>-</sup> en membranas intactas y su activación tras la escisión del parche de membrana (revisado por Díaz y cols., 1999), (2) el empleo de inhibidores inespecíficos de proteínas quinasas activa el canal en células intactas (Saigusa y Kobukum, 1988), (3) el canal (VDAC) mitocondrial puede fosforilarse por PKA (Bera y cols., 1995), y (4) la activación por los AE requiere la actividad de una proteína fosfatasa de características similares a la PP2A. Por otro lado, los estrógenos inhiben la activación por AE, un proceso que requiere la acción de una/s proteína/s quinasa/s aun no identificada/s. Tampoco se conoce si la diana última de la acción de la vía activada por el E<sub>2</sub>, y que implica un paso de fosforilación e inactivación, es el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> u otro elemento implicado en su regulación por los AE, por ejemplo el receptor de AE o la PP2A. En este sentido, es interesante señalar que la PP2A puede inactivarse tras su fosforilación (Chen y cols., 1992; Guo y Damuni, 1993).

#### 4.4. RELEVANCIA FISIOPATOLOGICA DEL MAXI-Cl<sup>-</sup>

La función del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> en la membrana plasmática aun es poco conocida. Se ha postulado que este canal puede estar involucrado en varias funciones celulares como la regulación del volumen celular o el transportes epitelial (Anderson y cols., 1992; Schwiebert y cols., 1995). La única evidencia directa que existe en relación a una función fisiológica del canal es la liberación de ATP al espacio extracelular. A pH fisiológico las moléculas de ATP se encuentran como formas aniónicas, lo que hace posible su paso a través de algunos canales aniónicos,

permitiendo la liberación del ATP intracelular. En la literatura se pueden encontrar numerosos estudios que sugieren que canales iónicos tales como el canal afectado en la fibrosis quística, el CFTR, pueden mediar la salida de ATP (Reisin y cols., 1994; Schwiebert y cols., 1995; Cantiello y cols., 1997; Cantiello y cols., 1998; Pasyk y Foskett, 1997; Lader y cols., 2000), aunque numerosas voces se han levantado cuestionando esta posibilidad (Takahashi y cols., 1994; Watt y cols., 1998). Por el contrario, son muchas las evidencias que apoyan tanto la participación del Maxi-Cl<sup>-</sup> (VDACpl) (Okada y Maeno, 2001; Dutta y cols., 2002; y el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral) como del VDAC mitocondrial (Blachly-Dyson y Forte, 1993; Rostovtseva y Colombini, 1997) en el transporte del ATP a través de membranas celulares.

Es posible que el papel del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> este relacionado con la transducción de señales intercelulares mediada por la salida del ATP y su unión a receptores purinérgicos de la propia célula o de células vecinas (Okada y Maeno, 2001; Dutta y cols., 2002), proporcionando un mecanismo celular que explique aspectos hasta ahora desconocidos de la regulación autocrina y paracrina mediada por ATP (Bodin y Burnstock, 2001).

Otro aspecto importante a tener en cuenta en relación con la liberación del ATP al exterior celular es que si esta no ocurre de forma transitoria, altamente regulada, puede desencadenar una situación de crisis energética y exacerbar posibles daños celulares ya presentes, o incrementar la susceptibilidad de las células a insultos apoptóticos (Gorman y cols., 2000). En este sentido, la apertura del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> y la consiguiente salida de ATP puede suponer uno de los mecanismos empleado por los AE para inducir muerte celular en células que no expresan ER. La muerte celular inducida por AE ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* y acontece a concentraciones micromolares de AE (Lee y cols., 1998; Mandlekar y Kong, 2001;

Strohmeier y cols., 2002; Lehenkari y cols., 2003), similares a las cuales se activa el Maxi-Cl<sup>-</sup> en los modelos celulares empleados en mi trabajo experimental.

El VDAC mitocondrial claramente está involucrado en el proceso de muerte celular (Crompton, 1999; Shimizu y cols., 2001; Blachly-Dyson y Forte, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001; Crompton y cols., 2002; Mayer y Oberbauer, 2003). Por otra parte el canal Maxi-Cl<sup>-</sup> (VDACpl), potencialmente también puede estar implicado en algunos aspectos relacionados con el proceso de muerte celular (discutido anteriormente). Sin embargo, en estos momentos se desconoce si existe un vínculo entre ambos canales, el VDAC mitocondrial y el Maxi-Cl<sup>-</sup> (VDACpl) de la membrana plasmática, a la hora de generar las señales celulares que determinan la muerte celular. En este sentido es especialmente interesante nuestra observación de que el VDAC mitocondrial no se expresa en todas las mitocondrias (Bahamonde y Valverde, 2003). Mientras que las mitocondrias perinucleares no expresan VDAC en las células C1300 y NIH3T3, en las mitocondrias más periféricas existe una presencia clara del VDAC. La diferente topográfica de las mitocondrias que expresan VDAC concuerda con los estudios que recientemente han identificado dos poblaciones de mitocondrias, funcionalmente diferentes (Park y cols., 2001; Villalobos y cols., 2002; Johnson y cols., 2003). Aun no estamos en disposición de discutir si la presencia del VDAC en las mitocondrias periféricas está relacionado con las diferencias en el establecimiento de los perfiles espaciotemporales del Ca<sup>2+</sup> intracelular que presentan las mitocondrias periféricas y perinucleares, pero es interesante tener en cuenta que el VDAC mitocondrial se ha implicado en el transporte de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria (Icha y cols., 1997).

