

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES DE
Cx47 OLIGODENDROCITARIOS Y DEL SINCITIO PANGLIAL.
EFECTO DE LAS MUTACIONES ASOCIADAS A LEUCODISTROFIA
HIPOMIELINIZANTE (ENFERMEDAD DE PELIZAEUS-
MERZBACHER).**

TESIS DOCTORAL

ILARIA FASCIANI

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES DE
Cx47 OLIGODENDROCITARIOS Y DEL SINCITIO PANGLIAL.
EFECTO DE LAS MUTACIONES ASOCIADAS A LEUCODISTROFIA
HIPOMIELINIZANTE (ENFERMEDAD DE PELIZAEUS-
MERZBACHER).**

Tesis Doctoral presentada por:

ILARIA FASCIANI

Para optar al grado de Doctora en Neurociencia

En la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por el Doctor

LUIS CARLOS BARRIO CALVO

Departamento de Investigación Sección Neurología Experimental
Hospital Ramón y Cajal
Madrid

Diciembre 2013

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Creo que nunca podré olvidar el primer día que llegué al laboratorio: por lo visto estaban registrando corrientes intercelulares de conexinas, pero yo sólo podía ver un enorme aparato con muchísimos botones que en aquel momento pensé que jamás aprendería a utilizar. Escuchaba al Dr. Barrio y al Dr. González hablar entre ellos de cosas para mí sin ningún sentido, me sentía muy pequeña y entonces fue cuando tomé mi decisión: quería aprender. Todavía sigo aprendiendo, sigo sorprendiéndome, sigo sintiéndome pequeña. Tras los sustos iniciales me apasioné a este mundo, a sus mecanismos, a no pensar en el mañana y a no tener nunca nada estable, a abusar del apoyo y de la ayuda de mi familia, a su respeto a mi decisión de elegir un camino no demasiado fácil. Me he acostumbrado a tener dos hogares: mi familia y el departamento de neurología experimental, han pasado muchos años, han sido muy intensos y por eso quiero expresar a cada una de las personas que me han ayudado, ya sea en el plano profesional o en el personal, todo mi agradecimiento.

Al **Dr. Luis. C. Barrio**, el director de este trabajo, le doy las gracias por haberme abierto las puertas del mundo de la investigación, le debo todo lo que se de electrofisiología y conexinas. Gracias por haber confiado en mí y por haberme guiado en este mundo sin escatimar tiempo ni esfuerzos.

Al **Dr. Daniel González-Nieto**, por iniciarme en el mundo de la biología molecular, por su espíritu crítico que ha sido siempre un motor de orientación y estímulo. Gracias también por haberme animado y aconsejado cada vez que lo he necesitado.

A **Amparo** y a **Rosa**, porque vuestra enorme ayuda técnica ha sido esencial para el desarrollo de los experimentos; pero sobre todo, porque me habéis ayudado siempre que lo he necesitado; con vosotras me he podido desahogar cuando lo he necesitado, me habéis aconsejado, habéis estado a mi lado y me habéis dado mucho cariño.

A **M.Carmen** por su trato cariñoso y maternal. Porque desde el primer día que llegué, me ofreciste toda tu disponibilidad y ayuda. Porque siempre puedo contar contigo, porque eres “mi madre española”.

A **Elena**, para la que no bastarían cien hojas para darle las gracias por todo lo que me ha ayudado, por las ganas de aprender que tenías cuando llegaste, por todo lo que has aprendido tan bien y tan rápidamente; por haberme defendido siempre que has podido y por haber estado a mi lado ayudándome de manera incondicional, convirtiéndote en algo más que una compañera de trabajo.

A **Adela** y a **Leo**, no sólo porque su compañía ha hecho más agradable el duro trabajo, porque me han sostenido en todo momento impidiendo el fácil camino a la locura y por haberse comportado como los que en realidad sois: unos amigos.

A **Ana** por haber aportado un aire nuevo con su alegría al laboratorio; por nuestras conversaciones “absurdas” y sin sentido, que muchas veces nos han ayudado a sobrevivir. Por haber compartido buenos y malos momentos y haber sabido superarlos.

A la **Dra Dolores Muñoz (Lili)**, por escucharme hasta lo imposible, por aconsejarme y hacerme ver las cosas con claridad. Por el cariño que me has demostrado en estos años y por los buenos momentos que hemos compartido.

A **José Manuel**, por estar siempre disponible, por ser incapaz de decir que no, por su sinceridad, su enorme ayuda en todos los sentidos y sobre todo por hacerme reír.

A **María**, por todos los momentos que pasamos, las risas que nos hemos echado, nuestras conversaciones sobre los idiomas, la comida, el café, Montalbano y por supuesto los ratones. Porque las plantas que están invadiendo mi casa nunca me harán olvidarme de ti.

Al **Dr. Juan M. Gómez-Hernández**, al **Dr. Juan Barrios** y al **Dr. Jose María Gaztelu** por su amabilidad y trato durante estos años.

A Dra **Paloma** y **Dr. Jesús**, por haberme ayudado con los clonajes, por su simpatía, disponibilidad y ánimos.

A todas aquellas personas que a lo largo de estos años de una manera u otra me han ayudado desinteresadamente con materiales, aparatos, protocolos....

Al Hospital Ramón y Cajal para haber podido utilizar su infraestructura y al proyecto Consolider Ingenio (CSD2008-00005). por su financiación económica durante estos años.

A todos mis amigos que de alguna manera han “sufrido” las consecuencias, a Dani y a Gema por haberme escuchado, a Katia por no haber dejado que me rindiera y a Emy por animarme desde la distancia.

A mi familia, mi **padre**, mi **hermano** y mi “**hermana**”, porque estáis allí siempre, porque habéis sido el apoyo más sólido que he tenido, me habéis ayudado a no desesperarme y a no rendirme y habéis confiado en mí.

Y por fin unas gracias muy especiales a **FEDE**, porque ha soportado con comprensión, con paciencia y con cariño todas las locuras e histerias de los últimos meses y porque en ningún momento has dejado de creerlo.

ABREVIATURAS

A	Parámetro en la ec. de Boltzmann (sensibilidad al voltaje)
aa	Aminoácido
AC	Dominio del asa citoplasmática
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cADN	Ácido desoxirribonucleico codificante
AQP4	Acuoporina-4
ARN	Ácido ribonucleico
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
AUG	Triplete iniciador
CBX	Carbenoxolona
CF	Carboxifluoresceína
CL	Asa citoplasmática
CMTX	Charcot-Marie-Tooth
CT	Dominio del carboxilo terminal
Cx	Conexina
DMEM	Medio Dulbecco
E1	Dominio del primer asa extracelular
E2	Dominio del segundo asa extracelular
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
E_r	Potencial de reversión
g_{hi}	Conductancia intercelular macroscópica
G_{hj}	Conductancia macroscópica de los hemicanales
G_j	Conductancia intercelular (normalizada)
G_{jmax}	Conductancia intercelular máxima
G_{jmin}	Conductancia intercelular mínima
g_{jo}	Valor inicial de la conductancia intercelular
G_{jo}	Valor inicial de la conductancia intercelular (normalizado)
g_{jss}	Valor de estado de la conductancia intercelular
G_{jss}	Valor de estado de la conductancia intercelular (normalizado)
hCx47-Met1&4	ARN de la hCx-47 con dos tripletes AUG en los codones 1 y 4
hCx47-Met4	ARN de la hCx47 sin los tres primeros codones
h.d.i.	Horas después de la inyección
KI	Knockin

Kir 4.1	Canales de K ⁺
KO	Knockout
Kv1	Canales de K ⁺
I_i	Corriente inicial
I_m	Corriente transmembrana
I_j	Corriente intercelular
I_s	Corriente de estado estacionario
YP	Yoduro de propidio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LY	Lucifer yellow
M1...M4	Primer...Cuarto dominios transmembrana
MRI	Imágenes de resonancia magnética
N2A	Neuroblastoma de ratón
NT	Dominio del amino terminal
ODDD	Displasia oculo dento digital
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH_i	pH intracelular
PMD	Pelizaeus-Merzbacher
PMLD	Pelizaeus-Merzbacher-like disease
PLP1	Proteína mayoritaria de la mielina
RNM	Resonancia Magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPG	Paraparesia espástica
TTX	Tetrodotoxina
V_j	Potencial o voltaje intercelular
V_o	Parámetro de Boltzmann donde la conductancia se reduce a la mitad
V_m	Potencial de membrana
τ	Constante de tiempo
z	nº equivalente de carga de electrones moviéndose en la membrana

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN

1.1.Canales de Conexinas y Patologías Asociadas.	1
1.2.Sincitio Panglial. Función en la Conducción Saltatoria y en el Mantenimiento de la Integridad de la Mielina.	7
1.3.Patologías con afectación de la Mielina Central Asociadas a Mutaciones en los Genes de las Conexinas Gliales. Mecanismos Patogénicos.	14

2.OBJETIVOS

23

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Construcción de los vectores de expresión de las conexinas silvestres y mutadas. Técnica de mutagénesis.	25
3.1.1.Construcción de las dos variantes Met1&4 y Met4 de la Cx47 humana.	25
3.1.2.Identificación de las mutaciones en el gen <i>GJC2</i> en pacientes de PMLD.	27
3.1.3.Clonaje de los mutantes de PMLD1 en el vector de expresión pBSXG.	27
3.1.4.Reclonaje de los cADNs de Cx47 Met1&4 y Met4 y de los mutantes de PMLD1 en el vector de expresión pIRES.	27
3.1.5.Reclonaje del cADN de Cx43 en el vector de expresión pIRES.	31
3.2.Expresión en el sistema de pares de oocitos de <i>Xenopus</i> .	31
3.2.1.Transcripción "in vitro" de los ARNs.	31
3.2.2.Preparación de los oocitos y microinyección.	31
3.3.Western blot y biotilación.	35
3.4.Técnica de captación de colorante en oocitos.	36
3.5.Electrofisiología.	36
3.5.1.Medida macroscópica de las corrientes de los hemicanales y de los canales intercelulares.	38
3.5.2.Procesamiento de las señales electrofisiológicas.	39
3.6.Expresión en las células.	40
3.7.Inmunocitoquímica.	41
3.8.Técnica de acoplamiento por colorante.	41
3.9.Análisis estadístico.	42

4.RESULTADOS

4.1.Caracterización de los canales formados por la Cx47 oligodendrocitaria humana. Identificación del sitio de iniciación.	43
4.1.1.Biosíntesis de los hemicanales y canales de Cx47-Met1&4 y -Met4.	43
4.1.2.Hemicanales y canales intercelulares formados por las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4.	45
4.1.2.1.Propiedades electrofisiológicas de los hemicanales de Cx47 humana.	45
4.1.2.2.Permeabilidad a colorantes de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4.	49
4.1.3.Propiedades electrofisiológicas de los canales de Cx47.	51
4.1.3.1.Niveles de acoplamiento eléctrico inducido por las construcciones Cx47-Met1&4 y Met4.	51
4.1.3.2.Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales de Cx47-Met1&4 y Met4.	53
4.1.3.3.Propiedades de regulación por voltaje de los canales heterotípicos Cx47-Met1&4/Cx47-Met4.	55
4.1.4.Estudios de permosselectividad a colorantes de los canales Cx47 Met1&4 y Met4.	57
4.2.Contribución de la Cx47 al acoplamiento intercelular glial.	61
4.2.1.Canales intercelulares entre las conexinas oligodendrocitarias.	61

4.2.1.1. Canales heterotípicos y heteroméricos entre las Cx47 y Cx32.	61
4.2.1.2 Canales heterotípicos y heteroméricos entre las Cx47 y Cx31.3.	64
4.2.2. Canales intercelulares entre las conexas astrocitarias.	66
4.2.3. Canales intercelulares oligodendro-astrocitarios.	68
4.2.3.1. Propiedades electrofisiológicas de los canales heterotípicos Cx47-Cx43.	68
4.2.3.2. Permeabilidad y direccionalidad en el flujo de colorantes aniónicos y catiónicos por los canales heterotípicos de Cx47-Cx43.	71
4.2.3.3. Propiedades electrofisiológicas de los otros canales oligodendrocito-astrocito.	75
4.3. Estudio de las bases moleculares de la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMLD1) asociada a mutaciones recesivas de la conexina 47.	78
4.3.1. Identificación de dos nuevas mutaciones de PMLD en el gen <i>GJC2</i> .	78
4.3.2. Ensayo funcional de las mutaciones en la Cx47 de PMLD1, H252D, Y47H y P90S.	81
4.3.2.1. Biosíntesis de los canales mutados.	81
4.3.2.2. Capacidad de los mutantes H252D, Y47H y P90S, para formar hemicanales funcionales. Propiedades electrofisiológicas.	83
4.3.2.3. Permeabilidad de los hemicanales de los mutantes de la Cx47 humana a colorantes.	85
4.3.3. Capacidad de los mutantes de PMLD1 para formar canales intercelulares funcionales. Estudio de acoplamiento eléctrico y por colorante.	88
4.3.3.1. Canales homéricos formados por los mutantes.	88
4.3.3.2. Canales heterotípicos formados entre hemicanales mutados y silvestres.	91
4.3.3.3. Canales heteroméricos entre subunidades mixtas y silvestres.	93
4.3.3.4. Interacciones entre los mutantes H252D, Y47H y P90S con las otras conexas oligodendrocitarias.	94
4.3.3.5. Interacciones heterotípicas entre los mutantes H252D, Y47H y P90S de la Cx47 humana oligodendrocitaria con las otras conexas astrocitarias.	97
5. DISCUSIÓN	
5.1. Identificación del sitio de iniciación de la transducción de la proteína Cx47 oligodendrocitaria. Correlación estructura-función de los canales formados por la Cx47 humana.	102
5.2. Bases moleculares de la comunicación intercelular en el sincitio panglial. Barrera oligodendro-astrocitaria.	109
5.3. Mecanismos patogénicos de la leucodistrofia hipomielinizante causada por mutaciones en la Cx47.	114
	120
6. CONCLUSIONES	
	123
7. BIBLIOGRAFÍA	

I. INTRODUCCIÓN

1.1. CANALES DE CONEXINAS Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS.

La comunicación directa entre las células a través de canales intercelulares está presente en todos los organismos pluricelulares. En los vertebrados, los canales intercelulares están formados por la familia de proteínas denominadas conexinas (Cx's). En el hombre se han identificado veintiún genes de conexinas (Willecke y col., 2002). El patrón de expresión de cada gen es tipo-celular específico y la gran mayoría de células expresan una o más Cx's. A través del poro de los canales intercelulares que forman las Cx's permean iones y moléculas de en general hasta 1 kDa, lo cual permite la transmisión de señales eléctricas y el intercambio de metabolitos, segundos mensajeros y moléculas de señalización. La existencia de este tipo directo de comunicación intercelular supone, por tanto, una importante matización de la Teoría Celular, ya que el conjunto de células acopladas eléctrica y metabólicamente se comporta como un sincitio funcional, posibilitando la coordinación y la sincronización de sus funciones celulares.

Los canales intercelulares se forman en dos etapas; primero, las Cx's se oligomerizan formando hemicanales hexaméricos o conexones, que se transportan en vesículas hasta la superficie celular y en una segunda etapa, los hemicanales, cada uno aportado por una célula, se unen para formar el canal intercelular (Fig. 1, A). Las distintas Cx's pueden combinarse entre sí para formar una gran diversidad de canales intercelulares (Fig. 1, B). Los canales de tipo homotípicos homoméricos se forman entre células que expresan la misma Cx; también se pueden formar canales entre células que expresan distintas Cx's que se denominan canales heterotípicos homoméricos en los que cada hemicanal está formado por un tipo de conexina. El proceso de unión de los hemicanales es altamente selectivo, indicando que no todas las conexinas son compatibles entre sí (Dahl y col., 1987; Eghbali y col., 1990; Fishman y col., 1990; Barrio y col., 1991; Veenstra y col., 1994). También hay evidencias que cuando diferentes Cx's se expresan en una misma célula, las distintas Cx's pueden combinarse, también de forma selectiva, para formar hemicanales heteroméricos (Stauffer, 1995; Jiang y Goodenough, 1996; Falk y col., 1997; Diez y col., 1999). La composición en Cx's del canal determina las propiedades biofísicas de conductancia unitaria y de permosselectividad, así como, las propiedades de regulación por distintos mecanismos de compuerta sensibles al voltaje, al pH o al Ca^{2+} intercelular y a la fosforilación, y que modulan de forma dinámica el grado de acoplamiento intercelular (Harris y col., 2001; González y col., 2007).

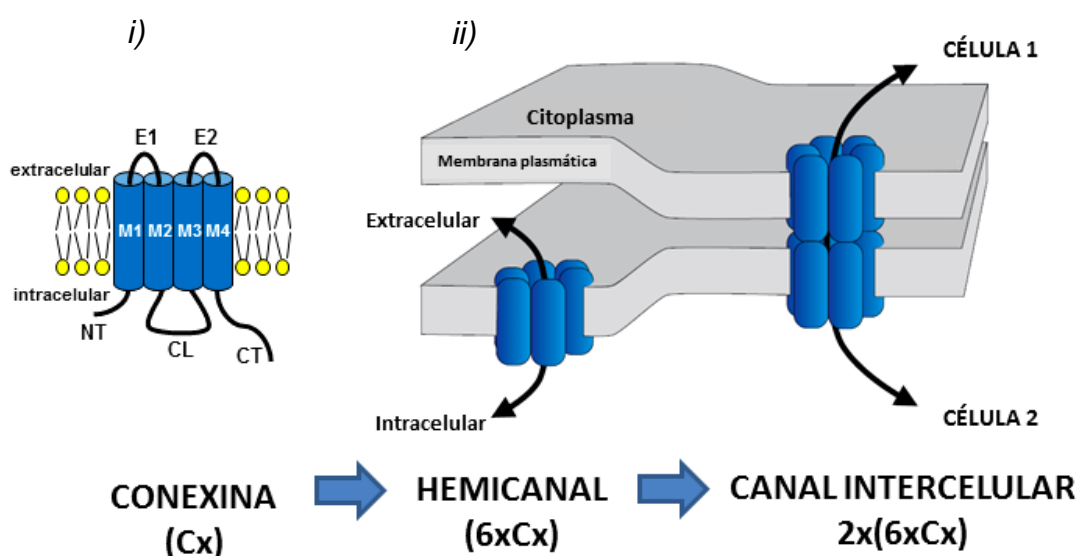
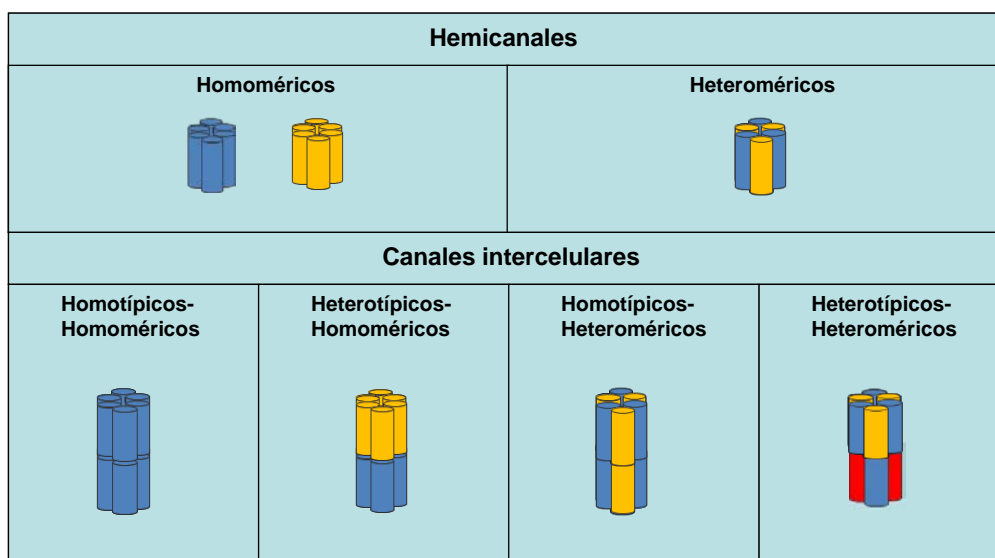
A**B**

Figura1. Canales y hemicanales de conexina. A) Etapas en la formación de los canales intercelulares. *i)* La estructura topológica de las conexas consiste de cuatro dominios transmembrana (M1-M4), dos dominios extracelulares (E1 y E2) y tres dominios citoplasmáticos: el amino terminal (NT), el asa citoplasmática (CL) y el carboxilo terminal (CT). *ii)* Los canales intercelulares se forman en dos etapas; primero se forman los precursores o hemicanales por la oligomerización de seis subunidades de conexina en cada una de las células y luego el canal intercelular al unirse los dos hemicanales y poniendo en comunicación a través del poro el interior de los citoplasmas de las células adyacentes. Los hemicanales de algunas conexas pueden también ser funcionales formando una vía de comunicación entre el interior y el exterior celular. **B) Tipos de hemicanales y canales en función de la compatibilidad de las Cx's para combinarse o no entre sí.**

La comunicación intercelular a través de canales de Cx's interviene en una multitud de procesos fisiológicos, entre los que se incluye el control de la proliferación y de la diferenciación celular (Goldeberg y col., 2004) y la coordinación de la actividad metabólica y el mantenimiento de la homeostasis celular (Mathias y col., 2010). En el sistema nervioso central (SNC), los canales intercelulares entre las neuronas son la base estructural de las sinapsis de tipo eléctrico, constituyendo una vía de baja resistencia para la transmisión de las señales eléctricas, que facilita el sincronismo de las descargas y la generación de la actividad rítmica de las redes neuronales (Connors y col., 2004). Las células de la macroglía también están comunicadas por canales intercelulares y forman una amplia red de células interconectadas entre sí que están especializadas en dar soporte metabólico a las neuronas y que participan en la homeostasis extracelular y en el mantenimiento de la conducción saltatoria en las fibras mielínicas (Rash y col., 2010).

Inicialmente se aceptaba que los precursores de los canales intercelulares, o los hemicanales, permanecían cerrados hasta que se unían entre sí y el canal intercelular recién formado adquiriría la conformación de canal abierto. Actualmente se ha demostrado que la apertura de los hemicanales puede inducirse por la despolarización del potencial de membrana (Paul y col., 1991; Gupta y col., 1994; Ebihara y col., 1995; Ebihara y col., 1996; Castro y col., 1999), por la disminución de la concentración de calcio extracelular (Devries y Schwartz, 1992; Li y col., 1996; Malchow y col., 1993), por inhibidores del metabolismo celular (John y col., 1999), por estres mecánico o por fosforilación (Fasciani y col., 2013). Los hemicanales podrían tener, por lo tanto, un papel clave regulando el potencial de membrana, la permeabilidad celular y la liberación de moléculas de señalización autocrina o paracrina. Se ha demostrado que los hemicanales desempeñan un papel importante en multitud de procesos: en el mantenimiento de la homeostasis del cristalino (Paul y col., 1991; Ebihara y col., 1999), en la formación del hueso (Plotkin y Bellido, 2001), en la modulación de la liberación sináptica de los fotorreceptores en la retina (Jansenn-Bienhold y col., 2001) o en la regulación de proliferación y diferenciación de los queratinocitos en la piel (Levit y col., 2012). También han sido implicados en procesos fisiopatológicos como la formación de cataratas (Eckert y col., 1998) o la generación de arritmias asociadas a cardiopatías isquémicas (Kondo y col., 2000).

La relevancia que actualmente se atribuye a los canales/hemicanales de Cx se fundamenta en la identificación de un número creciente de enfermedades asociadas a

mutaciones en los genes de esta familia de proteínas y que se denominan “conexinopatías” (Tabla 1). Estas conexinopatías afectan a multitud de órganos y tejidos, pudiendo producir en función del gen mutado y del tipo de mutación, alteraciones en la mielina a nivel central y/o periférico, cataratas congénitas, sordera neurosensorial no-sindrómica o síndrómica, genodermopatías, enfermedades cardiovasculares y la displasia oculo-dento-digital. El patrón de herencia puede ser autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X.

En relación con las patologías que cursan con afectación de la mielina, primero se identificaron las mutaciones en el gen *GJB1* que codifica para la Cx32, que se expresa en las células de Schwann, y que causan la forma ligada al cromosoma X de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMTX) (Bergoffen y col., 1993), una neuropatía periférica en general de tipo desmielinizante. Posteriormente se encontraron las mutaciones en el gen *GJA12/GJC2* (Uhlengerg y col., 2004), que codifica para la Cx47 oligodendrocitaria, asociadas a una hipo/desmielinización severa de la mielina central conocida como enfermedad tipo Pelizaeus-Merzbacher (PMLD), la forma prototipo de la leucodistrofia hipomielinizante. Finalmente, se identificaron un grupo de pacientes con el síndrome autosómico dominante de displasia oculo-dento-digital (ODDD) causado por mutaciones en el gen *GJA1*, que codifica para la Cx43, presente en los astrocitos y que cursan con paraparesia espástica por desmielinización (Paznekas y col., 2009).

Todas estas mutaciones que cursan con afectación de la mielina, tanto a nivel central como periférico, ponen de manifiesto la importancia que tienen las Cx32, Cx47 y Cx43 en la formación de la mielina y en el mantenimiento de su función. La vaina de mielina que envuelve las fibras desempeña una función vital, ya que permite la conducción rápida de los potenciales de acción (“conducción saltatoria”), a largas distancias y a alta frecuencia. Resulta por tanto del máximo interés determinar como contribuyen los canales de Cx’s al mantenimiento de la conducción saltatoria y a la integridad de la mielina. Se ha propuesto que el sincitio panglial está especialmente especializado en la regulación de la homeostasis del K^+ de los axones mielinizados permitiendo la difusión de los iones K^+ desde la región periaxonal a través de la vía de comunicación intercelular glial hasta el lecho vascular y el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fig. 2). Las mutaciones en los genes de la conexinas que forman estos canales intercelulares gliales podrían interferir en este mecanismo de tamponamiento del K^+ periaxonal a larga distancia y, como consecuencia de ello, podrían originar la destrucción de la mielina.

Tabla 1. Conexinopatías: patologías asociadas a mutaciones en los genes de conexinas.

Patología	Proteína	Gen	Herencia
Afectación de la mielina			
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	Cx32	GJB1	X
Enfermedad tipo Pelizaeus-Merzbacher	Cx47	GJA12/GJC2	AR
Cataratas	Cx46	GJA3	AD
	Cx50	GJA8	AD
Sordera neurosensorial	Cx26	GJB2	AR/AD
	Cx30	GJB6	
	Cx31	GJB3	
Enfermedades de la piel			
Síndrome de queratitis-ictiosis-sordera	Cx26	GJB2	AD
	Cx30	GJB6	
Síndrome de Vohwinkel	Cx26	GJB2	AD
Síndrome de Bart-Pumphrey	Cx26	GJB2	AD
Síndrome de Clouston	Cx30	GJB6	AD
Eritroqueratodermia variabilis	Cx30.3	GJB4	AD
	Cx31	GJB3	
Enfermedades cardiovasculares			
Fibrilación auricular	Cx40	GJA5	AD/ND
Heteroataxia visceratrial	Cx43	GJA1	ND
Displasia oculo-dento-digital	Cx43	GJA1	AD/AR

AR, autosómica recesiva; AD, autosómica dominante; X, ligada al X, ND, no determinada

En rojo se muestran aquellas conexinas cuyas mutaciones pueden causar hipo/desmielinización.

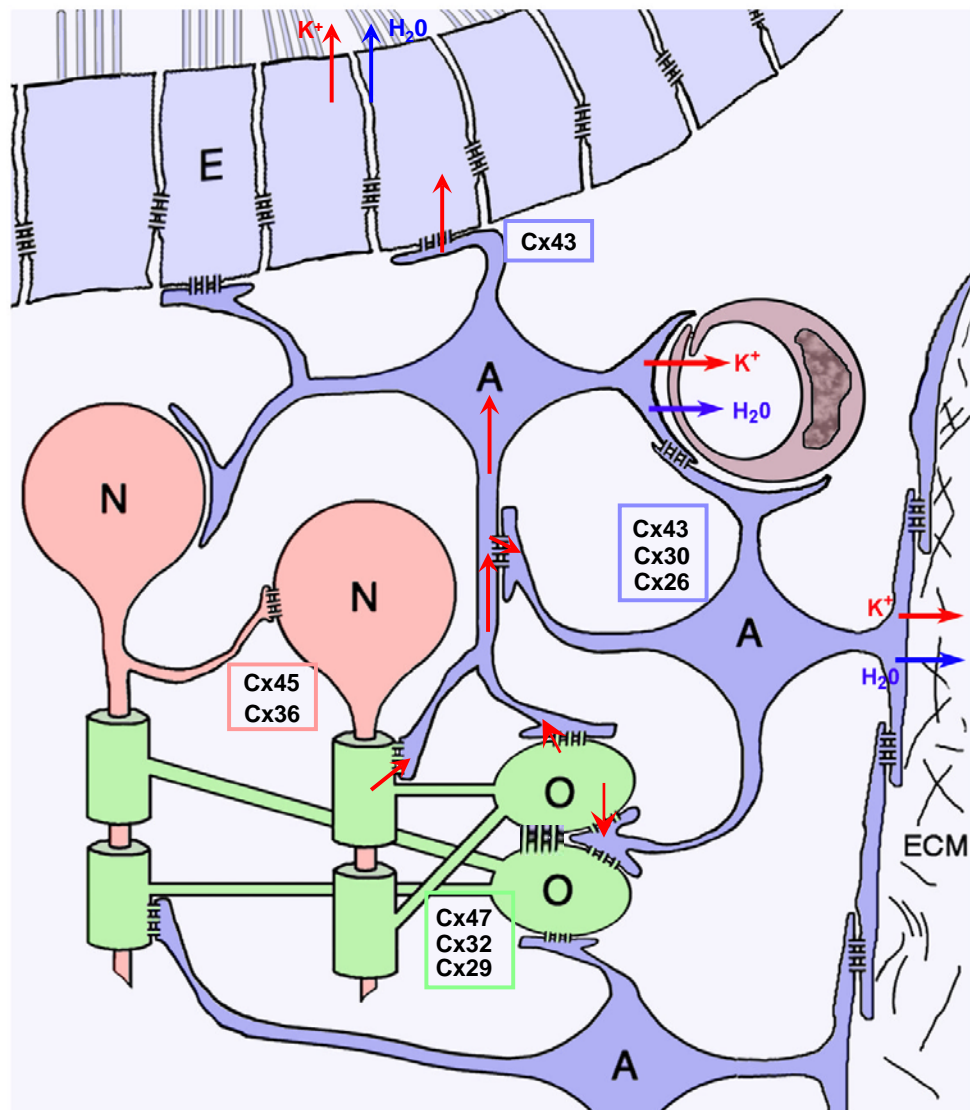


Figura 2. Comunicación intercelular por canales de conexinas en el SNC. Las neuronas (N) se acoplan entre sí a través de sinapsis eléctricas formadas fundamentalmente por canales de Cx36 y Cx45. Las células de macroglía, los astrocitos (A), los oligodendrocitos (O) y las células endoteliales (E), forman un sistema de comunicación intercelular independiente del neuronal, denominado sincitio panglial. Los astrocitos y los oligodendrocitos expresan distintos tipos de conexinas. El sincitio panglial está especializado en el reciclaje de los iones K⁺ desde el espacio periaxonal, vía canales intercelulares al lecho vascular y al líquido cefalorraquídeo (flechas rojas).

Modificada de **Rash 2010. *Neuroscience* 168(4).**

1.2. SINCITIO PANGLIAL. FUNCIÓN EN LA CONDUCCIÓN SALTATORIA Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD DE LA MIELINA.

El sincitio panglial está constituido por una amplia red de células de macroglía, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células endoteliales, interconectadas por canales intercelulares (Fig. 2). Los astrocitos, las células más abundantes del SNC, forman extensas redes de células interconectadas entre sí y dentro del sincitio panglial ocupan una posición central ya que, por una parte se acoplan con las células endoteliales y por otra con los oligodendrocitos (Mugnaini, 1986; Rash y col., 1997). Los astrocitos expresan la Cx43, la Cx30, y algunos la Cx26 (Dermietzlel y col., 1989; Yamamoto y col., 1990; Micevych y Abelson, 1991; Nagy y col., 1997, 1999, 2001, 2003; Kunzelmann y col., 1999; Rash y col., 2001; Zahs y col., 2003; Altevogt y Paul., 2004). La Cx43 se localiza tanto entre los astrocitos de la sustancia gris como entre los astrocitos de la sustancia blanca (Dermietzlel y col., 1989) y entre los pies astrocitarios perivasculares; la Cx30 se expresa fundamentalmente entre los astrocitos en la sustancia gris (Dahl y col., 1996; Nagy y col., 1997, 1999, 2001; Kunzelmann y col., 1999). En las uniones en hendidura entre los astrocitos se han identificado, en imágenes de microscopía electrónica y de barrido, de forma predominante la Cx43 y de forma minoritaria la Cx30 y la Cx26 (Nagy y col., 2003). Los ensayos *in vitro* mediante acoplamiento por colorante y registros electrofisiológicos indican que la Cx43 no se combina funcionalmente con la Cx30 (Orthmann y col., 2007) ni con la Cx26 (White y col., 1994; Elfganag y col., 1995); mientras que las Cx30 y Cx26 son capaces de formar canales heterotípicos y heteroméricos (Yum y col., 2007). Por lo tanto los astrocitos podrían estar conectados a través de canales homotípicos de Cx43, de Cx30 y de Cx26 y quizás también a través de canales heterotípicos-heteroméricos de Cx30 y Cx26. En los ensayos *in vivo*, llevados a cabo en ratones deficientes para la Cx43 el acoplamiento entre astrocitos se reduce significativamente, pero no de manera completa (Theis y col., 2004), consistente con la expresión de otras conexinas como la Cx30, ya que los estudios de acoplamiento con biocitina (sin carga; 372 Da) en el cuerpo calloso de los ratones que carecen de las dos conexinas (Cx43-KO/Cx30-KO), muestran que el acoplamiento entre astrocitos está completamente eliminado y el acoplamiento entre oligodendrocito-astrocito casi completamente ausente (Maglione y col., 2010).

Los oligodendrocitos, que son las células que forman la vaina de mielina en el SNC, se acoplan entre sí y con los astrocitos, pero expresan otros tres tipos de

conexinas: la Cx47, la Cx32 y la Cx31.3, cada una con un patrón de distribución subcelular característico, que varía dependiendo de las diferentes poblaciones de oligodendrocitos (Scherer y col., 1995; Rash y col., 2001; Menichella y col., 2003; Kleopas y col., 2004). La Cx29, la ortóloga de la Cx31.3 humana, se expresa básicamente en las fibras mielínicas de tamaño pequeño de la sustancia gris y en las regiones del tracto corticospinal y se localiza fundamentalmente a nivel adaxonal y en el cuerpo celular de los oligodendrocitos, donde no forma placas (Altevogt y col., 2002). La Cx29 tiene la particularidad de que no es capaz de formar canales homotípicos, pero sí podría combinarse con la Cx32 para formar canales heteroméricos (Altevogt y col., 2002). Su homóloga humana, la Cx31.3, tampoco es capaz de formar canales consigo misma pero se ha propuesto que es capaz de formar hemicanales funcionales, por su capacidad de captar colorante (Neurobiotina, +1; 322 Da) cuando se expresa exógenamente en las células N2A (Sargiannidou y col., 2008). La Cx32 es más abundante en la sustancia gris que en la sustancia blanca, y se localiza en los procesos proximales del soma de los oligodendrocitos, en la capa más superficial de las fibras mielínicas de mayor diámetro y, dentro de la mielina, en donde podría formar canales de tipo “reflexivo” entre las lamelas de la mielina, motivo por el que se ha propuesto que, como en el nervio periférico, podría formar una vía radial de comunicación intramielínica, más corta y más rápida que la vía circunferencial para la difusión de iones y de otras moléculas entre las distintas regiones citoplasmáticas de los oligodendrocitos (Balice-Gordon y col., 1998; Nagy y col., 2003, Altevogt y col., 2004; Kleopa y col., 2004; Kamasawa y col., 2005). La Cx47 es la principal conexina que se expresa en los oligodendrocitos tanto de la sustancia gris como de la sustancia blanca y se localiza en el soma y en los procesos iniciales de los oligodendrocitos (Menichella y col., 2003; Odermatt y col., 2003), donde se co-localiza con la Cx32. Ambas conexinas, la Cx47 y la Cx32, podrían estar implicadas en el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito. En los ensayos *in vitro* por acoplamiento por colorante y registros electrofisiológicos e inmunocitoquímica la Cx47 y la Cx32 forman canales homoméricos pero no canales heterotípicos (Orthmann y col., 2007; Magnotti y col., 2011), sugiriendo que el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito está mediado por canales Cx47-Cx47 y Cx32-Cx32. Se desconoce si ambas conexinas interactúan heteroméricamente. En este contexto, una cuestión fundamental que está aún sin resolver, es la caracterización electrofisiológica de los canales que forma la Cx47. El origen del problema radica en que el mRNA de la Cx47 presenta la peculiaridad de poseer dos

posibles tripletes iniciadores AUG, separados entre sí solo por otros dos codones, y que todavía no se han identificado en cuál de ellas si inicia el patrón de lectura. En los ensayos que se han realizado, se han usado construcciones que únicamente contienen la segunda metionina o que contienen las dos metioninas. En ambos casos se forman canales intercelulares, pero dependiendo de cuál es la construcción utilizada, las propiedades de regulación por el voltaje intercelular varían de forma significativa (Orthmann y col., 2007; Kim y col., 2013), sugiriendo que los canales están formados por distintas proteínas. La presencia o ausencia de los tres aa., en los que se diferencian, en el extremo 5' del dominio NT de la Cx47, podría justificar no solo las diferencias de dependencia de voltaje sino también las propiedades del poro (conductancia unitaria y permosselectividad) del canal muy distintas, con importantes repercusiones en el acoplamiento eléctrico y metabólico oligodendrocito-oligodendrocito y oligodendrocito-astrocito y en el mecanismo del tamponamiento del K^+ periaxonal.

Los estudios de acoplamiento con biocitina (sin carga; 372 Da) en el cuerpo caloso de los ratones de la Cx47 (Cx47-KO) o de la Cx32 (Cx32-KO) indican que la Cx47 es esencial en el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito, ya que la ausencia de su gen provoca una reducción significativa del acoplamiento entre los oligodendrocitos, mientras que la ausencia de la Cx32 no reduce significativamente el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito; sin embargo, la Cx32 podría contribuir de forma secundaria al acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito ya que en los ratones que carecen de ambas conexinas (Cx47-KO/Cx32-KO), el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito está completamente ausente (Maglione y col., 2010). En el trabajo posterior en el que se estudió el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito con sulforhodamina (sin carga; 559 Da), se muestra, por el contrario, que la supresión de la Cx47 no afecta de forma significativa al acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito y que este se elimina cuando se suprime la Cx32 (Wasseff y col., 2011). Aún cuando hay acuerdo en que no hay acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito en ausencia de Cx47 y Cx32 y que la Cx29 no contribuye al acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito (Maglione y col., 2010), la cuestión de si el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito está mediado principalmente por canales de Cx32-Cx32 o por canales de Cx47-Cx47 está aún por resolver.

En relación con el acoplamiento oligodendrocito-astrocito, los ensayos *in vitro* indican que la Cx47 oligodendrocitaria es capaz de formar canales heterotípicos con

la Cx43 y con la Cx30 astrocitaria pero no con la Cx26 y que la Cx32 forma canales heterotípicos con la Cx30 y la Cx26 pero no con la Cx43 astrocitaria (Teubner y col., 2001; Orthmann-Murphy y col., 2007; Magnotti y col., 2010; Barrio y col., 1991; Dahl y col., 1996; White y Bruzzone, 1996). Por tanto, al menos cuatro tipos de canales intercelulares (Cx47-Cx43, Cx47-Cx30, Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26) podrían formarse entre los oligodendrocitos y los astrocitos. Los estudios *in vivo* de acoplamiento oligodendrocito-astrocito por biocitina (sin carga; 372 Da) realizados en el cuerpo caloso en ratones genéticamente modificados indican que cuando se elimina la Cx47, el acoplamiento oligodendrocito-astrocito se elimina completamente, y que si se suprime solo la Cx43 el acoplamiento oligodendrocito-astrocito se reduce, pero que cuando además se elimina la Cx30 el acoplamiento oligodendrocito-astrocito desaparece (Maglione y col., 2010; Tress y col., 2012). Estos estudios sugieren que el acoplamiento oligodendrocito-astrocito está mediado por canales Cx47-Cx43 y Cx47- Cx30.

En la corteza el acoplamiento oligodendrocito-astrocito mediado por sulforhodamina-101 (sin carga; 559 Da) requiere la Cx47 pero no la Cx32 (Wasseff y col., 2011) sugiriendo que está mediado exclusivamente por canales Cx47-Cx43, pero no por canales Cx32-Cx30. Estos estudios no observan la participación de los canales Cx47-Cx30 demostrados por acoplamiento de colorante con Neurobiotina (+1; 287 Da) *in vivo* (Magnotti y col., 2011), de los que se desconocen sus propiedades electrofisiológicas. Todos estos resultados sugieren que los canales heterotípicos formados por la Cx47 por el lado oligodendrocitario y por las Cx43 y Cx30 por el lado astrocitario serían las principales Cx's implicadas en la comunicación oligodendrocito-astrocito (Maglione y col., 2010, Wasseff y col., 2011; Tress y col., 2012). Por inmunocitoquímica la Cx47, la Cx43 y la Cx30 se han co-localizado presumiblemente en los mismos oligodendrocito-astrocito a nivel del soma de los oligodendrocitos (Nagy y col., 2003; Altevogt y Paul., 2004; Kleopa y col., 2004; Kamasawa y col., 2005), mientras que los canales heterotípicos de Cx32 y Cx30, se han localizado fundamentalmente en las uniones que forman los astrocitos en la parte más externa de la vaina de mielina y también a nivel del soma de los oligodendrocitos (Kleopa y col., 2004; Kamasawa y col., 2005).

El acoplamiento entre los astrocitos y las células endoteliales es la vía alternativa para el aclaramiento de los iones K^+ al LCR; son células ciliadas especializadas en el transporte de los iones K^+ y del H_2O , que están acoplados con otros endotelios mediante muchas uniones en hendidura homólogas constituidas

por Cx43 (Brightman y Reese, 1969; Bushong y col., 2002; Landis, 1981; Mugnaini, 1986; Rash y col., 1997) y con los astrocitos mediante uniones heterólogas astrocitos-ependimocitos (Mugnaini, 1986; Rash y col., 1997).

Este complejo sistema de comunicación intercelular entre los distintos tipos de células de macroglia, (oligodendrocitos, astrocitos y células ependimarias), está mediado por canales intercelulares de distintos tipos (canales homotípicos, heterotípicos y probablemente también heteroméricos) y se ha propuesto que es la vía por la cuál difunden los iones potasio que se acumulan en la región periaxonal durante la conducción saltatoria, hasta el lecho vascular o el LCR (Fig. 3). En la conducción saltatoria, el potencial de acción se regenera en cada nodo de mielina mediante la activación por depolarización de los canales de Na^+ localizados en el nodo de Ranvier (Fig. 3, flecha 1) seguida por la activación de los canales de K^+ (Kv1) que se localizan en la región internodal que originan un flujo de salida de los iones K^+ al espacio periaxonal (Fig. 3, flecha 2). Solo una pequeña proporción de estos iones K^+ retornan al interior del axón y tampoco difunden hacia la región del nodo ya que las regiones internodal y nodal están aisladas físicamente por uniones estrechas y septadas. Se ha estimado que la concentración extracelular de potasio en la región adaxonal internodal podría aumentar de 2 mM hasta 20-100 mM dependiendo de la intensidad de la descarga axonal, llegando a despolarizar el espacio periaxonal internodal hasta +36 a +74 mV (David *et al.*, 1992). Entre el potencial en el espacio adaxonal y el potencial intracelular (~ -85 mV) a nivel de los pies astrocitarios perivascuales, se podría llegar a crear un gradiente de voltaje de hasta +120 a +159 mV. En estas condiciones, por tanto, se establece un importante gradiente electroquímico que favorecería la difusión de los iones potasio desde el espacio periaxonal hacia el lecho vascular o el LCR.

