

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**BASES MOLECULARES DE LA DESMIELINIZACIÓN CAUSADA
POR MUTACIONES EN EL GEN *GJA1* QUE CODIFICA LA
CONEXINA 43 ASTROCITARIA**

TESIS DOCTORAL

ADELA ESCUDERO LÓPEZ

**BASES MOLECULARES DE LA DESMIELINIZACIÓN CAUSADA
POR MUTACIONES EN EL GEN *GJA1* QUE CODIFICA LA
CONEXINA 43 ASTROCITARIA**

Tesis doctoral presentada por:

ADELA ESCUDERO

Para optar al grado de Doctora en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación
Clínica por la Universidad de Sevilla

Dirigida por los Doctores:

LUIS C. BARRIO CALVO
JESÚS MOLANO MATEOS

Unidad de Neurología Experimental. Departamento de Investigación.
Hospital Ramón y Cajal
Unidad de Genética Molecular. Instituto de Genética Médica y Molecular.
Hospital Universitario La Paz.

Madrid
2017

ABREVIATURAS

A	Sensibilidad al voltaje. Parámetro de la función de Boltzmann
A:A	Acoplamiento astrocito-astrocito
aa	Aminoácido
AD	Herencia autosómica dominante
A:E	Acoplamiento astrocito-célula endotelial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Región codificante del ácido desoxirribonucleico
AQP4	Transportador acuaporina-4
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
AR	Herencia autosómica recesiva
Ca²⁺	Ión calcio
Cl⁻	Ión cloro
CBX	Carbenoxolona
CF	Carboxifluoresceína
CNP	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa
CQ	Cloroquina
CT	Dominio carboxilo terminal
Cx	Conexina
Cx43WT	Conexina 43 silvestre (wild type)
DMEM	Medio Dulbecco
dKO	Ratón al que se le ha anulado la expresión de dos genes, del inglés Knock-out
dsRED	Proteína fluorescente roja
E1-E2	Dominio del asa extracelular primera - segunda
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
Er	Potencial de reversión
F	Segregación familiar
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
g_h / G_h	Conductancia macroscópica de los hemicanales (sin normalizar/normalizada)
GJ	Del inglés "Gap junction" uniones o placas en hendidura
g_j / G_j	Conductancia macroscópica intercelular (sin normalizar/normalizada)
G_{jmax}	Conductancia intercelular máxima normalizada
G_{jmin}	Conductancia intercelular mínima normalizada
g_{ji} / G_{ji}	Valor inicial de la conductancia intercelular (sin normalizar /normalizado)
g_{jss} / G_{jss}	Valor de estado de la conductancia intercelular (sin normalizar /normalizado)
h.d.a.	Horas después del apareamiento
h.d.i	Horas después de la inyección
I_h	Corriente de hemicanal
I_j	Corriente intercelular
I_m	Corriente transmembrana
I_{min} / I_{max}	Valor mínimo/máximo de corriente transmembrana
K⁺	Ión potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAG	Glucoproteína asociada a la mielina
MBP	Proteína básica de la mielina
Mg²⁺	Ión magnesio
MOG	Glucoproteína oligodendrocitaria de la mielina

MOPS	Ácido 3-(ALmorfolín)propanosulfónico
Na⁺	Ión sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
N2a	Línea celular de neuroblastoma de ratón
N.A	No acoplado
NB	Neurobiotina
ND	No descrito
n.s.	Diferencia no significativa estadísticamente
NT	Dominio amino terminal
O:A	Acoplamiento oligodendrocito-astrocito
ODDD	Displasia oculo-dento-digital
O:O	Acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
PDGFα	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina E2 o dinoprostona
PMD	Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher
PMLD	Enfermedad tipo Pelizaeus-Merzbacher
Ratón KI	Ratón al que se le ha insertado una mutación en un gen, del inglés Knock-in
Ratón KO	Ratón al que se le ha anulado la expresión de un gen , del inglés Knock-out
R.E.	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Origen esporádico
SB	Sustancia blanca
SDS	Dodecilsulfato sódico
SG	Sustancia gris
SNC	Sistema nervioso central
SPG	Paraparesia espástica
TM1, TM2, TM3 y TM4	Dominios transmembrana: primero, segundo, tercero y cuarto
UTR	Del inglés "UnTranslated Region", región del gen no traducida
U.A	Unidades arbitrarias
V_h	Potencial de fijación
V_j	Potencial o voltaje intercelular
V_m	Potencial de membrana
V₀	Voltaje en el que la conductancia se reduce a la mitad. Parámetro de función de Boltzmann
YP	Yoduro de propidio
Z	Carga asociada al sensor

RESUMEN

Existe un grupo patologías de la mielina de etiología autoinmune y genética que se originan por alteraciones en moléculas claves implicadas en los mecanismos gliales que mantienen la integridad de la mielina en el sistema nervioso central. Entre ellas se encuentra la displasia oculodentodigital (ODDD), una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *GJA1* que codifica la conexina 43 (Cx43), y que se caracteriza por anomalías esqueléticas, malformaciones craneofaciales y que en ocasiones también cursa con paraparesia espástica, una patología causada por desmielinización. Sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales las mutaciones dominantes de ODDD en la Cx43 astrocitaria pueden causar la destrucción de la mielina formada por los oligodendrocitos. Con este objetivo, en una primera etapa se realizaron los estudios genéticos en el gen *GJA1* de pacientes con paraparesia espástica asociada a un fenotipo de ODDD y se identificaron en heterocigosis las mutaciones pR148Q y pV85M y en una segunda etapa, se realizó el su ensayo funcional. Los resultados de este ensayo muestran que la función de hemicanal y la función de adhesión de los canales intercelulares están preservadas en las dos mutaciones, sin embargo ambas mutaciones abolen la función de comunicación intercelular ya que los canales que forman no son funcionales. En la condición de heteocigosis de los pacientes, las dos mutaciones ejercen un potente efecto de inhibición dominante sobre el acoplamiento intercelular inducido por la Cx43 silvestre formando canales consigo misma y con la Cx47 oligodendrocitaria. Estos resultados sugieren que la desmielinización causante de la paraparesia espástica en los pacientes con displasia oculodentodigital podría originarse como consecuencia de la significativa reducción de la comunicación intercelular astrocito-astrocito y astrocito-oligodendrocito; esta vía de comunicación glial es esencial en el mecanismo de aclaramiento de los iones K^+ , que se acumulan en la región periaxonal internodal de las fibras mielínicas durante la conducción saltatoria, hasta el lecho vascular o al líquido cefalorraquídeo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 COMPOSICIÓN, FUNCIÓN y PATOLOGÍAS DE LA MIELINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	2
1.2 ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS CONEXINAS	5
1.3 SINCITIO PANGLIAL.....	7
1.3.1 COMUNICACIÓN ASTROCITO-ASTROCITO.....	8
1.3.2 COMUNICACIÓN INTERCELULAR ASTROCITO - CÉLULAS EPENDIMARIAS	11
1.3.3 COMUNICACIÓN INTERCELULAR ASTROCITO - OLIGODENDROCITO	11
1.4 FUNCIÓN DEL SINCITIO PANGLIAL EN EL MECANISMO DE TAMPONAMIENTO DE POTASIO PERIAXONAL	12
1.5 PATOLOGÍAS CON AFECTACIÓN DE LA MIELINA ASOCIADAS A MUTACIONES EN GENES DE CONEXINAS GLIALES. MECANISMOS PATOGÉNICOS.....	13
1.6 HIPÓTESIS.....	23
II. OBJETIVOS	24
III. MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1 ESTUDIOS GENÉTICOS.....	27
3.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN	27
3.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pBSXG	27
3.2.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pIRES.....	30
3.3 SISTEMAS DE EXPRESIÓN.....	30
3.3.1 ENSAYO FUNCIONAL EN OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	30
3.3.1.1 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO.....	33
3.3.1.2 OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y MICROINYECCIÓN DE LOS OOCITOS	33
3.3.1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL Y EN LA SUPERFICIE CELULAR	34
3.3.1.1 ESTUDIOS DE CAPTACIÓN DE COLORANTE EN OOCITOS AISLADOS	37
3.3.1.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	37
3.3.2 ENSAYO FUNCIONAL EN LA LÍNEA CELULAR N2a.....	40
3.3.2.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN EN LA LÍNEA CELULAR N2a	40
3.3.2.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL EN LA LÍNEA CELULAR N2a	40
3.3.2.3 INMUNOCITOQUÍMICA EN LA LÍNEA CELULAR N2a	41
3.3.2.4 TRANSFERENCIA INTERCELULAR DE COLORANTE EN LA LÍNEA CELULAR N2a	
41	
3.3.3 ENSAYO FUNCIONAL EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS HUMANOS	42
3.3.3.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS	42

3.3.3.2	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS	43
3.3.3.3	INMUNOCITOQUÍMICA EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS ...	43
3.3.3.4	TRANSFERENCIA INTERCELULAR DE COLORANTE EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS	43
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
IV.	RESULTADOS	45
3.5	IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN <i>GJA1</i> EN PACIENTES CON PARAPRESIA ESPÁSTICA ASOCIADA A DISPLASIA OCULODENTODIGITAL.	46
3.6	ENSAYO FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LA CONEXINA-43 ASOCIADAS A PARAPRESIA ESPÁSTICA	49
3.6.1	BIOSÍNTESIS Y FUNCIONALIDAD DE LOS HEMICANALES MUTADOS DE Cx43	49
3.6.1.1	NIVELES DE EXPRESIÓN TOTAL Y EN MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS MUTANTES DE Cx43. TASA DE DEGRADACIÓN.	49
3.6.1.2	PERMEABILIDAD A YODURO DE PROPIDIO. REGULACIÓN POR LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE CATIONES DIVALENTES.	53
3.6.1.3	CORRIENTES DE LOS HEMICANALES. REGULACIÓN POR EL POTENCIAL DE MEMBRANA (<i>V_m</i>).	55
3.6.1.4	FORMACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS CANALES INTERCELULARES MUTADOS	59
3.6.1.5	FORMACIÓN DE UNIONES EN HENDIDURA.....	59
3.6.1.6	ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE.	59
3.6.1.7	ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO INTERCELULAR.....	61
3.6.1.8	DEPENDENCIA DEL VOLTAJE INTERCELULAR DE LOS CANALES INTERCELULARES MUTADOS.	64
3.6.1.9	EFFECTO DE INHIBICIÓN DOMINANTE DE LAS MUTACIONES DE Cx43 SOBRE EL ACOPLAMIENTO INTERCELULAR INDUCIDO POR LA Cx43 ENDÓGENA EN UNA LÍNEA PRIMARIA DE ASTROCITOS HUMANOS.	69
3.6.2	INTERACCIÓN ENTRE LAS CONEXINAS SILVESTRE Y MUTADAS CON LA CONEXINA-30 ASTROCITARIA.....	72
3.6.2.1	EFFECTO DE TRANSREGULACIÓN DE LA Cx43 SILVESTRE SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA Cx30.	72
3.6.2.2	FORMACIÓN DE UNIONES EN HENDIDURA DE Cx43 Y Cx30.....	74
3.6.2.3	ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE DE Cx43 Y Cx30	74
3.6.2.4	ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO DE Cx43 y Cx30. DEPENDENCIA DE VOLTAJE INTERCELULAR (<i>V_j</i>).....	77
3.6.2.5	Efecto de las mutaciones R148Q y V85M sobre el acoplamiento intercelular de Cx30	

3.6.3 INTERACCIÓN ENTRE LAS CONEXINAS-43 SILVESTRE Y MUTADAS ASTROCITARIAS Y LA CONEXINA-47 OLIGODENDROCITARIA.....	84
3.6.3.1 FORMACIÓN DE PLACAS INTERCELULARES ENTRE LAS Cx43 MUTADAS Y LA Cx47.....	84
3.6.3.1 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE ENTRE LAS UNIONES HETERÓLOGAS FORMADAS POR LOS MUTANTES DE Cx43 Y LA Cx47.	86
3.6.3.2 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO DE LOS CANALES FORMADOS POR LA Cx43 SILVESTRE Y MUTADAS CON LA Cx47. DEPENDENCIA DEL VOLTAJE INTERCELULAR.....	87
V. DISCUSIÓN.....	94
6.1 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LAS MUTACIONES DE ODDD ASOCIADAS A PARAPRESIA ESPÁSTICA.....	96
6.2 SÍNTESIS Y FUNCIONALIDAD DE LOS HEMICANALES MUTADOS	97
6.3 COMUNICACIÓN ASTROCITARIA. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE EL ACOPLAMIENTO MEDIADO POR Cx43 Y POR Cx30.	98
6.4 COMUNICACIÓN OLIGODENDROASTROCITARIA. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE EL ACOPLAMIENTO MEDIADO POR Cx43-Cx47.	103
VI. CONCLUSIONES.....	106
VII. BIBLIOGRAFIA.....	108

I. INTRODUCCIÓN

1.1 COMPOSICIÓN, FUNCIÓN Y PATOLOGÍAS DE LA MIELINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La vaina de mielina es una estructura altamente especializada de los vertebrados que rodea al axón y que resulta esencial para la transmisión rápida y a largas distancias de los potenciales de acción (Scherer, Xu et al. 1998; Seidl 2014). En el sistema nervioso central (SNC), la vaina de mielina la forman los oligodendrocitos; la membrana plasmática de los oligodendrocito se enrolla múltiples veces alrededor del axón formando los denominados segmentos internodales que dejan zonas carentes de mielina conocidas como nodos de Ranvier; un único oligodendrocito puede formar de 20-40 segmentos internodales en distintos axones (Figura 1A) (White and Kramer-Albers 2014; Rasband and Peles 2015). Este proceso requiere la síntesis de una gran cantidad de membrana plasmática con un alto contenido de colesterol, fosfolípidos y glicolípidos, y de proteínas específicas de la mielina como son la proteolipoproteína de la mielina (PLP y la isoforma DM-20), la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína asociada a mielina (MAG), la fosfodiesterasa CNP y la glucoproteína oligodendrocitaria de la mielina (MOG) (Han, Myllykoski et al. 2013; Schmitt, Castelvetti et al. 2015). La relevancia fisiológica de la mielina radica en que al comportarse como un elemento aislante las corrientes de sodio que generan los potenciales de acción se producen exclusivamente en las regiones de los nodos de Ranvier, dando lugar a lo que se denomina “conducción saltatoria” (Seidl 2014). En los axones no mielinizados, la propagación del potencial de acción ocurre a lo largo de todo el axón a medida que se va despolarizando la membrana y se van abriendo los canales de sodio dependientes de voltaje. La “conducción saltatoria” de los potenciales de acción permite una transmisión más rápida, a altas frecuencias y a largas distancias de los potenciales de acción (Figura 1B) (Waxman and Bennett 1972; Seidl 2014; Rasband and Peles 2015).

Las patologías de la mielina central asociadas a una causa genética se conocen con el nombre de leucodistrofias. Bajo la denominación de leucodistrofias se engloba un grupo muy heterogéneo de enfermedades raras, que pueden originarse por un defecto en la formación de la mielina (i.e., tipo hipomielinizante) o por un defecto en la degeneración de la misma posterior a la formación (i.e., tipo desmielinizante) (Tabla 1). Dentro de las leucodistrofias se ha identificado a un grupo de ellas asociadas a la familia de proteínas denominadas conexinas (Cx), como las mutaciones recesivas en el gen *GJC2* de la Cx47 que producen en la mayoría de los casos una leucodistrofia de tipo hipomielinizante denominada enfermedad tipo Pelizaeus Merzbacher (Uhlenberg, 2004 #2176), aunque también se ha identificado una mutación que produce un cuadro de tipo desmielinizante que solo cursa con una paraparesia espástica (Orthmann-Murphy, Salsano et al. 2009) y las mutaciones en el gen *GJA1* que codifica la conexina 43 que causan un síndrome conocido como displasia oculodentodigital.

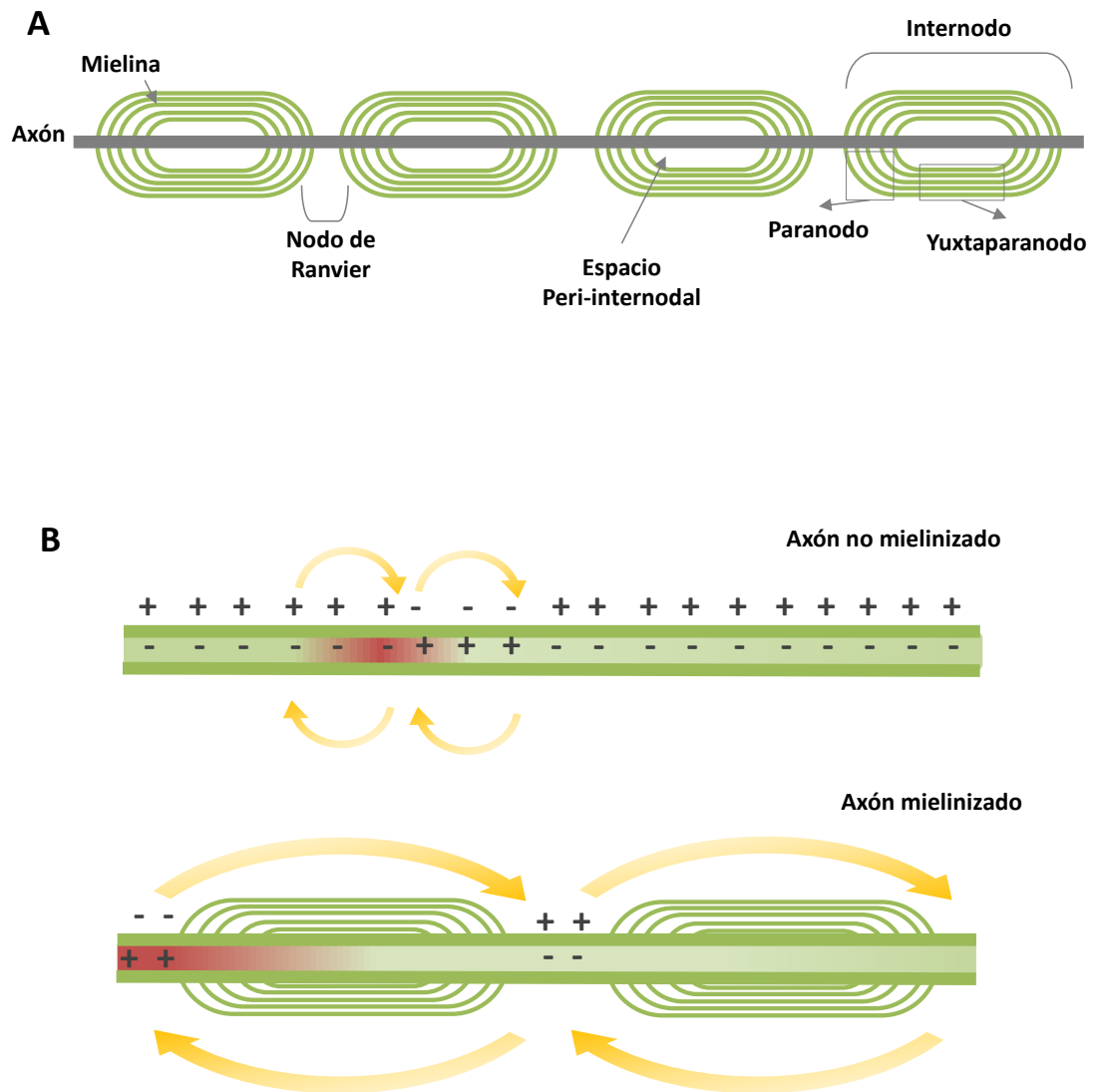


Figura 1. Estructura y función de la vaina de mielina. **A)** Esquema de una fibra axonal mielinizada, en la que se distinguen la alternancia de zonas mielinizadas o mielina internodal y no mielinizadas denominadas nodos de Ranvier. En la región internodal se distingue una zona central de mielina compactada o yuxtaparano y otra de mielina no compactada o paranodo; entre el yuxtaparano y el axón se encuentra un espacio virtual denominado compartimento periinternodal. **B)** Conducción gradual y saltatoria de los potenciales de acción en los axones no mielinizados y mielinizados (arriba y abajo).

Tabla 1. Tipos de leucodistrofias.

ENFERMEDAD	INCIDENCIA	GEN	HERENCIA
LEUCODISTROFIAS DESMIELINIZANTES			
Adrenoleucodistrofia	1/21.000	<i>ABCD1</i>	<i>Ligada al X</i>
Enfermedad de Krabbe	1/100.000	<i>GALC</i>	AR
Fenilcetonuria	1/1000	<i>PAH</i>	AR
Leucodistrofia metacromática	1/40.000	<i>ARSA, PSAP</i>	AR
Displasia oculodentodigital	1/1.000.000	<i>GJA1</i>	AD/AR
LEUCOSTROFIAS HIPOMIELINIZANTES			
Enfermedad Pelizaeus–Merzbacher	1/400.000	<i>PLP1</i>	Ligada al X
Enfermedad tipo Pelizaeus-Merzbacher	1/200.000- 500.000	<i>GJC2</i>	AR
Enfermedad de Alexander	Desconocido	<i>GFAP</i>	AR/Esporádica
Síndrome de Cockayne	Desconocido	<i>ERCC6, ERCC8</i>	AR
Síndrome de Tay	Desconocido	<i>ERCC2, ERCC3, GTF2H5, MPLKIP</i>	AR
Hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (H-ABC)	1/1.000.000	<i>TUBB4A</i>	Esporádica
Hipomielinización con catarata congénita	1/1.000.000	<i>FAM126A</i>	AR
Hipomielinización con afectación del tronco cerebral y de la médula espinal y espasticidad de las piernas (HBSL)	1/1.000.000	<i>DARS</i>	AR
Enfermedad por depósito de ácido siálico libre	Desconocido	<i>SLC17A5</i>	AR
Fucosidosis	1/1.000.000	<i>FUCA1</i>	AR
Síndrome 4H /Leucodistrofias asociadas a Pol III	1/1.000.000	<i>POLR3A, POLR3B</i>	AR
Síndrome de ataxia infantil con hipomielinización central (CACH)	Desconocido	<i>eiFB2</i>	AR
Síndrome de Allan-Herndon-Dudley	1/1.000.000	<i>MCT8</i>	Ligado al X

En negrita, leucodistrofias causadas por mutaciones en genes de conexinas.

1.2 ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS CONEXINAS

Las conexinas son proteínas de membrana capaces de formar canales intercelulares entre dos células adyacentes permitiendo el paso de pequeñas moléculas de hasta 1 KDa (Abascal and Zardoya 2013). En su estructura se diferencia un dominio carboxilo terminal citoplasmático (CT), un dominio aminoterminal citoplasmático (NT), un asa citoplasmática (L), dos asas extracelulares (E) y cuatro dominios transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4) (Sohl, Maxeiner et al. 2005) (Figura 2A). Cada subunidad de conexina se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplasmático (R.E) (Dbouk, Mroue et al. 2009), posteriormente 6 subunidades oligomerizan (Koval, Molina et al. 2014) formando un anillo hexamérico conocido como hemicanal o conexón que llega a la membrana plasmática a través de un mecanismo de transporte mediado por actina (Lauf, Giepmans et al. 2002; Dbouk, Mroue et al. 2009). Los conexones homoméricos son aquellos formados por un único tipo de conexina mientras que los conexones heteroméricos se componen de dos tipos de conexina diferentes (Figura 2A), sin embargo, no todas las conexinas son compatibles entre sí para formar el hemicanal indicando que la formación de heteroméricos es un proceso altamente selectivo (Barrio, Suchyna et al. 1991; Eghbali, Kessler et al. 1991; Fishman, Moreno et al. 1991; Veenstra, Wang et al. 1994; Koval, Molina et al. 2014). Una vez llegan a membrana, dos hemicanales de células adyacentes pueden interactuar y formar un canal intercelular completo (Sohl, Maxeiner et al. 2005). Estos canales a su vez se agrupan formando regiones especializadas en la zona de aposición entre dos células conocidas como placas o uniones en hendidura. Los canales intercelulares pueden ser homotípicos cuando los hemicanales que lo integran son iguales o heterotípicos cuando son distintos (Figura 2A) y al igual que pasa con las subunidades de conexina, las combinaciones son altamente selectivas (Stauffer 1995; Jiang and Goodenough 1996; Falk, Buehler et al. 1997; Diez, Ahmad et al. 1999). La composición del canal en cuanto a conexinas le confiere unas propiedades biofísicas de permioselectividad iónica y conductancia unitaria así como una regulación específica de los mecanismos de compuerta (Gonzalez, Gomez-Hernandez et al. 2007).

En el proceso de degradación, los canales intercelulares formados no pueden separarse de nuevo en conexones de manera que se generan vesículas de doble membrana que se degradarán en una de las dos células que forman los canales intercelulares (Jordan, Chodock et al. 2001). Una vez internalizadas aparece una estructura de doble membrana llamada endosoma (Musil, Le et al. 2000) que puede degradarse vía proteosoma (Laing and Beyer 1995) o vía lisosoma (Musil, Le et al. 2000; Thomas, Zosso et al. 2003). Esta última vía implica la formación de un autofagosoma que se fusiona con el lisosoma dando lugar al fagolisosoma donde se activan las enzimas lisosomales que degradan las conexinas (Iyyathurai, Decuypere et al. 2016); (Thomas, Zosso et al. 2003) (Figura 2B).

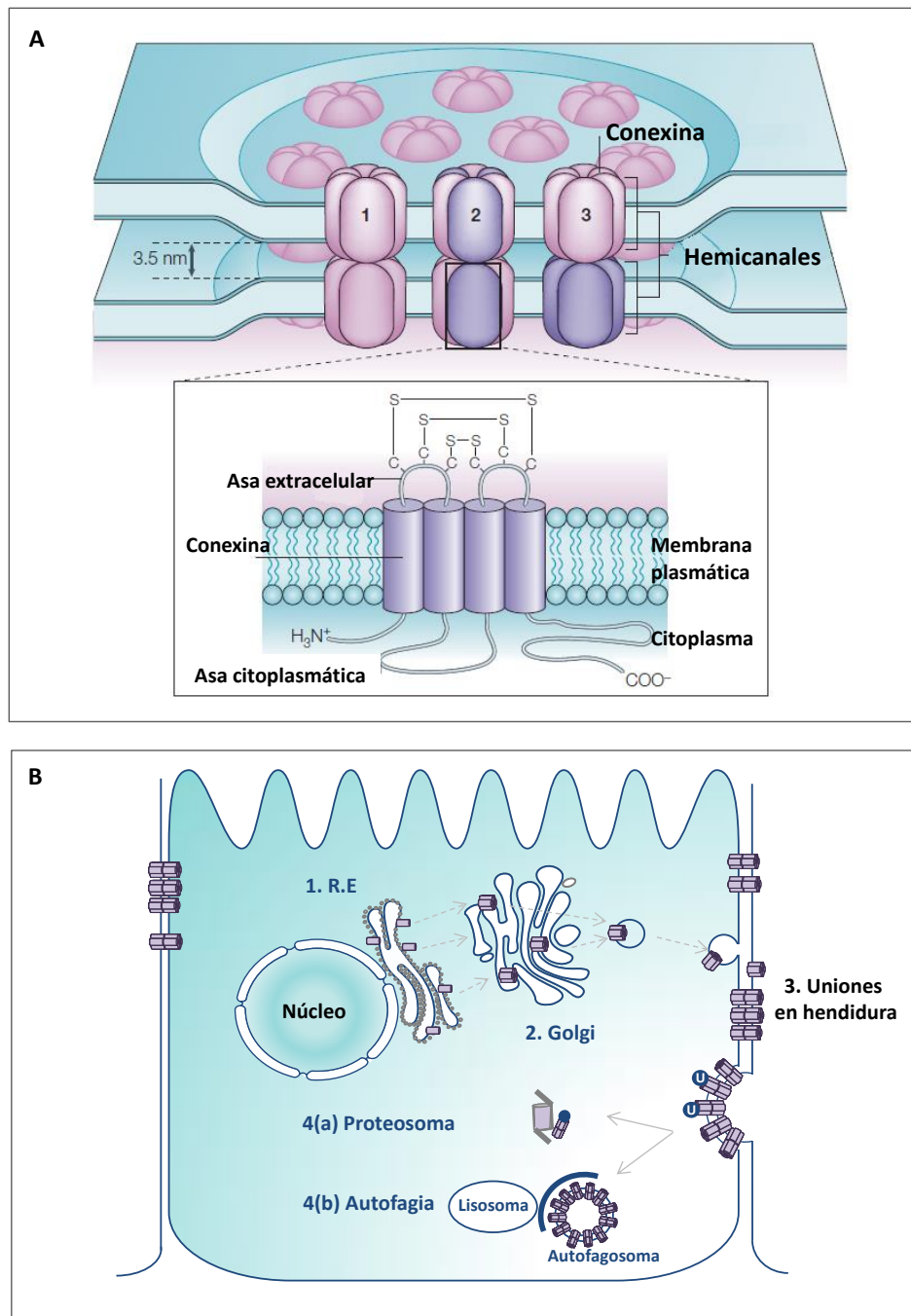


Figura 2. Hemicanales y canales de conexina. A. Tipos de hemicanales y canales intercelulares (arriba, modificada de Söhl, 2005). En función del tipo de conexinas que forman el canal encontraremos canales homoméricos homotípicos (1), heteroméricos homotípicos (2) u homoméricos heterotípicos (3). **Estructura de la subunidad de conexinas (abajo).** Todas las conexinas comparten la misma estructura topológica que consiste en un dominio carboxilo terminal citoplasmático (CT), un dominio aminoterminal citoplasmático (NT), un asa citoplasmática (L), dos asas extracelulares (E) y cuatro dominios transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4). (modificadas de (Sohl, Maxeiner et al. 2005)). **B. Etapas de biosíntesis/degradación de un hemicanal y canal intercelular.** Se sintetizan las subunidades en el R.E, 6 subunidades oligomerizan para formar un hemicanal o conexón en el Golgi, llega a membrana donde forma hemicanales o canales intercelulares capaces de poner en comunicación los citoplasmas de dos células adyacentes y finalmente se degrada por invaginación simple (hemicanal) o doble (canal completo) de la membrana plasmática vía proteosoma o autofagia.

Los hemicanales que llegan a membrana presentan en condiciones fisiológicas una probabilidad de apertura baja que viene determinada principalmente por: la presencia de cationes divalentes (Mg^{++} y Ca^{++}) en el medio extracelular (Verselis and Srinivas 2008), por modificaciones postraduccionales (Johnstone, Kroncke et al. 2012) y por despolarización del potencial de membrana (Ebihara and Steiner 1993; Gonzalez, Gomez-Hernandez et al. 2006). Sin embargo la actividad de los hemicanales en condiciones basales se puede ver incrementada en determinadas situaciones por un aumento de Ca^{2+} intracelular (De Vuyst, Wang et al. 2009) y una vez abiertos permiten la permeabilización de diferentes tipos de moléculas como glucosa y glutamato (Hansen, Ye et al. 2014), NAD^+ (Bruzzone, Guida et al. 2001) o PGE_2 (Dringen, Bishop et al. 2007). Fisiológicamente los hemicanales son importantes en la regulación del potencial de membrana y en la liberación de moléculas de señalización paracrina y autocrina. Además se ha demostrado que tienen un importante papel en multitud de procesos biológicos como: la regulación basal de la transmisión en la sinapsis glutamatérgica (Chever, Lee et al. 2014), la formación del hueso (Plotkin 2014), la modulación de la liberación sináptica de los fotorreceptores en la retina (Janssen-Bienhold, Schultz et al. 2001), la regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos de la piel (Levit, Mese et al. 2012), o la liberación de ATP en células β -pancreáticas (Pizarro-Delgado, Fasciani et al. 2014).

Los canales intercelulares que median el intercambio de moléculas entre células también son esenciales en multitud de procesos fisiológicos entre los que se incluye el control de la proliferación y diferenciación celular (Goldberg, Valiunas et al. 2004), la coordinación de la actividad metabólica y el mantenimiento de la homeostasis celular (Mathias, White et al. 2010). Dentro del sistema nervioso central participan en homeostasis extracelular, en el mantenimiento de las fibras mielínicas (Rash 2010), en la transmisión de señales de tipo eléctrico (Connors and Long 2004) y además permite la comunicación entre células gliales que dan soporte metabólico a las neuronas dando lugar a una red de células gliales conocida como sincitio panglial.

1.3 SINCITIO PANGLIAL

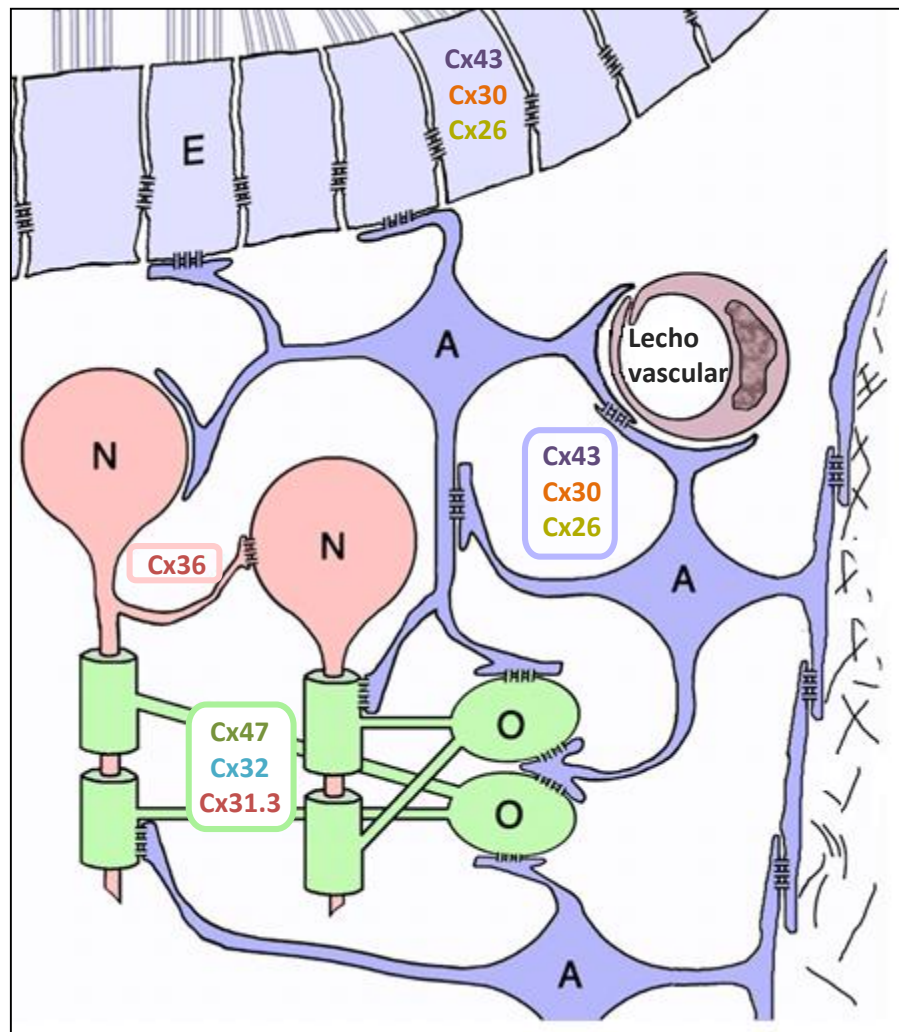
El sincitio panglial está constituido por una amplia red de células de la macroglía, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias, que se comunican entre sí por medio de canales intercelulares (Maglione, Tress et al. 2010). Las neuronas también presentan comunicación mediada por conexinas, sin embargo, las células de la glía no se comunican intercelularmente con las neuronas sino que existen dos sistemas independientes que se fundamentan en la expresión celular específica de las conexinas y en la especificidad de las distintas conexinas para combinarse entre sí: el sistema neuronal (N:N) acoplado por sinapsis de tipo eléctrico y el sistema de células gliales en el que se acoplan los astrocitos entre sí (A:A), los astrocitos con las células ependimarias (A:E), los astrocitos

con los oligodendrocitos (A:O) y los oligodendrocitos entre sí (O:O) (Rash, Yasumura et al. 2001) (Figura 3, Tabla2).

1.3.1 COMUNICACIÓN ASTROCITO-ASTROCITO

Los astrocitos expresan de forma mayoritaria la Cx43 seguida por la Cx30 mientras que sólo algunos expresan la Cx26 (Dermietzel, Traub et al. 1989; Dahl, Manthey et al. 1996; Nagy, Patel et al. 1999; Rash, Yasumura et al. 2001; Zahs, Kofuji et al. 2003; Altevogt and Paul 2004). En la especie humana, la Cx43 se expresa, a partir del duodécimo día de gestación, en astrocitos de sustancia blanca y sustancia gris así como en los pies astrocitarios perivasculares (Dermietzel, Traub et al. 1989; Kunzelmann, Schroder et al. 1999) mientras que la conexina 30 no se expresa hasta la tercera semana de vida en sustancia gris, donde colocaliza con Cx43 (Kunzelmann, Schroder et al. 1999; Nagy, Patel et al. 1999). La Cx26 a diferencia de las otras dos, se expresa de forma minoritaria, únicamente en algunos astrocitos de las leptomeninges y de regiones subcorticales del cerebro (Nagy, Lynn et al. 2011) . Los estudios in vitro de compatibilidad muestran que la Cx43 no se combina con la Cx26 (Elfgang, Eckert et al. 1995) ni con la Cx30, aunque hay controversia (Manthey, Banach et al. 2001; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007), a diferencia de la Cx30 que sí es capaz de formar canales funcionales heterotípicos y heteroméricos Cx26-Cx30 (Yum, Zhang et al. 2007). Estos datos sugieren que existen cuatro tipos diferentes de canales que median la comunicación astrocitaria: canales homoméricos de Cx43, Cx30, Cx26 y canales heterotípicos/heteroméricos de Cx26-Cx30. (Figura 3, Tabla2).

Es importante esclarecer, además de la compatibilidad entre conexas, qué canales tienen mayor peso en la comunicación intercelular en astrocitos. Para ello, varios investigadores realizaron estudios del acoplamiento in vivo en ratones deficientes en una o varias conexas astrocitarias. Los ratones deficientes en conexina Cx43 y en Cx30 (dKO Cx43/Cx30) mostraron bloqueo por completo del acoplamiento en hipocampo y presentaban desmielinización y vacuolización (Lutz, Zhao et al. 2009; Maglione, Tress et al. 2010). Al estudiar ratones deficientes únicamente en Cx30 se observó una reducción del acoplamiento en hipocampo del 20% (Dere, De Souza-Silva et al. 2003) sin embargo, cuando eran deficientes en Cx43 se observaba en rodajas de cuerpo caloso, un aumento de la expresión de Cx30 y una reducción del acoplamiento del 50% sin alteración de la mielina. Dicha reducción es significativamente menor a la esperada por sobreexpresión compensadora de la Cx30 (Theis, Speidel et al. 2004), sugiriendo que la Cx26 y la Cx43 son las conexas que menos y más contribuyen al acoplamiento respectivamente y que la Cx30 podría compensar, aumentando su expresión, aunque no sustituiría por completo el acoplamiento entre astrocitos carentes de Cx43 (Tabla 3).



A:A	O:O	O:A
Cx43, Cx30, Cx26	Cx47, Cx32, Cx31.3	Cx43, Cx30, Cx26 Cx47, Cx32

Figura 3. Sistemas de comunicación intercelular neuronal y glial. Composición del sincitio panglial: neuronas (N), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y células endoteliales (E) donde se indican las diferentes conexinas expresadas por cada tipo celular. La Cx36 se expresa en neuronas; Las conexinas Cx43, Cx30 y Cx26 se expresan en astrocitos; las conexinas Cx47, Cx32 y Cx31.3 en oligodendrocitos y las conexinas Cx43, Cx37 y Cx40 en células endoteliales. La tabla resume la compatibilidad homotípica y heterotípica existente entre conexinas astrocitarias, oligodendrocitarias y oligodendro-astrocitarias (el círculo rojo indica controversia entre autores)

Tabla 2. Expresión y compatibilidad de conexinas de la glía. Tipo de célula glial donde se expresa la conexina: astrocito (A), oligodendrocito (O); Localización: sustancia gris (SG), sustancia blanca (SB); Compatibilidad con otras conexinas, y tipo de comunicación intercelular: A:A (astrocítico-astrocítico) O:O (oligodendrocítico-oligodendrocítico) y O:A (astrocítico-oligodendrocítico). Con * se indican las compatibilidades en las que hay controversia.

Cx	Tipo glial	Localización	Compatibilidad con otras Cx	Tipo
Cx43	A	SG y SB	Canales homotípicos Cx43 Canales heterotípicos Cx43-Cx30* Canales heterotípicos Cx43-Cx47 No forma canales con Cx26, Cx32 ni con Cx31.3	A:A A:A* A:O -
Cx30	A	SG	Canales homotípicos Cx30 Canales heterotípicos Cx30-Cx26 Canales heterotípicos Cx30-Cx43* Canales heterotípicos Cx30-Cx32 No forma canales con Cx47 ni con Cx31.3	A:A A:A A:A* A:O -
Cx26	A	Leptomeninges y regiones subcorticales	Canales homotípicos Cx26 Canales heterotípicos Cx26-Cx30 Canales heterotípicos Cx26-Cx32 No forma canales con Cx43, Cx47 ni con Cx31.3	A:A A:A A:O -
Cx47	O	SG y SB	Canales homotípicos Cx47 Canales heterotípicos Cx47-Cx31.3 Canales heterotípicos Cx47-Cx43 No forma canales con Cx30, Cx26, ni con Cx32	O:O O:O O:A -
Cx32	O	SB	Canales homotípicos Cx32 Canales heterotípicos Cx32-Cx30 Canales heterotípicos Cx32-Cx26 No forma canales con Cx43, Cx31.3 ni con Cx47	O:O O:A O:A -
Cx31.3	O	SG	Canales heterotípicos Cx47-Cx31.3 No forma canales homotípicos Cx31.3 ni forma canales heterotípicos con ninguna otra Cx	O:O -

1.3.2 COMUNICACIÓN INTERCELULAR ASTROCITO - CÉLULAS EPENDIMARIAS

Las células endimarias son células ciliadas en contacto con el líquido cefalorraquideo (LCR) especializadas en el transporte de K^+ y de agua. Al igual que los astrocitos este tipo celular expresa Cx43 (Rash, Duffy et al. 1997) (Ochalski, Frankenstein et al. 1997) (Rash, Yasumura et al. 1998), Cx30 (Dere, De Souza-Silva et al. 2003; Sohl, Odermatt et al. 2004) y Cx26 (Dermietzel, Traub et al. 1989) y tiene la capacidad de comunicarse con otros endimocitos o con otros astrocitos a través de canales homotípicos homoméricos de Cx43 (Rash, Duffy et al. 1997) (Figura 3).

1.3.3 COMUNICACIÓN INTERCELULAR ASTROCITO - OLIGODENDROCITO

Los oligodendrocitos humanos expresan tres tipos de conexina: Cx47, Cx32 y Cx31.3 (Kleopa, Orthmann et al. 2004) (Figura 3). La Cx29 de ratón, ortóloga de la Cx31.3 humana, se expresa en las fibras mielínicas de la sustancia gris y en el tracto corticoespinal a nivel adaxonal así como en el soma del oligodendrocito (Altevogt, Kleopa et al. 2002); la conexina 32 es más abundante en sustancia blanca (Kleopa, Orthmann et al. 2004), se expresa en la capa más superficial de la mielina y dentro de la misma donde puede formar canales de “tipo reflexivo” entre las sucesivas lamelas dando lugar a una vía de comunicación intramielínica (Kamasawa, Sik et al. 2005) mientras que la Cx47 se expresa en sustancia gris y sustancia blanca y se localiza en el soma de los oligodendrocitos donde colocaliza con Cx32 (Odermatt, Wellershaus et al. 2003). Los estudios de acoplamiento *in vitro* indican que la Cx31.3 no es capaz de formar canales funcionales homoméricos homotípicos (Liang, Su et al. 2011) mientras que las conexinas Cx47 y Cx32 forman canales homoméricos homotípicos pero no homoméricos heterotípicos (Magnotti, Goodenough et al. 2011). Estos resultados sugieren que la comunicación oligodendrocito-oligodendrocito está mediada a través de canales homoméricos homotípicos de conexina 47 en su mayoría, canales homoméricos homotípicos de Cx32 y canales heteroméricos homotípicos de Cx32-31.3 (Altevogt, Kleopa et al. 2002; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007; Magnotti, Goodenough et al. 2011) (Tabla 2). Los estudios *in vivo* de estas conexinas oligodendrocitarias muestran resultados contradictorios. Cuando se estudia el acoplamiento entre oligodendrocitos en ratones que carecen de ambas conexinas Cx47-KO y Cx32-KO no se observa acoplamiento (Maglione, Tress et al. 2010) mientras que los ratones deficientes en Cx47 sólo o en Cx32 presentan un acoplamiento muy reducido en algunos trabajos (Menichella, Goodenough et al. 2003; Wasseff and Scherer 2011) y apenas disminuido en otros (Scherer, Xu et al. 1998). Estos datos sugieren que ambas conexinas contribuyen al acoplamiento entre oligodendrocitos pero deja sin resolver cuál de las dos contribuye en mayor o menor medida a este tipo de acoplamiento (Magnotti, Goodenough et al. 2011) (Figura 4).

Los oligodendrocitos se acoplan además de con ellos mismos con los astrocitos. Como los oligodendrocitos expresan tres tipos de conexinas, Cx47, Cx32 y Cx31.3 distintas a la que expresan los

astrocitos, la Cx43, Cx30 y Cx26, este tipo de comunicación A:O está mediada por canales de tipo heterotípico. Los estudios de inmunocitoquímica muestran que la Cx43, Cx47 y Cx30 colocalizan en las uniones en hendidura presentes entre los somas de los oligodendrocitos y astrocitos mientras que las Cx32 y Cx30 colocalizan en la parte más externa de la vaina de mielina (Altevogt and Paul 2004; Kamasawa, Sik et al. 2005). En relación a la compatibilidad, los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que podrían formarse hasta cuatro tipos de canales heterotípicos funcionales entre: Cx43 - Cx47, Cx30 - Cx47, Cx30 - Cx32 y Cx26 - Cx32, descartando la funcionalidad del resto de combinaciones: Cx43 - Cx32 y Cx26 - Cx47 (Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007) (Tabla 2). En los estudios *in vivo* en ratones deficientes en Cx47 el acoplamiento A:O disminuye drásticamente (Odermatt, Wellershaus et al. 2003) mientras que los ratones carentes de Cx32 tienen el nivel de acoplamiento A:O menos reducido (Wasseff and Scherer 2011) sugiriendo que el acoplamiento entre astrocitos y oligodendrocitos estaría mediado principalmente por canales heterotípicos de Cx47-Cx43 y Cx47-Cx30 (Tabla 3). Estos resultados junto con la expresión mayoritaria de Cx43 en astrocitos indican de forma indirecta que la contribución de canales heterotípicos Cx43-Cx47 podría ser mayor al resto de combinaciones en el acoplamiento astrocito-oligodendrocito.

1.4 FUNCIÓN DEL SINCITIO PANGLIAL EN EL MECANISMO DE TAMPONAMIENTO DE POTASIO PERIAXONAL

El sincitio panglial juega un papel esencial en el tamponamiento de potasio liberado al espacio periinternodal tras la descarga de un potencial de acción. Este proceso llevado a cabo por una red de células gliales se produce de forma rápida y eficaz con el objetivo permitir la activación de los canales de sodio y por lo tanto la generación de nuevos potenciales de acción (Vabnick, Trimmer et al. 1999; Mert 2007). La generación de un potencial de acción requiere la entrada de sodio en el axón a través de canales Nav1 localizados en los nodos de Ranvier, lo que implica un aumento intracelular de la concentración de este ión desencadenando una despolarización de la membrana plasmática neuronal que desencadena la activación de los canales de potasio internodales dependientes de voltaje, Kv1, y como consecuencia la salida de este ión al exterior celular (Hodgkin and Huxley 1946). En los axones mielinizados el espacio periaxonal del internodo está aislado y puesto que sólo retorna al axón una pequeña parte del potasio que se libera, éste se acumula llegando a alcanzar concentraciones desde 2 mM a 20-100 mM. Este incremento en la concentración implica la existencia de un gradiente de voltaje desde el espacio periaxonal hasta los pies astrocitarios vasculares que va desde -120 hasta +160 mV que favorecería la difusión de potasio (David, Barrett et al. 1992; David, Barrett et al. 1993). El proceso de tamponamiento de potasio implica la entrada al interior de la mielina del ión potasio a través de canales de potasio o de hemicanales de conexina (Figura 4). Posteriormente, el potasio difundiría hacia las vainas más superficiales de mielina a través de canales homotípicos homoméricos de Cx32 de “tipo reflexivo” (Balice-Gordon, Bone et al. 1998; Kleopa,

Orthmann et al. 2004; Kamasawa, Sik et al. 2005). Una vez que llegan a la superficie pasaría a los oligodendrocitos vecinos a través de canales homotípicos homoméricos de Cx32 o de Cx47 y a los astrocitos a través de canales homoméricos heterotípicos Cx47-Cx43 y Cx47-Cx30 o Cx32-Cx30. Al alcanzar los pies vasculares de los astrocitos el potasio difundiría a través de canales Kir 4.1 hasta a la luz de los capilares o a través de canales homoméricos homotípicos de Cx43 hasta las células endoteliales y de ahí al LCR. La difusión de potasio va asociada a un transporte de agua mediado por acuaporina-4 (AQP4) para compensar las variaciones de osmolaridad y un transporte de cloro que compensa el balance de cargas (Rash 2010). La red de células gliales interconectadas a través de conexinas permitiría por tanto reconstituir rápidamente unos niveles bajos de potasio en el espacio periaxonal generando un mecanismo altamente eficaz esencial para una correcta conducción saltatoria de los potenciales de acción.