## CONCLUSIONES 5

- La regulación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por estrógenos y antiestrógenos en las células C1300 y NIH3T3 implica mecanismos de acción alternativos, diferentes al mecanismo clásico de control de la transcripción asociado a estos compuestos.
- La activación del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> por los antiestrógenos tamoxifeno y toremifeno sólo acontece cuando dichos compuestos se añaden al exterior celular y requiere la participación de una fosfatasa del tipo PP2A.
- La exposición previa de las células a 17β-estradiol o AMPc previene la activación de las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup> por los antiestrógenos.
- El efecto inhibitor de los estrógenos se previene con inhibidores de proteínas quinasas.
- Una isoforma del canal mitocondrial VDAC que presenta un péptido líder para su localización en la membrana plasmática (VDACpl) está involucrado en la generación de las corrientes Maxi-Cl<sup>-</sup>, bien formando la estructura que determina el poro del canal, o actuando como una subunidad reguladora necesaria para la función del canal.

- El canal del Maxi-Cl<sup>-</sup> (VDACpl) puede localizarse en microdominios de la membrana plasmática denominados *lipid rafts*, con o sin estructuras especializadas conocidas como caveolas.
- La isoforma mitocondrial del canal VDAC se expresa sólo en las mitocondrias más periféricas de las células C1300 y NIH3T3, no en las mitocondrias perinucleares.
- El papel del canal Maxi-Cl<sup>-</sup> (VDACpl) en la fisiología de las células donde se expresa aun no esta totalmente definido. La demostración de que la activación del canal por los antiestrógenos determina la liberación del ATP celular, apunta a su posible implicación en el proceso de muerte celular. Esta observación podría explicar, al menos en parte, la muerte celular inducida por los antiestrógenos en células que no expresan los receptores de estrógenos clásicos, abriendo una nueva línea de investigación encaminada al desarrollo de fármacos que indujeran muerte celular mediante la activación de este canal.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 6

Ackerman, M. J. & Clapham, D. E. (1997). Ion channels basic science and clinical disease. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1575-1586.

Alexander, S., Mathie, A., & Peters, J. (2001). Ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 104-117.

Anderson, R. G., Kamen, B. A., Rothberg, K. G., & Lacey, S. W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**, 410-411.

Aronica, S. M., Kraus, W. L., & Katzenellenbogen, B. S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8517-8521.

Babel, D., Walter, G., Gotz, H., Thinnes, F. P., Jurgens, L., Konig, U., & Hilschmann, N. (1991). Studies on human porin VI. Production and characterization of eight monoclonal mouse antibodies against the human VDAC "Porin 31HL" and their application for histotopological studies in human skeletal muscle. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **372**, 1027-1034.

Bahamonde, M. I., Fernandez-Fernandez, J. M., Guix, F. X., Vazquez, E., & Valverde, M. A. (2003). Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated Maxi-Cl<sup>-</sup> currents in C1300 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33284-33289.

Bahamonde, M. I. & Valverde, M. A. (2003). Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria. *Pflugers Arch.* **446**, 309-313.

Barford, D. (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 407-412.

Barton, G. J., Cohen, P. T., & Barford, D. (1994). Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **220**, 225-237.

Bathori, G., Parolini, I., Szabo, I., Tombola, F., Messina, A., Oliva, M., Sargiacomo, M., De, P., V., & Zoratti, M. (2000). Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 79-89.

Bathori, G., Parolini, I., Tombola, F., Szabo, I., Messina, A., Oliva, M., De, P., V., Lisanti, M., Sargiacomo, M., & Zoratti, M. (1999). Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 29607-29612.

Bauer, M. F., Hofmann, S., Neupert, W., & Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**, 25-31.

Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**, 1-32.

Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.

Beigi R, K. E. A. M. D. GR. (1999). Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am. J. Physiol.* **276**, C267-C278.

Bell, P. D., Lapointe, J. Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K., Kovacs, G., & Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4322-4327.

Ben Baruch, G., Schreiber, G., & Sokolovsky, M. (1982). Cooperativity pattern in the interaction of the antiestrogen drug clomiphene with the muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **21**, 287-293.

Benz, R. (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 167-196.

Bera, A. K., Ghosh, S., & Das, S. (1995). Mitochondrial VDAC can be phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 213-217.

Bernabei, P., Allione, A., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Losana, G., Borghi, I., Forni, G., & Novelli, F. (2001). Regulation of interferon-gamma receptor (INF-gammaR) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes. *Eur Cytokine.* **12**, 6-14.

Bernardi, P., Broekemeier, K. M., & Pfeiffer, D. R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 509-517.

Blachly-Dyson, E. & Forte, M. (2001). VDAC channels. *IUBMB. Life.* **52** , 113-118.

Blachly-Dyson, E., Zambronicz, E. B., Yu, W. H., Adams, V., McCabe, E. R., Adelman, J., Colombini, M., & Forte, M. (1993). Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 1835-1841.

Blatz, A. (1994). Chloride channels in skeletal muscle and cerebral cortical neurons. In *Chloride Channels*, ed. Guggino, W. R., pp. 131-151.

Blatz, A. L. (1990). Chloride channels in skeletal muscle. In *Chloride channels and carriers in nerve, muscle, and glial cells*, eds. Alvarez-Leefmans, F. J. & Russell, J. M., pp. 407-420.

Blatz, A. L. & Magleby, K. L. (1983). Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys. J.* **43**, 237-241.

Bodas, E., Aleu, J., Pujol, G., Martin-Satue, M., Marsal, J., & Solsona, C. (2000). ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 20268-20273.

Bodin, P. & Burnstock, G. (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* **26**, 959-969.