Esta vía de difusión implica primero, la entrada de los iones K^+ al interior de la mielina por canales de K^+ o hemicanales de conexinas (Fig. 3, flecha 3) y desde allí su difusión a la capa más superficial de la mielina, por la vía radial formada por hemicanales y/o canales de Cx32 de tipo reflexivo, y al soma del oligodendrocito que mieliniza ese nodo y otros nodos de fibras contiguas (Fig. 3, flecha 4); a continuación, los iones K^+ pasarían a través de canales intercelulares a los oligodendrocitos vecinos y a los astrocitos y difundirían por el sincitio astrocitario (Fig. 3, flechas 5 y 6) hasta alcanzar los pies vasculares astrocitarios en donde se produce el eflujo de los iones K^+ a través de canales de K^+ (Kir 4.1) a la luz de los capilares, o a través de la comunicación intercelular astrocito-ependimocito hasta el

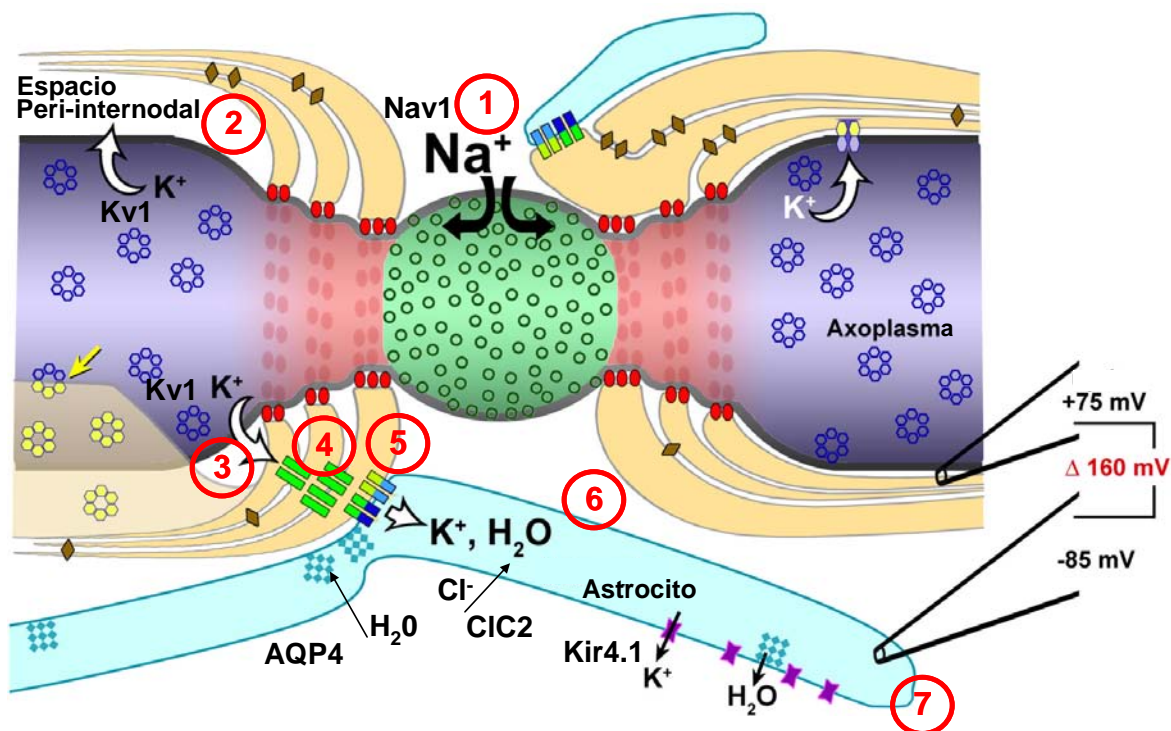


Figura 3. Esquema de la conducción saltatoria y del mecanismo de aclaramiento de los iones K^+ desde la región peri-internodal al lecho vascular a través del sincitio panglial.

En la conducción saltatoria los potenciales de acción se regeneran en cada nodo mediante la activación de canales de Na^+ localizados en el mismo nodo (1) y la posterior activación de los canales de K^+ (Kv1) localizados en la región internodal y la salida de K^+ al espacio adaxonal (2), desde donde difunde al interior de la mielina (3) y atraviesa la mielina por la vía radial intramielina que forman los canales de conexinas de tipo reflexivo hasta alcanzar la capa más superficial (4). Desde allí a través de canales intercelulares difunde a los oligodendrocitos vecinos y a los astrocitos por las uniones heterológicas oligodendrocito-astrocito (5) principalmente mediadas por la Cx47 (verde claro) y la Cx43 (azul claro) y también por la Cx32 (verde) y la Cx30 (azul oscuro); finalmente se difunde por el sincitio astrocitario (6), hasta alcanzar los pies astrocitarios y pasar al torrente circulatorio (7). Los cambios de osmolaridad asociados a la salida de iones K^+ están compensados con el arrastre de H_2O por transportadores de acuaporina-4 (AQP4). El flujo de los iones K^+ desde el espacio peri-internodal a los pies astrocitarios, vía canales de conexinas, ocurre a favor de gradiente electro-químico.

Modificada de **Rash 2010. *Neuroscience* 168(4).**

liquido cefalorraquídeo (Fig. 3, flecha 7). La difusión de los iones potasio en todo su recorrido requiere además arrastre de agua para compensar los cambios de osmolaridad, que lo realizan los transportadores de agua acuoporina-4 (AQP4), y un balance de carga mediante canales/transportadores de iones de cloro (Rash 2010). En resumen, la conducción saltatoria de los potenciales de acción en las fibras mielínicas requiere por tanto de un complejo, rápido y eficaz mecanismo de “aclaramiento” capaz de mantener baja la concentración extracelular de los iones potasio en el espacio adaxonal de la región internodal y que se basa en una amplia red de células gliales interconectadas entre sí por canales intercelulares.

La hipótesis de que los iones y otras moléculas difunden libremente en todas las direcciones a través de los canales intercelulares dentro de todo el sincitio panglial debería ser revisada a la vista de los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* en el nervio óptico del conejo, en los que se identificó la existencia de una barrera para la difusión entre los oligodendrocitos y los astrocitos (Robinson y col., 1993). En dicho estudio, utilizando la técnica de difusión intercelular de colorante, se muestra que los astrocitos se acoplan extensamente entre sí por biotina (+1; 373 Da) y Lucifer Yellow (-2; 443 Da) mientras en los oligodendrocitos el nivel de acoplamiento es mucho menor por biotina y prácticamente ausente por Lucifer Yellow. También se observó que la difusión de colorantes entre los astrocitos y los oligodendrocitos es fundamentalmente unidireccional ya que cuando se inyecta la biotina o el Lucifer Yellow en los astrocitos en todos los casos se observó difusión de los dos colorantes hacia los oligodendrocitos, mientras que cuando se inyectan los colorantes a los oligodendrocitos solo difunde el trazador con carga positiva, la biotina, y en un bajo porcentaje de los casos hacia los astrocitos. Veinte años después de este estudio, todavía desconocemos cuáles son las bases moleculares de esta barrera para la difusión oligodendrocito/astrocito y cuál podría ser su significado funcional. Debido a que los oligodendrocitos y los astrocitos expresan diferentes tipos de conexinas, esta barrera para la difusión podría generarse como consecuencia de que las uniones heterólogas astrocito-oligodendrocito están formadas por canales de tipo heterotípico (Cx47-Cx43, Cx47-Cx30, Cx32-Cx26 y Cx32-Cx30).

Es bien conocido que la formación de canales heterotípicos puede originar en ciertas ocasiones una barrera para la difusión de los iones. Dicha barrera consiste en un cambio instantáneo en la conductividad del canal (i.e., en el valor de la conductancia unitaria) en función del gradiente de voltaje intercelular. Como

consecuencia de ello, el flujo de corriente aumenta para una polaridad y disminuye para la polaridad opuesta. Este comportamiento asimétrico confiere direccionalidad al flujo iónico y por tanto a la transmisión de las señales eléctricas (revisado por González y col., 2007). Entre los canales heterotípicos que median el acoplamiento oligodendrocito-astrocito, se ha descrito este tipo de rectificación instantánea en los canales Cx32-Cx26 y Cx32-Cx30 (Barrio y col., 1991; Dahl y col., 1996). En el caso de los canales Cx32-Cx26 con una marcada rectificación instantánea, los estudios de difusión de colorante muestran que los canales homotípicos de Cx32 permean mejor el colorante aniónico Lucifer Yellow (-2; 443 Da) que el catiónico DAPI (+2; 350 Da), mientras que por los canales homotípicos de Cx26 permean mejor los catiónicos que los aniónicos (Cao y col., 1998). En este contexto, la caracterización en detalle del comportamiento de los canales Cx47-Cx43 es un prerrequisito para poder atribuir a ellos la existencia de una barrera para la difusión entre los oligodendrocitos y los astrocitos.

En los estudios *in vitro* en los que se ha determinado que los canales de Cx47-Cx43 no rectifican instantáneamente y que son capaces de permear colorantes catiónicos y aniónicos, se ha utilizado la proteína Cx47 que carece de los tres primeros aa. en su extremo 5' del amino terminal (Orthmann y col., 2007), pero podría ocurrir que el sitio de iniciación de la Cx47 corresponde a la otra metionina que se localiza a tres codones de distancia en el sentido 5'.

1.3. PATOLOGÍAS CON AFECTACIÓN DE LA MIELINA CENTRAL ASOCIADAS A MUTACIONES EN LOS GENES DE LAS CONEXINAS GLIALES. MECANISMOS PATOGENÉTICOS.

El adecuado funcionamiento de la conducción saltatoria y de la integridad de la mielina basado en este complejo mecanismo de “aclaramiento” del K⁺ periaxonal a través de la comunicación intercelular entre los oligodendrocitos, que se caracterizan por un menor tamaño, y los astrocitos podría verse afectado por las mutaciones en los genes de las Cx's oligodendrocitarias y astrocitarias. Actualmente en el hombre se han identificado mutaciones en tres genes: la Cx47 y la Cx32 oligodendrocitarias y la Cx43 astrocitaria, que causan hipo o/y desmielinización a nivel del SNC.

La patología más severa de la mielina central está causada por las mutaciones recesivas en el gen *GJC2* que codifica para la Cx47 oligodendrocitaria y que es responsable de una forma autosómica recesiva de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (PMLD1; MIM ID # 608804) (Uhlenberg y col., 2004; Bugiani y

col., 2006), la forma prototipo de la leucodistrofia hipomielinizante. Las leucoencefalopatías hipomielinizantes representan un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas caracterizadas por un defecto en el proceso de formación de la mielina (OMIM ID # 312080). La forma clásica o prototipo de las leucodistrofias hipomielinizantes es la enfermedad descrita por Pelizaeus y Merzbacher que se denominó esclerosis cerebral crónica de la infancia (PMD; Pelizaeus 1885; Merzbacher 1910). Se trata de una enfermedad de inicio precoz en los primeros meses de vida que suele debutar con nistagmus, retraso en el desarrollo motor, seguidos de ataxia, movimientos coreoatetósicos, disartria a los 4 años, y espasticidad progresiva a partir de los 6 años (Renier y col., 1981). Las imágenes de resonancia magnética muestran un patrón hipomielinizante difuso (Saugier-Veber y col., 1994). Inicialmente la PMD se identificó como una enfermedad ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el gen de la proteína mayoritaria de la mielina (PLP1; locus Xq 22), (Cremers y col., 1987; Gencic y col., 1989; Raskind y col., 1991). Posteriormente, se descubrió un grupo de pacientes con fenotipo de PMD con herencia autosómica recesiva y con mutaciones en el gen de la Cx47 (*GJC2*; locus 1q41-q42) (Uhlengerg y col., 2004). La PMLD1 es una enfermedad desde el punto de vista clínico, neuro-radiológico y neuro-electrofisiológico, indistinguible de la forma clásica de PMD. En la actualidad se han identificado 34 mutaciones distintas en la Cx47 en homocigosis o heterocigosis compuesta; en algunos casos no se ha logrado identificar la segunda mutación (Tabla 2). Las mutaciones se han encontrados en distintas regiones del gen pero sobre todo en la región codificante. El fenotipo clínico es variable, dependiendo probablemente de la naturaleza de la mutación, desde un cuadro clínico severo congénito caracterizado por hipotonía, cuadriplegia, nistagmus y muerte muy prematura (con grado 0 de desarrollo motor) a la forma más leve que cursa con un cuadro puro de paraparesia espástica (grado 4; SPG44; MIM ID # 613206), pasando por la forma clásica, que cursa con un fenotipo más complicado, con inicio en la infancia o adolescencia (grado 2-3) con retraso moderado en el desarrollo, moderada neuropatía periférica y un fenotipo complicado de paraparesia espástica que se caracteriza por nistagmus, ataxia y leve disartria (Tabla 2).

Los mecanismos patogénicos de las mutaciones de Cx47 que causan la PMLD1 y la SPG44, no están suficientemente esclarecidos. En los ensayos funcionales realizados hasta la actualidad, solo se han estudiado de las 34 mutaciones, 11 de PMLD1 y 1 de SPG44 (Tabla 2). Respecto a las mutaciones

Tabla 2. Mutaciones en el gen *GJC2* asociadas a la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher y a paraparesia espástica.

Alelos	Dominio	Fenotipo	Ensayo funcional				Referencia
			Localización subcelular	Uniones en hendidura	Corrientes de hemicanales	Acoplamiento por colorante/ eléctrico	
c.-20+1G>C/ c.-20+1G>C	5'UTR	0/2/3	--	--	--	--	Al-Yahyaee y col., 2012
c.-167A>G/ c.-167A>G	Sox10	4	--	--	--	--	Osaka y col., 2010
p.L28RfsX16/ p.L28RfsX16	M1	3/4	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.I36M/ p.I36M	M1	SPG44	MP	SI	--	NO Colorante NO Corrientes	Orthmann y col., 2009
p.I46M/ p.I46M	E1	3	MP	SI	--	-- No Corrientes	Wang y col., 2010/ Kim y col., 2013
p.D64fs214X/Wt	E1	1	--	--	--	--	Bilir y col., 2012
p.P73AfsX35/ p.P73AfsX35	E1	4	--	--	--	--	Wang y col., 2010
p.P90S/ p.C329fsX141	M2/CT	3	ER/--	NO/--	--/--	NO Colorante NO Corrientes/ --	Uhlenberg y col., 2004/ Orthmann y col., 2007
p.L95R/ p.L95R	M2	3	--	--	--	--	Bilir y col., 2012
p.A98G_ p.V99insT/Wt	CL/CL	2	ER	NO	NO	--	Henneke y col., 2008/ Diekmann y col., 2010
p.R101L/ p.F227Cp. H412Y	CL	4	--	--	--	--	Zittel y col., 2012
p.R125X/ p.R125X	CL	4	--	--	--	--	Henneke y col., 2010
p.P131RfsX79/Wt	CL	2/4	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.H132PfsX13/ p.H132PfsX13	CL	3	--	--	--	--	Bugiani y col., 2006
p.G149S/Wt	CL	2	ER y MP	SI	NO	SI Colorante (=)/ SI Corrientes (=)	Henneke y col., 2008/ Diekmann y col., 2010/ Kim y col., 2013/
p.V182fs257X/ p.V182fs257X	CL	3	--	--	--	--	Bilir y col., 2012
p.E207GfsX3/ p.E207GfsX3	CL	4	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.Y232X/ p.Y232X	E2	3	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.G236R/ p.G236R	E2	2	NO ⁽¹⁾ /SI ⁽²⁾	NO/SI	NO/--	--/-- NO Corrientes	⁽¹⁾ Henneke y col., 2008/ ⁽²⁾ Diekmann y col., 2010/ Kim y col., 2013
p.G236S/ p.G236S	E2	2/3	MP	SI	--	--/NO Corrientes	Bugiani y col., 2006
p.R240X/ p.Y272D*	E2/M4	1	ER/--	--/NO	--/--	--/ NO Colorante NO Corrientes	Uhlenberg y col., 2004/ Orthmann y col., 2007
p.E263K	E2	0	--	--	--	--	Biancheri y col., 2012
p.T265A/ p.T265A	M4	4	ER	NO	NO	--	Henneke y col., 2008/ Diekmann y col., 2010
p.L281AfsX5/ p.L281AfsX5	M4	3	--	--	--	--	Bugiani y col., 2006
p.M286T/ p.M286T	CT	3	ER/MP	SI	--	NO Colorante NO Corrientes	Uhlenberg y col., 2004/ Orthmann y col., 2007/ Kim y col., 2013
p.P305RfsX155/ p.P305RfsX155	CT	3/4	--	--	--	--	Salviati y col., 2006
p.P309fs477X/Wt	CT	4	--	--	--	--	Bilir y col., 2012
p.C318PfsX160/ p.C318PfsX160	CT	4	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.A325PfsX147/ p.A325PfsX147	CT	3	--	--	--	--	Henneke y col., 2008
p.T398I/Wt	CT	1/4	MP	SI	SI	--/ SI Corrientes(=)	Henneke y col., 2008/ Diekmann y col., 2010/ Kim y col., 2013

M1-M4, dominios transmembrana; CL, asa citoplasmática; CT, carboxilo terminal; --, no determinado; MP, membrana plasmática; ER, retículo endoplasmático

* mutación ensayada

Fenotipo grado 1-4 según la descripción de Cailloux y col., 2000 y Hobson y col., 2012.

recesivas de PMLD1, identificadas en homocigosis, su ensayo reveló que la mutación en la región del promotor Sox10 (c167A>G) asociada a un fenotipo poco severo (grado 4), reduce la transcripción del gen de la Cx47, sugiriendo una reducción de la expresión y de la funcionalidad (Osaka y col., 2010) mientras que las mutaciones en la región codificante I46M, G236R, G236S y M286T asociadas a una forma clásica de PMD (grado 2-3), conducen a una pérdida completa de la funcionalidad de la proteína Cx47 para formar canales consigo misma y canales heterotípicos con la Cx43 astrocitaria (Orthmann y col., 2007; Kim y col., 2013). En el caso de la mutación recesiva homocigótica I36M asociada a un fenotipo de SPG44 menos severo, la proteína mutada tampoco forma canales de Cx47 pero sí canales heterotípicos Cx47-Cx43 con propiedades aberrantes de regulación por voltaje (Orthmann y col., 2009). También se ha descrito que otras mutaciones identificadas en heterocigosis (P90S y Y272D), originan una pérdida completa de su función para formar canales funcionales (Orthmann y col., 2007). En conjunto estos datos podrían estar indicando que existe una posible correlación entre el grado de pérdida de función y el fenotipo clínico.

Se ha propuesto que las mutaciones de PMLD1 podrían interferir también con la capacidad de la Cx47 para formar hemicanales funcionales contribuyendo de esa forma a la patogénesis de la enfermedad ya que las mutaciones A98G_V99insT, G149S, G236R y T265A no son capaces de formar hemicanales funcionales y que la mutación T398I lo hace pero con menor eficacia (Diekmann y col., 2010).

En el modelo animal del ratón se ha demostrado que la Cx47 se expresa predominantemente en los oligodendrocitos y que durante el desarrollo postnatal, su patrón temporal de expresión corre paralelo al de los otros genes implicados en el programa de formación de la mielina, como el gen de la PLP (Menichella y col., 2003; Odermatt y col., 2003; Grinspan y col., 1998). Sin embargo, en los ratones que carecen de la Cx47 (Cx47-KO) no se observa un fenotipo grave con grandes anomalías de la mielina, como ocurre en los pacientes de PMLD1, sólo se ha podido observar una esporádica vacuolización que afecta fundamentalmente al segmento proximal del nervio óptico (Tabla 3) (Menichella y col., 2003; Odermatt y col., 2003). Estos resultados podrían estar indicando que la PMLD1 no se produce como consecuencia de que las mutaciones en el gen *GJC2* inducen solo una pérdida de función de la proteína Cx47. Los ratones en los que se ha introducido la mutación M286T de la Cx47 (M286T-KI), identificada en los pacientes de PMLD1 y que en los ensayos funcionales causa una pérdida de función (Orthmann y col., 2007),

Tabla 3. Modelos animales genéticamente modificados para el estudio de los mecanismos patogénicos de las patologías de la mielina.

	Gen	Modelo genético	Fenotipo	Referencia
Cx47	<i>GJC2</i>	<i>KO</i>	Fenotipo muy leve, sin importantes alteraciones de la mielina central. Esporádica vacuolización en el nervio óptico. No alteración de la mielina del sistema nervioso periférico.	Menichella y col., 2003 Odermantt y col., 2003
		<i>doble KO Cx47/Cx32</i>	Fenotipo muy severo, retraso en la mielinización, vacuolización de las fibras mielínicas y muerte prematura.	Tress y col., 2011
		<i>M286T (KI)</i>	Fenotipo leve parecido al de los ratones <i>KO</i> .	Menichella y col., 2003 Odermantt y col., 2003
		<i>M286T(KI)/Cx32KO</i>	Cuadro neurológico muy severo con hipomielinización, vacuolización generalizada y degeneración de los oligodendrocitos.	Tress y col., 2011
Cx32	<i>GJB1</i>	<i>KO</i>	Neuropatía periférica de aparición tardía y severidad moderada.	Scherer y col., 1998
Cx29	<i>GJC3</i>	<i>KO</i>	No presenta ninguna anomalía de la mielina central ni periférica.	Eiberger y col., 2006
Cx43	<i>GJA1</i>	<i>KO (condicional)</i>	No hay alteraciones de la mielina. Reducción parcial del acoplamiento entre astrocitos.	Theis y col., 2004
		<i>doble ko Cx43/Cx30</i>	Desmielinización severa. Edema y vacuolización difusa de las fibras mielínicas.	Lutz y col., 2009
Cx30	<i>GJB6</i>	<i>KO</i>	No hay alteraciones de la mielina. Sordera severa. Alteración de la respuesta emocional y de la reactividad hacia un nuevo ambiente.	Teubner y col., 2002 Dere y col., 2003
Cx26	<i>GJB2</i>	<i>KO (condicional)</i>	No presenta fenotipo anormal.	Nagy y col., 2011

presentan un fenotipo neuropatológico muy leve y que mejora con la edad, que tampoco reproduce el fenotipo severo de los pacientes (Tress y col., 2011). El hecho de que el proceso de mielinización en el modelo de los ratones Cx47-KO ni en los que llevan la mutación M286T de PMLD1 no se vea significativamente alterado, podría indicar simplemente que los oligodendrocitos del ratón son menos dependientes que los de humanos de la expresión de la Cx47 para realizar su función y que en los ratones las otras conexas oligodendrocitarias, la Cx32 o la Cx31.3, podrían estar compensando la pérdida de función de la Cx47. En estos ratones M286T-KI no aparece una completa inhibición del acoplamiento entre los oligodendrocitos, sugiriendo que la Cx32 podría estar participando en el mantenimiento de la mielina (Maglione y col., 2010; Tress y col., 2011); de echo, en las fibras miélicas del sistema nervioso central de los ratones Cx47-KO y de los ratones M286T-KI, se ha podido observar un aumento de los niveles de la Cx32 (Li y col., 2008), que podría compensar la pérdida de la Cx47.

Las mutaciones en el gen *GJB1* que codifica para la Cx32, que se expresa en las células de Schwann pero también en los oligodendrocitos, son la causas de una de las formas ligada al cromosoma X de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, (CMTX, MIM ID # 302800, Bergoffen y col., 1993). Se trata de una neuropatía periférica que se caracteriza por debilidad y atrofia muscular con disminución en la velocidad de la conducción de los nervios motores y sensoriales y que en general, cursa con desmielinización y degeneración axonal secundaria. En la mayoría de las neuropatías periféricas causadas por mutaciones en la Cx32 no hay afectación central y sólo en algunos casos hay sintomatología y desmielinización central (Paulson y col., 2002; Hanemann y col., 2003; Takashima y col., 2003). La ausencia de alteraciones clínicas o subclínicas a nivel central en pacientes con CMTX con una completa ausencia de la región codificante de la Cx32 (Hanemann y col., 2003; Takashima y col., 2003) y la ausencia de un fenotipo con afectación central en los ratones en los que se ha suprimido el gen de la Cx32 (Cx32-KO) (Scherer y col., 1998) sugiere que la Cx32 no es esencial en el SNC y que las manifestaciones centrales en los pacientes podrían estar causadas por una ganancia de función. Una posibilidad es que los mutantes de Cx32 pudieran interactuar heteroméricamente con la Cx47 afectando a su funcionalidad causando un efecto aditivo que podría ser más deletéreo que la pérdida de función de la Cx32 sola. Esta hipótesis no ha sido aún contrastada experimentalmente.

Lo que sí muestra el modelo de ratón en el que se eliminaron a la vez las dos conexinas Cx47 y Cx32, es que produce un efecto mayor que la supresión de cada gen por separado, ya que se origina un fenotipo muy severo a nivel central con un importante retraso en la mielinización, una marcada vacuolización de las fibras mielínicas y muerte prematura de los ratones que podría ser un modelo equivalente al de los pacientes de PMLD1 (Menichella y col., 2003; Odermatt y col., 2003). En este modelo, desaparece completamente el acoplamiento entre oligodendrocitos, sugiriendo que en los pacientes podría ocurrir lo mismo si los mutantes de PMLD1 ejercieran un efecto de inhibición dominante sobre la funcionalidad de la Cx32. Esta posibilidad también debe ser comprobada experimentalmente. En este modelo de ratón se pudo demostrar que el proceso de vacuolización de las fibras mielínicas del nervio óptico se podría reducir o prevenir inyectando en la retina de estos animales tetrodotoxina (TTX), que bloquea la conducción de los potenciales de acción, indicando que la vacuolización de las fibras tiene su origen en la descarga axonal y la subsiguiente acumulación de iones K^+ y de agua en las capas más profundas de la mielina (Menichella y col., 2003). Los ratones M286T-KI en los que además se suprimió la Cx32 (M286T/Cx32-KO), también desarrollan un cuadro neurológico muy severo con hipomielinización y vacuolización generalizada de la sustancia blanca, muy similar al fenotipo humano (Tress y col., 2011). En este modelo se ha observado una importante degeneración oligodendrocitaria, lo que ha llevado a sugerir que junto al mecanismo patogénico del bloqueo del acoplamiento que produce vacuolización y destrucción de la mielina, la ausencia del acoplamiento intercelular podría provocar un aporte insuficiente de metabolitos, glucosa, ATP o N-acetilaspártato a los oligodendrocitos durante la fase de formación y diferenciación de la mielina y que ello podría contribuir a la hipomielinización observada en estos ratones y en los pacientes de Pelizaeus-Merzbacher.

Las mutaciones dominantes en el gen *GJA1* que codifica para la Cx43 causan la displasia oculo dentodigital (ODDD, MIM ID # 164200, Paznekas y col., 2003) que se caracteriza por presentar malformaciones oculo-faciales, que incluyen microoftalmos, microcórnea, hipoplasia del ala de la nariz, hipoplasia dental, y sindactilia. El 30% de los pacientes cursan con espasticidad progresiva de inicio en la segunda década de la vida, ataxia, temblor, hipereflexia, alteraciones de los esfínteres y la presencia de desmielinización en las imágenes de resonancia magnética (Loddenkemper y col., 2004). El fenotipo sindrómico de los pacientes se explica por el amplio patrón de expresión de la Cx43 en multitud de tipos celulares.

En el sistema nervioso central, la Cx43 es la más abundante y se expresa fundamentalmente en los astrocitos (y en las células endoteliales) (Theis y col., 2004). De las 65 mutaciones identificadas de ODDD sólo algunas se han asociado a paraparesia espástica pero se desconoce qué determina que una mutación origine o no alteraciones en la mielina (revisado por Paznekas y col., 2003). En el modelo animal del ratón la inactivación específica del gen de la Cx43 en los astrocitos, reduce significativamente, pero no de manera completa, el acoplamiento entre astrocitos y los animales no muestran alteración en la mielina (Theis y col., 2004). Esta reducción parcial del acoplamiento entre astrocitos es consistente con la expresión de otras conexinas como la Cx30, ya que en los ratones Cx43-KO en los que además se suprime la Cx30 la reducción del acoplamiento entre astrocitos es completa y los animales presentan vacuolización y desmielinización severa (Lutz y col., 2009). En estos ratones el acoplamiento oligodendrocito-astrocito por biocitina (sin carga; 372 Da) está casi completamente ausente en el cuerpo caloso, presumiblemente porque los canales Cx47-Cx43 y Cx32-Cx30 están ausentes, y el acoplamiento entre oligodendrocitos está significativamente reducido, indicando que el acoplamiento entre oligodendrocito-astrocito es un prerrequisito para el acoplamiento entre los oligodendrocitos (Maglione y col., 2010), sugiriendo que algunos astrocitos podrían interponerse entre los oligodendrocitos favoreciendo el acoplamiento del sincitio oligodendrocitario (Rash y col., 2010). Estos datos están sugiriendo que las mutaciones dominantes de la Cx43 en los pacientes de ODDD podrían causar la paraparesia espástica ejerciendo un efecto de inhibición dominante no solo sobre la Cx43 del alelo silvestre, sino también interfiriendo con la Cx30.

En resumen, las evidencias obtenidas en relación con la genética de los pacientes de PMLD1 y los estudios en los modelos animales transgénicos indican que la Cx47 oligodendrocitaria es necesaria para el mantenimiento de la función de la mielina en el SNC. El papel fisiológico de la Cx47 y el mecanismo patogénico de las mutaciones en el gen *GJC2* podrían estar relacionados con la acumulación de iones K^+ periaxonal generado por la descarga axonal y su redistribución dentro del sincitio panglial en el que los oligodendrocitos y los astrocitos se comunican intercelularmente por canales formados por la Cx47. En este contexto la caracterización de las propiedades funcionales de los canales que forma la Cx47 consigo misma, con las otras conexinas oligodendrocitarias y con las Cx's astrocitarias es un prerrequisito necesario para entender el funcionamiento del

sincitio oligodendrocito-astrocitario en el aclaramiento de los iones K^+ y para elucidar las bases moleculares de la leucodistrofia hipomielinizante asociada a las mutaciones en la Cx47.

II. OBJETIVOS

2.1. PRIMER OBJETIVO: "CARACTERIZACIÓN DE LOS CANALES FORMADOS POR LA CONEXINA-47 OLIGODENDROCITARIA HUMANA. IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN".

Dicho objetivo incluye:

2.1.1. El estudio de la biosíntesis de los hemicanales y canales de la conexina 47 humana. Para poder identificar experimentalmente el sitio de iniciación de la traducción de la Cx47 humana se ensayarán dos construcciones del mRNA, una conteniendo los dos tripletes AUG iniciadores (Met1&4) y otra que solo contiene el segundo triplete AUG iniciador (Met4). Ambas construcciones se expresarán exógenamente en el sistema de oocitos de *Xenopus laevis* y en la línea celular Neuro2A y se evaluarán mediante técnicas de western blot e inmunocitoquímica las posibles diferencias en el nivel de expresión total de la proteína y en la eficacia para transportarse a la superficie celular y formar uniones en hendidura.

2.1.2. El estudio de las propiedades electrofisiológicas de los hemicanales y canales de Cx47. Se analizará la funcionalidad y las propiedades de los hemicanales y de los canales intercelulares sintetizados a partir de los mARNs Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4. Las propiedades de los hemicanales se estudiarán mediante experimentos de captación de colorante y el registro de las corrientes de hemicanal y la funcionalidad de los canales intercelulares midiendo el flujo intercelular de las corrientes iónicas y de distintos colorantes.

De los estudios de biosíntesis y de las propiedades electrofisiológicas de los hemicanales y canales intercelulares inducidos por los mARNs Cx47-Met1&4 y Met4 se podrá inferir a partir de qué metionina iniciadora se sintetiza la proteína Cx47 humana.

2.2. SEGUNDO OBJETIVO: "CONTRIBUCIÓN DE LA CONEXINA 47 AL ACOPLAMIENTO GLIAL".

En este objetivo se estudiarán, utilizando la misma metodología:

2.2.1. La capacidad de la Cx47 para formar canales heterotípicos y heteroméricos con las otras dos conexinas oligodendrocitarias (Cx32 y Cx31.3) y canales heterotípicos con las conexinas astrocitarias (Cx43, Cx30 y Cx26).

2.2.2. Las propiedades electrofisiológicas de los canales híbridos de la Cx47 con las conexinas oligodendrocitarias, astrocitarias, y como varían en función de cuál sea la metionina iniciadora de la Cx47.

2.3. TERCER OBJETIVO: “ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE PELIZAEUS-MERZBACHER ASOCIADA A MUTACIONES RECESIVAS DE LA CONEXINA-47”.

Este objetivo incluye:

2.3.1. La identificación de mutaciones en el gen *GJC2* en pacientes con leucodistrofia hipomielinizante en los que previamente se han descartado mutaciones en el gen *PLP1*.

2.3.2. El análisis funcional de mutaciones de la Cx47 de *PMLD1*, con la finalidad de determinar el tipo y el grado de disfunción que causan cada mutación sobre la funcionalidad del acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito y oligodendrocito-astrocito simulando la condición de homocigosis de los pacientes y de heterocigosis de los portadores.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LOS OBJETIVOS.

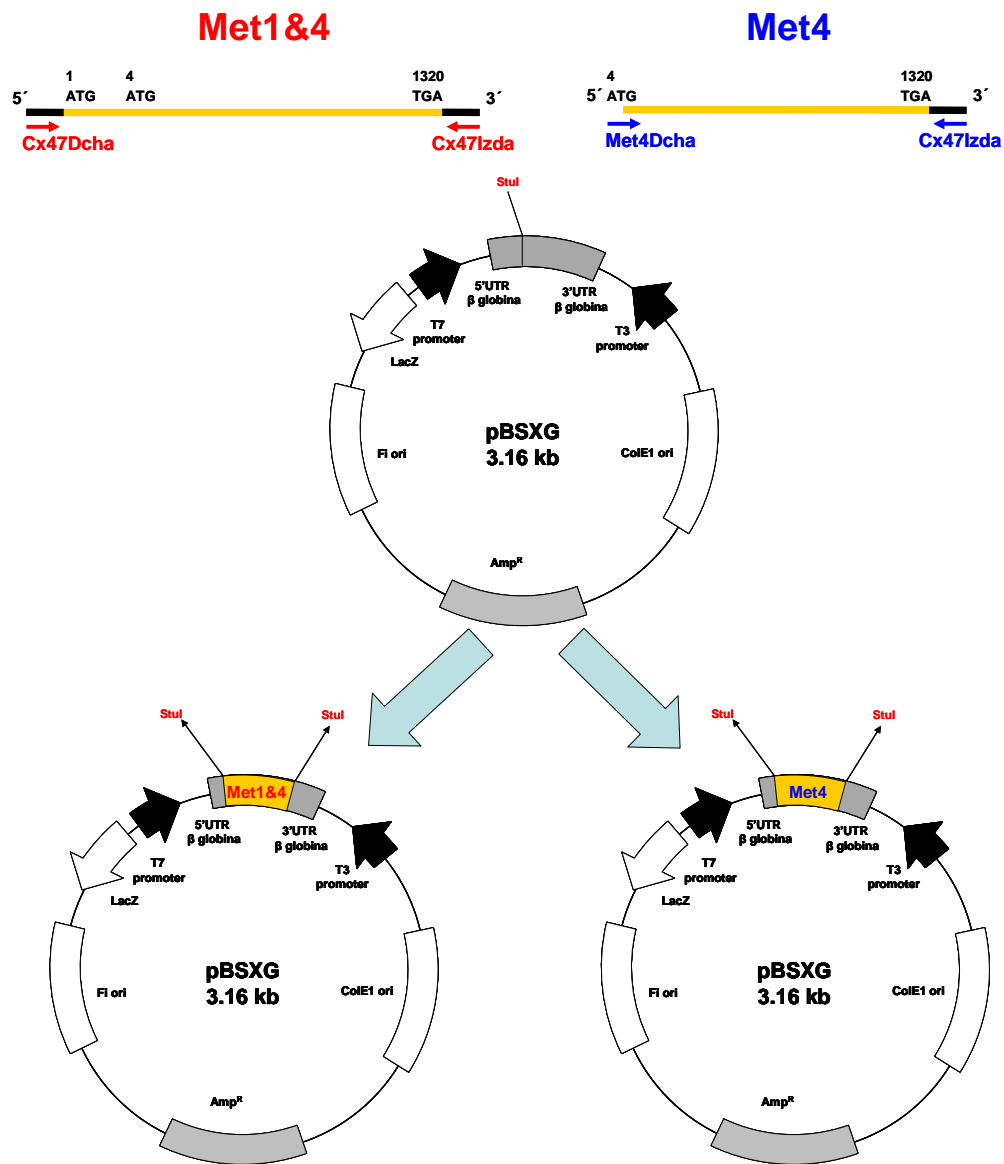
La caracterización funcional de los hemicanales y de los canales intercelulares formados por las conexinas gliales, astrocitarias y oligodendrocitarias y el análisis funcional de las mutaciones de Cx47 asociadas a PMLD1, se realizó utilizando sistemas de expresión exógena, el sistema de expresión de los oocitos de *Xenopus laevis* y la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2A (N2A).

El desarrollo experimental del trabajo se ha realizado fundamentalmente en dos etapas. Primero, se clonaron los cADNs que codifican para las conexinas humanas oligodendrocitarias (Cx47, Cx31.3 y Cx32) y astrocitarias (Cx43, Cx30 y Cx26) y se construyeron las mutaciones Met4, Y47H, H252D y P90S de la Cx47 en dos tipos de vectores de expresión, uno adecuado para la inyección de mRNA a los oocitos y otro para la transfección de la línea celular N2A. En una segunda etapa, se realizó el ensayo funcional de las Cx's silvestres y mutadas, en el que se determinó el nivel de expresión total y en la membrana celular y la localización subcelular mediante técnicas de western blot, biotilación e inmunocitoquímica. Finalmente se emplearon técnicas electrofisiológicas de difusión de colorantes y de fijación de voltaje para determinar la funcionalidad de los hemicanales y de los canales intercelulares.

3.1. Construcción de los vectores de expresión de las conexinas silvestres y mutadas. Técnica de mutagénesis.

3.1.1. Construcción de las dos variantes Met1&4 y Met4 de la Cx47 humana.

Mediante amplificación por PCR del ADN genómico, utilizando los cebadores que se muestran en la figura 4, se obtuvieron dos versiones del cADN que codifica para Cx47 humana que contenían respectivamente en la región 5' dos tripletes AUG en los codones 1 y 4 o únicamente el segundo triplete AUG y que denominamos Met1&4 y Met4. Los dos fragmentos amplificados de 1320 bp y 1311 pb se insertaron en el sitio *Stu1* del plásmido pBSXG, que está flanqueado por las regiones 5' y 3' no-codificantes del gen de la β -globina de *Xenopus* para aumentar la eficiencia de traducción en los oocitos de los ARNs exógenos (Krieg y Melton, 1984). Mediante secuenciación de las dos hebras del cADN se comprobó que la secuencia de nucleótidos de los cADNs clonados era la correcta y que correspondía con la que figura en la base de datos de Genbank (NM_020435).

**CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR:****Met1&4**

Cx47Dcha: 5' accgcccgccgcccctat 3'

Cx47Izda: 5' gaggccaccgctaaggagaaggctga 3'

Met4

Met4Dcha: 5' atgagctggagctcctgacgcggc 3'

Cx47Izda: 5' gaggccaccgctaaggagaaggctga 3'

CEBADORES UTILIZADOS PARA SECUENCIAR:

T7: 5' aatacgactcactatagg 3'

2F: 5' ctgcgacaacgtctgctatg 3'

Y2: 5' tctactagttatggacgtgtgca 3'

Figura 4. Estrategia de clonaje de las dos versiones de la Cx47 humana en el vector de expresión para oocitos pBSXG. Las dos construcciones de Cx47 humana fueron obtenidas mediante amplificación por PCR del ADN genómico, utilizando los cebadores indicados: Cx47 Dcha, Cx47 Izda, para la Met1&4 y Met4 Dcha y Cx47 Izda para la Met4. Los dos fragmentos amplificados de 1320 bp y 1311 pb, que contienen en la región 5' dos tripletes AUG en los codones 1 y 4 o únicamente el segundo triplete AUG, se insertaron en el sitio *Stu1* del plásmido pBSXG.

3.1.2. Identificación de las mutaciones en el gen *GJC2* en pacientes de PMLD1.

Los mutantes de la Cx47 humana se obtuvieron a partir del ADN genómico de pacientes de PMD (material proporcionado por los Drs. Jesús Molano y Paloma Martínez de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Universitario La Paz). El cribado mutacional que llevó a la identificación de dichas mutaciones consistió en primer lugar, en el estudio genético del gen *PLP1* en 98 pacientes con diagnóstico clínico y por RNM de leucodistrofia y en caso de no encontrar ninguna mutación en ese gen (duplicaciones, deleciones y mutaciones puntuales), se procedió a un análisis de la secuencia de la región codificante del gen *GJC2*, que codifica para la Cx47 (Fig. 5).

3.1.3. Clonaje de los mutantes de PMLD1 en el vector de expresión pBSXG.

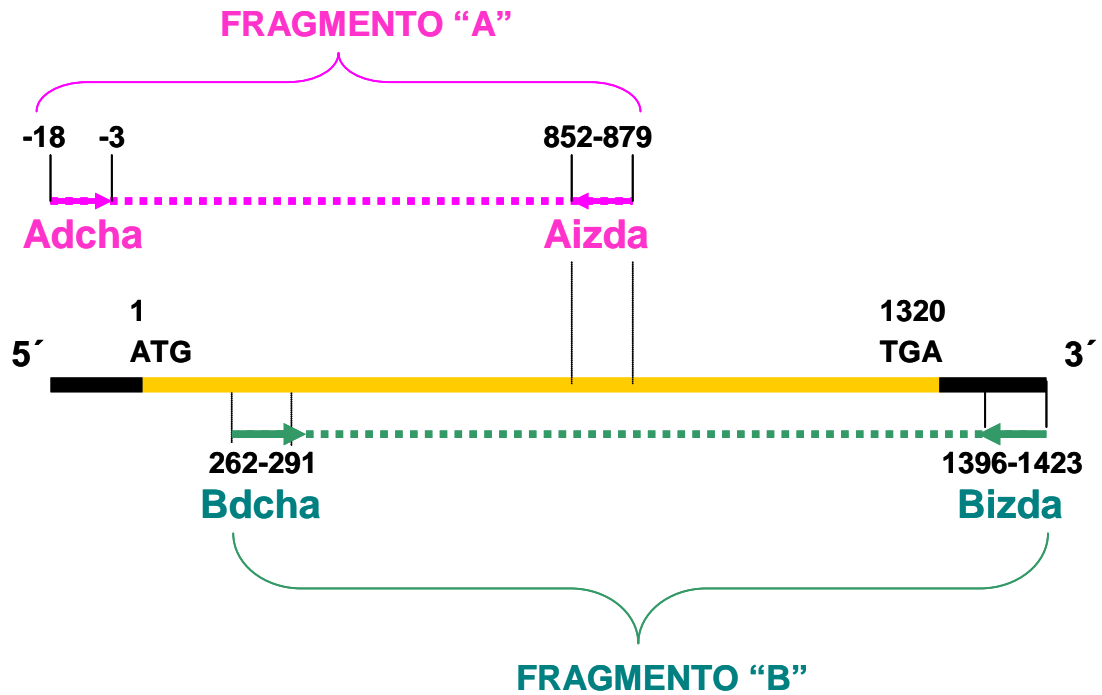
Mediante amplificación por PCR de la región codificante en dos fragmentos parcialmente solapantes (A y B) de 897 pb y 1161 pb y su posterior secuenciación con primers 5' y 3', los fragmentos mutados se clonaron de forma dirigida mediante digestión con las enzimas: Esp3I y Sfil para el fragmento B, en el caso del mutante H252D, y Esp3I y BstxI para el fragmento A, en el caso del mutante Y47H, en el vector de expresión pBSXG que contenía la Cx47 humana previamente clonada, a su vez digerido con las mismas enzimas (Fig. 6). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la figura 6. La mutación P90S también se obtuvo por amplificación por PCR de la región codificante de la Cx47 en dos fragmentos, utilizando dos parejas cebadores (Fig. 7) que además de llevar la mutación, también presentan una diana de restricción para la posterior unión de los dos fragmentos (SpeI). Después de haber ligado los dos fragmentos A y B, el inserto resultante con la mutación se insertó en el sitio *Stu1* del plásmido pBSXG y, después de haber seleccionados los posibles clones positivos por análisis de restricción, se procedió a la comprobación por secuenciación de las dos hebras de ADN.