1.5 PATOLOGÍAS CON AFECTACIÓN DE LA MIELINA ASOCIADAS A MUTACIONES EN GENES DE CONEXINAS GLIALES. MECANISMOS PATOGENICOS.

Se han descrito mutaciones en tres genes de conexinas - *GJC2* (Cx47), *GJB1* (Cx32) y *GJA1* (Cx43) - asociados a leucodistrofias hipomielinizantes o desmielinizantes caracterizadas por un defecto primario en el proceso de formación o mantenimiento de la mielina: (Orthmann-Murphy, Salsano et al. 2009; Paznekas, Karczeski et al. 2009; Henneke, Gegner et al. 2010; Abrams and Freidin 2015). La primera leucodistrofia hipomielinizante descrita fue la enfermedad Pelizaeus Merzbacher (PMD, MIM ID #312080) en 1985 (Inoue 2005). Es una enfermedad ligada al cromosoma X, que aparece en los primeros meses de vida, causada por mutaciones en el gen *PLP1* (locus Xq22) que codifica la proteína proteolipídica 1 (Inoue 2005) y cursa ataxia, movimientos coreoatetósicos, disartria, espasticidad progresiva y patrón hipomielinizante difuso en la resonancia magnética (Renier, Gabreels et al. 1981).

Unos años después, se describió otra forma de leucodistrofia hipomielinizante, denominada PLMD o enfermedad tipo Pelizaeus Merzbacher (MIM ID #608804) (Henneke, Gegner et al. 2010). Esta enfermedad presenta herencia autosómica recesiva y aparece como consecuencia de mutaciones en el gen *GJC2* (locus 1q41), que codifica la Cx47 (Bugiani, Al Shahwan et al. 2006); (Uhlenberg, Schuelke et al. 2004). Clínicamente la PLMD, indistinguible de la PMD, muestra una alta variabilidad dependiendo del tipo de mutación de forma que encontramos desde formas más graves (grado 0), caracterizadas por hipotonía, nistagmos y muerte prematura, hasta fenotipos más leves (grado 4) que cursan únicamente con paraparesia espástica en la primera o segunda década de la vida (SPG44, MIM ID #608803). Hasta la fecha no se han dilucidado los mecanismos patogénicos que causan la PLMD/SPG44 por mutaciones en Cx47, sin embargo si se han hecho estudios funcionales de algunas de estas mutaciones sugiriendo que el fenotipo de PLMD podría estar directamente relacionado con el

Conexina	Célula	Modelo genético	Fenotipo	O:O	O:A	A:A	Referencia
Cx47	O	KO	Fenotipo leve. Esporádica vacuolización en el nervio óptico. No alteración de la mielina del sistema nervioso periférico.	↓↓ o igual	↓	ND	(Menichella, Goodenough et al. 2003; Odermatt, Wellershaus et al. 2003)
Cx32	O	KO	Fenotipo leve. No afectación de la mielina a nivel central. Neuropatía periférica de aparición tardía y severidad moderada.	↓	Si	↓Cx30	(Scherer, Xu et al. 1998)
Cx29	O	KO	No presenta ninguna anomalía de la mielina central ni periférica.	Si	Si	ND	(Eiberger, Kibschull et al. 2006)
Cx43	A	KO	100% Mueren al nacer	ND	ND	ND	(Reaume, de Sousa et al. 1995)
		<i>KO-c astrocito-específico</i>	Fenotipo ODDD. No hay alteraciones de la mielina. Reducción parcial del acoplamiento entre astrocitos.	No	Si	↓50% ↑Cx30	(Theis, Speidel et al. 2004)
		<i>Cx43G138R corazón-específico</i>	Fenotipo ODDD. No hay alteraciones en la mielina a nivel central. 80% muerte prematura	ND	ND	ND	(Dobrowolski, Sasse et al. 2008)
		<i>Cx43G60S Inducción química</i>	Fenotipo ODDD. No hay alteraciones en la mielina a nivel central.	ND	ND	ND	(Flenniken, Osborne et al. 2005)
		<i>Cx43I130T corazón-específico</i>	Fenotipo ODDD. 40% muerte prematura. No hay alteraciones en la mielina a nivel central.	ND	ND	ND	(Kalcheva, Qu et al. 2007)
Cx30	A	KO	No hay alteraciones de la mielina. Sordera severa. Alteración de la respuesta emocional y de la reactividad hacia un nuevo ambiente.	ND	ND	↓20%	(Dere, De Souza-Silva et al. 2003)
Cx26	A	KO-c	No presenta fenotipo anormal.	ND	ND	ND	(Nagy, Lynn et al. 2011)
Cx47/Cx32	O/O	dKO	Fenotipo grave. Hipomielinización, vacuolización fibras mielínicas, temblor, convulsiones tónicas y muerte prematura	No	No	ND	(Tress, Maglione et al. 2011)
Cx30/Cx47	A/O	dKO	Fenotipo grave. Hipomielinización y vacuolización fibras mielínicas. Temblores, ataxia, y muerte prematura	↑Cx32 No	No	No	(Tress, Maglione et al. 2012)
Cx43/Cx32	A/O	dKO	Fenotipo. Vacuolización, ↓muerte prematura		No	ND	(Magnotti, Goodenough et al. 2011)
Cx43/Cx30	A/A	dKO	Fenotipo medio- grave. Hipomielinización y vacuolización fibras mielínicas.	↓	↓↓↓	No	(Lutz, Zhao et al. 2009) (Wallraff, Kohling et al. 2006)

Tabla 3. Modelos de animales genéticamente modificados empleados en el estudio de conexinopatías causantes de alteraciones de la mielina. Conexina/s delecionada/s o mutada/s; tipo celular donde se expresa la conexina: oligodendrocito (O) o astrocito (A); modelo genético : Knock- out constitutivo (KO), Knock-in (KI), Knock- out condicional (KO-c) o doble Knock-out (dKO); fenotipo; efecto sobre el acoplamiento: oligodendrocito-oligodendrocito (O:O), astrocito-astrocito (A:A) u oligodendrocito-astrocito (A:O), y referencia bibliográfica. (ND = no descrito, ↓ : reducción del acoplamiento, ↑Cx: Aumento de la expresión de conexina, SI: se mantiene el acoplamiento, No: desaparece el acoplamiento).

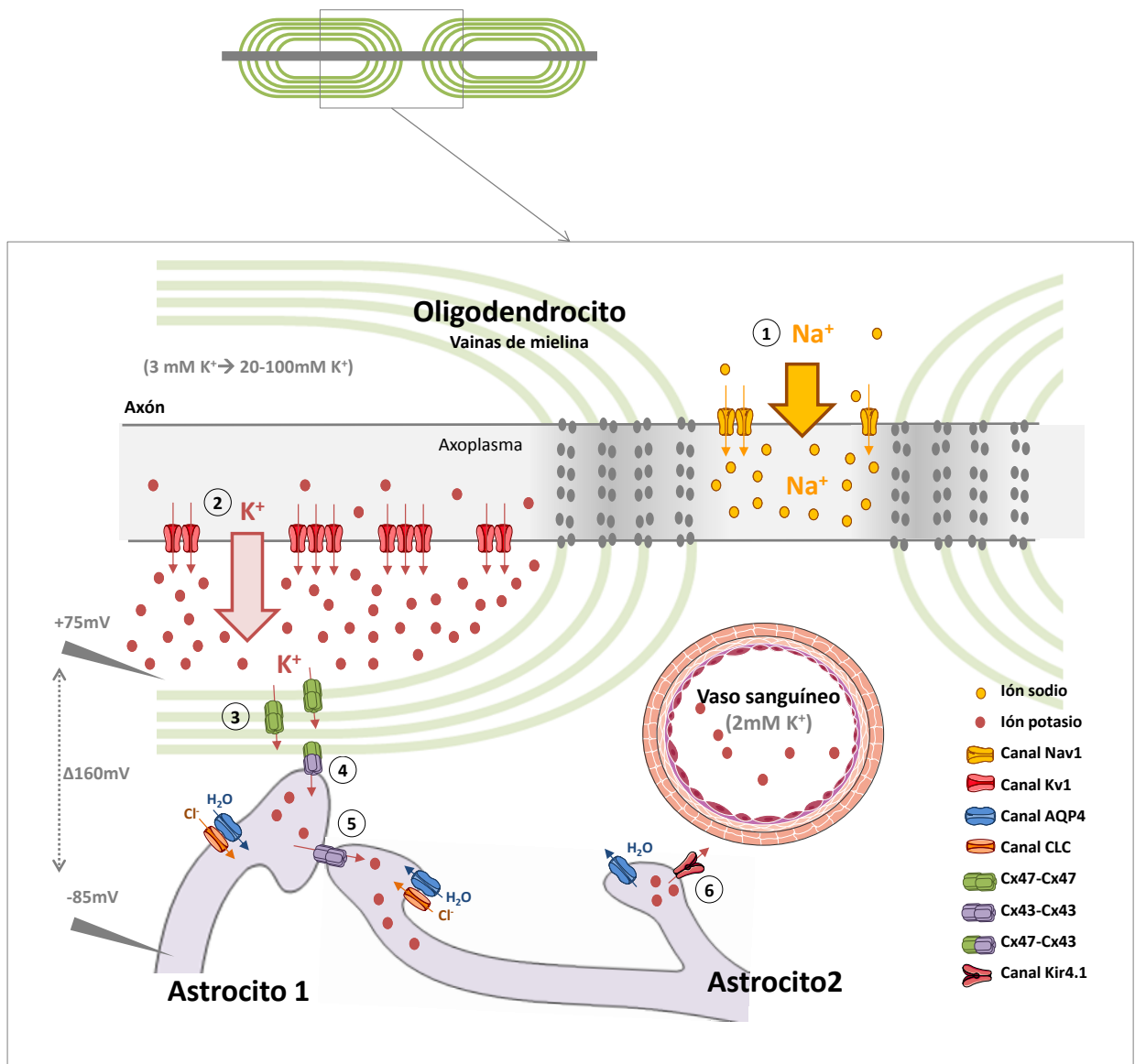


Figura 4. Mecanismo de aclaramiento de potasio a través de conexinas. Detalle de un axón mielinizado. En primer lugar tras la descarga de un potencial de acción se libera potasio al espacio periinternodal (1), a continuación pasa a través de conexinas oligodendrocitarias por las vainas de mielina (2), hasta llegar a los oligodendrocitos que se comunican con astrocitos mediante canales intercelulares heterotípicos, (3). Después difundiría de unos astrocitos a otros mediante canales intercelulares de conexinas astrocitarias (4) y finalmente se libera desde los astrocitos al lecho vascular o LCR (5) a través de canales de potasio o canales intercelulares de conexinas.

grado de pérdida de función de la Cx47 (Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007; Orthmann-Murphy, Salsano et al. 2009; Osaka, Hamanoue et al. 2010; Kim, Gloor et al. 2013).

Las mutaciones en el gen *GJB1* (locus Xq13.1) que codifica la Cx32 causan una de las formas de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth (MIM ID #302800) (Bergoffen, Scherer et al. 1993), una neuropatía con desmielinización periférica primaria y degeneración axonal. La Cx32 a pesar de expresarse en oligodendrocitos y en células de Schwann cursa en pocos casos con desmielinización central transitoria (Hanemann, Bergmann et al. 2003; Xie, Zhou et al. 2016). Las manifestaciones clínicas o subclínicas no aparecen en ausencia completa de la región codificante de la Cx32 (Hanemann, Bergmann et al. 2003; Xie, Zhou et al. 2016) lo que sugiere que se deben a una ganancia de función en la proteína. Sin embargo, aún está por esclarecer el mecanismo patogénico. Una explicación que se ajusta a los estudios realizados en ratón, sería que estos mutantes de Cx32 ejercieran un potente efecto de inhibición dominante sobre la Cx47. En ratón, el doble dKO Cx47/Cx32, o el homocigoto para M286T (Cx47) y KO para Cx32, presentan un fenotipo mucho más grave, que incluye desmielinización, vacuolización y muerte prematura, ausente en el modelo KO de Cx32 (Scherer, Xu et al. 1998; Menichella, Goodenough et al. 2003).

Mutaciones en Cx43 codificada por el gen *GJA1* (locus 6q22-24) causan la displasia oculodentodigital (ODDD) (Paznekas, Karczeski et al. 2009) en el 70% de los casos aunque también pueden asociarse otras patologías como ataxia viscerotriaxial, linfedema, glaucoma, síndrome Hallerman-Streiff o muerte súbita infantil (Tabla 4). El síndrome de ODDD, en general de herencia autosómica dominante y en casos aislados de herencia autosómica recesiva (Richardson, Donnai et al. 2004; Paznekas, Karczeski et al. 2009) presenta una alta variabilidad fenotípica intra e interfamiliar y se caracteriza clínicamente por anomalías craneofaciales, en las extremidades, dentales, oculares y neurológicas. La afectación de distintos órganos y tejidos se explica por el amplio patrón de expresión que tiene la proteína que expresa el gen *GJA1*, la conexina 43 (Cx43). La dismorfología craneofacial que normalmente presentan los pacientes de ODDD son hipoplasia nasal alar, pequeñas narinas antevertidas y una collumela prominente. Algunos pacientes presentan además orejas displásicas. Las anomalías oftalmológicas incluyen microoftalmia, microcornea, cataratas, glaucoma y neuropatía óptica y con menor frecuencia nistagmo y estrabismo convergente. En la zona bucal se puede observar sobrecrecimiento mandibular, labio leporino y paladar hendido, microdoncia, anodoncia parcial, hipoplasia del esmalte dental, caries y pérdida dental precoz. En relación a las malformaciones de las extremidades muestran sindactilia en dedos de las manos y los pies así como camptodactilia y

Tabla 4. Mutaciones identificadas en el gen *GJA1*. En la tabla se muestra el genotipo de los pacientes analizados con la nomenclatura según su localización en el ADNc (los nucleótidos se han enumerado considerando la posición +1 a la posición de la adenina del codón ATG de iniciación de la proteína) y en la proteína; el tipo de herencia de la mutación (AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; F, familiar; S, esporádica; -, no descrito), el dominio en el que se localiza dentro de la proteína (CT: dominio carboxilo terminal, NT: dominio aminoterminal, L: asa citoplasmática, E: asa extracelular, TM1-TM4: dominios transmembrana), el fenotipo asociados en los pacientes y la referencia bibliográfica.

Nucleótido	Fenotipo		Herencia		Dom	Fenotipo	Referencia
	Proteína		R/D	S/F			
c.5G>T	p.G2V		AD	S	NT	ODDD	(de la Parra and Zenteno 2007)
c.6delT /c.301C>T	p.G2fsX7 /p.R101X		AR	S/F	NT	ODDD	(Jamsheer, Badura-Stronka et al. 2010)
c.7G>A	p.D3N		AD	F	NT	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.13A>T	p.S5C		-		NT	ODDD	(Himi, Fujimaki et al. 2009)
c.19T>G	p.L7V		AD	S	NT	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.23G>T	p.G8V		AR	S	NT	ODDD	(Wang, Cao et al. 2015)
c.31C>T	p.L11F		AR	S	NT	ODDD	(Gabriel et al., 2011)
c.32T>C	p.L11P		-		NT	ODDD	(Kelly, Ratajczak et al. 2006)
c.50A>C	p.Y17S		AD	F	NT	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.52T>C	p.S18P		AD	F	NT	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.61G>A	p.G21R		AD	S	TM1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.64G>A	p.G22R		AD	-	TM1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.65G>A	p.G22E		AD AD	S F	TM1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003) DNA diagnostic Lab
c.68A>C	p.K23T		AD	S	TM1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.75G>T	p.W25C		AD	S	TM1	ODDD /glaucoma	(Furuta, Ikeda et al. 2012)
c.79T>C	p.S27P		AD	-	TM1	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004)
c.93T>G	p.I31M		AD	F	TM1	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004)
c.97C>T	p.R33X/p. R33X		AR	F	TM1	ODDD	(Richardson, Joss et al. 2006)
c.119C>T	p.A40V		AD AD AD AD	- F S S	TM1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003) (Richardson, Donnai et al. 2004; Sargiannidou, Vavlitou et al. 2009) (Debeer, Van Esch et al. 2005) DNA diagnostic Lab (Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.120del GGTTGAGTCAGC	p.A40delVESA		AD	F	TM1	ODDD /glaucoma	(Gabriel et al., 2011)
c.121G>C	p.V41L/ p.R127H (<i>GJB2</i>)		AR	S	TM1	ODDD	(Kellermayer, Keller et al. 2005)
c.124G>A	E42K		AD	S	E1	SID	(Van Norstrand, Asimaki et al. 2012)
c.142G>A	p.E48K		AD	S	E1	ODDD	(Feller, Wood et al. 2008)
c.G139>C	p.D47H		AD	F	E1	ODDD	(Jamsheer, Sowinska-Seidler et al. 2014)
c.145_147dupCAG	p.Q49dup		AD	S	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.145C>A	p.Q49K		AD	F	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.146A>C	p.Q49P		AD	S	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.154_156dupTTT	F52dup		AD	F	E1	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)

Genotipo		Herencia		Dom	Fenotipo	Referencia
Nucleótido	Proteína	R/D	S/F			
c.163A>G	p.N55D	AD	-	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.174A>C	p.Q58H	AD	-	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.175C>G	p.P59A	AD	-	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.176C>A	p.P59H	AD	F	E1	ODDD	(Vasconcellos, Melo et al. 2005)
c.206C>A	p.S69Y	AD	F	E1	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004)
c.221A>T	p.H74L	AD	F	E1	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.226C4A	p.R76S	AD	F	TM2	ODDD /S.Hallerman -Streiff	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.227G>A	p.R76H	AR	F	TM2	ODDD	(Pizzuti, Flex et al. 2004)
c.253 G>A	p.V85M	AD	F	TM2	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.C257>A	p.S86Y	AD	S	TM2	ODDD /glaucoma	(Jamsheer, Sowinska-Seidler et al. 2014)
c.268C>G	p.L 90V	AD	F	TM2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.284A>G	p.H95R	AD	F	TM2	ODDD	(Honkaniemi, Kalkkila et al. 2005)
c.286G>A	p.V96M	AD	F	TM2	ODDD	(Kjaer, Hansen et al. 2004)
c.287T>A	p.V96E	AD	S	TM2	ODDD	(Wiest, Herrmann et al. 2006)
c.287T>C	p.V96A	AD	S	TM2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.293A>G	p.Y98C	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.306G>C	p.K102N	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.317T>C	p.L106P	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.T317>G	p.L106R	AD	F	L2	ODDD /glaucoma	(Jamsheer, Sowinska-Seidler et al. 2014)
c.330G>C	p.E110D	AD	F	L2	ODDD	(Debeer, Van Esch et al. 2005)
c.338T>C	p.L113P	AD AD AD	- F F	L2	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004) (Wiest, Herrmann et al. 2006) (Musa, Ratajczak et al. 2009)
c.389T>C	p.I130T	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.400A>G	p.K134E	AD	S	L2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.402G>T	p.K134N	AD	F	L2	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004)
c.412G>C	p.G138R	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.412G>A	p.G138S	AD AD AD	F - F	L2	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.413G>A	p.G138D	AD	-	L2	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.427G4A	p.G143S	AD	F	L2	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004)
c.428G>A	p.G143D	AD	-	L2	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.430A>G	p.K144E	AD	F	L2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.434T>G	p.V145G	AD	-	L2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.440T>C	p.M147T	AD	S	L2	ODDD	(Debeer, Van Esch et al. 2005)
c.443G>A	p.R148G	AD	-	L2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.442C>G	p.R148Q	AD AD AD AD AD	- - - F F	L2	ODDD	(Richardson, Donnai et al. 2004) (Richardson, Donnai et al. 2004) (Fenwick, Richardson et al. 2008) (Paznekas, Karczeski et al. 2009) (Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.458G>A	p.R153Q	AD	-	TM3	Cardiopatía congénita	(Wang, Wen et al. 2010)
c.460A>G	p.T154A	AD	S	TM3	ODDD	(van Es, Wittebol-Post et al. 2007)
c.461C>A	p.T154N	AD	F	TM3	ODDD	(Wiest, Herrmann et al. 2006)
c.504_506delCTT	p.F169del	AD	S	TM3	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.578C>T	p.P193L	AD	-	E2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.581A>C	p.H194P	AD	F	E2	ODDD	(Vitiello, D'Adamo et al. 2005)
c.602C>A	p.S201Y	AD	-	E2	ODDD	(Fenwick, Richardson et al. 2008)
c.602C>T	p.S201F	AD	S	E2	ODDD	(Paznekas, Karczeski et al. 2009)
c.605G>A	p.R202H	AD AD AD	F - F	E2	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003) (Richardson, Donnai et al. 2004) (Paznekas, Karczeski et al. 2009)

Nucleótido	Genotipo		Herencia		Dom	Fenotipo	Referencia
	Proteína		R/D	S/F			
c.646G>T	p.V216L		AD	F	TM4	ODDD	(Paznekas, Boyadjiev et al. 2003)
c.659C>A	p.S220Y		AD	S	TM4	ODDD	(Wiest, Herrmann et al. 2006)
c.679_680delAT	Y230fsX236		AD	S	CT		(Vreeburg, de Zwart-Storm et al. 2007)
c.456G>A	p.R239W		AR AR	- S/F	CT CT	Cardiopatía Cardiopatía	(Chen, Xie et al. 2005; Hu, Chen et al. 2013)
c.752G>C	p.S251T		AR	-	CT	Cardiopatía	(Chen, Xie et al. 2005)
c.757G>C	p.A253P		AR	-	CT	Glaucoma	(Chen, Xie et al. 2005)
c.780_781delTG	C260fsX306		AD	F	CT	ODDD	(van Steensel, Spruijt et al. 2005)
c.781G>T	p.G261W		AD	-	CT	Cardiopatía	(Wang, Wen et al. 2010)
c.814T>C	p.S272P		AD	S	CT	SID	(Van Norstrand, Asimaki et al. 2012)
c.848C>T	p.P283L		AR	-	CT	Cardiopatía	(Chen, Xie et al. 2005)
c.869C>A	p.T290N		AR	-	CT	Cardiopatía	(Chen, Xie et al. 2005)
c.968C>T	p.A323V		AD	-	CT	Cardiopatía	(Wang, Wen et al. 2010)
c.1055A>G	p.E352G			-	CT	Cardiopatía	(Britz-Cunningham, Shah et al. 1995)
c.1100T>C	/S364P		AR				
c.977A>G	p. T326A			-	CT	Cardiopatía	(White, Bruzzone et al. 1994; Britz-Cunningham, Shah et al. 1995)
c.1055A>G	/E352G		AR				
	p.R362Q		-	-	CT	Cardiopatía	(Dasgupta, Martinez et al. 2001)
c.1100T>C	p.S364P		AR	-	CT	Cardiopatía	(Britz-Cunningham, Shah et al. 1995)
c.1095C>A	/p.S365N						
c.1104G>A	p.S364P		AR	-	CT	Cardiopatía	(Britz-Cunningham, Shah et al. 1995)
c.1117A>G	/p.S373G						
c.1127 G>A	p.R376Q		-	-	CT	Cardiopatía	(Dasgupta, Martinez et al. 2001)

clinodactilia. A veces también cursa con anomalías dérmicas, en el pelo o en los dientes. Además las características fenotípicas los pacientes presentan en un 3% de los casos alteraciones cardiacas a veces asociadas con muerte súbita y en un 30% alteraciones neurológicas. Las malformaciones cardiacas son en su mayoría arritmias o malformaciones congénitas que afectan a la comunicación interventricular. Las alteraciones neurológicas incluyen paraparesia espástica (SPG), ataxia, temblor, epilepsia, debilidad muscular y cursan con anomalías en la sustancia blanca observadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Paznekas, Karczeski et al. 2009; De Bock, Kerrebrouck et al. 2013). El gen *GJA1* se expresa dentro del SNC fundamentalmente en astrocitos pero también se observa en microglía, células endoteliales, pericitos leptomeninges y endotelio vascular (De Bock, Vandebroucke et al. 2014). Los mecanismos por los cuales las mutaciones en Cx43 astrocitaria causan la desmielinización en los pacientes con paraparesia espástica no están suficientemente esclarecidos. En los ensayos funcionales de algunas de estas mutaciones se ha descrito que en la mayoría de los casos las mutaciones conducen a una pérdida total de la función de los hemicanales, que los canales de Cx43 mutados pueden ser en unos parcialmente funcionales o no funcionales; también se ha descrito que las Cx43 mutadas cuando se co-expresan con la Cx43 silvestre producen un efecto de inhibición dominante, sugiriendo que la desmielinización se produce por un defecto en la comunicación intercelular astrocito-astrocito (Tabla 5). Sin embargo, se desconoce si las mutaciones en la Cx43 ejercen además un efecto de transdominancia sobre la otra conexina astrocitaria, la conexina-30, y sobre el acoplamiento astrocitario-oligodendrocitario formado por las uniones heterólogas entre la Cx43 astrocitaria y la conexina-47 oligodendrocitaria, que según los estudios *in vitro* y en los modelos de ratón KO son las principales conexinas que forman los canales heterólogos A:O y que en su ausencia se producen alteraciones de la mielina (Dere, De Souza-Silva et al. 2003; Theis, Speidel et al. 2004; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007; Lutz, Zhao et al. 2009; Maglione, Tress et al. 2010)

Tabla 5. Fenotipo y ensayo funcional de todas las mutaciones en el gen *GJA1* asociadas a alteraciones neurológicas. Las mutaciones se han nombrado según su posición en la proteína. Se describen Las alteraciones en el SNC para cada mutación (SPG: paraparesia espástica y ASB alteraciones en la sustancia blanca). El ensayo funcional se divide en cuatro apartados (ND: no descrito): localización subcelular (MP: si llega a membrana plasmática, ↑ aumento de expresión, uniones en hendidura indicando si forman o no placas, canal intercelular que muestra el mayor o menor grado de acoplamiento de los mutantes o la permeabilidad a colorante (NA: no acoplado, NB:neurobiotina, YP: yoduro de propidio), funcionalidad de los hemicanales, efecto de dominancia de la mutación sobre la conexina 43 silvestre y referencia bibliográfica de los ensayos.

Mutación	Alteraciones SNC	Localización Subcelular	Uniones hendidura	Canal intercelular	Hemicanal	Efecto DND	Referencia
p.G2fsX7 /p.R101X	ASB, Hipomielinización	ND	ND	ND	ND	ND	-
p.D3N	Espasticidad/Hiperreflexia Defecto motoneuronas	Acumulación Golgi	Sí placas	N.A	ND	SI	(Churko, Shao et al. 2011) (Shao, Liu et al. 2012)
p.Y17S	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB defecto motoneuronas	M.P	Sí placas (↓n°)	N.A	No funcionales	SI	(Shibayama, Paznekas et al. 2005) (Lai, Le et al. 2006) (Shao, Liu et al. 2012)
p.G21R	Espasticidad/Hiperreflexia defecto motoneuronas	ND	Sí placas (↓n°)	N.A No transf IP	No funcionales	SI	(Shibayama, Paznekas et al. 2005) (Roscoe, Veitch et al. 2005) (Lai, Le et al. 2006) (Gong, Shao et al. 2007) (McLachlan, Plante et al. 2008) (Churko, Langlois et al. 2010)
p.G22E	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB defecto motoneuronas	Sí placas	ND	ND	ND	ND	(Abrams and Scherer 2012)
p.K23T	ASB, Defecto Motoneuronas, temblor	Sí placas	ND	ND	ND	ND	(Abrams and Scherer 2012)
p.W25C	ASB	ND	ND	ND	ND	ND	-
p.R33X	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB Defecto motoneuronas	No hay en M.P	ND	ND	ND	SI	(Huang, Shao et al. 2013)
p.A40V	Dificultad al andar	ND	Sí placas (↓n°)	N.A No transf IP	No funcionales	ND	(Shibayama, Paznekas et al. 2005) (Lai, Le et al. 2006)

Mutación	Alteraciones SNC	Localización Subcelular	Uniones hendidura	Canal intercelular	Hemicanal	Efecto DND	Referencia
p.R76S	ASB, Epilepsia	ND	Sí placas	ND	ND	ND	(Abrams and Scherer 2012)
p.L90V	SPG, ASB Epilepsia	ND	Sí placas (↓n°)	↓A No transf IP	No funcionales	SI	(Shibayama, Paznekas et al. 2005) (Lai, Le et al. 2006) (Chitchetinin, Gifford et al. 2009)
p.K102N	ASB	ND	Sí placas	ND	ND	ND	(Abrams and Scherer 2012)
p.L106P	Espasticidad	ND	ND	ND	ND	ND	-
p.L113P	SPG, ASB Defecto motoneuronas	ND	ND	ND	ND	ND	-
p.K134E	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB Defecto motoneuronas	ND	Sí placas (↓n°)	↓A	No funcionales	ND	(Seki, Coombs et al. 2004) (Shibayama, Paznekas et al. 2005)
p.K134N	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB Defecto motoneuronas	ND	Sí placas (↓n°)	↓A	ND	ND	(Shibayama, Paznekas et al. 2005)
p.G138R	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB temblor, defecto motoneuronas	↑M.P	Sí placas	N.A No transf NB	↑ actividad	SI	(Roscoe, Veitch et al. 2005) (Gong, Shao et al. 2006) (Dobrowolski, Sasse et al. 2008) (Gong, Shao et al. 2007) (McLachlan, Plante et al. 2008) (Churko, Shao et al. 2011)
p.T154A	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB Retraso psicomotor Defecto motoneuronas	ND	Sí placas	↓A	ND	ND	(Zucker, Bancroft et al. 2013)
p.T154N	SPG, Temblor	ND	ND	ND	ND	ND	-
p.V216L	Espasticidad/Hiperreflexia, ASB Defecto motoneuronas	Acumulación Golgi	Sí placas (↓n°)	↓A	ND	SI	(Churko, Shao et al. 2011)
p.S220Y	Alteraciones lenguaje	ND	ND	ND	ND	ND	-

1.6 HIPÓTESIS

Las evidencias genéticas obtenidas en el modelo del ratón y en la patología humana indican que conexina 43 es esencial para el mantenimiento de la integridad de la mielina en el sistema nervioso central, sin embargo se desconoce los mecanismos a través de los cuales una proteína astrocitaria como es la Cx43 participa desempeña su función de soporte sobre la mielina que está formada por otro tipo de célula glial, los oligodendrocitos. La conexina 43 fundamentalmente se expresa en los astrocitos donde forma hemicanales funcionales y canales intercelulares que ponen en comunicación intercelular directa a los astrocitos entre sí y a los astrocitos con los oligodendrocitos. Se ha propuesto que la comunicación intercelular oligodendrocito-astrocito y astrocito-astrocito constituye la principal vía para el aclaramiento a larga distancia de los iones K^+ que se acumulan en la región periaxonal internodal de las fibras mielínicas durante la conducción saltatoria. En base a ello postulamos que las mutaciones dominantes de Cx43 en los pacientes con paraparesia espástica podrían causar la desmielinización suprimiendo tanto el acoplamiento intercelular astrocito-astrocito como el astrocito-oligodendrocito a través de un mecanismo de dominancia negativa sobre las dos conexinas astrocitarias, la Cx43 y la Cx30, y sobre la conexina-47 oligodendrocitaria.

II. OBJETIVOS

2.1. PRIMER OBJETIVO. Identificación de mutaciones en el gen *GJA1* en pacientes con Displasia Oculodentodigital (ODDD) que cursan con paraparesia espástica.

2.2. SEGUNDO OBJETIVO. Ensayo funcional de las mutaciones identificadas.

2.2.1. Estudio de la biosíntesis y funcionalidad de los hemicanales mutados. Se analizará la capacidad para llegar a membrana así como el efecto de inhibición dominante que pueden ejercer las mutaciones de ODDD en coexpresión con la conexina silvestre. Para ello se expresarán los mutantes solos o en coexpresión con el silvestre en un sistema de oocitos de *Xenopus* y en la línea celular N2a. Mediante técnicas inmunológicas, moleculares, celulares y electrofisiológicas en oocitos aislados se determinarán las diferencias de expresión y función en los hemicanales de los mutantes analizados.

2.2.2. Efecto de las mutaciones sobre la comunicación astrocito-astrocito.

2.2.2.1. Se estudiará la capacidad de formar uniones en hendidura y canales intercelulares funcionales así como el efecto de dominancia de los mutantes de ODDD solos o en coexpresión con la Cx43 silvestre mediante técnicas inmunológicas, moleculares, celulares y electrofisiológicas en el sistema de oocitos de *Xenopus* y en la línea celular N2a.

2.2.2.2. Se analizará el efecto de los mutantes sobre el acoplamiento mediado por Cx43 endógena en un cultivo primario de astrocitos empleando técnicas de inmunocitoquímica y transferencia de colorante

2.2.2.3. Se determinará la compatibilidad de la Cx43 sobre la Cx30 así como el efecto de los mutantes de ODDD sobre la Cx30 a través de técnicas inmunológicas, moleculares, celulares y electrofisiológicas en un sistema de oocitos de *Xenopus* y en la línea celular N2a.

2.2.3. Efecto de las mutaciones sobre la comunicación astrocito-oligodendrocito. Para poder determinar si los mutantes de ODDD ejercen algún efecto sobre el acoplamiento oligodendroastrocitario se emplearán técnicas de inmunológicas, moleculares, celulares y electrofisiológicas en células N2a y un sistema de oocitos de *Xenopus* que nos permitirán analizar la formación de uniones en hendidura así como la funcionalidad de los canales intercelulares heterotípicos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ESTUDIOS GENÉTICOS

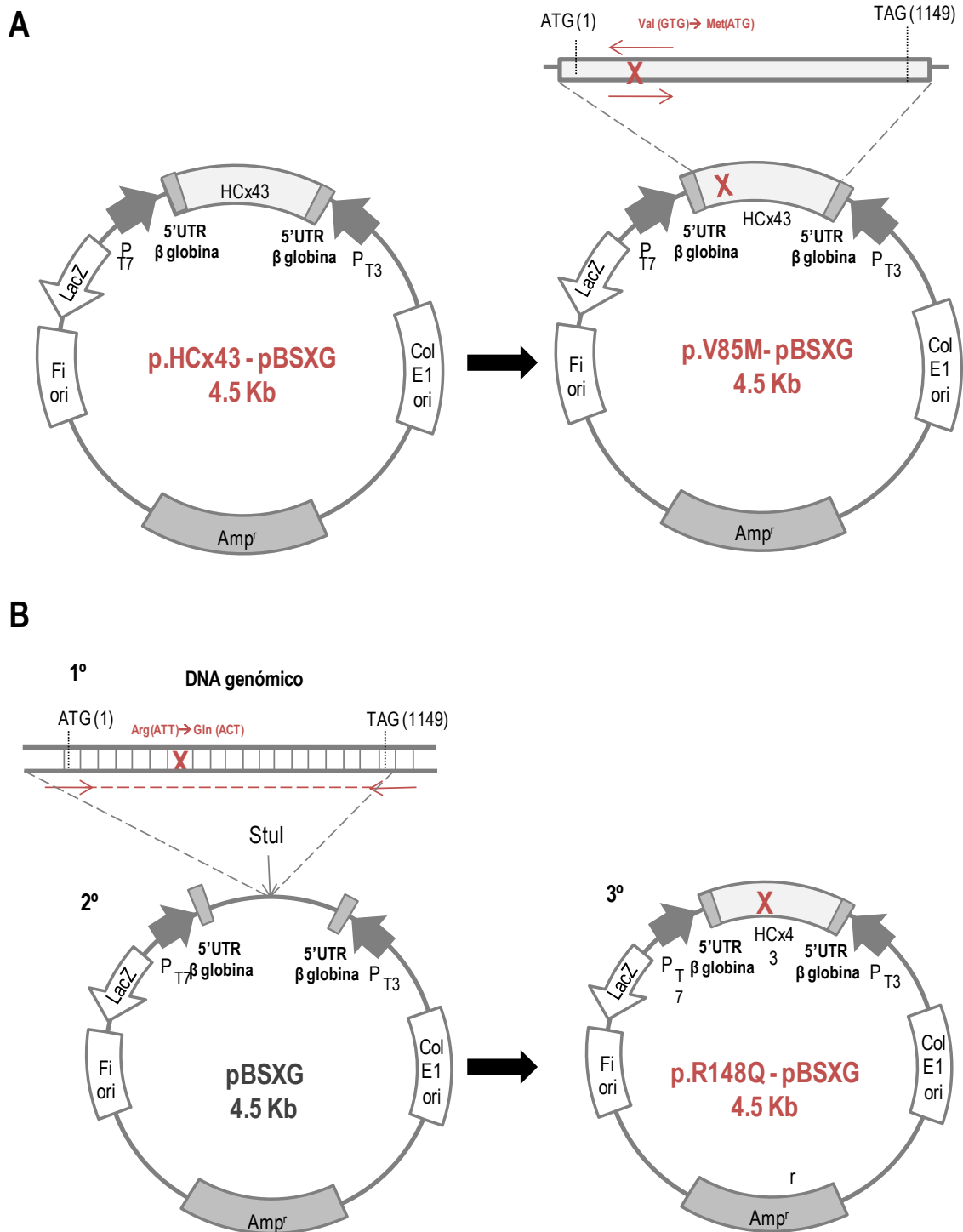
Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal. Tanto las muestras como la información clínica de los pacientes y familiares que cursan con ODDD y paraparesia espástica fueron remitidas desde el Servicio de Neurología del Hospital Ramón y Cajal y desde el grupo de Neurogenética de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica tras obtener el consentimiento informado firmado por los pacientes.

Se extrajo ADN a partir de sangre periférica de los pacientes y familiares utilizando el kit de extracción Gentra Puregene Blood® (Ref. 158489, Qiagen). Tras su cuantificación con el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 se amplificó la región codificante del gen *GJA1* con oligonucleótidos específicos (ANEXO I, Tabla 6) y la enzima Master Mix (Ref. M7505, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial (1 minuto a 95°C), 35 ciclos de: desnaturalización, anillamiento y extensión (1 minuto a 95° C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto y 30 segundos a 72° C) y 1 ciclo de extensión final (10 minutos a 72°C). El producto amplificado de 1395 pb se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Tris Base 90 mM, Ref. 648310, Merck; ácido bórico 90 mM, Ref. 100165 Merck; EDTA 100 mM pH8, Ref. 324506, Merck; agarosa D-2, Ref. 8039, Conda y SybrSafe diluido 1:10000; Ref.S33102, Invitrogen) y se purificó con Exosap-it (Ref. 78202, Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación directa se llevó a cabo con oligonucleótidos específicos (ANEXO I, Tabla 6) empleando el kit BigDye Terminator v1.1 (Ref. 4337450, Applied Biosystem) y la posterior purificación se realizó Agencourt®CleanSEQ (Ref. 000219, Beckman Coulter) según instrucciones del fabricante. Finalmente los cromatogramas obtenidos, tras la separación de los fragmentos en el equipo ABI3730XL, se analizaron con el programa Sequencher v.4.1.4 (Genes Code) (Applied Biosystems) consultando las bases de datos Ensembl (www.ensembl.org/), Human Genome Database (www.hgmd.cf.ac.uk) y National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

3.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN

3.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pBSXG

El ensayo funcional en *Xenopus laevis* se realizó empleando el vector pBSXG derivado del plásmido pBLUESCRIPT SKII (Stratagene). La diferencia entre ambos vectores es que en el primero se ha sustituido la diana BglIII por StuI y se han clonado las regiones 5' y 3' de la B-globina de *Xenopus* con el fin de aumentar la eficiencia de traducción (Figura 5). Al comienzo de este estudio ya disponíamos en el laboratorio del plásmido pBSXG con la secuencia codificante de la Cx43 humana clonada (Cx43-pBSXG), de la Cx30 humana (Cx30-pBSXG) y de la Cx47 humana (Cx47-pBSXG).



La mutación p.V85M se obtuvo por mutagénesis dirigida empleando el plásmido Cx43-pBSXG como molde (ANEXO I, Tabla 6). Este proceso implica la amplificación del vector, la digestión del plásmido molde, la transformación en bacterias y la selección de clones positivos. La amplificación se llevó a cabo con oligonucleótidos específicos y la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Ref. F549L, Thermo Fisher) partiendo de 25 ng de molde y en presencia de DMSO al 3%. Los oligonucleótidos reversos y complementarios, deben contener la mutación, tener una longitud entre 25-45 pb, un contenido de GC > 40% y una temperatura de Melting (T_m) > 78 °C según la siguiente fórmula: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - (675/N) - \% \text{ pares de bases modificados con respecto a la secuencia molde}$. El programa de temperaturas y tiempos fue: 1 ciclo a 95°C 3 minutos, 25 ciclos a 95° C 30 segundos, 60°C 40 segundos y 68°C 3 minutos y un ciclo a 68°C 5 minutos. Tras comprobar la amplificación por electroforesis se incubó parte del producto de PCR con 20U de DpnI (R0176S, New England Biolabs), 1 hora a 37°C. La transformación se realizó incubando en hielo durante 30 minutos 5 µl de producto de PCR digerido/no digerido con 100 µl de bacterias competentes E.coli de la cepa XL1Blue. A continuación se sometieron las muestras a un choque térmico de 1 minuto y 40 segundos a 42 °C seguido de 3 minutos en hielo. Tras el choque térmico se añadieron 9 volúmenes de LB (Tryptona 1%, Ref. 211705, Becton, Dickinson; extracto de levadura 0.5%, Ref. 212750, Becton Dickinson y NaCl 90mM, Ref. S9888, Sigma-Aldrich) y se incubó de nuevo durante 1 hora a 37 °C. Finalmente las bacterias se sembraron placas LB-agar (Ref. L2897 Sigma-Aldrich) con 50µg/ml de ampicilina (Ref. A9518, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Se seleccionaron 10 colonias obtenidas a partir del producto de PCR digerido, se crecieron en medio LB+ampicilina (50µg/ml), se extrajo el ADN con el kit MINIPREPS DNA Purification System (Ref. A1330, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron por secuenciación directa empleando el mismo protocolo con el que se secuenció el ADN genómico. Una vez secuenciadas las colonias, se seleccionó una de las 9 que contenían la mutación p.V85M, y se obtuvo mayor cantidad de ADN con el kit QIAGEN Plasmid Maxi (Ref. 12162, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El clon con la mutación p.R148Q en el gen *GJA1* se resolvió por clonaje. Se amplificó a partir de ADN del paciente con la enzima Pfu Turbo DNA polymerase (Ref. EP0502, Thermo Fisher) y oligonucleótidos específicos (ANEXO I, Tabla 6) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 1 minuto a 95° C; 35 ciclos de 1minuto a 95° C, 1minuto a 60°C, 90 segundos a 72° C; y un ciclo de 10 minutos a 72°C. En paralelo se linearizó el plásmido pBSXG vacío con 20U de StuI durante 4 horas a 37° C (Ref. R0187S, New England Biolabs). Tanto el producto de PCR como el plásmido linearizado se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification (Ref. 28106, Qiagen) y a continuación se ligaron ambos productos con la enzima Ligasa T4 (Ref.10481220001,

Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto del procedimiento para aislar y purificar los clones positivos fue idéntico al utilizado para obtener la construcción V85M- pBSXG.

3.2.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pIRES

El ensayo funcional en las células Neuro2a (N2a, ATCC CCL-131) y en cultivo primario de astrocitos humanos se realizó utilizando el plásmido p-IRES2-EGFP (Clontech). Este vector de expresión se caracteriza por expresar bajo un mismo promotor dos proteínas independientes, la conexina clonada y una proteína fluorescente verde (EGFP) (Figura 6), facilitando la identificación de las células transfectadas esencial en el análisis de acoplamiento por colorante sin interferir en síntesis y/o función de las conexinas (Martin E 1998). En el laboratorio disponíamos al comienzo del estudio de dicho plásmido con la secuencia codificante de la Cx43 humana (Cx43-pIRES-EGFP y Cx43-pIRES-dsRED) clonada, la Cx30 humana (Cx30-pIRES-EGFP) y la Cx47 humana (Cx47-pIRES-EGFP).

El plásmido V85M-pIRES2-EGFP se generó por mutagénesis dirigida (Figura 6) utilizando los mismos oligonucleótidos y el mismo protocolo que en el caso de pBSXG a excepción de las bacterias, *E.coli* DH5 α , y el antibiótico, kanamicina 50 μ g/ml (Ref. K4000, Sigma-Aldrich), empleados en la transformación.

La construcción R148Q-pIRES-EGFP (Figura 6) se obtuvo por clonaje. A partir del plásmido R148Q-pBSXG se amplificó siguiendo las instrucciones del fabricante con oligonucleótidos específicos (ANEXO I, Tabla 6) y la enzima Pfu Turbo DNA polymerase (Ref. EP0502, Thermo Fisher). En paralelo se linearizó el vector pIRES2-EGFP incubando con 20U de SmaI (Ref. 10220566001, Roche) durante 4h a 37°C. La purificación, ligación, transformación y selección de colonias se realizó del mismo modo que se llevó a cabo la construcción del vector R148Q-pBSXG a excepción de las bacterias, *E.coli* cepa DH5 α , y el antibiótico, kanamicina 50 μ g/ml (Ref. K4000, Sigma-Aldrich), empleado en la transformación.

3.3 SISTEMAS DE EXPRESIÓN

3.3.1 ENSAYO FUNCIONAL EN OOCITOS DE *Xenopus laevis*

El ensayo funcional en *Xenopus* requiere varias etapas con una duración aproximada de 4-5 días. En primer lugar se obtienen los oocitos, a continuación se inyectan con ARN sintetizado previamente *in vitro*, se forman los pares y finalmente se realiza el análisis de expresión de conexinas en oocitos aislados, la captación de colorante a través de hemicanales y el registro electrofisiológico de canales intercelulares y/o hemicanales (Figura 7).

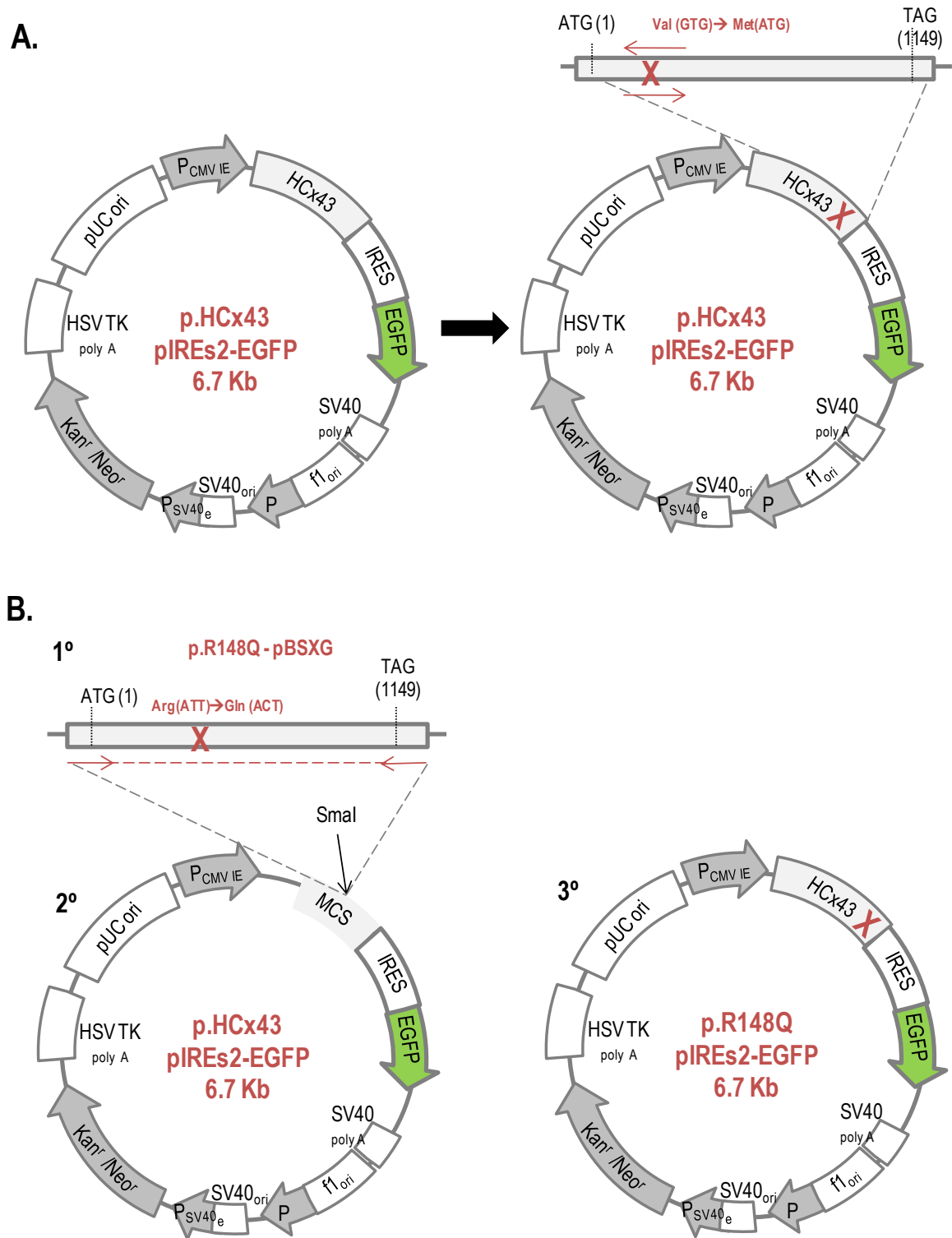


Figura 6. Estrategia de generación de los mutantes en el plásmido pIRES2-EGFP. Resumen de la mutagénesis dirigida para generar la construcción V85M-pIRES-EGFP (A) y de la estrategia de reclonaje de la construcción R148Q-pIRES-EGFP (B).