Bork, P., Brown, N. P., Hegyi, H., & Schultz, J. (1996). The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci.* **5**, 1421-1425.

Bossenmeyer-Pourie, C., Lievre, V., Grojean, S., Koziel, V., Pillot, T., & Daval, J. L. (2002). Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience* **114**, 869-882.

Brandes, L. J. & Bogdanovic, R. P. (1986). New evidence that the antiestrogen binding site may be a novel growth-promoting histamine receptor (?H3) which mediates the antiestrogenic and antiproliferative effects of tamoxifen. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **134**, 601-608.

Brown, P. D., Greenwood, S. L., Robinson, J., & Boyd, R. D. (1993). Chloride channels of high conductance in the microvillous membrane of term human placenta. *Placenta* **14**, 103-115.

Buettner, R., Papoutsoglou, G., Scemes, E., Spray, D. C., & Dermietzel, R. (2000). Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 3201-3206.

Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., & Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* **276**, 9817-9824.

Cantiello, H. F., Jackson, G. R., Jr., Grosman, C. F., Prat, A. G., Borkan, S. C., Wang, Y., Reisin, I. L., O'Riordan, C. R., & Ausiello, D. A. (1998). Electrodifusional ATP movement through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol.* **274**, C799-C809.

Cantiello, H. F., Jackson, G. R., Jr., Prat, A. G., Gazley, J. L., Forrest, J. N., Jr., & Ausiello, D. A. (1997). cAMP activates an ATP-conductive pathway in cultured shark rectal gland cells. *Am. J. Physiol.* **272**, C466-C475.

Casadio, R., Jacoboni, I., Messina, A., & De, P., V (2002). A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett.* **520**, 1-7.

Chen, J., Martin, B. L., & Brautigan, D. L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* **257**, 1261-1264.

Christ, M., Haseroth, K., Falkenstein, E., & Wehling, M. (1999). Nongenomic steroid actions: fact or fantasy? *Vitam. Horm.* **57**, 325-373.

Clarke, C. H., Norfleet, A. M., Clarke, M. S., Watson, C. S., Cunningham, K. A., & Thomas, M. L. (2000). Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* **71**, 34-42.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.

Cohen, P. (1991). Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol.* **201**, 389-398.

Cohen, P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 245-251.

Cole, T., Awni, L. A., Nyakatura, E., Gotz, H., Walter, G., Thinner, F. P., & Hilschmann, N. (1992). Studies on human porin. VIII. Expression of "Porin 31HL" channels in the plasmalemma of the acute-lymphoblastic-leukemia cell line KM3 as revealed by light- and electron-microscopy. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 891-896.

Colombini, M. (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* **279**, 643-645.

Colombini, M. (1989). Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J. Membr. Biol.* **111**, 103-111.

Colombini, M., Peng, S., Blachly-Dyson, E., & Forte, M. (1992). Probing molecular structure and structural changes of voltage-gated channel by expressing mutant channels in yeast and reconstituting them into planar membranes. *Methods Enzymol.* **207**, 432-444.

Connor, C. E., Norris, J. D., Broadwater, G., Willson, T. M., Gottardis, M. M., Dewhirst, M. W., & McDonnell, D. P. (2001). Circumventing tamoxifen resistance in breast cancers using antiestrogens that induce unique conformational changes in the estrogen receptor. *Cancer Res.* **61**, 2917-2922.

Coulombe, A. & Coraboeuf, E. (1992). Large-conductance chloride channels of newborn rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media. *Pflugers Arch.* **422**, 143-150.

Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A. & Korach, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology.* **138**, 4613-4621.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233-249.

Crompton, M., Barksby, E., Johnson, N., & Capano, M. (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **84**, 143-152.



Dagda, R. K., Zaucha, J. A., Wadzinski, B. E., & Strack, S. (2003). A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 24976-24985.

De Boland, A. R. & Norman, A. W. (1998). 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> signaling in chick enterocytes: enhancement of tyrosine phosphorylation and rapid stimulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J. Cell Biochem.* **69**, 470-482.

Deng, X., Ito, T., Carr, B., Mumby, M., & May, W. S., Jr. (1998). Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **273**, 34157-34163.

Dermietzel, R., Hwang, T. K., Buettner, R., Hofer, A., Dotzler, E., Kremer, M., Deutzmann, R., Thinner, F. P., Fishman, G. I., & Spray, D. C. (1994). Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 499-503.

Diaz, M. (2002). Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.* **445**, 257.-66.

Diaz, M., Hardy, S., & Valverde, M. (1999). Modulation of Maxi-Cl<sup>-</sup> channels by oestrogen and antioestrogen. *J. Physiol.* **517.P**, 7S-8S.

Diaz, M., Bahamonde, M. I., Lock, H., Munoz, F. J., Hardy, S. P., Posas, F., & Valverde, M. A. (2001). Okadaic acid-sensitive activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by triphenylethylene antioestrogens in C1300 mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* **536**, 79-88.

Diel, P., Smolnikar, K., & Michna, H. (1999). The pure antiestrogen ICI 182780 is more effective in the induction of apoptosis and down regulation of BCL-2 than tamoxifen in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **58**, 87-97.

Diez, J. (2000). Apoptosis in cardiovascular diseases. *Rev. Esp. Cardiol.* **53**, 267-274.

Dixon, D. M., Valkanov, M., & Martin, R. J. (1993). A patch-clamp study of the ionic selectivity of the large conductance, Ca-activated chloride channel in muscle vesicles prepared from *Ascaris suum*. *J. Membr. Biol.* **131**, 143-149.

Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W., & Wallimann, T. (1999). Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J. Struct. Biol.* **127**, 64-71.

Doolan, C. M., Condliffe, S. B., & Harvey, B. J. (2000). Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca(2+)]<sub>i</sub> by 17β-estradiol in female rat distal colon. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1375-1386.

Duncan, L., Alper, S., Arigoni, F., Losick, R., & Stragier, P. (1995). Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science* **270**, 641-644.

Dutta, A. K., Okada, Y., & Sabirov, R. Z. (2002). Regulation of an ATP-conductive large-conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. *J. Physiol.* **542**, 803-816.

Enan, E. & Matsumura, F. (1992). Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1777-1784.

Falkenstein E, N. A. W. M. (2000b). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2072-2075.

Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., & Wehling, M. (2000a). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* **52**, 513-556.

Ferlini, C., Scambia, G., Marone, M., Distefano, M., Gaggini, C., Ferrandina, G., Fattorossi, A., Isola, G., Benedetti, P. P., & Mancuso, S. (1999). Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **79**, 257-263.

Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, A. R., Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1649-1660.

Forshaw, P. J., Lister, T., & Ray, D. E. (1993). Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. *Neuropharmacology* **32**, 105-111.

Forte, M., Guy, H. R., & Mannella, C. A. (1987). Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**, 341-350.

Freiss, G. & Vignon, F. (1994). Antiestrogens increase protein tyrosine phosphatase activity in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1389-1396.

Galbiati, F., Razani, B., & Lisanti, M. P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**, 403-411.

Galbiati, F., Volonte, D., Gil, O., Zanazzi, G., Salzer, J. L., Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Engelman, J. A., Schlegel, A., Parenti, M., Okamoto, T., & Lisanti, M. P. (1998). Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 10257-10262.

García-Campaña, A. M., Baeyens, W., Zhang, X., & Alés, F., & Gámiz, L. (2001). Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence. *Ars. Pharmaceutica* **42**, 81-107.

Gekle, M., Silbernagl, S., & Oberleithner, H. (1997). The mineralocorticoid aldosterone activates a proton conductance in cultured kidney cells. *Am. J. Physiol.* **273**, C1673-C1678.

Goldberg, Y. (1999). Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem. Pharmacol.* **57**, 321-328.

Gorman, A. M., Ceccatelli, S., & Orrenius, S. (2000). Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Dev. Neurosci.* **22**, 348-358.

Gu, Q. & Moss, R. L. (1998). Novel mechanism for non-genomic action of 17 beta-oestradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurones. *J. Physiol.* **506**, 745-754.

Gulbins, E. (2003). Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* **47**, 393-399.

Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H., & Lang, F. (2000). Physiology of apoptosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F605-F615.

Guo, H. & Damuni, Z. (1993). Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2500-2504.

Halestrap, A. P. & Brennerb, C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1507-1525.

Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 36869-36872.

Hardcastle, R., Rowlands, M. G., & Jarman, M. (1996). Antiestrogens as calmodulin antagonists. *Current Medicinal Chemistry* **3**, 211-226.

Hardy, S. P. & Valverde, M. A. (1994). Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB J.* **8**, 760-765.

Haskell, S. G. (2003). Selective estrogen receptor modulators. *South. Med. J.* **96**, 469-476.

Hazama A, F., Fan H. T., Abdullaev I., Maeno E., Tanaka S., Ando-Akatsuka Y., & Okada Y. (2000). Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl<sup>-</sup> conductances in murine C127 cells. *J. Physiol.* **523**, 1-11.

Heiden, M., Kroll, K., Thinner, F. P., & Hilschmann, N. (1996). Proteins of cytosol and amniotic fluid increase the voltage dependence of human type-1 porin. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 171-180.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.

Henriquez, M. & Riquelme, G. (2002). 17beta-estradiol and tamoxifen regulate a maxi-chloride channel from human placenta. *J. Membr. Biol.* **191**, 59-68.

Hiemke, C. & Ghraf, R. (1984). Interaction of non-steroidal antiestrogens with dopamine receptor binding. *J. Steroid Biochem.* **21**, 663-667.

Hirsch, T., Marzo, I., & Kroemer, G. (1997). Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci. Rep.* **17**, 67-76.

Hodge, T. & Colombini, M. (1997). Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J. Membr. Biol.* **157**, 271-279.

Horn, A., Reymann, S., & Thinnes, F. P. (1998). Studies on human porin. XVI: Polyamines reduce the voltage dependence of human VDAC in planar lipid bilayers--spermine and spermidine inducing asymmetric voltage gating on the channel. *Mol. Genet. Metab.* **63**, 239-242.

Hubbard, M. J. & Cohen, P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 172-177.

Ichas, F., Jouaville, L. S., & Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145-1153.

Ingebritsen, T. S. & Cohen, P. (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* **132**, 255-261.

Jakob, C., Gotz, H., Hellmann, T., Hellmann, K. P., Reymann, S., Florke, H., Thinner, F. P., & Hilschmann, N. (1995). Studies on human porin: XIII. The type-1 VDAC 'porin 31HL' biotinylated at the plasmalemma of trypan blue excluding human B lymphocytes. *FEBS Lett.* **368**, 5-9.

Janssens, V. & Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**, 417-439.

Janssens, V., Jordens, J., Stevens, I., Van Hoof, C., Martens, E., De Smedt, H., Engelborghs, Y., Waelkens, E., & Goris, J. (2003). Identification and functional analysis of two Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand motifs in the B<sup>0</sup>/PR72 subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **278**, 10697-10706.

Jentsch, T. J. (2002). Chloride channels are different. *Nature* **415**, 276-277.