Las construcciones de los cADN que codifican para las Cx26, Cx32, Cx30, Cx31.3 y Cx43 humanas ya estaban disponibles en nuestro laboratorio.

3.1.4. Reclonaje de los cADNs de Cx47 Met1&4 y Met4 y de los mutantes de PMLD1 en el vector de expresión pIRES.

El vector pIRES utilizado para los clonajes y posterior transfección en las células N2A contiene EGFP, como gen reportador. Las construcciones en el vector de expresión para las células se hicieron por clonaje dirigido mediante doble

CRIBADO MUTACIONAL DE LA ORF DE LA Cx47 EN PACIENTES DE PMLD



CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR:

FRAGMENTO "A" (897 bp)

A Dcha: 5' accgcccgccgccc 3'

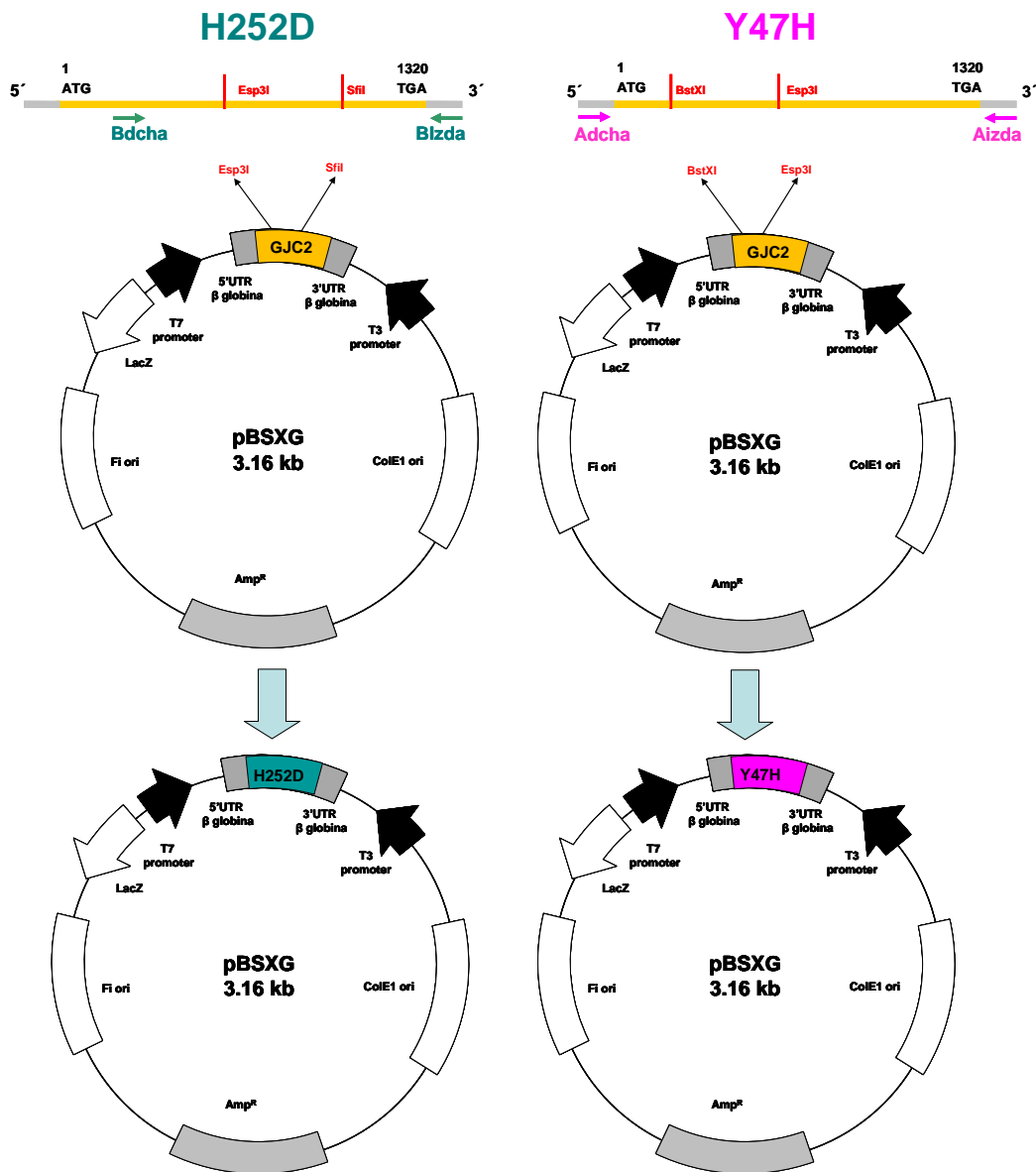
A Izda Dir.: 5' gctgcccaagcccaggtgggccatctc 3'

FRAGMENTO "B" (1161 bp)

B Dcha: 5' actagtctgggtcatgtacctgggctacgcc 3'

B Izda.: 5' gaggccaccggctaaggagaaggctga 3'

Figura 5. Estrategia para el cribado mutacional de los mutantes de la Cx47 humana. El cribado mutacional del gen *GJC2* que codifica para la Cx47 se llevó a cabo amplificando la región codificante de la Cx47 en dos fragmentos parcialmente solapantes (A y B) de 897 pb y 1161 pb utilizando los cebadores indicados para cada fragmento.



CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR:

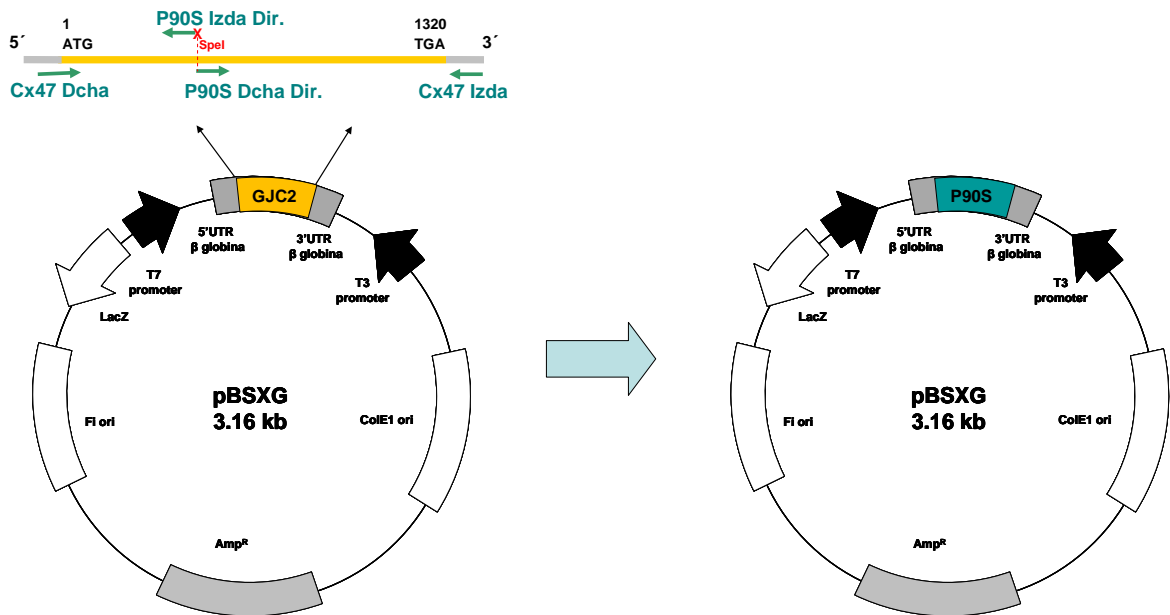
Y47H
Adcha: 5' acccgcccgccgccc 3'
Aizda: 5' gctgccaagcccaggctggccatctc 3'

H252D
Bdcha: 5' actagttcggatcatgtacctgggctacgcc 3'
Bizda: 5' gaggccaccggctaaggagaaggctga 3'

CEBADORES UTILIZADOS PARA SECUENCIAR:
T7: 5' aatacgaactcactatagg 3'
2F: 5' ctgcgacaacgtctgctatg 3'
Y2: 5' tctactagttatggacgtgtgca 3'

Figura 6. Estrategia de clonaje de los mutantes de la Cx47 humana en el vector de expresión para oocitos pBSXG. Los dos mutantes H252D e Y47H fueron obtenidos mediante amplificación por PCR de la región codificante en dos fragmentos solapantes: A y B, utilizando los cebadores indicados: A dcha, Aizda, para el fragmento A y Bdcha y Bizda para el fragmento B. Los fragmentos mutados se clonaron de forma dirigida mediante digestión con las enzimas: Esp3I y SfiI en el caso del mutante H252D y Esp3I y BstXI en el caso del mutante Y47H en el vector de expresión Cx47-pBSXG, a su vez digerido con las mismas enzimas.

P90S



CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR:

FRAGMENTO "A"

Cx47 Dcha: 5' acccgccccgccgccc 3'

P90S Izda Dir.: 5' actagtgagatgaccacaatctggaagacc 3'

FRAGMENTO "B"

P90S Dcha Dir.: 5' actagttcggatcatgtacctgggctacgcc 3'

Cx47 Izda.: 5' gaggccaccggctaaggagaaggctga 3'

CEBADORES UTILIZADOS PARA SECUENCIAR:

T7: 5' aatacgactcactatagg 3'

2F: 5' ctgcgacaacgtctgctatg 3'

Y2: 5' tctactagtattgacgtgtca 3'

Figura 7. Estrategia de clonaje del mutante P90S de la Cx47 humana en el vector de expresión para oocitos pBSXG. El mutante P90S fue obtenido mediante amplificación por PCR de la región codificante en dos fragmentos A y B, utilizando los cebadores indicados: Cx47dcha, P90SIzdaDir (que presenta la mutación y una diana SpeI en el extremo), para el fragmento A y P90SDchaDir (con la diana SpeI en el extremo) y Cx47Izda para el fragmento B. Los fragmentos se ligaron y el inserto resultante se clonó en el sitio StuI del plásmido pBSXG.

digestión del vector pIRES2-EGFP (Clontech) y de las diferentes conexinas, clonadas en el vector pBSXG, con las enzimas *SacI* y *EcoRI* (Fig. 9).

3.1.5. Reclonaje del cADN de Cx43 en el vector de expresión pIRES.

Después de la amplificación por PCR de la proteína dsRED-express del vector SF91 con cebadores que contienen enzimas de restricción en los extremos, la proteína dsREDexpress fue clonada de manera dirigida, en el vector pIRES al que se le había eliminado previamente por PCR la proteína EGFP con cebadores que contienen las mismas enzimas de restricción en los extremos (Fig. 8). El vector pIRES-dsRED así obtenido, fue utilizado para el clonaje de la Cx43 y posterior transfección en las células N2A conteniendo dsREDexpress, como gen reportador. La construcción de la Cx43 se hizo por clonaje dirigido mediante doble digestión del vector pIRES2-dsRED (Clontech) y de la Cx43 clonada en el vector pBSXG, con las enzimas *SacI* y *EcoRI* (Fig. 8).

3.2. Expresión en el sistema de pares de oocitos de *Xenopus*.

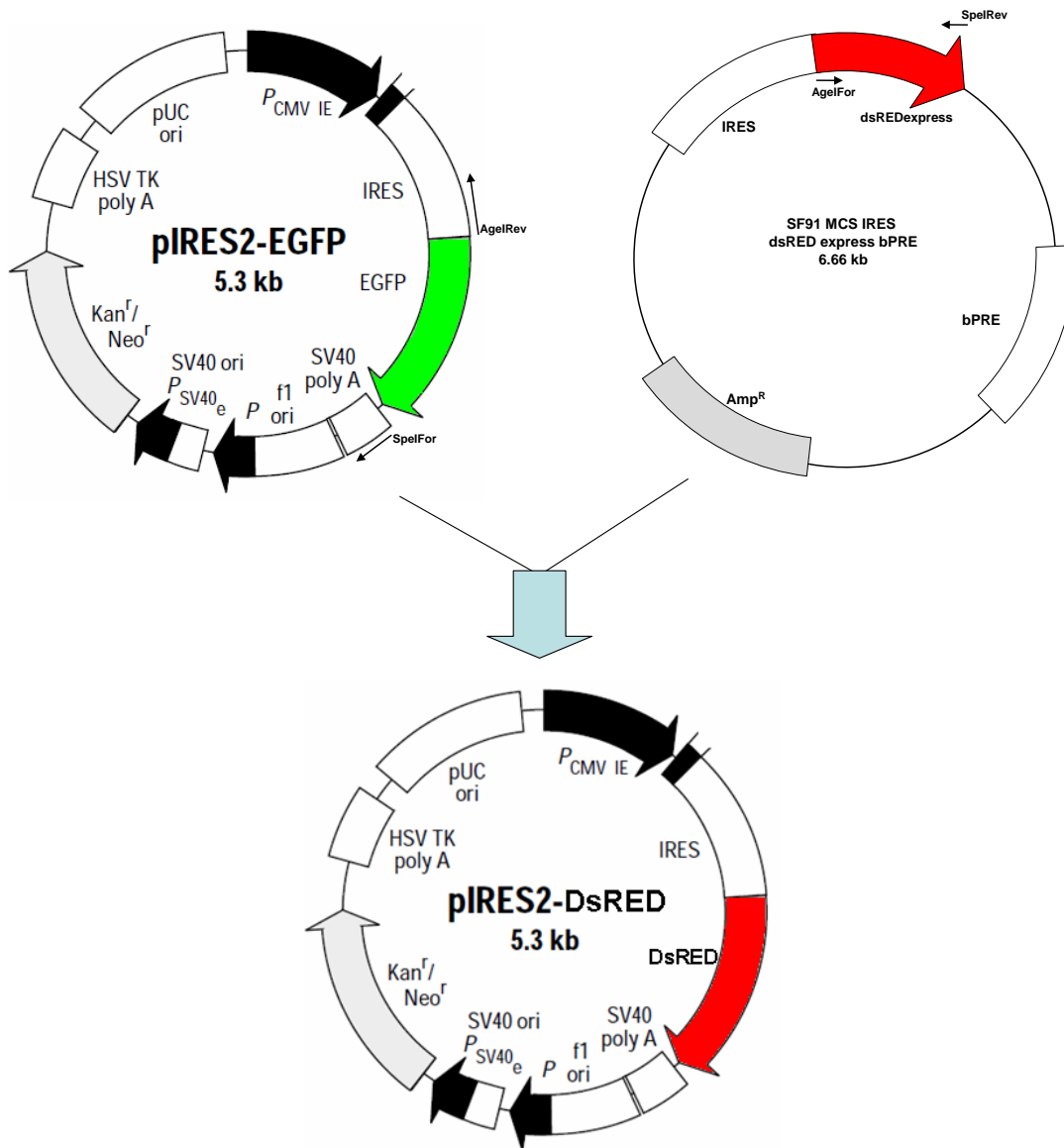
3.2.1. Transcripción *in vitro* de los ARNs.

La síntesis *in vitro* de los mARNs se realizó a partir de 20 µg de plásmido pBSXG linearizado con la enzima *SalI*, que solo realiza un corte, no tiene diana en el promotor que vamos a utilizar para transcribir el inserto y deja un extremo 5' protuberante (que reconocerá la RNA polimerasa). Posteriormente se purifica el ADN digerido utilizando el kit de purificación "QUIAquick PCR purification kit", de la casa QUIAGEN (Nº ref: 28104) y se lleva a cabo la reacción de transcripción utilizando el análogo capping m⁷G(5')ppp(5')G y la ARN polimerasa T7 para la Cx47, la Cx30, la Cx31.3, la Cx43, la Cx32, la Cx36, los mutantes Y47H, H252D, P90S, y la polimerasa T3 para la Cx26. Una vez finalizada la reacción de transcripción, el ADN molde se digirió con una ADNasa libre de ARNsas y se procedió a la purificación del ARN, mediante el kit Rneasy de Qiagen de purificación de mARN (Ref.74106, QUIAGEN). Al final se comprobó la integridad del mARN en un gel de formaldehído y se calculó la concentración y la pureza a partir de las medidas de absorbancia en 260 nm y 280 nm. Únicamente los mARNs con una relación 260/280 nm en un rango entre 1.8 y 2.0 fueron utilizados en los experimentos de expresión en los oocitos.

3.2.2. Preparación de los oocitos y microinyección.

Los sapos hembras de la especie *Xenopus laevis* se anestesiaron con ácido

ESQUEMA DE CLONAJE DE LA PROTEÍNA dsREDexpress EN EL VECTOR PIRES



CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR:

Eliminación EGFP (4580 bp)

SpeI For: 5' actagtagcggccgactctagatcataa 3'

AgeI Rev: 5' accggtggtgtggccatattatcatc 3'

dsREDexpress (670 bp)

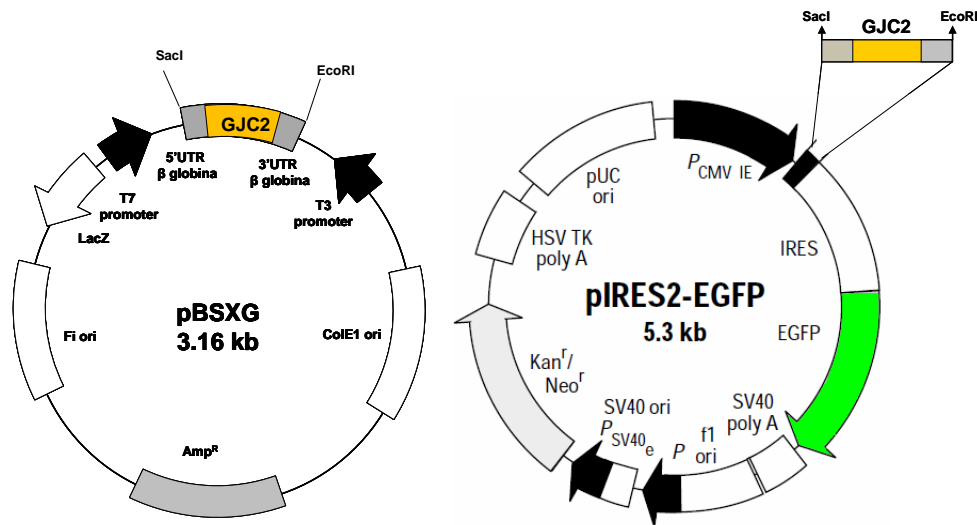
AgeI For: 5' accggtatggcctcctccgaggacgtcat 3'

SpeI Rev: 5' actagtcaggaacaggtggtggcg 3'

Figura 8. Estrategia de clonaje de la proteína dsREDexpress en el vector pIRES. La proteína dsRED-express fue amplificada por PCR del vector SF91 con cebadores que contienen enzimas de restricción (AgeI y SpeI) en los extremos y fue clonada, de manera dirigida, en el vector pIRES al que se le había eliminado previamente por PCR la proteína EGFP con cebadores que contienen las mismas enzimas de restricción AgeI y SpeI en los extremos.

ESQUEMA DE CLONAJE EN LOS VECTORES PIRES-EGFP Y PIRES-dSREdExpress

A



B

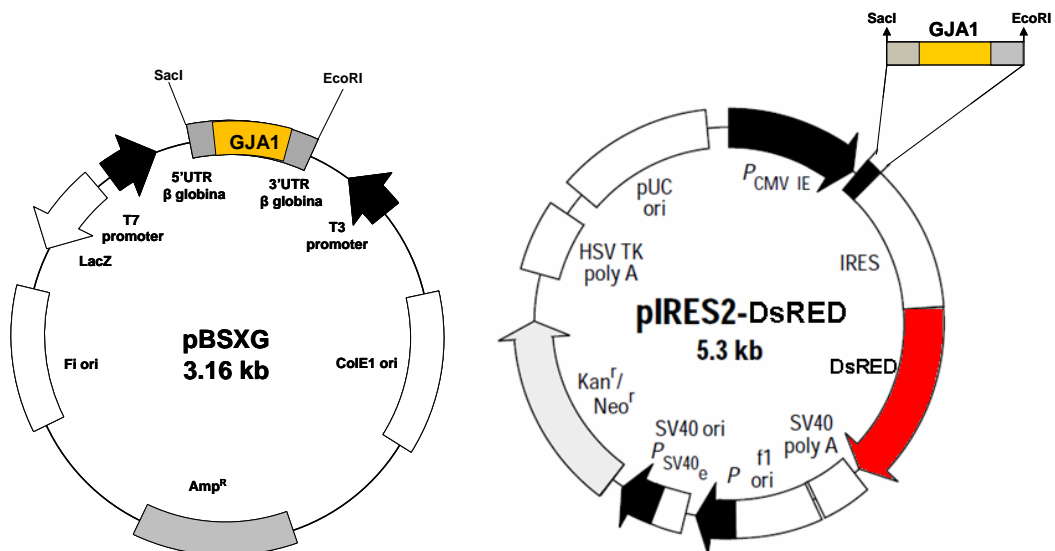


Figura 9. Estrategia de clonaje en los vectores pIRES-EGFP y pIRES-REdExpress. A) Esquema de clonaje de la Cx47 humana y de los mutantes de PMLD1 en el vector de expresión para células N2A pIRES-EGFP. La Cx47 humana y los mutantes de PMLD1 fueron clonados en el vector pIRES-EGFP mediante clonaje dirigido por digestión con las enzimas SacI y EcoRI. El vector tiene la proteína EGFP como gen reportador y que se expresa en verde. **B) Esquema de clonaje de la Cx43 humana en el vector de expresión para células N2A pIRES-dsREdExpress.** La Cx43 humana fue clonada en el vector pIRES-dsREdExpress mediante clonaje dirigido por digestión con las enzimas SacI y EcoRI. El vector tiene la proteína dsREdExpress como gen reportador y que se expresa en rojo.

3-aminobenzoico-etil-éster, y se les extrajo mediante cirugía parte de los lobúlos del ovario. Se trocearon y fueron digeridos con colagenasa 1A (2 µg/ml; Sigma) durante una hora. A continuación, bajo lupa, se quitó la capa folicular y se seleccionaron oocitos en estadio de maduración fase V y VI. 24 h después de ser extraídos, los oocitos se micro-inyectaron con un único tipo de mARN o con una combinación de mARN silvestre y mutante (50 ng/oocito) del mARN a ensayar junto con un oligonucleótido antisentido dirigido contra el mARN de la Cx38 endógena (GCTTAGTAATCCCCATCCTGCCATGTTTC) de *Xenopus* (1 µg/µl), que bloquea la expresión endógena (Barrio y col., 1991). Los oocitos inyectados con los mARNs correspondientes a cada una de las conexinas a ensayar, silvestres y mutantes, se dividieron en dos grupos. En el primer grupo, los oocitos se mantuvieron aislados y se utilizaron o bien para evaluar la capacidad para formación de los precursores del canal, los hemicanales, mediante estudios de captación de colorante o mediante estudios de las corrientes de hemicanales por técnicas de fijación de voltaje o bien para la extracción de proteína y la valoración de los niveles de expresión total y en la membrana celular.

En el otro grupo, los oocitos fueron puestos en contacto por pares para permitir la formación de canales intercelulares. 24 horas después de la inyección los oocitos se sometieron a un choque hipertónico (en mM: 200 aspartato-K, 20 KCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, pH=7.4) (Methfessel y col., 1986) para poder eliminar manualmente la membrana vitelina y se pusieron en contacto por pares sobre una superficie de agar al 2%. Los oocitos se incubaron a 18°C en la solución ND96 (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato; pH 7.40) suplementado con penicilina/estreptomicina (10 ml/L; Invitrogen) hasta su registro electrofisiológico, 24-48 horas después del apareamiento.

En estos experimentos se aparearon oocitos que se habían inyectado con el mismo mARN, para inducir la formación de canales homotípicos y heterotípicos-homoméricos, o con una mezcla de mARNs, silvestre y mutante, combinándolos homotípicamente o heterotípicamente con oocitos inyectados con una conexina silvestre o mutante. La funcionalidad de los canales intercelulares que se pueden formar en las distintas combinaciones ensayadas, que en el caso de los mutantes de PMLD1, simulan la condición de homocigosis de los pacientes y de heterocigosis de los portadores, se valora midiendo la corriente intercelular que fluye de una célula a la vecina mediante la técnica de doble fijación de voltaje.

3.3. Western blot y biotinilación.

Para determinar los niveles de expresión total y en la superficie celular de la Cx47 humana y de los diferentes mutantes se utilizaron técnicas de western blot y de biotinilación. La secuencia de la Cx47 humana tiene en sus asas extracelulares dos lisinas susceptibles de ser biotiniladas (la K53 y la K264). En cada experimento se hicieron dos grupos de 25-30 oocitos, 48 horas después de la micro-inyección con el mRNA. En un grupo de oocitos, las proteínas de la superficie celular fueron biotiniladas con 1.5 mg/ml de sulfo-N-hidrosuccinamida-SS-biotina (Pierce), que no permea a través de la membrana, en una solución de ND96 pH=8 durante 30 min a 4°C. A continuación, se hicieron 5 lavados con una solución 100 mM glicina para bloquear la reacción de la biotinilación. El otro grupo se utiliza como control, procesándose de forma similar pero sin añadir biotina. Posteriormente, los oocitos se homogeneizaron con agujas G25 en un volumen de 350 µl con una solución de lisis (0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1mM PMSF y 25 µg/ml leupeptina, pH=8) durante 30 min a 4°C, y el homogenizado se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. Se cogió el sobrenadante y de él se tomó una alícuota de 15 µl como muestra de proteína total y el resto del sobrenadante se incubó con 300 µl de nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos de biotina-estreptavidina se lavaron cinco veces con PBS (1X). El pellet final se resuspendió en 50 µl de tampón de carga (10% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris, 0.1% azul de bromofenol, 5% mercapto-etanol) y se calentó dos horas a 25°C para romper las uniones disulfuro.

Antes de cargar el gel, las muestras se calentaron a 95°C 5 min y se dejaron 10 min en hielo, finalmente las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Después de ser tratadas con la solución de bloqueo (5% de leche en polvo en 1% de TBS (pH 7.6) y 0.1% Tween20) durante 1 h a temperatura ambiente, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario de conejo dirigido contra el dominio del CT (residuos 344-399) de la Cx47 humana a una dilución 1:5000 (suministrado por J. Orthmann-Murhy). Después de varios lavados, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa a una dilución 1/10.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se detectaron con kits de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences; Supersignal Pico y

Supersignal Femto, Pierce). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (ImageQuant TL software V. 2003.02; Amersham Biosciences).

3.4. Técnica de captación de colorante en oocitos.

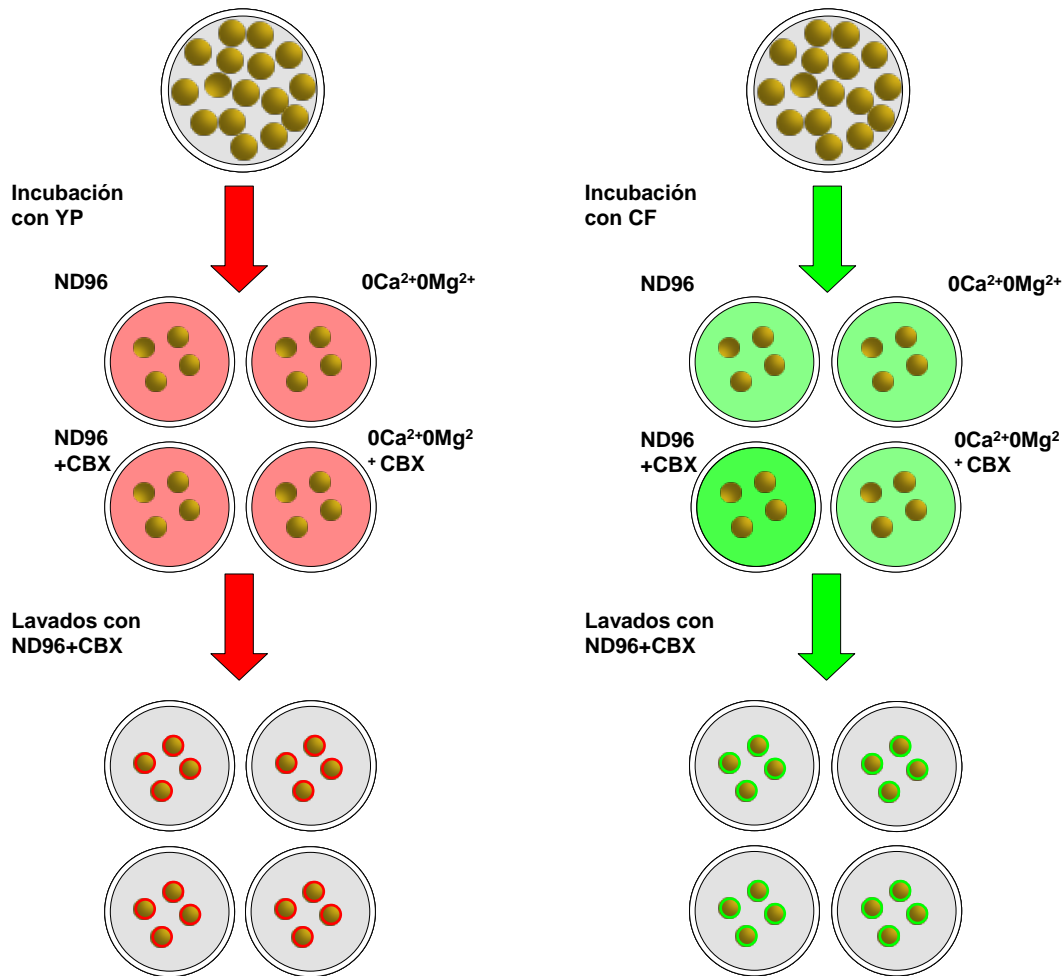
Para evaluar la conductividad de la membrana celular de los hemicanales se usó la técnica de captación de colorante. Se utilizaron los oocitos inyectados 48 horas antes con los mARNs correspondientes a la Cx47 silvestre y a los mutantes de PMLD1 que se habían mantenido aislados y como control oocitos que solo habían sido inyectados con el oligonucleótido antisentido. Con cada tipo de oocito se hicieron cuatro grupos que fueron incubados en medio ND96 con Ca^{2+} y Mg^{2+} , en medio ND96 sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , en medio ND96 con Ca^{2+} y Mg^{2+} y carbenoxolona 500 μM y en medio ND96 sin Ca^{2+} y Mg^{2+} con carbenoxolona 500 μM . Cada uno de estos grupos se incubaron con los colorantes: 1,5 mM de yoduro de propidio (YP) y 1,5 mM de carboxifluoresceína (CF) durante una hora a 18 °C (Fig. 10). Posteriormente se llevaron a cabo seis y diez lavados, respectivamente para el YP y la CF, con medio ND96 con Ca^{2+} y Mg^{2+} y con carbenoxolona 500 μM y a continuación se adquirieron las imágenes de fluorescencia con un microscopio confocal (con el objetivo x 20) excitando los oocitos incubados con YP a 568 nm y captando la emisión a 640 nm y con CF a 488 nm y captando a 540 nm. La intensidad de la captación obtenida se cuantificó por densitometría con el programa Image J. Para ello se elige una zona de interés de la membrana plasmática del oocito, donde se acumula el colorante y otra zona del mismo tamaño que el anterior, fuera del oocito para la señal de fondo y los valores de intensidad de color así obtenidos se promedian y se comparan entre sí.

3.5. Electrofisiología.

Los oocitos inyectados con los diferentes mARNs fueron registrados entre las 24 y 48 horas después de la inyección en la solución extracelular ND96. Los registros electrofisiológicos se obtuvieron mediante técnicas de fijación de voltaje con dos electrodos, uno de voltaje y uno de corriente para los oocitos aislados y de doble fijación de voltaje para los oocitos apareados.

Se utilizaron microelectrodos de registro rellenos de una solución 2M de KCl, 10 mM de EGTA y 10 mM de HEPES a pH=7.2 y con una resistencia de 0.5-1 M Ω . Todas las medidas electrofisiológicas se realizaron mediante dos amplificadores TEV-

A



B

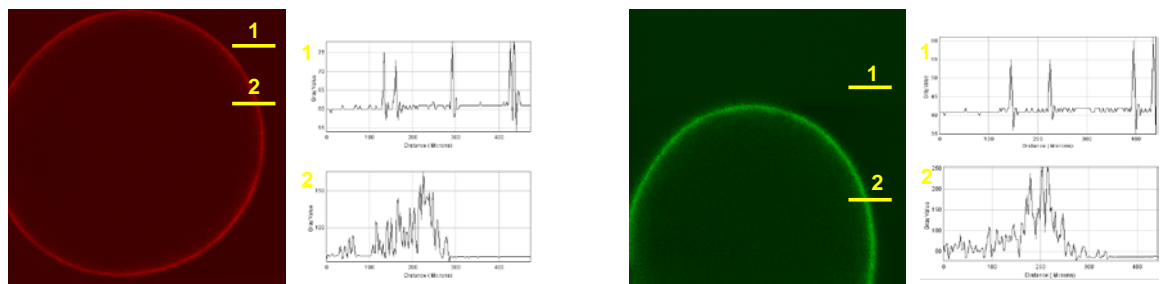


Figura 10. A) Esquema del protocolo de captación de colorante. Los oocitos se dividieron en cuatro grupos, cada uno correspondiente a un medio diferente: con ND96, con ND96 y CBX 500 μ M, con 0 mM Ca^{2+} 0 mM Mg^{2+} y con 0 mM Ca^{2+} 0 mM Mg^{2+} y CBX 500 μ M y se incubaron con los colorantes 1.5 mM YP y CF durante 1 h a 18 $^{\circ}$ C. Pasado ese tiempo se lavaron con ND96+ CBX y se adquirieron las imágenes con microscopio confocal. **B) Cuantificación de la intensidad de captación.** La intensidad de captación de colorantes se cuantificó por densitometría con el programa Image J, eligiendo una zona de la membrana plasmática del oocito, donde se acumula el colorante y otra zona del mismo tamaño que el anterior, fuera del oocito; los valores de intensidad de color así obtenidos se promedian y se comparan entre sí.

200 (Dagan) conectados a un ordenador a través una tarjeta analógica-digital (TL-1) y utilizando el programa pClamp5.0 (Axon).

3.5.1. Medida macroscópica de las corrientes de los hemicanales y de los canales intercelulares.

En el estudio de los hemicanales funcionales, los oocitos se colocan en una cámara de perfusión rápida (de 500 μ l, 2 ml/min) y se empala cada oocito con dos electrodos, para medir, una vez recuperados, el potencial de membrana y la resistencia de entrada. A continuación se registran las corrientes transmembrana mediante la técnica de fijación de voltaje. Típicamente el potencial de membrana de los oocitos se mantiene a un voltaje de -40 mV, próximo al potencial de membrana en reposo, y se aplicaron pulsos despolarizantes hasta +80 mV, en incrementos de 20 mV y de 2 s de duración, inicialmente en una solución de ND96 con una concentración normal de divalentes (1.8 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}), y luego en una solución ND96 con baja concentración de cationes divalentes, no añadiendo Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}) o Mg^{2+} (1.8 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+}) y en condiciones de bajo calcio y magnesio (0 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+}). La aplicación de estos protocolos produce típicamente en las células que expresan hemicanales funcionales, corrientes de salida de lenta activación con los pulsos de polaridad positiva, que se hacen de entrada y se cierran cuando el potencial vuelve al valor de fijación (-40 mV). Para poder determinar la compleja dependencia de voltaje de los hemicanales (Fasciani y col., 2013) se llevaron a cabo además protocolos en los que los oocitos fueron mantenidos a un voltaje de 0 mV y se estudiaron las corrientes obtenidas en respuesta a la aplicación de pulsos positivos y negativos de ± 100 mV, en incrementos de 20 mV y de 2 s de duración. Para poder separar las corrientes de hemicanales de las corrientes endógenas de los oocitos, en paralelo se registraron, aplicando los mismos protocolos en similares condiciones experimentales, oocitos controles en los que se habían suprimido los hemicanales endógenos de XCx38 inyectando únicamente el oligonucleótido antisentido dirigido contra la Cx endógena. Las corrientes transmembrana se atribuyeron a la activación de los hemicanales, basándonos en la amplitud de las corrientes, en sus características únicas (dependencia de voltaje y potencial de reversión) y en el incremento de permeabilidad de la membrana a colorantes (CF e YP) y en el hecho de que la utilización de agentes bloqueantes de hemicanales como son la acidosis o la carbenoxolona (500 μ M) suprimen casi completamente y de forma reversible la conductancia de los hemicanales.

Las gráficas de corriente/voltaje (I_m/V_m) que se construyeron en respuesta a pulsos de voltaje de hasta +80 mV en incrementos de 20 mV y de 2 s de duración, se obtuvieron representando la corriente en el estado estacionario (I_s) y la inicial (I_i) respecto al respectivo pulso de voltaje.

La capacidad para formar canales intercelulares y el nivel de canales formados se estimó a partir de la medida de las corrientes intercelulares mediante la técnica de doble fijación de voltaje. El procedimiento para medir las corrientes intercelulares (I_j) fue el siguiente. Primero, se fija el potencial de membrana (V_m) de los dos oocitos en un mismo valor, generalmente a -40 mV; en esta condición el voltaje intercelular definido por la diferencia de potencial entre el interior de una célula respecto al potencial de la célula vecina, es igual a cero ($V_j = V_1 - V_2$). A continuación, se aplica un pulso de voltaje (V_1) en uno de los oocitos (O_1) mientras que en el otro (O_2) el voltaje permanece en el mismo valor ($V_2 = -40$ mV), creándose así un gradiente de voltaje entre las dos células, y se mide la corriente (I_2) que es necesario inyectar en el O_2 para mantener su voltaje fijo. La corriente I_2 es igual en magnitud pero del signo opuesto a la corriente que fluye a través de los canales intercelulares del oocito 1 al 2 ($I_j = -I_2$), y la conductancia intercelular (g_j) se calcula de acuerdo a la ley de Ohm como $g_j = I_j/V_j$.

3.5.2. Procesamiento de las señales electrofisiológicas.

Para el cálculo de la conductancia macroscópica atribuible a los hemicanales (g_{hj}) se utilizaron los valores de las corrientes obtenidos en el voltaje de fijación (0 mV). El cálculo de la conductancia macroscópica para cada pulso de voltaje fue obtenido midiendo el valor de la corriente inicial y de estado estacionario. El valor de la conductancia fue obtenido mediante la ecuación $g_{hj} = I_{hj}/V_m - E_r$, siendo E_r el potencial de reversión del hemicanal. El potencial de reversión se determinó estimándose el valor del potencial al cuál se produce la inversión de las corrientes. Los valores se normalizaron respecto al de mayor conductancia en cada registro.

Las curvas G_j/V_j de dependencia de voltaje de los canales intercelulares, representando el valor de la conductancia inicial (g_{j0}) y la conductancia en estado estacionario (g_{jss}) normalizada respecto a su valor durante un prepulso de +10 mV, se construyeron en respuesta a pulsos de V_j entre ± 120 mV, aplicados en incrementos de 20 mV y de 5 s de duración.

Tanto para los hemicanales como para los canales intercelulares, los valores promedio de la curva se ajustaron a una ecuación de Boltzmann de la forma:

$$G_{iss} = \{ (G_{jmax} - G_{jmin}) / (1 + \exp[A(V_j - V_o)]) \} + G_{jmin}$$

en la que la A es la pendiente o sensibilidad del voltaje de la curva, una constante definida como $A = zq/kT$, que refleja el número (z) de cargas equivalentes de electrón (q) que se mueven a través de todo el campo eléctrico de la membrana asociadas al sensor de voltaje (a 20°C $kT/q = 25.26$ mV); el V_o es el valor de V_j en el que la conductancia se reduce a la mitad y la G_{jmax} y G_{jmin} son la conductancia máxima y la conductancia residual respectivamente. Esta función aplica para transiciones entre dos estados del canal con una diferencia de energía entre ellos que depende linealmente del voltaje (Harris y col., 1981 y Spray y col., 1981). Aún cuando no todos los canales estudiados en este trabajo siguen una cinética de primer orden, su dependencia de voltaje ha sido caracterizada con fines comparativos con una función de Boltzmann. Para el ajuste de las curvas G_j/V_j a una ecuación de Boltzmann, las constantes G_{jmax} , G_{jmin} , A y V_o se trataron como parámetros libres y se aplicó el método interactivo de error de mínimos-cuadrados (Sigma-Plot). El curso temporal de las corrientes de los hemicanales y de los canales se ajustaron a una exponencial o a la suma de dos exponenciales con un coeficiente de correlación $R > 0.99$ (Clampfit pCLAMP Axon) con la siguiente forma:

$$I_j = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} + A_r$$

en donde las constantes A_1 y A_2 corresponden a la amplitud de la corriente de los componentes rápido y lento y A_r es el valor de estado de la corriente.

3.6. Expresión en las células.

Las células de la línea celular Neuro2A (ATCC, CCL131), una línea deficiente en conexinas endógenas, se crecieron en medio Dulbecco (DMEM, Life Technologies), suplementado con el 10 % de suero fetal bovino (SFB), 4.5 g/l de glucosa, 4 mM l-glutamina, 110 mg/l piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina y estreptomycin y en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y a 37°C. La transfección se realizó mediante la técnica de la lipofectamina (Lipofectamine 2000 complex solution Life Technologies) y se llevó a cabo incubando, durante 30 min a temperatura ambiente, 3 µg de vector pIRES-EGFP y 2 µl/µg de ADN de lipofectamina en OptiMem (Life Technologies). Las células, en estado de confluencia entre el 60 y 80%, se incubaron primero con la mezcla de lipofectamina y el vector pIRES-EGFP toda la noche a 37°C y al día siguiente, se lavaron dos veces con DMEM modificado y se dejaron 24-48 horas más a 37 °C, para ser procesadas para inmunocitoquímica y para estudios de acoplamiento por colorante.

3.7. Inmunocitoquímica.

Las células transfectadas y crecidas sobre cubres (1 mm de diametro), se lavaron dos veces con PBS (1X) y primero se prefijaron con paraformaldeído al 2% a 4 °C y luego con etanol acético (95%/5%) 10 min a -20°C. A continuación se lavaron con PBS (1X) y se trataron con la solución de bloqueo (25mM EDTANa, 1% gelatina de pez, 0.05% NP40, 1% BSA-Igfree, 1% suero de cabra) durante 30 min a temperatura ambiente, antes de ser incubadas con el anticuerpo primario, disuelto en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. En el caso de la Cx47 silvestre y de los mutantes se usó un anticuerpo de conejo dirigido contra el dominio del CT (residuos 344-399) de la Cx47 humana a una dilución 1:1500 (suministrado por J. Orthmann-Murhy); para la Cx43 se utilizó un anticuerpo de ratón a una dilución 1:500 (Chemicon Ref. MAB3068). Después de dos lavados con PBS (1X), las células se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente; en el caso de la Cx47 se utilizó un anticuerpo anti-conejo alexa verde a una dilución 1/500 (Invitrogen Alexa Fluor 488nm Ref. A11034) y para la Cx43, un anticuerpo anti-ratón rhodamina a una dilución de 1:50 (Jackson Ref.115-295-062). Finalmente las células se lavaron dos veces más con PBS (1X), una vez con agua y los cubres se montaron (ProlongGold Invitrogen Ref. P36930) en portaobjetos.

3.8. Técnica de acoplamiento por colorante.

Los estudios de permeabilidad de los canales formados por las diferentes conexas y los mutantes de PMLD1 expresados en las células N2A, fueron llevados a cabo mediante la técnica de difusión intracelular de colorantes utilizando la 5-6 carboxifluoresceína (CF) cargada negativamente (-2) y con un peso molecular de 376 Da (5% CF en 0.1 M de acetato potásico) y el yoduro de propidio (YP) cargado positivamente (+2) y con un peso molecular de 441 Da, (10mg/ml en LiCl 1 M). Las células positivas a EGFP (en verde) y a dsREDexpress (en rojo) fueron empaladas con un microelectrodo, con una resistencia entre 200 y 400 MΩ relleno con el colorante, que fue inyectado en el caso de la CF con corriente negativa durante 10 min y en el caso de YP con corriente positiva durante 20 min.

Utilizando un microscopio confocal y el programa de curso temporal Lasersharpe (MRC-1024, BioRad), primero se eligieron las regiones de interés (ROI), una correspondiente a la célula que se iba a inyectar y otras correspondientes a las células en contacto con la inyectada y también se utilizó un ROI adicional para la señal de fondo, con el fin de minimizar al máximo la señal emitida por las registradas

EGFP y dsREDexpress. Antes de inyectar la célula, se reduce la ganancia de los fotomultiplicadores por debajo del 20% del rango dinámico de detección (de 0-250), que se tomará como valor basal. Se excitó a 568 nm para el YP y a 488 nm para la CF y midiendo la fluorescencia emitida a 640/40 nm y a 540/40 nm con dos fotodetectores, se estudió el curso temporal del paso de colorante desde la célula inyectada hasta las células adyacentes.