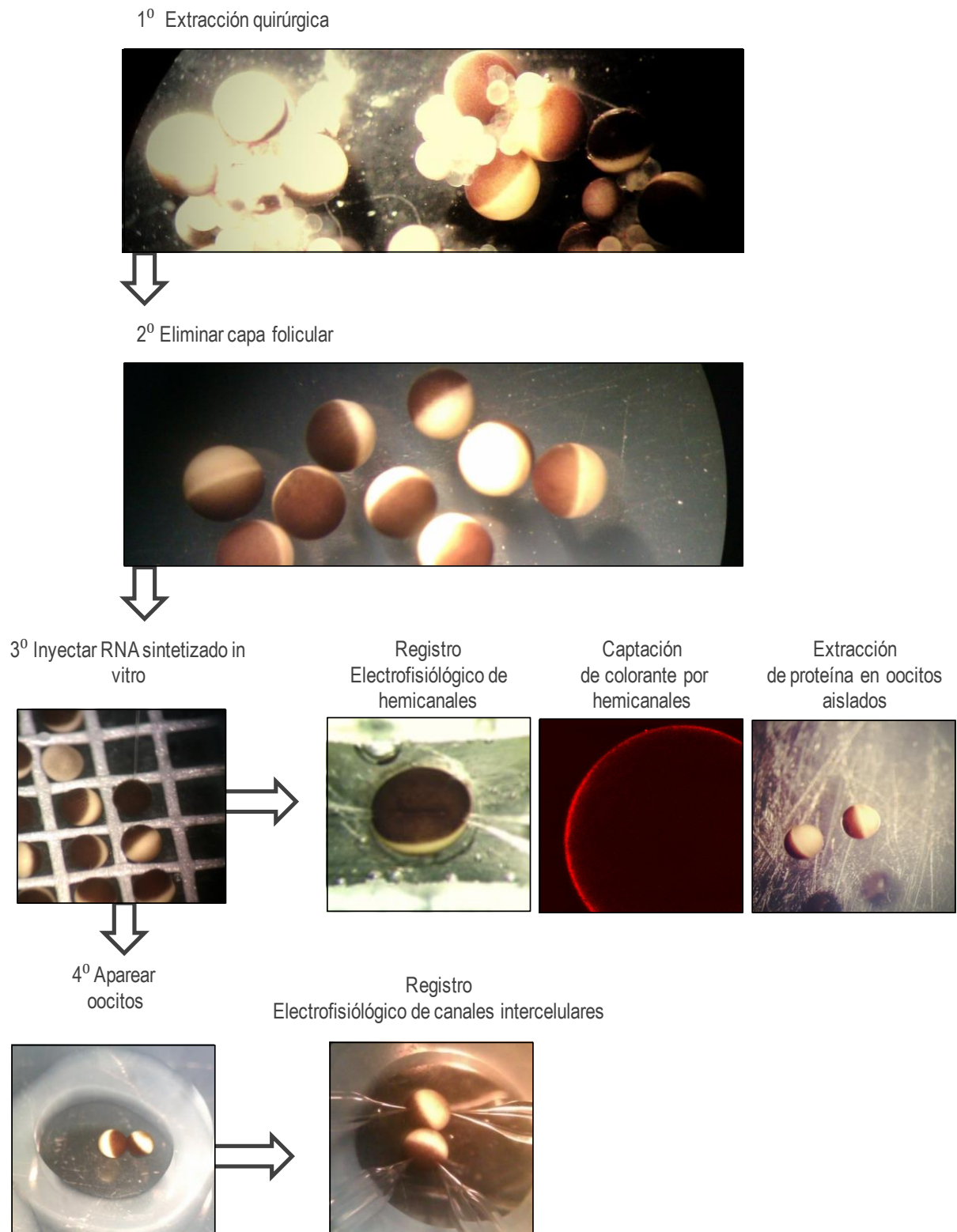


Figura 7. Etapas del protocolo de registro de oocitos aislados y pares. En primer lugar se extraen los oocitos de hembras de *Xenopus*, se seleccionan los estadios V y VI, se elimina la capa folicular, se inyectan con ARN sintetizado *in vitro*, se aparean y se procede a: la extracción de proteína total o de superficie celular, a la captación por colorante de oocitos aislados, al registro electrofisiológico de los hemicanales o al registro electrofisiológico de los canales intercelulares.

3.3.1.1 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

La transcripción *in vitro* de ARN mensajero (ARNm) se realizó a partir del plásmido pBSXG que incluía la conexina de interés. Tras la linearizar 60 ug del vector con 90 U de Sall (Ref. 10348783001, Roche) se purificó (Ref. 28106, Qiagen) y se llevó a cabo la reacción de transcripción durante 3h incubando a 37 °C la siguiente mezcla: 160 U de ARN polimerasa T7, 1X buffer de transcripción (Ref. P2075, Promega), 1 U del análogo “capping” m⁷G(5')ppp(5')G (Ref. 10904988001, Roche), 5mM de rATP, rCTP y rUTP y 3mM de rGTP (Ref. P1221, Promega), 10 mM de DTT (P117B, Promega) y 12U de inhibidor de RNAsa (Ref. 10877200, Roche). A continuación, eliminamos el ADN molde incubando 30 minutos a 37° C con 30U de la enzima DNAsal (Ref. 04716728001, Roche) y posteriormente purificamos con el kit Rneasy (Ref. 74106, QIAGEN) eluyendo en agua con DEPC (D5758, Sigma-Aldrich) para inactivar las RNAsas. Tras comprobar la integridad del ARN por electroforesis en un gel con: 18% formaldehído (Ref. 47629, Fluka), MOPS 1X y 1% de agarosa D-2 (Ref. 8039, Conda), se determinó la concentración de ARN y la pureza midiendo la absorbancia a 280 nm y a 260 nm en un NanoDrop ND1000. Únicamente se emplearon en los experimentos ARNs con una relación 260/280 nm de entre 1.8 - 2.0. Finalmente se hicieron alícuotas de 10 µg a las que se les añadió, para precipitarlo, antes de almacenar a -80 °C, 1/16 del volumen de NaCl 5M y 2.5 del volumen de EtOH absoluto. Una hora antes de la inyección se centrifugaron las muestras 15 minutos a 14.000 rpm, se lavaron con EtOH al 80% en agua+DEPC y se resuspendieron en 10 µl de TAB diluído 1µg/µl en agua+DEPC. Este último paso es muy esencial para el estudio electrofisiológico de canales y hemicanales ya que el TAB es un oligonucleótido antisentido (5'- GCT TAG TAA TCC CCA TCC TGC CAT GTT TC- 3') que reconoce la conexina endógena de *Xenopus* (xCx38) y bloquea específicamente su expresión (Barrio, Suchyna et al. 1991), permitiendo obtener corrientes/captación puras correspondientes a la conexina inyectada en ausencia de corrientes/captación endógena.

3.3.1.2 OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y MICROINYECCIÓN DE LOS OOCITOS

Se anestesiaron las hembras adultas de *Xenopus laevis* con 2 g/L de ácido 3-aminobenzoico-etil-éster y mediante cirugía se les extrajeron varios folículos ováricos (Figura 7). Estos folículos se trocearon e incubaron a 18 °C durante media hora en una solución con 1 mg/ml de colagenasa 1A (Sigma-Aldrich) en ND96 sin Ca²⁺ a pH 7.4 (96mM NaCl - Ref. S9888 Sigma-Aldrich, 2mM KCl - Ref.P4504 Sigma-Aldrich,1mM MgCl₂ - Ref.172571 Merck, 5mM HEPES - Ref. H3375 Sigma-Aldrich, 2.5mM de piruvato - Ref. P2256, Sigma Aldrich y 10 ml/L de penicilina/estreptomicina a – Ref.15140-122, Invitrogen). A continuación se lavaron los oocitos varias veces con una solución de ND96 a pH 7.4 con 2.8mM CaCl₂ (Ref. 1016, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron así hasta la finalización del experimento. Tras la colagenasa se seleccionaron los oocitos en fase IV y V de maduración y se eliminó bajo lupa

manualmente la capa folicular (Figura 7). 24 horas después, se micro-inyectó cada oocito con 50 nl de ARN total sintetizado *in vitro* empleando una micropipeta digital (Ref. 533506-100, WWR) y capilares con punta oblicua de diámetro de hasta 20 μm (Ref. 3-000-210-G8, Drummond Scientific) (Figura 7). Pasadas 48-72 de la microinyección se procedió a realizar el análisis funcional de los oocitos aislados y de los canales intercelulares. Para el estudio de los canales intercelulares fue necesario, 24h después de la inyección, aparear los oocitos. Para ello se incubaron los oocitos en una solución hipertónica (Methfessel 1986), a continuación se retiró manualmente con ayuda de unas pinzas la capa vitelina y finalmente se colocaron pares de oocitos en contacto en una cámara de agarosa al 2% con medio ND96. (Figura 7).

3.3.1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL Y EN LA SUPERFICIE CELULAR

El nivel de expresión de las conexinas se valoró mediante la técnica Western blot. Para extraer proteína total y de membrana de la célula se seleccionaron oocitos aislados 24-48 horas después de la inyección. En los estudios de degradación de conexinas empleamos cloroquina (CQ, Ref.C-6628, Sigma-Aldrich), que es un fármaco que incrementa el pH interno de los lisosomas bloqueando la degradación vía lisosomal. En estos experimentos se incubaron los oocitos 24h antes de la extracción con cloroquina a 100 μM o 300 μM y se extrajo la proteína total tras 24-48h de la inyección. La extracción de proteína total se llevó a cabo con la selección de 20-40 oocitos a los que se añadieron 10 μl /oocito de solución de lisis compuesta por: 0.5 mM EDTA (Ref. E5134, Sigma-Aldrich), 0.5 mM EGTA (Ref. E4378, Sigma-Aldrich), 50 mM TrisBase (Ref. 0311814200, Roche), 10 mM NaCl (Ref. S9888, Sigma-Aldrich), 1% Tritón X-100 (Ref. T9284, Sigma-Aldrich), 1mM PMSF (Ref.P7626, Sigma-Aldrich) y 25 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina (Ref.L2884, Sigma-Aldrich), pH=8. A continuación se homogenizaron las muestras con una aguja G30 (Ref. 305934, Becton, Dickinson) y se incubaron durante 30 min en hielo. Después se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. Finalmente se calculó la cantidad de proteína extraída en el sobrenadante por el método BCA siguiendo las indicaciones del fabricante (Ref. 23225, Pierce) y se almacenaron las muestras a -20 °C.

En los estudios de extracción de proteína de membrana junto con proteína total se incubaron los oocitos antes de proceder al lisado a 4⁰C durante 30 minutos en presencia o ausencia de 1.5 mg/ml de sulfo-N-hidrosuccinamida-SS-biotina (Ref. 21445, Pierce). La biotina empleada lleva unido un grupo sulfo-NHS que se une de forma específica a grupos aminos presentes en las lisinas y como no permea la membrana se unirá exclusivamente a las lisinas que formen parte de proteínas de la superficie celular. Para bloquear la reacción de la biotilación se hicieron 5 lavados con glicina (Ref. G7126, Sigma-Aldrich). Después del último lavado se lisaron los oocitos, de igual modo que para proteína total,

y se separaron dos fracciones, una de ellas corresponde a la fracción de proteína total para cada grupo y la otra es la fracción correspondiente a la proteína de membrana. Esta fracción que corresponde a proteínas de superficie celular se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con nanopartículas magnéticas cubiertas de estreptavidina que reconocen y se unen específicamente a biotina (SiMAG-Streptavidin Ref. 1517-1, Chemicell), a continuación se aplicó un campo magnético y se lavó 5 veces con PBS1X (Ref. 14200-059, Gibco) se resuspendió el complejo estreptavidina-biotina-proteína en 50 μ l de tampón de carga (10% glicerol, Ref. 104091 Merck; 2% SDS, Ref. L5750, Sigma-Aldrich; 50 mM Tris-HCl, Ref. 10812846001, Roche; 0.004% azul de bromofenol, B-6896, Sigma-Aldrich y 5% mercapto-etanol. Ref. M6250, Sigma-Aldrich) y finalmente se incubó a 25°C con DTT 200 Mm (Ref. D9779, Sigma-Aldrich) para romper la unión covalente biotina - proteína.

La determinación de la expresión de las conexinas silvestres o mutantes se realizó cargando las muestras de proteína en un gel SDS-PAGE (10% de acrilamida/Bisacrilamida, Ref. 161-0158 Bio-Rad; 1M Tris-HCl pH8, Ref. 10812846001 Roche; 10% SDS, Ref. L5750 Sigma-Aldrich; 10% PSA Ref. 327081000 Acros; 0.05% TEMED Ref. 161-0801 Bio-Rad) y separándolas aplicando un campo eléctrico de 100 V durante una hora y media. Las muestras que no llevaban biotina antes de cargar se incubaron a 95°C y se pusieron en hielo. Tras separar las muestras por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Ref. RPN2020D, Thermo Fisher) durante una hora a 100V y 4°C. A continuación se lavó con TBS1X (20 mM de Tris-Base, Ref.648310, Merck; 137 mM de ClNa, Ref. S9888, Sigma-Aldrich y 1M de HCl, Ref. 10812846001, Roche) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo, 1% de TBS y 0.1% de Tween, Ref.170-6531 Bio-rad). La inmunodetección se realizó incubando durante toda la noche en solución de bloqueo con anticuerpo primario (ANEXO I, Tabla 7). Tras varios lavados con TBS/Tween (TBS1% y Tween al 0.1%) se incubó una hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo y posteriormente 1 hora con una solución de anticuerpo secundario (ANEXO I, Tabla 7) unido a peroxidasa. Las bandas específicas en la membrana se detectaron por quimioluminiscencia utilizando diferentes kits (ECL Western Blotting Substrate ref. 32106 ; Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrat ref. 34080, SuperSignal West Femto Substrate ref. 34094, Pierce). La imagen se procesó posteriormente por densitometría usando el programa ImageQuant TL V. 2003.02 (Amersham Biosciences) y la densidad óptica de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java). Los promedios se calcularon restando el fondo a cada una de las bandas y normalizando con la señal de GAPDH utilizada como control de carga.

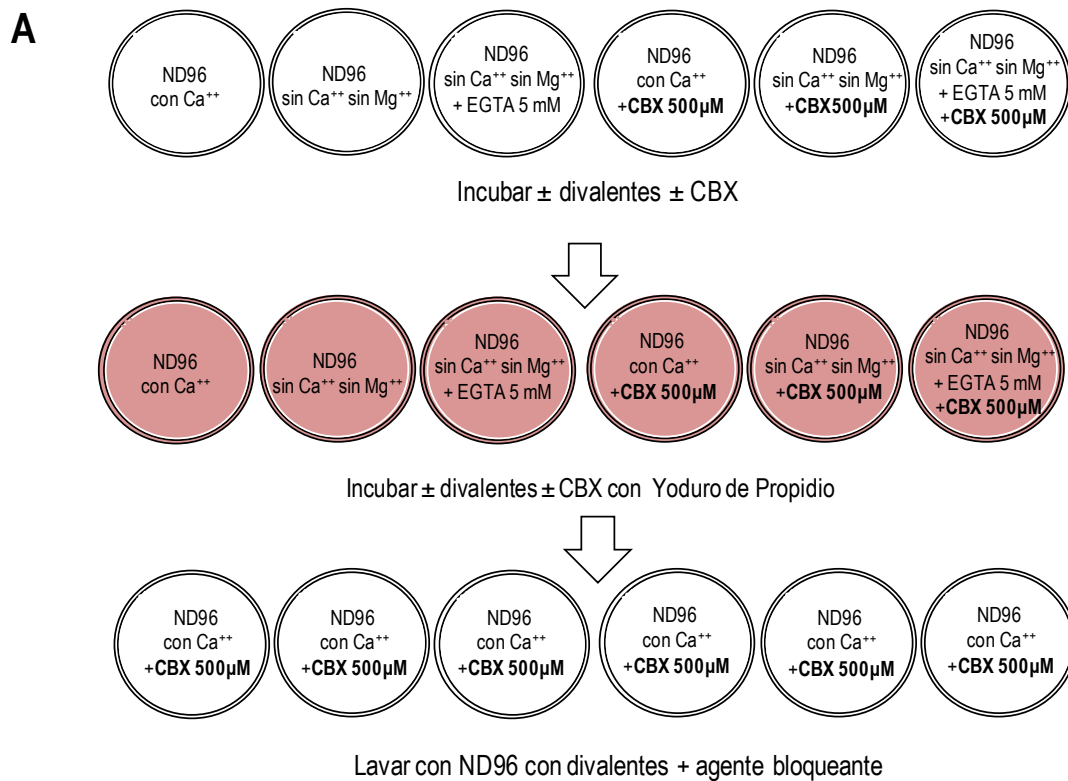
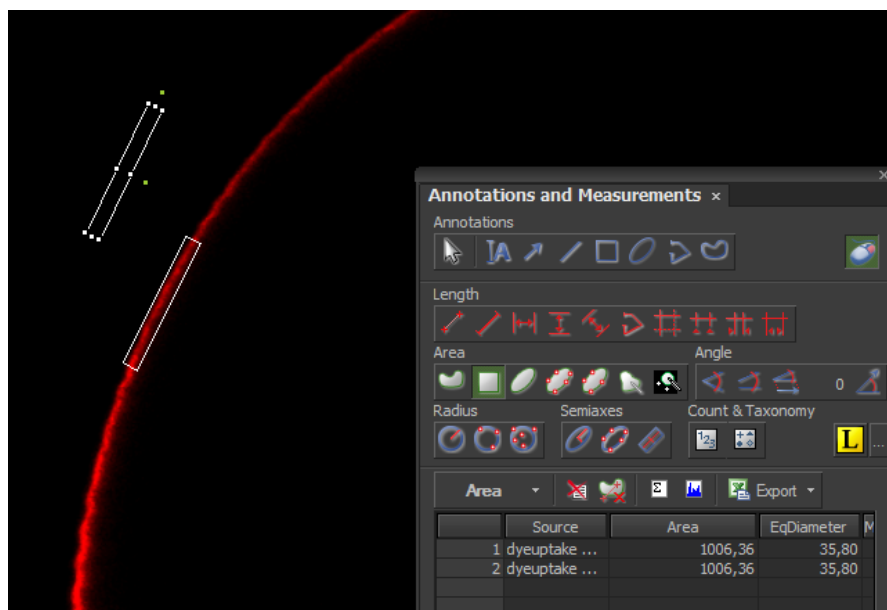
**B**

Figura 8. Protocolo de captación de colorante en oocitos aislados. A. Cada grupo de oocitos inyectados se subdividió en 6 grupos que se incubaron \pm iones divalentes \pm agente bloqueante, carbenoxolona (CBX). A continuación se mantuvieron los oocitos con las mismas soluciones más yoduro de propidio y se lavaron con CBX. **B.** Cuantificación de la intensidad de colorante en la membrana. Utilizando el programa NIS Elements se midió la intensidad de tres regiones en la membrana de cada oocito y una región para determinar el fondo.

3.3.1.1 ESTUDIOS DE CAPTACIÓN DE COLORANTE EN OOCITOS AISLADOS

La permeabilidad de la membrana celular a colorantes mediada por hemicanales se evaluó con la técnica de captación de colorante (Figura 8). Se utilizaron oocitos inyectados 48 h antes con la Cx43 silvestre y los dos mutantes, V85M y R148Q y como control se utilizaron oocitos inyectados con TAB. De cada inyección se incubaron durante 30 minutos a 18 °C grupos de 20 oocitos en diferentes condiciones: ND96 con Ca²⁺, ND96 con Ca²⁺ y carbenoxolona 500 µM (CBX), ND96 sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺, ND96 sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺ con CBX, ND96 sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺ con EGTA 5 mM (Ref. E4378, Sigma-Aldrich) y ND96 sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺ con EGTA 5 mM y con CBX. El EGTA es un quelante de calcio y elimina las posibles trazas que puedan quedar en la solución mientras que la CBX (Ref C-4790, Sigma-Aldrich) es un agente bloqueante específico de conexina. A continuación se incubaron durante una hora a 18 °C en las mismas soluciones con Yoduro de Propidio 1.5 mM (441Da, 2 cargas +; Ref. P4170, Sigma-Aldrich). Posteriormente se hicieron 5 lavados con ND96 con Ca²⁺ con CBX 500 µM y se adquirieron las imágenes de fluorescencia con un objetivo 20X en un microscopio Nikon Eclipse Ti acoplado a un módulo confocal Nikon C1 excitando los oocitos a 568 nm y captando la emisión a 640 nm. La intensidad de la captación se cuantificó con el programa NIS Elements Basic Research v.3.22.00. La cuantificación se realizó eligiendo tres regiones con una misma área en la membrana de cada oocito donde se acumula el colorante y otra región para determinar el fondo. A cada región se le restó el fondo y se hizo el promedio de la intensidad cuantificada para cada oocito.

3.3.1.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

El registro electrofisiológico se llevó a cabo entre las 48 y las 72 horas después de la inyección utilizando la técnica de fijación de voltaje para el registro de los hemicanales y de doble fijación de voltaje para el registro de canales intercelulares. Las corrientes macroscópicas se registraron con microelectrodos con una resistencia entre 0.4-1 MΩ rellenos con una solución 2 M KCl (Ref.P4504, Sigma-Aldrich, 10 mM EGTA Ref. E4378, Sigma-Aldrich y 10mM HEPES Ref. H3375, Sigma-Aldrich a pH 7.2). A continuación se filtraron las señales entre 100-200 Hz adquiriéndose con una frecuencia de muestreo de 1KHz y 100 Hz para los registros de 500ms y 5s de duración respectivamente. Tras el filtrado, se amplificaron las señales (TEV-200, Dagan), se digitalizaron (TL-1/Digidata 1200 Axon instrument) y se visualizaron en el programa pClamp5.0 (Axon Instruments) (Figura 9).

3.3.1.2.1 Registro de corrientes de hemicanales

El registro de hemicanales se realizó (Figura 9A) empalmando los oocitos aislados con un electrodo de corriente y otro de voltaje (I₂ y V₂) en una cámara de perfusión rápida (2 ml/min, volumen

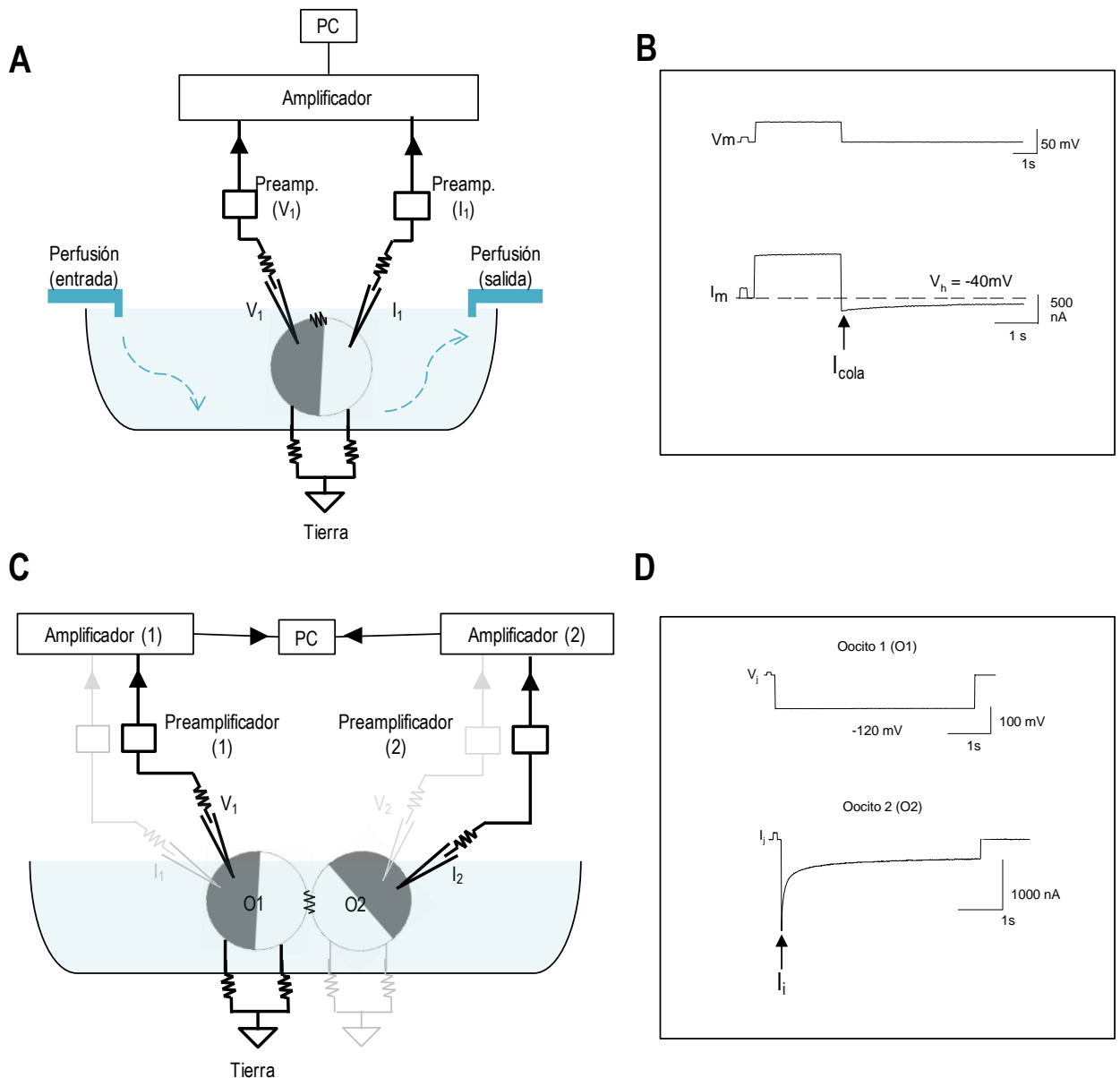


Figura 9. Técnica de fijación de voltaje de un oocito aislado y técnica de fijación de voltaje con dos electrodos para a medida de las corrientes intercelulares. A) Registro electrofisiológico de hemicanales. Se fija el potencial de membrana con el electrodo de voltaje y se registra la corriente aplicada para mantener el potencial de membrana fijo con el electrodo de corriente. La señal es amplificada mediante un amplificador y a través de una tarjeta DigiData 2100 se convierte la señal de analógica a digital. **B)** Pulso de voltaje de 0 mV y valor de la corriente de cola (I_{cola} , flecha) registrada durante este pulso a $V_h = -40\text{mV}$ para calcular la conductancia del hemicanal **C.** Registro electrofisiológico de pares. Tras fijar el potencial de membrana de los dos oocitos a -40mV ($V_j = V_{mO1} - V_{mO2} = 0$) se mide la corriente en el oocito 2 durante el pulso de voltaje en el oocito 1. **D.** Pulso de voltaje aplicado al oocito 1 y valor de corriente inicial (I_i , flecha) tomado del registro de corriente del oocito 2 para calcular la conductancia del canal.

total 500 μ l). Una vez estabilizada la señal, se monitorizó el potencial de membrana en reposo y la resistencia de entrada con un pulso de 10 nA a través del electrodo de corriente. Se utilizaron dos protocolos distintos. Uno para estudiar la activación de los hemicanales y otro para analizar el cierre de los mismos. Dichos protocolos se aplicaron perfundiendo con una solución de ND96 sin sodio (KCl 98mM, Ref.P4504, Sigma-Aldrich; CaCl₂ 1.8mM, Ref. 1016, Sigma-Aldrich; MgCl₂ 1mM, Ref.172571, Merck; Hepes 5mM, Ref. H3375, Sigma-Aldrich y pH 7.4) o una solución ND96 sin sodio baja en divalentes (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ añadido) con EGTA 5mM. Durante el protocolo de activación, con ambas soluciones, se fija el potencial de membrana a -40 mV (V_h) y se aplica una serie de pulsos despolarizantes desde -40 mV a +100 mV de 4 segundos de duración en incremento de 20 mV. El valor de conductancia macroscópica atribuible a los hemicanales (g_h) se obtuvo mediante la ecuación $g_h = I_h / (V_m - E_r)$, siendo E_r el potencial de reversión de los hemicanales, tomando como valor de I_h el valor de corriente de cola registrada durante el pulso de 0 mV (Figura 9B). Para determinar las propiedades de regulación por voltaje de los hemicanales se utilizó un protocolo en el que se fijó el potencial de membrana del oocito a 0 mV, cercano al potencial de equilibrio del hemicanal y se aplicaron pulsos despolarizantes desde -100mV hasta +100mV en incrementos de 20 mV durante 500 milisegundos y 5 segundos. En todos los experimentos se registraron oocitos controles a los que se les inyectó TAB (ARN antisentido complementario a xCx38 de Xenopus). En ambos protocolos, tanto el de activación como el de cierre, para aislar las corrientes macroscópicas atribuibles a hemicanales (I_h) de la corriente total de membrana (I_m), se perfundieron los oocitos durante 5 minutos con carbenoxolona (CBX, Ref C-4790, Sigma-Aldrich), diluida 500 μ M en una solución de ND96 sin sodio baja en divalentes. La corriente residual (I_r) resultado de la incubación con CBX, se restó a la corriente total ($I_h = I_m - I_r$). Finalmente pudimos diferenciar las corrientes correspondientes a hemicanales de otras corrientes presentes en el oocito (Fasciani, Temperan et al. 2013) teniendo en cuenta que: a) la activación de las corrientes de hemicanales ocurre por despolarización y el cierre por hiperpolarización, b) la magnitud de dichas corrientes es dependiente de concentración extracelular de iones divalentes y c) que los hemicanales presentan un potencial de equilibrio cercano a 0.

3.3.1.2.2 Registro de corrientes intercelulares

Se midieron las corrientes intercelulares (I_j) entre los pares de oocitos con la técnica de doble fijación de voltaje empalmando cada célula con dos microelectrodos, de corriente (I1 e I2) y dos de voltaje (V1 y V2) conectados a dos amplificadores independientes (Figura 9C). Durante el registro, inicialmente se fija el potencial de membrana para las dos células a un mismo valor ($V_m = -40$ mV) de manera que el voltaje intercelular (V_j) es 0 ($V_j = V_2 - V_1$, siendo V_1 y V_2 el voltaje de membrana de cada célula). A continuación se aplica un protocolo de pulsos de voltaje de ± 120 mV en incrementos de 20 mV durante 5 segundos al oocito 1 (O_1) mientras que el voltaje en el oocito 2 (O_2) se mantiene a -40

mV. En caso de que el par esté acoplado eléctricamente para mantener fijo su potencial de membrana es necesario inyectar la misma corriente que fluye del O₁ al O₂ pero de signo contrario, $I_j = -I_2$. Como resultado de cada pulso de voltaje aplicado a un par de oocitos acoplado obtenemos una señal de corriente con la que podemos calcular la conductancia intercelular (g_j) según la ley de Ohm, $g_j = I_j/V_j$ (Figura 9D). A partir de la conductancia se calculó la dependencia de voltaje intercelular (V_j) en el estado estacionario G_j/V_j o G_{hj}/V_m ajustando los valores a la siguiente ecuación Boltzmann: $G_{ss} = \{(G_{max} - G_{min}) / (1 + \exp[A(V_j/m - V_0)])\} + G_{min}$, donde la G_{max} es la conductancia máxima, la G_{min} es la conductancia residual no sensible a voltaje, V_0 es el voltaje intercelular al cual la conductancia se reduce a la mitad ($G_{ss} = (G_{jmax} - G_{min})/2$) y A es la pendiente o sensibilidad al voltaje, que viene definida como $A = zq/kT$ donde, z es el número de cargas equivalente de electrón (q) moviéndose a través de la membrana asociadas al sensor de voltaje (a 20°C $kT/q = 25.26$ mV). Esta función aplica para transiciones entre dos estados de conductancia unitaria del canal con una diferencia de energía entre ellos que depende linealmente del voltaje (Harris, Spray et al. 1981; Spray, Harris et al. 1981). Las constantes G_{max} , G_{min} , A y V_0 se trataron como parámetros libres y se calcularon con el método interactivo de error de mínimos-cuadrados (Sigma-Plot).

3.3.2 ENSAYO FUNCIONAL EN LA LÍNEA CELULAR N2a

3.3.2.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN EN LA LÍNEA CELULAR N2a

La línea celular Neuro-2a (N2a, ATCC CCL-131) empleada en los experimentos, cedida al laboratorio por el Dr. Eric C. Beyer del Departamento de Pediatría de la Universidad de Chicago, se caracteriza por carecer de la expresión de conexinas. Se cultivó en una atmósfera humificada con 5% de CO₂ a 37°C en medio Dulbecco (DMEM, ref. 42430025, Invitrogen) suplementado con el 10% de Suero Fetal Bovino (Ref. 10500, Invitrogen), y con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Ref. 15140-148, Gibco). Al alcanzar un 60-70% de confluencia se transfectó con el vector pIRES2-EGFP vacío como control o con el mismo vector que contenía las conexinas o mutantes clonados. Para ello, se sembraron las células en placas multipocillo de 24 pocillos (Ref. CLS3337-50EA, Sigma-Aldrich) a las que habíamos colocado un cubre por pocillo (Ref. 40CIR1600621, Thermo Fisher) en el caso de los estudios de inmunohistoquímica y transferencia por colorante. Se sembraron 30.000 células por pocillo que se transfectaron pasadas 24h con 1µg de ADN y lipofectamina (Ref. 11668-019, Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Entre 24 y 48 h después de la transfección se procesaron las muestras para su análisis.

3.3.2.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL EN LA LÍNEA CELULAR N2a

La extracción de proteína total se realizó, después de 3 lavados con PBS1X (Ref. 14200-059, Gibco), añadiendo a las células 500µl de buffer de lisis (150mM NaCl, Ref. S9888 Sigma-Aldrich; 50mM

TrisBase, Ref. 03118142001, Roche; 5mM EDTA pH8, Ref. E5134, Sigma-Aldrich; 5mM EGTA pH8, Ref. E4378, Sigma-Aldrich; 1% Tritón, 1µg/µl Ref. T9284, Sigma-Aldrich; 1µg/ml de leupeptina, Ref. L2884, Sigma-Aldrich y 1mM de PSMF Ref. P7626, Sigma-Aldrich). A continuación se recogieron las células con un rastrillo (Ref: 83,183 Sarstedt), se congelaron toda la noche a -20 °C y se sonicaron durante 30 segundos. Tras centrifugar el lisado 15 minutos a 14000rpm, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. En los estudios de degradación en los que empleamos cloroquina se incubaron las células 3 horas antes de la extracción con 100 µM CQ (Ref.C-6628, Sigma-Aldrich). Los lisados obtenidos se analizaron por Western blot siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para la proteína extraída de oocitos.

3.3.2.3 INMUNOCITOQUÍMICA EN LA LÍNEA CELULAR N2a

La inmunocitoquímica se realizó 24 horas después de la transfección. En primer lugar se fijaron lavando con PBS1X (Ref. 14200-059, Gibco) e incubando con paraformaldehído (Ref. P6148, Sigma-Aldrich) al 2% y al 4% durante 10 minutos a 4°C. A continuación se añadió solución de bloqueo (PBS1X, Ref. 14200-059, Gibco; 5% de suero de cabra, Ref. 50007A, Labclinics-Serolab y 0.05% de tritón, Ref. T3284, Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente y tras 20 minutos se incubó a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario (ANEXO I, Tabla 8) diluido en solución de bloqueo. Al día siguiente retiramos el anticuerpo primario y se añadimos Hoechst 33258 (B2883, Sigma-Aldrich) diluido 1:1500 durante 5 minutos, e incubamos de nuevo 40 minutos con el anticuerpo secundario (ANEXO I, Tabla 8). Finalmente, después de lavar con PBS y con agua, se montaron los cubres en portaobjetos con una gota de solución de montaje (ProlongGold, Ref. P36930, Invitrogen). Las imágenes de las preparaciones se adquirieron con un microscopio óptico de fluorescencia y un microscopio Nikon Eclipse Ti acoplado a un módulo confocal Nikon C1 y se procesaron con el programa NIS-Elements Advanced Research (Nikon).

3.3.2.4 TRANSFERENCIA INTERCELULAR DE COLORANTE EN LA LÍNEA CELULAR N2a

Las células transfectadas (EGFP positivas) se empalaron con un microelectrodo que tenía una resistencia de entre 200 y 400 MΩ. Antes de inyectar, se bajó la ganancia para no tener fondo verde de la proteína GFP, se llenó el electrodo con 5-6 carboxifluoresceína 133 mM (CF, 376 Da, carga -2, Ref. 46945, Sigma Aldrich) diluida en acetato potásico (Ref. P3542, Sigma-Aldrich 0.1M) y tras inyectar la célula y se aplicaron pulsos hiperpolarizantes de corriente de entre 0.25-1 nA. Durante 10 minutos se registró la señal emitida a 540/40 nm excitando a 488 nm con un microscopio confocal y el programa de curso temporal Lasersharp (MRC-1024, BioRad). En el proceso de adquisición de las imágenes se definieron tres regiones de interés (o ROI): la célula que se inyectó o célula donadora, la célula receptora o aceptoras que son las células en las que hay o no difusión de colorante y otra región

adicional del fondo. La cuantificación de la transferencia de colorante se llevó a cabo finalmente calculando la relación entre la intensidad de colorante de la célula aceptora (A) y la intensidad de colorante en la célula inyectada o donadora (D) que nos da el coeficiente de transferencia (A/D).

3.3.3 ENSAYO FUNCIONAL EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS HUMANOS

A partir de una biopsia de lóbulo temporal realizada en una paciente diagnosticada de epilepsia y resistente al tratamiento con fármaco se obtuvo tejido cerebral humano. La paciente fue evaluada de acuerdo al protocolo del Hospital La Princesa de Madrid por el equipo dirigido por el Dr. Rafael Sola, y el procedimiento contaba con la autorización del Comité Ético de Ensayos Clínicos de dicho hospital y con el consentimiento informado de la paciente. El material de partida fue una masa de tejido de menos de 1 gramo, con sustancia gris y sustancia blanca de una zona libre de descargas epilépticas que era necesario resecar para colocar la rejilla de electrodos de estimulación con el fin de controlar la epilepsia.

3.3.3.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS

El tejido cerebral fue separado en sustancia gris y sustancia blanca, y cada pieza fue troceada en esterilidad en pequeños dados de aproximadamente 1 mm de lado, en medio Leibowitz L15 al que se añadió penicilina/estreptomicina (Ref.15140-148, Gibco). Se procedió a la dispersión mecánica mediante una pipeta automática P1000 con puntas de filtro estériles y se mantuvo el cultivo en medio Dulbecco MEM/Ham's F12 (Ref. 42430025, Invitrogen, Ref. L0135-500, Biowest) suplementado con suero fetal bovino al 12% (Ref. 10500, Invitrogen), penicilina/estreptomicina (Ref.15140-148, Gibco), HEPES 10mM (Ref.15630080, Gibco), L-Glutamina 4.5 mM (Ref. 25030081, Invitrogen), piruvato 2 mM (Ref. 11360070, Gibco), transferrina humana 100 µg/mL (Ref. 10652202001, Roche), insulina 25 µg/mL (Ref. 1882, Sigma-Aldrich), selenito sódico 30 nM (Ref. S9133, Sigma-Aldrich), putrescina 60 nM (Ref. P5780, Sigma-Aldrich), progesterona 20 nM (Ref. P7556, Sigma-Aldrich), D-glucosa (hasta 6 g/l), EGF 20 ng/mL (Ref. 100-15, Peprotech), FGF2 10 ng/mL (Ref. 100-18B, Peprotech) y LIF (ESGRO, 1 U/mL) en una atmósfera humificada con 5% de CO₂ a 37°C. De este cultivo se generaron neuroesferas (agregados que contienen células madre neurales) de las cuales se pudieron diferenciar neuronas y glia, al retirar los factores de crecimiento. En uno de los cultivos se generaron células adherentes al plástico, no refringentes y que proliferaban en medio con 10% de suero fetal bovino, que se identificaron como astrocitos por ser GFAP positivas en la inmunohistoquímica. Las células fueron expandidas en número y preservadas en congelación para estudios posteriores. En los experimentos de inmunocitoquímica y transferencia por colorante se sembraron en placas de 24 pocillos con cubres 3.000 células por cubre 72 horas antes de la

transfección. Al alcanzar el 70% de confluencia, se transfectaron con los vectores de expresión pIRES-EGFP. La transfección se realizó igual que en células N2a mezclando 1 µg de ADN con lipofectamina e incubando la mezcla con las células durante 5-6 horas siguiendo las instrucciones del fabricante. Para extraer proteína endógena del cultivo primario de astrocitos se sembraron 5×10^4 células en frascos de 75 cm³ de superficie (Ref: CLS430641 Sigma-Aldrich). Tanto la extracción de proteína como los ensayos funcionales de transferencia por colorante se realizaron 24-48 horas después de la transfección.

3.3.3.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TOTAL EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS

Los estudios de expresión de proteína total se realizaron siguiendo el mismo protocolo que para células N2a.

3.3.3.3 INMUNOCITOQUÍMICA EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS

La inmunocitoquímica se realizó siguiendo el mismo protocolo y empleando los mismos anticuerpos que con las células N2a (ANEXO I, Tabla 8).

3.3.3.4 TRANSFERENCIA INTERCELULAR DE COLORANTE EN CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS HUMANOS

Los estudios de transferencia por colorante se realizaron siguiendo el mismo protocolo que para células N2a.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el programa Sigma Plot para realizar el análisis estadístico de los datos. Las diferencias entre grupos se evaluaron con la prueba t de Student si los datos seguían una distribución normal o con la prueba U de Mann-Whitney en los casos en que los datos no siguieran una distribución gaussiana. Los grupos se consideraron significativamente diferentes en los casos en que el p valor fue <0.05

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación/clonaje secuenciación o mutagénesis de los vectores generados.

NOMBRE	SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDO 5' → 3'	TÉCNICA
Cx43ODDDdcha	TGGGACAGGAAGAGTTTGCAC	PCR
Cx43ODDDizda	CACCTGGTGCACCTTTCTACAGCAC	PCR
S1-Hcx43	GATGGTGTCAATGTGGACATGCAC	Secuenciación
S2-Hcx43	GACTGTGGGTCTCAAAAATATGCT	Secuenciación
D179N	AACAGTCCACCTGATGTGGGCA	Secuenciación
HCx43 p.V85M F	GTCCTGCAGATCATATTTATGTCGGTACCCACACTCTTGTAC	Mutagénesis
HCx43 p.V85M R	GTACAAGAGTGTGGGTACAGCCATAAATATGATCTGCAGGAC	Mutagénesis

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección en el sistema de expresión de oocitos de *Xenopus laevis*.

ANTICUERPO	EPÍTOPO	ESPECIE	REFERENCIA	DILUCIÓN
anti- Cx43	aa 252-270	Ratón	MAB3068, Chemicon	1/500
anti- Cx30	C-terminal	Conejo	71-2200, Invitrogen	1/500
anti- GAPDH	Región WARS	Pollo	AB2302, Millipore	1/10000
anti- ratón IgG PO	-	Cabra	RPN 2106, GE Healthcare	1/2000
anti- conejo IgG PO	-	Cabra	RPN 2106, GE Healthcare	1/2000
anti- pollo PO	-	Cabra	603-103-126, Rockland	1/4000

Tabla 8. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunocitoquímica realizada en la línea celular N2a transfectada y/o en el cultivo primario de astrocitos humanos (CxASTRO).

ANTICUERPO	EPÍTOPO	ESPECIE	REFERENCIA	DILUCIÓN
anti- Cx43	aa 252-270	Ratón	MAB3068, Chemicon	1/200
anti- Cx30	C-terminal	Conejo	71-2200, Invitrogen	1/200
anti-Cx47	aa 344-399	Conejo	suministrado por J. Orthmann-Murhy	1/5000
anti- GFAP	Cadena completa	Conejo	Z0334, Dako	1/500
anti- ratón IgG Alexa Fluor 568	-	Cabra	A-11031, Thermo Scientific	1/500
anti- conejo IgG Alexa Fluor 488	-	Cabra	A-11034, Thermo Scientific	1/500

IV. RESULTADOS

3.5 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *GJA1* EN PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA ASOCIADA A DISPLASIA OCULODENTODIGITAL.

El estudio genético se realizó en dos familias españolas en las que clínicamente uno o más de sus miembros presentaban una paraparesia espástica (SPG) asociada a un fenotipo con malformaciones compatibles con padecer una displasia oculodentodigital (ODDD) (Tabla 9).

Familia 1. El probando es un varón de 37 años que nos fue remitido desde la consulta de Neurología del Hospital Ramón y Cajal por presentar una paraparesia espástica asociada a una displasia oculodentodigital. El paciente refiere dificultad progresiva para la deambulación desde los 6 años y en la exploración física se observó que tenía una sindactilia tipo III, micrognatia, mala implantación dental, hipotelorismo, pies valgus y cifoescoliosis y en la exploración neurológica una marcha espástica en tijera con un marcado piramidalismo. En la resonancia magnética nuclear se observó una marcada reducción del calibre de la medula espinal y una discreta atrofia cortical en secuencias potenciadas en T1 (Figura 10A).

En la secuenciación del ADN genómico del probando se identificó en heterocigosis la mutación puntual c.443G>A en el exón 2, que predice la sustitución p.R148Q (Figura 10B). Dicha mutación no se identificó en los otros familiares del paciente analizados, la madre, el padre y la hermana, que no presentan signos de ODDD ni de afectación neurológica (Figura 10B,C), sugiriendo que se trata de una mutación *de novo*.

La mutación R148Q se ubica en el asa citoplasmática de la Cx43 entre los dominios transmembrales TM2 y TM3 (Delmar 2004; Zhou, Yang et al. 2007) (Figura 10D). La posible naturaleza patogénica que podría resultar de la sustitución de un amino ácido cargado positivamente por otro polar, como es el caso de la mutación R148Q, se ve reforzada por un alto grado de conservación de este residuo a lo largo de la evolución de los vertebrados en las conexinas ortólogas a la Cx43 humana (Figura 10E).

Familia 2. La probando fue una mujer de 47 años de edad remitida desde la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica que acudió a la consulta por presentar marcha espástica en tijera y piramidalismo. En el examen médico se le detectaron muchos de los signos clínicos característicos de la ODDD: sindactilia bilateral del IV y V dedo, microftalmia, hipertelorismo, hipoplasia del pliegue del epicanto nasal alar y microdoncia con hipoplasia del esmalte dental.

Respecto a los antecedentes familiares, la paciente refiere que su madre también tenía sindactilia y alteraciones en la marcha y que falleció por muerte súbita, y que el abuelo materno

Tabla 9. Características clínicas y genéticas de los pacientes estudiados con paraparesia espástica asociada a displasia oculodentodigital. (S, esporádica; AD, autosómica dominante; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado; SPG, paraparesia espástica).