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* **82**, 503-568.

Johnson, P. R., Dolman, N. J., Pope, M., Vaillant, C., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., & Erdemli, G. (2003). Non-uniform distribution of mitochondria in pancreatic acinar cells. *Cell Tissue Res.* **313**, 37-45.



Jordan, V. C. & Morrow, M. (1999). Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocr. Rev.* **20**, 253-278.

Kangas, L. (1990). Biochemical and pharmacological effects of toremifene metabolites. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **27**, 8-12.

Kayser, H., Kratzin, H. D., Thinnies, F. P., Gotz, H., Schmidt, W. E., Eckart, K., & Hilschmann, N. (1989). [Identification of human porins. II. Characterization and primary structure of a 31-kDa porin from human B lymphocytes (Porin 31HL)]. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 1265-1278.

Kelly, M. J. & Levin, E. R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 152-156.

Kelly, M. J. & Wagner, E. J. (1999). Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol. Metab* **10**, 369-374.

Kemp, P. J., MacGregor, G. G., & Olver, R. E. (1993). G protein-regulated large-conductance chloride channels in freshly isolated fetal type II alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **265**, L323-L329.

Kennely, P. J. (1998). Prokaryotic Protein-Serine/Threonine Phosphatases. In *Methods in Molecular Biology: Protein Phosphatase Protocols*, ed. Ludlow, J., pp. 1-21.

Keyse, S. M. (1995). An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1265**, 152-160.

Kim, H. P., Lee, J. Y., Jeong, J. K., Bae, S. W., Lee, H. K., & Jo, I. (1999). Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 257-262.

Kirk, J. & Kirk, K. (1994). Inhibition of volume-activated I- and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* **269**, 29389-29394.

Klinge, C. M., Bambara, R. A., & Hilf, R. (1992). What differentiates antiestrogen-liganded vs estradiol-liganded estrogen receptor action? *Oncol. Res.* **4**, 137-144.

Kourie, J. I. (1998). Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* **275**, C1-24.

Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., & Manolagas, S. C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* **104**, 719-730.

Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M. T., Meisinger, C., Kassenbrock, C. K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M. G., Neupert, W., Nargang, F. E., & Pfanner, N. (2001).

Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J. Cell Biol.* **152**, 289-300.

Lacour, S., Micheau, O., Hammann, A., Drouineaud, V., Tschopp, J., Solary, E., & Dimanche-Boitrel, M. T. (2003). Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* **22**, 1807-1816.

Lader, A. S., Xiao, Y. F., O'Riordan, C. R., Prat, A. G., Jackson, G. R., Jr., & Cantiello, H. F. (2000). cAMP activates an ATP-permeable pathway in neonatal rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C173-C187.

Lagrange, A. H., Ronnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (1997). Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Mol. Pharmacol.* **51**, 605-612.

Lantin-Hermoso, R. L., Rosenfeld, C. R., Yuhanna, I. S., German, Z., Chen, Z., & Shaul, P. W. (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* **273**, L119-L126.

Le, D. A., Wu, Y., Huang, Z., Matsushita, K., Plesnila, N., Augustinack, J. C., Hyman, B. T., Yuan, J., Kuida, K., Flavell, R. A., and Moskowitz, M. A. (2002). Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15188-15193

Leach, F. (1981). ATP determination with firefly luciferase. *Journal of Applied Biochemistry* **3**, 473-517.

Lee, S. Y., Ahn, B. T., Baik, S. H., & Lee, B. L. (1998). Tamoxifen inhibits GH3 cell growth in culture via enhancement of apoptosis. *Neurosurgery* **43**, 116-123.

Lehenkari, P., Parikka, V., Rautiala, T. J., Weckstrom, M., Dahllund, J., Harkonen, P. L., & Vaananen, H. K. (2003). The effects of tamoxifen and toremifene on bone cells involve changes in plasma membrane ion conductance. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 473-481.

Levin, E. R. (2001). Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol* **91**, 1860-1867.

Levinson, S. R. (1995). Structure and Mechanism of Voltage-Gated Ion Channels. In *Cell Physiology Source Book*, ed. Sperelakis, N., pp. 293-314.

Li, Z., Niwa, Y., Sakamoto, S., Chen, X., and Nakaya, Y. (2000). Estrogen modulates a large conductance chloride channel in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**, 506-510

Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F., & Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* **126**, 111-126.

Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.

Liu, M. Y. & Colombini, M. (1991). Voltage gating of the mitochondrial outer membrane channel VDAC is regulated by a very conserved protein. *Am. J. Physiol.* **260**, C371-C374.

Losel, R. & Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 46-56.

Lubert, E. J., Hong, Y., & Sarge, K. D. (2001). Interaction between protein phosphatase 5 and the A subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a heterotrimeric form of protein phosphatase 5. *J. Biol. Chem.* **276**, 38582-38587.

Madge, L. A., Sierra-Honigmann, M. R., & Pober, J. S. (1999). Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 13643-13649.

Mandlekar, S. & Kong, A. N. (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis.* **6**, 469-477.

Mangel, A. W., Raymond, J. R., & Fitz, J. G. (1993). Regulation of high-conductance anion channels by G proteins and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in CHO cells. *Am. J. Physiol.* **264**, F490-F495.

Mannella, C. A. (1984). Phospholipase-induced crystallization of channels in mitochondrial outer membranes. *Science* **224**, 165-166.

Martinou, J. C. (1999). Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* **399**, 411-412.

Masserini, M., Palestini, P., & Pitto, M. (1999). Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J. Neurochem.* **73**, 1-11.