La cuantificación del paso de colorante de una célula a otra fue llevada a cabo calculando el nivel de expresión del EGFP y del dsREDexpress, estimado a partir de la intensidad de fluorescencia promedio de la proteína verde y de la roja en el par de células estudiadas. Este valor de intensidad ha sido correlacionado con el coeficiente de transferencia, calculado como la relación de intensidad del colorante en la célula aceptora (A) respecto al de la célula inyectada o donadora (D), (coeficiente A/D).

3.9. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis cuantitativo donde se calculó la media $\bar{x} \pm$ el error estándar (s.e.) para cada grupo en cada experimento. Las diferencias entre los grupos han sido evaluadas mediante el test de Student y en el caso de distribución no gaussiana con el test de ANOVA. Todos los valores con una $p < 0.05$ se han considerado estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

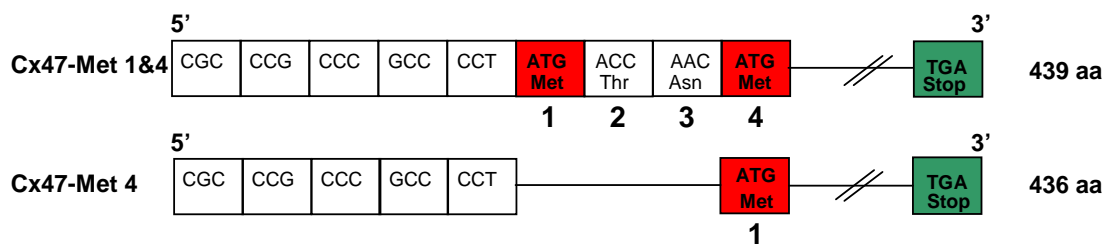
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CANALES FORMADOS POR LA Cx47 OLIGODENDROCITARIA HUMANA. IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INICIACIÓN.

4.1.1. Biosíntesis de los hemicanales y canales de Cx47-Met1&4 y -Met4.

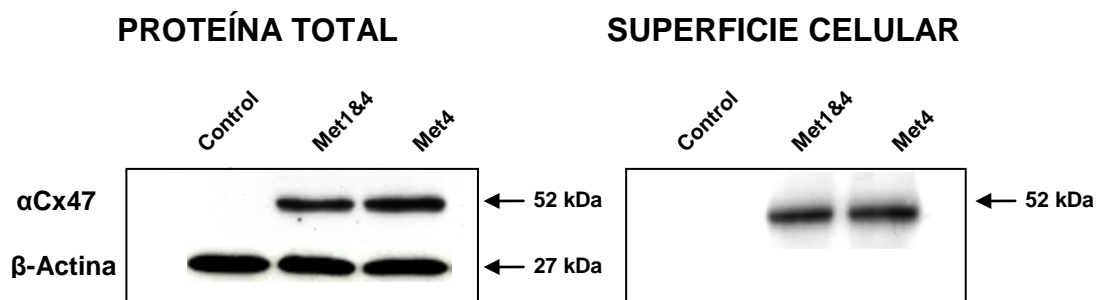
El mRNA que codifica para la Cx47 humana presenta dos posibles metioninas iniciadoras para la traducción de la proteína separadas entre sí por solo dos otros aminoácidos. Para poder determinar experimentalmente cuál es la metionina iniciadora utilizamos dos versiones de mRNA que hemos denominado Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4. La construcción Met1&4 contiene los dos tripletes AUG en los codones 1 y 4 y en la construcción Met4 se eliminaron los tres primeros codones con la finalidad de que la transducción de la Cx47 únicamente se pudiera iniciar en la segunda metionina (Fig. 11, A). Con ambas construcciones se llevaron a cabo estudios de expresión, localización subcelular y estudios de funcionalidad de los hemicanales y de los canales intercelulares en el sistema de los oocitos de *Xenopus laevis* y en las células N2A.

Los oocitos se inyectaron con el mRNA de la Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 junto con el oligonucleótido antisentido dirigido contra la Cx38 para bloquear la expresión endógena de conexina (Barrio y col., 1991) y en el grupo de los oocitos control solo con el oligonucleótido antisentido. Los oocitos inyectados se procesaron a las 48 horas para determinar el nivel de expresión total y en la superficie celular mediante estudios de western blot (Fig. 11, A y B). En los geles de SDS correspondientes al lisado de los oocitos inyectados con los mARNs Cx47-Met1&4 y Met4 se identificó una banda de similar intensidad con un peso molecular aparente de ~52 kDa, que no estaba presente en el grupo control (Fig. 11, B), y que podría corresponder a la forma monomérica de la Cx47 (Orthmann-Murphy, 2007), indicando que la proteína Cx47 fue capaz de sintetizarse a partir de ambas construcciones sin diferencias en su nivel de expresión, sugiriendo una similar eficacia de síntesis y de degradación. Las proteínas Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 sintetizadas fueron detectadas también en la superficie celular con niveles muy similares mediante la técnica de biotinización (Fig. 11, B), indicando que tampoco existe entre ellas diferencias en su transporte a membrana celular y sugiriendo que las Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 son capaces de expresar hemicanales en la membrana plasmática. En el sistema de células N2A se analizó por inmunocitoquímica la localización subcelular de las dos proteínas sintetizadas a partir de las dos construcciones. En ambos casos, la proteína fue detectada tanto en

A



B



C

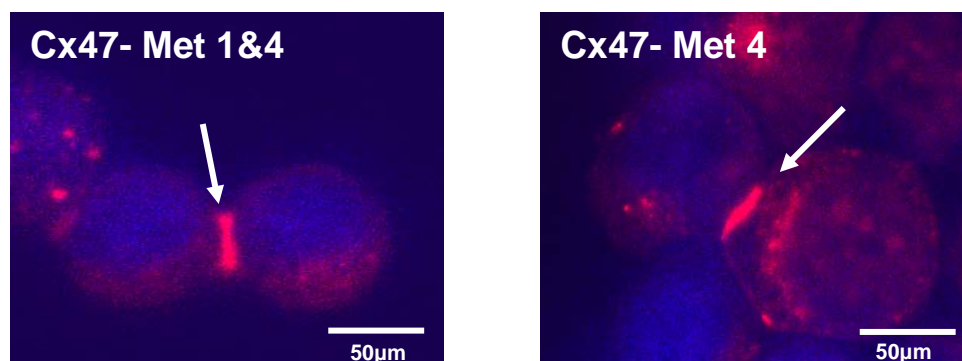


Figura 11. Identificación del sitio de inicio de la traducción de la Cx47 humana. A) Construcciones diseñadas para identificar el sitio de iniciación; la construcción Cx47-Met1&4 contiene dos tripletes ATG iniciadores en los codones 1 y 4, mientras que en la construcción Cx47-Met4 se han eliminado los tres primeros codones para forzar la síntesis de la proteína a partir de la segunda metionina, originando la delección de los tres primeros aminoácidos (MTN) y una proteína con 436 aa. en lugar de los 439 aa. que se obtendrían si la síntesis se iniciara en la primera metionina. **B) Niveles de expresión total y en la superficie celular de las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4.** Los western blots de proteína total y de proteína en la membrana celular de los oocitos inyectados con la Cx47-Met1&4 y Met4, pero no en el control, muestran una banda de 52 kDa de similar intensidad, indicando que las proteínas sintetizadas a partir de los dos tipos de mRNA se procesan de forma similar. **C) Localización subcelular de la Cx47 humana por inmunocitoquímica;** las imágenes de microscopía confocal muestran el mismo patrón de localización intracelular y la formación de placas o "uniones en hendidura" en las zonas de contacto entre las células (flechas).

el citoplasma como en la superficie celular formando placas en las zonas de contacto entre las células que sugieren la formación de uniones en hendidura por la agregación de multitud de canales intercelulares (Fig. 11, C).

4.1.2. Hemicanales y canales intercelulares formados por las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4.

Los estudios de biosíntesis de las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4 indican que ambas proteínas podrían formar hemicanales en la superficie celular y que cuando las células contactan entre sí, esos hemicanales podrían unirse y formar canales intercelulares. La capacidad de las dos construcciones de la Cx47 para formar hemicanales o/y canales intercelulares funcionales se evaluó por técnicas electrofisiológicas en el sistema de los oocitos. Los oocitos se inyectaron con la misma concentración de mRNA Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 a idéntica concentración, y como grupo control se utilizaron oocitos inyectados solamente con el oligonucleótido antisentido -XCx38. En cada experimento se hicieron dos grupos: en un grupo, los oocitos se mantuvieron aislados para explorar la funcionalidad de los hemicanales, y en el otro grupo, los oocitos se pusieron en contacto por pares para permitir la formación de canales intercelulares.

4.1.2.1. Propiedades electrofisiológicas de los hemicanales de Cx47 humana.

Mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos se midieron las corrientes transmembrana originadas por pulsos despolarizantes aplicados desde un potencial de -40 mV hasta +80 mV, en incremento de 20 mV, y 2 s de duración en los oocitos aislados expuestos a una solución ND96 con una concentración de cationes divalentes normal (1.8 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}), en ausencia de Ca^{2+} o de Mg^{2+} (0 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+} y 1.8 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+}) y en un medio en el que no se añaden cationes divalentes (Fig. 12, A). En los oocitos inyectados con Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 y expuestos a una concentración normal de divalentes y sin Ca^{2+} o Mg^{2+} , las corrientes transmembrana fueron de pequeña amplitud y similares a las registradas en los oocitos controles. Sin embargo, cuando ambos cationes divalentes están ausentes, se observa un aumento significativo de las corrientes transmembrana en el potencial de fijación (-40 mV) y con los pulsos despolarizantes en los oocitos que expresan la Cx47-Met1&4 y Met4, pero no en los controles (Fig. 12, A). Las corrientes de hemicanal que se activan con el pulso de -20 mV son de entrada, revierten alrededor del potencial de membrana próximo a cero (-6 mV) y para pulsos de polaridad positiva son de salida. La activación de las corrientes

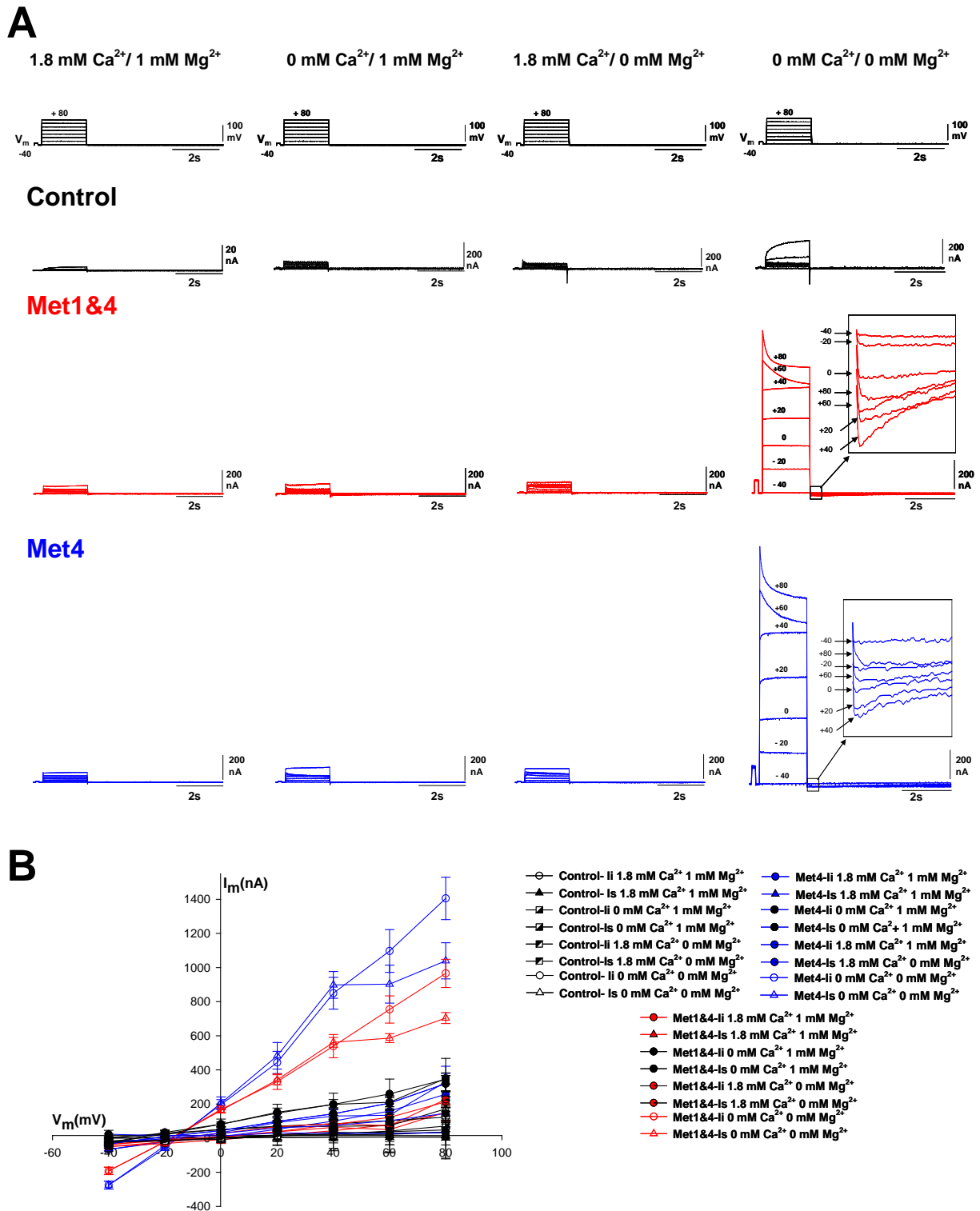
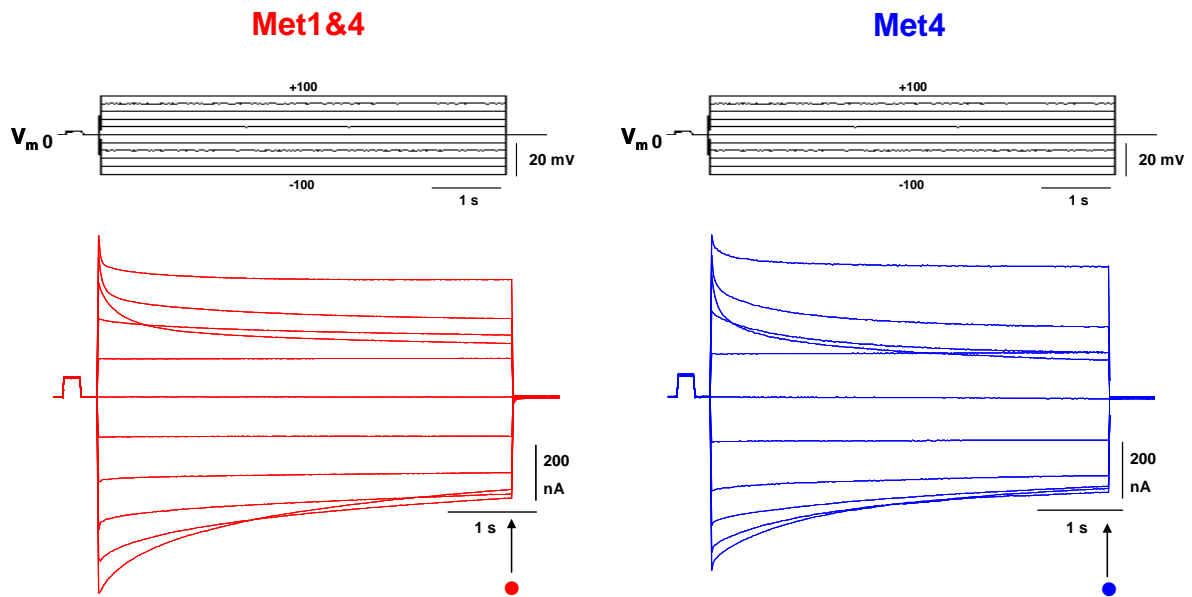


Figura 12. Activación de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 por despolarización y su dependencia de la concentración extracelular de los cationes divalentes. A) Registros de las corrientes transmembrana (I_m) inducidas por la aplicación de pulsos de voltaje (V_m) desde un potencial de -40 mV hasta +80 mV, en incrementos de 20 mV, en oocitos controles e inyectados con el mRNA Met1&4 y Met4 de la Cx47 expuestos a distintas concentraciones de divalentes. **B)** Curvas I_m/V_m en las que se representan en promedio el valor inicial (I_0) y el valor de estado (I_s) de las corrientes al final de los pulsos de 2 s. Los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 solo se activan por despolarización en ausencia de cationes divalentes en el medio extracelular (0 Ca²⁺ 0 Mg²⁺); primero, las corrientes de los hemicanales se activan con el grado de despolarización y luego a valores más positivos se inactivan (+ 60 mV y + 80 mV). Las corrientes activadas por despolarización cierran por hiperpolarización (ver detalle de las corrientes de cola). Los datos representados corresponden a $\bar{x} \pm s.e$ (n=11).

primero aumenta progresivamente con el grado de depolarización, desde -20 hasta +40 mV, pero a valores de polarización positiva más elevados, de +60 mV y +80 mV, las corrientes se inactivan. Las corrientes activadas por depolarización se cierran lentamente cuando el potencial de membrana vuelve al potencial de fijación de -40 mV después de cada pulso. La amplitud de estas corrientes de cola, primero aumenta progresivamente con los pulsos de -20 a +40 mV y luego para los pulsos de +60 mV y +80 mV disminuye en amplitud y muestra un comportamiento bifásico, ya que primero aumentan ligeramente antes de cerrarse, sugiriendo que los hemicanales antes de desactivarse se desinactivan (Fig. 12, ver detalle de las corrientes de cola).

Las curvas de I_m/V_m en ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} extracelular se caracterizan por un incremento de las corrientes transmembrana con el grado de depolarización del potencial de membrana (entre -20 y +40 mV), que en promedio es más marcado en los oocitos que expresan la Cx47-Met4 que en los Cx47-Met1&4, y por la inactivación entre +60 mV y +80 mV. Para poder caracterizar mejor esta compleja dependencia de voltaje de los hemicanales Cx47-Met1&4 y Met4, se aplicó un protocolo en el que los oocitos fueron mantenidos en el potencial de equilibrio de 0 mV y se aplicaron pulsos entre ± 100 mV, en incrementos de 20 mV, y de 5 s de duración (Fig. 13, A). La conductancia macroscópica de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 es máxima entre -20 y +20 mV y disminuye más y más rápidamente a medida que aumenta el gradiente de V_m , tanto para la polaridad positiva como negativa, pero lo hace de forma asimétrica en función de la polaridad del V_m (Fig. 13, B). Este comportamiento “bipolar” y asimétrico sugiere la existencia de dos mecanismos de compuerta distintos que operan con la polaridad de cierre opuesta y que median transiciones entre distintos valores o estados de conductancia unitaria (Fasciani y col., 2013). Para los pulsos de polaridad negativa, la cinética de cierre de las corrientes y la sensibilidad a voltaje de los hemicanales Cx47-Met1&4 y Met4 fueron muy similares, mientras que para los voltajes de polaridad positiva los hemicanales de Cx47-Met4 cierran más y más rápidamente que los hemicanales de Cx47-Met1&4 (Fig. 13, A y B). Los parámetros de la función de Boltzmann que ajustan las curvas G_{hj}/V_m para los voltajes de polaridad negativa para los hemicanales Met1&4 y Met4 fueron similares: ($A=0.05$ y 0.06 , $V_o=-76.28$ y -68.15 , $G_{hjmin}=0.30$ y 0.35 , respectivamente) indicando que el mecanismo de compuerta que produce el cierre con la polaridad negativa está conservado en ambos hemicanales. Sin

A



B

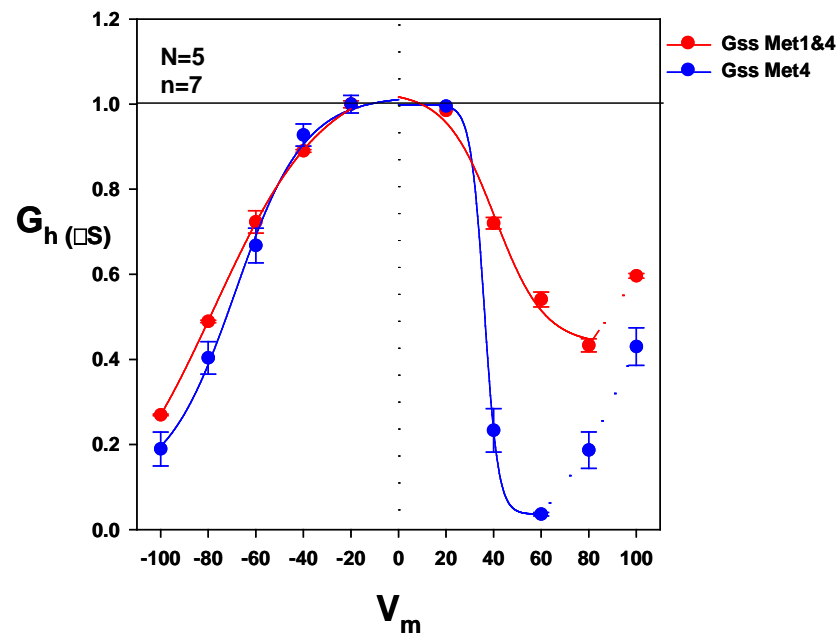


Figura 13. Dependencia “bipolar” del potencial de membrana de los hemicanales formados por la hCx47-Met1&4 y hCx47-Met4. A) Registros en baja concentración extracelular de cationes divalentes de las corrientes transmembrana (I_m) inducidas por los pulsos de voltaje (V_m) desde un potencial de 0 mV hasta ± 100 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración. **B)** Gráfica de la conductancia macroscópica de los hemicanales vs. el potencial de membrana (G_h/V_m); se representa el promedio del valor de estado estacionario (G_{jss} ; \bullet) de la conductancia normalizada después de haberse sustraído la corriente de fuga, y el ajuste para cada polaridad de voltaje a una función de Boltzmann con los parámetros que se indican en la Tabla 4. (N= número de experimentos, n=número de oocitos).

embargo, para los voltajes de polaridad positiva, los parámetros de Boltzmann reflejan un aparente aumento de la sensibilidad a voltaje de este otro mecanismo de compuerta en los hemicanales Cx47-Met4 ($A=0.09$ y 0.22 , $V_o=40.21$ y 33.80 $G_{hmin}=0.45$ y 0.32 , respectivamente). Estas diferencias deben ser atribuidas a una distinta composición proteica de los hemicanales como consecuencia de haberse sintetizado la Cx47 en el caso del mARN-Met1&4 desde la primera metionina y en el caso del mARN-Met4, desde la segunda metionina.

4.1.2.2. Permeabilidad a colorantes de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4.

Los hemicanales de conexinas no sólo permean los iones que portan las corrientes transmembrana, sino también permiten la difusión de moléculas de mayor tamaño (Fasciani y col., 2013). Para estudiar las propiedades de permeabilidad de las células que expresan los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 se utilizó la técnica de captación de colorante. Para ello, los oocitos inyectados con los mARNs de la Cx47-Met1&4 y de la Cx47-Met4, junto con un grupo control, fueron incubados durante una hora con dos trazadores fluorescentes de similar peso molecular pero de carga opuesta: la 5-6 carboxifluoresceína, (CF; -2 , 379 Da) y el yoduro de propidio, (YP; $+2$, 411 Da), en una concentración de 1.5 mM, en dos condiciones experimentales: con y sin cationes divalentes en la solución extracelular (Fig. 14). En presencia de una concentración extracelular normal de cationes divalentes y en el potencial de reposo (-38 ± 5 mV), los oocitos que expresan los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 mostraron unos niveles de captación de ambos colorantes significativamente mayores que los oocitos controles ($p < 0.05$). Dicha captación aumentó, entre 3-4 veces cuando los oocitos se expusieron a una solución sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (Fig. 14A, *ii*). La captación de colorante en los oocitos que expresan la Cx47-Met1&4 y Met4 pudo prevenirse con un pretratamiento con 500 μ M de carbenoxolona (CBX), un bloqueante de los canales de Cx's, que previamente se había determinado que era capaz de bloquear completamente las corrientes de hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 (Fig. 14, B). En estos estudios, también encontramos diferencias significativas entre los hemicanales Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 en relación con su permeabilidad relativa a los dos tipos de colorantes utilizados, tanto en presencia de cationes divalentes como en su ausencia. Los hemicanales de Cx47-Met1&4 permean mejor el colorante catiónico que los hemicanales de Cx47-Met4, mientras que los hemicanales Cx47-Met4 permean mejor el colorante aniónico (Fig. 14A, *ii*).

En resumen, estos resultados indican que ambas proteínas de la Cx47 humana, la Cx47-Met1&4 y la Cx47-Met4, forman hemicanales que se activan por

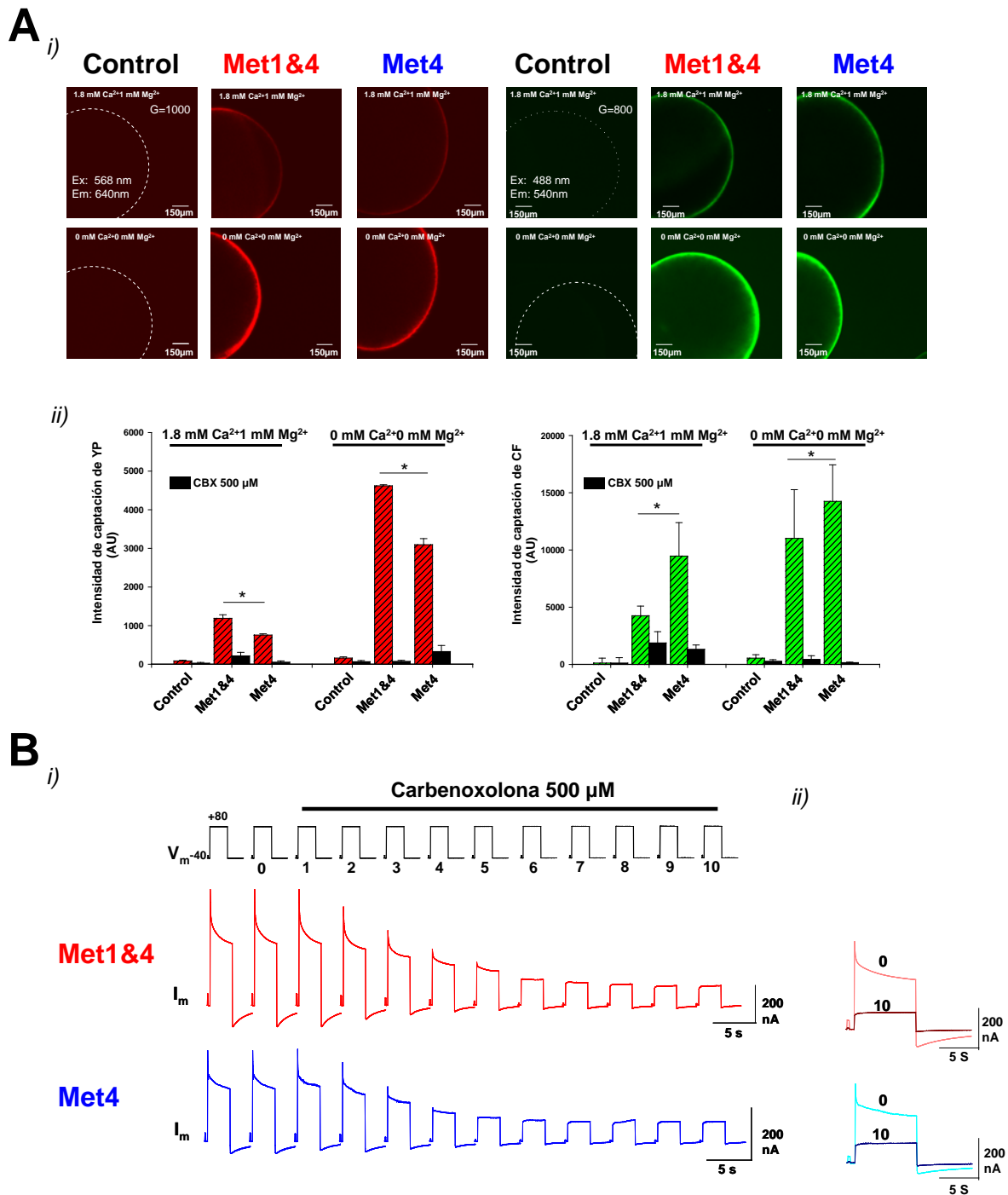


Figura 14. Permeabilidad de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 a colorantes aniónicos (5-6 carboxifluoresceína, CF) y catiónicos (yoduro de propidio, YP). A) Imágenes de microscopía confocal (x10) ilustrando la captación de YP (en rojo) y CF (en verde) que se acumula en la zona submembranal de los oocitos inyectados con el mRNA de Cx47-Met1&4 y Met4, pero no en los controles. **B) Cuantificación de los niveles de captación.** Los oocitos que expresan los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4, pero no los controles, son capaces de captar ambos colorantes en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes (1.8 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}); dicha captación aumenta de forma marcada en ausencia de cationes divalentes (0 Ca^{2+} 0 Mg^{2+}). En ambas condiciones los hemicanales de Cx47-Met1&4 permean mejor YP y los de Cx47-Met4 mejor CF ($p < 0.05$). La captación es inhibida con un pre-tratamiento con carbenoxolona 500 μM (CBX). Los datos representados corresponden a $\bar{x} \pm \text{s.e}$ ($N=4$, $n=16$). **C) Curso temporal del bloqueo de las corrientes de los hemicanales Cx47-Met1&4 y Met4 por carbenoxolona 500 μM (CBX);** *i)* corrientes de los hemicanales (I_m) activadas por pulsos despolarizantes (+80 mV, 2 s de duración), aplicados cada 60 s desde un potencial de fijación de -40 mV en condiciones de baja concentración de cationes divalentes, *ii)* superposición de las corrientes antes y después de 10 min en CBX.

despolarización del potencial de membrana y se inhiben por la presencia de cationes divalentes en el medio extracelular pero que los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 difieren en los niveles de conductancia macroscópica que inducen, en sus propiedades de regulación por el potencial de membrana y en sus propiedades de permeabilidad a colorantes aniónicos y catiónicos.

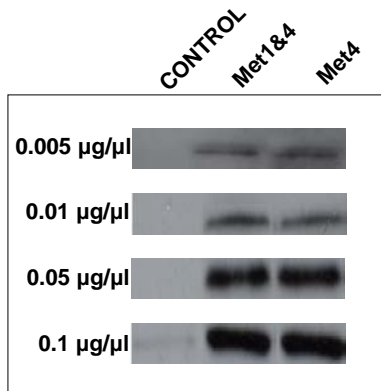
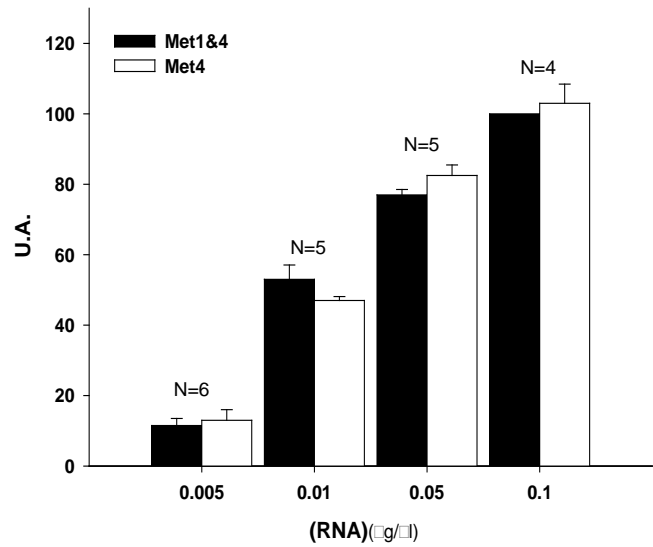
4.1.3. Propiedades electrofisiológicas de los canales de Cx47.

4.1.3.1. Niveles de acoplamiento eléctrico inducido por las construcciones Cx47-Met1&4 y Met4.

La última etapa en la formación de los canales intercelulares consiste en la unión de dos hemicanales, cada uno de ellos aportado por una de las células en contacto, y la consiguiente apertura del canal intercelular recién formado que pone en comunicación directa a través del poro del canal los citoplasmas de las células adyacentes. Primero, para determinar la capacidad de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 para unirse y formar canales intercelulares funcionales, los oocitos inyectados con ambos mARNs se pusieron en contacto por pares, y 24 horas después se determinó si los pares se acoplaban eléctricamente, midiendo el flujo de corriente de una célula a la otra.

A diferencia de los pares controles no inyectados con mARN, en los que no se detectó paso de corriente de un oocito al otro, tanto los pares homotípicos de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 se acoplaron eléctricamente, indicando que ambas construcciones conducen a la formación de canales intercelulares funcionales. Sin embargo, los pares inyectados con la Cx47-Met4 mostraron mayores niveles de acoplamiento eléctrico para los mismos niveles de expresión de la proteína Cx47 (Fig. 15). En estos experimentos, los oocitos se inyectaron con concentraciones crecientes de ambos mARNs que indujeron niveles de expresión de las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4 progresivamente mayores, pero similares entre sí para cada concentración de mARN inyectado (Fig. 15, A). A su vez, este incremento de la expresión a nivel de proteína, produjo un aumento progresivo del grado de acoplamiento eléctrico desarrollado entre estos pares de oocitos hasta alcanzar valores de saturación (Fig. 15, B). Sin embargo, los valores de conductancia macroscópica saturadas en el caso de los pares Cx47-Met4 fueron del orden de ~2 veces superior que los registrados entre los pares inyectados con el mARN Met1&4 para la misma concentración y en todo el rango de concentraciones estudiado (0.005 µg/µl a 0.1 µg/µl). En conjunto estos datos indican que la Cx47 sintetizada a partir de

A

*ii)*

B

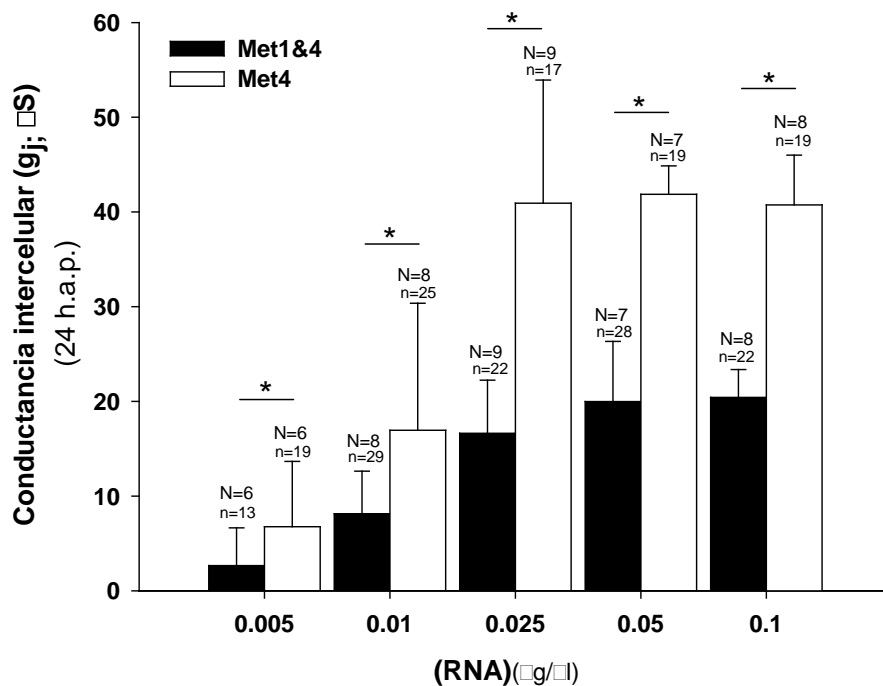


Figura 15. Correlación entre los niveles de expresión total de las proteínas Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 y el grado de acoplamiento eléctrico. Los oocitos se inyectaron con concentraciones crecientes de mRNA (0.005 – 0.1 µg/µl) y se determinó el nivel de expresión total de las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4 (A, *i-ii*) y el grado de acoplamiento eléctrico entre los correspondientes pares (B). Aún cuando no se observan diferencias en el nivel de expresión de las proteínas Cx47 Met1&4 y Met4, el grado de acoplamiento detectado en los pares Met4 fue significativamente mayor con respecto al de los pares Met1&4 para todas las concentraciones de mRNA ensayadas (*, p<0.05; N=número de experimentos, n=número de oocitos).

la segunda metionina (Met4) induce mayores niveles de acoplamiento eléctrico para niveles de expresión de las proteínas Cx47-Met1&4 y Met4 similares, sugiriendo que la ausencia de los tres primeros aminoácidos del extremo 5' del NT podría originar un aumento de la conductancia unitaria de los canales (ver discusión).

4.1.3.2. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular de los canales de Cx47-Met1&4 y Met4.

Una vez determinada la capacidad de la Met1&4 y Met4 para formar canales intercelulares funcionales, se estudiaron sus propiedades de regulación por voltaje intracelular (V_j). Para lo cual se utilizaron pares de oocitos con valores de conductancia intercelular inferiores a 10 μ S para evitar problemas de resistencia de acceso (Wilders y Jongsma, 1992), observándose que las características de las corrientes intercelulares (I_j) en los pares homotípicos de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 difieren entre sí en cuanto a sus propiedades cinéticas y a la sensibilidad al voltaje intercelular (Fig. 16). En el caso de los canales Cx47-Met1&4, las I_j 's comienzan a cerrarse durante aplicación de los pulsos de $\geq \pm 40$ mV, mientras que el umbral aparente para el cierre de las corrientes de los canales Met4 es ligeramente superior ($\geq \pm 60$ mV), sin embargo a medida que aumenta el gradiente de V_j , las corrientes de los canales Met4 se cierran más y más rápidamente. En los canales Met1&4 la cinética de cierre de las corrientes sigue un curso temporal bi-exponencial, con un componente rápido (τ_1) seguido de otro más lento (τ_2) (Fig. 16B, *i*); el componente lento es el de mayor amplitud en los valores de V_j intermedios (de ± 60 y 80 mV), mientras que el componente rápido es el dominante para los valores de V_j más altos (i.e., ± 100 y ± 120 mV), (Fig. 16B, *ii*). Por el contrario, la cinética del cierre de las corrientes de los canales Cx47-Met4 sigue un curso mono-exponencial en todo el rango de voltaje, con una cinética significativamente más rápida (Fig. 16B, *i-ii*). Las gráficas de conductancia/voltaje (G_j/V_j) muestran que en ambos tipos de canal el valor inicial de la conductancia (G_{jo}) no varía en función del gradiente de V_j y que el valor de estado de la G_j (G_{jss}), que es máximo a $V_j=0$, disminuye simétricamente para las dos polaridades de V_j con el incremento del voltaje intracelular. La rectificación de la G_{jss} con el voltaje no llega a ser completa, ya que en ambos canales existe un valor de conductancia residual (G_{jmin}) insensible al voltaje. El ajuste de los datos para cada polaridad de V_j a una función de Boltzmann reveló en los canales Cx47-Met4 una mayor sensibilidad a voltaje, con incremento en el número de cargas asociadas al sensor de $z=2$ a $z=4$, y con una menor conductancia residual (ver parámetros Tabla 5).

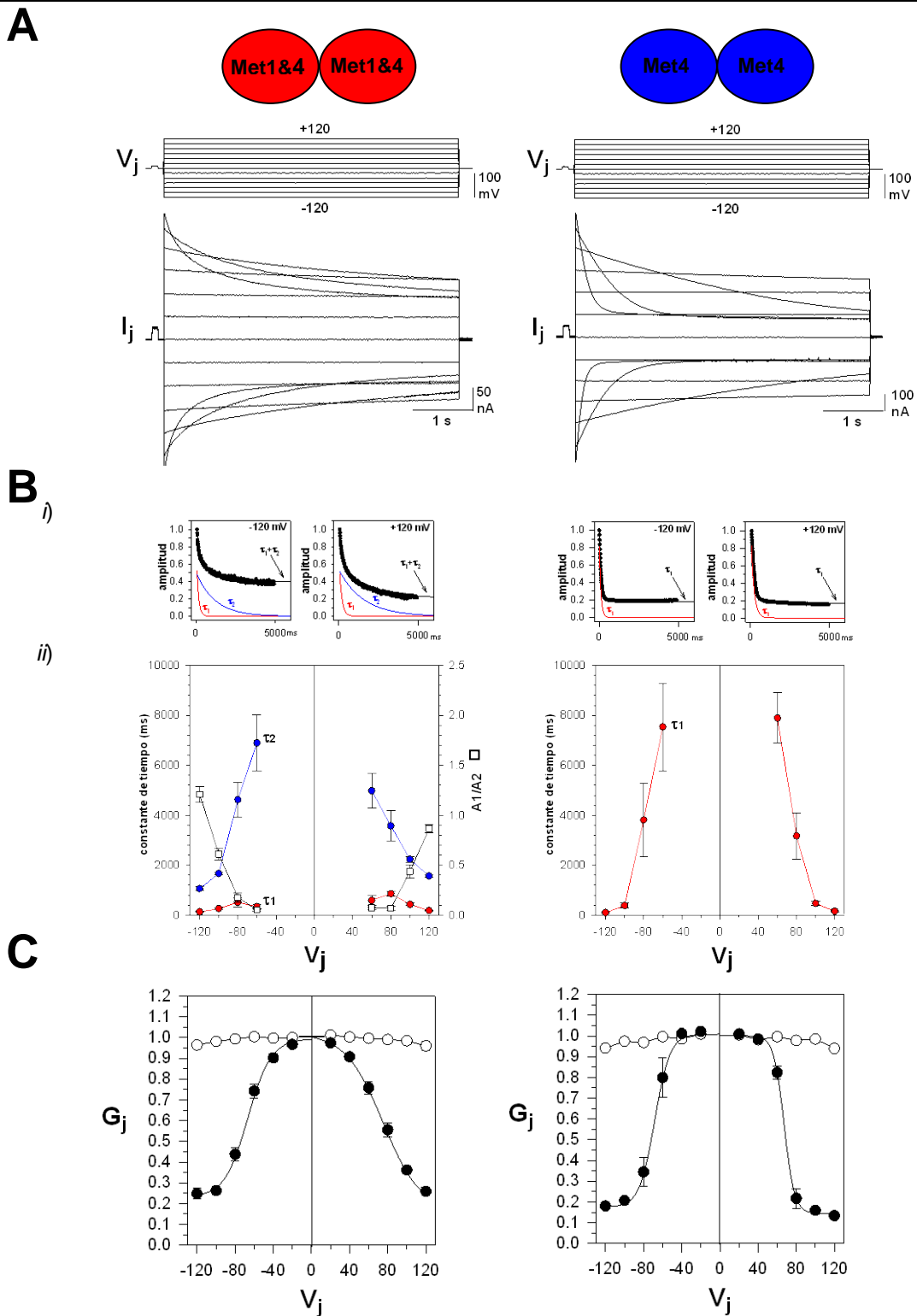


Figura 16. Regulación por el voltaje intercelular de los canales intercelulares formados por la Cx47-Met1&4 y por la Cx47-Met4. A) Registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a los pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV, y de 5 s de duración. **B-i)** Curso temporal del cierre de las corrientes; las corrientes en los canales Met1&4 decaen siguiendo un curso biexponencial (τ_1 y τ_2) y en los canales Met4 monoexponencial (τ_1); **ii)** gráfica de las constantes de tiempo (τ_1 , τ_2) y de su amplitud relativa (A1/A2). **C)** Gráfica de los valores iniciales y de los valores de estado estacionario de la conductancia intercelular (G_{j0} ; \circ) (G_{jss} ; \bullet) normalizados en función del voltaje (G_j/V_j) con los valores durante los prepulsos. La relación G_{jss}/V_j para cada polaridad del V_j se ajustó a una función Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 5 y que indican una mayor sensibilidad a voltaje de los canales de Cx47-Met4.