	Familia 1	Familia 2		
	II:1 (caso índice)	III:1 (caso índice)	II:6 (hermana)	IV:3 (hijo)
Genotipo	p.R148Q/WT	p.V85M/WT	p.V85M/WT	p.V85M/WT
Tipo de herencia	S	AD	AD	AD
Género	M	F	F	M
Edad del diagnóstico	41	47	N.D	N.D
Alteraciones neurológicas	SPG	SPG	SPG	SPG
Malformaciones craneofaciales	Hipotelorismo, micrognatia	Hipertelorismo, pliegue del epicanto nasal alar	N.D	N.D
Anomalías oftalmológicas	N.D	Microftalmia	N.D	N.D
Anomalías dentales	Mala implantación dental	Microdoncia con hipoplasia del esmalte dental	N.D	N.D
Malformaciones esqueléticas	Sindactilia tipo III, pies valgos y cifoescoliosis	Sindactilia bilateral	Sindactilia bilateral	Sindactilia bilateral

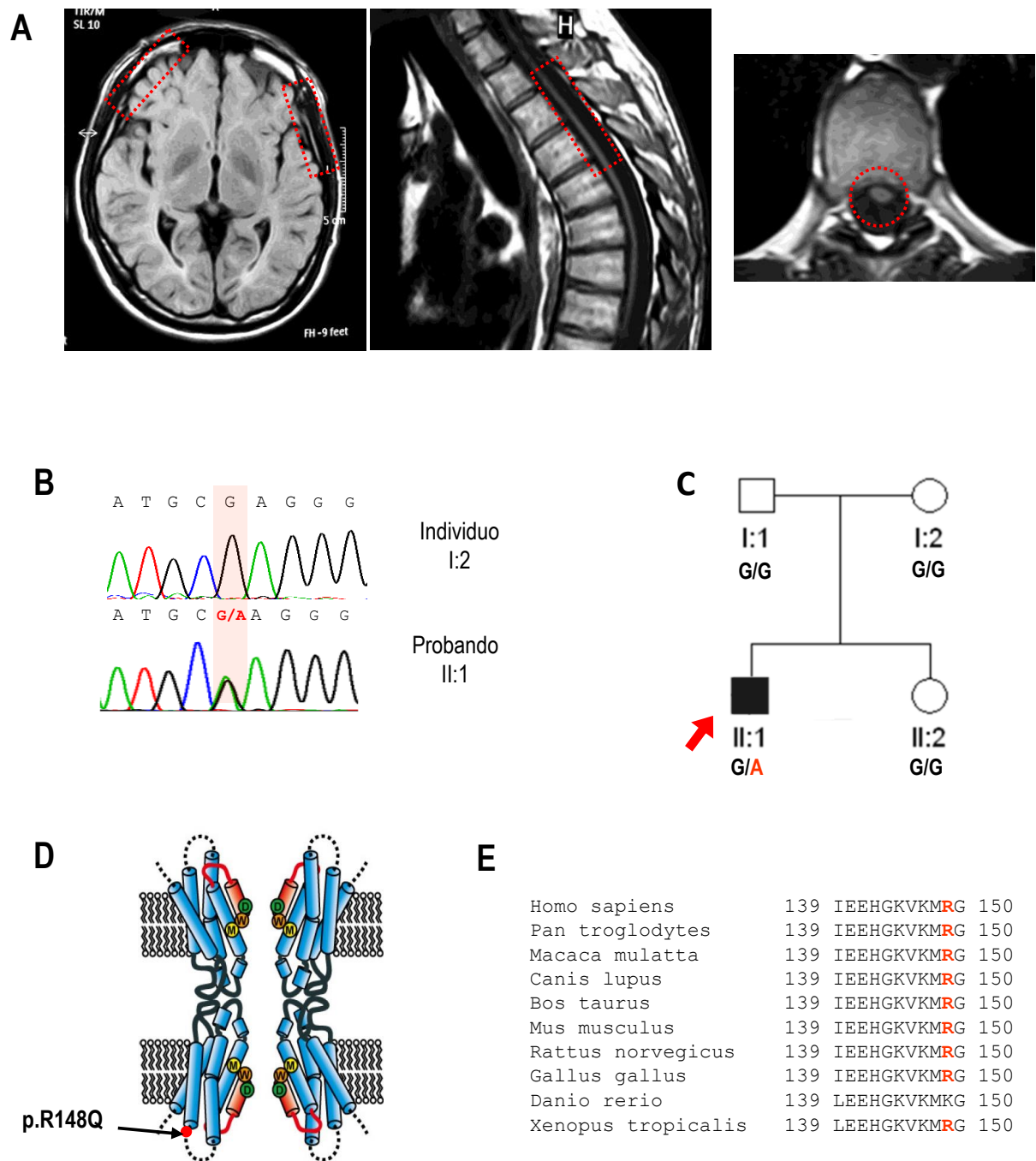


Figura 10. Estudio clínico y genético de la familia 1. **A)** Imagen de resonancia magnética mostrando una discreta atrofia cortical (*izda.*) y un marcado adelgazamiento de la médula espinal (*dcha.*). **B)** Cromatograma de la secuenciación del ADN del paciente (II:1) con la mutación c.443G>A (p.R148Q) en heterocigosis y de un familiar asintomático (I:2) sin la mutación. **C)** Árbol genealógico de los miembros afectados con SPG y ODDD (*en negro*) y los no afectados (*en blanco*) sugiriendo la aparición *de novo* de la mutación. **D)** Modelo de la estructura de un canal intercelular en el que se representa la localización de la mutación en el asa citoplasmática. **E)** Análisis de la conservación filogenética del residuo de arginina en la posición 148 en la Cx43 de distintas especies de vertebrados.

también falleció por muerte súbita. Entre sus cuatro hermanos, tiene una hermana con sindactilia y SPG, y entre sus cuatro hijos, hay uno de ellos que también tiene SGP y sindactilia. En conjunto, el árbol genealógico de esta familia de cuatro generaciones sugiere un patrón de herencia autosómico dominante en el que la sindactilia y la SPG cosegregan con el mismo grado de penetrancia en todos los miembros afectados (Figura 11A). En la secuenciación del ADN de la probando se identificó en heterocigosis la mutación puntual c.253G>A en el exón 2 de la región codificante del gen *GJA1*, que predice el cambio p.V85M; dicha mutación también se encontró en su hijo afecto, pero que no en ninguno de los otros hijos asintomáticos; y en su hermana afecta pero no en su hermano sano (Figura 11B).

La sustitución de la valina⁸⁵ por un residuo de metionina, también hidrofóbico, se localiza en el segundo dominio transmembranal de la Cx43 (Figura 11C); sin embargo, este residuo de valina está perfectamente conservado en todas las Cx43 ortólogas de todas las especies de vertebrados analizadas (Figura 11D).

3.6 ENSAYO FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LA CONEXINA-43 ASOCIADAS A PARAPARESIA ESPÁSTICA

Para confirmar la naturaleza patogénica de las mutaciones identificadas y contribuir al esclarecimiento de los mecanismos patogénicos a través de los cuales estas mutaciones llegan a producir la paraparesia espástica se realizó su ensayo funcional. Dicho ensayo tiene como objetivo determinar cómo afectan las mutaciones en la región codificante a la funcionalidad de la Cx43 y qué efecto tiene la expresión de las proteínas mutadas sobre la Cx43 silvestre en la condición de heterocigosis de los pacientes sobre el acoplamiento astrocito-astrocito y astrocito-oligodendrocito.

3.6.1 BIOSÍNTESIS Y FUNCIONALIDAD DE LOS HEMICANALES MUTADOS DE Cx43

3.6.1.1 NIVELES DE EXPRESIÓN TOTAL Y EN MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS MUTANTES DE Cx43. TASA DE DEGRADACIÓN.

Primero, se determinó el efecto de las mutaciones Cx43V85M y Cx43R148Q sobre el nivel de expresión total y en la membrana celular de la Cx43 en el sistema de expresión de los oocitos de *Xenopus laevis*. En este tipo de ensayo se inyectó un grupo de oocitos controles con el ARN de la Cx43 silvestre (Cx43WT), un segundo grupo con el ARN de cada una de las Cx43 mutadas a la misma concentración y un tercer grupo en el que se simuló la condición de heterocigosis de los pacientes inyectando en una relación 1:1 una mezcla los ARNs de la Cx43 silvestre con cada uno de los mutantes a la misma concentración final; como control negativo se inyectó un grupo de oocitos únicamente con el vehículo conteniendo el oligonucleótido antisentido de la Cx38 de *Xenopus* para

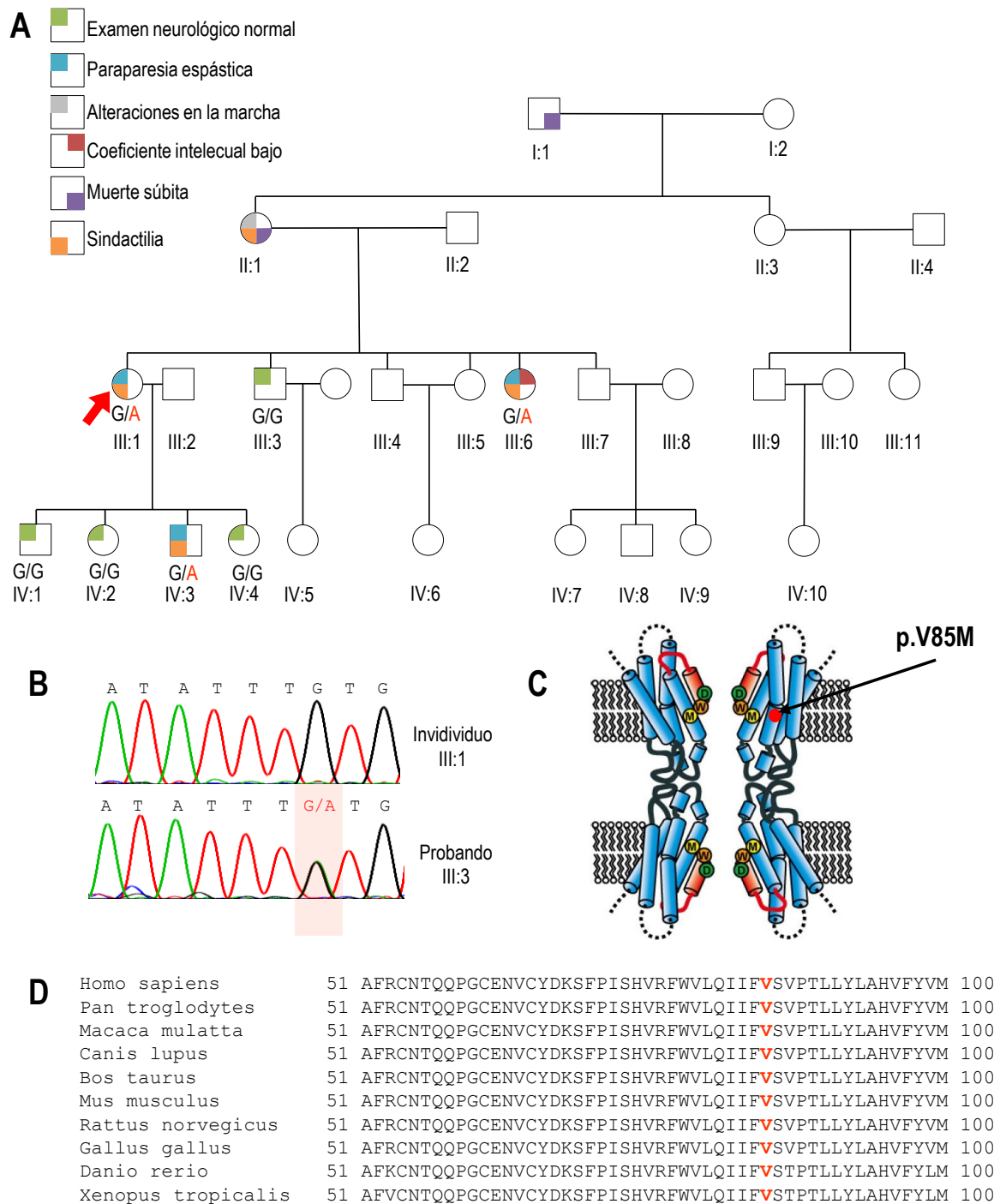


Figura 11. Resultados clínicos y genéticos de la familia 2. **A)** Árbol genealógico de familia de cuatro generaciones en la que se muestran los miembros afectados, indicando el tipo de patología que padecen, y su genotipo; en todos ellos se asocia el alelo mutado (*en rojo*) a SPG y ODDD. **B)** Cromatograma de la secuencia del ADN del probando y de un miembro asintomático mostrando el cambio c.253 G>A en heterocigosis (p.V85M). **C)** Localización de la mutación V85M en el segundo dominio transmembranal. **D)** Análisis de la conservación filogenética de la valina en posición 85 en la Cx43 de distintas especies de vertebrados.

bloquear la expresión de esta conexina endógena de los oocitos (Barrio, Suchyna et al. 1991). Los oocitos se recolectaron a las 24 h después de la inyección, y antes de ser lisados se sometieron a un tratamiento con un agente biotinizante que no permea la membrana plasmática. Las muestras correspondientes al lisado total y al purificado de las proteínas biotinizadas de la superficie celular se procesaron para su posterior análisis por western blot. En los geles de SDS de las muestras de los oocitos inyectados con el ARN de la Cx43 silvestre y de los dos mutantes se detectó una banda mayoritaria de 40 kD, y en ocasiones también otra, minoritaria no siempre detectable, de 41 kDa que podrían corresponder respectivamente a la forma monomérica no fosforilada y fosforilada de la proteína Cx43 (Musil, Cunningham et al. 1990; Solan and Lampe 2009); dichas bandas no se detectaron en las muestras de los controles negativos (Figura 12). En promedio, la intensidad de la banda de 40 kDa en las muestras del lisado total de los oocitos inyectados con el mutante R148Q fue ligeramente menor, pero no estadísticamente diferente, comparado con la Cx43WT mientras que en el caso del mutante V85M se observó una reducción significativa de la expresión de aproximadamente el 50% (Figura 12, A, *i* y *ii*). El análisis de la fracción específica de membrana plasmática mostró que la Cx43R148Q se acumula algo más en la superficie celular que la Cx43WT sin encontrar diferencias significativas, mientras que en el caso de la mutación V85M se produjo una reducción en membrana plasmática en la misma proporción que en sus niveles de expresión total.

En los experimentos de co-expresión con mitad de dosis del mutante y de la Cx43WT se observó en el caso de la mutación R148Q unos niveles de expresión total y en membrana muy similares a los que indujeron cada uno de ellos por separado para la misma concentración final de ARN; sin embargo, en el caso de las co-inyecciones Cx43V85M y Cx43WT los niveles de expresión total y en membrana plasmática fueron aproximadamente un 25%, indicando que aun cuando la mutación V85M reduce la expresión de la Cx43 no ejerce un efecto de inhibición dominante sobre la síntesis y el posterior procesamiento de la Cx43 silvestre (Figura 12, A, *i* y *ii*).

A continuación se evaluó la tasa de degradación de los mutantes de la Cx43 bloqueando la vía lisosomal de la degradación de las proteínas con cloroquina (CQ) (Musil, Le et al. 2000). Para ello, los oocitos inyectados con el ARN de la Cx43WT y de los dos mutantes se trataron durante 24 h con CQ a una concentración de 100 y 300 μ M. En el caso de las muestras de lisado total de los oocitos Cx43WT y la Cx43V85M tratadas con CQ se observó respecto a los no tratados un aumento dosis dependiente de sus niveles de expresión; con la concentración de 300 μ M de CQ, la tasa de degradación del mutante V85M en 24 h fue aproximadamente del doble que la de la proteína silvestre (Figura 12, B, *i* y *ii*). Comparativamente, en el caso de la Cx43R148Q se produce un incremento significativamente menor en presencia de CQ, indicando una menor o más lenta degradación por la vía lisosomal de este mutante (Figura 12, B, *i* y *ii*).

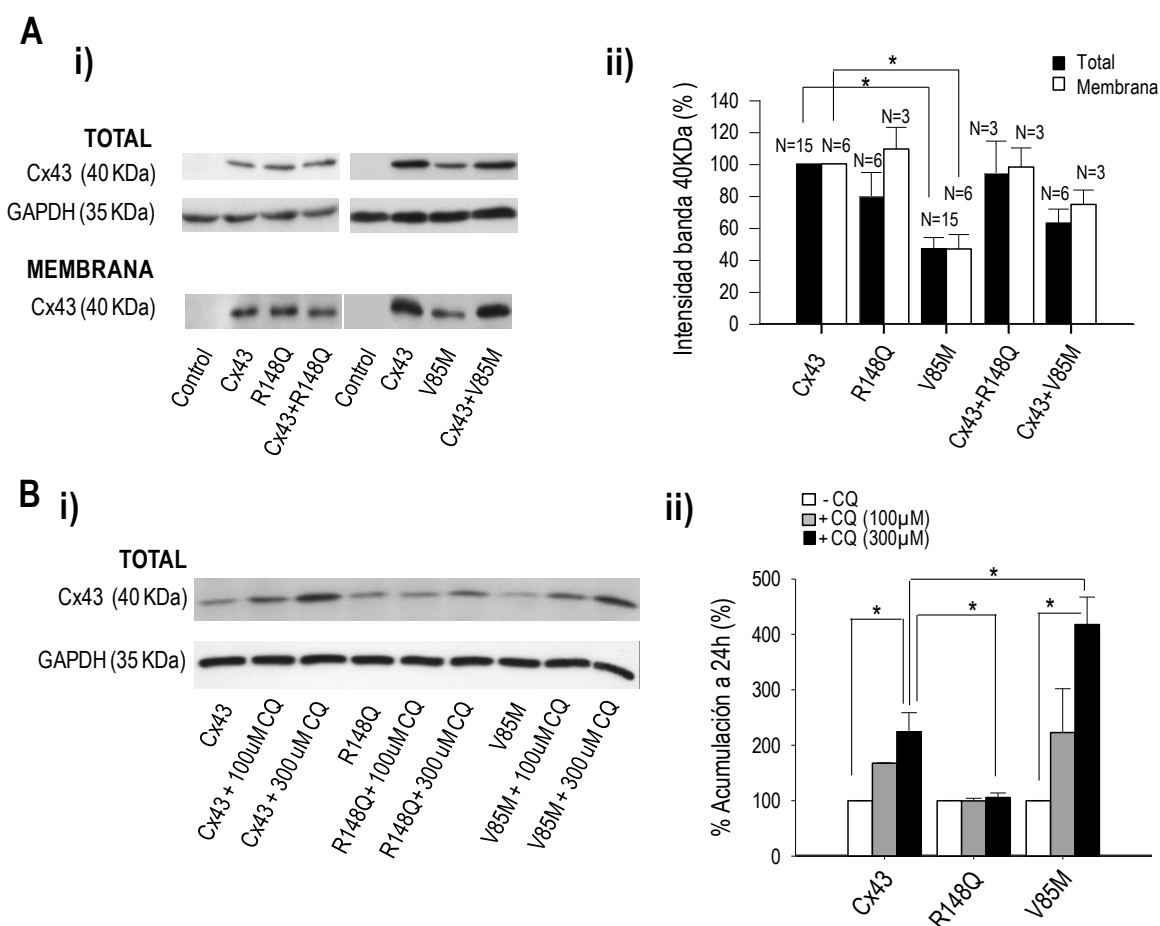


Figura 12. Expresión total y en la membrana plasmática de las proteínas Cx43 mutadas. **A)** Western blots de las muestras de lisado total y de la fracción biotinilada de membrana plasmática de oocitos inyectados con el ARN de la Cx43 silvestre (WT) y con las dos mutaciones (R148Q y V85M) solo y con una mezcla 1:1 del mutante y el silvestre y la misma concentración final (WT+R148Q y WT+V85M), que simula la condición de heterocigosis de los pacientes, y no inyectados con ningún ARN (control) (i) y cuantificación de la intensidad de la banda monomérica de 40 kDa de la Cx43 normalizada con respecto al control de carga GAPDH (ii); los niveles de expresión total y en la superficie celular del mutante R148Q fueron similares a los de la Cx43WT, la mutación V85M, por el contrario, produjo una reducción de la expresión total y en la membrana celular proporcionalmente igual, que en los experimentos de co-inyección no afecta a los niveles de expresión de la Cx43WT. **B)** Tasa de degradación lisosomal de las Cx43 mutadas, N=3, n=60; (i) western blot de los oocitos inyectados con la Cx43WT, R148Q o V85M e incubados con y sin cloroquina (CQ) durante 24 h a una concentración de 100 y 300 μM, y (ii) porcentaje medio de la tasa de degradación/24 h; la inhibición dosis dependiente de CQ de la degradación del mutante V85M es significativamente mayor que la de la Cx43WT mientras que la del mutante R148Q es poco CQ-dependiente. (media ± se; N, n° de experimentos; *, p<0.05).

3.6.1.2 PERMEABILIDAD A YODURO DE PROPIDIO. REGULACIÓN POR LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE CATIONES DIVALENTES.

Teniendo en cuenta que los mutantes Cx43R148Q y Cx43V85M se expresan en la superficie celular y que las conexinas se transportan a la membrana plasmática ya oligomerizadas formando hemicanales (Koval, Molina et al. 2014), el siguiente paso fue estudiar la funcionalidad de los hemicanales mutados en oocitos aislados, no apareados. Para ello se realizaron experimentos de captación de colorantes, para determinar la contribución de los hemicanales mutados a la permeabilidad de la membrana plasmática, se cuantificaron las corrientes de los hemicanales por técnicas electrofisiológicas y se analizaron sus propiedades de regulación por la concentración extracelular de cationes divalentes y por el potencial de membrana (Fasciani, Temperan et al. 2013).

A las 24 h después de la inyección los oocitos inyectados con la Cx43WT y los mutantes se incubaron durante 30 min con 1.5mM de YP (PM: 441 Da, cargado positivamente, +2) y posteriormente se valoró mediante microscopia confocal la intensidad de la acumulación intracelular del colorante en la región submembranal (Figura 13). En el grupo de oocitos en los que la incubación se realizó en un medio con una concentración extracelular normal de cationes divalentes (1.8 mM Ca^{2+} y 1.0 mM Mg^{2+}), no se detectó acumulación intracelular del YP en ninguno de estos grupos, ni tampoco en los oocitos controles no inyectados con ningún ARN. Sin embargo, cuando la incubación se realizó en ausencia de cationes divalentes (0 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+}) se observó una intensa acumulación submembranal del colorante en los oocitos Cx43WT, Cx43R148Q y Cx43V85M, pero no en los controles sin inyección de ARN (Figura 13A), indicando que la reducción de la concentración de cationes divalentes induce la apertura de los hemicanales y la subsiguiente entrada del colorante al interior celular; en todos los casos la captación del YP se previno añadiendo carbenoxolona (300 μM), un bloqueante de canales/hemicanales de conexina, 30 minutos antes y durante el periodo de incubación, confirmando que la entrada del YP al interior celular está mediada por los hemicanales de Cx43. Comparativamente, los niveles de captación de los oocitos Cx43R148Q fueron similares a la de los oocitos Cx43WT, sin embargo en el caso de los oocitos Cx43V85M estos niveles fueron significativamente menores en aproximadamente un 50%, un nivel de reducción similar al observado en la acumulación de esta proteína mutada en la superficie celular (Figura 13B). Los niveles de captación no se incrementaron de forma significativa quelando los niveles extracelulares residuales de los cationes divalentes con EGTA (5 mM), indicando que en todos los casos con la reducción de la concentración extracelular cationes divalentes en la solución 0 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+} es suficiente para inducir la máxima probabilidad de apertura de los hemicanales. Estos resultados indican que, como los hemicanales de Cx43WT, los hemicanales de Cx43R148Q y en menor medida los de Cx43V85M son capaces de aumentar la permeabilidad de la membrana celular en condiciones de baja concentración

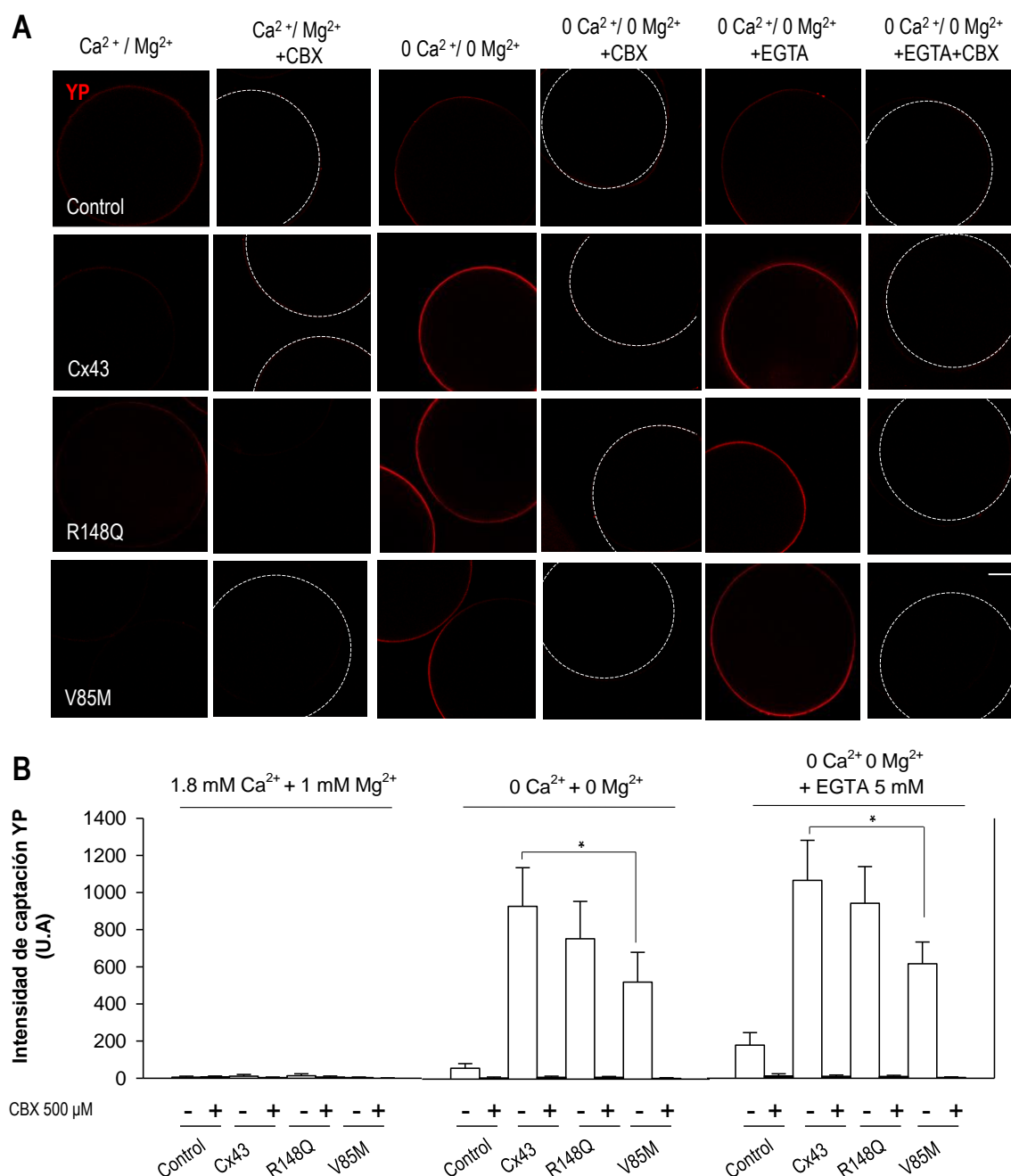


Figura 13. Funcionalidad de los hemicanales Cx43R148Q y Cx43V85M: I. Captación de yoduro de propidio (YP). **A)** Imágenes de microscopía confocal (10x, barra de escala 200 μm) mostrando la acumulación submembranal de YP en función de la concentración extracelular de cationes divalentes y de la ausencia/presencia de carbenoxolona (CBX; 300 μM). **B)** Cuantificación de la intensidad de captación del YP. En presencia de una concentración normal de cationes divalentes en el medio extracelular (1.8 mM Ca²⁺ y 1.0 Mg²⁺) y en ausencia. La reducción de la concentración de cationes divalentes (0 mM Ca²⁺ y 0 Mg²⁺) indujo un aumento significativo de la captación en los oocitos Cx43WT y Cx43R148Q y en menor medida en los oocitos Cx43V85M, que no se incrementa significativamente en presencia de EGTA (5 mM) y que se previene con CBX, indicando que los hemicanales mutantes, como los silvestres, están normalmente cerrados en presencia de cationes divalentes y se abren en su ausencia produciendo un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática que es menor en los hemicanales Cx43V85M. Valores promedio ± s.e., N=5 y n= 16-20; *, *p* < 0.05).

de cationes divalentes en el medio extracelular.

3.6.1.3 CORRIENTES DE LOS HEMICANALES. REGULACIÓN POR EL POTENCIAL DE MEMBRANA (V_m).

Las corrientes de los hemicanales de Cx43 silvestres y mutados se midieron con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos en oocitos aislados aplicando protocolos de pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta +60 mV, en incrementos de 20 mV y de 4 s de duración. Los registros obtenidos en presencia de una concentración normal de cationes divalentes mostraron unos niveles de corriente de baja amplitud en los oocitos Cx43WT, indistinguibles de los registrados en los oocitos controles no inyectado con ARN; sin embargo, en ausencia de cationes divalentes las corrientes transmembranas en el potencial de fijación de -40 mV y las inducidas por los pulsos despolarizantes aumentaron significativamente en los oocitos Cx43WT pero no en los controles (Figura 14A, *i* y *ii*), indicando que la activación por voltaje de los hemicanales de Cx43 estaba completamente bloqueada en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes. Las corrientes de los hemicanales de Cx43WT son de entrada en valores negativos del potencial de membrana y de salida para la polaridad positiva, indicando que su potencial de reversión de las corrientes es de -20 mV, próximo a 0 (Figura 14A, *Er* en *i* y *ii*). La dependencia de voltaje que exhibieron los hemicanales de Cx43WT en ausencia de cationes divalentes es más compleja que la previamente descrita (Contreras, Saez et al. 2003); primero, con la despolarización del V_m en el rango de -40 a +20 mV se produce la activación lenta y progresivamente mayor de los hemicanales en función del grado de despolarización y a lo largo de la duración de los pulsos, y al retornar el V_m al potencial de fijación (-40 mV) las correspondientes corrientes de cola aumentaron en amplitud y muestran un cinética de cierre progresivo. Sin embargo, en el rango de +40 y +60 mV las corrientes de los hemicanales muestran una cinética de cierre durante los pulsos y las correspondientes corrientes de cola son bifásicas, primero aumentan y luego disminuyen lentamente hasta cerrarse por completo (Figura 14A-*i*); este comportamiento es atribuible a la inactivación de los hemicanales con la polarización positiva del V_m y a la desinactivación y posterior deactivación de los hemicanales al retornar el V_m a valores de polarización negativa. Esta dependencia bipolar del voltaje de los hemicanales de Cx43 pudo confirmarse con un protocolo de voltaje en el que se fijó el V_m en 0 mV y se aplicaron pulsos de polaridad negativa y positiva (± 100 mV en incrementos de 20 mV y 5 s de duración). Los registros muestran que cuando el gradiente de V_m alcanza un determinado umbral las corrientes de los hemicanales Cx43WT cierran tanto para la polaridad negativa como para la polaridad positiva del V_m (Figura 14B-*i*). Las curvas conductancia/voltaje (G_h / V_m) muestran una rectificación "instantánea" del valor inicial de la conductancia macroscópica de los hemicanales Cx43WT (G_{hi}), i.e., más rápida que la resolución de la técnica de fijación de voltaje de

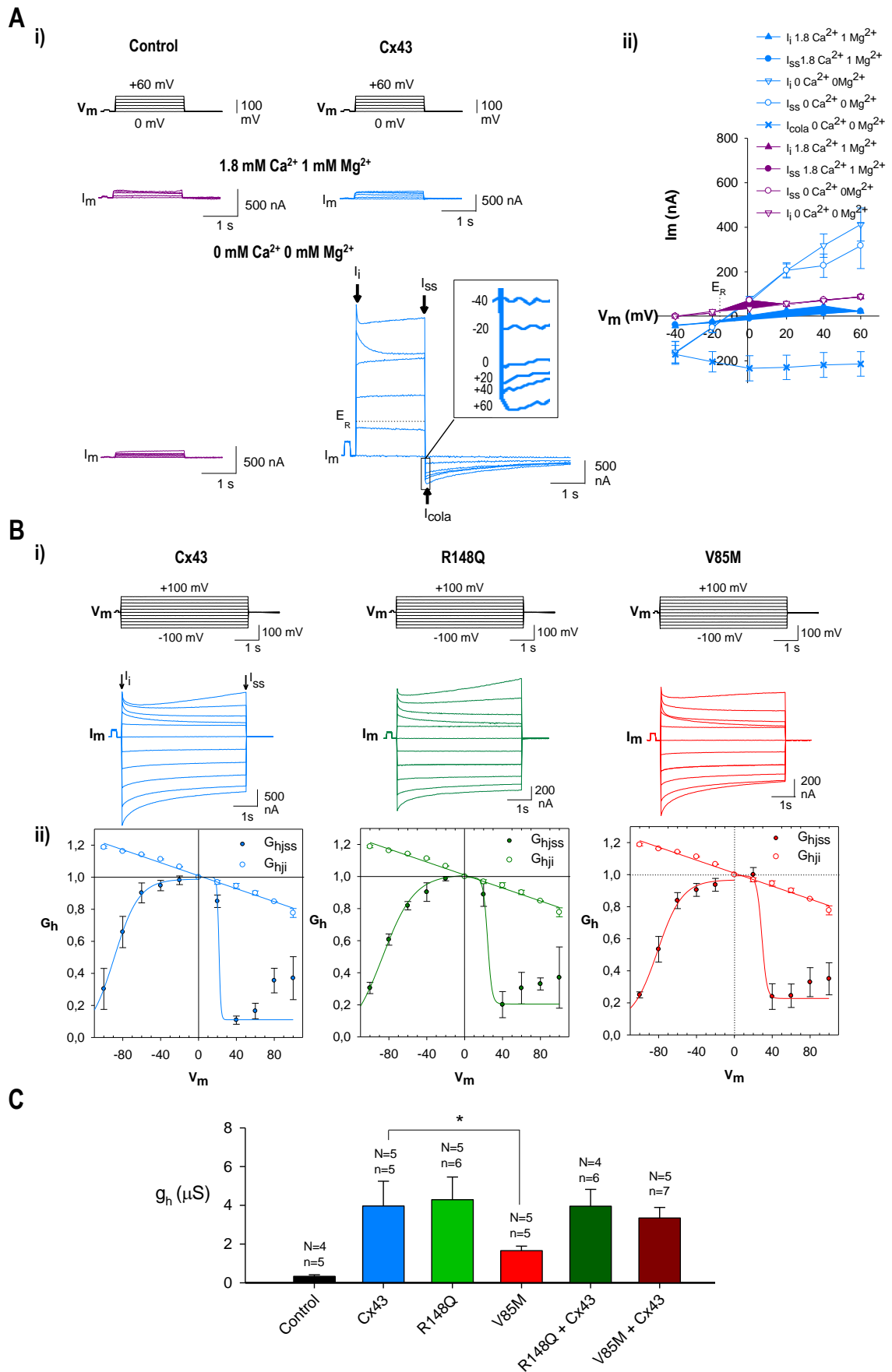


Figura 14. Funcionalidad de los hemicanales Cx43R148Q y Cx43V85M: II. Corrientes de los hemicanales y su regulación por el potencial de membrana (V_m). A) Activación e inactivación de los

hemicanales de Cx43WT por la despolarización progresiva del potencial de membrana; (i) corrientes transmembrana (I_m) evocadas por pulsos despolarizantes (V_m ; desde -40 mV a +60 mV en incrementos de 20 mV) en los oocitos controles y Cx43WT en presencia y ausencia de cationes divalentes en la solución extracelular (1.8 mM Ca^{2+} +1.0 mM Mg^{2+} y 0 mM Ca^{2+} +0 mM Mg^{2+}) y (ii) curvas corriente/voltaje (I_m/V_m) en las que se ha representado el valor promedio inicial y de estado de las corrientes (I_i e I_{ss}) durante los pulsos y el valor inicial de las corrientes de cola (I_{cola}) al retornar a -40 mV (V_h) (N=5); en concentraciones normales de cationes divalentes, las corrientes transmembrana fueron similares y de baja amplitud en ambos grupos de oocitos, sin embargo en ausencia de cationes divalentes la despolarización de los oocitos Cx43WT, pero no de los controles, indujo un significativo incremento en la amplitud de las corrientes, que inicialmente se activan y posteriormente se cierran con el grado de despolarización del V_m ; al retornar al V_h la amplitud de las correspondientes I_{cola} para los pulsos -20 a +20 mV aumentan y la cinética es de cierre y para los pulsos de +40 y +60 mV la amplitud disminuye y su cinética es primero de apertura y luego de cierre (recuadro en *i*). **B)** Dependencia de voltaje bipolar de los hemicanales de Cx43 silvestre y mutados; (i) corrientes transmembrana (I_m) registradas en los oocitos que expresan la Cx43 silvestre (Cx43WT) y los mutantes (Cx43R148Q y Cx43V85M) en respuesta a un protocolo de pulsos de ± 100 mV, en incrementos de 20 mV y 5 s de duración aplicado en un $V_h = 0$ mV y (ii) curvas de conductancia/voltaje (G_h/V_m) de los hemicanales en las que se representan el valor promedio inicial (G_{hi}) y de estado (G_{hss}) de la conductancia normalizadas respecto a su valor en el prepulso (N=5). Los hemicanales de Cx43R148Q y Cx43V85M como los de la Cx43WT muestran la misma dependencia de V_m con una rectificación rápida o "instantánea" de la G_{hi} , que aumenta con la polaridad negativa y disminuye con la polaridad positiva, y una G_{hss} con un valor máximo entre ± 20 mV y que se reduce asimétricamente para las dos polaridades del V_m con distintos parámetros de sensibilidad a voltaje (ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 10). **C)** Niveles de expresión de las corrientes de los hemicanales mutados. Los oocitos se inyectaron solo con la Cx43WT, la Cx43R148Q o la Cx43V85M y con la combinación en una relación 1:1 de cada mutante con la Cx43WT a la misma concentración final (Cx43+ R148Q y Cx43+V85M); en comparación con la Cx43WT, los valores de conductancia macroscópica (g_h) registrados en los oocitos R148Q y Cx43+R148Q fueron similares; sin embargo, en el caso del mutante V85M fueron significativamente menores y en la combinación Cx43+V85M intermedios a los de los oocitos Cx43 y V85M. Valores promedio \pm s.e; *, $p < 0.05$.

~1 ms, que se redujo en ~40% de -100 a +100 mV. El valor conductancia de estado (G_{hss}) fue máximo entre ± 20 mV y se redujo asimétricamente para las dos polaridades del V_m , de forma más pronunciada y con una cinética más rápida para la polaridad positiva que para la negativa (Figura 14B, *i-ii*; ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 10); además, durante los pulsos +80 a +100 mV, se observó un incremento neto de las corrientes/conductancia. Esta curva de dependencia de voltaje bipolar es compatible con la existencia de dos mecanismos de compuerta en serie que operan con la polaridad opuesta del V_m y que inducen el cierre completo del canal para la polaridad negativa (Fasciani, Temperan et al. 2013). A partir de este comportamiento de los hemicanales a nivel macroscópico se puede inferir que los hemicanales de Cx43WT están cerrados a valores hiperpolarizados del V_m , se abren progresivamente con el grado de despolarización y una vez activados se cierran parcialmente a potenciales de membrana de mayor polaridad positiva.

Los niveles de expresión de las corrientes de los hemicanales mutados registradas en los oocitos Cx43R148Q en ausencia de cationes divalentes en la solución extracelular fueron similares a la de los oocitos Cx43WT, mientras que en los oocitos Cx43V85M mostraron una reducción de las corrientes significativa de aproximadamente el 50% (Figura 14C). En ambos casos, sin embargo, las propiedades de regulación por voltaje fueron indistinguibles a las previamente descritas para los hemicanales Cx43WT (Figura 14B, *i-ii*; ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 10). Este valor de conductancia reducido en los hemicanales de V85M corresponde aproximadamente al 50% (Figura 14C) y se correlaciona con una menor captación de yoduro de propidio y una disminución de la expresión de proteína que llega a la superficie celular con respecto al silvestre (Figura 12A-*i*; 13, B). En los experimentos de co-expresión de cada uno de los mutantes con la Cx43WT en los que se inyectó una mezcla de ARN mutado y silvestre en una relación 1:1 y a la misma concentración final que cada uno por separado, para simular la condición de heterocigosis de los pacientes, los niveles de corriente de los hemicanales en los oocitos Cx43R148Q+Cx43WT fueron similares a los inducidos por la Cx43WT, y en el caso de la combinación Cx43V85M+Cx43WT algo menores e intermedios a los registrados en los oocitos Cx43WT y Cx43V85M, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 14C).

Estos resultados indican que, como los hemicanales de Cx43WT, los hemicanales de Cx43R148Q y en menor medida los de Cx43V85M son capaces de aumentar la permeabilidad de la membrana celular en condiciones de baja concentración de cationes divalentes en el medio extracelular.

En resumen, los dos mutantes analizados, la Cx43R148Q y la Cx43V85M, son capaces de acumularse en la membrana celular y de formar hemicanales funcionales homoméricos, y probablemente también heteroméricos con la Cx43WT, con unas propiedades de regulación por voltaje

y una dependencia de los cationes divalentes extracelulares superponibles a la de los hemicanales silvestres de Cx43. Cuantitativamente, el mutante Cx43R148Q solo y en combinación con la proteína Cx43 silvestre indujo el mismo nivel de acumulación de Cx43 en la membrana plasmática y un aumento similar en la permeabilidad de membrana y en las corrientes iónicas transmembrana que la Cx43WT; por el contrario, la mutación Cx43V85M redujo significativamente y en la misma proporción los niveles de expresión en la membrana plasmática y los cambios en permeabilidad y en las corrientes transmembrana, sin embargo en los experimentos de coexpresión no indujo un efecto de inhibición dominante sobre la Cx43 silvestre.

3.6.1.4 FORMACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS CANALES INTERCELULARES MUTADOS .

En la última etapa de la biosíntesis de los canales intercelulares, los hemicanales aportados por cada una de las células se unen y el canal recién formado se abre (Sohl, Maxeiner et al. 2005), Además de la función de adhesión que desempeñan los canales intercelulares al mantener en íntima aposición las membranas de las células vecinas, estos canales a través de su poro ponen en comunicación directa los citoplasmas de las células permitiendo el intercambio de iones y otras moléculas de hasta 1 kDa.

3.6.1.5 FORMACIÓN DE UNIONES EN HENDIDURA

La inmunocitoquímica realizada en las células N2a 24 h después de ser transfectadas transitoriamente con un plásmido conteniendo la región codificante de la Cx43R148Q o de la Cx43V85M y la EGFP como reportador reveló la presencia de placas intercelulares en la zona de aposición entre las células, que son compatibles con la formación de “uniones en hendidura” por la agregación de cientos de canales intercelulares, similares a las que se encontraron entre las células transfectadas con el plásmido Cx43WT, pero que no se observaron en aquellas células que fueron transfectadas con el plásmido control pIRES-GFP (Figura 15A, flechas). Del mismo modo, se observó la formación de placas intercelulares en aquellas células que fueron co-transfectadas con ambas construcciones en una relación 1:1 a la misma concentración final (Cx43WT+Cx43R148Q y Cx43WT+Cx43V85M) (Figura 15B, flechas). Estos resultados indican que tanto los mutantes por separado como en co-expresión con la Cx43 silvestre son capaces de formar canales intercelulares.

3.6.1.6 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE.

Para determinar la funcionalidad de estos canales intercelulares formados por los mutantes Cx43R148Q y Cx43V95M por separado o en combinación con la Cx43WT se realizó una serie de experimentos en los que mediante la técnica de difusión intercelular de colorante se determinó su

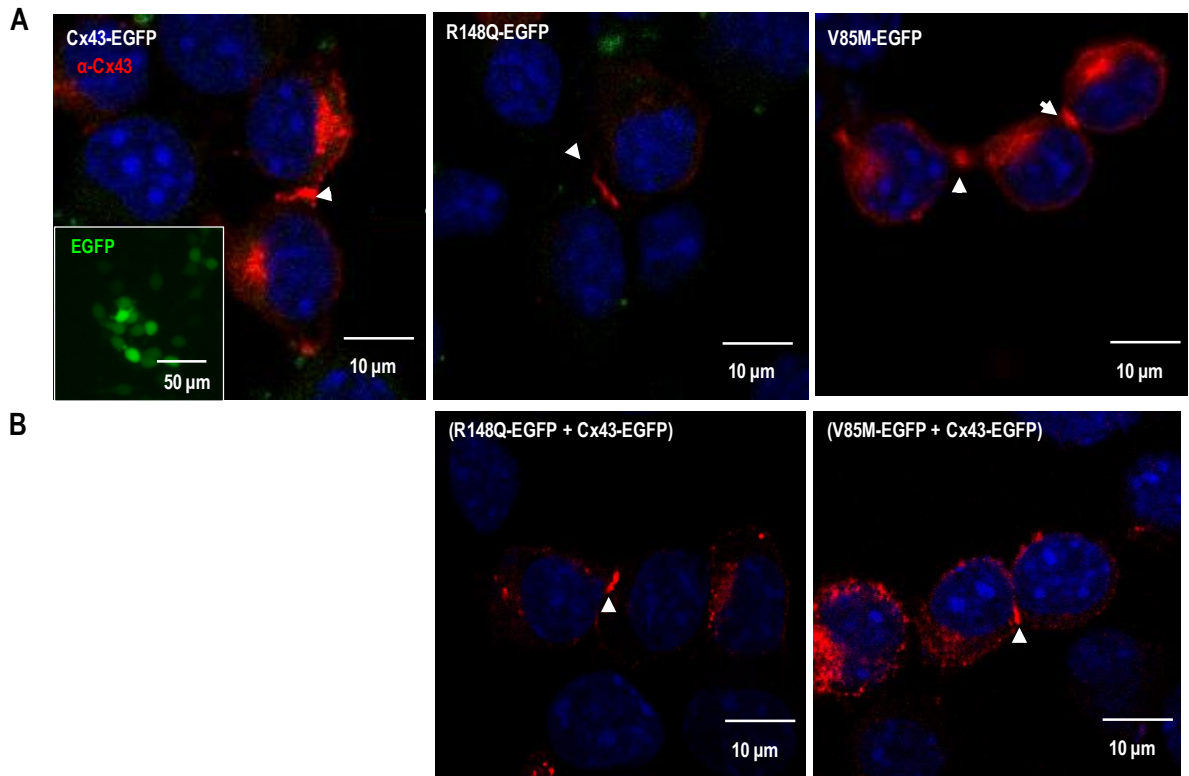


Figura 15. Formación de placas intercelulares por las Cx43R148Q y Cx43V85M. La línea N2a fue transfectada transitoriamente con los plásmidos Cx43WT, Cx43R148Q y Cx43V85M por separado (**A**) y con mezcla mutante:silvestre 1:1 a la misma concentración final (**B**). Las imágenes de microscopía confocal de la inmunocitoquímica de Cx43 muestran en todos los casos la formación de placas en la zona de contacto entre las células EGFP⁺, que siguieron la formación de “uniones en hendidura”.

capacidad para permear carboxifluoresceína (CF; PM= 376 Da, -2). En estos experimentos, primero se seleccionaron en cada tipo de cultivo un grupo de células EGFP⁺, en una de ellas se inyectó por iontoforesis la CF (célula donadora) y se monitorizó en las células vecinas (células receptoras) la

intensidad del colorante transcurridos los siguientes 10 min (Figura 16A, *i* y *ii*). En los cultivos transfectados con la Cx43WT el porcentaje de células EGFP⁺ aceptoras a las que había difundido la CF fue del 53 %, y en la mayoría de los casos con un coeficiente de acoplamiento o relación entre las intensidades entre las células aceptoras/célula próximo a uno; sin embargo, no se detectó en ningún caso acoplamiento intercelular entre las células EGFP⁺ de los cultivos transfectados con la Cx43R148Q y Cx43V85M, ni tampoco en los cultivos co-transfectados con cada uno de los mutantes y la proteína silvestre (Figura 16B). Estos resultados sugieren que los canales homoméricos formados por las conexinas mutadas no son funcionales y que en caso de los experimentos de co-expresión la funcionalidad de los canales de Cx43 se inhibe por la presencia de las conexinas mutadas, probablemente como consecuencia de la formación de canales intercelulares de tipo heteromérico entre las conexinas silvestre y mutadas.

3.6.1.7 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO INTERCELULAR.