Mayer R & Hemmings B. (1994). Protein phosphatase 2A- a "menage a trois". *Trends in Cell Biology* **4** , 287-291.

Mayer, B. & Oberbauer, R. (2003). Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol. Sci.* **18**, 89-94.

McDonnell, D. P. (1999). The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 301-311.

McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 141-147.

McGill, J. M., Gettys, T. W., Basavappa, S., & Fitz, J. G. (1993). GTP-binding proteins regulate high conductance anion channels in rat bile duct epithelial cells. *J. Membr. Biol.* **133**, 253-261.

Meera, P., Wallner, M., & Toro, L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5562-5567.

Mendelsohn, M. E. (2000). Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ. Res.* **87**, 956-960.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., & Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15**, 1292-1300.

Migliaccio, A., Pagano, M., & Auricchio, F. (1993). Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells. *Oncogene* **8**, 2183-2191.

Millward, T. A., Zolnierowicz, S., & Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 186-191.

Minami, T., Oomura, Y., Nabekura, J., & Fukuda, A. (1990). 17 beta-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res.* **519**, 301-307.

Monje, P. & Boland, R. (1999). Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol. Cell Endocrinol.* **147**, 75-84.

Morris, A. P. & Frizzell, R. A. (1993). Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29). II. Regulation and rundown. *Am. J. Physiol* **264**, C977-C985.

Motz, C., Martin, H., Krimmer, T., & Rassow, J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* **323**, 729-738.

Murata, K., Wu, J., & Brautigan, D. L. (1997). B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10624-10629.

Nadal, A., Diaz, M., & Valverde, M. A. (2001). The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *News Physiol. Sci.* **16**, 251-255.

Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E., & Soria, B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11603-11608.

Nadal, A., Rovira, J. M., Laribi, O., Leon-quinto, T., Andreu, E., Ripoll, C., & Soria, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* **12**, 1341-1348.



Nanahoshi, M., Nishiuma, T., Tsujishita, Y., Hara, K., Inui, S., Sakaguchi, N., & Yonezawa, K. (1998). Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 520-526.

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev Biochem.* **66**, 863-917.

Nilius, B. & Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol. Scand.* **177**, 119-147.

Nishito, Y., Usui, H., Shinzawa-Itoh, K., Inoue, R., Tanabe, O., Nagase, T., Murakami, T., & Takeda, M. (1999). Direct metal analyses of Mn<sup>2+</sup>-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn<sup>2+</sup>-independent one. *FEBS Lett.* **447**, 29-33.

Nobile, M. & Galletta, L. J. (1988). A large conductance Cl<sup>-</sup> channel revealed by patch-recordings in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 719-726.

Nordeen, S. K., Moyer, M. L., & Bona, B. J. (1994). The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanisms. *Endocrinology* **134**, 1723-1732.

Norman, A. W., Okamura, W. H., Bishop, J. E., & Henry, H. L. (2002). Update on biological actions of 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> (rapid effects) and 24R,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *Mol. Cell Endocrinol.* **197**, 1-13.

O'Donnell, M. J., Kelly, S. P., Nurse, C. A., & Wood, C. M. (2001). A maxi Cl(-) channel in cultured pavement cells from the gills of the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **204**, 1783-1794.

Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D., & Seror, S. J. (2000). Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *J. Bacteriol.* **182**, 5634-5638.

Ojasoo, T., Bignon, E., Crastes, d. P., Dore, J. C., Gilbert, J., Miquel, J. F., Pons, M., & Raynaud, J. P. (1993). Relative involvement of protein kinase C and of the estrogen receptor in the cytotoxic action of a population of triphenylethylenes on MCF7 cells as revealed by correspondence factorial (CF) analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **44**, 239-250.

Okada, Y. & Maeno, E. (2001). Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **130**, 377-383.

Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M. C., & Beach, D. (1996). p53-dependent association between cyclin G and the B' subunit of protein phosphatase 2A. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6593-6602.

Okamoto, K., Li, H., Jensen, M. R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S. S., & Prives, C. (2002). Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol. Cell* **9**, 761-771.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. (1998). Caveolins, a family of

scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 5419-5422.

Olefsky, J. M. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* **276**, 36863-36864.

Pahapill, P. A. & Schlichter, L. C. (1992). Cl<sup>-</sup> channels in intact human T lymphocytes. *J. Membr. Biol.* **125**, 171-183.

Pappas, T. C., Gametchu, B., & Watson, C. S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* **9**, 404-410.

Park, M. K., Ashby, M. C., Erdemli, G., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* **20**, 1863-1874.

Parker, M. G. (1993). Mortyn Jones Memorial Lecture. Structure and function of the oestrogen receptor. *J. Neuroendocrinol.* **5**, 223-228.

Parton, R. G. (2001). Cell biology. Life without caveolae. *Science* **293**, 2404-2405.

Pasyk, E. A. & Foskett, J. K. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **272**, 7746-7751.

Paul, S. M. & Purdy, R. H. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J.* **6**, 2311-2322.

Petronilli, V., Costantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S., & Bernardi, P. (1994). The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J. Biol. Chem.* **269**, 16638-16642.

Puchelle, E., Jacquot, J., Fuchey, C., Bulet, H., Klossek, J. M., Gilain, L., Triglia, J. M., Thinnès, F. P., & Hilschmann, N. (1993). Studies on human porin. IX. Immunolocalization of porin and CFTR channels in human surface respiratory epithelium. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **374**, 297-304.

Razani, B. & Lisanti, M. (2002). The role of caveolae and the caveolins in mammalian physiology. *Reviews in Undergraduate Research* **1**, 44-50.