4.1.3.3. Propiedades de regulación por voltaje de los canales heterotípicos Cx47-Met1&4/Cx47-Met4.

Los hemicanales de Cx47-Met1&4 son capaces de unirse con los hemicanales de Cx47-Met4 para formar canales intercelulares. El grado de acoplamiento eléctrico desarrollado entre los pares heterotípicos en los que un oocito había sido inyectado con el mRNA Cx47-Met1&4 y el otro con el de Cx47-Met4 fue de $4.7 \pm 1.3 \mu\text{S}$, un valor intermedio a los registrados entre los correspondientes pares homotípicos ($2.66 \pm 3.3 \mu\text{S}$ para los pares de Cx47-Met1&4 y $6.76 \pm 5.1 \mu\text{S}$ para los pares de Cx47-Met4). Además, las corrientes intercelulares que fluyen a través de estos canales híbridos muestran una compleja dependencia del voltaje, con un comportamiento doblemente rectificador ya que, además de la rectificación del valor de estado de la conductancia (G_{jss}) presente en los correspondientes canales homotípicos, también rectifica con el voltaje, el valor inicial de la conductancia (G_{jo}) (Fig. 17). Este tipo de rectificación de la G_{jo} es una propiedad emergente de los canales heterotípicos que se genera cuando se unen dos hemicanales con distintas propiedades biofísicas de conductancia unitaria y selectividad iónica (Suchyna y col., 1999), y que consiste en un cambio del valor de la conductancia unitaria en función del V_j (Bukauskas y col., 1995). A nivel de los registros macroscópicos este tipo de rectificación la denominamos "instantánea", al ser más rápida que la resolución temporal de nuestra técnica de fijación de voltaje ($\sim 1-3$ ms), y origina cambios en el valor inicial de las corrientes que alejan del comportamiento óhmico en función del gradiente y de la polaridad del V_j . En el caso de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4 se observa un aumento progresivo de la amplitud inicial de las I_j 's para los pulsos de polaridad negativa relativa en la célula que expresa la Cx47-Met1&4 y una reducción para los pulsos de polaridad positiva (Fig. 17, A izda). Cuando los pulsos se aplican en la célula que expresa la Cx47-Met4, los cambios en la amplitud de las corrientes ocurren en el sentido opuesto, las I_j 's aumentan para los pulsos positivos y disminuyen para los negativos (Fig. 17B, I_j), indicando que la rectificación inicial de la corriente depende de la polaridad del V_j . Además de estos cambios no lineales de las corrientes con el voltaje, también se observa cierre de las corrientes con el aumento del gradiente para las dos polaridades de V_j . Dicha reducción de las corrientes es mayor y más rápida para los pulsos de polaridad negativa aplicados en el lado Met1&4 (que son vistos como positividad relativa desde el interior de la célula que expresa la Cx47-Met4) que para los pulsos positivos aplicados en el lado Met1&4 (vistos como

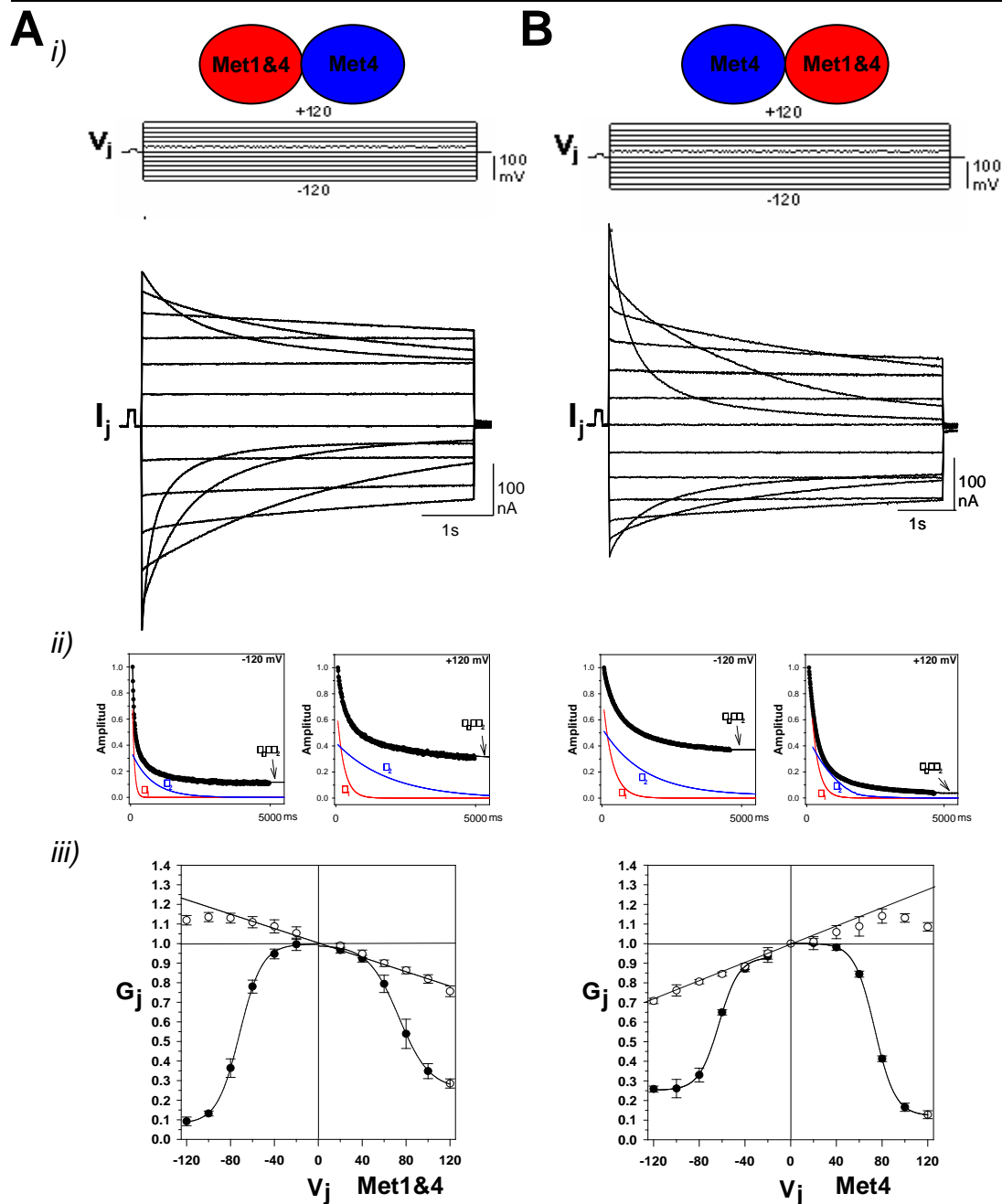


Figura 17. Regulación por el voltaje intercelular (V_j) de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4. Los canales híbridos se formaron apareando oocitos que se inyectaron con la Cx47-Met1&4 con los que se inyectaron con la Cx47-Met4. **A-i)** Registros de las corrientes intercelulares (I_j) inducidas por pulsos de voltaje intercelular (V_j) entre ± 120 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración, aplicados en el oocito Cx47-Met1&4. **B-i)** Mismo protocolo aplicado en el oocito Cx47-Met4 del mismo par. Las corrientes en respuesta a los pulsos de polaridad negativa en el lado Met1&4 son mayores que las corrientes para los mismos pulsos de polaridad positiva; dicho comportamiento se revierte cuando los pulsos se aplican en la célula Met4. **ii)** Curso temporal biexponencial (τ_1 ; τ_2) del cierre las corrientes; el componente rápido (en rojo) es el dominante durante el cierre para los pulsos de -120 mV en Met1&4 (A) y de +120 mV en Met4 (B). **iii)** Gráficas G_j/V_j mostrando la rectificación del valor inicial de la conductancia (G_{j0} , \circ) que se caracteriza por un aumento progresivo de la G_{j0} para los pulsos de polaridad negativa y disminución para los de polaridad positiva aplicados en la célula Cx47-Met1&4 (A). La rectificación del valor de estado ocurre para las dos polaridades de V_j , pero es más marcada para los pulsos de polaridad negativa aplicados en la célula Cx47-Met1&4; cuando se aplican los pulsos en la célula Met4, se produce la misma rectificación de G_{j0} y G_{jss} pero con la polaridad opuesta (B). Las relaciones G_{jss}/V_j para cada polaridad se ajustaron a una ecuación de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 5. Los datos representados corresponden a la $\bar{x} \pm s.e$ ($n=10$).

negatividad relativa desde el interior de la célula Met4) (Fig. 17A-B, *i*). El curso temporal del cierre de las corrientes hasta alcanzar su nuevo valor de estado fue bi-exponencial siendo el componente rápido el de mayor amplitud para los pulsos negativos aplicados en la célula Cx47-Met1&4 y para los pulsos positivos aplicados en la célula Cx47-Met4 (Fig. 17A y B, *ii*). Las relaciones G_j/V_j de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4 ilustran los dos tipos de rectificación de la conductancia en función del V_j . La rectificación de la G_{jo} se caracteriza por un aumento de 1.0 a 1.3 con el incremento del gradiente de voltaje de 0 a -100mV y una disminución de 1.0 a 0.7 con el incremento del voltaje de 0 a +100 mV cuando los pulsos se aplican en la célula que expresa los hemicanales de Cx47-Met1&4 (Fig. 17A, *iii*). Dicha rectificación se corresponde con el aumento y la disminución de la G_{jo} para los voltajes de polaridad positiva y negativa vistos desde el interior de la célula que expresa los hemicanales Cx47-Met4 (Fig. 17B, *iii*). Por el contrario, la rectificación del valor de estado de la conductancia (G_{jss}) se reduce para las dos polaridades del V_j aunque también lo hace de forma asimétrica; la G_{jss} es más marcada para los pulsos de polaridad negativa que positiva vistos desde el hemicanal Cx47-Met1&4, y para la polaridad positiva que negativa cuando los pulsos de V_j se aplican en la célula que expresa los hemicanales de Cx47 Met4 (Fig. 17A y B, *iii*). Las curvas de ajuste para cada polaridad de V_j a una función de Boltzmann muestran una sensibilidad a voltaje mayor y una G_{jmin} significativamente menor para los V_j negativos en el lado Met1&4, que se corresponden con los cambios observados para los pulsos positivos en Met4 (ver parámetros en la Tabla 5). La asimetría en la rectificación de la G_{jss} para las dos polaridades de V_j en los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4 es atribuible a la distinta dependencia de voltaje de los dos tipos de hemicanales en sus respectivos canales homoméricos Cx47Met1&4-Cx47Met1&4 y Cx47Met4-Cx47Met4 (ver discusión). La presencia de la rectificación instantánea en los canales heterotípicos de Cx47Met1&4-Cx47Met4 sugiere la existencia de importantes diferencias entre las propiedades del poro de los canales Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4.

4.1.4. Estudios de permosselectividad a colorantes de los canales Cx47-Met1&4 y Met4.

Para poder identificar las posibles diferencias en permosselectividad se utilizó la técnica de difusión intercelular de colorantes, con dos trazadores de similar peso molecular pero de carga opuesta: la 5-6 carboxifluoresceína (CF): (-2; 379 Da) y el

yoduro de propidio (YP): (+2; 411 Da). Estos experimentos se realizaron en las células N2A transfectadas transitoriamente con las dos construcciones de Cx47, Met1&4 y Met4 y como gen reportador se utilizó la proteína fluorescente verde (EGFP). A las 24-48 h después de la transfección se inyectó el mismo número de células con el colorante CF que con el YP, y se valoró el número de inyecciones en las que el colorante difundía desde la célula inyectada a la célula vecina, ambas EGFP positivas (Fig. 18, A y B). El porcentaje de acoplamiento entre las células transfectadas con el gen Cx47-Met4 fue significativamente mayor que el obtenido para las transfectadas con el gen Cx47-Met1&4 (75% vs. 25%, $p < 0.05$) (Fig. 18C, *i*). También observamos que, mientras que el porcentaje de las células Met4 que se acoplaron por YP y CF fue similar (47% y 53%), en el caso de las células Met1&4 el porcentaje de células acopladas por YP fue significativamente mayor que con CF (75% vs. 25%, $p < 0.05$) (Fig. 18C, *ii*). Calculamos la curva de transferencia para cada colorante en función del nivel de expresión, como la relación de intensidad del colorante en la célula aceptora (A) respecto al de la célula inyectada o donadora (D) (coeficiente A/D). A su vez, el nivel de expresión fue estimado a partir del valor promedio de la intensidad de fluorescencia de la proteína verde en las células donadora y aceptora. En relación con los estudios de difusión de CF, su curva de transferencia entre las células Cx47-Met4 muestra paso de colorante desde niveles de expresión relativamente bajos, alcanzándose el coeficiente A/D del 50% en un valor promedio de EGFP del ~ 80 UA y del 100% para niveles ~ 120 UA. Sin embargo, en el caso de las células Cx47-Met1&4 no se detectó paso de colorante hasta los máximos niveles de expresión de EGFP (> 150 UA). En los estudios de transferencia de YP se observó un solapamiento de las curvas de transferencia en ambos tipos celulares, pero, aún cuando ambas curvas muestran un coeficiente de difusión del 50% similar, en el caso de los canales Cx47-Met1&4 la pendiente de función de transferencia fue significativamente mayor. Estos datos indican que por los canales de Cx47-Met1&4 permea mejor el colorante catiónico (YP) que al aniónico (CF), mientras que por los canales Cx47-Met4 difunden de forma similar ambos colorantes.

En conjunto, el ensayo realizado muestra que a partir de las dos construcciones de la Cx47 humana Met1&4 y Met4 se transducen dos proteínas distintas que forman hemicanales y canales intercelulares con importantes diferencias en sus propiedades electrofisiológicas.

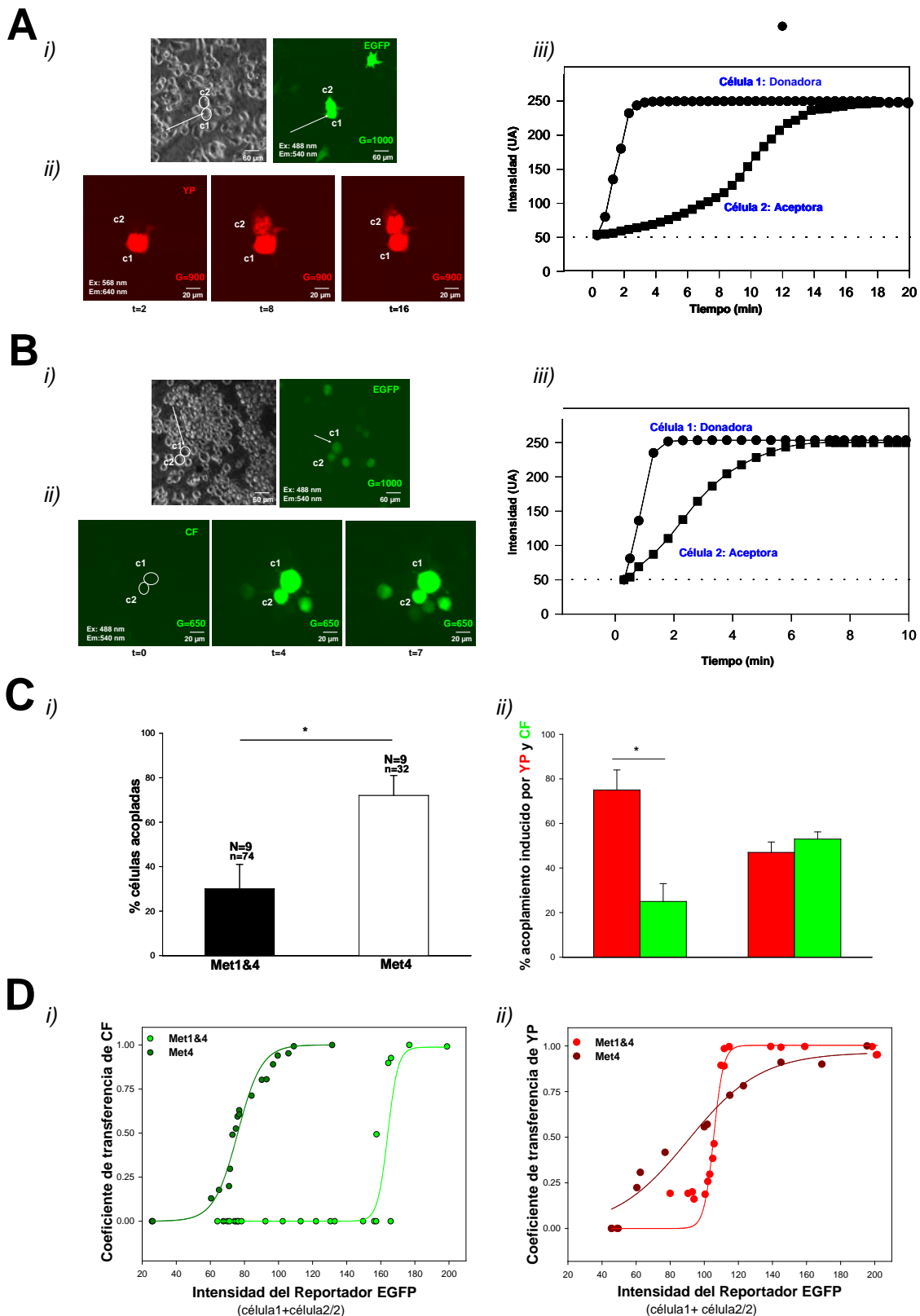


Figura 18. Difusión de yoduro de propidio (YP) y 5-6 carboxifluoresceína (CF) por los canales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4. A y B) Técnica de difusión intracelular de YP (en rojo, A) y CF (en verde, B); i) imagen de luz transmitida del cultivo N2A y de las células EGFP positivas (c1 y c2), ii) microinyección del colorante en c1 y difusión del colorante a la célula vecina (c2), iii) curso temporal del llenado de la célula inyectada (c1) y transferencia a la célula vecina (c2). C) Porcentaje total de acoplamiento (i) y por cada colorante (ii). D) Curva de transferencia de la CF (i) del YP (ii) en función del nivel de expresión de la proteína verde reportadora, EGFP. Los canales de Met1&4 muestran un menor porcentaje de acoplamiento (C-i) y permean mejor el colorante catiónico que el aniónico (C-ii y D-i y ii). Los datos representados corresponden a $\bar{x} \pm s.e$ (N=número de experimentos, n=número de oocitos).

En el caso del mARN silvestre, que contiene los dos sitios de iniciación Met1 y Met4, la transducción se inicia en el primer AUG dando lugar a una proteína de 439 aa, pero cuando este codón de iniciación no está presente, la proteína se sintetiza a partir del segundo codón AUG, dando lugar a una proteína truncada en el NT de 436 aa. Por tanto, todas las diferencias encontradas entre las propiedades electrofisiológicas de los hemicanales y canales de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 deben ser atribuidas al triplete de aminoácidos Met-Thr-Asn presente en el extremo 5' del dominio NT.

4.2. CONTRIBUCIÓN DE LA Cx47 AL ACOPLAMIENTO INTERCELULAR GLIAL.

Para entender las bases moleculares de las enfermedades que afectan a la mielina causadas por las mutaciones en la Cx47, que es el objetivo de este trabajo, es necesario conocer qué canales forma la Cx47 en el SNC y cuáles son sus propiedades electrofisiológicas. Por tanto, una vez identificado el sitio de iniciación de la proteína Cx47 oligodendrocitaria, se analizó su capacidad para combinarse con las otras conexinas oligodendrocitarias (la Cx32 y la Cx31.3) y con las conexinas astrocitarias (la Cx43, la Cx30 y la Cx26).

4.2.1. Canales intercelulares entre las conexinas oligodendrocitarias.

4.2.1.1. Canales heterotípicos y heteroméricos entre las Cx47 y Cx32.

Para analizar los distintos tipos de canales que pueden formar ambas conexinas, se inyectaron los oocitos solo con el mRNA de la Cx47 o de la Cx32 o con una mezcla de ambos, en una relación 1:1 y a la misma concentración final que cada uno por separado. Los pares homotípicos de oocitos inyectados tanto con la Cx47 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como con la Cx32 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) desarrollaron altos niveles de acoplamiento eléctrico: ($30.3 \pm 10.2 \mu\text{S}$ y $20.4 \pm 3.0 \mu\text{S}$ respectivamente, Fig. 19); sin embargo, no se detectó acoplamiento eléctrico entre los pares Cx47-Cx32, indicando que los hemicanales de Cx47 y de Cx32 son incapaces de unirse entre sí para formar canales intercelulares de tipo heterotípico.

Las posibles interacciones heteroméricas entre las subunidades de Cx47 y Cx32 se analizaron en oocitos que expresaban ambas conexinas y que se aparearon entre sí formando pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32, con oocitos que solo expresaban la Cx47 (Cx47/Cx32-Cx47) o con oocitos que solo expresaban la Cx32 (Cx47/Cx32-Cx32). En todos los casos, los pares se acoplaron eléctricamente, pero la conductancia intercelular registrada entre los pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32 ($25.0 \pm 4.5 \mu\text{S}$) fue significativamente mayor que entre los pares Cx47/Cx32-Cx47 y Cx47/Cx32-Cx32 ($12.3 \pm 4.4 \mu\text{S}$ y $20.4 \pm 9.4 \mu\text{S}$, $p < 0.05$). Los distintos pares no solo se diferencian en los niveles de acoplamiento también difieren en cuanto a sus propiedades de regulación por el voltaje intercelular, tanto en lo que se refiere a la cinética de cierre de las corrientes intercelulares como a la sensibilidad a voltaje (Fig. 20). Las corrientes de los canales homotípicos de Cx32 en respuesta al mismo protocolo de V_j utilizado ($\pm 100 \text{ mV}$ y 5 s de duración) se reducen menos con el incremento del gradiente de voltaje y lo hacen siguiendo un curso temporal bien

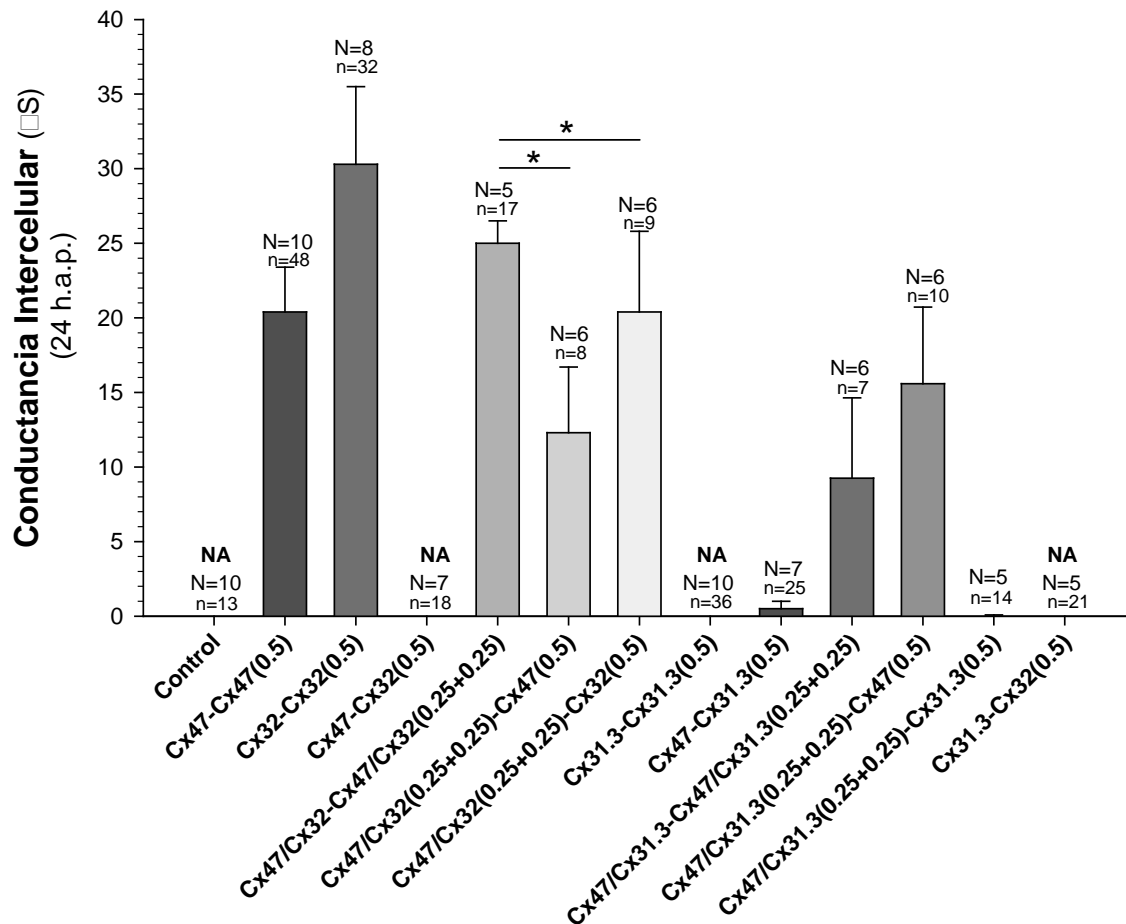


Figura 19. Interacciones funcionales de la Cx47 con la Cx32 y Cx31.3 oligodendrocitarias: I. Niveles de acoplamiento eléctrico. Los oocitos fueron inyectados solo con los mARNs de la Cx47, la Cx32 y la Cx31.3 humana o con una mezcla de la Cx47 con la Cx32 o con la Cx31.3 en una relación 1:1 a la misma concentración final. Los oocitos se combinaron formando pares homotípicos y heterotípicos y a las 24 h de apareamiento se midió el grado de acoplamiento eléctrico. Los valores de conductancia intercelular indican que todas las Cx's oligodendrocitarias, a excepción de la Cx31.3, forman canales homoméricos funcionales, y que la Cx47 no forma canales heterotípicos con la Cx32 pero sí con la Cx31.3; la Cx31.3 y la Cx32 tampoco forman canales heterotípicos. En los experimentos de coexpresión el acoplamiento entre los pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32 fue significativamente mayor que entre los pares Cx47/Cx32-Cx32 y Cx47/Cx32-Cx47 ($p < 0.05$). Los datos representan los valores medios de conductancia intercelular ($\bar{x} \pm s.e.$; N= número de experimentos; n= número de pares registrados; NA, no acoplamiento).

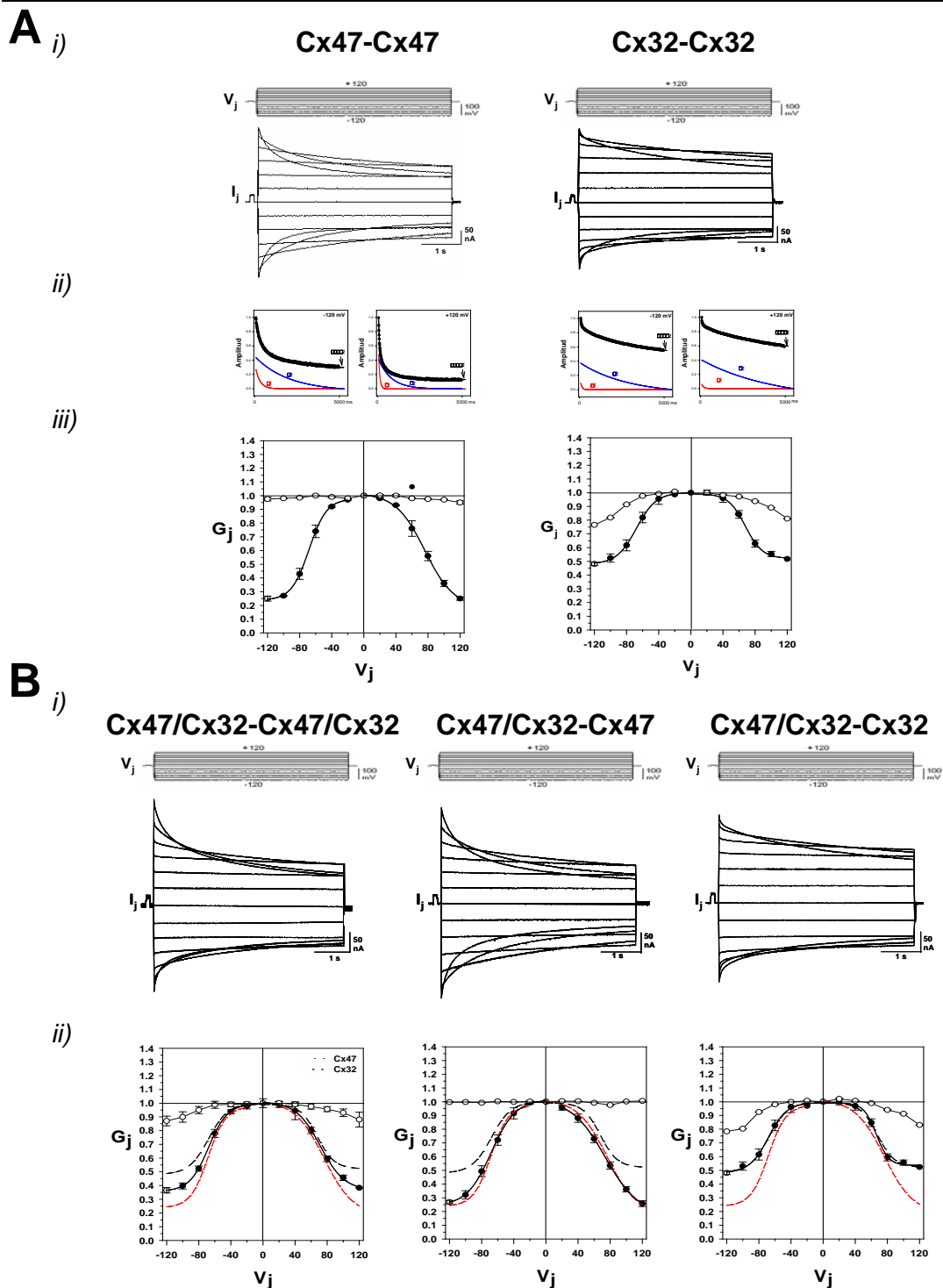


Figura 20. Interacciones funcionales de la Cx47 con la Cx32 oligodendrocitaria: II. Propiedades de regulación por el voltaje intracelular. **A-i)** Registros de las corrientes intercelulares (I_j) de los pares homotípicos Cx47-Cx47 y Cx32-Cx32 en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incremento de 20 mV, y 5 s de duración; *ii)* curso temporal del cierre bi-exponencial de las corrientes; *iii)* gráficas G_j/V_j para el valor de conductancia inicial (G_{j0} ; \circ) y el valor de estado estacionario de la conductancia intercelular (G_{jss} ; \bullet). Las curvas representan al ajuste de la relación G_{jss}/V_j a la función de Boltzmann (ver parámetros en Tabla 5). **B-i)** Registro de las corrientes intercelulares (I_j) entre los pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32 y los pares Cx47/Cx32-Cx47 y Cx47/Cx32-Cx32; *ii)* gráficas G_j/V_j para el valor inicial (G_{j0} ; \circ) y el valor de estado estacionario (G_{jss} ; \bullet) de la conductancia. Se han superpuesto las curvas de Boltzmann de los canales homoméricos Cx47-Cx47 (---) y Cx32-Cx32 (---); los pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32 muestran una dependencia de V_j intermedia a la observada en los pares Cx47-Cx47 y Cx32-Cx32 y la de los pares Cx47/Cx32-Cx47 y Cx47/Cx32-Cx32 es similar a la de los pares Cx47-Cx47 y Cx32-Cx32 respectivamente, indicando que la Cx47 y la Cx32 no forman canales heteroméricos.

distinto, ya que el componente inicial del cierre es más rápido y las constantes de tiempo del segundo componente son más lentas que en los canales de Cx47-Cx47 (Fig. 20A, *i-ii*). Las gráficas de G_j/V_j de los canales de Cx32-Cx32 muestran una aparente reducción del valor instantáneo de la conductancia (G_{j0}), simétrica para las dos polaridades del V_j , que no se observa en los canales de Cx47-Cx47, y una significativa menor reducción del valor de estado de la conductancia (G_{jss}) con el incremento del gradiente del voltaje (Fig. 20A, *i-ii*). Las diferencias en los parámetros de ajuste a la función de Boltzmann entre los canales homotípicos Cx32-Cx32 y Cx47-Cx47 se muestran en la Tabla 5. En los pares Cx47/Cx32-Cx47/Cx32, las propiedades de regulación por voltaje son intermedias a las observadas para los pares homotípicos de Cx47 y de Cx32, mientras que en los pares Cx47/Cx32-Cx47 y Cx47/Cx32-Cx32 se corresponden con las observadas en los canales homotípicos de Cx47-Cx47 y Cx32-Cx32, respectivamente (Fig. 20B, *i-ii*). Estos resultados indican que la Cx47 y la Cx32 oligodendrocitarias no se combinan para formar canales heteroméricos pero si podrían coexistir en paralelo canales homotípicos de Cx32 y de Cx47.

4.2.1.2. Canales heterotípicos y heteroméricos entre las Cx47 y Cx31.3.

En el caso de los oocitos inyectados con el mRNA de la Cx31.3 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) no se detectó acoplamiento eléctrico entre los pares homotípicos Cx31.3-Cx31.3, sugiriendo que esta conexina no forma canales intercelulares funcionales cuando se combina consigo misma (Fig. 19). Sin embargo, cuando los oocitos inyectados con la Cx31.3 se aparearon con los inyectados con la Cx47, pero no con los que expresan la Cx32, se observó paso de corriente pero con unos valores de acoplamiento eléctrico muy bajos ($0.5 \pm 0.5 \mu\text{S}$). La conductancia intercelular de los canales heterotípicos Cx47-Cx31.3 muestra un comportamiento doblemente rectificador con el V_j (Fig. 21A, *i*); el valor inicial de la conductancia (G_{j0}) aumenta de 1.0 a 1.3 desde 0 a -100 mV y disminuye de 1.0 a 0.7 desde 0 a +100 mV cuando los pulsos de voltaje se aplicaron en la célula que expresa la Cx47. La rectificación del valor de estado de la conductancia (G_{jss}) se observa para las dos polaridades de V_j , pero es muy asimétrica con una mayor reducción de los valores de G_{jss} para los valores V_j de polaridad positiva visto por el hemicanal Cx47 (ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 5).

También se analizaron las posibles interacciones heteroméricas entre las Cx31.3 y Cx47 mediante experimentos de coexpresión, en los que los oocitos se inyectaron con una mezcla de mARNs en una relación 1:1 y a la misma

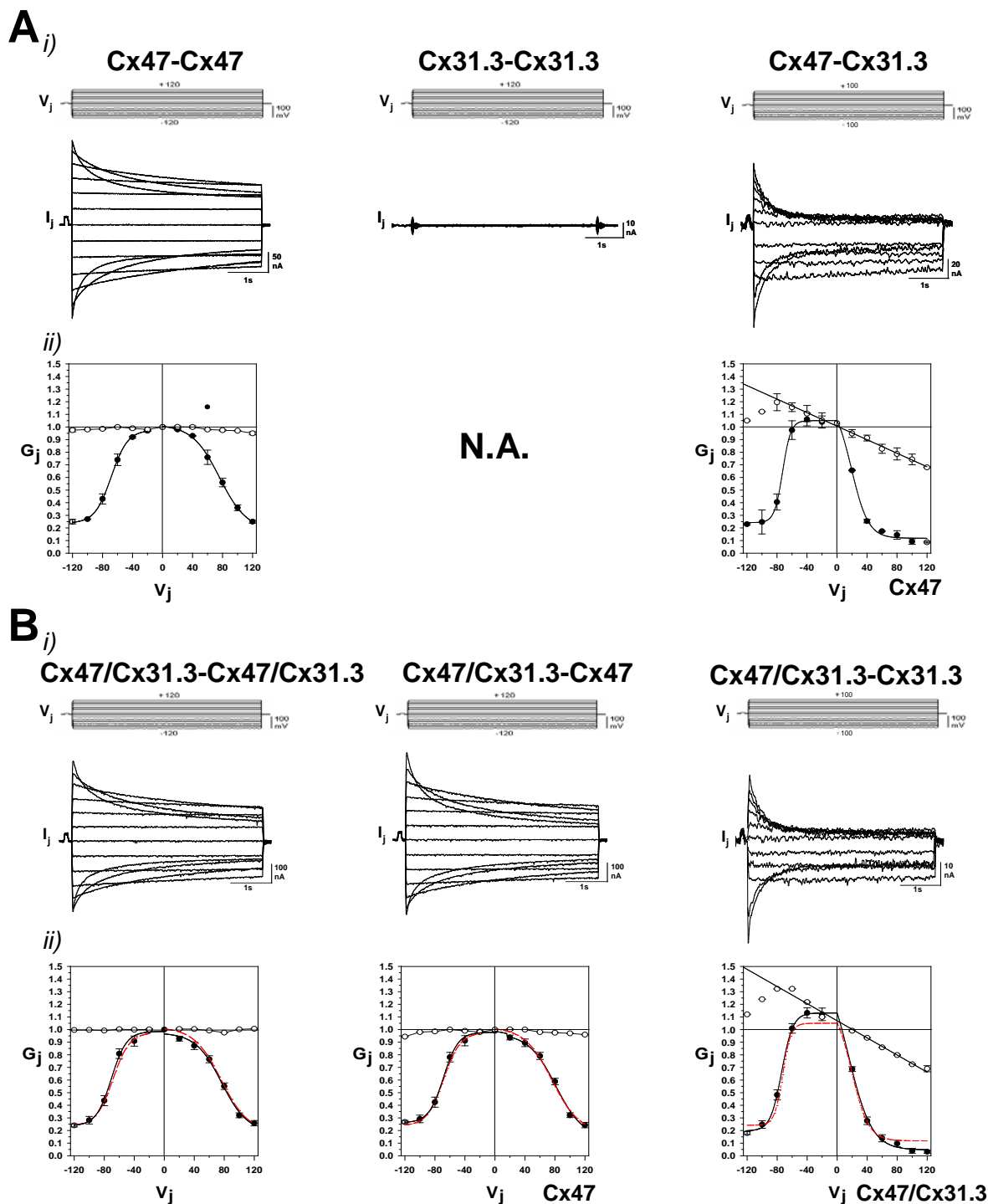


Figura 21. Interacciones funcionales de la Cx47 con la Cx31.3 oligodendrocitaria: II. Propiedades de regulación por el voltaje intercelular. A-i) Registros de las corrientes intercelulares (I_j) de los pares homotípicos Cx47-Cx47 y de los heterotípicos Cx47-Cx31.3 en respuesta a pulsos de voltaje intercelular de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración. En los pares Cx31.3-Cx31.3 no se detectó acoplamiento eléctrico (NA), pero si entre los pares Cx47-Cx31.3; *ii)* gráficas G_j/V_j para el valor de conductancia inicial (G_{j0i} ; \circ) y el valor de estado estacionario de la conductancia (G_{jSSi} ; \bullet). **B-i)** Registros de las corrientes intercelulares (I_j) entre los pares Cx47/Cx31.3-Cx47/Cx31.3 y los pares Cx47/Cx31.3-Cx47 y Cx47/Cx31.3-Cx31.3; *ii)* gráficas G_j/V_j para el valor inicial (G_{j0i} ; \circ) y el valor de estado estacionario (G_{jSSi} ; \bullet) de la conductancia. Se han superpuesto las curvas de Boltzmann de los canales Cx47-Cx47 (--) y Cx47-Cx31.3 (--). Los pares Cx47/Cx31.3-Cx47/Cx31.3 y los Cx47/Cx31.3-Cx47 muestran una dependencia de V_j muy parecida a la observada en los pares Cx47-Cx47, mientras que los pares Cx47/Cx31.3-Cx31.3 muestran una dependencia parecida a la de los canales Cx47-Cx31.3 indicando que las dos conexinas no son capaces de combinarse heteromericamente.

concentración final. Los pares Cx31.3/Cx47-Cx31.3-Cx47 y los pares Cx31.3/Cx47-Cx47 desarrollaron altos niveles de acoplamiento eléctrico ($9.3 \pm 5.3 \mu\text{S}$ y $15.6 \pm 5.1 \mu\text{S}$) con unas propiedades de regulación por V_j indistinguibles de las de los canales homoméricos Cx47-Cx47. En el caso de los pares Cx47/Cx31.3-Cx31.3 se detectó paso de corriente con unos niveles muy bajos de acoplamiento eléctrico ($0.05 \pm 0.03 \mu\text{S}$) y con unas propiedades de regulación por voltaje indistinguibles de las observadas en los canales heterotípicos Cx47-Cx31.3 (Fig. 21 A y B). Estos resultados indican que las Cx31.3 y la Cx47 no se combinan para formar hemicanales heteroméricos y que los hemicanales homoméricos de Cx31.3, que no se combinan consigo mismo, son capaces de unirse a los hemicanales de Cx47 y formar canales heterotípicos pero con una muy baja eficacia.

4.2.2. Canales intercelulares entre las conexinas astrocitarias.

Los astrocitos, como los oligodendrocitos, expresan varias conexinas. La Cx43 es la mayoritaria, pero también expresan la Cx30 (Nagy y col., 1999) y la Cx26 (Nagy y col., 1999; Rash y col., 2001). Cuando se expresaron las tres Cx's humanas en nuestro sistema de expresión, las tres indujeron la formación de canales homotípicos con valores altos de conductancia intercelular, pero no se detectó acoplamiento eléctrico cuando se aparearon los oocitos que expresaban la Cx43 humana con los oocitos inyectados con la Cx30 ni con la Cx26 (Fig. 22, A). A su vez, los oocitos que expresaban la Cx30 sí se acoplaron eléctricamente con los inyectados con la Cx26 (Fig. 22, A). En función de esta combinatoria, el acoplamiento eléctrico entre los astrocitos humanos podría estar mediado por una parte, por canales homotípicos de Cx43, y por otra parte, por canales de Cx30 y Cx26. En todos los canales homotípicos la corriente intercelular se reduce cuando aumenta el gradiente de voltaje intercelular, pero los distintos canales astrocitarios se diferencian significativamente en sus propiedades cinéticas y en la sensibilidad a voltaje. La sensibilidad a voltaje es muy marcada en el caso de los canales homoméricos de Cx30, intermedia en el caso de los canales de Cx43 y baja en los canales de Cx26 (Fig. 22B, *i-ii*; ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 6).

Los canales entre la Cx26 y la Cx30, que fue la única combinación heterotípica funcional encontrada entre las conexinas astrocitarias; se caracterizan por una ligera rectificación del valor inicial de la conductancia, que disminuye y aumenta ligeramente con los pulsos de polaridad negativa y positiva aplicados en el lado de la Cx26, de 1.0 a 0.8 desde 0 a -100 mV y de 1.0 a 1.2 desde 0 a +100 mV.