Estos estudios de acoplamiento eléctrico se realizaron en pares de oocitos que habían sido previamente inyectados con el ARN que codifica para la Cx43WT, la Cx43R148Q y la Cx43V85M por separado y con una mezcla de los ARNs mutados con el silvestre en una relación 1:1 y a la misma concentración final. Primero, se evaluó la capacidad de cada uno de los ARN mutados para formar canales intercelulares funcionales de tipo homomérico-homotípico apareando oocitos inyectados con el mismo ARN (i.e., pares homotípicos) y se midió con la técnica de doble fijación de voltaje con dos electrodos en cada célula, los niveles de corriente macroscópica que fluyen entre una célula a otra (i.e. la corriente intercelular, I_j) a través de la población de canales intercelulares abiertos que se han formados durante el tiempo de apareamiento. A diferencia de los pares de oocitos inyectados con la Cx43 WT que desarrollaron unos valores de conductancia intercelular ($G_j = I_j / V_j$) elevados ($22 \pm 1.9 \mu\text{S}$), entre los pares R148Q-R148Q y V85M-V85M no se detectó flujo de corriente intercelular, como ocurrió en los pares controles en los que no se inyectó ARN (Figura 17, A y B; Cx43-Cx43 vs. R148Q-R148Q y V85M-V85M), indicando que ninguno de los dos mutantes es capaz forma canales funcionales. Por el contrario, en el caso de los pares heterotípicos que se indujeron apareando los oocitos Cx43WT con los de Cx43R18Q o Cx43V85M se detectó acoplamiento eléctrico, indicando que los canales heterotípicos homoméricos que se forman por la unión de los hemicanales mutantes con los hemicanales silvestres son funcionales, pero con unos valores macroscópicos de conductancia intercelular muy reducidos, menores en $\approx 95\%$ a los registrados en los pares silvestres (Figura 17, A y B, Cx43-R148Q y Cx43-V85M). En los experimentos que se simulan la condición de heterocigosis de

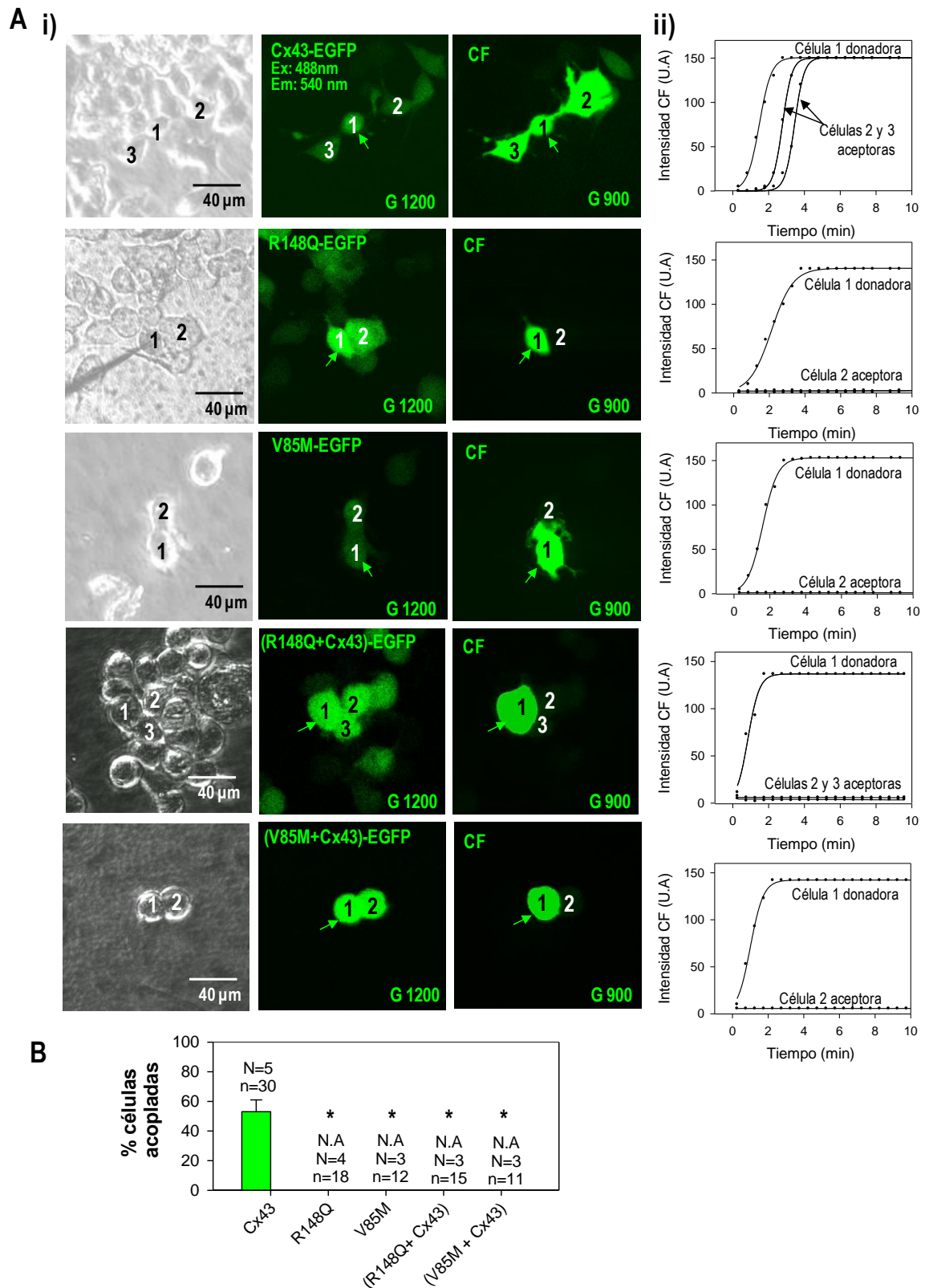


Figura 16. Transferencia de colorante a través de los canales homoméricos de Cx43WT, Cx43R148Q y Cx43V85M y de los canales heteroméricos de la Cx43WT con los mutantes de Cx43. A) (i) Imágenes de microscopio confocal (i) de luz transmitida del cultivo (*izda*), de las células EGFP⁺ (*centro*, a alta ganancia del fotodetector) y de las células inyectadas con la CF (*flecha*) y de las células vecinas transcurridos 10 min desde el inicio de la inyección intracelular (*dcha*, a baja ganancia del fotodetector), y **(ii)** curso temporal de la intensidad en la célula donadora y en las células aceptoras. **B)** Porcentaje de acoplamiento. Solo se detectó difusión de CF entre las células EGFP⁺ de los cultivos de Cx43WT; dicho acoplamiento intercelular se inhibe en presencia de ambos mutantes. (promedio \pm SE, NA; no acoplamiento; N, n° cultivos, n, n° de células inyectadas, *, p<0.05).

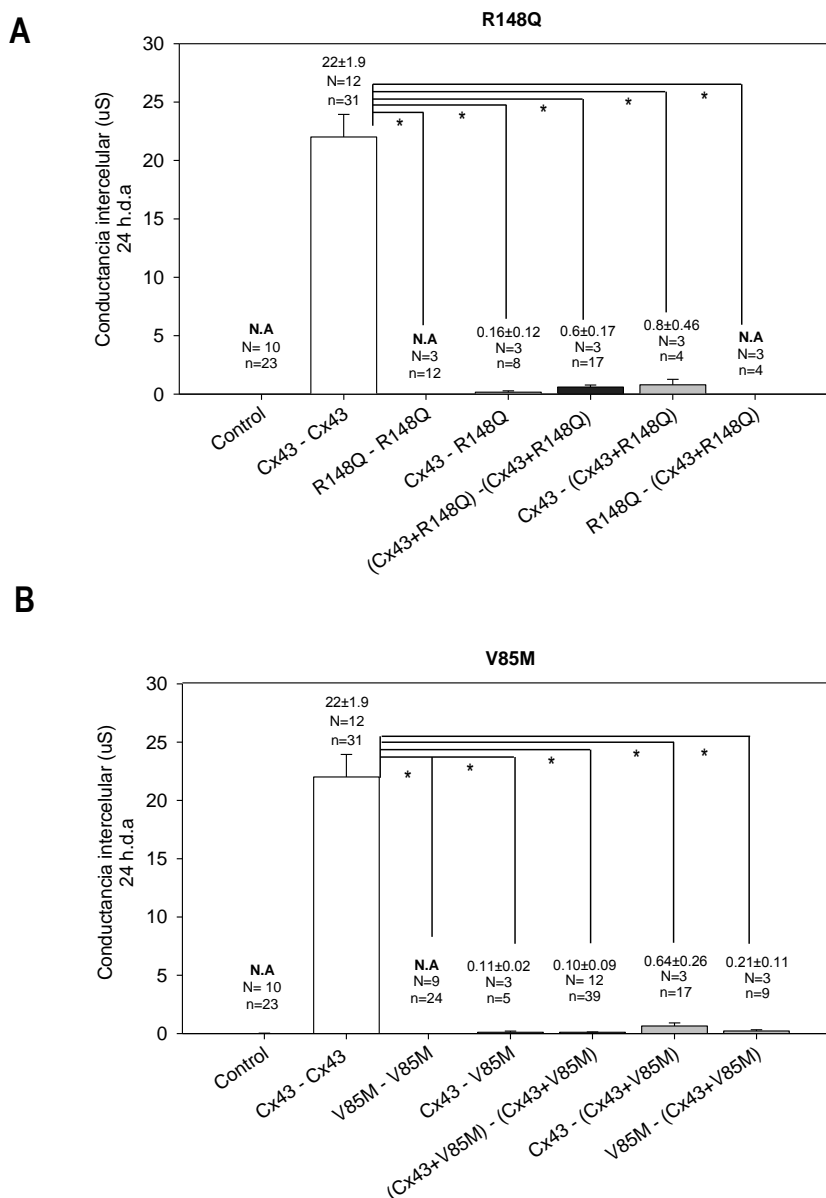


Figura 17. Niveles de acoplamiento eléctrico entre pares de oocitos inducidos por la Cx43R148Q (A) y la Cx43V85M (B) por separado y en combinación con la Cx43 silvestre. Los oocitos inyectados con los ARNs de la Cx43WT, la Cx43R148Q y la Cx43V85M o con una mezcla 1:1 de silvestre y mutante para la misma concentración final se aparearon en sus posibles combinaciones homotípicas y heterotípicas. Los valores de conductancia macroscópica intercelular registrados muestran que entre los pares de Cx43-Cx43 se desarrolló un alto grado de acoplamiento eléctrico, mientras que los pares R148Q y V85M, como los controles, no se acoplaron; las combinaciones de pares heterotípicos entre los oocitos Cx43WT y los oocitos R148Q y V85M se acoplaron entre sí pero con muy bajos niveles de conductancia intercelular y la coexpresión de cada uno de los mutantes con la Cx43 silvestre produjo en todas las combinaciones ensayadas un potente efecto de inhibición dominante, reduciendo el acoplamiento a niveles residuales. (Valores promedio ± s.e; NA, no acoplamiento; N, nº experimentos y n, nº de pares de oocitos; *, p<0.05, h.d.a, horas de apareamiento).

los pacientes en los que aparean entre si los pares coinyectados con la Cx43WT y la Cx43R148Q o con la Cx43V85M en una relación 1:1, los niveles de acoplamiento intercelular fueron también residuales (<95%; Figura 17, A y B, Cx43+R148Q-Cx43+R1448Q y Cx43+V85M-Cx43+V85M), indicando que ambas conexinas mutadas producen un potente efecto de inhibición dominante sobre la funcionalidad de la Cx43 silvestre. Dicho efecto de dominancia negativa también se produjo apareando los oocitos que coexpresan la proteína silvestre con cualquiera de las dos mutadas apareados con los oocitos Cx43WT y en mayor medida con los oocitos que solo expresan cada uno de los mutantes (Figura 17, A y B; Cx43WT-(Cx43+R148Q) o Cx43WT-(Cx43+V85M) y R148Q-(Cx43+R148Q) o V85M-(Cx43+V85M).

3.6.1.8 DEPENDENCIA DEL VOLTAJE INTERCELULAR DE LOS CANALES INTERCELURES MUTADOS.

A continuación se analizó si las mutaciones Cx43R148Q y Cx43V85M, además de reducir el grado de acoplamiento, podrían también alterar a las propiedades de regulación por el voltaje intercelular (V_j) de los canales intercelulares silvestres. La dependencia de V_j de los canales formados por la Cx43 humana se caracteriza, como ya ha sido descrito previamente (Bukauskas, Bukauskiene et al. 2001), por el cierre de las corrientes intercelulares (I_j) para gradientes de V_j por encima de 40 mV para las dos polaridades del voltaje, a valores progresivamente menores y más rápidamente con el incremento del V_j (Fig 18A-i). La curva G_j / V_j muestra que el valor instantáneo de la conductancia intercelular (G_j) no varía significativamente en función del voltaje aplicado, que el valor de estado de la conductancia (G_{jss}) es máximo entre +40 y -40 mV (G_{jmax}) y que se reduce progresivamente con el incremento del V_j hasta alcanzar valores residuales o de conductancia mínima distintos de cero (G_{jmin}) (Fig 18A-ii); los parámetros de sensibilidad a voltaje que se obtuvieron ajustando la curva G_{jss} / V_j para cada polaridad del V_j a una ecuación Boltzmann se muestran en la Tabla 11. Las propiedades de regulación por voltaje de los canales intercelulares que se forman entre los pares de oocitos en los que ambas células coexpresan la Cx43WT y la Cx43R148Q, fueron muy similares, sino idénticas, a las de los canales homoméricos de Cx43WT (Figura 18B, i y ii; Tabla 11). Sin embargo, los canales que se forman entre los pares de oocitos que coexpresan la Cx43V85M con la Cx43WT mostraron nuevas propiedades de regulación por voltaje ya que estos canales responden a los pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes ($> \pm 60$ mV) primero, con una reducción rápida de las corrientes intercelulares, como los canales de Cx43WT, seguida por un aumento progresivo con una cinética más lenta (Figura 18C, i y ii).

También se analizaron las propiedades de regulación por voltaje del acoplamiento mediado por los canales con una composición asimétrica en Cx43, como son los canales de tipo heterotípico homomérico que se forman entre los pares Cx43WT-Cx43R148Q y Cx43WT-Cx43V85M (Figura 19) y

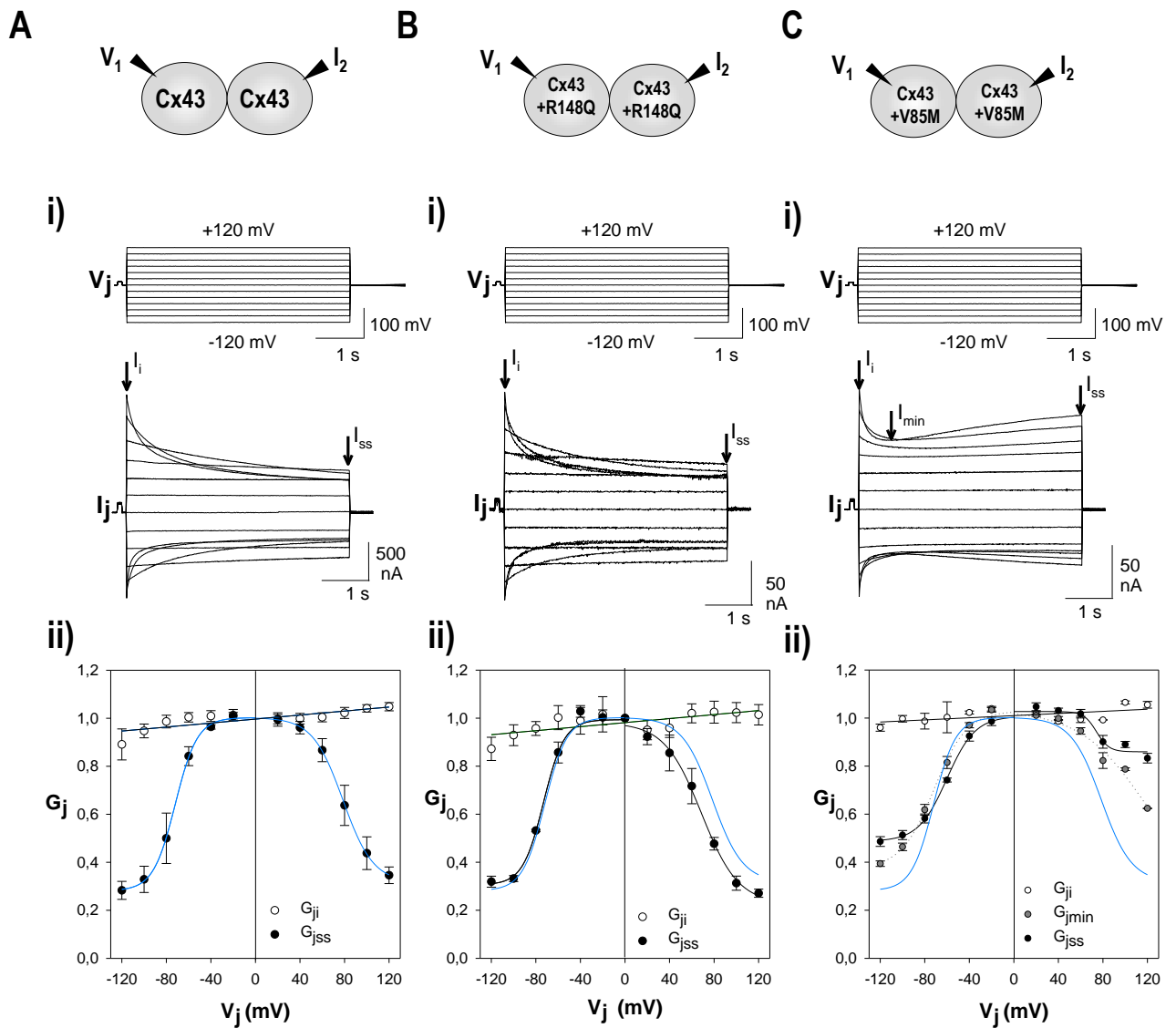


Figura 18. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales silvestres de Cx43 (A) y de los canales que median el acoplamiento entre los pares de oocitos coinyectados con la Cx43R148Q (B) o con la Cx43V85M y la Cx43WT (C). (i) Registro crudo de las corrientes intercelulares (I_j) inducidas por pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV y de 5 s de duración; (ii) Graficas conductancia/voltaje representado el valor inicial (G_{ji} , \circ) y de estado de la conductancia intercelular (G_{jss} , \bullet) o de la conductancia mínima (G_{jmin} en C); la curva para cada polaridad del V_j representa el ajuste de los valores promedio de G_{jss} a una ecuación de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 11. La dependencia de V_j de los canales de Cx43WT se caracteriza a nivel macroscópico por un comportamiento óhmico de la G_{ji} y una G_{jss} máxima entre ± 40 mV que se redujo progresivamente hasta valores mínimos (G_{jmin}) con el incremento del gradiente de V_j para la dos polaridades del voltaje (curvas en azul); en el caso de los pares homotípicos Cx43+R148Q las propiedades de regulación fueron muy similares (B), mientras que en los pares homotípicos aplicados en Cx43+V85M la responde al V_j fue bifásica, primero disminuye el acoplamiento y luego aumenta (C). En (ii) se representan la \pm s.e de $n=6$ pares de oocitos.

de los canales de tipo heterotípico heteromérico que median el acoplamiento entre los pares Cx43WT-(Cx43WT+Cx43R148Q) y Cx43WT-(Cx43WT+Cx43V85M) (Figura 20). En los canales híbridos Cx43WT-Cx43R148Q y Cx43WT-Cx43V85M, la aplicación de los pulsos de V_j de polaridad positiva y negativa indujo corrientes intercelulares asimétricas (Figura 19, A y B, i), que contrastan con el comportamiento simétrico registrado en los canales de tipo homotípico homomérico de la Cx43WT (Figura 18A). En el caso de los canales Cx43WT-Cx43R148Q, para los pulsos hiperpolarizantes en el oocito Cx43WT y para los pulsos despolarizantes en el oocito Cx43R148Q, que son vistos como hiperpolarizaciones relativas desde el interior de los oocitos Cx43WT, las corrientes intercelulares cierran progresivamente con el incremento del gradiente de V_j ; por el contrario para los pulsos de polaridad opuesta aplicados tanto en el oocito Cx43WT como en el oocito Cx43R148Q, las corrientes primero se cierran y luego se abren (Figura 19A, i y ii), indicando que la asimetría en las corrientes intercelulares se produce como consecuencia de las diferencias en la dependencia de voltaje de los hemicanales que componen el canal híbrido. Las correspondientes curvas G_j / V_j muestran un comportamiento rectificador del valor inicial de la G_j , que aumenta con la polaridad positiva y disminuye para la negativa del V_j , definida respecto al interior del oocito Cx43WT, en $\approx 45\%$ entre ± 120 mV (Figura 20B-i; G_{ji}). Este tipo de rectificación rápida de la G_j se ha descrito previamente en otros canales heterotípicos formados por conexinas que difieren en conductancia unitaria y selectividad iónica (Suchyna, Nitsche et al. 1999). El valor de estado de la G_j se reduce para la polaridad negativa del V_j con unos parámetros de sensibilidad a voltaje similares a los de los canales de Cx43WT (Figura 18A-ii, G_{jss} y Tabla 11); para la polaridad positiva el comportamiento de la G_{jss} con el V_j fue complejo, ya que tras una reducción inicial se produjo un aumento de la conductancia. En los canales heterotípicos-homoméricos formados por la unión de los hemicanales de Cx43WT con los compuestos por la Cx43V85M, las corrientes intercelulares que fluyen en ambas direcciones son también asimétricas; para los pulsos hiperpolarizantes aplicados en el oocito Cx43WT y para los pulsos despolarizantes en el oocito Cx43V85M, que son vistos como hiperpolarizaciones relativas desde el interior de los oocitos Cx43WT, la amplitud de las corrientes intercelulares primero disminuyen y luego aumentan durante los pulsos de V_j ; por el contrario para los pulsos de polaridad opuesta aplicados tanto en el oocito Cx43WT como en el oocito Cx43V85M, las corrientes intercelulares solo se cierran con el incremento del gradiente de V_j ; (Figura 19A, iii-iv). Los canales Cx43WT-Cx43V85M también mostraron una rectificación rápida del valor inicial de la conductancia, que aumenta con la polaridad positiva y disminuye para la negativa del V_j , definida respecto al interior del oocito Cx43WT, en $\approx 30\%$ entre ± 120 mV (Figura 19B-ii; G_{ji}). Para la polaridad positiva el valor de estado de la G_j disminuye solo ligeramente con el V_j , sin embargo para la polaridad negativa la reducción de la G_j fue inicialmente más marcada pero posteriormente aumentó a valores de estado que llegaron a alcanzar para $V_j = -120$ mV hasta 3,5 veces el valor de la conductancia calculada con el prepulso $V_j = +20$ mV (Figura 19B-ii; G_{jss}).

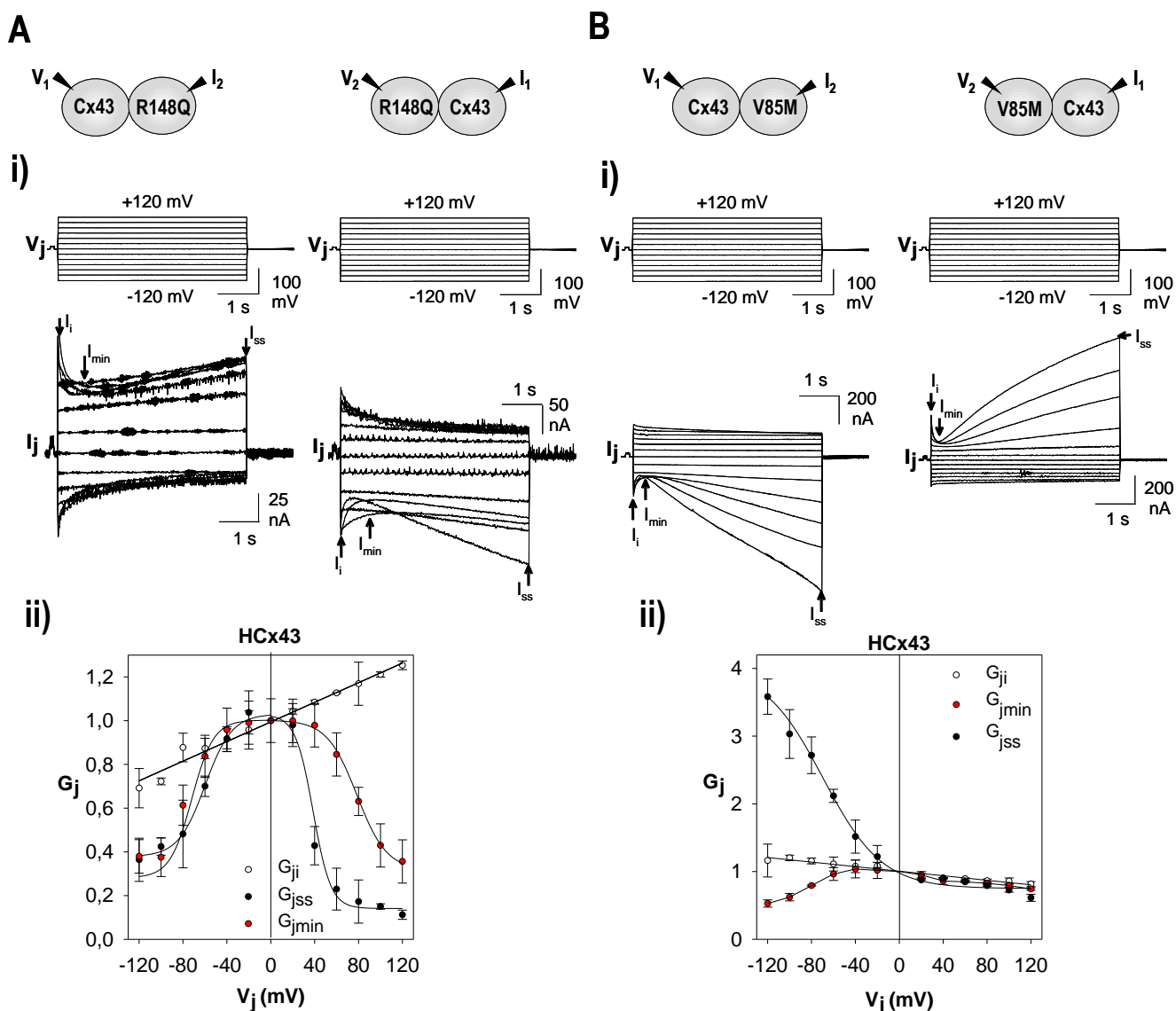


Figura 19. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales de tipo heterotípico homomérico formados por la Cx43WT con la Cx43R148Q (A) y la Cx43V85M (B). (i) Registros crudos de las corrientes intercelulares (I_j) inducidas por los pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV y de 5 s de duración, aplicados en el oocito Cx43WT (izda) y en el oocito que expresa la Cx43 mutada (dcha); (ii) gráficas conductancia/voltaje representado el valor inicial o “instantáneo” (G_{ji} , \circ), la conductancia mínima (G_{jmin}) o/y el valor de estado de la conductancia intercelular (G_{jss} , \bullet); la curva para cada polaridad del V_j corresponde al ajuste de los valores promedio de la G_{jss} a una ecuación de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 11. En ambos tipos de canales híbridos, las corrientes intercelulares inducidas por los pulsos de V_j de polaridad opuesta fueron asimétricas; en los canales Cx43WT-Cx43R148Q para los pulsos hiperpolarizantes aplicados en el oocito Cx43WT y despolarizantes en el oocito Cx43R148Q, las corrientes cierran con el gradiente de V_j , sin embargo para los pulsos de polaridad opuesta, al cierre inicial le siguió una apertura. Por el contrario, en los canales Cx43WT-Cx43V85M, la respuesta bifásica ocurrió para los pulsos de polaridad negativa en el oocito Cx43WT y de polaridad positiva en el oocito Cx43V85M. Además, en ambos tipos de canales se observa rectificación rápida de la G_{ji} , que en los canales Cx43WT-Cx43R148Q aumenta y disminuye con la despolarización y la hiperpolarización relativa del oocito Cx43WT mientras que en los canales Cx43WT-Cx43V85M varía en el sentido opuesto. En (ii) se representan la \pm s.e de $n = 4$ pares de oocitos.

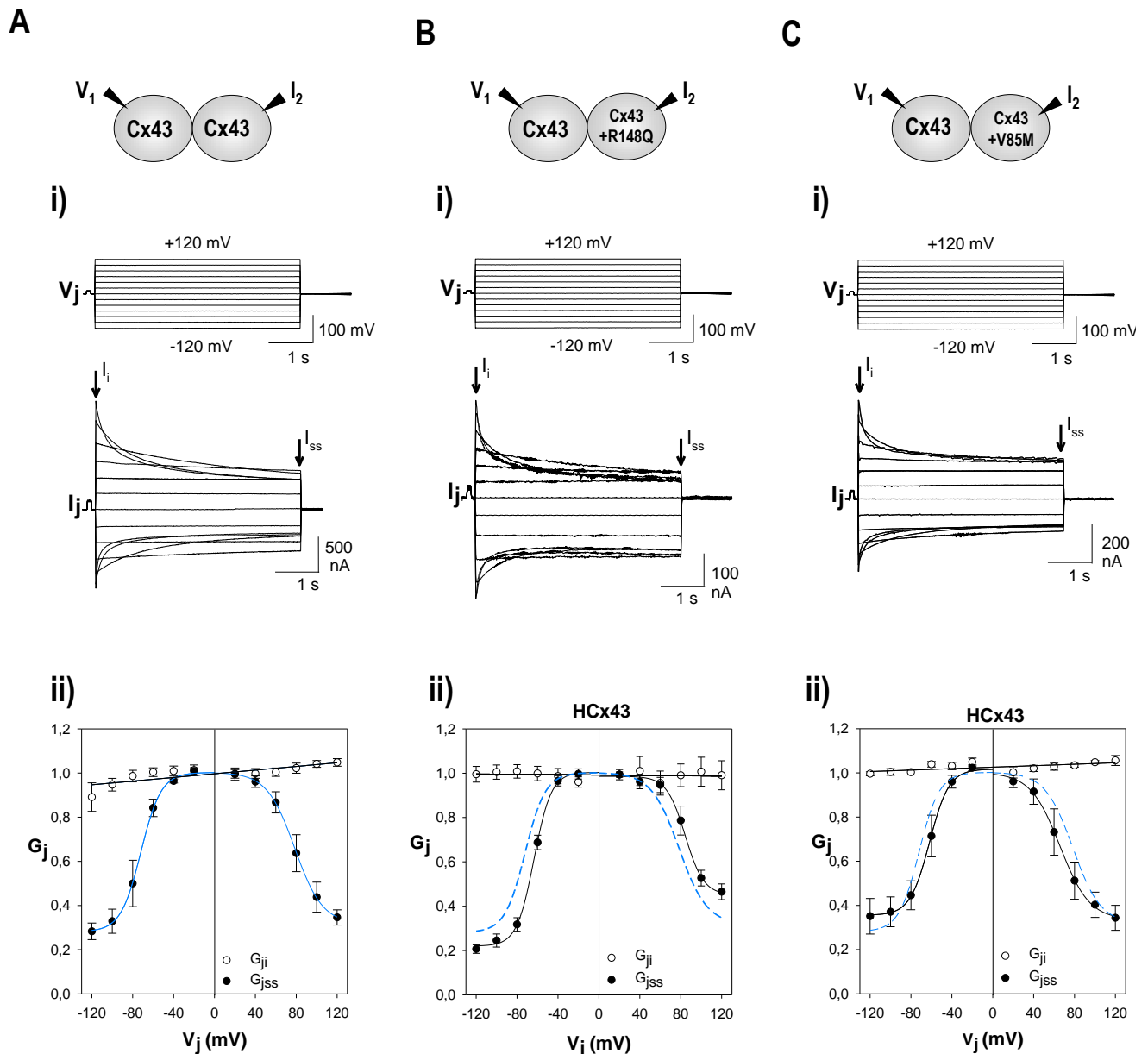


Figura 20. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular del acoplamiento entre pares de oocitos homotípicos de Cx43WT (A) y heterotípicos de Cx43WT con oocitos que coexpresan la Cx43WT con la Cx43R148Q (B) y la Cx43V85M (C). (i) Registros crudos de las corrientes intercelulares (I_j) inducidas por los pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV y de 5 s de duración, aplicados en el oocito Cx43WT, y (ii) gráficas conductancia/voltaje representado el valor inicial o "instantáneo" (G_{ji} , \circ) y el valor de estado de la conductancia intercelular (G_{jss} , \bullet); la curva para cada polaridad del V_j corresponde al ajuste de los valores promedio de la G_{jss} a una ecuación de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 11; en B y C se ha superpuesto la curva de ajuste de los canales de Cx43WT (azul). Las propiedades de regulación del acoplamiento entre los pares Cx43-Cx43+R148Q y Cx43-Cx43+V85M son similares a las de los canales Cx43WT; no hubo rectificación instantánea y las corrientes intercelulares que se redujeron simétricamente para las dos polaridades del V_j con una sensibilidad a voltaje muy parecida. En (ii) se representan la \pm s.e de $n=4$ pares de oocitos.

Respecto a las propiedades regulación por voltaje del acoplamiento registrado entre los pares de oocitos de la Cx43WT con los oocitos que coexpresan la Cx43 silvestre con la mutada (Cx43R148Q y Cx43V85M), los registros muestran ausencia de rectificación instantánea con unas corrientes intercelulares que se reducen simétricamente para las dos polaridades del V_j con unos parámetros desensibilidad a voltaje muy similares a los de los canales de tipo homotípico-homomérico de Cx43 silvestres (Figura 20, A-C, *i-ii* y Tabla 11).

En resumen, las dos mutaciones analizadas, la Cx43R148Q y la Cx43V85M, no interfieren con el proceso de formación de los canales intercelulares; sin embargo, los canales mutados que se forman no son funcionales y suprimen el acoplamiento intercelular tanto de tipo eléctrico y como por colorantes. En los experimentos que simulan la condición de heterocigosis de los pacientes, las subunidades mutadas ejercen un potente efecto de inhibición sobre la funcionalidad de los canales de Cx43 silvestres reduciendo el acoplamiento intercelular a niveles residuales. Aun cuando los hemicanales mutados fueron capaces de combinarse con los hemicanales silvestres para formar canales intercelulares de tipo heterotípico-homomérico los niveles de acoplamiento eléctrico que indujeron fueron muy bajos y las propiedades de regulación por el voltaje intercelular de estos canales fueron aberrantes.

3.6.1.9 EFECTO DE INHIBICIÓN DOMINANTE DE LAS MUTACIONES DE Cx43 SOBRE EL ACOPLAMIENTO INTERCELULAR INDUCIDO POR LA Cx43 ENDÓGENA EN UNA LÍNEA PRIMARIA DE ASTROCITOS HUMANOS.

Con el objetivo de confirmar el efecto de inhibición dominante de las proteínas mutadas Cx43R148Q y Cx43V85M sobre la Cx43 silvestre se transfectó una línea primaria de astrocitos humanos, extraídos y seleccionados a partir de una biopsia de corteza, con los plásmidos conteniendo ambas mutaciones. El cultivo presentaba una morfología celular homogénea con inmunoreactividad positiva para la proteína ácida fibrilar glial o GFAP (Figura 21A-*i*); las células GFAP⁺ expresan endogenamente altos niveles de Cx43 tal como se evidencia por western blot y por inmunocitoquímica, que mostró la formación de numerosas placas en hendidura en las zonas de contacto entre las células (Figura 21A-*ij*, flechas). En esta línea primaria de astrocitos humanos no se detectó, ni por western blot ni por inmunocitoquímica, la presencia de Cx30 que también se expresa en algunas poblaciones de astrocitos (Figura 21A-*iii*).

En los experimentos de transferencia intercelular de carboxifluoresceína (CF) realizados en los cultivos en confluencia sin transfectar mostraron una difusión del colorante desde la célula inyectada a la mayoría de las células vecinas, de primer, segundo e incluso de tercer orden en los 10 minutos de registro (valor promedio del % de células acopladas 100 ± 10) (Figura 21B-*i*); en la gráfica en la

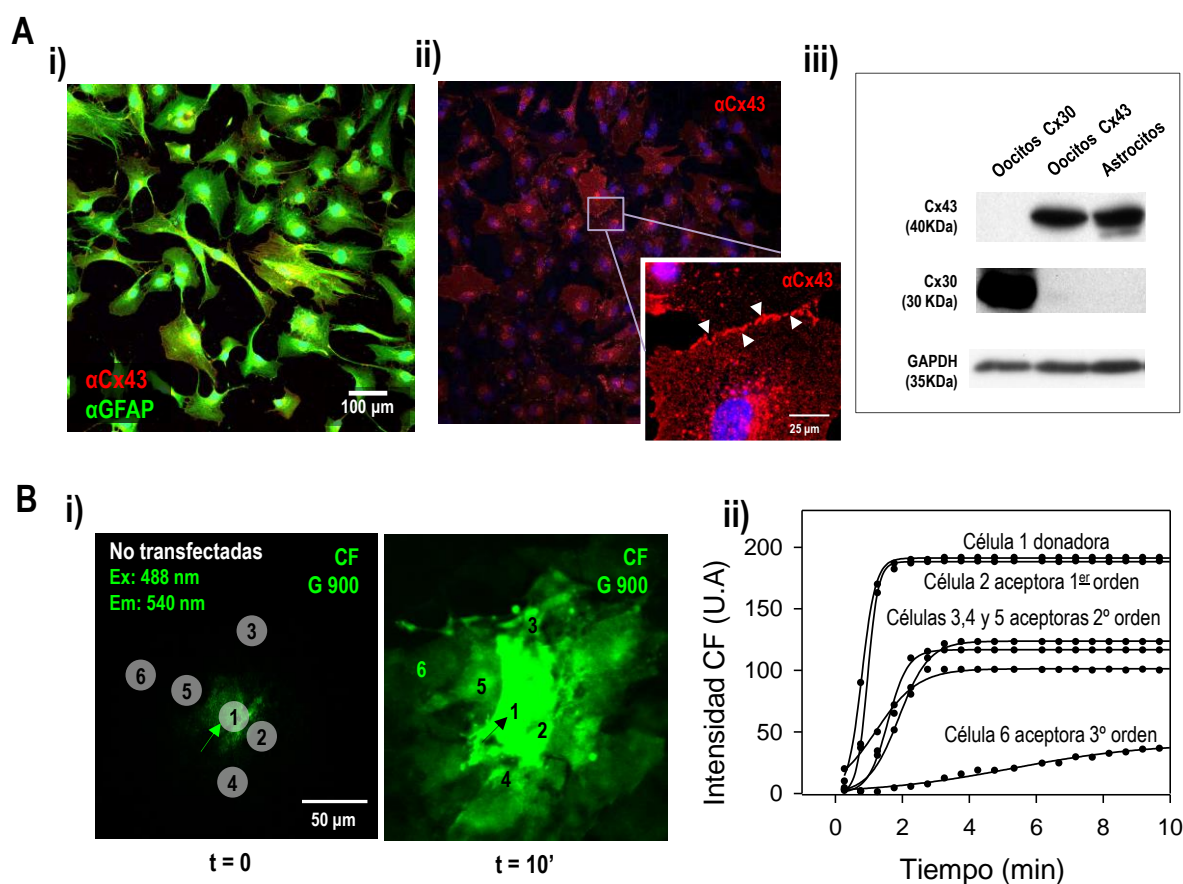


Figura 21. Caracterización molecular y funcional de una línea primaria de astrocitos humanos. (A) Expresión de los marcadores astrocitarios GFAP, Cx43 y Cx30. (*i* y *ii*) Imágenes de microscopía confocal mostrando inmunorreactividad positiva citoplasmática para la GFAP y de la Cx43 formando placas en las zonas de contacto entre las células; (*iii*) Western blot del lisado de los cultivos mostrando la banda de 40 KDa correspondiente al monómero de Cx43 y la ausencia de banda de 30 KDa del monómero de Cx30; como controles positivos se han cargado los lisados de oocitos acoplados por Cx43 y Cx30 y como control de carga se utilizó GAPDH (36 KDa). **(B)** Acoplamiento por carboxifluoresceína (CF) de los astrocitos humanos. (*i*) Inyección intracelular de la CF en la célula donadora-1 ($t=0$) y difusión a un gran número de células vecinas al final del registro ($t= 10$ min) y (*ii*) curso temporal de la intensidad de CF durante el llenado intracelular (cel-1) y la difusión intercelular a célulasceptoras de primer orden (cel-2), de segundo (cel-3-5) y de tercer orden (cel-6); al cabo de 10 min. la gran mayoría de estas células están acopladas por CF (% de células acopladas 100 ± 10 en 12 inyecciones).

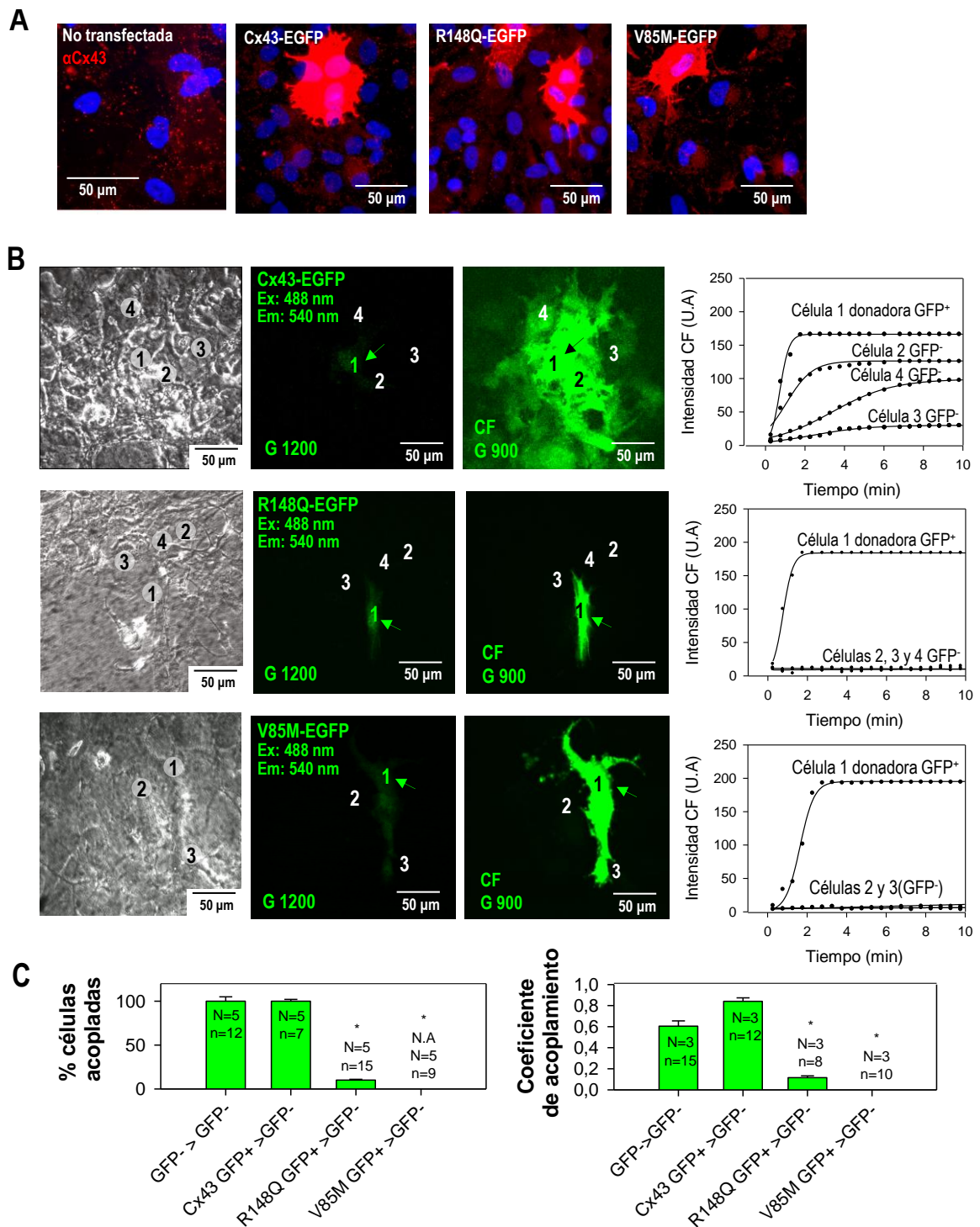


Figura 22. Inhibición dominante del acoplamiento endógeno de los astrocitos por la transfección de los mutantes Cx43R148Q y Cx43V85M. **A)** Inmunocitoquímica para la Cx43 (*en rojo*) de los cultivos no transfectados (*izda*) y transfectados transitoriamente con los plásmidos Cx43WT-IRES-EGFP, Cx43R148Q-IRES-EGFP y Cx43V85M-IRES-EGFP. **B)** Transferencia de carboxifluoresceína (CF) en los cultivos transfectados; (i) imagen de luz transmitida del cultivo (*izda*), células GFP⁺ inyectadas con el colorante (*medio*) y difusión del colorante a las células vecinas GFP⁻ (*dcha*), y (ii) curso temporal de la intensidad de CF durante el llenado intracelular (cel-1) y de la difusión intercelular a las células vecinas. **C)** Porcentaje de acoplamiento y coeficiente de acoplamiento en los cultivos transfectados respecto a los no transfectados. La transferencia de colorante desde las células EGFP⁺ que coexpresan la Cx43R148Q con la Cx43 endógena al resto de los astrocitos está muy reducida y en el caso de las células EGFP⁺ Cx43V85M completamente inhibida. En C se representan la \pm s.e; N, n° de cultivos transfectados, n, n° inyecciones; NA, no acoplamiento; *, p<0.05.

que se representa el curso temporal del acoplamiento dentro el cultivo, se observa que durante el llenado de colorante en la célula inyectada o donadora ya se produce la difusión del colorante a las células aceptoras de primer orden y que en menos de dos minutos esta alcanza la misma intensidad que la de la célula donadora (i.e., el coeficiente de acoplamiento es 1); con el incremento de orden de las células aceptoras de orden superior la difusión es más lenta y el coeficiente de acoplamiento se reduce progresivamente (Figura 21B-ii). En los cultivos transfectados con los plásmidos que contienen la región codificante de la Cx43WT, la Cx43R148Q y la Cx43V85M y la EGFP como gen reportador, se verificaron con inmunohistoquímica frente a Cx43 (Figura 22A). El estudio de transferencia de la CF reveló que cuando el colorante se inyectaba en las células del cultivo GFP⁺ Cx43WT el número de células GFP⁻ a las que difundía el colorante era similar al de los cultivos controles; sin embargo, en los cultivos en ninguna de las inyecciones de células Cx43V85M EGFP⁺ el colorante difundió a ninguna de las células vecinas EGFP⁻ y en el caso de los cultivos Cx43R148Q a un porcentaje muy reducido, 5±1 % y con un coeficiente de acoplamiento muy bajo 0.1±0.01 (Figura 22, B y C)

3.6.2 INTERACCIÓN ENTRE LAS CONEXINAS SILVESTRE Y MUTADAS CON LA CONEXINA-30 ASTROCITARIA.

Como los astrocitos además de la Cx43 expresan la Cx30 (Dermietzel, Traub et al. 1989; Dahl, Manthey et al. 1996; Nagy, Patel et al. 1999; Rash, Yasumura et al. 2001; Altevogt and Paul 2004; Levit, Sellitto et al. 2015), a continuación analizamos si las Cx43 mutadas (R148Q y V85M) interaccionaban funcionalmente con la Cx30 humana. Previo a este estudio fue necesario realizar una serie de experimentos dirigidos a esclarecer la compatibilidad funcional entre estas dos conexinas astrocitarias, dada la escasa información actualmente disponible y contradictoria a este respecto (Manthey, Banach et al. 2001; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007)

3.6.2.1 EFECTO DE TRANSREGULACIÓN DE LA Cx43 SILVESTRE SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA Cx30.

En una primera aproximación se compararon los niveles de expresión de la Cx43 y la Cx30 inducidos en los oocitos inyectados con cada ARN a la misma concentración por separado y combinados. A las 48 h después de las inyecciones se valoró mediante western blot el nivel de expresión total de ambas conexinas. La cuantificación de la bandas de Cx43 y de Cx30 mostró que mientras los niveles de la banda correspondiente al monómero de Cx43 no varían entre los oocitos solo inyectados con el ARN de la Cx43 y los oocitos en los que se inyectó junto con la Cx30; los niveles de expresión de la banda correspondiente al monómero de la Cx30 en los oocitos coinyectados fueron significativamente menores, en $\approx 60 \pm 16\%$, para los mismos niveles de control de carga de GAPDH, respecto al de los oocitos exclusivamente inyectados con el ARN de la Cx30 (Figura 23A, i y ii). Los

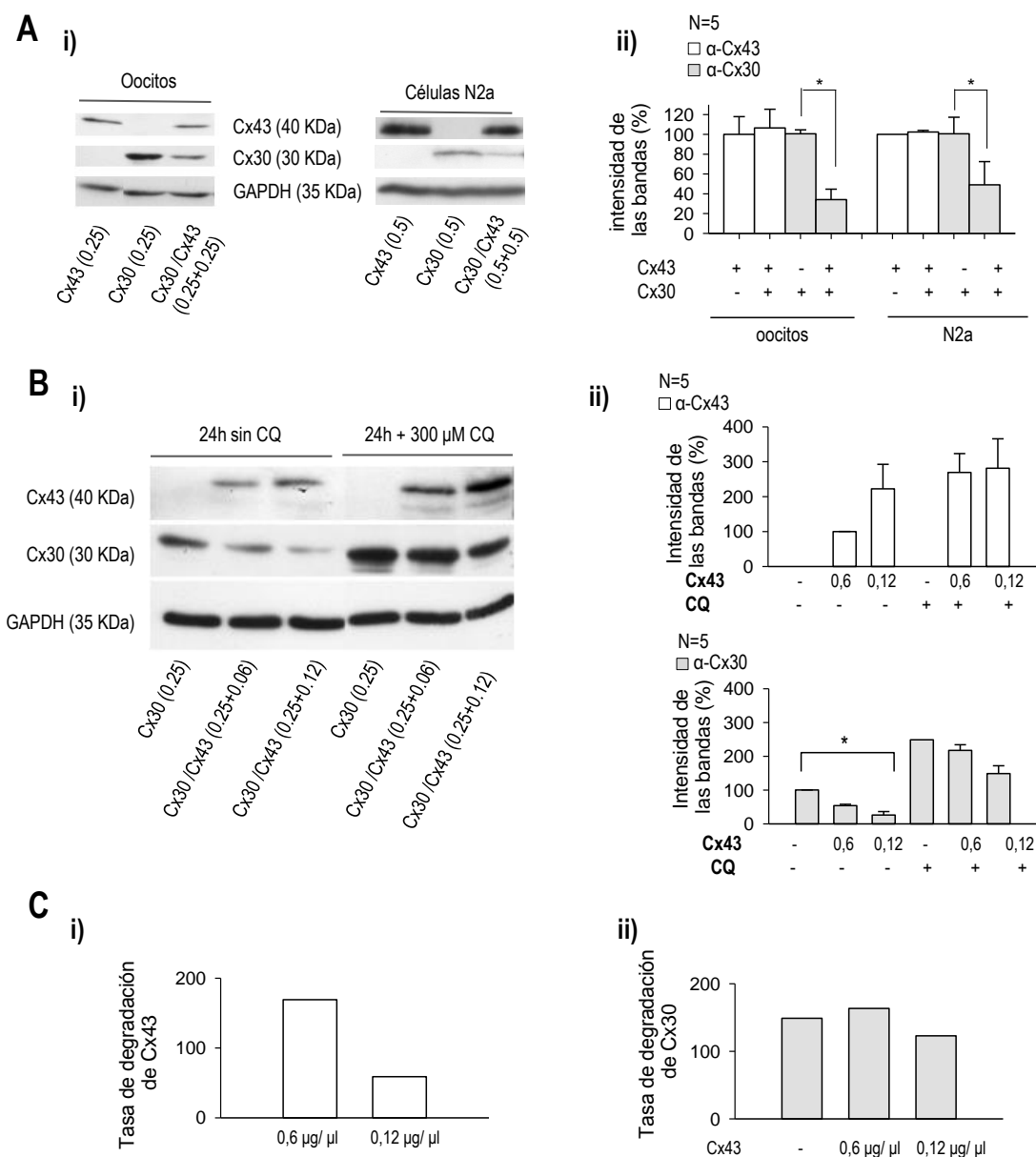


Figura 23. Efecto de transregulación de la Cx43 silvestre sobre la expresión de la Cx30. **A**) (i) Western blots para la Cx43 y la Cx30 de las muestras de lisado de los oocitos y de las células N2a inyectadas o transfectadas, respectivamente, con los ARNs o los plásmidos de la Cx43WT y de la Cx30 por separado o con una mezcla de cada uno ellos a la misma concentración final (en µg), y para GAPDH como control de carga y (ii) cuantificación de la intensidad de las bandas de 40 KDa de la Cx43 y de 30 KDa de la Cx30 normalizadas respecto a la banda de GAPDH (35 kDa). **B**) Western blots para la Cx43 y la Cx30 de las muestras de lisado de los oocitos inyectadas con el ARN de la Cx30 solo (0,25 µg) y con el ARN de la Cx43WT a baja y alta concentración (0,06 y 0,12 µg) en ausencia y presencia de cloroquina (CQ, 300 µg durante 24 h) y (ii) cuantificación de la intensidad de las bandas de 40 KDa de la Cx43 y de 30 KDa de la Cx30 normalizadas respecto a la banda de GAPDH (35 kDa). **C**) Tasa de degradación por la vía lisosomal de la Cx43 y la Cx30 (i y ii), calculada de los experimentos mostrados en B. La expresión de Cx30 se redujo en presencia de Cx43 (en A) y de forma dosis dependiente (en B); la tasa de degradación lisosomal de la Cx43 y en menor medida de la Cx30 se redujo en función de los niveles de Cx43 (en C). (Se representa $\bar{x} \pm s.e$; N, n° de experimentos; *, $p < 0.05$).

experimentos realizados en la línea celular N2a transfectando transitoriamente los cultivos con el plásmido Cx43-IRES-EGFP y Cx30-IRES_EGFP por separado y con una mezcla de cada uno de ellos a la misma concentración mostraron resultados muy similares (Figura 23A, *i y ii*). La reducción de los niveles de Cx30 en los oocitos aumentó con el incremento de la expresión de la Cx43 (Figura 23B, *i y ii*). En condiciones de bloqueo de la vía de degradación lisosomal con cloroquina (300 μ m durante 24 h), se observó un incremento en la acumulación de ambas conexinas (Figura 23B, *i y ii*) con una tasa de degradación, calculada como la diferencia entre los niveles de expresión sin y con CQ, que en el caso de la Cx43 se redujo con el incremento de sus niveles de expresión; y en el caso de la Cx30 no varió con los niveles bajos de expresión de la Cx43 y se redujo en un 20% con los más altos (Fig, 23C, *i y ii*).