Reddy, A. G., Shivaji, S., & Gupta, P. D. (1989). Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *J. Steroid Biochem.* **33**, 1229-1233.

Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., & Truscott, K. N. (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 291-336.

Reigada, D., Diez-Perez, I., Gorostiza, P., Verdaguer, A., Gomez, D. A., I, Pineda, O., Vilarrasa, J., Marsal, J., Blasi, J., Aleu, J., & Solsona, C. (2003). Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3485-3490.

Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A., & Cantiello, H. F. (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 20584-20591.

Revelli, A., Massobrio, M., & Tesarik, J. (1998). Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* **19**, 3-17.

Reymann, S., Haase, W., Krick, W., Burckhardt, G., & Thinner, F. P. (1998). Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. *Pflugers Arch.* **436**, 478-480.

Riquelme, G. & Parra, M. (1999). Regulation of human placental chloride channel by arachidonic acid and other cis unsaturated fatty acids. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 469-475.

Riquelme, G., Stutzin, A., Barros, L. F., & Liberona, J. L. (1995). A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 733-738.

Roos, N., Benz, R., & Brdiczka, D. (1982). Identification and characterization of the pore-forming protein in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **686**, 204-214.

Ropero, A. B., Fuentes, E., Rovira, J. M., Ripoll, C., Soria, B., & Nadal, A. (1999). Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J. Physiol.* **521**, 397-407.

Ropero, A. B., Soria, B., & Nadal, A. (2002). A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol. Endocrinol.* **16**, 497-505.

Rostovtseva T, C. M. (1997). VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J.* **72**, 1954-1962.

Rostovtseva TK, B. SM. (1998). ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J.* **74**, 2365-2373.

Sabirov RZ, D. A. O. Y. (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* **118**, 251-266.

Saigusa, A. & Kokubun, S. (1988). Protein kinase C may regulate resting anion conductance in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **155**, 882-889.

Salami, S. & Karami-Tehrani, F. (2003). Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines small star, filled. *Clin. Biochem.* **36**, 247-253.

Schein, S. J., Colombini, M., & Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J. Membr. Biol.* **30**, 99-120.

Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M. P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 29337-29346

Schleiff, E., Silvius, J. R., & Shore, G. C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell Biol.* **145**, 973-978.

Schlichter, L. C., Grygorczyk, R., Pahapill, P. A., & Grygorczyk, C. (1990). A large, multiple-conductance chloride channel in normal human T lymphocytes. *Pflugers Arch.* **416**, 413-421.

Schneider, G. T., Cook, D. I., Gage, P. W., & Young, J. A. (1985). Voltage sensitive, high-conductance chloride channels in the luminal membrane of cultured pulmonary alveolar (type II) cells. *Pflugers Arch.* **404**, 354-357.

Schönthal, A. (1998). Analyzing Gene Expression with the Use of Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. In *Methods in Molecular Biology: Protein Phosphatase Protocols*, ed. Ludlow, J. W., pp. 35-40.

Schuchard, M. D. & Killilea, S. D. (1989). Salt stimulation of the activation of latent protein phosphatase, Fc.M, by Mn<sup>++</sup> and by Mn/trypsin. *Biochem. Int.* **18**, 845-849.

Schwarze, W. and Kolb, H. A. (1984). Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes. *Pflügers Arch.* **402**, 281-291

Schwarzer, C., Becker, S., Awni, L. A., Cole, T., Merker, R., Barnikol-Watanabe, S., Thinner, F. P., & Hilschmann, N. (2000). Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1075-1084.

Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., & Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063-1073.

Schwiebert, E. M., Mills, J. W., & Stanton, B. A. (1994). Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line. *J. Biol. Chem.* **269**, 7081-7089.

Scott, R. H., Sutton, K. G., & Dolphin, A. C. (1993). Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci.* **16**, 153-160.

Scott, R. H., Sweeney, M. I., Kobrinsky, E. M., Pearson, H. A., Timms, G. H., Pullar, I. A., Wedley, S., & Dolphin, A. C. (1992). Actions of arginine polyamine on voltage and



ligand-activated whole cell currents recorded from cultured neurones. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 199-207.

Seeling, J. M., Miller, J. R., Gil, R., Moon, R. T., White, R., & Virshup, D. M. (1999). Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* **283**, 2089-2091.

Sheppard, D. & Valverde, M. A. (1997). Therapeutic potential of chloride channel modulators. *Ion Channel Modulators* **2**, 111-119.

Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y., & Tsujimoto, Y. (2001). Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **152**, 237-250.

Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.

Shivaji, S. & Jagannadham, M. V. (1992). Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**, 99-109.

Shoshan-Barmatz, V., Hadad, N., Feng, W., Shafir, I., Orr, I., Varsanyi, M., & Heilmeyer, L. M. (1996). VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett.* **386**, 205-210.

Silverstein, A. M., Barrow, C. A., Davis, A. J., & Mumby, M. C. (2002). Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4221-4226.

Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39.

Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., & Lisanti, M. P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7289-7304.

Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M., & Colombini, M. (1998). The topology of VDAC as probed by biotin modification. *J. Biol. Chem.* **273**, 24406-24413.

Sorgato, M. C. & Moran, O. (1993). Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 127-171.

Strack, S., Chang, D., Zaucha, J. A., Colbran, R. J., & Wadzinski, B. E. (1999). Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* **460**, 462-466.

Strohmeier, R., Roller, M., Sanger, N., Knecht, R., & Kuhl, H. (2002). Modulation of tamoxifen-induced apoptosis by peripheral benzodiazepine receptor ligands in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 99-107.