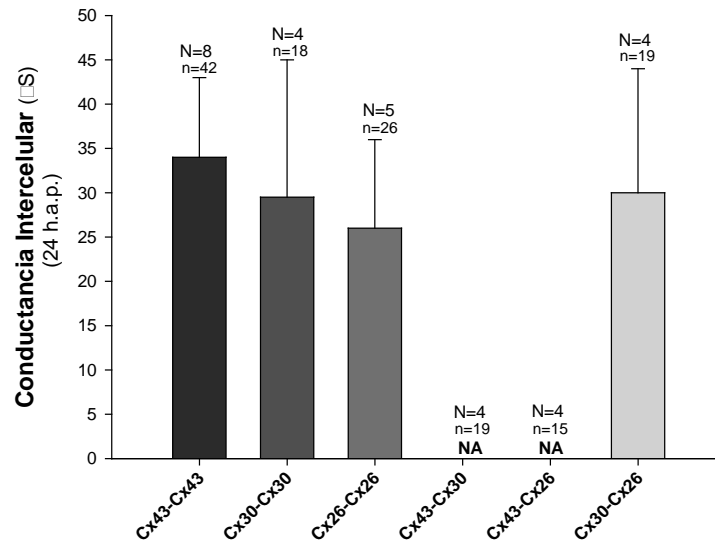
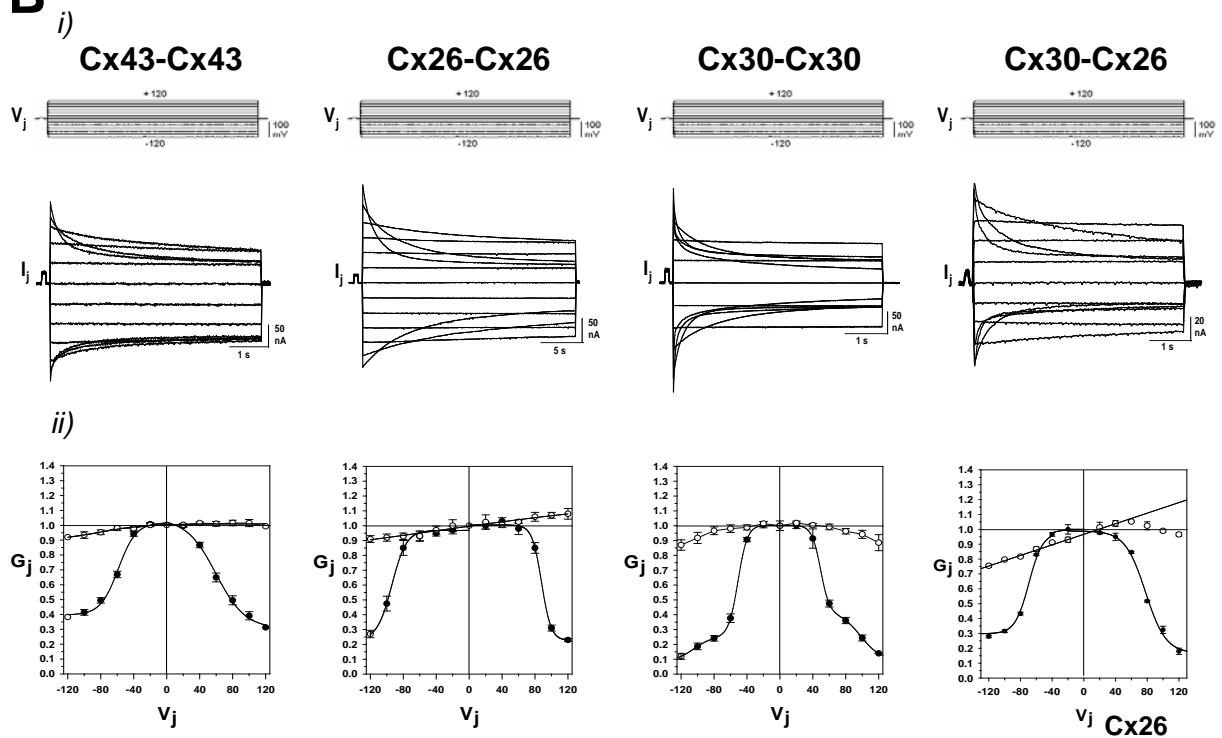
A**B**

Figura 22. Canales intercelulares entre las conexinas astrocitarias. **A)** Nivel de acoplamiento eléctrico detectado entre pares homotípicos y heterotípicos de oocitos inyectados con las Cx43, Cx30 y Cx26. Las tres Cx's indujeron la formación de canales homotípicos con valores altos de conductancia intercelular; en las combinaciones heterotípicas solo se detectó acoplamiento entre los pares Cx30-Cx26. Los datos representan valores promedio ($\bar{x} \pm s.e.$; N= número de experimentos; n= número de pares registrados; NA, no acoplamiento). **B)** Regulación por voltaje de los canales intercelulares formados por las Cx's astrocitarias. **A-i)** Registros de las corrientes intercelulares (I_j) inducidas en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración; **ii)** gráficas G_j/V_j para el valor de conductancia inicial (G_{j0} ; \circ) y el valor de estado estacionario (G_{jss} ; \bullet). Los canales homoméricos de Cx43-Cx43, Cx26-Cx26 y Cx30-Cx30 difieren significativamente en sus propiedades de dependencia de V_j , los canales de Cx30 son los más sensibles a voltaje y los de Cx26 los menos sensibles; la dependencia de los canales de Cx43 es intermedia (ver parámetros de Boltzmann en Tabla 6). Los canales heterotípicos Cx30-Cx26 muestran rectificación instantánea en función de la amplitud y de la polaridad de V_j y la rectificación del valor de estado para las dos polaridades de V_j es asimétrica.

A su vez, la rectificación del valor de estado también es asimétrica para las dos polaridades de V_j , la G_{jss} se reduce más para los pulsos de polaridad negativa en el lado de Cx26, que es vista como polaridad positiva desde el interior de la célula Cx30 (Fig. 22B, *i-ii*).

4.2.3. Canales intercelulares oligodendro-astrocitarios.

A continuación se analizó la compatibilidad funcional entre la Cx47 y las otras dos Cx's oligodendrocitarias, la Cx32 y la Cx31.3, con las tres conexinas astrocitarias la Cx43, la Cx30 y la Cx26 (Fig. 23). Los datos muestran un alto grado de acoplamiento eléctrico entre los pares heterotípicos Cx47-Cx43, bajo acoplamiento entre los pares Cx47-Cx30 y ausencia de acoplamiento entre los pares Cx47-Cx26. Respecto a la Cx32, los registros muestran un alto grado de acoplamiento entre los pares heterotípicos Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26 y ausencia de acoplamiento entre los pares de Cx32-Cx43. La Cx31.3 oligodendrocitaria no fue capaz de combinarse funcionalmente con ninguna de las tres conexinas astrocitarias. Por tanto, la comunicación intercelular oligodendrocito-astrocito podría estar mediada por canales heterotípicos de Cx47-Cx43 y por los canales heterotípicos Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26.

4.2.3.1. Propiedades electrofisiológicas de los canales heterotípicos Cx47-Cx43.

Los canales formados por la Cx47 oligodendrocitaria con la Cx43 astrocitaria son de tipo "rectificador instantáneo". Las corrientes intercelulares inducidas por los pulsos de V_j de polaridad positiva aplicados en el oocito que expresa la Cx47 se reducen de amplitud con el incremento del gradiente de voltaje, mientras que las inducidas por los pulsos de polaridad negativa aumentan progresivamente con el incremento del gradiente de V_j (Fig. 24A, *i*). En los canales Cx47/Cx43, también hay rectificación del valor de estado de las corrientes para las dos polaridades de V_j . El cierre de las I_j 's sigue un curso temporal bi-exponencial con distintos valores de constante de tiempo y distintas amplitudes relativas de los componentes rápido y lento para los pulsos positivos y negativos de V_j (Fig. 24A, *ii-iii*). Las gráficas G_j/V_j ilustran esta doble rectificación asimétrica de los canales Cx47-Cx43 (Fig. 24A, *iv*): la rectificación del valor inicial de la conductancia (G_{jo}) dependiente de la polaridad y de la amplitud del V_j , cuyo valor aumenta de 1.0 a 1.3 desde 0 a -100 mV y disminuye otro tanto de 0 a +100 mV para los pulsos aplicados en el lado de la Cx47, y la rectificación del valor estado (G_{jss}) que ocurre para las dos polaridades

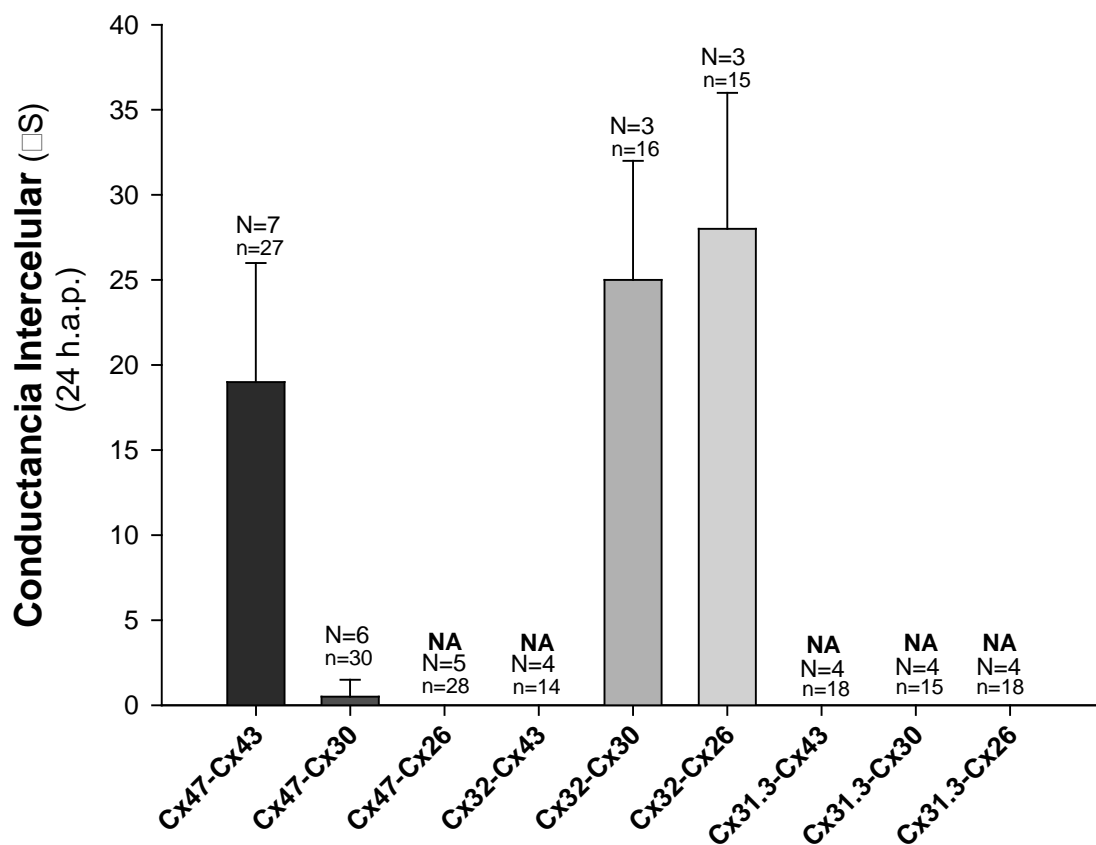


Figura 23. Interacciones funcionales entre las conexinas oligodendrocitarias y astrocitarias. La Cx47 oligodendrocitaria forma canales heterotípicos con la Cx43 con niveles elevados de acoplamiento y con la Cx30 con bajos niveles, sin embargo la Cx47 no es capaz de combinarse con la Cx26. La Cx32 oligodendrocitaria forma canales heterotípicos con la Cx30 y la Cx26 pero no con la Cx43 astrocitaria. La Cx31.3 oligodendrocitaria no es capaz de combinarse con ninguna de las Cx's astrocitarias. Los datos representan valores promedio ($\bar{x} \pm s.e.$; N= número de experimentos; n= número de pares registrados; NA, no acoplamiento).

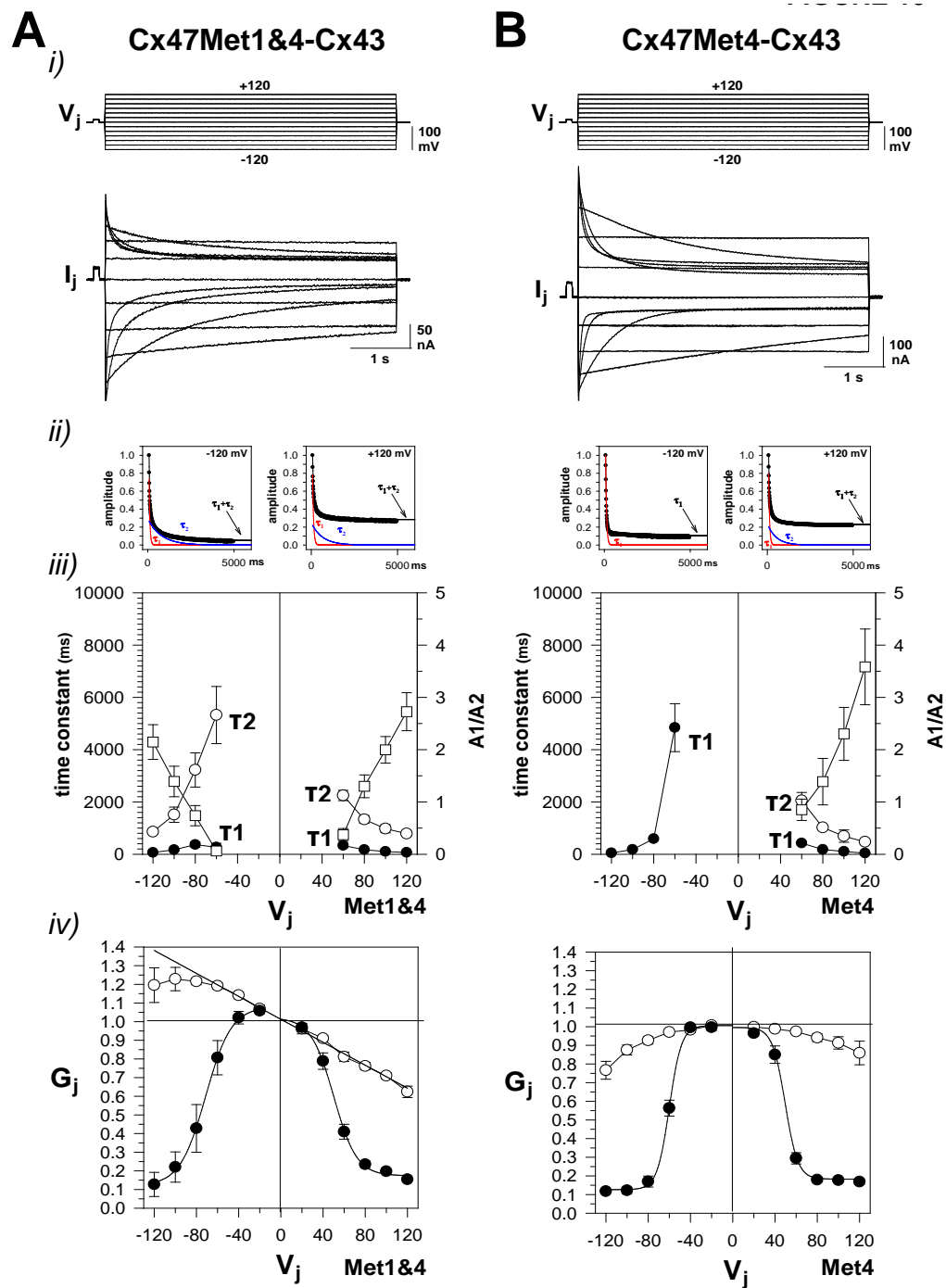


Figura 24. Dependencia del V_j de los canales heterotípicos de la Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 con la Cx43 astrocitaria. A) Registros de las corrientes (I_j) en respuesta a pulsos de V_j (V_j) entre ± 120 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración. En ambos casos los pulsos se aplicaron en el lado de la Cx47. La amplitud de las I_j 's de los canales Met1&4/Cx43 varía asimétricamente con el incremento del V_j , aumenta con los pulsos de polaridad negativa y se reduce progresivamente con los de polaridad positiva. Esta asimetría no se observa en los canales Met4/Cx43. En ambos canales, además, la corriente se cierra con el incremento del gradiente de V_j para las dos polaridades. **B)** Curso temporal del cierre de las I_j 's; en los canales Met1&4-Cx43 el cierre es biexponencial para las dos polaridades de V_j mientras que en los Met4/Cx43 es monoexponencial para los V_j negativos y biexponencial para los positivos (*i*); *ii*) gráfica de las constantes de tiempo (τ_1 , ○; τ_2 , ●) y de amplitud relativa del componente rápido y del lento ($A1/A2$) en función del V_j . **C)** Gráficas G_j/V_j del valor inicial de la conductancia (G_{j0} ; ○) y del valor del estado estacionario (G_{jss} ; ●). Solo en el caso de los canales Met1&4/Cx43, la G_{j0} rectifica asimétricamente con la polaridad del V_j . En ambos canales, la G_{jss} rectifica para las dos polaridades del V_j con los parámetros de Boltzmann de la Tabla 7.

del voltaje. Las curvas G_{jss}/V_j para cada polaridad de V_j se ajustaron a una función de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 7. Comparando los parámetros de la dependencia de voltaje y las propiedades cinéticas del canal heterotípico Cx47-Cx43 con los de los correspondientes canales homoméricos Cx47-Cx47 y Cx43-Cx43 (Fig. 16 y 22 y Tablas 5 y 6) es posible adscribir el cierre del hemicanal de Cx47 y del hemicanal de Cx43 con la polaridad negativa del V_j .

En los estudios previos no se había descrito la “rectificación instantánea” en los canales heterotípicos de la Cx47 con la Cx43 astrocitaria (Orthmann y col., 2007). Con la finalidad de clarificar si esta discrepancia podría ser atribuida a la utilización en estos estudios de la construcción Cx47-Met4, analizamos las propiedades de los canales Cx47Met4-Cx43. El nivel promedio de acoplamiento eléctrico desarrollado entre los pares Cx47Met4-Cx43 fue significativamente mayor que el detectado entre los pares Cx47Met1&4-Cx43 ($40 \pm 5.2 \mu\text{S}$ vs $19 \pm 7.0 \mu\text{S}$, $p < 0.05$) y los canales no muestran “rectificación instantánea” (Fig. 24, B). En cuanto a la rectificación del valor de estado con el voltaje, las propiedades cinéticas de las corrientes y su sensibilidad a voltaje para los pulsos de polaridad positiva aplicados en la célula que expresa los hemicanales Cx47Met4, que son vistos como negatividad relativa desde el interior de la célula Cx43 son similares a las observadas para esa misma polaridad en los pares Cx47Met1&4-Cx43 (Fig. 24, A) y en los canales homotípicos de Cx43-Cx43 (Fig. 22, B y Tabla 6), pudiéndose atribuir al hemicanal de Cx43. Para los pulsos de polaridad negativa, la cinética de cierre monoexponencial y la mayor sensibilidad a voltaje que se observa, se corresponde con el comportamiento del hemicanal Cx47Met4 en su combinación de canal homomérico (Fig. 16B, *ii* y Tabla 5).

4.2.3.2. Permeabilidad y direccionalidad en el flujo de colorantes aniónicos y catiónicos por los canales heterotípicos de Cx47-Cx43.

La “rectificación instantánea” de las corrientes iónicas en los canales intercelulares Cx47Met1&4-Cx43 es de la misma magnitud y varía de forma similar con la polaridad de V_j que la rectificación previamente descrita en los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4 (Fig. 17). En el caso de los canales Cx47Met1&4 y Cx47Met4 encontramos una buena correlación con las diferencias de permeabilidad a los colorantes aniónicos y catiónicos que observamos entre los canales homotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met1&4 y Cx47Met4-Cx47Met4 y la presencia de rectificación iónica en los canales heterotípicos de Cx47Met1&4-Cx47Met4. Basándonos en estas observaciones, hipotetizamos que esas mismas diferencias de permoselectividad en función de la carga podrían darse entre los

canales de Cx47Met1&4 y Cx43. Primero, analizamos las propiedades de permeabilidad de los canales homoméricos de Cx43 expresados en las células N2A los mismos dos colorantes, la CF y el YP de tamaño similar pero con carga opuesta. En los cultivos transfectados con la Cx43 humana se encontró un alto porcentaje de acoplamiento (81%) con un número similar de células acopladas por el colorante catiónico YP y por el aniónico CF (58% vs 42%; n.s.) (Fig. 25B, *i-ii*). Las curvas de la función de transferencia (CT) para CF e YP en función del nivel de expresión del reportador, en este caso utilizando la proteína roja dsRED como reportador, no mostraron diferencias significativas ni en el valor de expresión en el que se alcanza el coeficiente de transferencia del 50%, ni en la pendiente de la curva de transferencia para los dos colorantes, pudiéndose concluir que ambos colorantes permean con una eficacia muy similar a través de los canales de Cx43. A continuación se analizaron las propiedades de permeabilidad de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx43 y Cx47Met4-Cx43. Para ello, cada uno de los colorantes se inyectó tanto en la célula que expresa la Cx43 como en la célula que expresa la Cx47. Para poder distinguir las células que expresan la Cx47 de las que expresan la Cx43 en los cultivos mixtos se utilizaron distintas proteínas reportadoras, la proteína verde fluorescente EGFP para la Cx47 y la proteína roja fluorescente dsRED para la Cx43. Por inmunofluorescencia, se confirmó que las placas o uniones en hendidura entre las células EGFP positivas y dsRED positivas estaban formadas por los canales heterotípicos Cx47-Cx43 (Fig. 26, A). El porcentaje total de acoplamiento obtenido cuando se inyectaban la CF y el YP en la célula Cx47Met4 o en la célula Cx43 en los pares Cx47Met4-Cx43 fue similar (71% vs 61%; n.s.). Sin embargo, en el caso de los pares Cx47Met1&4-Cx43, el porcentaje de acoplamiento varió en función de si se inyectaba la célula que expresa la Cx43 o la Cx47-Met1&4 desde un 65% a un 30% ($p < 0.05$). El porcentaje de acoplamiento por YP y por CF en las inyecciones realizadas en las células que expresan la Cx43 y la Cx47-Met4 de los pares Cx43-Cx47Met4 y en las células Cx43 de los pares Cx43-Cx47Met1&4 fue similar, pero cuando las inyecciones se hicieron en la célula que expresa la Cx47Met1&4 se observó un mayor porcentaje de acoplamiento por YP que por CF (71% vs 29%, $p < 0.05$), indicando una menor transferencia del colorante aniónico desde la célula Cx47Met1&4 a la célula Cx43 que en la dirección opuesta. En este sentido, las curvas de transferencia de CF y de YP en función de donde se realiza la inyección aportan información adicional (Fig. 26, D). En el caso de los pares Cx47Met4-Cx43, las funciones de transferencia para el colorante aniónico CF y el

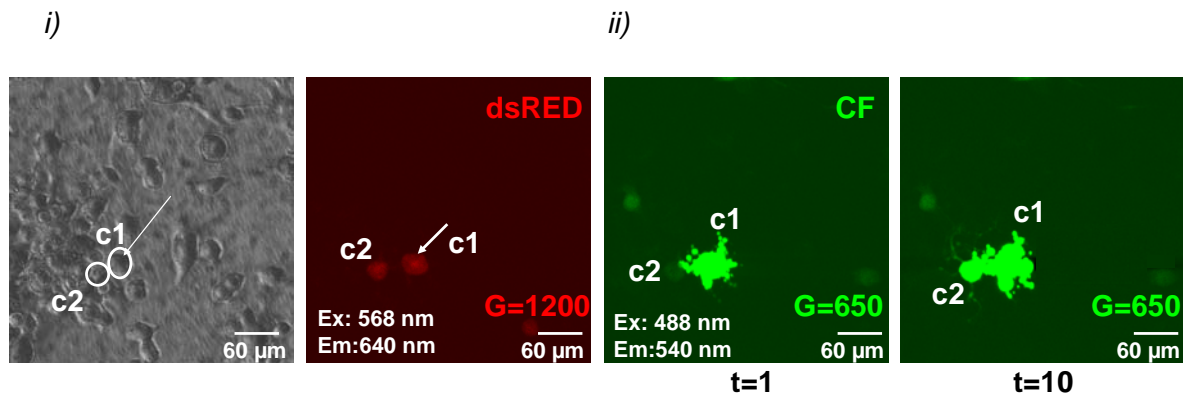
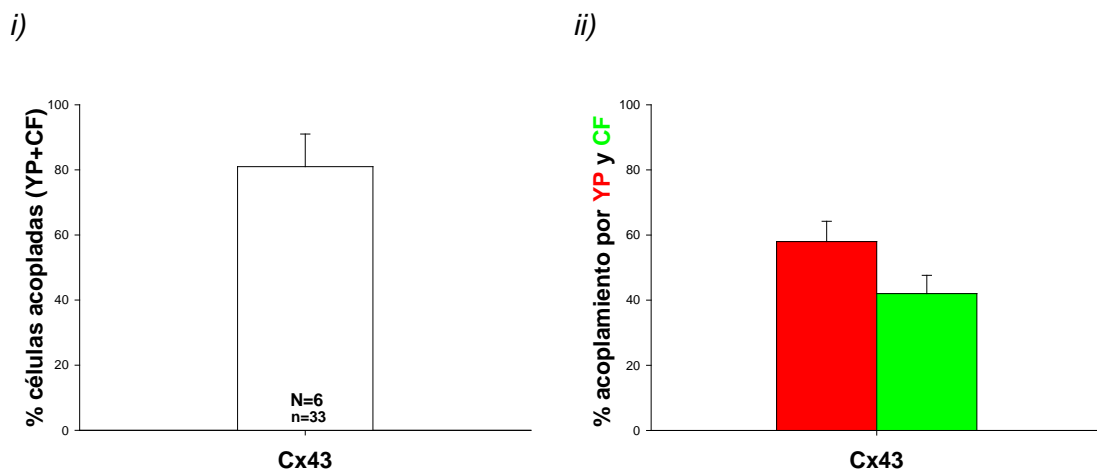
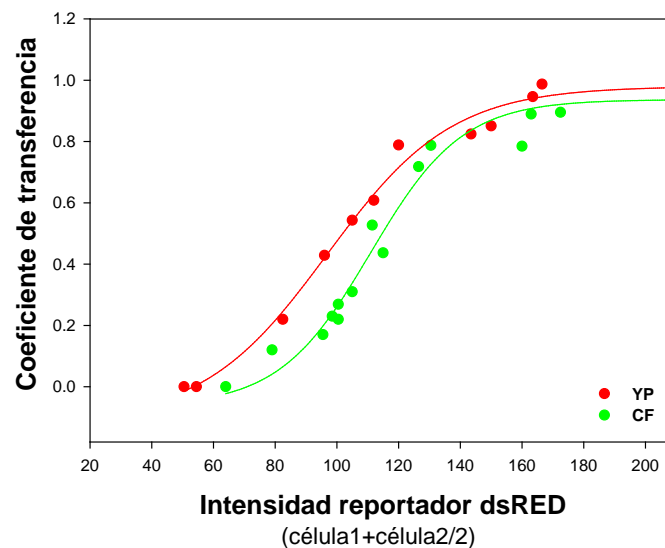
A**B****C**

Figura 25. Permeabilidad de los canales de la Cx43 humana a colorantes aniónicos (5-6 carboxifluoresceína, CF) y catiónicos (yoduro de propidio, YP). A) Técnica de difusión de colorante; *i)* selección del par de células dsRED positivas que expresan la Cx43; *ii)* ejemplo de inyección de una célula c1 con 5-6 carboxifluoresceína (CF) y difusión del colorante a la célula vecina (c2). **B-*i)*** Porcentaje total de células dsRED positivas acopladas; *ii)* porcentaje de acoplamiento para cada colorante. Las células transfectadas con la Cx43 presentan una alta incidencia de acoplamiento y similar para ambos colorantes. **C)** Función de transferencia para CF (verde) e YP (rojo) vs. intensidad del reportador. El acoplamiento es alto entre las células dsRED positivas (B, *i)*). Las curvas de transferencia para CF e YP son similares.

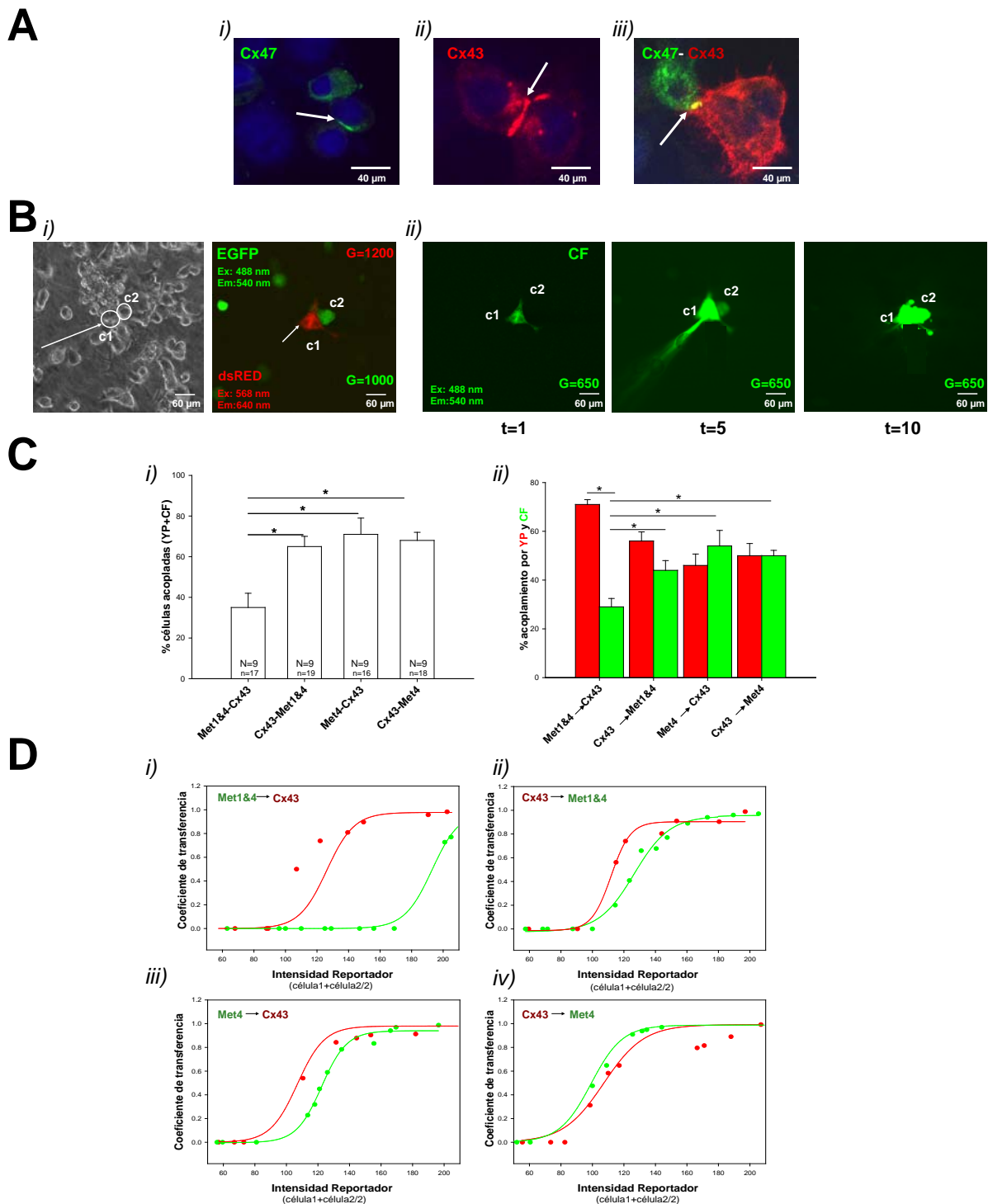


Figura 26. Permeabilidad de los canales heterotípicos Cx47-Cx43 a colorantes aniónicos (5-6 carboxifluoresceína, CF) y catiónicos (yoduro de propidio, YP). **A**) Imágenes de microscopía confocal mostrando las placas de Cx47 (*i*), Cx43 (*ii*) y mixtas de Cx47 con Cx43 (*iii*) en las zonas de contacto entre las células. **B-i-ii)** Co-cultivo de células verdes transfectadas con la construcción Cx47Met1&4 o Met4 (EGFP) y de células rojas transfectadas con la Cx43 (ds RED); *ii*) curso temporal de la inyección de CF en la célula dsRED positiva (c1) y de la difusión del colorante a la célula vecina EGFP positiva (c2). **C-i)** Porcentaje total de acoplamiento; *ii*) porcentaje de acoplamiento para cada colorante. **D**) Curva de transferencia para cada colorante en función del nivel de expresión del reportador y de la célula del par Cx47Met1&4-Cx43 y Cx47Met4-Cx43 en la que se realiza la inyección (*i-iv*). Entre los pares Met1&4-Cx43 se observa un menor porcentaje de acoplamiento cuando se inyecta el colorante en la célula que expresa la Cx47 que en la que expresa la Cx43 (*C-i*; $p < 0.05$) y un menor acoplamiento por CF que por YP (*C-ii*; $p < 0.05$); la curva de transferencia para la CF está desplazada hacia niveles de expresión sustancialmente más elevados. Este tipo de direccionalidad para la difusión del colorante aniónico no se observa cuando se inyecta la célula Cx47-Met4 en los pares Cx47Met4-Cx43.

catiónico YP son similares entre sí y no varían en función de si la inyección se realiza en la célula que expresa la Cx47Met4 o la Cx43 (Fig. 26D, *ii-iv*). En el caso de los pares de células Cx47Met1&4-Cx43, la función de transferencia para la CF y el YP son también superponibles cuando los colorantes se inyectaron en la célula que expresa la Cx43; sin embargo, cuando las inyecciones se realizan en la célula que expresa la Cx47-Met1&4 no se observan cambios en la función de la transferencia del YP, pero en el caso de las inyecciones con CF, la curva de transferencia se desplaza de forma muy marcada hacia los valores de expresión más altos, indicando que el colorante aniónico únicamente difunde desde la célula Cx47-Met1&4 a la célula que expresa la Cx43 en esas condiciones (Fig. 26D, *i-ii*). De estos estudios se concluye que en los canales Cx47Met1&4-Cx43, el colorante aniónico CF difunde significativamente mejor desde el hemicanal de la Cx43 al de la Cx47Met1&4 que en la dirección opuesta, indicando que con la formación de los canales heterotípicos se crea una barrera para la difusión que origina direccionalidad en el flujo intercelular de las moléculas en función de la carga. La bidireccionalidad en el flujo se restablece uniendo a los hemicanales de Cx43 los hemicanales de la Cx47Met4, indicando que el factor limitante de la difusión reside en los tres primeros aminoácidos del extremo 5' del amino terminal de la Cx47 que forma el vestíbulo citoplasmático del poro del canal.

4.2.3.3. Propiedades electrofisiológicas de los otros canales oligodendrocito-astrocito.

En contraposición de los canales oligodendro-astrocitario de la Cx47 con la Cx43, que inducen un relativo alto grado de acoplamiento eléctrico, los canales que forma la Cx47 con la Cx30 astrocitaria, con la que también se combina, se asocian a valores muy reducidos de conductancia intercelular ($< 0.5 \mu\text{S}$) (Fig. 23). Las corrientes intercelulares que fluyen a través de estos canales también muestran un marcado comportamiento rectificador instantáneo con el voltaje intercelular en el mismo sentido que el descrito para los canales Cx47-Cx43 pero más marcado, ya que aumentan y disminuyen progresivamente con la negatividad y la positividad relativa de la célula que expresa la Cx47 de 1.0 a 0.5 desde 0 a +100 mV y de 1.0 a 1.5 desde 0 a -100mV (Fig. 27, A). El valor de estado de la conductancia (G_{jss}) también rectifica con el incremento del gradiente de V_j y lo hace de forma simétrica para las dos polaridades (ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 7).

La Cx32 oligodendrocitaria también participa en las uniones heterólogas oligodendrocito-astrocito formando canales heterotípicos con la Cx30 y con la

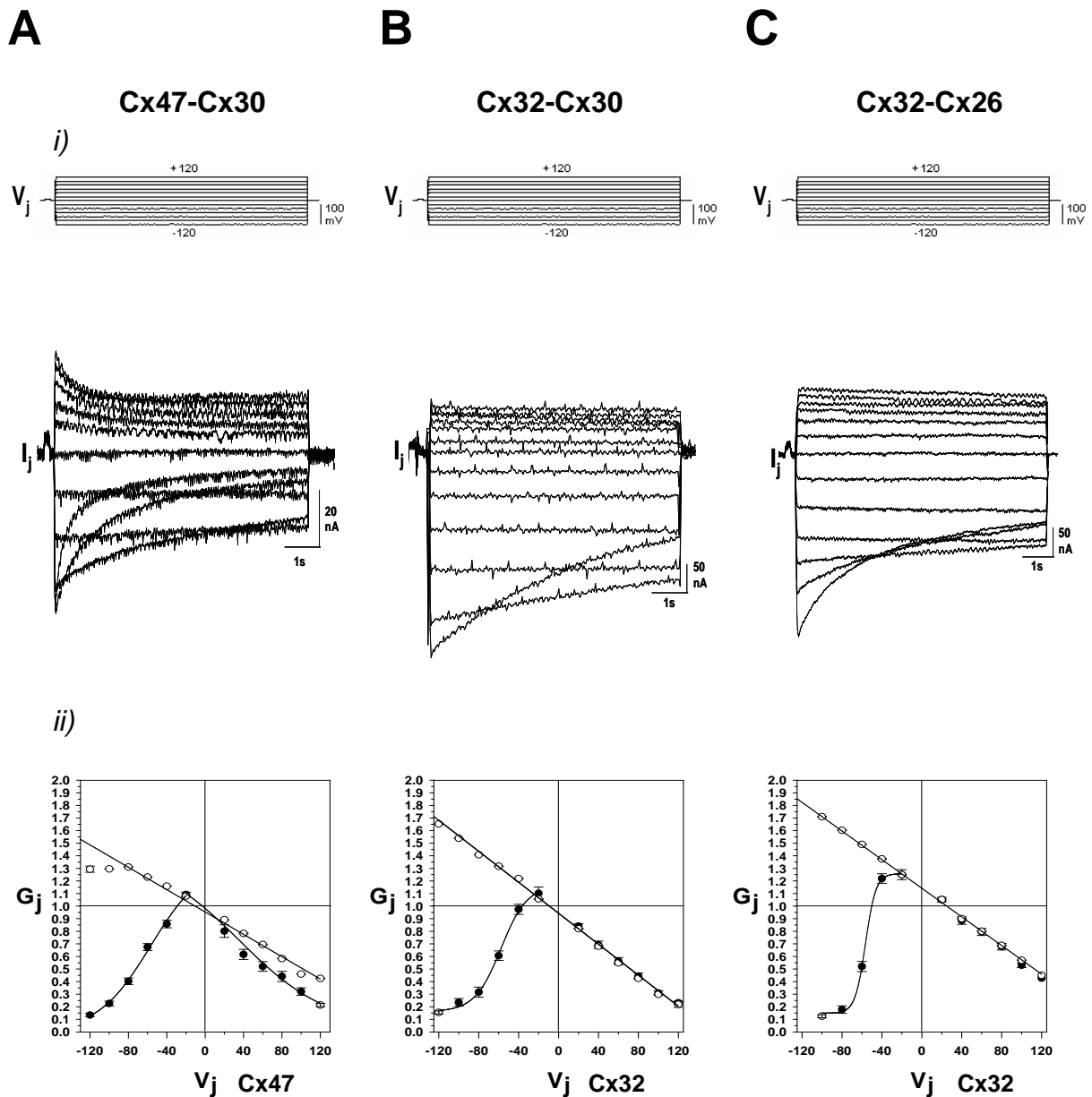


Figura 27. Propiedades rectificadoras con el voltaje intercelular de los canales oligodendro-astrocitarios Cx47-Cx30 (A), Cx32-Cx30 (B) y Cx32-Cx26 (C). *i)* Registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a un protocolo de voltaje intercelular de ± 120 mV aplicados en el oocito que expresa la Cx47 o Cx32 oligodendrocitarias. *ii)* Gráficas G_j/V_j para el valor de conductancia inicial (G_{j0} ; \circ) y el valor de estado estacionario (G_{jss} ; \bullet) ajustadas a una función de Boltzmann (ver parámetros Tabla 7). En los tres casos se observa una marcada rectificación de la G_{j0} en el mismo sentido, aumenta con la polaridad negativa y disminuye con la positiva del V_j vista desde la célula que expresa la Cx47 o Cx32 oligodendrocitaria; y la rectificación de la G_{jss} ocurre para las dos polaridades en los pares Cx47-Cx30 y en los pares Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26 solo se observa para la polaridad positiva vista por la célula que expresa la Cx32.

Cx26 astrocitarias, en ambos casos con un relativo alto nivel de acoplamiento eléctrico. Los canales Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26, también muestran un marcado carácter rectificador instantáneo, el valor inicial de la conductancia aumenta y disminuye, en la misma magnitud en los dos tipos de canales, de 1.0 a 1.6 y a 0.4 cuando el potencial de la célula que expresa la Cx32 varía desde 0 a -100 mV y de 0 a +100 mV, respectivamente (Fig. 27, B y C). En ambos casos, el valor de estado de la conductancia intercelular (G_{jss}) únicamente rectifica para los pulsos de polaridad negativa aplicados en el lado de la Cx32 oligodendrocitaria (Fig. 27B y C, *ii*) (ver parámetros de Boltzmann en la Tabla 7).

En relación con el acoplamiento intra o inter-oligodendrocito, estos estudios indican que la Cx47 no se combina con la Cx32 pero si forma canales heterotípicos con la Cx31.3 con un bajo nivel de acoplamiento. En cuanto al acoplamiento oligodendrocito-astrocito, los canales heterotípicos que son funcionales son Cx47-Cx43, Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26 y con bajo acoplamiento los canales de Cx47-Cx30. Todos ellos son canales de tipo rectificador instantáneo en función del voltaje intercelular y todos ellos rectifican de la misma forma: la conductancia intercelular aumenta con la negatividad relativa de la célula que expresa la Cx47 y disminuye con la positividad relativa. En el caso de los canales Cx47-Cx43 la rectificación iónica se correlaciona con la presencia de una barrera para la difusión de los colorantes aniónicos desde la célula que expresa la Cx47 oligodendrocitaria a la célula que expresa la Cx43 astrocitaria. La rectificación iónica y la direccionalidad en la difusión de los colorantes aniónicos desaparecen cuando se eliminan los tres primeros aminoácidos del dominio NT de la Cx47.

4.3. ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE PELIZAEUS MERZBACHER (PMLD) ASOCIADA A MUTACIONES RECESIVAS DE LA CONEXINA 47.

4.3.1 Identificación de dos nuevas mutaciones de PMLD en el gen *GJC2*.

Hasta el momento se han descrito en la literatura 34 mutaciones asociadas a la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (Tabla 2). El análisis del gen *GJC2* que se ha realizado (en colaboración con la Unidad de Genética Molecular del Hospital La Paz), en 98 pacientes con leucodistrofia hipomielinizante, en los que previamente se habían descartado mutaciones en el gen *PLP1*, nos ha permitido identificar dos nuevas mutaciones en homocigosis en la región codificante de la Cx47: la mutación H252D asociada a un fenotipo clásico de la enfermedad y la Y47H que causa un fenotipo congénito más grave.

Familia 1:

El probando es un varón que presenta el cuadro clínico clásico de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (PMLD), ya que debuta con nistagmus y mioclonías a los 6 meses y que cursa con retraso del desarrollo motor de grado 3/4, (Tabla 7) (Cailloux y col. 2000). Con la edad aparecen movimientos coreoatetósicos, lenguaje disártrico y trastornos neurológicos (visuales y auditivos) y los potenciales evocados auditivos y visuales anormales. Actualmente camina con órtesis y andador y el desarrollo cognitivo está un poco por debajo de la media para su edad. La imagen de resonancia (RMN) actual presenta un claro patrón de retraso de la mielinización con hipomielinización difusa. La secuenciación del ADN del probando reveló ser homocigoto para la mutación c.754 C>G (Fig. 28, A). El estudio genético se completó con el análisis de los individuos de las tres generaciones de la familia que eran asintomáticos: los padres, una hermana del padre y los dos abuelos y que reveló que eran portadores heterocigotos para la mutación (Fig. 28, A). Esta es la primera mutación en el gen *GJC2* identificada en la población española.

La mutación c.754 C>G origina la sustitución del residuo de histidina en la posición 252 por un aspártico, en el segundo dominio extracelular de la Cx47 (Fig. 28, B).

Familia 2:

El probando es un varón, hijo de padres consanguíneos de una familia de origen marroquí, con un cuadro clínico congénito muy grave, que se manifiesta al nacimiento con una marcada hipotonía y en los primeros meses de vida, con

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con las mutaciones en el gen *GJC2* que se estudiaron en este trabajo.