3.6.2.2 FORMACIÓN DE UNIONES EN HENDIDURA DE Cx43 Y Cx30

Las imágenes de confocal de la inmunocitoquímica de las células N2a 24 h después de que los cultivos fueran transfectados con la Cx30 o con la Cx43 mostró la presencia de placas en las zonas de contacto intercelular, sugerentes de la formación de uniones en hendidura, entre las células homólogas y su ausencia entre células heterólogas que expresan las distintas conexinas (Figura 24A), indicando que las Cx43 y Cx30 son incompatibles para formar canales intercelulares de tipo homomérico heterotípico. En los experimentos en los que las células fueron cotransfectadas con la Cx43 y la Cx30 se observó la formación de placas intercelulares de Cx43, de Cx30 y mixtas (Figura 24B); sin embargo, cuando se aparearon las células que expresan solo la Cx43 o solo la Cx30 con células que coexpresan las dos conexinas, solo se observaron en el primer caso placas de Cx43 y en segundo solo de Cx30 (Figura 24C), confirmando la incompatibilidad de las dos conexinas para formar canales intercelulares de tipo heterotípico-homomérico y tampoco de tipo homomérico-heteromérico, y sugiriendo que las placas mixtas observadas entre las células que coexpresan ambas conexinas corresponden a la agrupación de canales homotípicos-homoméricos de Cx43 y de Cx30.

3.6.2.3 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE DE Cx43 Y Cx30

Se estudiaron las propiedades de permeabilidad de los canales homotípicos homoméricos de Cx30 y Cx43 y de los canales heterotípicos homoméricos de Cx30-Cx43. Se empleó el colorante aniónico carboxifluoresceína (CF) y el colorante catiónico yoduro de propidio (YP). Para distinguir las células transfectadas con Cx43 y Cx30 se emplearon dos construcciones que incluían dos proteínas fluorescentes: GFP para la Cx30 y dsRED para la Cx43. Las imágenes (Figura 25A) muestran que los canales homotípicos homoméricos de Cx43 así como los de Cx30 son permeables a ambos colorantes, sin embargo no se registró difusión de ninguno de los dos colorantes desde una célula que expresara Cx30 a una que expresara Cx43 ni viceversa. El curso temporal obtenido tras cuantificar la intensidad

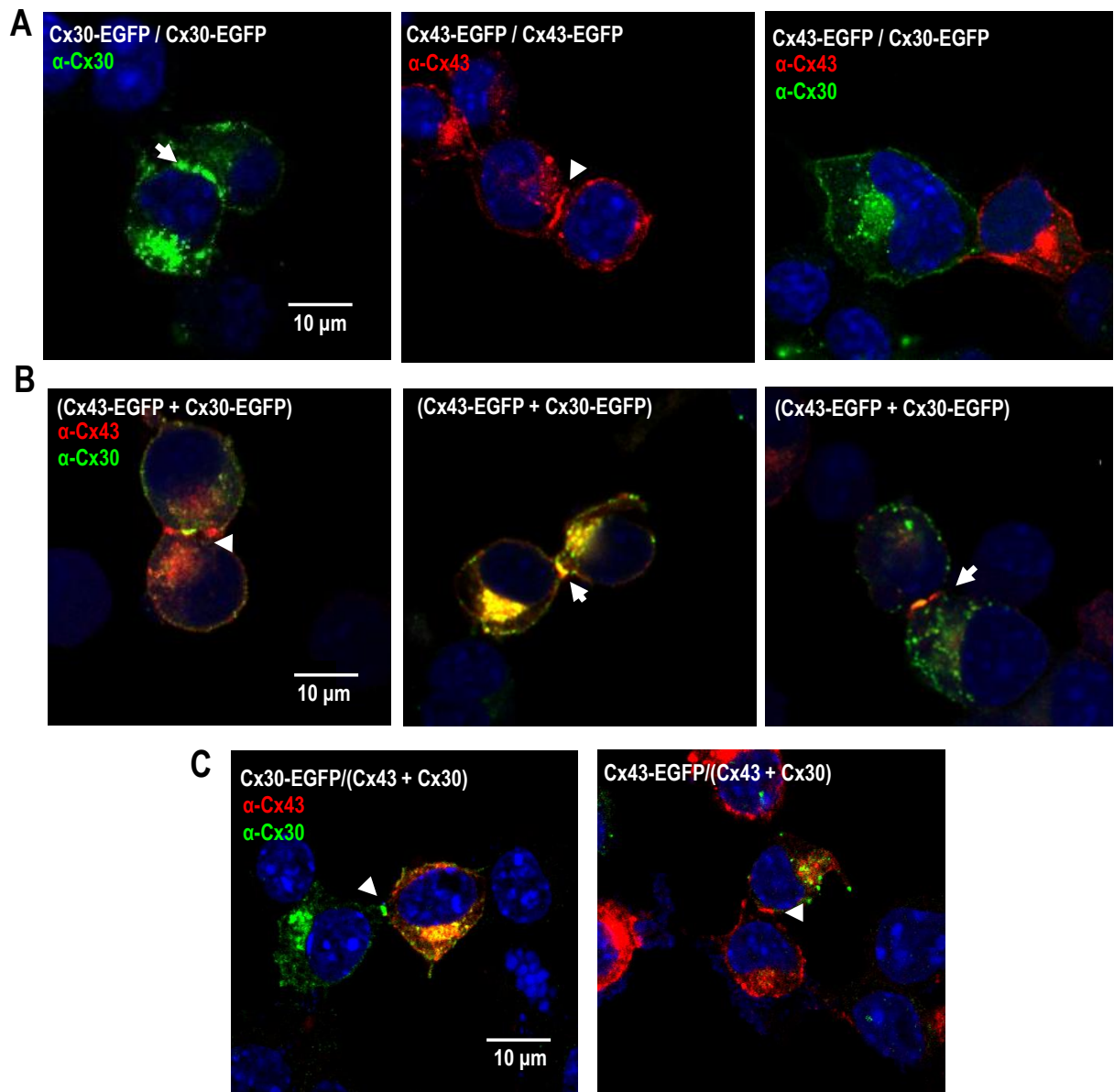


Figura 24. Formación de placas intercelulares por las Cx43 y Cx30. Se transfectó transitoriamente la línea celular N2a con los plásmidos Cx43 y Cx30 por separado y con la mezcla mutante-silvestre 1:1 a la misma concentración final (**A**, **B** y **C**). Las imágenes de microscopía confocal tras realizar inmunocitoquímica muestran la presencia estructuras compatibles con uniones o placas en hendidura entre células que expresan Cx43 o Cx30 ausente en todos los pares analizados de Cx43-Cx30 (**A**). El análisis de las células que coexpresaban las dos conexinas revela placas mixtas (**B**), sin embargo, los cocultivos de células que expresaban Cx43 o Cx30 con células que coexpresan Cx43 y Cx30 sugieren que las placas mixtas se deben a la colocalización de canales homotípicos homoméricos de ambas conexinas.

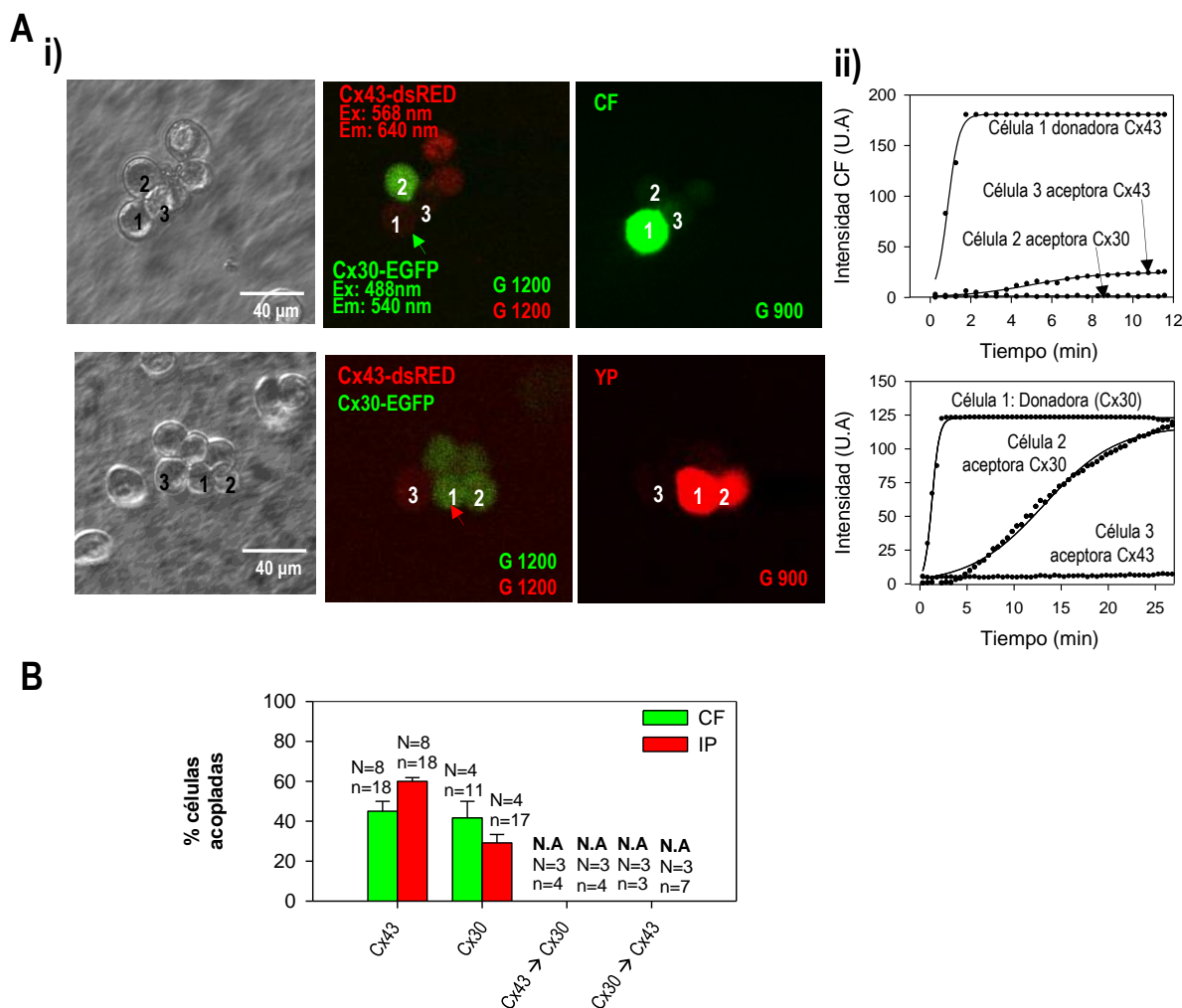


Figura 25. Transferencia de colorante a través de los canales homoméricos de Cx43 y Cx30 y de los canales heterotípicos de la Cx43 con la Cx30. Se cocultivaron células N2a transfectadas con la Cx43 y con la Cx30. **A)** Imágenes con microscopio confocal de luz transmitida (*izda*), de las células EGFP⁺ (*centro*, *alta ganancia del fotodetector*, G:1200), y de las células inyectadas con CF o YP (*dcha*, *flecha*) (*i*). Curso temporal de difusión de colorante de la célula donadora y la célula aceptora (*ii*). **B)** Porcentaje de acoplamiento entre células que expresan Cx43-Cx43, Cx30-Cx30 y Cx43-Cx30. Se detectó un mayor nivel de difusión en pares de células que expresaba Cx43 comparado a los pares que expresaban Cx30, sin embargo, no se encontró acoplamiento en ninguno de los pares analizados entre células que expresaban Cx30 y Cx43 ni al inyectar la célula RED⁺ ni al inyectar la célula GFP⁺. NA; no acoplamiento; N, n° cultivos, n, n° de células inyectadas.

de fluorescencia (verde o roja) de cada célula marcada al inicio de la transferencia durante 10 minutos (CF) o 20 minutos (YP) muestra cómo aumenta la intensidad de verde de la célula que expresa Cx43 inyectada con carboxifluoresceína así como aumenta la intensidad de una célula adyacente que expresa Cx43 mientras que la célula que expresa Cx30 no ve modificada su intensidad de fluorescencia. En el caso contrario vemos como la intensidad de rojo va aumentando en la célula que expresa Cx30 inyectada con yoduro de propidio así como en la célula adyacente que también expresa Cx30 pero no aumenta en la célula que expresa Cx43 (Figura 25B). Se calculó el porcentaje de células acopladas analizadas con ambos tipos de colorante (Figura 25B) indicando que tanto para YP como para CF la Cx43 es más permeable que la Cx30 y que en ningún caso se encontró acoplamiento a través de canales heterotípicos con ninguno de los dos colorantes.

3.6.2.4 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO DE Cx43 y Cx30. DEPENDENCIA DE VOLTAJE INTERCELULAR (V_j)

Mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos se midió la corriente transmembrana y se calculó el nivel de acoplamiento eléctrico según la fórmula: $G_{ji}=I_{ji}/V_j$ de los posibles canales formados por Cx43 y Cx30. Los pares de oocitos que coexpresaban ambas conexinas (Cx43+Cx30)-(Cx43+Cx30) tenían un nivel de acoplamiento eléctrico (Figura 26) similar al de los pares Cx43-Cx43 o Cx30-Cx30 mientras que los pares heterotípicos Cx43-Cx30 no estaban acoplados al igual que los oocitos control. Además de medir los niveles de acoplamiento eléctrico, se analizaron las propiedades de regulación por voltaje de los pares formados por canales de Cx43 y Cx30. En estos experimentos se observó que los canales homoméricos homotípicos de Cx30 (Figura 27A) tienen una sensibilidad a voltaje mayor que los canales homotípicos de Cx43 con un comportamiento simétrico para las dos polaridades. La curva G_{jss}/V_j (Figura 27B) ajustada una ecuación de Boltzmann (ver parámetros en la Tabla 12) muestra que estos canales adquieren un valor de conductancia máxima entre ± 40 mV que disminuye bruscamente a un valor de conductancia muy reducido para pulsos de $\geq \pm 60$ mV. Los canales homotípicos heteroméricos formado por oocitos que coexpresan Cx43 y Cx30 tienen unas propiedades de regulación por voltaje idénticas a los canales de Cx43 homotípicos (Figura 27A) donde se observa un valor de conductancia máxima para pulsos $\leq \pm 40$ mV y un valor de conductancia mínima para pulsos de ± 120 mV. Estos canales no presentan rectificación instantánea pero sí rectificación del valor de estado (Figura 27B) que tras ajustar a una ecuación de Boltzmann (ver parámetros en la Tabla 12) indica una dependencia a voltaje del canal simétrica que disminuye para los dos polaridades menos sensible a pulsos de voltaje que los canales homotípicos de Cx30-Cx30.

3.6.2.5 Efecto de las mutaciones R148Q y V85M sobre el acoplamiento intercelular de Cx30

En el análisis de expresión de los mutantes en coexpresión con la Cx30 se identificaron dos bandas de 30 y 40 KDa correspondientes a los lisados de células contransfectadas con Cx30 y R148Q

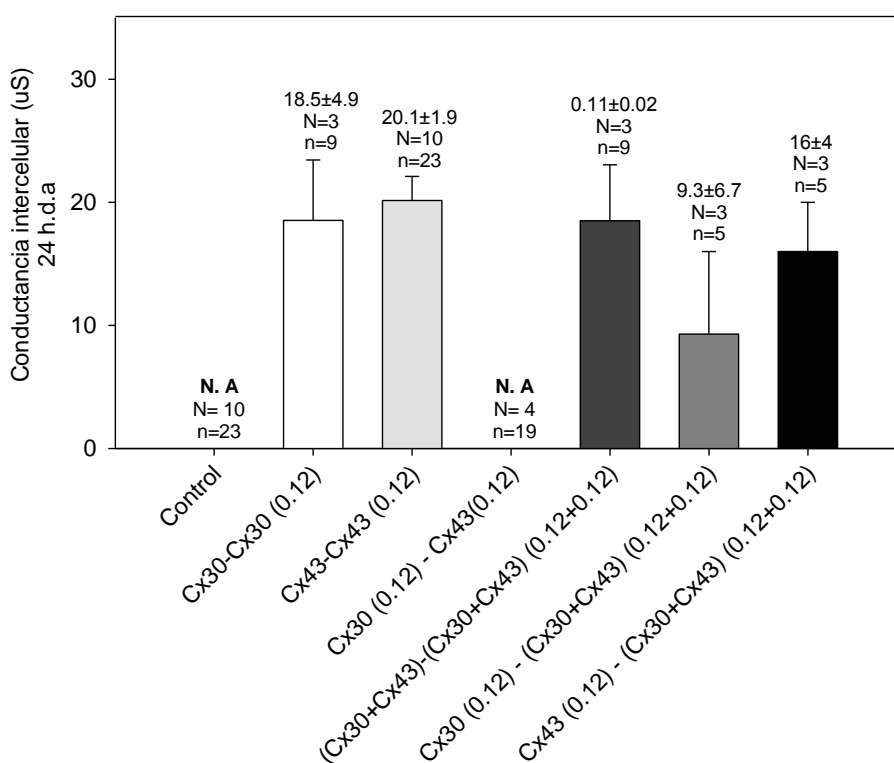


Figura 26. Niveles de acoplamiento eléctrico entre pares de oocitos inyectados con la Cx43 y la Cx30 por separado y coinyectados con ambas conexinas. Los oocitos se inyectaron con ARN de Cx43, Cx30 o con una mezcla 1:1 a la misma concentración final y se aparearon teniendo en cuenta todas las combinaciones posibles. Los valores promedio de conductancia macroscópica (\pm s.e) indican que a pesar de encontrar acoplamiento eléctrico en los pares que expresaban Cx43 y en los pares que expresaban Cx30, la combinación Cx43-Cx30, al igual que los controles no inyectados, no estaba acoplada. El resto de combinaciones presentaron un valor promedio de conductancia elevado al igual que los canales homotípicos homoméricos de Cx43 o Cx30 a excepción de la combinación Cx30-(Cx43+Cx30) donde se observó una reducción significativa del acoplamiento. (NA, no acoplamiento; N, nº experimentos y n, nº de pares de oocitos; *, $p < 0.05$, h.d.a, horas de apareamiento).

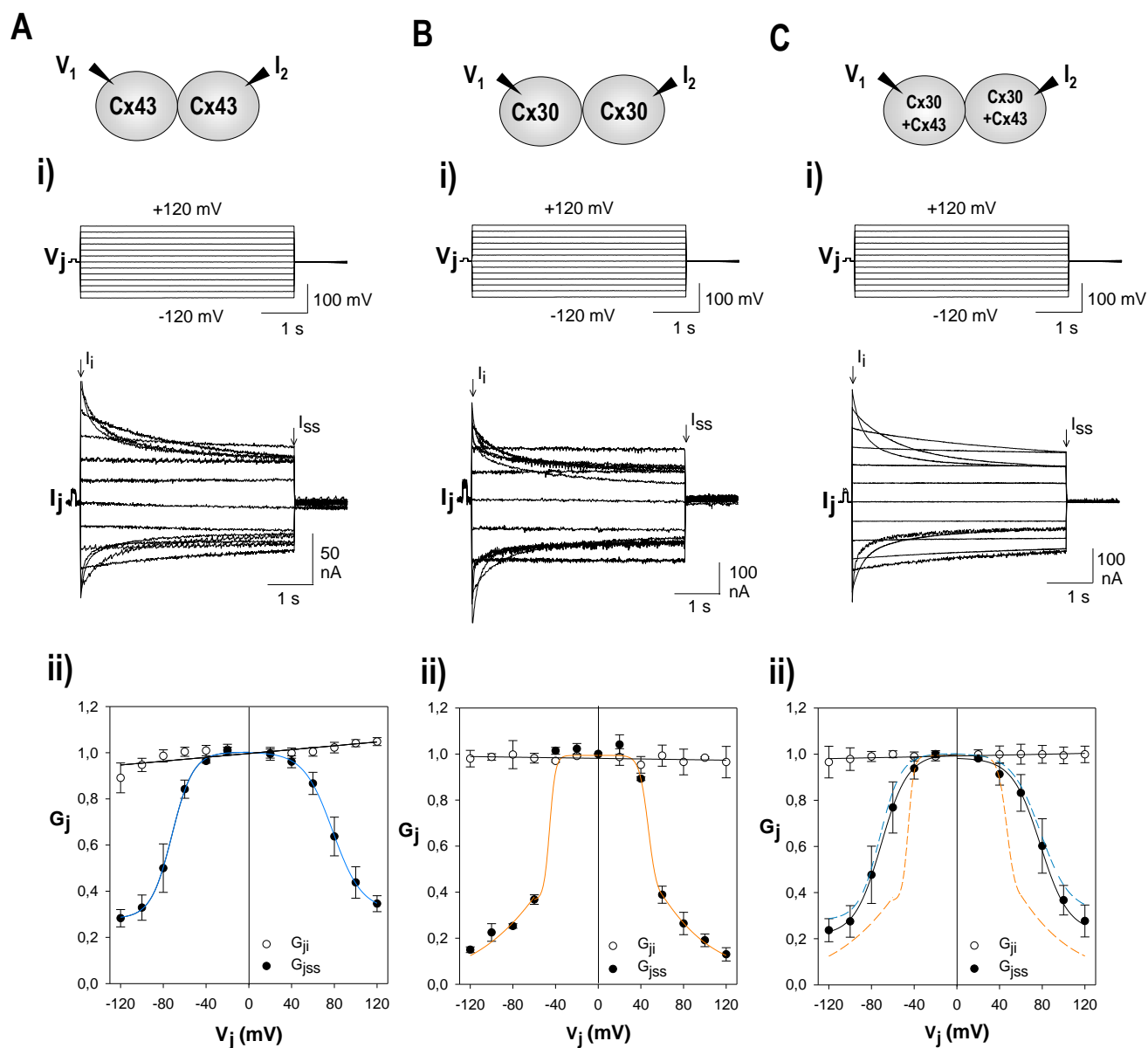


Figura 27. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales de Cx43 (A), de los canales de Cx30 y de los canales que median el acoplamiento entre los pares de oocitos coinyectados con la Cx43 y Cx30 (C). (i) Registro crudo de las corrientes intercelulares (I) de los pares homotípicos homoméricos Cx30-Cx43 y Cx30-Cx30 y de los pares heteroméricos Cx43+Cx30/Cx43+Cx30 inducidas por pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV en intervalos de 20 mV de 5 segundos de duración. (ii) Curvas que representan los valores promedio G_j/V_j (\pm s.e) de la conductancia instantánea (G_i) y de la conductancia del valor de estado (G_{ss}) para cada pulso de voltaje ajustadas a una ecuación Boltzmann (Tabla 12) ($N=3$, $n=4$). La curva G_j/V_j de los pares que expresan Cx43 se superpone a la de los pares coinyectados con ambas conexas (Cx43+Cx30)- (Cx43+Cx30) y se caracteriza por presentar una conductancia máxima entre ± 40 mV que disminuye de forma gradual hasta alcanzar el valor de conductancia mínimo con el pulso de ± 120 mV. En cambio, los pares que expresan Cx30, presentan una conductancia máxima entre ± 40 mV que disminuye drásticamente a partir del pulso de ± 60 mV alcanzando a partir de este pulso un valor mínimo de conductancia residual ($N=3$, $n=5$).

o Cx30 y V85M. Como control de carga se empleó GAPDH que migra a 36 KDa. Los resultados obtenidos de la cuantificación del western blot (Figura 28A) revelaron que la intensidad de la banda de Cx30 en los lisados de oocitos transfectados con Cx30 es igual a la intensidad de la banda del lisado de oocitos transfectados con Cx30 y el mutante R148Q mientras que disminuye significativamente ($\approx 53 \pm 18 \%$) al coexpresarse con el mutante V85M del mismo modo que observamos al coexpresar Cx30 con Cx43. También observamos una disminución de la intensidad de la banda de Cx43 en el mutante V85M comparado con R148Q mostrada previamente en el análisis de expresión de dichas mutaciones (Figura 12, A). Estos datos sugieren que el mutante R148Q ha perdido la capacidad que tiene la Cx43 de transregular la expresión de Cx30 mientras que el mutante V85M mantiene el efecto de regulación sobre Cx30 a pesar de presentar un nivel de expresión más reducido que la Cx43 silvestre.

La inmunocitoquímica de células N2a reveló la formación de placas homotípicas homoméricas en células transfectadas con Cx30 o con R148Q pero en ningún caso se encontraron placas heterotípicas homoméricas de Cx30-R148Q al mezclar dos poblaciones de células transfectadas de forma independiente con ambas conexinas. Las células cotransfectadas muestran la formación de placas mixtas del mismo tipo que las que aparecen al coexpresar Cx30 y Cx43 (Figura 28B-ii). En el caso del otro mutante, se identificaron placas en células transfectadas con Cx30 o con V85M pero tampoco se observaron placas heterotípicas homoméricas en ninguno de los campos analizados (Figura 28B-i). La inmunocitoquímica de células cotransfectadas con Cx30 y V85M mostraron placas mixtas iguales a las de la Cx43WT cuando se cotransfecta con la Cx30 (Figura 28B-ii).

Al analizar el nivel de acoplamiento eléctrico de los canales formados por oocitos inyectados con Cx30 y los mutantes de Cx43 no encontramos diferencias significativas entre los valores promedio de conductancia de los canales homotípicos homoméricos Cx30-Cx30 y los canales heteroméricos homotípicos (Cx30+R148Q)-(Cx30+R148Q) mientras que los canales heterotípicos Cx30-R148Q estaban no acoplados igual que los controles no inyectados (Figura 29A). En el caso del mutante V85M, los canales heteroméricos homotípicos (Cx30+V85M)-(Cx30+V85M) presentaban un valor promedio de acoplamiento eléctrico de $9.4 \mu\text{S}$ (\pm s.e), inferior a los $12.5 \mu\text{S}$ (\pm s.e) registrados en los oocitos inyectados con Cx30 pero no significativamente diferentes ($p=0,329$). Sin embargo los pares homoméricos heterotípicos Cx30-V85M no estaban acoplados eléctricamente (Figura 29B).

Las propiedades de regulación por voltaje se determinaron aplicando un protocolo de pulsos de voltaje de ± 120 mV con incrementos de $+20$ mV durante 5 segundos y se registraron las corrientes intercelulares (I_j). Los resultados del registro crudo (Figura 30A) indican que tanto R148Q como V85M

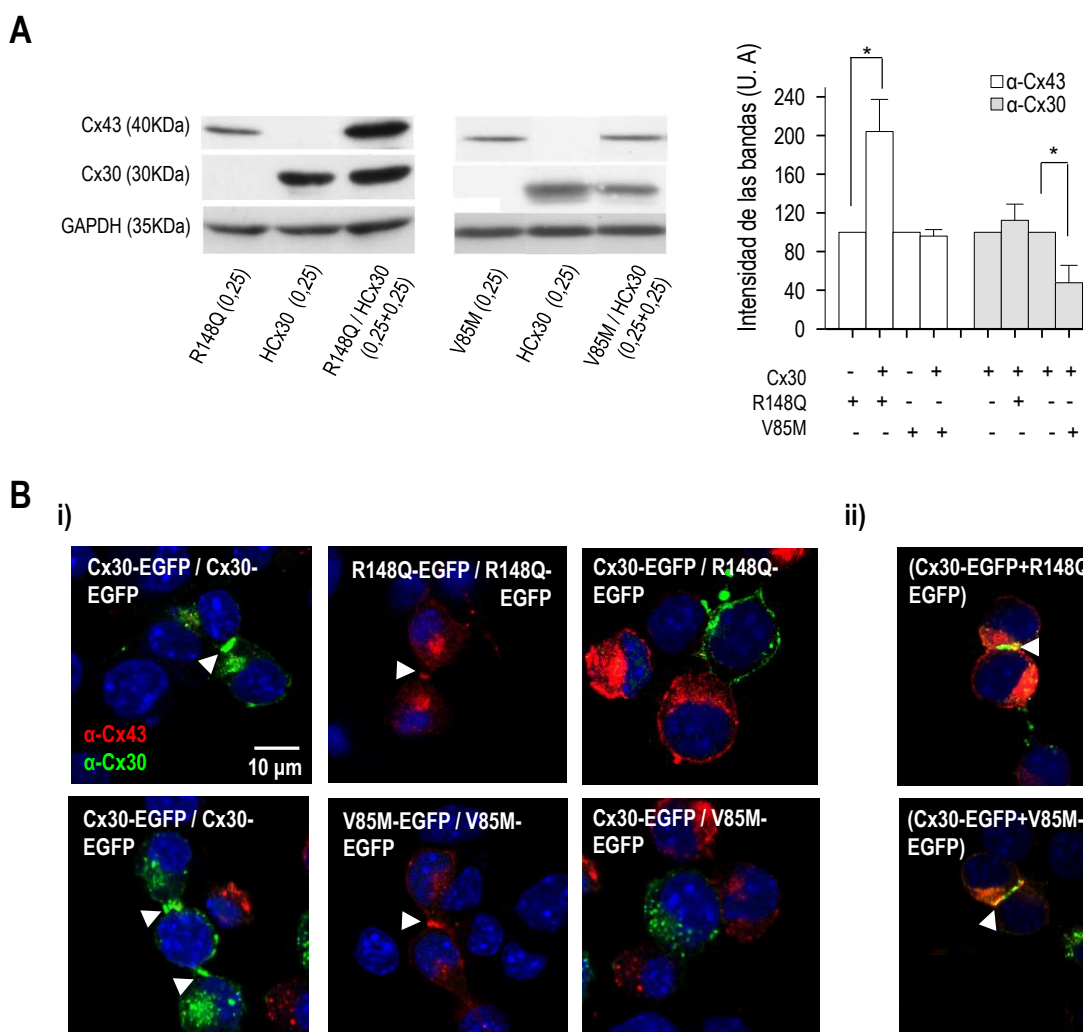


Figura 28. Transregulación de la expresión y formación de placas de entre Cx30 y los mutantes de Cx43.
A). Western blot de proteína total de oocitos inyectados con Cx30, Cx30+R148Q y Cx30+V85M. Se observan tres bandas de 40KDa, 30KDa y 35KDa correspondientes al monómero Cx43, Cx30 o GAPDH respectivamente. Histograma que indica los valores promedio \pm s.e de la expresión de Cx30 sólo o en coexpresión con los mutantes de CX43 (N= 3, n=60-80). El mutante V85M disminuye de forma significativa la expresión de Cx30 cuando ambos se coexpresan, sin embargo, no se observan cambios en los niveles de expresión de Cx30 al coexpresar con R148Q (* = $p < 0.05$). **B.** Imágenes de microscopía confocal que muestran placas en la zona de aposición entre dos células (*flechas*) en un cultivo transfectados con Cx30, un cultivo mixto de células transfectadas o con mutante de Cx43 o con Cx30 y en células cotransfectadas con Cx30 y mutante de Cx43. No se observaron placas heterotípicas entre Cx30 y R148Q (i) aunque sí se encontraron placas mixtas homotípicas heteroméricas al coexpresar Cx30+R148Q del mismo tipo que las encontradas cuando se coexpresaban Cx30+Cx43 (ii). Se identificaron placas homotípicas homoméricas de V85M y de Cx30 o Cx30 y V85M. Como control de carga se empleó GAPDH que migra a 36 KDa. Los resultados obtenidos de la cuantificación del western blot (Figura 28A) revelaron que la intensidad de la banda de Cx30 en los lisados de oocitos transfectados con Cx30 es igual a la intensidad de la banda del lisado de oocitos transfectados con Cx30 y el mutante R148Q mientras que disminuye significativamente ($\approx 53 \pm 18 \%$) al coexpresarse con el mutante V85M del mismo modo que observamos al coexpresar Cx30 con Cx43 .pero no heterotípicas al mezclar estas dos poblaciones de células (i). También se identificaron placas homotípicas heteroméricas mixtas muy similares a las formadas cuando se coexpresaban Cx43+Cx30 (ii).

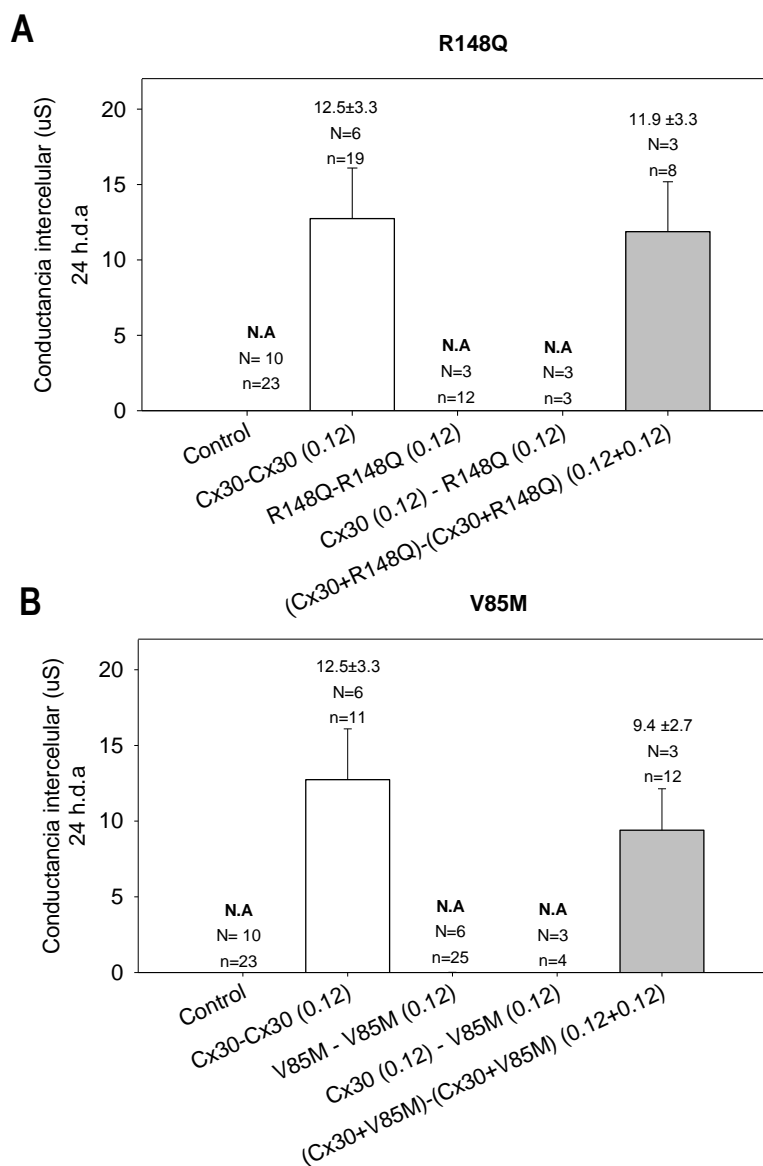


Figura 29. Niveles de acoplamiento eléctrico entre pares de oocitos que expresan Cx30 y los mutantes por separado y en combinación. Se aparearon oocitos inyectados con Cx30, Cx43R148Q y Cx43V85M y una combinación 1:1 de Cx30 con los mutantes. Los valores promedio de conductancia macroscópica intercelular (\pm s.e) de los pares que expresaban Cx30 ($12.5 \mu\text{S}$) fue similar al de los pares que coexpresaban Cx30 y el mutante Cx43R148Q **(A)** o el mutante Cx43V85M **(B)** mientras que el resto de combinaciones analizadas, al igual que los oocitos control no estaban acopadas eléctricamente (NA, no acoplamiento; N, n° experimentos y n, n° de pares de oocitos; *, $p < 0.05$, h.d.a, horas de apareamiento).

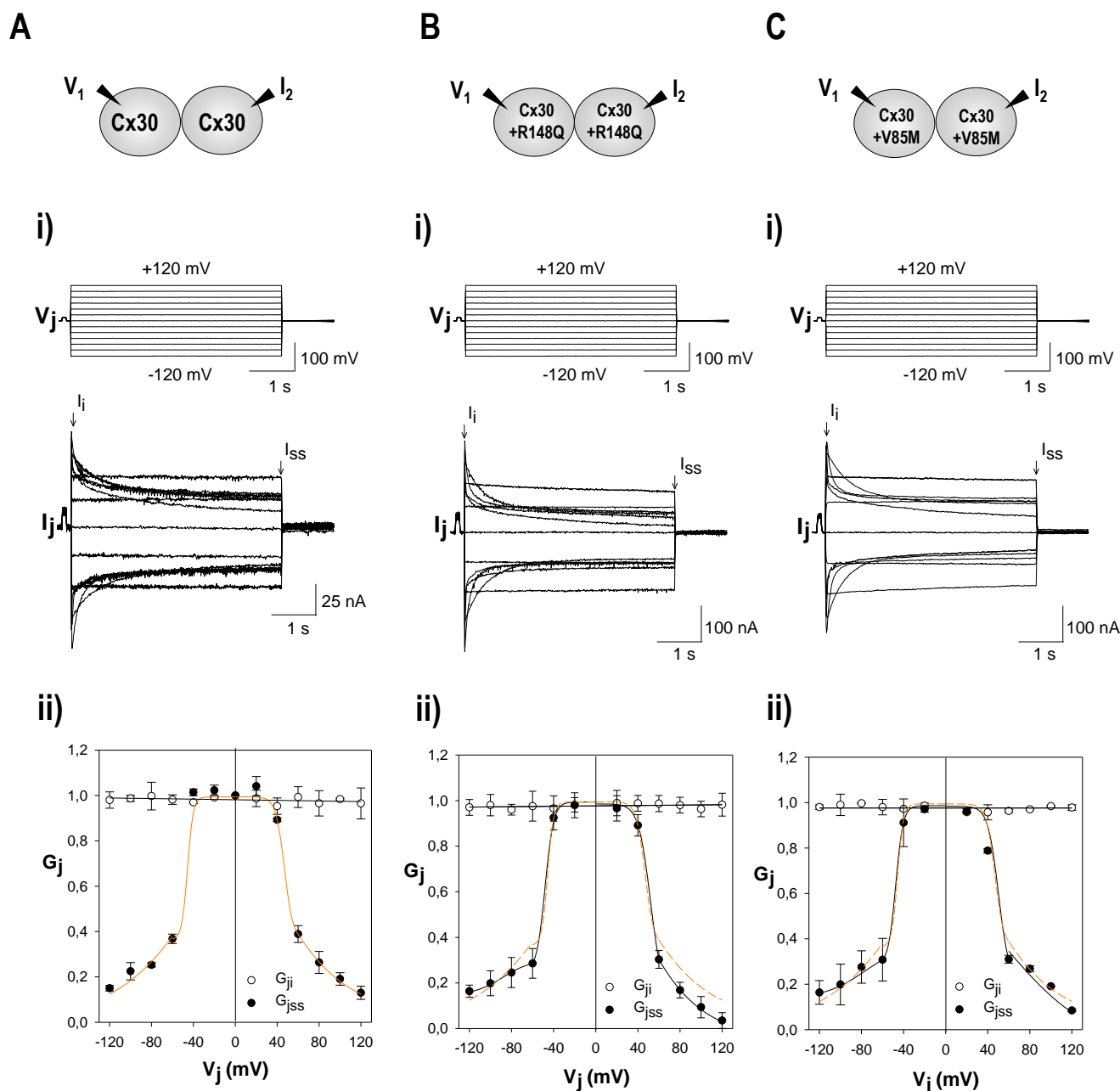


Figura 30. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales de Cx30 (A) y de los canales que median el acoplamiento entre los pares de oocitos coinyectados con Cx43R148Q (B) o con Cx43V85M y la Cx30. (i) Registro crudo de las corrientes obtenidas tras un protocolo de pulsos de ± 120 mV con incrementos de 20 mV durante 5 segundos. (ii) Gráfica G_j/V_j que representan el valor inicial y de estado de conductancia intercelular ajustada a una ecuación de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 12. Los pares que coexpresaban la Cx30 y el mutante Cx43R148Q o el mutante Cx43V85 mostraron unas propiedades de regulación por voltaje y una curva G_j/V_j perfectamente superponible a las de los pares que expresaban sólo Cx30. En (ii) se representan la $\bar{x} \pm s.e$ de $n=5$ pares de oocitos.

no varían la sensibilidad a voltaje de los canales intercelulares formados por Cx30-Cx30 ya que los canales heteroméricos homotípicos (Cx30+R148Q)- (Cx30+R148Q) así como los canales (Cx30+V85M)- (Cx30+V85M) presentan una rectificación de la amplitud de la corriente simétrica para las dos polaridades idéntica a la de los canales Cx30-Cx30. La relación entre la conductancia de los canales y el voltaje (Figura 30B) ajustada a una ecuación Boltzmann (ver parámetros en la Tabla 12) muestra que la curva G_{jss}/V_j de los canales de Cx30-Cx30 se superpone perfectamente con la curva de los canales heteroméricos de R148Q y de V85M y que todos presentan una elevada sensibilidad a voltaje con un valor de conductancia máxima (G_{max}) en los pulsos de voltaje de ± 40 mV y un valor de conductancia mínimo (G_{min}) para pulsos de $\geq \pm 60$ mV. Estos resultados sugieren que además de no formar canales heterotípicos eléctricamente acoplados con Cx30, los mutantes R148Q y V85M no interactúan con dicha conexina para formar canales heteroméricos.

3.6.3 INTERACCIÓN ENTRE LAS CONEXINAS-43 SILVESTRE Y MUTADAS ASTROCITARIAS Y LA CONEXINA-47 OLIGODENDROCITARIA.

Los astrocitos además de acoplarse entre sí se también se comunican intercelularmente con los oligodendrocitos (Maglione, Tress et al. 2010), el tipo celular que forma la mielina en el SNC. Dado que los astrocitos y los oligodendrocitos expresan distintos tipos de conexinas, las uniones heterólogas astrocito-oligodendrocito tiene lugar a través de canales intercelulares de tipo heterotípico; en este contexto la Cx43 astrocitaria únicamente forma canales heterotípicos con la Cx47 oligodendrocitaria (Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007). Con la finalidad de determinar el impacto de las mutaciones Cx43R148Q y Cx43V85M sobre al acoplamiento astrocitario-oligodendrocitario, mediado principalmente por canales de Cx43-Cx47, se analizó la capacidad funcional de dichos mutantes para combinarse con la Cx47 en ausencia y presencia de la Cx43 silvestre.

3.6.3.1 FORMACIÓN DE PLACAS INTERCELULARES ENTRE LAS Cx43 MUTADAS Y LA Cx47.

Los estudios de formación de placas intercelulares entre las Cx43 silvestre y mutadas con la Cx47 se realizaron en células de la línea N2a transfectadas por separado con los plásmidos pCx43WT-IRES-EGFP, pCx43R148Q-IRES-EGFP, pCx43V85M-IRES-EGFP y pCx47-IRES-dsRED, y que posteriormente se mezclaron para poder obtener cultivos con células heterólogas. Las imágenes de microscopia confocal de la inmunocitoquímica mostraron la formación de placas intercelulares entre los pares de células homologas que expresan la Cx43WT y la Cx47, y también entre las células heterólogas Cx43WT-Cx47 (Figura 31A). Estos estudios también pusieron en evidencia la formación de de placas heterotípicas entre pares heterólogos en los que una célula expresa la Cx47 y la otra la Cx43R148Q o la Cx43V85M (Figura 31, B y C), sugiriendo que ambos mutantes de Cx43 forman, como lo hace la Cx43WT, canales intercelulares de tipo heterotípico-homomérico.