Sudo, K., Monsma, F. J., Jr., & Katzenellenbogen, B. S. (1983). Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: subcellular localization, ligand specificity, and distribution in tissues of the rat. *Endocrinology* **112**, 425-434.

Sutherland, R. L., Murphy, L. C., San Foo, M., Green, M. D., Whybourne, A. M., & Krozowski, Z. S. (1980). High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* **288**, 273-275.

Swain, L. D., Schwartz, Z., Caulfield, K., Brooks, B. P., & Boyan, B. D. (1993). Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is dependent on cell maturation. *Bone* **14**, 609-617.

Sylvia, V. L., Hughes, T., Dean, D. D., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (1998). 17β-estradiol regulation of protein kinase C activity in chondrocytes is sex-dependent and involves nongenomic mechanisms. *J. Cell Physiol.* **176**, 435-444.

Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Ellis, E. B., Helm, S. H., Gomez, R., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1996). Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J. Cell Physiol.* **167**, 380-393.

Szabo, I., Bernardi, P., & Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J. Biol. Chem.* **267**, 2940-2946.

Szewczyk, A. & Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* **54**, 101-127.

Takahashi, T., Matsushita, K., Welsh, M. J., & Stokes, J. B. (1994). Effect of cAMP on intracellular and extracellular ATP content of Cl<sup>-</sup>-secreting epithelia and 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 17853-17857.

Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., & Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 2255-2261.

Thinnes, F. P. (1992). Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 71-75.

Thinnes, F. P., Gotz, H., Kayser, H., Benz, R., Schmidt, W. E., Kratzin, H. D., & Hilschmann, N. (1989). [Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell.]. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 1253-1264.

Thomas, L., Kocsis, E., Colombini, M., Erbe, E., Trus, B. L., & Steven, A. C. (1991). Surface topography and molecular stoichiometry of the mitochondrial channel, VDAC, in crystalline arrays. *J. Struct. Biol.* **106**, 161-171.

Tian, L., Knaus, H. G., & Shipston, M. J. (1998). Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **273**, 13531-13536.

Tonks, N. K. & Neel, B. G. (1996). From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **87**, 365-368.

Uehara, A., Fill, M., Velez, P., Yasukochi, M., & Imanaga, I. (1996). Rectification of rabbit cardiac ryanodine receptor current by endogenous polyamines. *Biophys. J.* **71**, 769-777.

Vaca, L. & Kunze, D. L. (1992). Anion and cation permeability of a large conductance anion channel in the T84 human colonic cell line. *J. Membr. Biol.* **130**, 241-249.

Valverde, M. A. (1999). CIC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millennium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 509-516

Valverde, M. A., Hardy, S. P., & Diaz, M. (2002). Activation of Maxi-Cl<sup>-</sup> channels by antiestrogens and phenothiazines in NIH3T3 fibroblasts. *Steroids* **67**, 439-445.

Valverde, M. A., Hardy, S. P., & Sepulveda, F. V. (1995). Chloride channels: a state of flux. *FASEB J.* **9**, 509-515.

Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C., & Latorre, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* **285**, 1929-1931.

Van Hoof, C. & Goris, J. (2003). Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochim. Biophys. Acta* **1640**, 97-104.

Villalobos, C., Nunez, L., Montero, M., Garcia, A. G., Alonso, M. T., Chamero, P., Alvarez, J., & Garcia-Sancho, J. (2002). Redistribution of Ca<sup>2+</sup> among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* **16**, 343-353.

Wali, R. K., Baum, C. L., Sitrin, M. D., & Brasitus, T. A. (1990). 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J. Clin. Invest* **85**, 1296-1303.

Wang, S. J., Omori, N., Li, F., Jin, G., Zhang, W. R., Hamakawa, Y., Sato, K., Nagano, I., Shoji, M., & Abe, K. (2002). Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci. Lett.* **331**, 115-118.

Watt, W. C., Lazarowski, E. R., & Boucher, R. C. (1998). Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y<sub>2</sub> receptors in airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **273**, 14053-14058.

Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 365-393.

Wehling, M., Christ, M., & Gerzer, R. (1993). Aldosterone-specific membrane receptors and related rapid, non-genomic effects. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 1-4.

Weiss, D. J. & Gurbide, E. (1988). Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens. *J. Steroid Biochem.* **31**, 671-676.

White, R. E., Schonbrunn, A., & Armstrong, D. L. (1991). Somatostatin stimulates Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels through protein dephosphorylation. *Nature* **351**, 570-573.

Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* **325**, 289-297.

Yamamoto, H., Hinoi, T., Michiue, T., Fukui, A., Usui, H., Janssens, V., Van Hoof, C., Goris, J., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2001). Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **276**, 26875-26882.

Yan, Z., Fedorov, S. A., Mumby, M. C., & Williams, R. S. (2000). PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1021-1029.

Yu, S. P., Canzoniero, L. M., & Choi, D. W. (2001). Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 405-411.

Yu, W. H. & Forte, M. (1996). Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 93-100.

Yu, W. H., Wolfgang, W., & Forte, M. (1995). Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. *J. Biol. Chem.* **270**, 13998-14006.

Zachar, J. & Hurnak, O. (1994). Arachidonic acid blocks large-conductance chloride channels in L6 myoblasts. *Gen. Physiol. Biophys.* **13**, 193-213.

Zamzami, N. & Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 67-71.

Zhou, J., Pham, H. T., & Walter, G. (2003). The formation and activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **278**, 8617-8622.

Zolnierowicz, S. (2000). Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1225-1235.

Zoratti, M. & Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139-176.