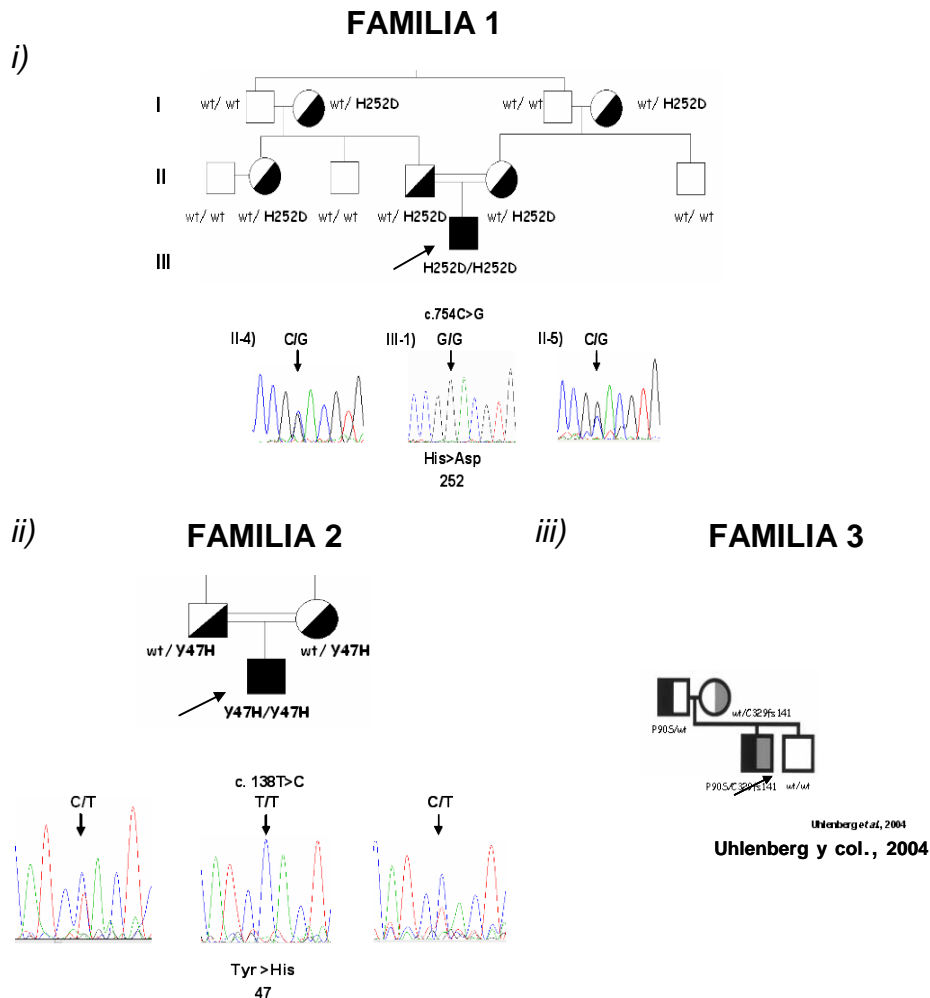
Mutación	H252D/H252D	Y47H/Y47H	P90S/C329fs141*
Fenotipo			
FORMA CLÍNICA ⁽¹⁾	CLÁSICA	CONNATAL	CONNATAL
GRADO DE DESARROLLO MOTOR ⁽²⁾ :	3/4	0/4	0/4
1. Mantenimiento de la cabeza	SI (retrasado)	NO	NO
2i. Sentarse sin ayuda	SI (retrasado)	NO	NO
2ii. Lenguaje	SI (disartria)	NO	NO
3. Mantenerse de pie	SI (retrasado)	NO	NO
4. Andar sin ayuda	NO	NO	NO
OTROS SÍNTOMAS	Ataxia Coreoatetosis Espasticidad	Hipotonía Coreoatetosis	Ataxia Crisis epilépticas
MRI	Hipomielinización difusa	Hipomielinización marcada	ND
NEUROFISIOLOGÍA	Potenciales evocados auditivos y Visuales anormales	Potenciales evocados auditivos y Visuales anormales	ND

(1) La clasificación de las distintas formas clínicas está basada en la edad de inicio de la enfermedad, en la sintomatología neurológica y en el grado de desarrollo motor conseguido.

(2) La identificación de los grados de retraso motor está basada en la adquisición de los hitos de 1 a 4 (Cailloux y col., 2000).

* La mutación ha sido descrita por primera vez por Orthmann y col., 2007.

A



B

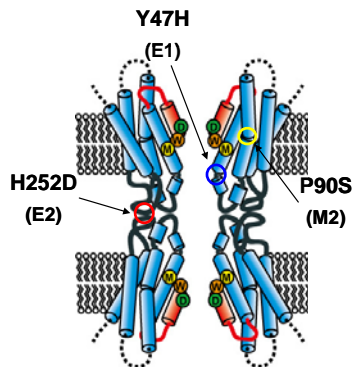


Figura 28. A) Pedigrés de las familias con PMLD1. *i)* Se muestra el árbol genealógico de la primera familia española afectada, en la que se analizaron los genotipos de todos los individuos de tres generaciones. El *probando* (III), es homocigoto para la mutación c.754C>G (H252D) y presenta un fenotipo clásico de PMLD1; los padres, una hermana del padre y las dos abuelas son portadores heterocigotos asintomáticos de la mutación; *ii)* árbol genealógico de la familia de origen marroquí afectada, en la que se pudieron analizar solamente los genotipos de los padres del probando. El probando es homocigoto para la mutación c.138T>C (Y47H) y presenta el fenotipo más grave de PMLD; los padres son portadores heterocigotos de la mutación. *iii)* árbol genealógico de la familia afectada, en la que se analizaron solamente los genotipos de los padres del individuo afectado. El probando es heterocigoto para la mutación c.268C>T (P90S) y para la mutación materna c.989delC (C329fs141). **B) Localización de las mutaciones en los distintos dominios de la proteína.** La mutación H252D se localiza en el segundo dominio extracelular de la Cx47, en una posición relativamente conservada en las conexinas e implicada en la unión de los hemicanales; mientras que la mutación Y47H se encuentra en el primer dominio extracelular y la mutación P90S afecta a un residuo perfectamente conservado en todas las conexinas y se localiza en el segundo dominio transmembrana.

nistagmus, coreoatetosis y retraso en el desarrollo motor de grado 0/4. El cuadro clínico evolucionó hacia un mayor deterioro motor y un empeoramiento de la hipotonía y la aparición de una espasticidad progresiva. Nunca consiguió la sedestación, ni la bipedestación, ni tampoco la deambulación independiente y muestra disartria y un marcado retraso psicomotor. Nunca sufrió crisis epilépticas y su electroencefalograma es normal, sin embargo presenta los potenciales evocados auditivos, visuales y somatosensoriales anormales. Las imágenes de RMN muestran alteraciones de la sustancia blanca, con hipomielinización marcada y difusa. En la secuenciación de la región codificante del gen *GJC2* se detectó la mutación c.138T>C en homocigosis en el probando y en heterocigosis en ambos padres (Fig. 28, A). Dicha mutación predice la sustitución del residuo de la tirosina en la posición 47 por una histidina, en el primer dominio extracelular de la proteína (Fig. 28, B).

Familia 3:

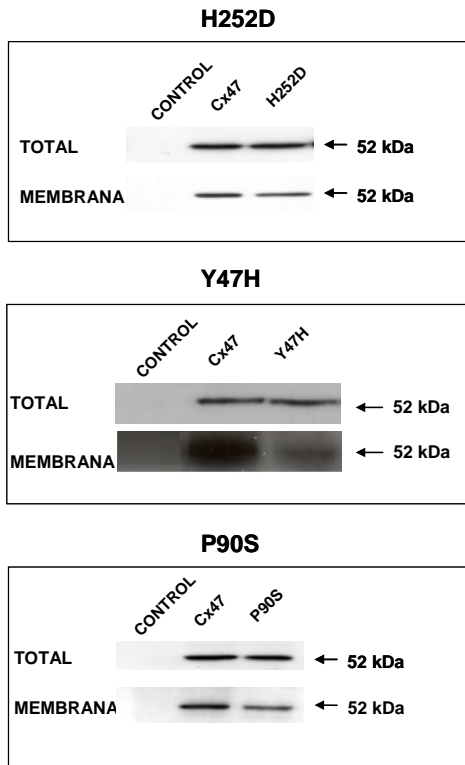
La tercera mutación que se ha analizado en este estudio fue descrita por Uhlenberg y col. en 2004. El probando presenta la forma clásica de la enfermedad, con nistagmus, retraso en el desarrollo motor (grado 3/4), ataxia y crisis epilépticas (Tabla 7). En el estudio genético se identificaron dos mutaciones, la c.268C>T y la c.989delC en heterocigosis compuesta, que dan lugar respectivamente a la sustitución P90S y C329fs141. La mutación P90S, que es la que se analiza en este estudio, afecta a un residuo perfectamente conservado en todas las conexinas, que se ubica en el segundo dominio transmembrana (Fig. 28, B).

4.3.2. Ensayo funcional de las mutaciones de PMLD1, H252D, Y47H y P90S.

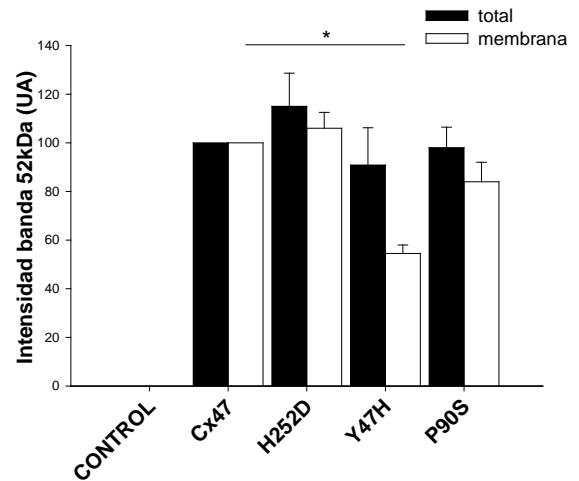
4.3.2.1. Biosíntesis de los canales mutados.

Para poder determinar el tipo y grado de disfunción que causan las tres mutaciones, primero se analizó, el nivel de expresión total y en la membrana celular de las tres proteínas mutadas utilizando el sistema de los oocitos (Fig. 29 A y B). Los oocitos se inyectaron con los mARN de los tres mutantes, el H252D, el Y47H y el P90S, y con el mARN de la Cx47 silvestre a la misma concentración (0.5 µg/µl) y a las 48 horas, los oocitos se procesaron para su análisis por western blot (Fig. 29). En los geles de SDS correspondientes al lisado de los oocitos se detectó una banda de ~52 kDa, correspondiente a la forma monomérica de la proteína Cx47, con una intensidad similar para los tres mutantes y la proteína Cx47 silvestre (Fig. 29, B). Las proteínas mutadas también fueron detectadas en superficie celular utilizando la

A



B



C

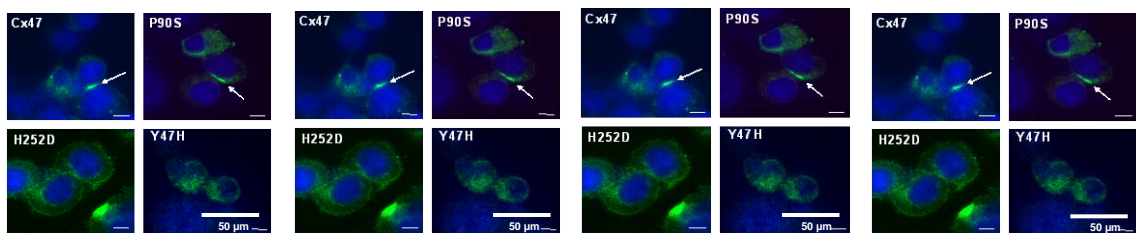


Figura 29. Biosíntesis de los canales mutados de PMLD1. A) Expresión total y en superficie de las proteínas mutadas. Western blots de proteína total y de membrana biotinilizada. **B)** Cuantificación de la intensidad de la banda total y en membrana vs. Cx47 silvestre. El nivel de expresión total de los mutantes fue similar al de la Cx47 silvestre y la expresión en la superficie celular está significativamente reducida en el caso del mutante Y47H ($p < 0.05$) ($N=5$). **C) Localización subcelular de los mutantes de la Cx47 humana.** Imágenes de microscopía confocal mostrando que el mutante P90S es el único capaz de formar placas o uniones en hendidura en la zona de contacto entre las células tal y como lo hace la proteína silvestre (flecha).

técnica de biotinilización, pero los niveles de expresión celular variaron en función del mutante analizado; mientras que para el mutante H252D el nivel fue similar al de la proteína silvestre, en el caso de los mutantes P90S e Y47H, fueron menores, pero solo en el caso de la Y47H esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), sugiriendo un procesamiento defectuoso de la proteína o/y un transporte anómalo a la superficie celular (Fig. 29, B).

Por inmunocitoquímica, en las imágenes de microscopía confocal de las células transfectadas con la Cx47 silvestre y las proteínas mutadas, se observó marcaje intracelular en todos los casos y la formación de placas en la zona de contacto entre las células solo en las células transfectadas con la Cx47 silvestre y también, pero de forma ocasional, en el caso de la mutación P90S (Fig. 29, C).

4.3.2.2. Capacidad de los mutantes H252D, Y47H y P90S, para formar hemicanales funcionales. Propiedades electrofisiológicas.

La presencia de las proteínas mutadas en la superficie celular sugiere que son capaces de formar hemicanales en la membrana plasmática. Para determinar si estos hemicanales eran funcionales, se midieron las corrientes transmembrana en respuesta a un protocolo de pulsos de voltaje en oocitos aislados expuestos a una solución ND96 con una concentración normal de cationes divalentes (1.8 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}) y en medio en el que no se añaden cationes divalentes (0 mM Ca^{2+} y 0 mM Mg^{2+}) (Fig. 30, A). De forma similar a como se describió en el caso de los hemicanales de Cx47 silvestre (Fig. 12), en los oocitos que expresaban los tres mutantes solo se detectó activación de las corrientes de hemicanal por despolarización, en ausencia de cationes divalentes en la solución extracelular. En estas condiciones se registró un incremento de la corriente de entrada en el potencial de fijación de -40 mV y durante el pulso de +20 mV y un aumento de las corrientes de salida para los pulsos de polaridad positiva. Cuando el potencial vuelve al valor de fijación la corriente vuelve a ser de entrada y se desactiva lentamente. La dirección de la corriente revierte en un valor próximo a 0 mV. También se observa a potenciales muy positivos (> 40 mV), la inactivación de las corrientes. Dicha inactivación se correlaciona con unas corrientes de cola a -40 mV de menor amplitud y con un curso temporal bifásico, que primero aumentan y posteriormente se reducen lentamente, sugiriendo que en este caso la desactivación de los hemicanales está precedida por una deinactivación.

Esta compleja dependencia de voltaje se caracterizó mediante un protocolo de pulsos de voltaje de ± 100 mV aplicados a un potencial de 0 mV en ausencia de

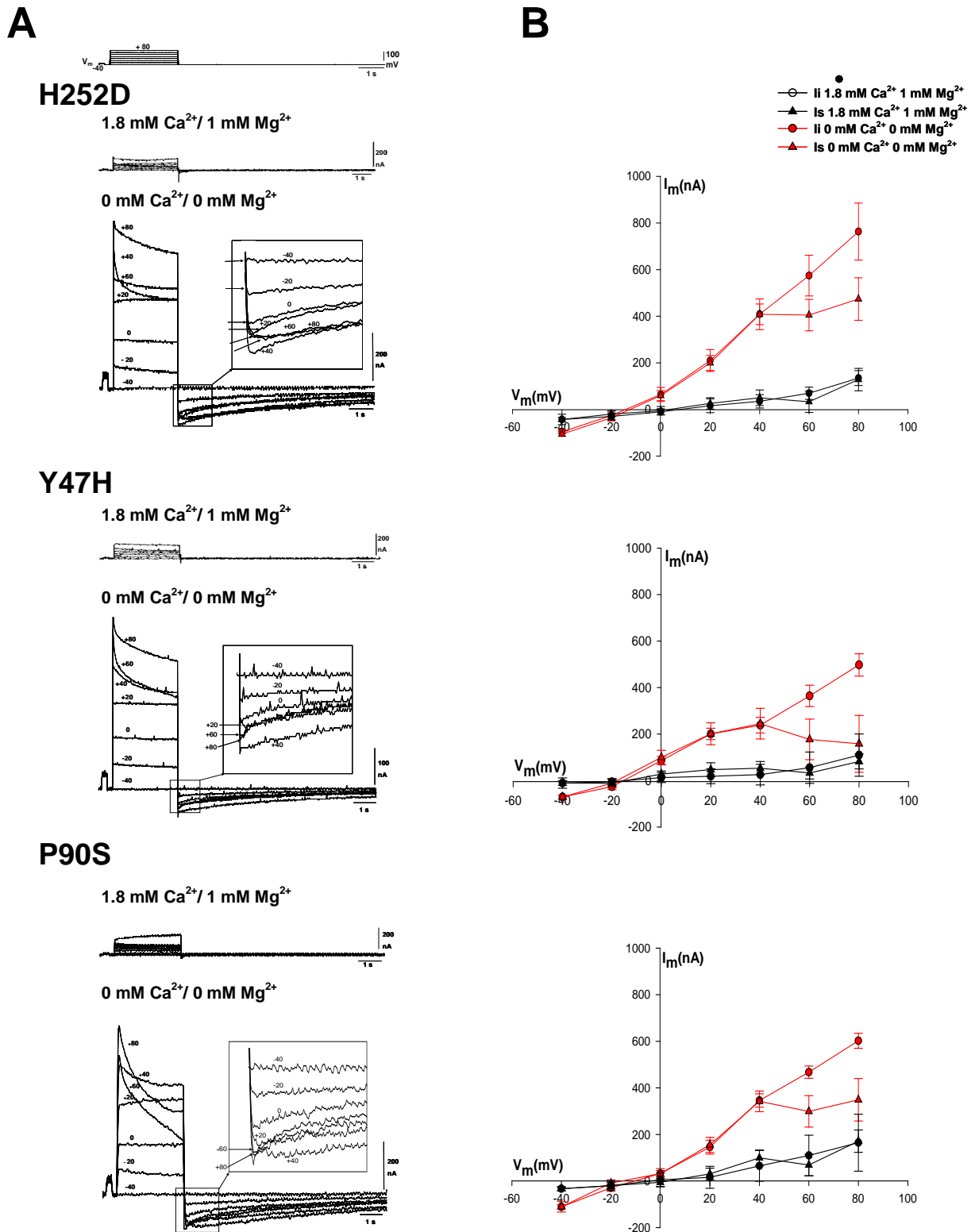


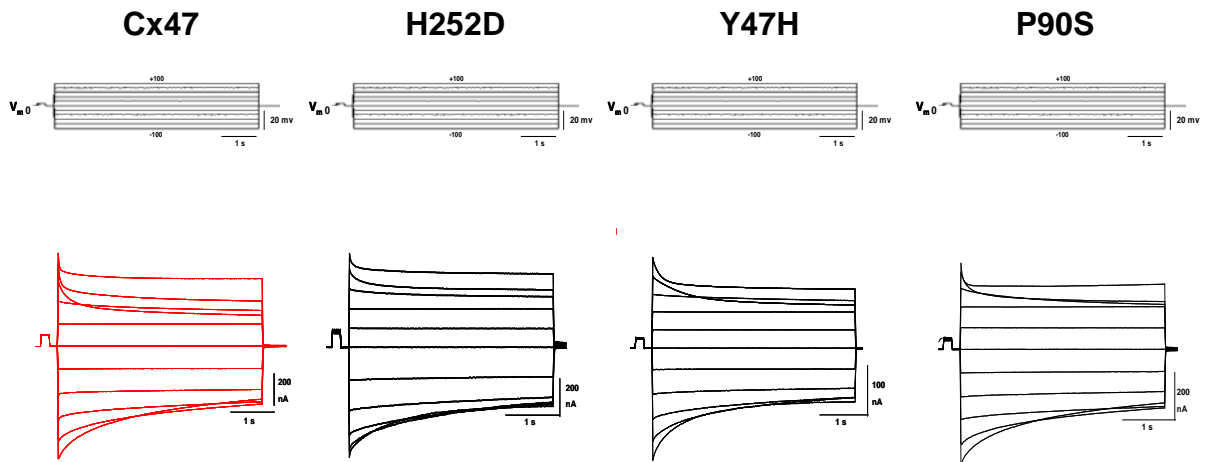
Figura 30. Regulación por el voltaje de los hemicanales formados por los mutantes de PMLD1. **A)** Registros de las corrientes transmembrana (I_m) inducidas por la aplicación de pulsos de voltaje (V_m) desde un potencial de -40 mV hasta $+80$ mV, en incrementos de 20 mV, y 2 s de duración, en un medio ND96 con 1.8 mM Ca²⁺ y 1 mM Mg²⁺ y sin añadir cationes divalentes (0 mM Ca²⁺ 0 mM Mg²⁺). **B)** Curvas I_m/V_m , en las que se han representado el valor promedio de las corrientes al inicio (I_i) y al final de los pulsos (I_s). Los hemicanales de los mutantes de PMLD1 solo se activan, de la misma manera que los hemicanales silvestres (Fig. 5), en condiciones de baja concentración extracelular de cationes divalentes. La dependencia de voltaje es compleja, primero se activan por depolarización y luego a potenciales más positivos de inactivación. Las corrientes activadas por depolarización se cierran por hiperpolarización (ver detalle de las corrientes de cola). Los datos representados corresponden a $\bar{x} \pm$ s.e. ($n=8$).

cationes divalentes en la solución extracelular (Fig. 31, A). Los registros muestran que las corrientes de los hemicanales mutados se cierran cuando los pulsos de voltaje superan un determinado umbral de polaridad positiva ($> + 40$ mV) y de polaridad negativa ($> - 20$ mV) indicando que, como en los hemicanales de Cx47 silvestre, los hemicanales mutados también están regulados por dos mecanismos de compuerta que operan con la polaridad de cierre opuesta. Las gráficas de conductancia/voltaje en las que se representan el valor de estado de la conductancia macroscópica de los hemicanales silvestres y de los tres hemicanales mutados son superponibles y muestran el mismo tipo de asimetría en función de la polaridad del voltaje; el valor de estado de la G_{hj} se reduce más gradualmente y a menores valores para los pulsos de polaridad negativa que para la polaridad positiva (Fig. 31, B; ver parámetros de Boltzmann, Tabla 4).

4.3.2.3. Permeabilidad de los hemicanales de los mutantes de la Cx47 humana a colorantes.

Mediante la técnica de captación de colorantes se valoraron los cambios en la permeabilidad de la membrana celular de los oocitos que expresan los hemicanales de PMLD1 (Fig. 32). Después de una hora de incubación con 1.5 mM de yoduro de propidio YP o con 1.5 mM de 5-6 carboxifluoresceína CF, se cuantificó el nivel de captación en presencia de cationes divalentes en la solución extracelular. En todos los mutantes, el nivel de captación fue bajo, pero significativamente superior al detectado en los oocitos controles, que no fueron inyectados con ningún mRNA o a los respectivos grupos de oocitos en los que se bloquearon los hemicanales, previamente a la incubación con el colorante, con 500 μ M de CBX. Estos niveles de captación en el caso de la mutación H252D, no fueron estadísticamente distintos de los oocitos que expresaban la proteína silvestre; sin embargo, para la mutación Y47H se observó una disminución significativa en la captación de ambos colorantes y para la P90S una disminución en la captación del YP (Fig. 32, A). La captación de ambos colorantes aumentó de manera significativa exponiendo los oocitos en un medio extracelular al que no se añadió ni Ca^{2+} ni Mg^{2+} . En estas condiciones experimentales, únicamente en el caso del mutante Y47H, los niveles de captación detectados de YP y CF fueron significativamente inferiores a los obtenidos en los oocitos de Cx47 silvestre ($p < 0.05$), pudiéndose atribuir esta diferencia a su menor expresión en la superficie celular (Fig. 30, B).

A



B

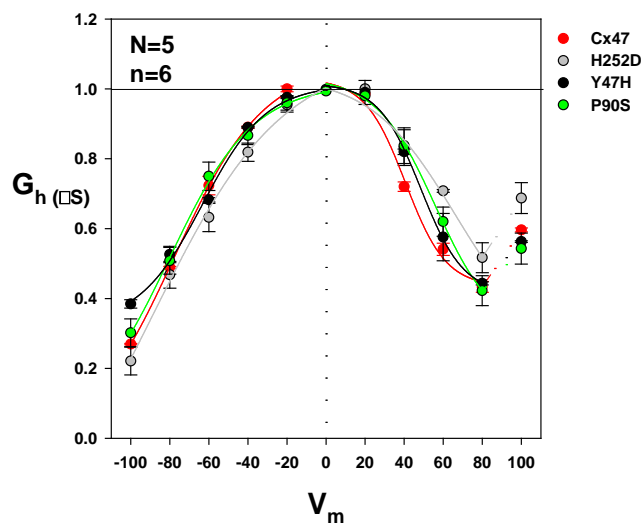


Figura 31. Dependencia “bipolar” del potencial de membrana de los hemicanales formados por los mutantes de PMLD1. A) Registros de las corrientes transmembrana (I_m) inducidas por la aplicación de pulsos de voltaje (V_m) desde un potencial de -0 mV hasta ± 100 mV, en incrementos de 20 mV, y 5 s de duración en un medio con una baja concentración extracelular de divalentes (0 mM Ca^{2+} , 0 mM Mg^{2+}). **B)** Gráficas conductancia/voltaje (G_h/V_m); se representa en promedio el valor de estado de la conductancia macroscópica de los hemicanales (G_{jSS} ; \bullet) de la conductancia y el ajuste para cada polaridad de voltaje a una función de Boltzmann con los parámetros que se indican en la Tabla 4 (N = número de experimentos, n = número de oocitos).

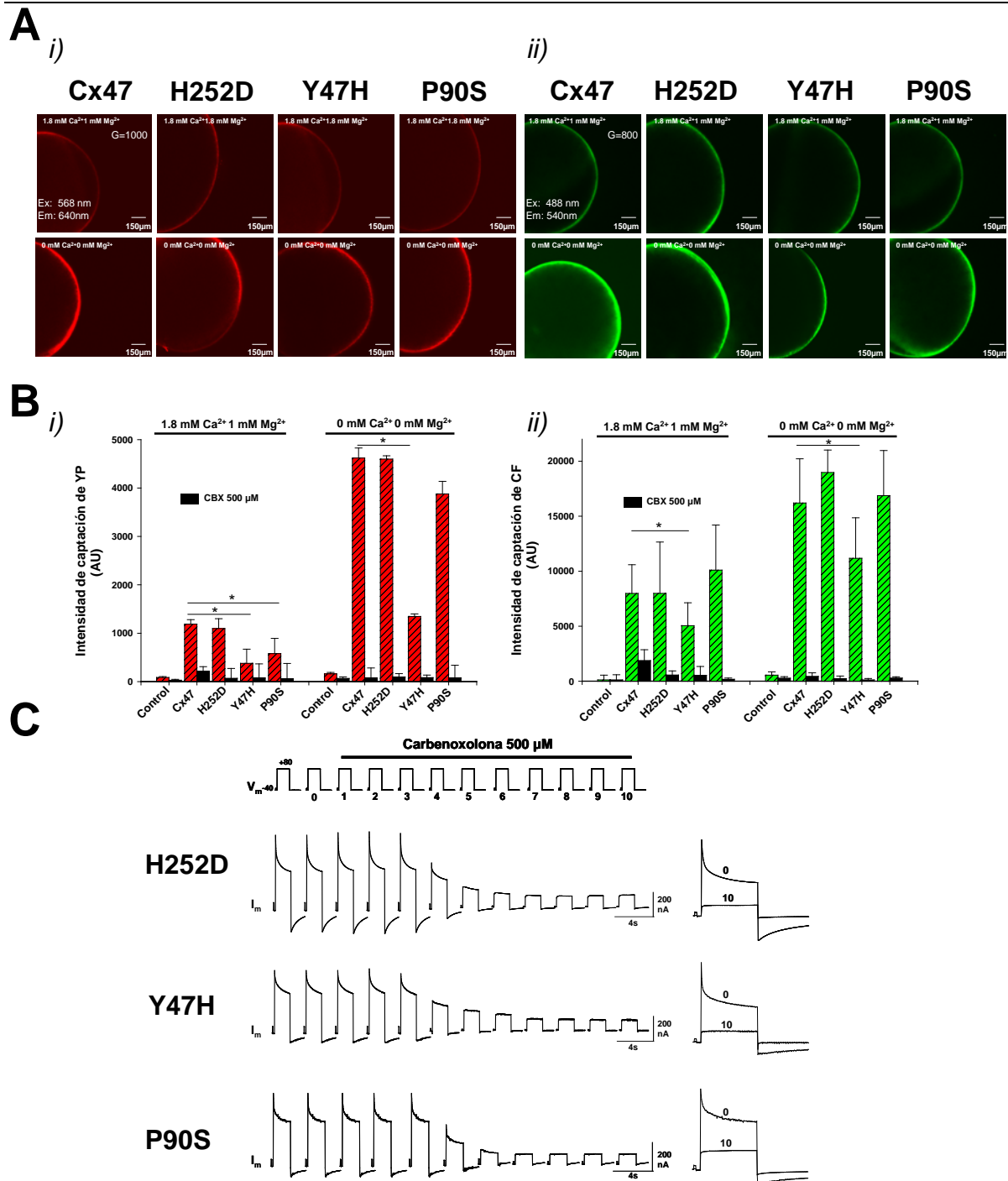


Figura 32. Captación de colorante desde el medio extracelular en los oocitos que expresan los hemicanales de los mutantes de PMLD1. A) Imágenes de microscopía confocal (x10) ilustrando la captación de YP (en rojo) y CF (en verde) y la acumulación en la zona subcelular de los oocitos inyectados con el mRNA de la Cx47 silvestre y de los mutantes. **B) Cuantificación de los niveles de captación.** Los oocitos inyectados con todos los mutantes de Cx47 son capaces de captar ambos colorantes en presencia de concentraciones fisiológicas de cationes divalentes; dicha captación aumenta de forma marcada cuando se reduce la concentración de los cationes divalentes y es inhibida con un pre-tratamiento con carbenoxolona 500 μM. Los oocitos inyectados con los mutantes H252D y P90S, son capaces de captar colorante, con una eficacia similar a la de los inyectados con la proteína silvestre; mientras que los inyectados con el Y47H, presentan una reducción significativa de la captación de ambos colorantes ($p < 0.05$; $N = 5$; $n = 80$). **C) Curso temporal del bloqueo de las corrientes de los hemicanales de los mutantes por carbenoxolona 500 μM (CBX); i)** las corrientes de hemicanales (I_m) se activan por pulsos despolarizantes (+80 mV, 2 s de duración), aplicados cada 60 s desde un potencial de fijación de -40 mV en condiciones de baja concentración de cationes divalentes (0 Ca²⁺ 0 Mg²⁺) *ii)* superposición de las corrientes antes y después de 10 min en CBX.

4.3.3. Capacidad de los mutantes de PMLD1 para formar canales intercelulares funcionales. Estudio de acoplamiento eléctrico y por colorante.

4.3.3.1. Canales homoméricos formados por los mutantes.

Dado que ninguna de las tres mutaciones de PMLD1 afecta a la funcionalidad de los hemicanales, a continuación estudiamos si estos hemicanales eran también capaces de formar canales intercelulares consigo mismo (i.e., canales homoméricos) y con la Cx47 silvestre (i.e., canales heterotípicos). Primero, se analizó la capacidad de los hemicanales mutantes de PMLD para formar por sí solos canales intercelulares, para lo cual se inyectaron los oocitos únicamente con el mRNA de cada una de las mutaciones y se aparearon entre sí; como control positivo se utilizaron los pares de oocitos inyectados con el mRNA de la Cx47 silvestre a la misma concentración. Estas condiciones experimentales simularán la condición de homocigosis de los pacientes en el caso de las mutaciones recesivas H252D e Y47H. A diferencia de los pares de oocitos de Cx47 silvestre que desarrollaron valores elevados de acoplamiento eléctrico a las 24 horas de apareamiento, en el caso de los pares que expresaban los mutantes H252D e Y47H, no se detectó paso de corriente intercelular (Fig. 33, A y B), indicando que ambas mutaciones conducen a una pérdida completa de la capacidad para formar canales homoméricos. Por el contrario, el mutante P90S fue capaz de inducir acoplamiento eléctrico pero con unos niveles de conductancia intercelular significativamente menores a los registrados entre los pares que expresaban la Cx47 silvestre ($13.3 \pm 4.7 \mu\text{S}$ vs. $4.5 \pm 3.5 \mu\text{S}$ y $p < 0.05$), indicando que la mutación P90S aún retiene la capacidad para formar canales intercelulares, pero lo hace con una eficacia significativamente reducida (Fig. 33, C). Estos canales homotípicos de P90S muestran una dependencia de voltaje similar, sino idéntica, a la previamente descrita en los canales de la Cx47 silvestre (Fig. 34 y 16). El umbral aparente con el que cierran las I_j 's de los canales de P90S es similar ($> \pm 40 \text{ mV}$), y la reducción de las corrientes con el aumento del gradiente de V_j también fue similar. Los parámetros de Boltzmann que ajustan la rectificación del valor de estado de la G_j (G_{jss}) fueron los mismos (ver Tabla 8).

Los estudios de acoplamiento eléctrico en los pares de oocitos se complementaron con los estudios de acoplamiento por los colorante con YP y CF en las células N2A transfectadas con los tres mutantes y la proteína silvestre, como control. Los resultados muestran que en el caso de las células EGFP-positivas transfectadas con el mutante H252D e Y47H no se detectó paso de ninguno de los

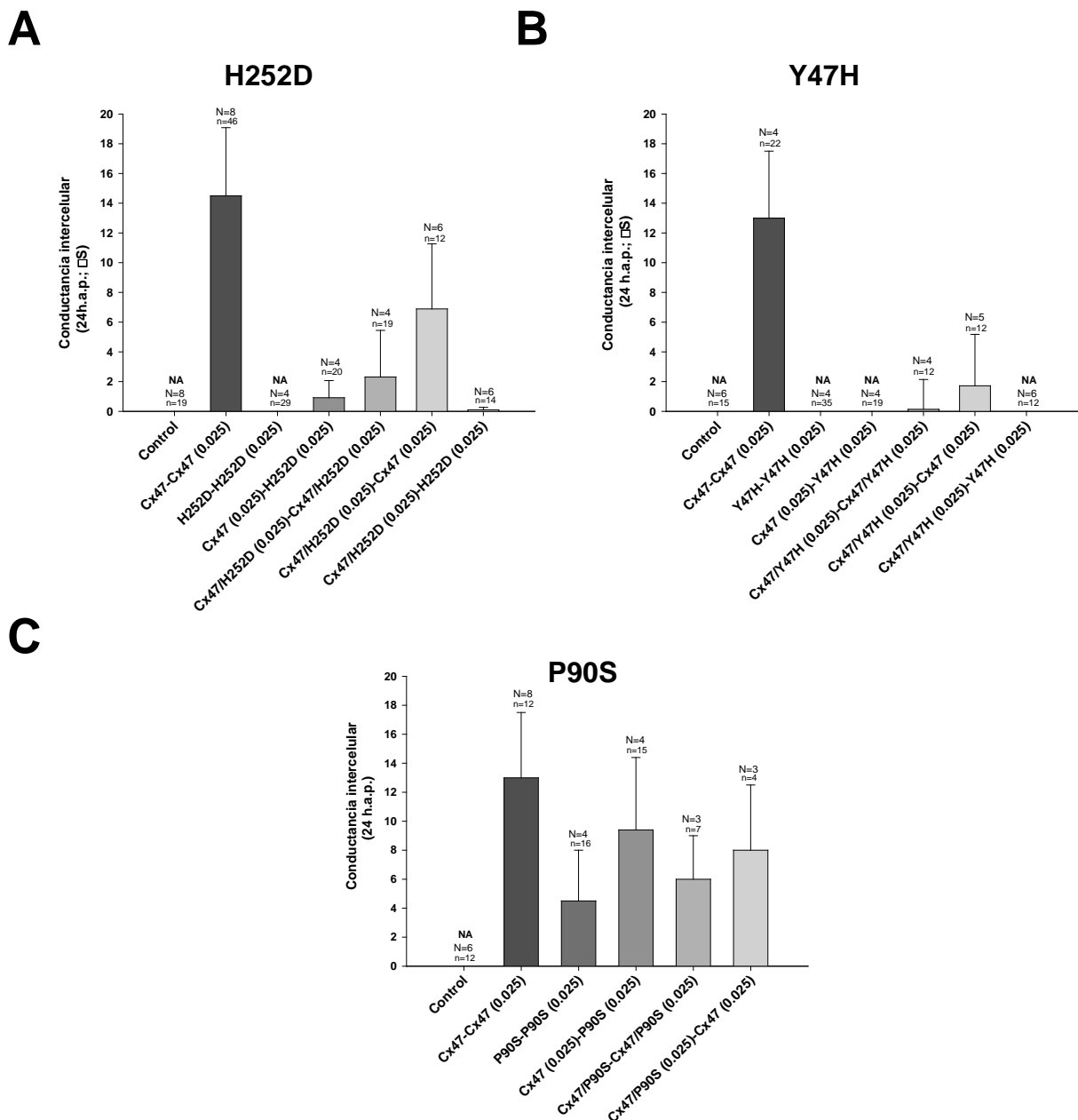


Figura 33. Niveles de acoplamiento eléctrico entre pares de oocitos que expresan los mutantes de PMLD1 solo o en combinación con la Cx47 silvestre, que simulan la condición de homocigosis de los pacientes y de heterocigosis de los portadores. A) El mutante H252D no indujo por sí solo acoplamiento eléctrico (H252D-H252D), sin embargo es capaz de formar canales heterotípicos con la Cx47 silvestre (Cx47-H252D). En los experimentos de coexpresión, los niveles de acoplamiento entre los pares Cx47/H252D-Cx47/H252D fueron significativamente menores que los detectados en los que únicamente expresan la Cx47 silvestre ($p < 0.05$). Los niveles de acoplamiento aumentan cuando los oocitos Cx47-H252D se aparean con los que expresan la Cx47 silvestre (H252D/Cx47-Cx47) y disminuyen cuando se aparean con los que únicamente expresan el mutante (Cx47/H252D-H252D). **B)** El mutante Y47H no forma canales consigo mismo (Y47H-Y47H) ni canales heterotípicos con la Cx47 silvestre (Cx47-Y47H) ($p < 0.05$). Los niveles de acoplamiento en los experimentos de coexpresión con la Cx47 silvestre fueron muy bajos entre los pares Cx47/Y47H-Cx47/Y47H; algo mayores entre los pares Cx47/Y47H-Cx47 y entre los pares Cx47/Y47H-Y47H no se detectó acoplamiento eléctrico. **C)** El mutante P90S fue capaz de formar canales funcionales consigo mismo (P90S-P90S) y con la Cx47 (Cx47-P90S), pero con unos niveles significativamente menores con respecto a los pares de Cx47 silvestre ($p < 0.05$ y $p = 0.001$). En los experimentos de coexpresión los niveles de acoplamiento entre los pares Cx47/P90S-Cx47/P90S fueron significativamente menores que los detectados en los que únicamente expresan la Cx47 silvestre ($p < 0.05$), algo mayores entre los pares Cx47/P90S-Cx47 y entre los pares Cx47/P90S-P90S no se detectó acoplamiento eléctrico. (N= número de experimentos; n= número de pares registrados; NA, pares no acoplados).

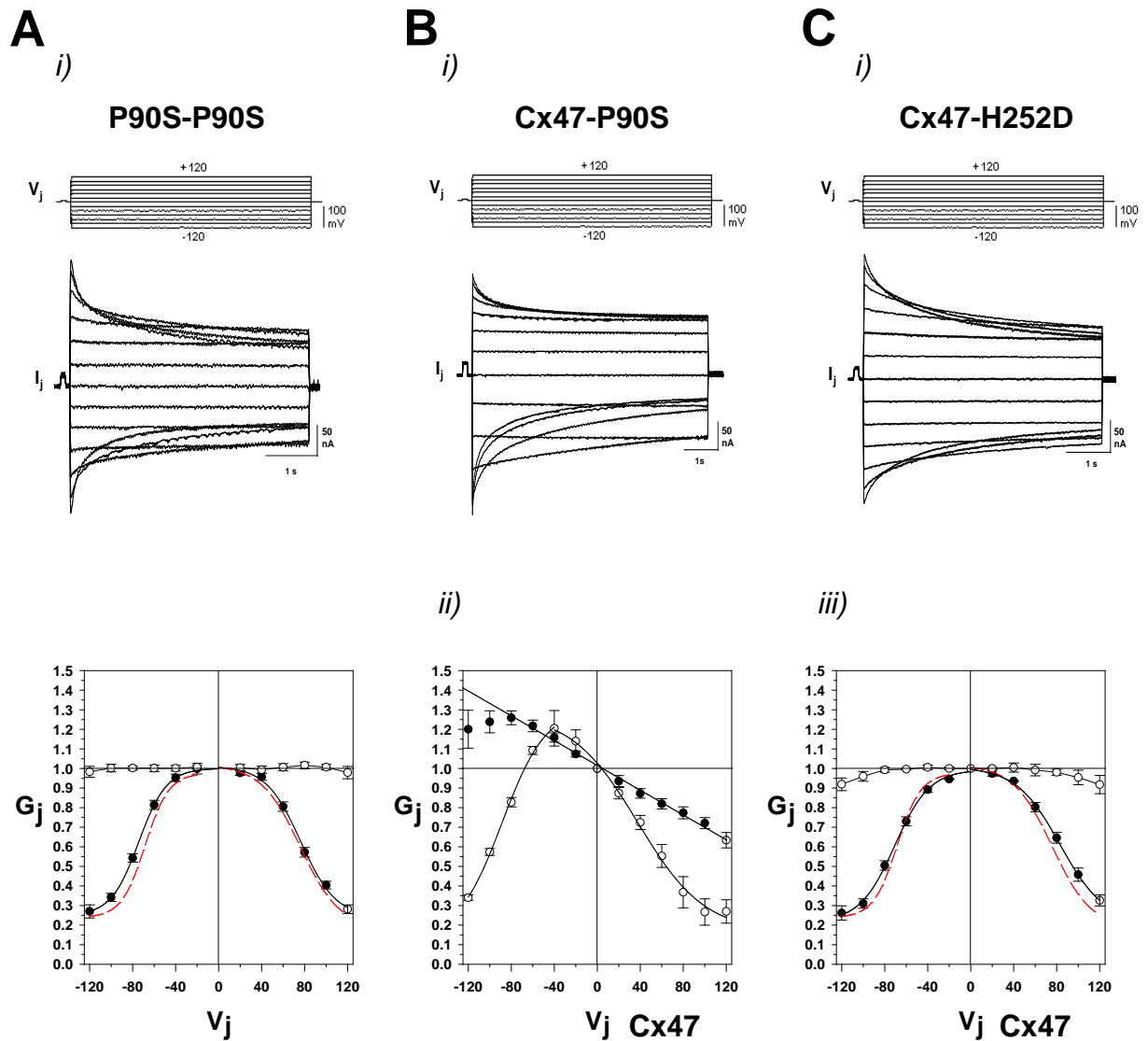


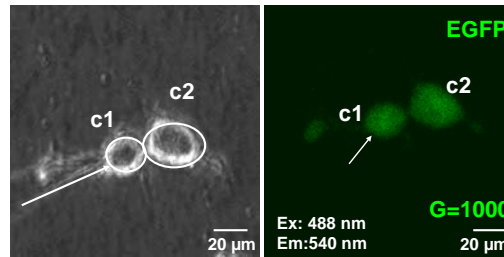
Figura 34. Regulación por el voltaje intercelular de los canales homotípicos P90S-P90S y de los canales heterotípicos P90S-Cx47 y H252D-Cx47. A) Registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV. En las combinaciones heterotípicas, los pulsos se aplicaron en el lado de la Cx47. **B)** Gráfica G_j/V_j de los valores iniciales de la G_j (G_{j0} , \circ) y de los valores de estado estacionario (G_{jss} , \bullet). La dependencia de G_{jss} con el V_j de los canales homotípicos P90S-P90S y de los heterotípicos Cx47-H252D fue similar a la de los canales homotípicos silvestres (Fig. 9). La G_{j0} sigue un comportamiento óhmico mientras que la G_{jss} disminuyó de manera simétrica para las dos polaridades de V_j . Sin embargo, en los canales Cx47-P90S los valores de G_{j0} aumentaron y disminuyeron, respectivamente, con los pulsos positivos y negativos de V_j aplicados en la célula que expresa la proteína silvestre, y la G_{jss} se redujo asimétricamente para las dos polaridades de V_j . Los parámetros del ajuste de los valores de G_{jss} para cada polaridad a una función de Boltzmann, se muestran en la tabla 9.

dos colorante entre las células EGFP-positivas (Fig. 35, A). Por el contrario, en el caso de la mutación P90S sí se observó acoplamiento por colorante pero en un menor porcentaje de las inyecciones que las células transfectadas con la Cx47 silvestre (10% vs. 80%; $p < 0.05$) (Fig. 35B, *i*). El porcentaje de acoplamiento por YP y CF fue similar (Fig. 35B, *ii*). Las curvas de transferencia de colorante entre las células P90S muestran que el acoplamiento por colorante solo ocurre en aquellos pares de células con altos niveles de expresión del reportador y que no hay diferencias de permeabilidad entre los dos colorantes utilizados (Fig. 35, C). En este sentido los canales de P90S difieren de los canales de Cx47 silvestre (Cx47 Met1&4), ya que estos permean mejor el colorante catiónico, el YP, que el aniónico, la CF (Fig. 18, B).