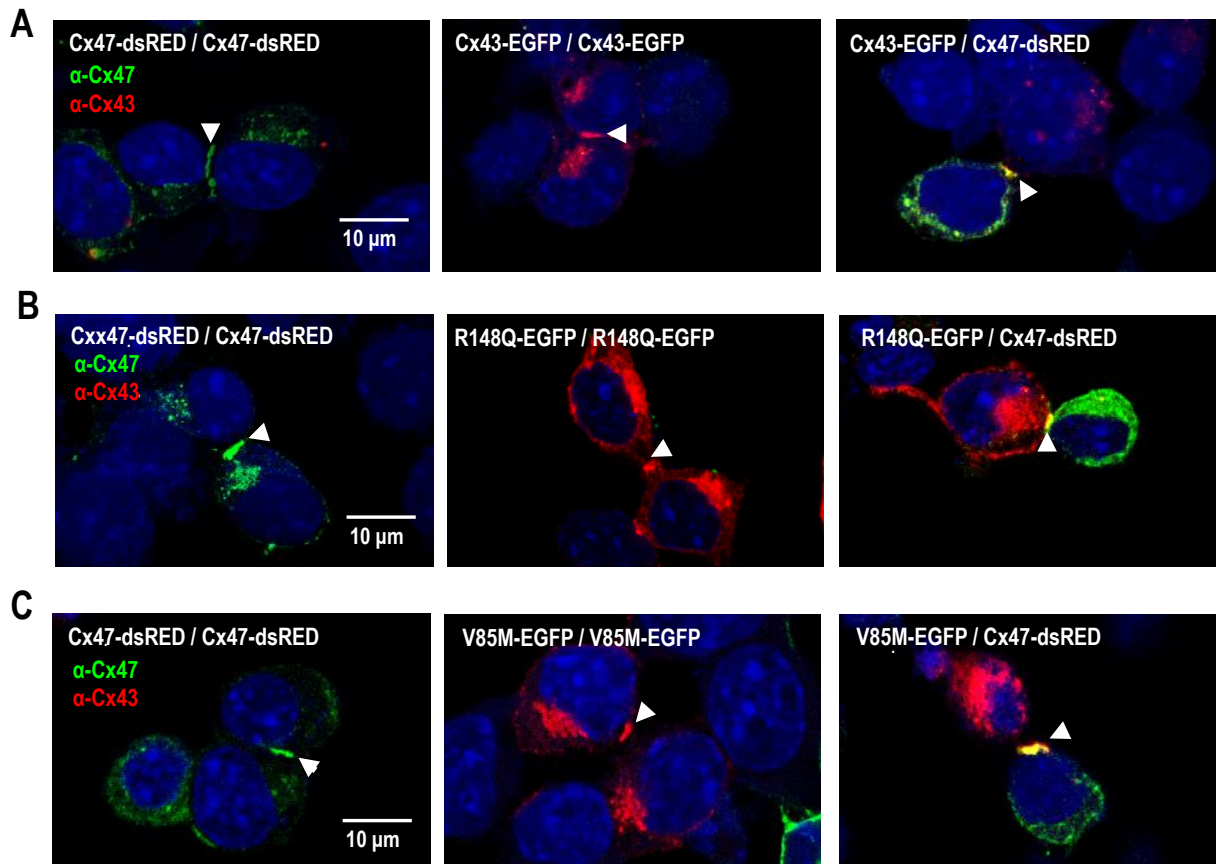


Figura 31. Formación de placas intercelulares por entre la Cx47 y la Cx43WT, Cx43R148Q o Cx43V85M. La línea celular N2a se transfectó transitoriamente con los plásmidos Cx47, Cx43, R148Q y V85M por separado y a continuación se cocultivaron en una relación 1:1 durante 18 horas. Las imágenes de microscopía confocal indican que la existencia de estructuras en la zona de aposición entre dos células compatibles con placas (*flechas*) en todas las combinaciones analizadas, sugiriendo la formación de canales heterotípicos homoméricos entre Cx47 y la Cx43 así como entre la Cx47 y los mutantes , Cx43R148Q y Cx43V85M.

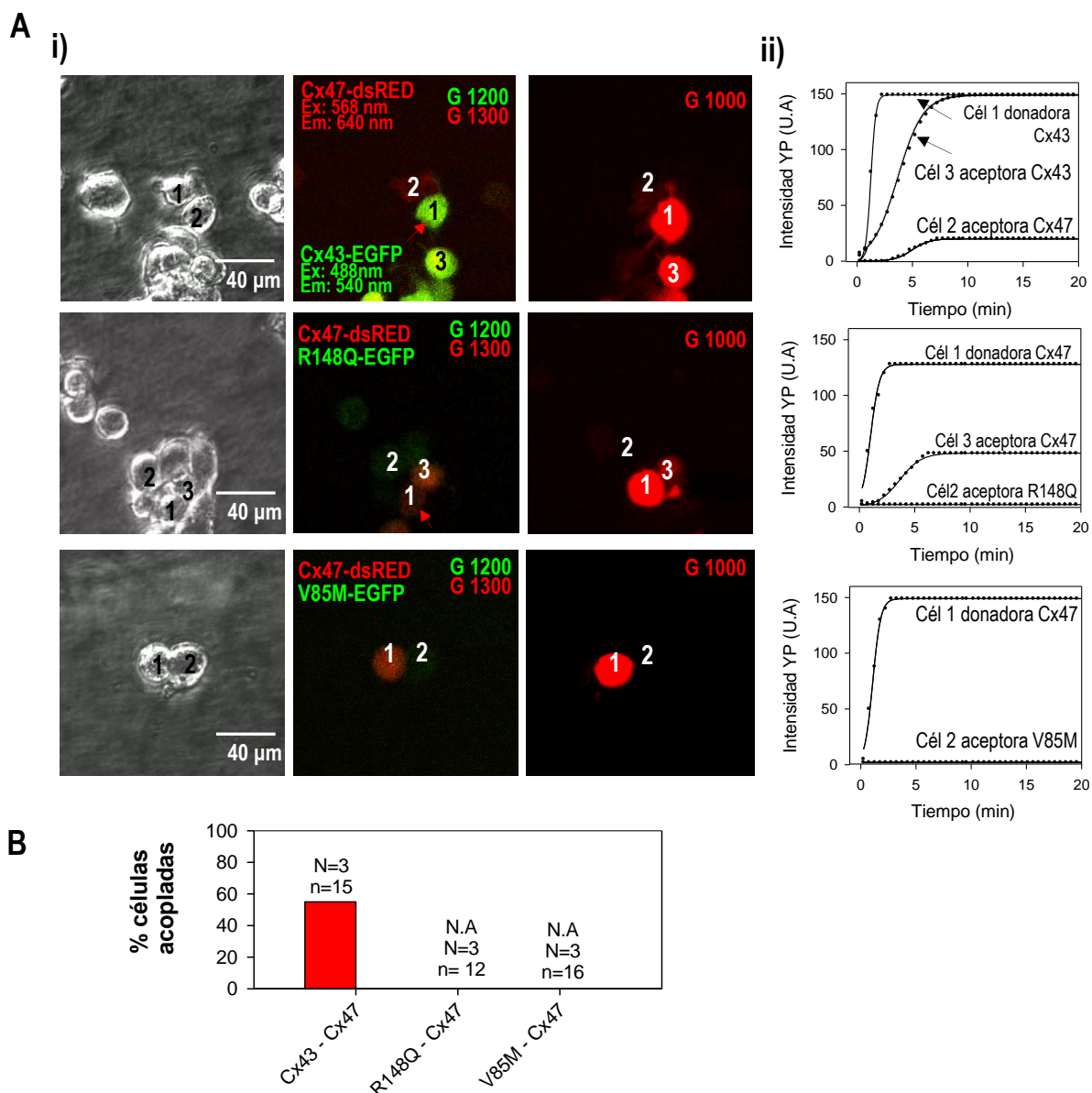


Figura 32. Transferencia de colorante a través de los canales heterotípicos de Cx47 y Cx43WT, Cx43R148Q y Cx43V85M. A) (i) Imágenes de microscopía confocal del cultivo con luz transmitida (*izda*), de células EGFP⁺ con alta ganancia del fotodetector (*centro*), y células inyectadas con YP (*flecha*) y adyacentes con baja ganancia del fotodetector, a tiempo final de la inyección. **(ii)** Curso temporal de la intensidad de la célula donadora y aceptora a lo largo de la inyección. **B)** Porcentaje de células acopladas por yoduro de propidio. Sólo se detectó acoplamiento entre las células que expresaban Cx43GFP⁺ y Cx47dsRED⁺. (NA; no acoplamiento; N, n° cultivos, n, n° de células inyectadas).

3.6.3.1 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO INTERCELULAR POR COLORANTE ENTRE LAS UNIONES HETERÓLOGAS FORMADAS POR LOS MUTANTES DE Cx43 Y LA Cx47.

En estos mismos cultivos se realizaron estudios de acoplamiento por colorante con la finalidad de determinar si los canales heterotípicos formados por las Cx43 mutadas con la Cx47

oligodendrocitaria eran funcionales (Figura 32, A y B). Cuando se inyectó el YP en las células EGFP⁺ transfectadas con la Cx43WT o en las células dsRES⁺ de Cx47 el colorante las difundió a las células vecinas heterólogas dsRES⁺ y EGFP⁺ en ≈55% de los casos ensayados, indicando que la Cx43 y Cx47 forman canales heterotípicos permeables; sin embargo, en los cultivos en que el YP se inyectó en las células EGFP⁺ transfectadas con la Cx43R148Q o con la Cx43V85M no se observó difusión intercelular del colorante a las células vecinas dsRES⁺ de Cx47; tampoco se produjo difusión del colorante a las células heterólogas EGFP⁺ de Cx43R148Q o de Cx43V85M en aquellos en que la inyección se realizó en las células vecinas dsRES⁺ de Cx47, indicando que, por el contrario, los canales formados por la Cx43R148Q y la Cx43V85M con la Cx47 no son funcionales.

3.6.3.2 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO DE LOS CANALES FORMADOS POR LA Cx43 SILVESTRE Y MUTADAS CON LA Cx47. DEPENDENCIA DEL VOLTAJE INTERCELULAR.

Estos experimentos se realizaron estudiando el acoplamiento eléctrico que se estableció apareando oocitos de inyectados con el ARN de la Cx47 con oocitos en los que se había inyectado la Cx43WT, la Cx43R148Q y la Cx43V85M o con una mezcla en una relación 1:1 de la Cx43 silvestre y de cada uno de los mutantes para la misma concentración final. A diferencia del alto grado de acoplamiento eléctrico registrado entre los pares heterotípicos de Cx47 con la Cx43WT, los pares de Cx47 con la Cx43V85M mostraron niveles de acoplamiento residuales (< 1%) y en caso de los pares Cx47-Cx43R148Q no se detectó acoplamiento eléctrico (Figura 33). En los experimentos en los que se simuló la condición de heterocigosis de los pacientes, la coexpresión de las Cx43 mutadas con la Cx43 silvestres el grado de acoplamiento se redujo entre los pares de oocitos Cx47-(Cx43WT+Cx43R148Q) y Cx47-(Cx43WT+Cx43V85M) en comparación con el de los pares Cx47-Cx43WT en aproximadamente un 92% y un 98%, respectivamente (Figura 33).

Las corrientes intercelulares de los canales astrocitarios de Cx43-Cx43, de los canales oligodendrocitarios de Cx47 y de los canales astrocitarios-oligodendrocitarios Cx43-Cx47 difieren respecto a sus propiedades de regulación por el voltaje intercelular (V_j) (Figura 34). En los canales compuestos por la Cx43 y por la Cx47 la amplitud de las corrientes intercelulares aumenta linealmente con el gradiente de voltaje y simétricamente para las dos polaridades del V_j (Figura 34A y B, i y ii); sin embargo, el comportamiento de los canales híbridos de Cx43-Cx47 fue de tipo rectificador rápido, ya que, el valor inicial de la conductancia intercelular (G_{ji}) aumenta y disminuye respectivamente con las

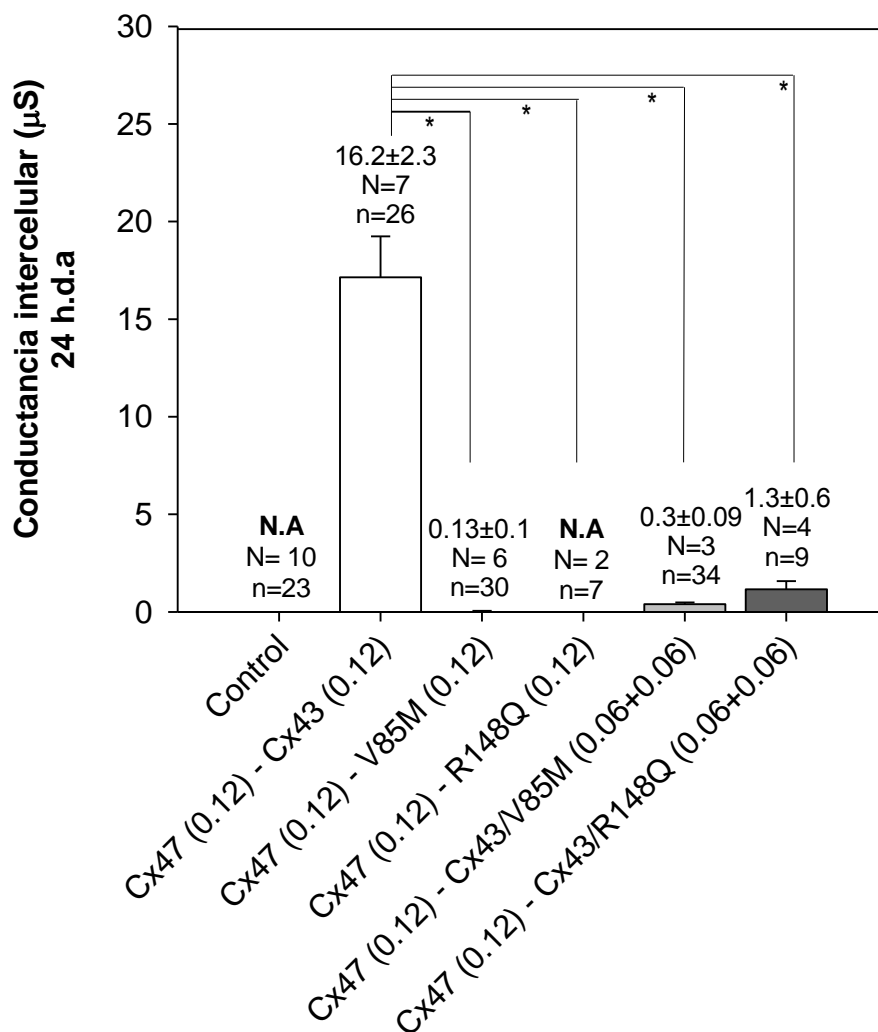


Figura 33. Niveles de acoplamiento eléctrico entre pares de oocitos que expresan Cx47, Cx43WT, y los mutantes en todas las combinaciones posibles. Los oocitos se inyectaron con ARNs de Cx47, Cx43, Cx43R148Q y Cx43V85M solos o coinyectados en una proporción 1:1 silvestre y mutado con la misma concentración final. Los valores promedio de conductancia macroscópica muestran unos niveles elevados de acoplamiento en los pares heterotípicos de Cx43-Cx47 no observado en los pares Cx47-R148Q ni en los controles no acoplados. En los pares Cx43-V85M los niveles de conductancia se redujeron en más de un 99 % al igual que en los pares heterotípicos heteroméricos que simulan la condición heterocigota de los pacientes Cx47-(Cx43+R148Q) y Cx47-(Cx43+V85M) donde se observan niveles de acoplamiento residual en ambos mutantes sugiriendo un potente efecto de inhibición dominante tanto de Cx43R148Q como de Cx43V85M sobre los canales intercelulares de Cx43WT-Cx47. (Valores promedio \pm s.e; NA, no acoplamiento; N, nº experimentos y n, nº de pares de oocitos; *, $p < 0.05$, h.d.a, horas de apareamiento).

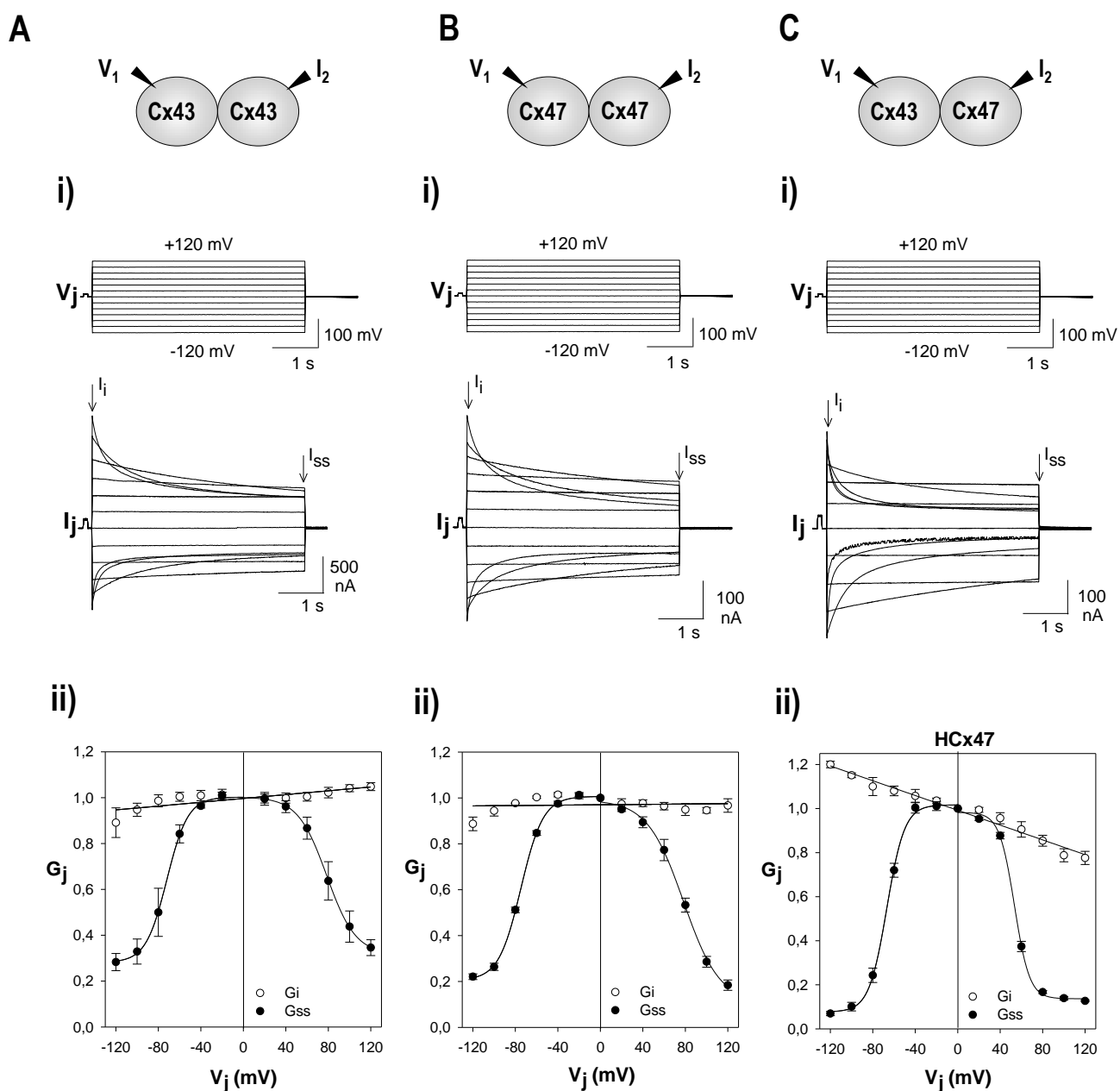


Figura 34. Propiedades de regulación por voltaje entre Cx47- Cx43. A. (i) Registro crudo de corriente intercelular (I_j) en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV de 5 segundos de duración con intervalos de 20 mV en pares homotípicos Cx43-Cx43 y Cx47-Cx47 y pares heterotípicos Cx43-Cx47. (ii) Curva G_{jss}/V_j de cada tipo de canal ajustada a una ecuación Boltzmann (Tabla 13). Los canales homotípicos de 43 y 47 a pesar de presentar cada uno una sensibilidad a voltaje específica (Tabla 13), son similares (A*i-ii*, B*i-ii*) mientras que en los canales heterotípicos se observa una mayor sensibilidad a voltaje a valores mayores de los pulsos de polaridad positiva aplicados a la célula que expresa Cx47 y una rectificación del valor de conductancia instantánea (C*i-ii*). En (ii) se representan la $\bar{x} \pm$ s.e de $n=5$ pares de oocitos.

despolarizaciones e hiperpolarizaciones relativas de la célula que expresa la Cx47 oligodendrocitaria, en $\approx 35\%$ entre ± 120 mV (Figura 34C, *i* y *ii*), indicando la existencia de direccionalidad en el acoplamiento eléctrico (i.e., en el movimiento de iones) entre los astrocitos y oligodendrocitos. En los canales de Cx47 y de Cx43, la amplitud de las corrientes intercelulares se redujo en función del gradiente de V_j y de forma simétrica para las dos polaridades del V_j (Figura 34A y B, *i* y *ii*), pero con unos parámetros de sensibilidad a voltaje específicos para cada tipo de canal (Tabla 13). En el caso de los canales híbridos de Cx47-Cx43 las corrientes intercelulares también disminuyeron con el incremento del gradiente intercelular de voltaje pero de forma asimétrica, con una mayor sensibilidad al voltaje pero a valores ligeramente mayores para los pulsos de polaridad positiva vistos por la célula Cx47 (Figura 34C, *i* y *ii*; Tabla 13). En los canales híbridos que forma el mutante Cx43V85M con la Cx43WT también se observó el comportamiento rectificador rápido para la misma polaridad del V_j (i.e., para la polaridad positiva relativa en el interior de la célula Cx47) pero significativamente más pronunciado, variando en $\approx 80\%$ entre ± 120 mV (Figura 35A, *i* y *ii*); estos canales también difirieron de los formados por la Cx43WT en las propiedades de cierre de las corrientes, para la polaridad positiva en la célula Cx47 la reducción de las corrientes fue de baja amplitud y rápida y para la polaridad opuesta el comportamiento fue bifásico, primero las corrientes se cierran y luego se abren (Figura 35A, *i* y *ii*; Tabla 13). Por el contrario, las propiedades de regulación por el V_j en los canales que se forman entre los pares de oocitos Cx47-Cx43R148Q y Cx47-Cx43V85M fueron indistinguibles de las exhibidas por los canales Cx47-Cx43WT (Figura 35B y C, *i* y *ii*; Tabla 13).

En resumen, estos resultados muestran que aun cuando las mutaciones astrocitarias Cx43R148Q y Cx43V85M no interfieren con la capacidad para formar canales con la Cx47 oligodendrocitaria, los canales resultantes o no son funcionales en el caso de la Cx43R148Q o inducen niveles de acoplamiento eléctrico residuales con propiedades aberrantes; en los experimentos de co-expresión con la Cx43WT, ambas mutaciones produjeron un potente efecto de inhibición dominante sobre el grado de acoplamiento astrocitario-oligodendrocitario mediado por los canales Cx43-Cx47.

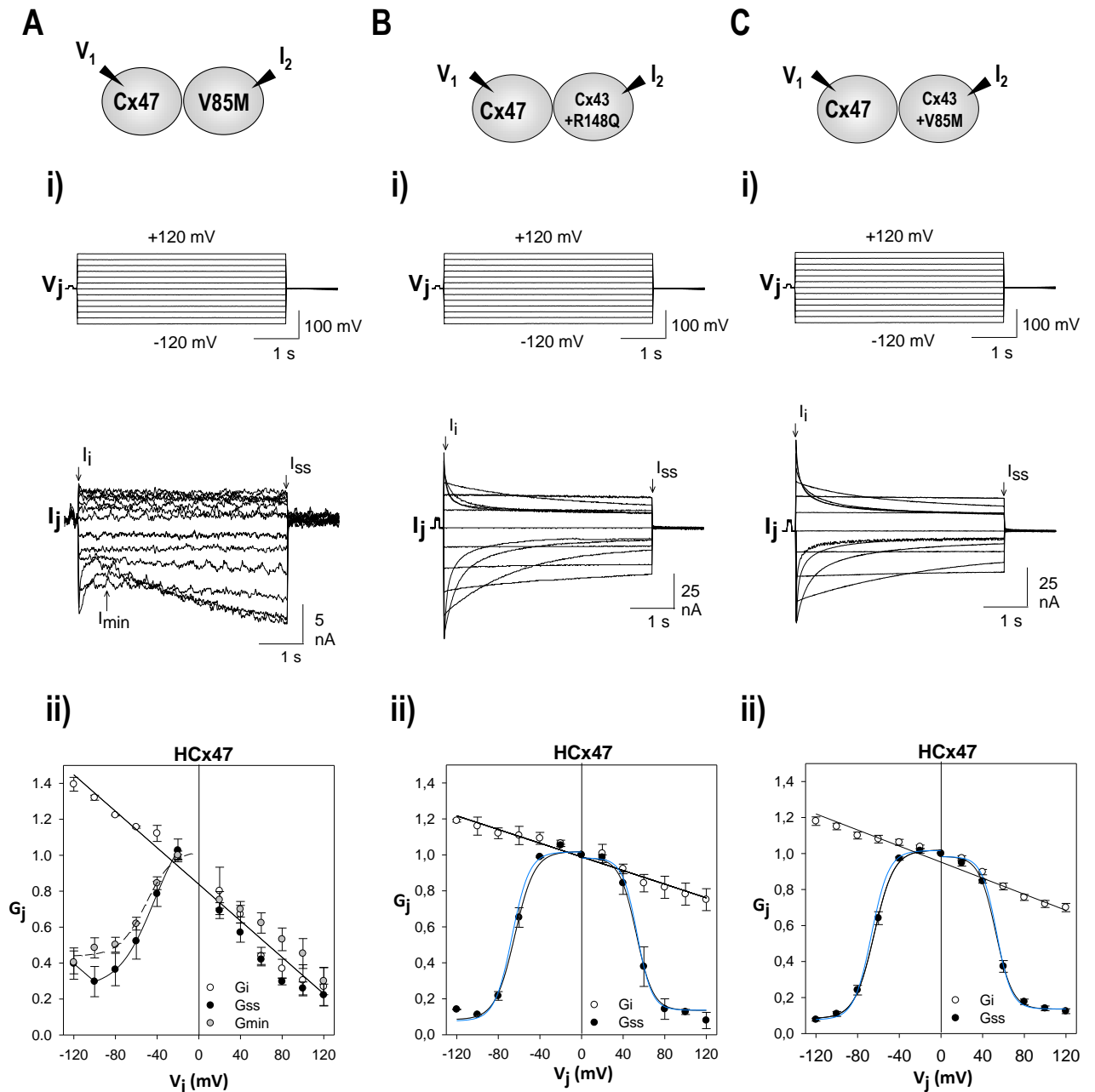


Figura 35. Propiedades de regulación por voltaje entre Cx47, Cx43R148Q y Cx43V85M. A) (i) Registro crudo la corriente intercelular (I_j) inducida por pulsos de voltaje de ± 120 mV (V_j) durante 5 segundos en incrementos de 20 mV (ii) en pares de oocitos que expresan Cx47-Cx43V85M y pares que simulan la condición heterocigota de los pacientes Cx47-(Cx43+R148Q) y Cx47-(Cx43+V85M). (ii) Graficas G_{ij}/V_j ajustada a una ecuación Boltzmann (Tabla 13) representado el valor inicial (G_{ij} , \circ) y el valor de estado de la conductancia intercelular (G_{jss} , \bullet) (\pm s.e., $n=5$ pares de oocitos). Los canales heterotípicos Cx47-Cx43V85M muestran el mismo comportamiento rectificador que observamos en los canales Cx47-Cx43WT pero más marcado y difieren de las propiedades de regulación por voltaje de los mismos mostrando un comportamiento bifásico en el que se observa una disminución de la amplitud de las corrientes a tiempos cortos seguido de un aumento de la amplitud sin llegar a alcanzar un valor de estado para pulsos negativos vistos por el oocito que expresa Cx47, a diferencia de los canales heterotípicos heteroméricos (Cx47-Cx43WT+Cx43R148Q y (Cx47-Cx43WT+Cx43V85M) donde no se observaron diferencias comparado con los de Cx47-Cx43WT.

Tabla 10. Parámetros de la función de Boltzmann de la dependencia del potencial de membrana de los hemicanales formados por la Cx43 humana y por los mutantes de paraparesia espástica solos o en combinación con la Cx43 (condición heterocigota).

	<i>V_m</i> (-)					<i>V_m</i> (+)				
	<i>G_{hmax}</i>	<i>G_{hmin}</i>	<i>A(mV⁻¹)</i>	<i>z</i>	<i>V₀ (mV)</i>	<i>G_{hmax}</i>	<i>G_{hmin}</i>	<i>A(mV⁻¹)</i>	<i>z</i>	<i>V₀ (mV)</i>
Cx43	1.03	0.18	0.08	2.02	-89.04	0.98	0.15	0.59	14.90	22.78
R148Q	1.03	0.22	0.06	1.51	-86.7	0.99	0.20	0.60	15.15	23.12
V85M	0.96	0.19	0.08	2.02	-81.16	0.99	0.21	0.25	6.31	33.6
R148Q+Cx43	1.02	0.21	0.07	1.76	-77.38	0.99	0.22	0.59	14.90	21.45
V85M+Cx43	1.2	0.23	0.06	1.51	-93.75	0.90	0.22	0.54	13.64	23.71

La dependencia de voltaje de los hemicanales se calculó a partir de la curva G_{hss}/V_m ajustada a la siguiente ecuación Boltzmann para cada una de las polaridades: $G_{hss} = \{(G_{hmax} - G_{hmin}) / (1 + \exp[A(V_{j/m} - V_0)])\} + G_{hmin}$, donde la G_{hmax} es la conductancia máxima, la G_{hmin} es la conductancia residual no sensible a voltaje, V_0 (mV) es el voltaje intercelular al cual la conductancia se reduce a la mitad ($G_{ss} = (G_{hmax} - G_{hmin}) / 2$) y A es la pendiente o sensibilidad al voltaje de cada hemicanal.

Tabla 11. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales astrocitarios formados por la conexina Cx43 y los mutantes de paraparesia espástica en combinación homotípica, heterotípica y heteromérica.

	<i>V_j</i> (-)					<i>V_j</i> (+)					
	<i>G_{jmax}</i>	<i>G_{jmin}</i>	<i>A(mV⁻¹)</i>	<i>z</i>	<i>V₀(mV)</i>	<i>G_{jmax}</i>	<i>G_{jmin}</i>	<i>A(mV⁻¹)</i>	<i>z</i>	<i>V₀(mV)</i>	
Cx43-Cx43	1.00	0.28	0.10	2.53	-72.00	1.00	0.32	0.07	1.77	78.50	
(Cx43+R148Q) – (Cx43+R148Q)	0.98	0.30	0.10	2.53	-73.08	0.98	0.22	0.06	1.52	68.69	
(Cx43+V85M)	1 ^a Boltz	1.00	0.49	0.07	1.77	-60.13	1.02	0.22	0.03	0.76	120.34
-(Cx43+V85M)	2 ^a Boltz	1.02	0.37	0.07	1.77	-71.82	1.02	0.8	0.17	4.29	74.19
*Cx43 – R148Q	1 ^a Boltz	0.98	0.42	0.29	7.32	-76.67	-	-	-	-	-
	2 ^a Boltz	1.00	0.46	0.14	3.54	79.02	1.04	0.22	0.07	1.77	46.45
*Cx43 – V85M	1 ^a Boltz	0.89	0.52	0.12	3.03	-89.44	ND	ND	ND	ND	ND
	2 ^a Boltz	4.00	0.74	0.03	0.76	-69.5	ND	ND	ND	ND	ND
*(Cx43) – (Cx43+R148Q)		1.00	0.22	0.11	2.78	-63.42	0.98	0.45	0.11	2.78	84.3
*(Cx43) – (Cx43+V85M)		1.01	0.35	0.10	2.53	-61.84	0.99	0.33	0.07	1.77	65.80

La sensibilidad a voltaje de los canales intercelulares se calculó con los valores de la conductancia de estado normalizada (G_{jss}) ajustados para cada polaridad a una o a dos (1^a Boltz/2^a Boltz) ecuaciones Boltzmann: $G_{jss} = \{(G_{jmax} - G_{jmin}) / (1 + \exp[A(V_{j/m} - V_0)])\} + G_{jmin}$, donde la G_{jmax} es la conductancia máxima, la G_{jmin} es la conductancia residual no sensible a voltaje, V_0 (mV) es el voltaje intercelular al cual la conductancia se reduce a la mitad ($G_{ss} = (G_{jmax} - G_{jmin}) / 2$) y A es la pendiente o sensibilidad al voltaje de cada uno de los canales intercelulares representados.

*Oocito al que se ha referido la polaridad de V_j

ND, no hay dependencia de voltaje.

Tabla 12. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales astrocitarios formados por conexina Cx30 con Cx43 o los mutantes de paraparesia espástica en combinación homotípica, heterotípica y heteromérica.

		$V_j (-)$					$V_j (+)$				
		G_{max}	G_{min}	$A(mV^{-1})$	z	$V_0(mV)$	G_{max}	G_{min}	$A(mV^{-1})$	z	$V_0(mV)$
Cx30-	1ªBoltz	0.99	0.36	0.36	9.09	-45.57	0.99	0.36	0.23	5.88	46.98
Cx30	2ªBoltz	0.38	0.12	0.02	0.50	-99.99	0.39	0.12	0.03	0.76	98.13
(Cx43+Cx30)-(Cx43+Cx30)		1.00	0.21	0.08	2.02	-70.97	0.98	0.23	0.08	2.02	78.29
(Cx30+R148Q)-	1ªBoltz	0.99	0.24	0.25	6.31	-48.09	0.98	0.13	0.18	4.54	51.99
(Cx30+R148Q)	2ªBoltz	0.29	0.14	0.07	1.76	-88.13	0.30	0.03	0.03	0.76	83.16
Cx30+V85M) -	1ªBoltz	0.99	0.29	0.28	7.07	-47.49	0.98	0.21	0.20	5.05	50.24
(Cx30+V85M)	2ªBoltz	0.24	0.13	0.05	1.26	-76.24	0.34	0.09	0.02	0.50	81.23

La dependencia de voltaje de los canales intercelulares se calculó a partir de la curva G_j/V_j donde los valores de G_{jss} se ajustaron a la ecuación Boltzmann que se indica en la Tabla 11.

Tabla 13. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales heterotípicos oligodendroastrocitarios formados por conexina Cx47 y Cx43 o los mutantes de paraparesia espástica en combinación homomérica y heteromérica.

	$V_j (-)$					$V_j (+)$				
	G_{max}	G_{min}	$A(mV^{-1})$	z	$V_0(mV)$	G_{max}	G_{min}	$A(mV^{-1})$	z	$V_0(mV)$
Cx47 - Cx47	1.00	0.20	0.10	2.53	-74.77	0.98	0.11	0.06	1.52	78.25
*Cx47 - Cx43	0.99	0.12	0.10	2.53	-66.8	1.00	0.12	0.11	2.78	53.52
*Cx47-V85M	1.22	0.26	0.06	1.52	-42.59	ND	ND	ND	ND	ND
*Cx47 - (Cx43 + R148Q)	1.02	0.12	0.13	3.28	-62.62	0.99	0.13	0.11	2.78	53.04
*Cx47 - (Cx43 + V85M)	1.01	0.08	0.11	2.78	-64.14	0.97	0.14	0.12	3.03	52.64

La dependencia de voltaje de los canales intercelulares se calculó según la curva de la conductancia normalizada respecto al voltaje (G_j/V_j) ajustando el valor de estado (G_{jss}) a la ecuación Boltzmann indicada en la Tabla 11.

*Oocito al que se ha referido la polaridad de V_j

ND, no hay dependencia de voltaje.

V. DISCUSIÓN

Con la finalidad de esclarecer los mecanismos patogénicos a través de los cuales las mutaciones dominantes en la Cx43 astrocitaria producen la destrucción de la mielina en los pacientes con paraparesia espástica, en una primera etapa de este trabajo se identificaron dos mutaciones en heterocigosis en el gen *GJA1*, pR148Q y pV85M, en dos familias en las que la paraparesia espástica segregaba con el síndrome de displasia oculodentodigital (ODDD) y posteriormente, se realizó su ensayo funcional. En dicho ensayo *in vitro* se determinó que en comparación con la Cx43 silvestre los niveles de expresión total y en membrana de la Cx43 portando la mutación p.V85M, pero no la mutación R148Q, están reducidos a la mitad por estar incrementada su tasa de degradación por la vía lisosomal. Ambos mutantes fueron capaces de formar hemicanales funcionales homoméricos, y probablemente también heteroméricos con la Cx43WT, con unas propiedades de regulación por el potencial de membrana y una dependencia de los cationes divalentes extracelulares superponibles a la de los hemicanales silvestres de Cx43. Ninguna de las dos mutaciones interfirió con el proceso de unión de los hemicanales para formar los canales intercelulares completos, sin embargo, los canales que formaron no fueron funcionales; en los experimentos que simulan la condición de heterocigosis de los pacientes, las Cx43 mutadas ejercieron un potente efecto de inhibición sobre la funcionalidad de los canales de Cx43 silvestres expresados exógenamente en pares de oocitos o endógenamente en una línea primaria de astrocitos humanos, reduciendo el grado de acoplamiento intercelular a niveles residuales; dicho efecto de inhibición dominante no se había observado sobre el nivel de expresión de proteína total y en la superficie celular, ni a nivel de corrientes de hemicanal. Respecto al efecto de las mutaciones sobre la otra conexina astrocitaria, la conexina-30, los experimentos realizados mostraron que ni la Cx43 silvestre, ni las mutadas fueron capaces de combinarse funcionalmente con la Cx30, y que cuando se expresan juntas, la Cx43WT y la Cx43V85M, pero no la Cx43R148Q, produjeron un efecto de transdominancia negativa sobre la expresión y el acoplamiento inducido por la Cx30. En relación con las interacciones de los mutantes astrocitarios de Cx43 con la Cx47 oligodendrocitaria, encontramos que, aun cuando los ambos hemicanales de Cx43 mutada fueron capaces de unirse a los hemicanales de Cx47, los canales resultantes o no fueron funcionales como ocurrió en el caso de la Cx43R148Q o inducen niveles de acoplamiento eléctrico muy bajos con propiedades aberrantes, y que en los experimentos de co-expresión con la Cx43WT ambas mutaciones produjeron un potente efecto de inhibición dominante sobre el grado de acoplamiento astrocitario-oligodendrocitario mediado por los canales Cx43-Cx47. En resumen, los resultados de ensayo funcional indican que el principal efecto de las dos mutaciones es la supresión casi completa del acoplamiento intercelular mediado por los canales astrocitarios de Cx43 y por los canales de Cx43 astrocitaria con Cx47 oligodendrocitaria, que ocurre como consecuencia del potente efecto de inhibición dominante que ejercen las subunidades Cx43R148Q y Cx43V85M sobre la funcionalidad de los canales de Cx43 silvestre.

6.1 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LAS MUTACIONES DE ODDD ASOCIADAS A PARAPARESIA ESPÁSTICA

En el análisis genético identificamos dos mutaciones en heterocigosis en el gen *GJA1* en dos familias españolas que cursan con un fenotipo clínico de ODDD y paraparesia espástica no asociadas previamente a alteraciones neurológicas. La mutación p.V85M, descrita con anterioridad en un único caso de ODDD sin fenotipo detallado, segrega con la clínica que incluye sindactilia y paraparesia espástica en las tres generaciones estudiadas indicando un patrón de herencia autosómico dominante (Fenwick, Richardson et al. 2008). Existen, en cambio, cinco casos publicados de pacientes de ODDD que portan la mutación p.R148Q (Richardson, Donnai et al. 2004; Fenwick, Richardson et al. 2008; Paznekas, Karczeski et al. 2009). En ninguno de ellos se especifica la clínica de los pacientes ni si cursa o no con paraparesia espástica y sólo en 2 de ellos hacen referencia al tipo de herencia clasificándolos como enfermedad familiar por haber estudiado la mutación en 2 y 3 generaciones en cada caso. Al margen de estos estudios, el hecho de identificar la misma mutación en seis familias aparentemente no relacionadas sugiere que se trata de un residuo con una alta frecuencia de mutaciones, también conocido como sitio o región "hot spot".

La mutación p.V85M se localiza, según la única conexina cristalizada hasta la fecha, en el segundo dominio transmembrana (TM2) que junto con el dominio TM1 forman parte del interior de la pared del poro del canal. (Maeda, Nakagawa et al. 2009). En concreto, en base a los experimentos realizados con el mutante V84L de Cx26 se ha propuesto que el dominio TM2 juega un papel importante en la permosselectividad de los canales de conexina. En este estudio, Beltramello y colaboradores analizan la permosselectividad metabólica y los registros de actividad unitaria en cultivos de células HeLa transfectados transitoriamente y observan que el cambio de valina por leucina en la posición 84 en esta conexina a pesar de mantener el mismo nivel de conductancia unitaria y acoplamiento por colorante (Lucifer Yellow) que los canales de Cx26WT bloquea el acoplamiento metabólico mediado por Ins (1,4,5)P₃ (Beltramello, Piazza et al. 2005). Sin embargo, el cambio de valina por metionina en la posición 85 de la Cx43 no es equivalente al mutante Cx26V84L ya que además de no observar en ningún caso difusión de colorante en cultivo de células N2a transfectadas con el mutante, no se registraron corrientes intercelulares en los experimentos de acoplamiento eléctrico con oocitos.

La mutación p.R148Q, se localiza en el asa citoplasmática (CL) de la Cx43 (Zhou, Yang et al. 2007; Zhou, Yang et al. 2009) y parece tener un papel importante en la regulación mediada por calcio de los mecanismos de compuerta del canal. Dentro de este dominio se ha descrito una región acotada entre los aminoácidos 136-158 de Cx43 que a altas concentraciones de calcio interacciona directamente con la calmodulina (CAM) y a falta de definir el mecanismo exacto de acción, bloquea la apertura de los canales desencadenando la inhibición del acoplamiento entre células adyacentes (Lurtz and Louis 2007; Zhou,

Yang et al. 2007; De Vuyst, Wang et al. 2009; Myllykoski, Kuczera et al. 2009; Chen, Zhou et al. 2011)). Un estudio realizado en células HeLa transfectadas con Cx43WT y con el doble mutante Cx43_{K146E,R148E} mostró que estos dos cambios en el asa citoplasmática permitían el acoplamiento intercelular en presencia de CAM y elevado $[Ca^{2+}]_i$; a diferencia de los cultivos que expresaban la conexina silvestre (Zhou, Yang et al. 2007). Sin embargo, aunque estos datos sugieran que el residuo R148 es importante en la unión a calmodulina en nuestros experimentos observamos ausencia de acoplamiento entre células adyacentes o pares de oocitos que expresan el mutante Cx43R148Q a diferencia del doble mutante indicando la necesidad de realizar más experimentos que confirmen el papel de la mutación aislada sobre la regulación de los mecanismos de compuerta de la Cx43 mediada por calcio intracelular.

Se han descrito en total 24 mutaciones en heterocigosis distribuidas a lo largo de todo el gen *GJA1* asociadas a espasticidad, hipomielinización o hiperreflexia. (Tabla 5). Casi todas ellas se analizaron en un trabajo reciente en el que se intentó correlacionar sin éxito la localización, funcionalidad y/o efecto de inhibición dominante de los mutantes descritos con la aparición de alteraciones neurológicas sugiriendo la necesidad de estudios funcionales adicionales que permitieran establecer el mecanismo patogénico de la desmielinización causada por mutaciones en la Cx43.

6.2 SÍNTESIS Y FUNCIONALIDAD DE LOS HEMICANALES MUTADOS

El análisis de los hemcanales de Cx43WT mutantes reveló una dependencia de voltaje más compleja que la descrita previamente caracterizada por un aumento de las corrientes inducido por despolarización en ausencia de cationes divalentes y en presencia de EGTA que puede bloquearse específicamente con agentes bloqueantes como la carbenoxolona (Contreras, Saez et al. 2003; Zu-Cheng 2003; Orellana, Diaz et al. 2011; Hansen, Ye et al. 2014; Calder, Rhett et al. 2015). Al igual que la Cx43WT, el mutante Cx43R148Q además de procesarse de forma similar es capaz de formar hemcanales con unas propiedades de regulación por voltaje y por cationes divalentes indistinguibles de las propiedades de los hemcanales de la conexina silvestre. Por otra parte, el mutante V85M presenta, una vez normalizado su nivel de expresión con el porcentaje que llega a membrana, un valor de conductancia total del hemcanal similar al de la conexina silvestre sin encontrar tampoco diferencias en las propiedades electrofisiológicas de los hemcanales mutantes con respecto a los de la Cx43.

Los experimentos realizados con CQ, un agente inhibidor de la vía de degradación lisosomal indican que el porcentaje de Cx43V85M degradado a través de este mecanismo en 24h es el doble que en el caso de la Cx43WT a diferencia del mutante Cx43R148 donde observamos una reducción de la degradación vía lisosomal. Estos resultados sugieren que la reducción del nivel de expresión en superficie celular en el caso de la Cx43V85M se debe un aumento en la degradación vía lisosomal. En el caso del mutante Cx43R148Q, donde apenas hay efecto de acumulación de proteína tras la incubación

con CQ aun cuando el nivel de expresión en superficie celular es similar al de la proteína silvestre, podría ocurrir que la vía de degradación estuviera aumentada o bien que la síntesis del mutante estuviera disminuida, sin embargo serían necesarios más experimentos para poder llegar a una conclusión.

Los estudios publicados de otros mutantes asociados a alteraciones neurológicas (Tabla 5) muestran heterogeneidad en cuanto a la funcionalidad de los hemicanales mutantes ya que hay mutantes como el G138R que tiene incrementada su actividad y otros como Y17S, G21R o A40V que presentan una reducción parcial o total de su función (Lai, Le et al. 2006; Dobrowolski, Sasse et al. 2008). Estos datos dejan sin resolver, por lo tanto, el papel específico de los hemicanales de Cx43 astrocitarios en el mecanismo patogénico que causa la paraparesia espástica.

6.3 COMUNICACIÓN ASTROCITARIA. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE EL ACOPLAMIENTO MEDIADO POR Cx43 Y POR Cx30.

Al igual que lo publicado (Bukauskas, Bukauskiene et al. 2001; Chen-Izu, Moreno et al. 2001) nuestros resultados indican que la apertura y/o cierre los canales homotípicos homoméricos de Cx43 es dependiente del voltaje intercelular que viene dado por la diferencia de voltaje entre el interior de una célula y el interior de la célula adyacente ($V_j = V_{m1} - V_{m2}$). Este tipo de regulación implica dos mecanismos de compuerta en cada hemicanal, uno rápido y otro lento, que median las transiciones entre los diferentes estados de conductancia. El componente rápido (<1 ms) podría explicar las transiciones del hemicanal entre el estado abierto (≈ 220 pS) y un subestado de conductancia (≈ 75 pS) mientras que el componente lento (>5 ms) explicaría el mecanismo de compuerta que media las transiciones del estado abierto al cerrado. En el caso de la Cx43 los mecanismos de compuerta actúan con polaridad opuesta ya que el componente que media las transiciones entre el estado abierto y un subestado de baja conductancia, que en la literatura se conoce como mecanismo rápido de V_j y es más sensible a voltaje, aparece cuando la polaridad es positiva en uno de los hemicanales mientras que el mecanismo lento se da cuando la polaridad es negativa (Oh, Rubin et al. 1999; Contreras, Saez et al. 2003).

En relación a los mutantes, los registros obtenidos de la coexpresión de V85M y Cx43 muestran, a diferencia de los canales heteroméricos de R148Q no acoplados, unas propiedades de regulación por voltaje diferentes a las de los canales homotípicos homoméricos de la proteína silvestre. Estas nuevas propiedades electrofisiológicas se caracterizan por un comportamiento bifásico en el que a tiempos cortos (≈ 500 ms) se alcanza la G_{jmin} y a tiempos largos (5 s) aumenta la G_j de forma que llega a un valor máximo sin llegar a alcanzar un valor de estado. Existe en la literatura un mutante en Cx50 que muestra un comportamiento similar al del mutante V85M cuando se combina de forma heterotípica con la Cx43. La Cx50 presenta al igual que la Cx43 dos mecanismos de compuerta que actúan con la polaridad opuesta. En el caso del mutante de Cx50, localizado también en el segundo dominio transmembrana de

la proteína, observan que la probabilidad de apertura de los canales heterotípicos Cx50/V79L está muy reducida y que las propiedades de regulación por voltaje de los canales son diferentes a las de los canales homotípicos de Cx50. Los experimentos de doble fijación de voltaje donde aplican pulsos de ± 100 mV, con $V_j = 0$, muestran que, al igual que V85M, cuando al mutante se le aplican pulsos positivos la corriente registrada aumenta a tiempos largos (8 s) sin llegar a alcanzar un valor de estado. En el mismo trabajo indican que este hecho podría explicarse con los registros de actividad unitaria del canal donde observan que la transición entre el estado abierto y el estado de subconductancia del canal está abolida (Rubinos, Villone et al. 2014) de manera que sólo sería funcional el mecanismo de compuerta lento que media la transición entre el estado abierto y el estado cerrado. A pesar de no haber registrado la conductancia unitaria del mutante V85M, estos datos sugieren, dada la similitud de los registros y la proximidad del aminoácido mutado dentro del segundo dominio transmembrana, que la dependencia de voltaje del mutante V85M podría deberse a la presencia de un único mecanismo de compuerta que media las transiciones lentas entre el estado abierto y cerrado del canal.

Además de las propiedades de regulación por voltaje analizamos el acoplamiento eléctrico y por colorante de los canales intercelulares silvestres y mutantes. Nuestros resultados en tres sistemas *in vitro* diferentes muestran, al simular la condición heterocigota de los pacientes, ambos mutantes ejercen un marcado efecto de inhibición dominante sobre el acoplamiento de los canales homotípicos de Cx43 y que dicho efecto coincide con el observado en otros ensayos funcionales realizados con mutantes que también causan ODDD y alteraciones neurológicas (Tabla 5) en los que se observa reducción o eliminación por completo del acoplamiento mediado por Cx43 (Shibayama, Paznekas et al. 2005; Lai, Le et al. 2006; Churko, Shao et al. 2011; Garcia, Maripillan et al. 2015) (Tabla 1, Introducción) . Esta potente inhibición del 98% sobre el acoplamiento de Cx43 que ejerce el mutante V85M y del 90% que ejerce el R148Q podría ser dependiente del número subunidades mutadas que componen el canal intercelular (Figura 36). Si consideramos que la probabilidad de incorporar una subunidad mutada o no mutada son eventos independientes, la probabilidad de que se forme un canal intercelular con al menos con una subunidad mutada es de 12/4096, que teniendo en cuenta el número total de combinaciones posibles correspondería al 0.3%. Este porcentaje es similar al porcentaje de acoplamiento de los mutantes con respecto a la conductancia intercelular de los canales homotípicos homoméricos de Cx43 silvestre sugiriendo que la presencia de más de una subunidad mutada en alguno de los dos hemicanales que conforman el canal sería suficiente para abolir por completo el acoplamiento intercelular.

Es bien conocido que los astrocitos expresan además de la Cx43, la Cx30 (Dermietzel, Traub et al. 1989; Dahl, Manthey et al. 1996; Nagy, Patel et al. 1999; Rash, Yasumura et al. 2001; Altevogt and Paul 2004; Levit, Sellitto et al. 2015) y como se han descrito algunos mutantes que ejercen efecto de transdominancia sobre otras conexinas como la mutación p.R33X sobre Cx37 y Cx40 (Huang, Shao et al.

2013), analizamos el efecto de Cx43R148Q y CxV85M sobre el acoplamiento mediado por Cx30. Previamente fue necesaria la realización de varios experimentos con el objetivo de esclarecer la compatibilidad entre Cx43 y Cx30 poco estudiada hasta la fecha y con resultados contradictorios (Manthey, Banach et al. 2001; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007).

Algunos autores proponen que la Cx43 además de formar canales homoméricos homotípicos es capaz de formar canales homéricos o heterotípicos con la Cx30. Sin embargo la compatibilidad entre la Cx43 y la Cx30 es controvertida (Liu, Tarle et al. 1993; Elfgang, Eckert et al. 1995; Altevogt and Paul 2004; Orthmann-Murphy, Freidin et al. 2007; Jara, Acuna et al. 2012). El primer trabajo publicado acerca de la interacción entre Cx30 y Cx43 fue el de Altevogt y colaboradores. En este trabajo utilizaban inmunofluorescencia sobre secciones semi-finas de médula espinal de ratones adultos con el objetivo de identificar la colocalización entre las diferentes conexinas astrocitarias y oligodendrocitarias. El resultado de este análisis reveló colocalización de Cx30 con Cx43, sin embargo, no se caracterizaron funcionalmente los canales heterotípicos/heteroméricos identificados. Tres años más tarde, Orthmann-Murphy y colaboradores publicaron otro estudio que demostraba en células N2a transfectadas mediante inmunocitoquímica y experimentos de doble fijación de voltaje que la Cx43 no era heterotípicamente compatible con la Cx30 ya que ni formaban placas en hendidura, ni estaban acopladas eléctricamente. Nuestros estudios indican que a pesar de que la Cx43 colocalice con la Cx30 no se forman placas heterotípicas ni homotípicas heteroméricas (Figura 24). Estos resultados se confirman con los estudios funcionales realizados donde no encontramos ni acoplamiento por colorante (PI y CF) ni acoplamiento eléctrico en ninguno de los pares heterotípicos analizados empleando dos sistemas *in vitro* diferentes. Además al analizar las propiedades de regulación por voltaje de los oocitos que coexpresaban Cx43 y Cx30 encontramos una dependencia de voltaje idéntica a los oocitos que expresaban Cx43. Este resultado, junto con los obtenidos tras la inmunocitoquímica de los pares heteroméricos heterotípicos nos indica que, en contra de lo publicado con anterioridad, la Cx43 no forma ni canales heteroméricos ni canales heterotípicos con la Cx30. La colocalización de Cx30 y Cx43 que vemos, también descrita por Altevogt y colaboradores, probablemente está limitada por la resolución de las técnicas empleadas. Según la estructura de la Cx26, la única cristalografiada hasta la fecha, el canal completo de conexina mediría de largo aproximadamente 135 Å que equivale a 0.0135 µm y de diámetro 0.004 µm. El límite de resolución del microscopio confocal empleado en nuestro trabajo es de 0.01µm, menor que las secciones semifinas empleadas por Altevogt (>1 µm), por lo tanto, ninguna de estas técnicas permite discriminar entre un canal heteromérico o heterotípico y dos canales homoméricos homotípicos superpuestos en las diferentes secciones analizadas (Maeda, Nakagawa et al. 2009).








		1/64	6/64	15/64	20/64	15/64	6/64	1/64
1/64		0.02 %	0.3 %	0.7 %	1 %	0.7 %	0.3 %	0.05 %
6/64			0.9 %	4.4 %	5.9 %	4.4 %	1.8 %	0.03 %
15/64				5.5 %	14.6 %	11 %	4.4 %	0.7 %
20/64					9.8 %	14.6 %	5.6 %	1 %
15/64						5.5 %	4.4 %	0.7 %
6/64							0.01 %	0.3 %
1/64								0.02 %

Figura 36. Probabilidad expresada en porcentaje de las diferentes combinaciones entre subunidades de hemicanales mutados y no mutados.

Además de demostrar que la Cx43 y la Cx30 no son compatibles, nuestros resultados, realizados en dos sistemas *in vitro* diferentes (oocitos y N2a), mostraron que la expresión de Cx30 es inversamente proporcional a la expresión de Cx43 y que esta relación es dosis dependiente y no se revierte completamente con cloroquina, lo que quiere decir que no podemos confirmar que la modulación de Cx43 sobre Cx30 ocurra a nivel de degradación vía lisosomal. Este efecto de la Cx43 sobre la expresión de otras conexinas se había descrito con anterioridad en cristalino (Banerjee, Das et al. 2011). Empleando una línea inmortalizada de células de cristalino de conejo que expresa tres conexinas diferentes, Cx43, Cx46 y Cx50, Banerjee y colaboradores observaron una transregulación recíproca entre la Cx43 y la Cx46. Los experimentos demostraron que en presencia de ARNs de interferencia que bloquean de forma específica la síntesis de Cx43, se producía un aumento de los niveles de expresión de Cx46 mientras que la sobre-expresión de Cx46 inducía una mayor tasa de degradación vía proteosoma de Cx43. Un trabajo realizado en un modelo *in vivo* en el que describen un aumento de la expresión de Cx30 en ratones deficientes para Cx43 (Theis, Jauch et al. 2003) apoya de forma específica los resultados de la transregulación de Cx43 específica sobre Cx30.

Una vez que confirmamos las interacciones presentes entre Cx43 y Cx30, estudiamos el efecto de los mutantes sobre la comunicación astrocitaria. La interacción de mutantes en trans con otras conexinas de forma que inhiben el acoplamiento se ha descrito previamente. Un ejemplo son las mutaciones de Cx26 asociadas al síndrome de queratitis ictiosis y sordera que inhiben el acoplamiento de Cx43 o la mutación p.R33X que ejerce un efecto sobre Cx37 y Cx40 (Huang, Shao et al. 2013; Garcia, Maripillan et al. 2015). Sin embargo, nuestros resultados inmunocitoquímicos y electrofisiológicos indican que ninguno de los dos mutantes interaccionan con la Cx30 para formar canales heteroméricos y que no inhiben por tanto el acoplamiento ni modifican las propiedades de regulación por voltaje de los canales homotípicos homoméricos de Cx30. En cuanto a la regulación de la expresión, al coexpresar el mutante V85M, a pesar de expresarse menos que la Cx43, se observaba un efecto sobre la expresión de Cx30 similar al observado con la conexina silvestre mientras que al coexpresar Cx30 con R148Q el efecto desaparecía.

Además de los experimentos realizados se intentó analizar el efecto neto de los mutantes sobre ambas conexinas, Cx43 y Cx30 en un cultivo primarios de astrocitos humanos, aun así tras la caracterización molecular de las células observamos que éstas únicamente expresaban Cx43 y no Cx30. Este resultado coincide con lo anteriormente publicado en cultivos primarios de astrocitos de ratón donde observan que a diferencia de la Cx43, la Cx30 sólo se expresa a tiempos largos de cultivo, unas dos semanas (Dermietzel, Gao et al. 2000), sin embargo, no se llegó a detectar Cx30 en ningún momento en nuestras células cultivadas durante aproximadamente 4 semanas.

En resumen, a la luz de estos resultados (Tabla 14), podemos suponer que a pesar de no interactuar directamente en la formación de canales con la Cx30, ambos mutantes ejercen un efecto neto diferente sobre el acoplamiento mediado por esta conexina ya que en el caso de R148Q el nivel de expresión de Cx30 estará incrementado. Los datos de regulación de la expresión junto con el efecto de inhibición dominante similar sobre el acoplamiento de Cx43 implican un bloqueo de la comunicación astrocitaria mayor en el mutante V85M comparado que en el mutante R148Q.

6.4 COMUNICACIÓN OLIGODENDROASTROCITARIA. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE EL ACOPLAMIENTO MEDIADO POR Cx43-Cx47.

El acoplamiento oligodendroastrocitario en el que participa la Cx43 está mediado por canales heterotípicos de Cx43-Cx47 (Magnotti, Goodenough et al. 2011). La Cx47 presenta dos codones de inicio alternativos que pueden dar lugar a dos proteínas de 436 o de 439 aa. En base a los datos publicados que muestran un alto grado de conservación de los tres primeros residuos (Met-Thr-Asn) y a los experimentos realizados en nuestro laboratorio en los que se estudiaron las propiedades electrofisiológicas de ambas proteínas solas y en combinación con otras conexinas oligodendrocitarias y astrocitarias concluimos que la Cx47 es una proteína de 439 aa que incluye la secuencia Met-Thr-Asn en su extremo amino terminal y será con esta proteína con la que realizaremos todos los experimentos de acoplamiento oligodendroastrocitario (Kim, Gloor et al. 2013)

Nuestros resultados muestran que las propiedades electrofisiológicas de los canales heterotípicos de Cx47-Cx43 se caracterizan por presentar rectificación instantánea (Figura 34). En este tipo de rectificación la amplitud de las corrientes depende de la polaridad de V_j y tiene como consecuencia un aumento progresivo de la conductancia instantánea intercelular a medida que la célula que expresa Cx47 oligodendrocitaria se hiperpolariza respecto a la célula que expresa la Cx43 astrocitaria. Esta rectificación, descrita por primera vez en canales heterotípicos de Cx26-Cx32, viene determinada por diferencias en la permeabilidad iónica y/o en la conductancia unitaria de los canales. En el caso de la Cx26 y la Cx32, existen diferencias tanto en la conductancia unitaria como en la permosselectividad. Los canales de Cx26 tienen una conductancia unitaria de 135 μ S y permean mejor los cationes mientras que en los canales de Cx32 se registra una conductancia menor, de 55 μ S y permean mejor los aniones (Barrio, Suchyna et al. 1991; Bukauskas, Elfgang et al. 1995; Suchyna, Nitsche et al. 1999).

Tabla 14. Tipo y grado de disfunción causados por las mutaciones de ODDD ensayadas.

	Cx43/Cx30/Cx47	R148Q	V85M
BIOSÍNTESIS			
Proteína total	SI	SI (=)	SI (↓)
Proteína de membrana	SI	SI (=)	SI (↓)
FUNCIONALIDAD DE LOS HEMICANALES			
Permeabilidad a colorante	SI	SI (=)	SI (↓)
Conductancia eléctrica	SI	SI (=)	SI (↓)
Regulación por Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	SI	SI (=)	SI (=)
Regulación por voltaje	SI	SI (=)	SI (=)
Inhibición dominante	-	NO	NO
ACOPLAMIENTO TIPO ASTROCITO (MEDIADO POR Cx43)			
Uniones en hendidura	SI	SI	SI
Acoplamiento por colorante	SI	SI (↓↓↓)	SI (↓↓↓)
Acoplamiento eléctrico	SI	SI (↓↓↓)	SI (↓↓↓)
Regulación por voltaje	SI	SI (≠)	SI (≠)
Inhibición dominante	-	SI	SI
	Cx30+Cx43	R148Q+Cx30	V85M +Cx30
ACOPLAMIENTO TIPO ASTROCITO (MEDIADO POR Cx30)			
Uniones en hendidura	NO	NO	NO
Acoplamiento por colorante	SI	-	-
Acoplamiento eléctrico	SI	SI	SI (↓)
Regulación por voltaje	SI (= Cx43)	SI (= Cx30)	SI (= Cx30)
Inhibición dominante	-	NO	NO
	Cx47/Cx43	Cx47/R148Q	Cx47/V85M
ACOPLAMIENTO TIPO ASTROCITO-OLIGODENDROCITO (MEDIADO POR Cx47-Cx43)			
Placas	SI	SI	SI
Acoplamiento por colorante	SI	NO	NO
Acoplamiento eléctrico	SI	NO	SI (↓↓↓)
Regulación por voltaje	SI	NO (=Cx43/Cx47)	SI (≠Cx43/Cx47)
Inhibición dominante	-	NO	NO

En cuanto a la Cx47 y Cx43, un estudio realizado hace años de acoplamiento por colorante entre astrocitos y oligodendrocitos en nervio óptico de conejo indicaba que existía un flujo unidireccional de

pequeñas moléculas cargadas que generaban una barrera o filtro entre ambos tipos celulares. En el trabajo empleaban dos colorantes, Lucifer yellow (LY, -2, 443Da) y biotina (+1, 287 Da). En todos los casos observaban difusión de ambos colorantes desde astrocitos hacia oligodendrocitos, sin embargo, en sentido opuesto, de oligodendrocito a astrocito, no encontraron acoplamiento por LY y sólo encontraron difusión de biotina en un 26% (Robinson, Hampson et al. 1993) . La existencia de este filtro o barrera que limita la difusión bidireccional de iones o moléculas cargadas implica el establecimiento de una organización jerárquica dentro del sincitio panglial. Aunque se desconoce el papel fisiológico de este fenómeno, la barrera oligodendroastrocitaria podría ser relevante en el mecanismo de tamponamiento de K^+ a través del sincitio panglial (Rash 2010). La entrada y acumulación de iones K^+ en los oligodendrocitos desde el espacio periaxonal durante la conducción saltatoria tiene como consecuencia la despolarización en este tipo celular. En estas condiciones la difusión de K^+ ocurre gracias al gradiente electroquímico así como a la selectividad positiva de cationes desde los oligodendrocitos hasta los astrocitos.

Se desconoce el efecto que pueden tener otras mutaciones de Cx43 sobre el acoplamiento oligodendroastrocitario. Los resultados de este trabajo (Tabla 14) muestran que nuestros mutantes de Cx43 a pesar de formar placas o uniones en hendidura con la Cx47 generan canales intercelulares no funcionales ya que tanto el acoplamiento por colorante como el acoplamiento eléctrico está abolido prácticamente por completo. Únicamente encontramos baja probabilidad de acoplamiento (<6%) en el caso del mutante V85M con unas propiedades de regulación por voltaje muy similares a las de Cx43-V85M. Además observamos que el acoplamiento eléctrico en los pares que simulan la condición de los pacientes se reduce drásticamente en más del 98% en el caso de la mutación p.V85M y en más del 90% con la mutación p.R148Q. Este efecto tan marcado de inhibición dominante de los mutantes sobre el acoplamiento mediado por Cx43-Cx47 tiene un efecto directo sobre la comunicación entre astrocitos y oligodendrocitos dentro del sincitio panglial de forma que la difusión de los iones y pequeños metabolitos a través de los canales heterotípicos Cx47-Cx43 se ve reducida drásticamente.

En resumen, la interrupción casi por completo de esta comunicación intercelular entre oligodendrocitos y astrocitos podría interferir en la difusión de los iones K^+ que se liberan tras la descarga de un potencial de acción al espacio periaxonal. En esta situación, los iones no podrían difundir desde los oligodendrocitos hacia los astrocitos de forma que aumentaría la concentración de este ión en el interior de los oligodendrocitos provocando despolarización axonal, bloqueo de la conducción saltatoria, acúmulo de agua en el interior de la mielina y finalmente demielinización axonal.

VI. CONCLUSIONES

1. Las dos mutaciones identificadas en heterocigosis en el gen *GJA1*, Cx43V85M y Cx43R148Q, en los pacientes con paraparesia espástica asociada a un fenotipo de displasia oculodentodigital, son de naturaleza patogénica y por tanto las causantes del síndrome.
2. Las mutaciones V85M y R148Q no interfieren con la capacidad de la proteína Cx43 para formar hemicanales en la superficie celular, ni alteran sus propiedades de regulación por los cationes divalentes extracelulares y el potencial de membrana; los hemicanales mutados son también capaces de unirse entre sí para formar canales intercelulares pero estos canales mutados no son funcionales ya que una vez formados no adquieren la conformación de canal abierto.
3. En la condición de heterocigosis de los pacientes, las subunidades mutadas R148Q y V85M son capaces de combinarse con la subunidades silvestres de Cx43 produciendo un potente efecto de inhibición dominante sobre el acoplamiento intercelular inducido por la Cx43 silvestre.
4. Respecto a la interacción de la Cx43 con la otra conexina astrocitaria, la conexina-30, se concluye que ambas conexinas no son capaces de combinarse entre sí para formar canales intercelulares y que la Cx43 ejerce un efecto de transdominancia negativa sobre la expresión y el acoplamiento intercelular inducido por la Cx30. Dicho efecto de transdominancia negativa también ocurre en el caso de la mutación V85M, sin embargo está ausente en el caso de la mutación R148Q.
5. En relación con los canales intercelulares híbridos que se forman entre la Cx43 astrocitaria y la Cx47 oligodendrocitaria, el mutante R148Q no formo canales funcionales con la Cx47 mientras que el mutante V85M indujo unos niveles de acoplamiento intercelular residuales con propiedades aberrantes; en la condición de heterocigosis de los pacientes, la presencia de las Cx43 mutadas produjo un potente efecto de inhibición dominante sobre el acoplamiento intercelular inducido por la Cx43 silvestre con la Cx47 oligodendrocitaria.
6. Estos resultados sugieren que la desmielinización causante de la paraparesia espástica en los pacientes con displasia oculodentodigital podría originarse como consecuencia de la reducción a niveles residuales de la comunicación intercelular entre los astrocitos y entre los astrocitos y los oligodendrocitos, causada por el efecto de inhibición dominante que ejercen las mutaciones sobre la funcionalidad de la Cx43 silvestre; esta vía de comunicación glial participa en el mecanismo de aclaramiento de los iones K^+ , que se acumulan en la región periaxonal internodal de las fibras mielínicas durante la conducción saltatoria, hasta el lecho vascular o al líquido cefalorraquídeo, y su supresión podría originar un incremento anormal en la concentración periaxonal de K^+ , despolarización axonal, bloqueo de la conducción, edema y finalmente, degeneración de la mielina.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abascal, F. and R. Zardoya (2013). "Evolutionary analyses of gap junction protein families." Biochim Biophys Acta **1828**(1): 4-14.
- Abrams, C. K. and M. Freidin (2015). "GJB1-associated X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, a disorder affecting the central and peripheral nervous systems." Cell Tissue Res **360**(3): 659-673.
- Abrams, C. K. and S. S. Scherer (2012). "Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system." Biochim Biophys Acta **1818**(8): 2030-2047.
- Altevogt, B. M., K. A. Kleopa, et al. (2002). "Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems." J Neurosci **22**(15): 6458-6470.
- Altevogt, B. M. and D. L. Paul (2004). "Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS." J Neurosci **24**(18): 4313-4323.
- Balice-Gordon, R. J., L. J. Bone, et al. (1998). "Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath." J Cell Biol **142**(4): 1095-1104.
- Banerjee, D., S. Das, et al. (2011). "Investigation of the reciprocal relationship between the expression of two gap junction connexin proteins, connexin46 and connexin43." J Biol Chem **286**(27): 24519-24533.
- Barrio, L. C., T. Suchyna, et al. (1991). "Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8410-8414.
- Beltramello, M., V. Piazza, et al. (2005). "Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness." Nat Cell Biol **7**(1): 63-69.
- Bergoffen, J., S. S. Scherer, et al. (1993). "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Science **262**(5142): 2039-2042.
- Britz-Cunningham, S. H., M. M. Shah, et al. (1995). "Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality." N Engl J Med **332**(20): 1323-1329.
- Bruzzone, S., L. Guida, et al. (2001). "Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells." FASEB J **15**(1): 10-12.
- Bugiani, M., S. Al Shahwan, et al. (2006). "GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy." Neurology **67**(2): 273-279.
- Bukauskas, F. F., A. Bukauskiene, et al. (2001). "Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin43 fused with green fluorescent protein." Biophys J **81**(1): 137-152.
- Bukauskas, F. F., C. Elfgang, et al. (1995). "Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance." Pflugers Arch **429**(6): 870-872.

- Calder, B. W., J. M. Rhatt, et al. (2015). "Inhibition of Connexin 43 Hemichannel-Mediated ATP Release Attenuates Early Inflammation During the Foreign Body Response." Tissue Engineering Part A **21**(11-12): 1752-1762.
- Connors, B. W. and M. A. Long (2004). "Electrical synapses in the mammalian brain." Annu Rev Neurosci **27**: 393-418.
- Contreras, J. E., J. C. Saez, et al. (2003). "Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11388-11393.
- Chen-Izu, Y., A. P. Moreno, et al. (2001). "Opposing gates model for voltage gating of gap junction channels." Am J Physiol Cell Physiol **281**(5): C1604-1613.
- Chen, P., L. J. Xie, et al. (2005). "Mutations of connexin43 in fetuses with congenital heart malformations." Chin Med J (Engl) **118**(12): 971-976.
- Chen, Y., Y. Zhou, et al. (2011). "Molecular interaction and functional regulation of connexin50 gap junctions by calmodulin." Biochemical Journal **435**(3): 711-722.
- Chever, O., C. Y. Lee, et al. (2014). "Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission." J Neurosci **34**(34): 11228-11232.
- Chtchetinin, J., W. D. Gifford, et al. (2009). "Tyrosine-dependent basolateral targeting of human connexin43-eYFP in Madin-Darby canine kidney cells can be disrupted by the oculodentodigital dysplasia mutation L90V." FEBS J **276**(23): 6992-7005.
- Churko, J. M., S. Langlois, et al. (2010). "The potency of the fs260 connexin43 mutant to impair keratinocyte differentiation is distinct from other disease-linked connexin43 mutants." Biochem J **429**(3): 473-483.
- Churko, J. M., Q. Shao, et al. (2011). "Human dermal fibroblasts derived from oculodentodigital dysplasia patients suggest that patients may have wound-healing defects." Hum Mutat **32**(4): 456-466.
- Dahl, E., D. Manthey, et al. (1996). "Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin." J Biol Chem **271**(30): 17903-17910.
- Dasgupta, C., A. M. Martinez, et al. (2001). "Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)." Mutat Res **479**(1-2): 173-186.
- David, G., J. N. Barrett, et al. (1992). "Evidence that action potentials activate an internodal potassium conductance in lizard myelinated axons." J Physiol **445**: 277-301.
- David, G., J. N. Barrett, et al. (1993). "Activation of internodal potassium conductance in rat myelinated axons." J Physiol **472**: 177-202.
- Dbouk, H. A., R. M. Mroue, et al. (2009). "Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels." Cell Commun Signal **7**: 4.

- De Bock, M., M. Kerrebrouck, et al. (2013). "Neurological manifestations of oculodentodigital dysplasia: a Cx43 channelopathy of the central nervous system?" Front Pharmacol **4**: 120.
- De Bock, M., R. E. Vandebroucke, et al. (2014). "A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins?" FEBS Lett **588**(8): 1259-1270.
- de la Parra, D. R. and J. C. Zenteno (2007). "A new GJA1 (connexin 43) mutation causing oculodentodigital dysplasia associated to uncommon features." Ophthalmic Genet **28**(4): 198-202.
- De Vuyst, E., N. Wang, et al. (2009). "Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells." Cell Calcium **46**(3): 176-187.
- Debeer, P., H. Van Esch, et al. (2005). "Novel GJA1 mutations in patients with oculo-dento-digital dysplasia (ODDD)." Eur J Med Genet **48**(4): 377-387.
- Delmar, M. (2004). "Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels." Cardiovasc Res **62**(2): 268-275.
- Depienne, C., M. Bugiani, et al. (2013). "Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study." Lancet Neurol **12**(7): 659-668.
- Dere, E., M. A. De Souza-Silva, et al. (2003). "Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes." Eur J Neurosci **18**(3): 629-638.
- Dermietzel, R., Y. Gao, et al. (2000). "Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 45-56.
- Dermietzel, R., O. Traub, et al. (1989). "Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10148-10152.
- Diez, J. A., S. Ahmad, et al. (1999). "Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions." Eur J Biochem **262**(1): 142-148.
- Dobrowolski, R., P. Sasse, et al. (2008). "The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans." Hum Mol Genet **17**(4): 539-554.
- Dringen, R., G. M. Bishop, et al. (2007). "The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain." Neurochem Res **32**(11): 1884-1890.
- Ebihara, L. and E. Steiner (1993). "Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes." J Gen Physiol **102**(1): 59-74.
- Eghbali, B., J. A. Kessler, et al. (1991). "Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10701-10705.
- Eiberger, J., M. Kibschull, et al. (2006). "Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice." Glia **53**(6): 601-611.

- Elfang, C., R. Eckert, et al. (1995). "Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells." J Cell Biol **129**(3): 805-817.
- Falk, M. M., L. K. Buehler, et al. (1997). "Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels." EMBO J **16**(10): 2703-2716.
- Fasciani, I., A. Temperan, et al. (2013). "Regulation of connexin hemichannel activity by membrane potential and the extracellular calcium in health and disease." Neuropharmacology **75**: 479-490.
- Feller, L., N. H. Wood, et al. (2008). "Report of a black South African child with oculodentodigital dysplasia and a novel *GJA1* gene mutation." Am J Med Genet A **146A**(10): 1350-1353.
- Fenwick, A., R. J. Richardson, et al. (2008). "Novel mutations in *GJA1* cause oculodentodigital syndrome." J Dent Res **87**(11): 1021-1026.
- Fishman, G. I., A. P. Moreno, et al. (1991). "Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3525-3529.
- Flenniken, A. M., L. R. Osborne, et al. (2005). "A *GJA1* missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia." Development **132**(19): 4375-4386.
- Furuta, N., M. Ikeda, et al. (2012). "A novel *GJA1* mutation in oculodentodigital dysplasia with progressive spastic paraplegia and sensory deficits." Intern Med **51**(1): 93-98.
- Garcia, I. E., J. Maripillan, et al. (2015). "Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome-associated Cx26 mutants produce nonfunctional gap junctions but hyperactive hemichannels when co-expressed with wild type Cx43." J Invest Dermatol **135**(5): 1338-1347.
- Goldberg, G. S., V. Valiunas, et al. (2004). "Selective permeability of gap junction channels." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 96-101.
- Gong, X. Q., Q. Shao, et al. (2007). "Differential potency of dominant negative connexin43 mutants in oculodentodigital dysplasia." J Biol Chem **282**(26): 19190-19202.
- Gong, X. Q., Q. Shao, et al. (2006). "Functional characterization of a *GJA1* frameshift mutation causing oculodentodigital dysplasia and palmoplantar keratoderma." J Biol Chem **281**(42): 31801-31811.
- Gonzalez, D., J. M. Gomez-Hernandez, et al. (2006). "Species specificity of mammalian connexin-26 to form open voltage-gated hemichannels." FASEB J **20**(13): 2329-2338.
- Gonzalez, D., J. M. Gomez-Hernandez, et al. (2007). "Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 66-106.
- Han, H., M. Myllykoski, et al. (2013). "Myelin-specific proteins: a structurally diverse group of membrane-interacting molecules." Biofactors **39**(3): 233-241.
- Hanemann, C. O., C. Bergmann, et al. (2003). "Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation." Arch Neurol **60**(4): 605-609.

- Hansen, D. B., Z. C. Ye, et al. (2014). "Activation, permeability, and inhibition of astrocytic and neuronal large pore (hemi)channels." J Biol Chem **289**(38): 26058-26073.
- Harris, A. L., D. C. Spray, et al. (1981). "Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance." J Gen Physiol **77**(1): 95-117.
- Henneke, M., S. Gegner, et al. (2010). "Clinical neurophysiology in *GJA12*-related hypomyelination vs Pelizaeus-Merzbacher disease." Neurology **74**(22): 1785-1789.
- Himi, M., T. Fujimaki, et al. (2009). "A case of oculodentodigital dysplasia syndrome with novel *GJA1* gene mutation." Jpn J Ophthalmol **53**(5): 541-545.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1946). "Potassium leakage from an active nerve fibre." Nature **158**: 376.
- Honkaniemi, J., J. P. Kalkkila, et al. (2005). "Letter to the editor: Novel *GJA1* mutation in oculodentodigital dysplasia." Am J Med Genet A **139**(1): 48-49.
- Hu, Y., I. P. Chen, et al. (2013). "A novel autosomal recessive *GJA1* missense mutation linked to Craniometaphyseal dysplasia." PLoS One **8**(8): e73576.
- Huang, T., Q. Shao, et al. (2013). "Autosomal recessive *GJA1* (Cx43) gene mutations cause oculodentodigital dysplasia by distinct mechanisms." J Cell Sci **126**(Pt 13): 2857-2866.
- Inoue, K. (2005). "PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2." Neurogenetics **6**(1): 1-16.
- Iyyathurai, J., J. P. Decuypere, et al. (2016). "Connexins: substrates and regulators of autophagy." BMC Cell Biol **17 Suppl 1**: 20.
- Jamsheer, A., M. Badura-Stronka, et al. (2010). "A severe progressive oculodentodigital dysplasia due to compound heterozygous *GJA1* mutation." Clin Genet **78**(1): 94-97.
- Jamsheer, A., A. Sowinska-Seidler, et al. (2014). "Three novel *GJA1* missense substitutions resulting in oculo-dento-digital dysplasia (ODDD) - further extension of the mutational spectrum." Gene **539**(1): 157-161.
- Janssen-Bienhold, U., K. Schultz, et al. (2001). "Identification and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex." Vis Neurosci **18**(2): 169-178.
- Jara, O., R. Acuna, et al. (2012). "Critical role of the first transmembrane domain of Cx26 in regulating oligomerization and function." Mol Biol Cell **23**(17): 3299-3311.
- Jiang, J. X. and D. A. Goodenough (1996). "Heteromeric connexons in lens gap junction channels." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1287-1291.
- Johnstone, S. R., B. M. Kroncke, et al. (2012). "MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation." Circ Res **111**(2): 201-211.
- Jordan, K., R. Chodock, et al. (2001). "The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization." J Cell Sci **114**(Pt 4): 763-773.

- Kalcheva, N., J. Qu, et al. (2007). "Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis in a murine model of oculodentodigital dysplasia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20512-20516.
- Kamasawa, N., A. Sik, et al. (2005). "Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning." Neuroscience **136**(1): 65-86.
- Kellermayer, R., M. Keller, et al. (2005). "Bigenic connexin mutations in a patient with hidrotic ectodermal dysplasia." Eur J Dermatol **15**(2): 75-79.
- Kelly, S. C., P. Ratajczak, et al. (2006). "A novel GJA 1 mutation in oculo-dento-digital dysplasia with curly hair and hyperkeratosis." Eur J Dermatol **16**(3): 241-245.
- Kim, M. S., G. B. Gloor, et al. (2013). "The distribution and functional properties of Pelizaeus-Merzbacher-like disease-linked Cx47 mutations on Cx47/Cx47 homotypic and Cx47/Cx43 heterotypic gap junctions." Biochem J **452**(2): 249-258.
- Kjaer, K. W., L. Hansen, et al. (2004). "Novel Connexin 43 (GJA1) mutation causes oculo-dento-digital dysplasia with curly hair." Am J Med Genet A **127A**(2): 152-157.
- Kleopa, K. A., J. L. Orthmann, et al. (2004). "Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes." Glia **47**(4): 346-357.
- Koval, M., S. A. Molina, et al. (2014). "Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues." FEBS Lett **588**(8): 1193-1204.
- Kraus, V., R. Srivastava, et al. (2014). "Potassium channel KIR4.1-specific antibodies in children with acquired demyelinating CNS disease." Neurology **82**(6): 470-473.
- Kunzelmann, P., W. Schroder, et al. (1999). "Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes." Glia **25**(2): 111-119.
- Lai, A., D. N. Le, et al. (2006). "Oculodentodigital dysplasia connexin43 mutations result in non-functional connexin hemichannels and gap junctions in C6 glioma cells." J Cell Sci **119**(Pt 3): 532-541.
- Laing, J. G. and E. C. Beyer (1995). "The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway." J Biol Chem **270**(44): 26399-26403.
- Lauf, U., B. N. Giepmans, et al. (2002). "Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10446-10451.
- Levit, N. A., G. Mese, et al. (2012). "Pathological hemichannels associated with human Cx26 mutations causing Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrome." Biochim Biophys Acta **1818**(8): 2014-2019.
- Levit, N. A., C. Sellitto, et al. (2015). "Aberrant connexin26 hemichannels underlying keratitis-ichthyosis-deafness syndrome are potently inhibited by mefloquine." J Invest Dermatol **135**(4): 1033-1042.

- Liang, W. G., C. C. Su, et al. (2011). "Human connexin30.2/31.3 (GJC3) does not form functional gap junction channels but causes enhanced ATP release in HeLa cells." Cell Biochem Biophys **61**(1): 189-197.
- Liu, P., S. A. Tarle, et al. (1993). "Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia." Science **261**(5124): 1041-1044.
- Lurtz, M. M. and C. F. Louis (2007). "Intracellular calcium regulation of connexin43." Am J Physiol Cell Physiol **293**(6): C1806-1813.
- Lutz, S. E., Y. Zhao, et al. (2009). "Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation." J Neurosci **29**(24): 7743-7752.
- Maeda, S., S. Nakagawa, et al. (2009). "Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution." Nature **458**(7238): 597-602.
- Maglione, M., O. Tress, et al. (2010). "Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32." Glia **58**(9): 1104-1117.
- Magnotti, L. M., D. A. Goodenough, et al. (2011). "Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins." Glia **59**(1): 26-34.
- Manthey, D., K. Banach, et al. (2001). "Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels." J Membr Biol **181**(2): 137-148.
- Marichal, N., G. Garcia, et al. (2012). "Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord." Stem Cells **30**(9): 2020-2031.
- Martin E, G. C., Castro C, Kendall JM, Capel J, Campbell AK, Revilla A, Barrio LC, Evans WH. (1998). "Assembly of Chimeric Connexin-Aequorin Proteins into Functional Gap Junction Channels."
- Mathias, R. T., T. W. White, et al. (2010). "Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis." Physiol Rev **90**(1): 179-206.
- Matiello, M., J. L. Schaefer-Klein, et al. (2011). "Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica." Neurology **77**(12): 1149-1155.
- McLachlan, E., I. Plante, et al. (2008). "ODDD-linked Cx43 mutants reduce endogenous Cx43 expression and function in osteoblasts and inhibit late stage differentiation." J Bone Miner Res **23**(6): 928-938.
- Menichella, D. M., D. A. Goodenough, et al. (2003). "Connexins are critical for normal myelination in the CNS." J Neurosci **23**(13): 5963-5973.
- Mert, T. (2007). "Roles of axonal voltage-dependent ion channels in damaged peripheral nerves." Eur J Pharmacol **568**(1-3): 25-30.
- Methfessel (1986). "Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes."

- Musa, F. U., P. Ratajczak, et al. (2009). "Ocular manifestations in oculodentodigital dysplasia resulting from a heterozygous missense mutation (L113P) in *GJA1* (connexin 43)." *Eye (Lond)* **23**(3): 549-555.
- Musil, L. S., B. A. Cunningham, et al. (1990). "Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines." *J Cell Biol* **111**(5 Pt 1): 2077-2088.
- Musil, L. S., A. C. Le, et al. (2000). "Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function." *J Biol Chem* **275**(33): 25207-25215.
- Myllykoski, M., K. Kuczera, et al. (2009). "Complex formation between calmodulin and a peptide from the intracellular loop of the gap junction protein connexin43: Molecular conformation and energetics of binding." *Biophys Chem* **144**(3): 130-135.
- Nagy, J. I., B. D. Lynn, et al. (2011). "Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice." *Eur J Neurosci* **34**(2): 263-271.
- Nagy, J. I., D. Patel, et al. (1999). "Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance." *Neuroscience* **88**(2): 447-468.
- Ochalski, P. A., U. N. Frankenstein, et al. (1997). "Connexin-43 in rat spinal cord: localization in astrocytes and identification of heterotypic astro-oligodendrocytic gap junctions." *Neuroscience* **76**(3): 931-945.
- Odermatt, B., K. Wellershaus, et al. (2003). "Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS." *J Neurosci* **23**(11): 4549-4559.
- Oh, S., J. B. Rubin, et al. (1999). "Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32." *J Gen Physiol* **114**(3): 339-364.
- Orellana, J. A., E. Diaz, et al. (2011). "Cation permeation through connexin 43 hemichannels is cooperative, competitive and saturable with parameters depending on the permeant species." *Biochem Biophys Res Commun* **409**(4): 603-609.
- Orthmann-Murphy, J. L., M. Freidin, et al. (2007). "Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins." *J Neurosci* **27**(51): 13949-13957.
- Orthmann-Murphy, J. L., E. Salsano, et al. (2009). "Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for *GJA12/GJC2* mutations." *Brain* **132**(Pt 2): 426-438.
- Osaka, H., H. Hamanoue, et al. (2010). "Disrupted SOX10 regulation of *GJC2* transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease." *Ann Neurol* **68**(2): 250-254.
- Paznekas, W. A., S. A. Boyadjiev, et al. (2003). "Connexin 43 (*GJA1*) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia." *Am J Hum Genet* **72**(2): 408-418.

- Paznekas, W. A., B. Karczeski, et al. (2009). "GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype." Hum Mutat **30**(5): 724-733.
- Pizarro-Delgado, J., I. Fasciani, et al. (2014). "Inhibition of connexin 36 hemichannels by glucose contributes to the stimulation of insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **306**(12): E1354-1366.
- Pizzuti, A., E. Flex, et al. (2004). "A homozygous GJA1 gene mutation causes a Hallermann-Streiff/ODDD spectrum phenotype." Hum Mutat **23**(3): 286.
- Plotkin, L. I. (2014). "Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells." Front Physiol **5**: 131.
- Rasband, M. N. and E. Peles (2015). "The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance." Cold Spring Harb Perspect Biol **8**(3): a020495.
- Rash, J. E. (2010). "Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system." Neuroscience **168**(4): 982-1008.
- Rash, J. E., H. S. Duffy, et al. (1997). "Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons." J Comp Neurol **388**(2): 265-292.
- Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (1998). "Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord." Cell Biol Int **22**(11-12): 731-749.
- Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (2001). "Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons." J Neurosci **21**(6): 1983-2000.
- Reaume, A. G., P. A. de Sousa, et al. (1995). "Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43." Science **267**(5205): 1831-1834.
- Renier, W. O., F. J. Gabreels, et al. (1981). "Connatal Pelizaeus-Merzbacher disease with congenital stridor in two maternal cousins." Acta Neuropathol **54**(1): 11-17.
- Richardson, R., D. Donnai, et al. (2004). "Expression of GJA1 correlates with the phenotype observed in oculodentodigital syndrome/type III syndactyly." J Med Genet **41**(1): 60-67.
- Richardson, R. J., S. Joss, et al. (2006). "A nonsense mutation in the first transmembrane domain of connexin 43 underlies autosomal recessive oculodentodigital syndrome." J Med Genet **43**(7): e37.
- Robinson, S. R., E. C. Hampson, et al. (1993). "Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia." Science **262**(5136): 1072-1074.

- Roscoe, W., G. I. Veitch, et al. (2005). "Oculodentodigital dysplasia-causing connexin43 mutants are non-functional and exhibit dominant effects on wild-type connexin43." J Biol Chem **280**(12): 11458-11466.
- Rubinos, C., K. Villone, et al. (2014). "Functional effects of Cx50 mutations associated with congenital cataracts." Am J Physiol Cell Physiol **306**(3): C212-220.
- Sargiannidou, I., N. Vavlitou, et al. (2009). "Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects." J Neurosci **29**(15): 4736-4749.
- Scherer, S. S., Y. T. Xu, et al. (1998). "Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy." Glia **24**(1): 8-20.
- Schmitt, S., L. C. Castelvetti, et al. (2015). "Metabolism and functions of lipids in myelin." Biochim Biophys Acta **1851**(8): 999-1005.
- Seidl, A. H. (2014). "Regulation of conduction time along axons." Neuroscience **276**: 126-134.
- Seki, A., W. Coombs, et al. (2004). "Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43." Heart Rhythm **1**(2): 227-233.
- Shao, Q., Q. Liu, et al. (2012). "Structure and functional studies of N-terminal Cx43 mutants linked to oculodentodigital dysplasia." Mol Biol Cell **23**(17): 3312-3321.
- Shibayama, J., W. Paznekas, et al. (2005). "Functional characterization of connexin43 mutations found in patients with oculodentodigital dysplasia." Circ Res **96**(10): e83-91.
- Sohl, G., S. Maxeiner, et al. (2005). "Expression and functions of neuronal gap junctions." Nat Rev Neurosci **6**(3): 191-200.
- Sohl, G., B. Odermatt, et al. (2004). "New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants." Brain Res Brain Res Rev **47**(1-3): 245-259.
- Solan, J. L. and P. D. Lampe (2009). "Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects." Biochem J **419**(2): 261-272.
- Spray, D. C., A. L. Harris, et al. (1981). "Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance." J Gen Physiol **77**(1): 77-93.
- Stauffer, K. A. (1995). "The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels." J Biol Chem **270**(12): 6768-6772.
- Suchyna, T. M., J. M. Nitsche, et al. (1999). "Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels." Biophys J **77**(6): 2968-2987.
- Theis, M., R. Jauch, et al. (2003). "Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43." J Neurosci **23**(3): 766-776.

- Theis, M., D. Speidel, et al. (2004). "Astrocyte cultures from conditional connexin43-deficient mice." Glia **46**(2): 130-141.
- Thomas, M. A., N. Zosso, et al. (2003). "A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover." J Cell Sci **116**(Pt 11): 2213-2222.
- Tress, O., M. Maglione, et al. (2012). "Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS." J Neurosci **32**(22): 7499-7518.
- Tress, O., M. Maglione, et al. (2011). "Pathologic and phenotypic alterations in a mouse expressing a connexin47 missense mutation that causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease in humans." PLoS Genet **7**(7): e1002146.
- Uhlenberg, B., M. Schuelke, et al. (2004). "Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease." Am J Hum Genet **75**(2): 251-260.
- Vabnick, I., J. S. Trimmer, et al. (1999). "Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns." J Neurosci **19**(2): 747-758.
- van Es, R. J., D. Wittebol-Post, et al. (2007). "Oculodentodigital dysplasia with mandibular retrognathism and absence of syndactyly: a case report with a novel mutation in the connexin 43 gene." Int J Oral Maxillofac Surg **36**(9): 858-860.
- Van Norstrand, D. W., A. Asimaki, et al. (2012). "Connexin43 mutation causes heterogeneous gap junction loss and sudden infant death." Circulation **125**(3): 474-481.
- van Steensel, M. A., L. Spruijt, et al. (2005). "A 2-bp deletion in the *GJA1* gene is associated with oculo-dento-digital dysplasia with palmoplantar keratoderma." Am J Med Genet A **132A**(2): 171-174.
- Vasconcellos, J. P., M. B. Melo, et al. (2005). "A novel mutation in the *GJA1* gene in a family with oculodentodigital dysplasia." Arch Ophthalmol **123**(10): 1422-1426.
- Veenstra, R. D., H. Z. Wang, et al. (1994). "Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45." Circ Res **75**(3): 483-490.
- Verselis, V. K. and M. Srinivas (2008). "Divalent cations regulate connexin hemichannels by modulating intrinsic voltage-dependent gating." J Gen Physiol **132**(3): 315-327.
- Vitiello, C., P. D'Adamo, et al. (2005). "A novel *GJA1* mutation causes oculodentodigital dysplasia without syndactyly." Am J Med Genet A **133A**(1): 58-60.
- Vreeburg, M., E. A. de Zwart-Storm, et al. (2007). "Skin changes in oculo-dento-digital dysplasia are correlated with C-terminal truncations of connexin 43." Am J Med Genet A **143**(4): 360-363.
- Wallraff, A., R. Kohling, et al. (2006). "The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus." J Neurosci **26**(20): 5438-5447.
- Wang, B., Q. Wen, et al. (2010). "Mutation analysis of Connexon43 gene in Chinese patients with congenital heart defects." Int J Cardiol **145**(3): 487-489.

- Wang, H., X. Cao, et al. (2015). "Exome sequencing reveals mutation in *GJA1* as a cause of keratoderma-hypotrichosis-leukonychia totalis syndrome." Hum Mol Genet **24**(1): 243-250.
- Wasseff, S. K. and S. S. Scherer (2011). "Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling." Neurobiol Dis **42**(3): 506-513.
- Waxman, S. G. and M. V. Bennett (1972). "Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system." Nat New Biol **238**(85): 217-219.
- White, R. and E. M. Kramer-Albers (2014). "Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation." Front Cell Neurosci **7**: 284.
- White, T. W., R. Bruzzone, et al. (1994). "Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins." J Cell Biol **125**(4): 879-892.
- Wiest, T., O. Herrmann, et al. (2006). "Clinical and genetic variability of oculodentodigital dysplasia." Clin Genet **70**(1): 71-72.
- Xie, C., X. Zhou, et al. (2016). "CNS involvement in CMTX1 caused by a novel connexin 32 mutation: a 6-year follow-up in neuroimaging and nerve conduction." Neurol Sci **37**(7): 1063-1070.
- Yum, S. W., J. Zhang, et al. (2007). "Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels." Am J Physiol Cell Physiol **293**(3): C1032-1048.
- Zahs, K. R., P. Kofuji, et al. (2003). "Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina." J Comp Neurol **455**(4): 531-546.
- Zhou, Y., W. Yang, et al. (2009). "Calmodulin Mediates the Ca²⁺-Dependent Regulation of Cx44 Gap Junctions." Biophys J **96**(7): 2832-2848.
- Zhou, Y., W. Yang, et al. (2007). "Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43." J Biol Chem **282**(48): 35005-35017.
- Zu-Cheng, Y. (2003). "<Ye (2003) - Functional Hemichannels in Astrocytes A Novel Mechanism of Glutamate Release.pdf>."
- Zucker, S. N., T. A. Bancroft, et al. (2013). "A dominant negative Cx43 mutant differentially affects tumorigenic and invasive properties in human metastatic melanoma cells." J Cell Physiol **228**(4): 853-859.