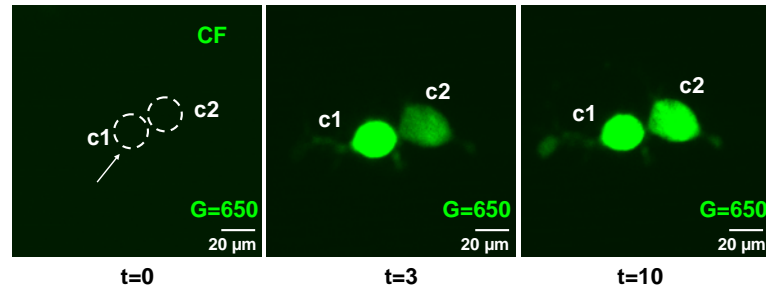
4.3.3.2. Canales heterotípicos formados entre hemicanales mutados y silvestres.

También analizamos la capacidad de los hemicanales mutados de unirse a los hemicanales de Cx47 silvestre y formar canales intercelulares heterotípicos. La formación de canales híbridos entre los hemicanales mutados y los silvestres se infirió de la capacidad de los oocitos que expresan la proteína mutada para acoplarse eléctricamente con los oocitos que expresan la proteína silvestre (Fig. 33). Encontramos acoplamiento eléctrico entre los pares H252D-Cx47 y entre los pares P90S-Cx47; por el contrario, no se detectó paso de corriente entre los pares que expresaban el mutante Y47H y la Cx47 (Fig. 33, A-C). Los valores de conductancia intercelular registrados entre los pares H252D-Cx47 y P90S-Cx47 fueron respectivamente de $0.91 \pm 1.2 \mu\text{S}$ y $9.4 \pm 5.0 \mu\text{S}$ y significativamente menores que los obtenidos entre los pares homotípicos de Cx47 silvestre ($13.3 \pm 4.7 \mu\text{S}$; $p < 0.05$) pero mayores que los inducidos por los mutantes por sí solos, ya que en el caso de los pares H252D-H252D no se registró acoplamiento eléctrico y en el caso de los pares P90S-P90S fue la mitad ($4.5 \pm 3.5 \mu\text{S}$). En cuanto a las propiedades de conductancia iónica de estos canales Cx47 mutante-Cx47 silvestre, observamos que, en el caso de los canales heterotípicos H252D-Cx47, la dependencia del voltaje intercelular es muy parecida a la observada para los canales homotípicos silvestres; el valor inicial de la conductancia macroscópica de estos canales (G_j) no varía con el V_j y el valor de estado de la G_j (G_{jss}) rectifica de forma simétrica para las polaridades positiva y negativa del V_j con el incremento del gradiente de voltaje (Fig. 34, B), con unos parámetros de Boltzmann muy similares (ver tabla 8). Sin embargo, en el caso de los canales heterotípicos P90S-Cx47 aparecen nuevas propiedades de

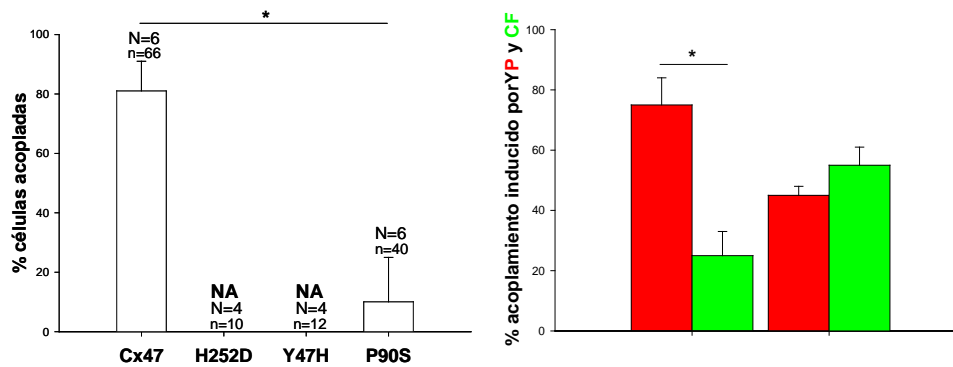
i)



ii)



B



C

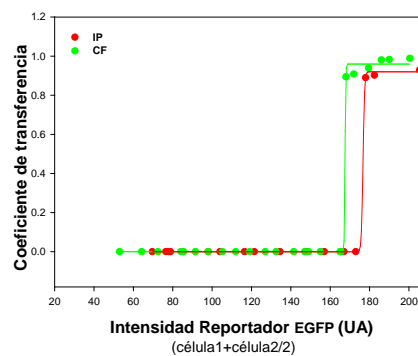


Figura 35. Acoplamiento por colorante en las células N2A transfectadas con los mutantes H252D, Y47H y P90S. A) Técnica de difusión intracelular de colorante; *i)* imágenes de luz transmitida (izda) de un par de células EGFP positivas (dcha) transfectadas con el mutante P90S; *ii)* curso temporal de la difusión de la CF desde la célula inyectada (c1) a la célula aceptora (c2). **B)** Las células transfectadas con la construcción P90S son las únicas que presentan acoplamiento aunque con unos niveles significativamente menores ($p < 0.05$) con respecto a las transfectadas con la construcción silvestre y una permeabilidad indiferente para ambos colorantes. **C)** Gráfica de difusión de colorante a través de los canales homotípicos P90S. El acoplamiento solo está presente en rangos muy elevados de intensidad del reportador y prácticamente no se observan diferencias significativas entre los dos colorantes. Los datos representan $x \pm s.e.$ (N= número de transfecciones; n= número de inyecciones; NA, pares no acoplados).

regulación por voltaje, que no se podrían predecir a partir del idéntico comportamiento de sus correspondientes combinaciones homotípicas P90S-P90S y Cx47-Cx47, ya que la conductancia macroscópica de estos canales híbridos muestra un comportamiento rectificador instantáneo aumentando y disminuyendo de 1.0 a 1.3 y de 1.0 a 0.7 respectivamente con el incremento del gradiente de V_j de 0 a -100 mV y de 0 a +100 mV, aplicados en la célula que expresa la Cx47 (Fig. 34, C). Además y a diferencia de los canales homotípicos Cx47-Cx47 y P90S-P90S en los que el valor máximo de la conductancia intercelular (G_{jss}) ocurre cuando el gradiente de voltaje es cero, en los canales heterotípicos Cx47-P90S, el valor máximo de la conductancia está desplazado hacia valores negativos de V_j (~ -40 mV) vistos desde el interior de la célula que expresa la Cx47 silvestre y la rectificación de la G_{jss} es asimétrica para las dos polaridades de V_j (Fig. 34, B). Esta marcada doble rectificación asimétrica de la conductancia de los canales híbridos P90S-Cx47, revela la existencia de importantes diferencias de las propiedades del poro entre los canales mutados de P90S y los canales de la Cx47 silvestre.

4.3.3.3. Canales heteroméricos entre subunidades mixtas y silvestres.

Con la finalidad de conocer lo que ocurre en la situación de heterocigosis de los portadores en los que hay un alelo mutado y otro alelo silvestre se estudió el efecto de los mutantes de PMLD1 sobre la funcionalidad de la proteína silvestre en la misma célula. Para ello los oocitos se inyectaron con una mezcla de mRNA silvestre y mutado, en una proporción de 1:1 a la misma concentración final que la utilizada en las inyecciones de cada uno por separado. Los pares de oocitos coinyectados con el mRNA de los tres mutantes y con el de la Cx47 silvestre mostraron unos niveles de acoplamiento eléctrico significativamente menores que los pares que únicamente expresaban la Cx47 silvestre (Fig. 33, A-C); la reducción de la conductancia intercelular fue del 99% en el caso de la mutación Y47H, del 84% en el caso de la mutación H252D y del 50% en el caso del P90S, indicando que las subunidades de conexinas mutadas son capaces de combinarse con las silvestres originando un efecto de inhibición dominante sobre la funcionalidad de la proteína silvestre para formar los canales intercelulares; el efecto es significativamente más marcado en el caso de los mutantes Y47H y H252D, incapaces de formar por sí solos canales homoméricos, que para la mutación P90S, que retiene la capacidad de formar canales, pero con unos niveles de acoplamiento reducidos. La reducción del acoplamiento es aún más marcada cuando se aparearon los oocitos que coexpresan la proteína silvestre y mutada con los oocitos que solo expresan la

conexina mutada, del 0.7% en los pares H252D/Cx47-H252D o no se detectó acoplamiento en el caso de los pares Y47H/Cx47-Y47H. Sin embargo, si se aparean los oocitos que coexpresan el mutante y la Cx47 silvestre con otros que solo expresan la Cx47 silvestre, la reducción de la conductancia fue significativamente menor, del 88% en los pares Y47H/Cx47-Cx47, del 63% en los pares H252D/Cx47-Cx47, y del 69% en los pares P90S/Cx47-Cx47.

La dependencia de voltaje de los canales que se forman cuando se combina la Cx47 silvestre con los tres mutantes de PMLD1 (Cx47/H252D, Cx47/Y47H y Cx47/P90S) es similar a la de los canales de Cx47 silvestre (Fig. 36).

4.3.3.4. Interacciones entre los mutantes H252D, Y47H y P90S con las otras conexinas oligodendrocitarias.

Con la finalidad de evaluar si las distintas mutaciones de Cx47 podrían también afectar al acoplamiento oligodendrocitario interfiriendo con las otras dos conexinas oligodendrocitarias la Cx32 y la Cx31.3, se realizaron experimentos para explorar las posibles interacciones heterotípicas y heteroméricas. Como ocurre con la Cx47 silvestre (Fig. 19), tampoco ninguno de los tres mutantes de PMLD fue capaz de formar canales heterotípicos con la Cx32 (Fig. 37, A). En los experimentos de coexpresión de mutantes H252D e Y47H con la Cx32, en los que los oocitos se inyectaron con una mezcla de mARNs, en una relación 1:1, y cada uno a la misma concentración que cuando se inyectaban solo, los niveles de acoplamiento de los pares fueron similares al detectado entre los pares Cx32-Cx32, sugiriendo que los mutantes de Cx47 no ejercen efecto de inhibición dominante sobre la Cx32 y que como la Cx47 silvestre (Fig. 19) no interaccionan heteroméricamente con la Cx32. Las propiedades electrofisiológicas de dependencia de voltaje de los canales heteroméricos H252D/Cx32-H252D/Cx32 e Y47H/Cx32-Y47H/Cx32 son prácticamente idénticas a las observadas en los canales homotípicos de la Cx32 silvestre (Fig. 37, B), confirmando la ausencia de interacciones heteroméricas entre los mutantes de PMLD1 y la Cx32.

A diferencia de los niveles de acoplamiento muy bajos que se registran entre los pares de Cx47 silvestre con la Cx31.3 (Fig. 19), en el caso de los tres mutantes de PMLD1, ninguno fue capaz de combinarse heterotípicamente con la Cx31.3 silvestre (Fig. 37, A). Tampoco se encontró acoplamiento entre los pares en los que los mutantes H252D e Y47H se coexpresaban con la Cx31.3 (Fig. 37, A).

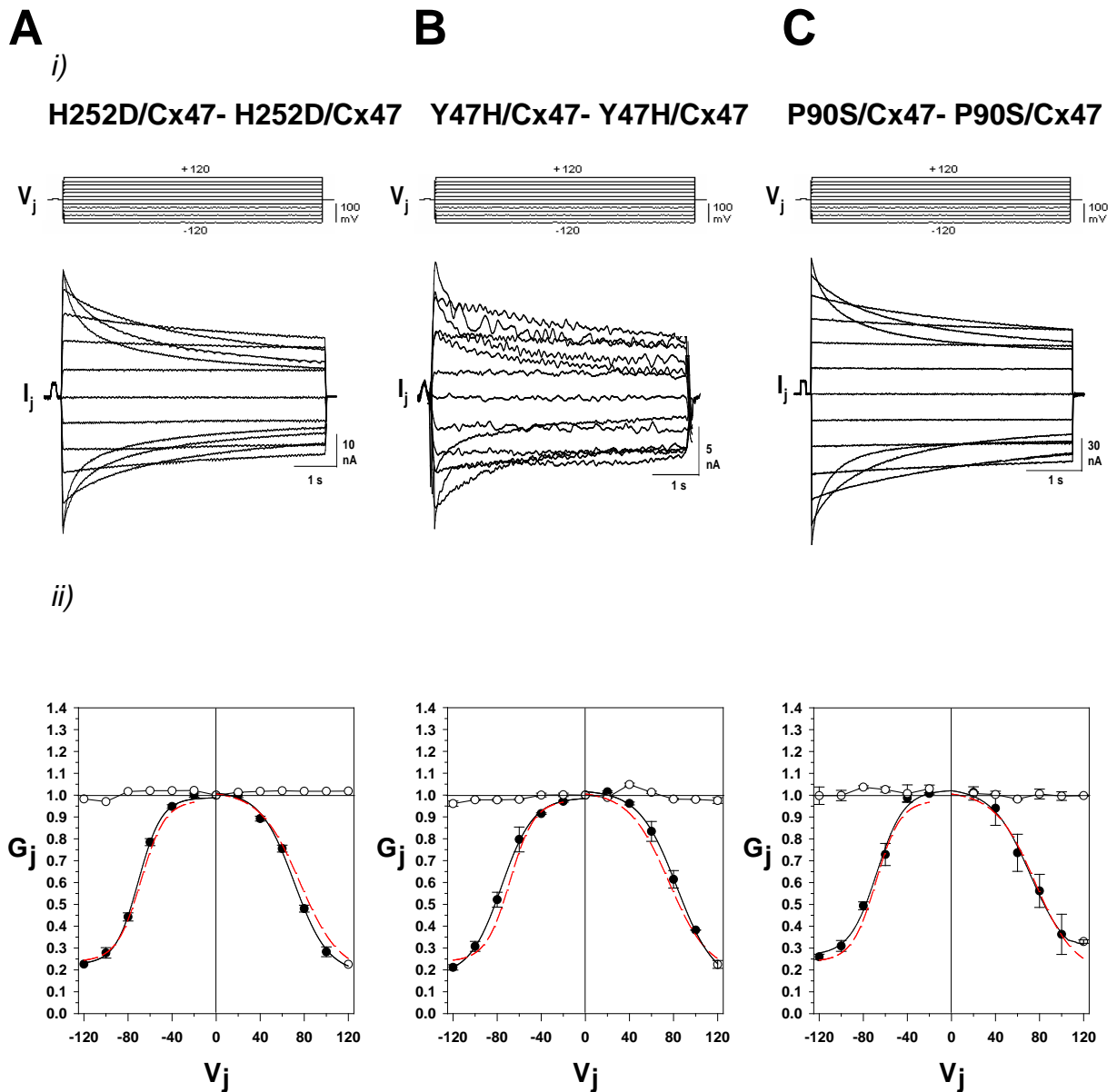
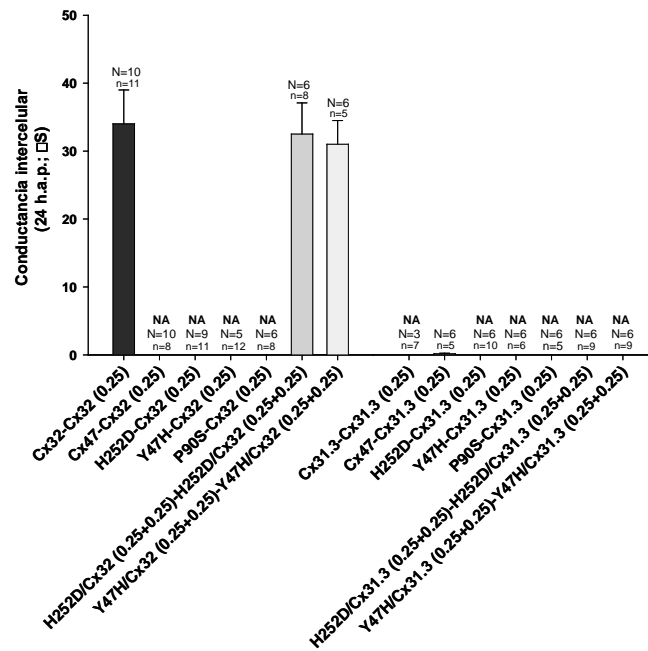


Figura 36. Regulación por el voltaje intercelular de los canales intercelulares heteroméricos formados por los mutantes H252D, Y47H y P90S en coexpresión con la Cx47 humana. A) Registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV en incrementos de 20 mV, y de 5 s de duración. **B)** Gráfica G_j/V_j de los valores iniciales de la G_j (G_{j0} ; \circ) y de los valores de estado estacionario (G_{jss} ; \bullet). La dependencia de V_j de todos los canales es similar a la de los canales homotípicos silvestres. La G_{j0} sigue un comportamiento óhmico mientras que el valor de estado de la G_j (G_{jss}) disminuyó de manera simétrica en función del V_j para la polaridad positiva y negativa del V_j .

A



B

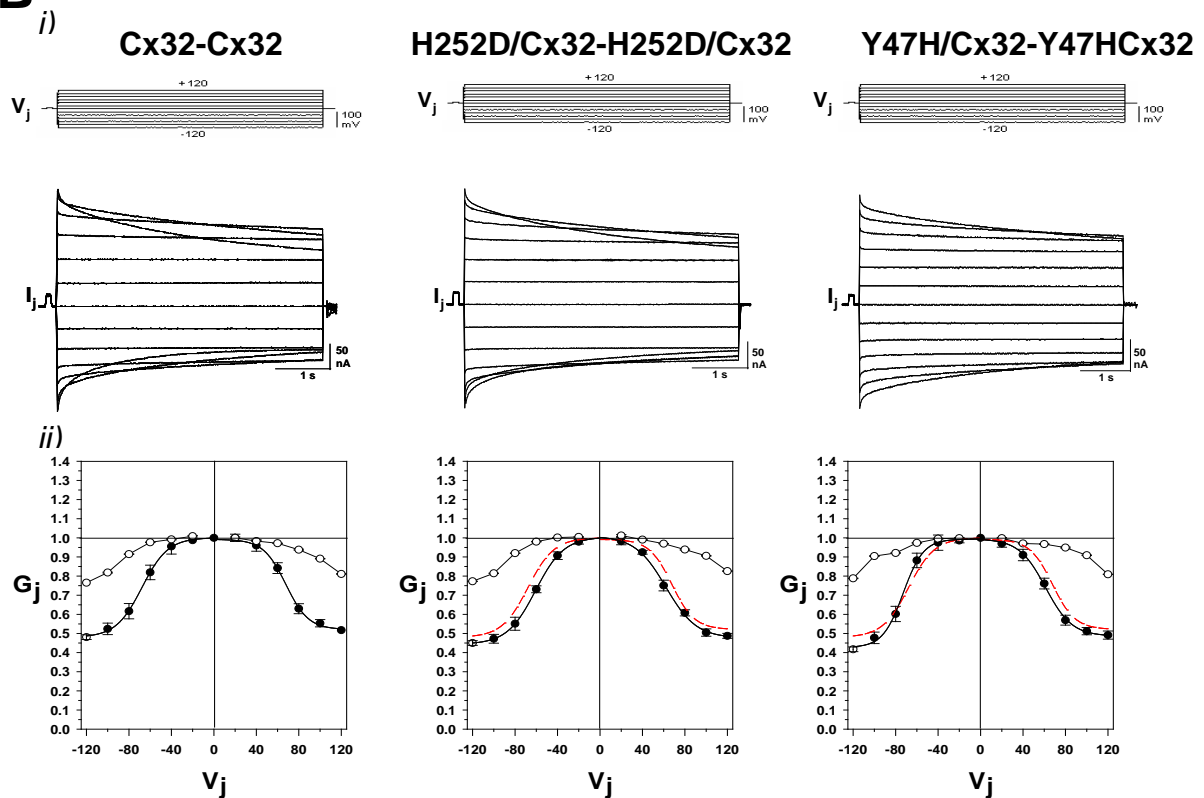


Figura 37. Capacidad de los mutantes H252D e Y47H para formar canales heteroméricos funcionales con la Cx32 y Cx31.3 oligodendrocitarias. A) Nivel de conductancia intercelular a las 24 horas después del apareamiento. Ninguno de los mutantes fueron capaces de acoplarse con la Cx32 ni con la Cx31.3. En los estudios de coexpresión homotípicas entre el H252D y la Cx32, se registraron niveles de acoplamiento parecidos a las combinaciones homotípicas silvestre de Cx32, así como en el caso del mutante Y47H con la Cx32. En ningún caso se detectó acoplamiento en las combinaciones con la Cx31.3. (N= número de experimentos; n= número de pares registrados; =NA, no se detectó acoplamiento eléctrico). B) Regulación por el voltaje intercelular de los canales H252D/Cx32-H252D/Cx32 y Y47H/Cx32-Y47H/Cx32; i) registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV. ii) Gráfica G_j/V_j de los valores iniciales de la G_j (G_{j0} , \circ) y de los valores de estado estacionario (G_{jss} , \bullet). La dependencia de G_{jss} con el V_j de ambos canales fue similar a la de los canales homotípicos silvestres de Cx32 (Fig. 13).

4.3.3.5. Interacciones heterotípicas entre los mutantes H252D, Y47H y P90S de la Cx47 humana oligodendrocitaria con las otras conexinas astrocitarias.

Dado que la Cx47 no solo participa en el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito, sino también en el oligodendrocito-astrocito, se estudió el impacto de las mutaciones de PMLD1 sobre la formación de canales heterotípicos Cx47-Cx43. En este grupo de experimento los oocitos se inyectaban solo con cada uno de los mutantes de PMLD1 o con una mezcla de mARNs de la proteína Cx47 silvestre y mutada para simular respectivamente la condición de homocigosis de los pacientes o de heterocigosis de los portadores. Los resultados muestran que, a diferencia de los pares de Cx47-Cx43 con valores altos de acoplamiento eléctrico, los pares H252D-Cx43 e Y47H-Cx43 no fueron capaces de inducir acoplamiento eléctrico, sugiriendo que estos dos mutantes no forman canales intercelulares funcionales con la Cx43 (Fig. 38, A). Por el contrario, el mutante P90S sí fue capaz de combinarse con la Cx43 con niveles de acoplamiento elevados parecidos a los de la Cx47 y Cx43 silvestres (Fig. 38, A). Sin embargo, la conductancia de los canales heterotípicos P90S-Cx43 no muestra el comportamiento rectificador instantáneo que caracteriza a los canales heterotípicos Cx47-Cx43. Los canales de P90S-Cx43 se caracterizan por un comportamiento óhmico del valor inicial de la G_j (G_{j0}) y una rectificación del valor de estado de la G_j (G_{jss}) muy asimétrico en función de la polaridad del V_j . Las cinéticas más rápidas del cierre de las corrientes y la menor sensibilidad a voltaje que se observa para los pulsos positivos de voltaje aplicados en el lado P90S y que son vistos como negatividad relativa desde la célula que expresa la Cx43, se corresponden a las observadas en los canales de Cx43 (Fig. 22, B), mientras que las corrientes de polaridad negativa fueron parecidas a las de los canales de Cx47 (Fig. 38, B).

En los experimentos de coexpresión en los que los oocitos fueron inyectados con una mezcla de mARN de Cx47 mutado y silvestre, en una relación 1:1 y cada uno de ellos a la mitad de la concentración, que simulan la condición de heterocigosis de los portadores, los niveles de acoplamiento de los pares H252D/Cx47-Cx43 e Y47H/Cx47-Cx43 fueron significativamente inferiores a los obtenidos en los pares heterotípicos de Cx47-Cx43 ($16 \mu\text{S} \pm 0.3$ y $11 \mu\text{S} \pm 1.3$), con una reducción significativa del nivel de acoplamiento con la Cx43 ($p < 0.05$) (Fig. 38, A).

El estudio de las propiedades de regulación por voltaje de estos canales evidenció en ambos casos, unas propiedades prácticamente idénticas a las de los

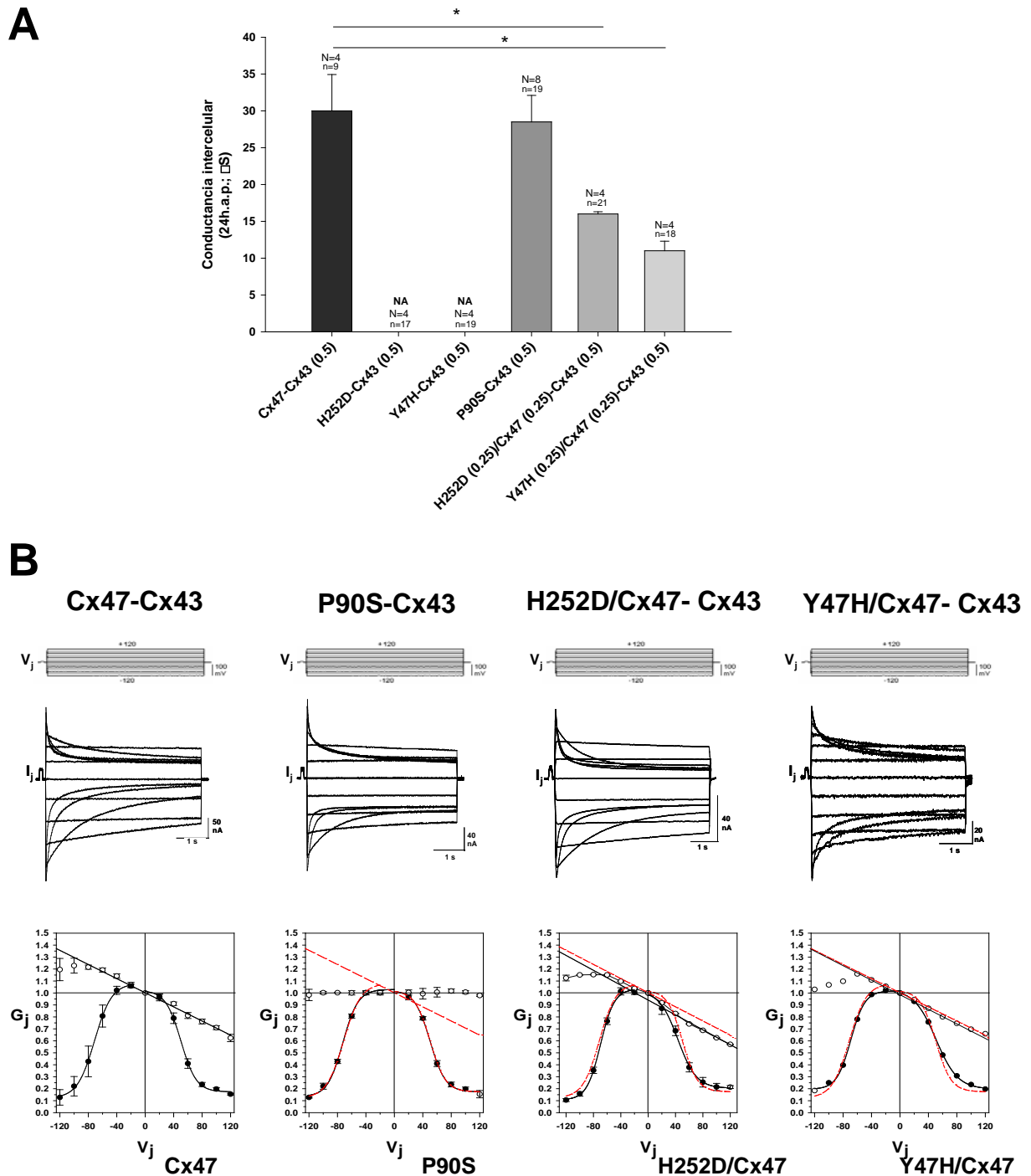


Figura 38. Capacidad de los mutantes H252D, Y47H y P90S para formar canales heterotípicos funcionales con la Cx43 astrocitaria. **A)** Nivel de conductancia intercelular a las 24 horas después del apareamiento. Los mutantes H252D e Y47H no fueron capaces de combinarse con la Cx43, sin embargo el P90S sí lo hizo con unos niveles de conductancia parecidos a los de los canales Cx47-Cx43. En los estudios de coexpresión, los niveles de acoplamiento de los pares H252D/Cx47-Cx43 e Y47H/Cx47-Cx43 fueron significativamente inferiores ($p < 0.05$) con respecto a los de los canales Cx47-Cx43. (N= número de experimentos; n= número de pares registrados; NA, no se detectó acoplamiento eléctrico). **B) Regulación por el voltaje intercelular de los canales P90S-Cx43, H252D/Cx47-Cx43 y Y47H/Cx47- Cx43;** *i)* registros de las corrientes intercelulares (I_j) en respuesta a pulsos de voltaje intercelular (V_j) de ± 120 mV. *ii)* Gráfica G_j/V_j de los valores iniciales de la G_j (G_{j0} , \circ) y de los valores de estado estacionario (G_{jss} , \bullet). La dependencia de G_{jss} con el V_j de ambos canales fue similar a la de los canales heterotípicos de Cx47-Cx43 (Fig. 17).

canales heterotípicos de Cx47 y Cx43 (Fig. 24). Las gráficas G_j/V_j ilustran esta doble rectificación asimétrica de los canales (Fig. 38, B): la del valor inicial de la conductancia (G_{jo}) que es dependiente de la polaridad del V_j , y que aumenta ~30%-40% desde 0 a -100 mV y disminuye otro tanto de 0 a +100 mV para los pulsos aplicados en el lado del H252D/Cx47 y/o Y47H/Cx47 y la del valor estado (G_{jss}) que ocurre para las dos polaridades del voltaje. Las curvas G_{jss}/V_j para cada polaridad de V_j se ajustaron a una función de Boltzmann con los parámetros que se muestran en la Tabla 8.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio indican que el mutante H252D, aún cuando forma hemicanales, es incapaz de formar canales intercelulares consigo mismo y con la Cx43 astrocitaria, aunque retiene la capacidad de formar canales funcionales con la Cx47. El mutante Y47H, que también forma hemicanales funcionales, tampoco fue capaz de formar canales homotípicos, ni heterotípicos con la Cx47 silvestre y con la Cx43. Ambos mutantes ejercen un marcado efecto de inhibición dominante sobre la función de la Cx47 silvestre. El mutante P90S que, por el contrario, retiene la capacidad de formar canales homotípicos y canales heterotípicos con la Cx47 silvestre y la Cx43 astrocitaria, modifica las propiedades del poro del canal de Cx47 y elimina las propiedades de rectificación instantánea de los canales con la Cx43 astrocitaria.

Tabla 4. Parámetros de la función de Boltzmann de la dependencia de voltajes de los hemicanales formados por la Cx47 humana Met1&4 y Met4.

	$V_j(-)$					$V_j(+)$				
	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$
Met1&4	0.72	0.30	0.05	1.26	-76.28	0.42	0.45	0.09	2.27	40.21
Met4	0.69	0.35	0.06	1.51	-68.15	0.71	0.32	0.22	5.56	33.80
H252D	0.67	0.23	0.06	1.51	-76.41	0.43	0.52	0.09	2.27	48.67
Y47H	0.65	0.41	0.06	1.51	-75.32	0.45	0.43	0.08	2.02	40.21
P90S	0.71	0.33	0.05	1.26	-74.56	0.38	0.44	0.07	1.77	40.68

Tabla 5. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales formados por las conexinas oligodendrocitarias en combinación homotípica, heterotípica y heteromérica.

	$V_j(-)$					$V_j(+)$				
	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$
Met1&4/Met1&4	1.00	0.22	0.08	2.02	-66.63	1.00	0.16	0.05	1.26	75.03
Met4/Met4	1.00	0.19	0.13	3.28	-68.40	1.00	0.15	0.19	4.80	67.23
Met1&4/Met4	1.00	0.08	0.10	2.53	-71.77	1.00	0.26	0.07	1.77	73.43
Cx32/Cx32	0.97	0.48	0.08	2.02	-67.73	0.95	0.52	0.09	2.27	67.80
Cx47-Cx32/ Cx47-Cx32	0.98	0.36	0.08	2.02	-67.78	0.98	0.36	0.06	1.52	71.45
Cx4-Cx32/Cx47	1.00	0.24	0.07	1.77	-68.08	1.00	0.18	0.04	1.01	73.81
Cx47-Cx32/ Cx32	0.98	0.49	0.08	2.02	-68.37	0.98	0.53	0.12	3.03	65.88
Cx47/Cx31.3	1.00	0.24	0.18	4.55	-72.47	1.00	0.12	0.08	2.02	19.33
Cx47-Cx31.3/ Cx47-Cx31.3	1.00	0.22	0.17	4.29	-72.50	1.00	0.11	0.09	2.27	20.01
Cx47-Cx31.3/ Cx47	1.00	0.36	0.1	2.53	-69.05	0.83	0.14	0.05	1.26	81.22
Cx47-Cx31.3/ Cx31.3	0.90	0.23	0.14	3.53	-73.37	1.41	0.06	0.07	1.77	16.63

Tabla 6. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales formados por las conexinas astrocitarias.

	$V_j(-)$					$V_j(+)$					
	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	
Cx43/Cx43	1.02	0.40	0.09	2.27	-58.68	1.04	0.30	0.06	1.52	59.71	
Cx30/ Cx30	1 ^a Boltz.	1.00	0.25	0.17	4.30	-50.86	1.00	0.41	0.18	4.55	49.38
	2 ^a Boltz.	0.41	0.08	0.05	1.26	-104.8	0.25	0.09	0.19	4.80	98.05
Cx26/Cx26	0.95	0.25	0.12	3.03	-94.45	1.01	0.20	0.14	3.53	88.95	
Cx26/Cx30	0.68	0.29	0.12	3.03	-69.40	0.82	0.16	0.07	1.77	77.87	

Tabla 7. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales formados por las combinaciones heterotípicas de las conexinas oligodendrocitarias y astrocitarias humanas salvajes.

	$V_j(-)$					$V_j(+)$				
	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$
Met1&4/Cx43	1.00	0.12	0.08	2.02	-70.50	1.00	0.17	0.07	1.77	67.86
Met4/Cx43	1.00	0.13	0.17	4.30	-60.03	0.99	0.17	0.17	4.30	49.60
Cx47/Cx30	0.92	0.28	0.04	1.01	-77.19					
Cx30/Cx32	1.10	0.14	0.18	4.55	-56.45					
Cx26/Cx32	1.00	0.15	0.19	4.80	-56.46					

Tabla 8. Parámetros de la función de Boltzmann para la dependencia del voltaje intercelular (V_j) de los canales formados por la hCx47, hCx43 y por los mutantes P90S y H252D en combinación homotípica y heterotípica.

	$V_j(-)$					$V_j(+)$				
	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$	G_{jmax}	G_{jmin}	$A(mV^{-1})$	z	$V_o(mV)$
Cx47/Cx47	1.00	0.22	0.08	2.02	-66.63	1.00	0.16	0.05	1.26	75.03
P90S/P90S	1.04	0.29	0.07	1.77	-68.40	1.00	0.24	0.19	4.80	67.23
Cx47/P90S	1.33	0.13	0.05	1.26	-88.55	1.28	0.16	0.03	0.76	30.74
Cx47/H252D	0.99	0.24	0.06	1.52	-72.78	1.00	0.26	0.05	1.26	84.24
Cx43/P90S	1.06	0.14	0.06	1.52	-70.50	1.00	0.22	0.07	1.77	67.86
H252D/ Cx47-Cx43	1.00	0.13	0.08	2.02	-71.48	1.00	0.20	0.07	1.77	66.89
Y47H/Cx47-Cx43	1.00	0.18	0.07	1.77	-68.98	1.00	0.20	0.07	1.77	68.56

V. DISCUSIÓN

5.1. Identificación del sitio de iniciación de la transducción de la proteína Cx47 oligodendrocitaria. Correlación estructura-función de los canales formados por la Cx47 humana.

La región 5' del mRNA que codifica para la Cx47 contiene una secuencia peculiar entre las Cx's como es la presencia de dos tripletes de AUG iniciadores casi consecutivos (Met-X-X-Met). Para poder resolver el dilema de en cuál de los dos tripletes AUG tiene lugar el inicio de la transducción, ensayamos dos versiones del mRNA de la Cx47 que contenían respectivamente los dos tripletes o solo el segundo. Los resultados del ensayo funcional en el sistema de los oocitos de *Xenopus* y en él de las células N2A indican que ambos mRNAs se transducen en dos proteínas distintas de Cx47, ya que los hemicanales y canales que forman difieren en sus propiedades electrofisiológicas. Estos resultados indican que la transducción se inicia en la primera metionina que aparece en el patrón de lectura de la secuencia del mRNA, que es consistente con la predicción que se obtuvo con el algoritmo AUG-Pred para traducción de proteínas cuyo mRNA carece de una secuencia Kozak (Kozak y col., 1986; Tikole y col., 2008). Como consecuencia de ello, el número de residuos aminoacídicos de la Cx47 nativa es de 439 y no de 436 como hasta ahora se había propuesto (Orthmann y col., 2007; Teubner y col., 2001). La versión completa de la proteína de 439 aa. es idéntica a la corta excepto por la presencia de los residuos Met-Thr-Asn en el extremo 5' del dominio del amino-terminal de la proteína Cx47. La presencia de estos tres residuos es crítica para la funcionalidad de los canales que forma la Cx47 por sí sola y con otras conexinas gliales con las que se combina, determinando las propiedades del poro del canal y las propiedades del mecanismo de compuerta sensible al voltaje. Este hallazgo puede tener importantes implicaciones para poder entender mejor la función del acoplamiento oligodendrocitario y oligodendrocito-astrocitario en el mantenimiento de la conducción saltatoria y de la integridad de la mielina en el sistema nervioso central, y para el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos que subyacen a la forma autosómica recesiva de la enfermedad tipo Pelizaeus-Merzbacher (PMLD) asociada a mutaciones en el gen *GJC2* de la Cx47.

El procesamiento de las proteínas sintetizadas a partir del mRNA Met1&4 y Met4 es similar. Los niveles de proteína total de las Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 no difieren entre sí y la biotinylación de las proteínas de la membrana plasmática muestra que ambas proteínas de Cx47 (de 439 aa. y de 436 aa.) son transportadas a la superficie celular con la misma eficacia y que ambas forman placas o uniones

en hendidura en las zonas de contacto entre las células (Fig. 11). Estos resultados se corresponden con los ya descritos en la literatura en donde no se observan diferencias en cuanto a nivel de expresión, y a la capacidad para formar placas (Diekmann y col., 2010).

La capacidad para formar hemicanales funcionales es una propiedad que poseen algunas conexinas y que cada vez tiene una importancia mayor en relación con el papel que desempeñan en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Fasciani y col., 2013). La existencia de hemicanales funcionales de Cx47 se había propuesto previamente (Diekmann y col., 2010), pero se desconocían cuáles eran sus propiedades electrofisiológicas. Nuestros resultados muestran que los hemicanales de Cx47 tienen una baja probabilidad de apertura en condiciones fisiológicas, i.e., en el potencial de membrana en reposo ($-38 \text{ mV} \pm 5$) y en presencia de una concentración extracelular normal de cationes divalentes (1.8 mM Ca^{2+} y 1 mM Mg^{2+}). Sin embargo, se activan masivamente por despolarización del potencial de membrana cuando se reduce la concentración extracelular de cationes divalentes (0 mM Ca^{2+} 0 mM Mg^{2+}) (Fig. 12). No encontramos diferencias entre los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4 en cuanto a su grado de inhibición en función de la concentración extracelular de cationes divalentes; pero, sin embargo, las corrientes de hemicanal en los oocitos que expresan la Cx47-Met4 fueron significativamente mayores, aproximadamente del doble, que en los oocitos que expresan la Cx47-Met1&4 (Fig. 12). En este sentido, es interesante destacar que los niveles de acoplamiento eléctrico desarrollados entre los pares de oocitos que expresan la Cx47-Met4, también son significativamente mayores, también aproximadamente del doble, que los registrados entre los pares de Cx47-Met1&4, y que estas diferencias ocurren en condiciones de igualdad de expresión de ambas proteínas (Fig. 15), sugiriendo que podrían reflejar diferencias de conductancia unitaria entre los hemicanales y los canales de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4. En la actualidad no disponemos aún de registros de actividad unitaria que nos permitan confirmar esta hipótesis. En los estudios previos de otros grupos únicamente se ha medido la conductancia unitaria para los canales Cx47-Met4 de ratón y humana y se ha registrado el valor de 55 pS para el valor de estado completamente abierto y de 8 pS para el subestado residual (Teubner y col., 2001; Orthmann-Murphy y col., 2007). Tentativamente y a la espera de que se obtenga la medida, la conductancia unitaria del canal completo de Cx47-Met1&4, podría estimarse en función del dato macroscópico en $\sim 25 \text{ pS}$ (de 50 pS para el hemicanal).

Los estudios de captación de colorante a través de los hemicanales de Cx47 y de difusión intercelular de colorantes, a través de los canales completos indican que, además de las posibles diferencias en conductancia unitaria, también cambian las propiedades de permeabilidad del poro de los hemicanales/canales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 (Fig. 14 y 18), puesto que los hemicanales Met1&4 permean mejor que los de Met4 el yoduro de propidio (+2; 411 Da) y los hemicanales de Met4 mejor la carboxifluoresceína (-2; 379 Da). A nivel de canal completo en los estudios de acoplamiento por colorante también encontramos que los canales de Cx47-Met1&4 permean mejor el YP que la CF, mientras que los canales de Cx47-Met4 son capaces de difundir ambos colorantes con una eficacia similar.

Los hemicanales y los canales completos de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 no solo difieren en sus propiedades biofísicas del poro, también muestran importantes diferencias en sus propiedades de regulación por el voltaje. En ausencia de cationes divalentes en el medio extracelular, tanto la probabilidad de apertura de los hemicanales de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 está estrictamente regulada por el potencial de membrana (Fig. 12 y 13); la probabilidad de apertura es máxima alrededor de valores del potencial de membrana próximos a cero y se reduce progresivamente con el grado de hiperpolarización, (i.e., para la polaridad negativa del potencial de membrana) y también en sentido opuesto para polarizaciones positivas elevadas ($> +40\text{mV}$). Esta dependencia de voltaje bipolar de los hemicanales de Cx47 ya ha sido previamente descrita en otros hemicanales de conexinas, en contraposición con el comportamiento de otros, que muestran una dependencia monopolar (Fasciani y col., 2013). Este comportamiento “bipolar” es debido a la presencia de dos mecanismos de compuerta en el hemicanal, que cierran para la polaridad opuesta del potencial de membrana. En los registros unitarios realizados en otros hemicanales, con una dependencia bipolar (e.g., los hemicanales de Cx26, González y col., 2006), cada uno de estos mecanismos de compuerta median transiciones entre distintos estados de conductancia del hemicanal; el mecanismo que cierra con la polaridad negativa del potencial de membrana induce el cierre del hemicanal desde un valor de conductancia unitaria principal o completamente abierto al estado cerrado del hemicanal, mientras que el mecanismo que cierra con la polaridad positiva provoca el cierre desde el estado abierto a un subestado de baja conductancia. Por este motivo, a nivel macroscópico, observamos en los hemicanales de Cx47 que con la depolarización progresiva del potencial de membrana, la conductancia disminuye durante el proceso de

inactivación, para luego aumentar, este incremento corresponde al reclutamiento de un número creciente de hemicanales parcialmente abiertos (Fig. 13). Es en el mecanismo de cierre con polaridad positiva, y no en el otro, en el que difieren los hemicanales de Cx47-Met1&4 y Met4; la sensibilidad al voltaje está aumentada de forma significativa en los hemicanales Cx47-Met4, cuya carga asociada al sensor de voltaje pasa de $z=2$ en los hemicanales Cx47-Met1&4 a $z=4$.

En los canales completos también se observa un incremento de sensibilidad a voltaje en los canales de Cx47-Met4 (Fig. 16), sugiriendo que los mismos mecanismos de compuerta que operan en los hemicanales son también responsables de la dependencia de voltaje de los canales completos. En el caso de los hemicanales, el campo eléctrico al que son sensibles los mecanismos de compuerta es el potencial de membrana (i.e., la diferencia de voltaje entre el interior y el exterior de la membrana plasmática, V_m) mientras que en el caso de los canales completos el campo eléctrico en el que operan los mecanismos de compuerta es el voltaje intercelular, definido como la diferencia de voltaje entre el interior de una célula y el exterior de la célula vecina y que por tanto resulta de la diferencia relativa entre el valor de V_m en la célula 1 y el V_m en la célula 2. En los canales de Cx47-Met1&4 y Met4 no hemos encontrado que su probabilidad de apertura esté regulada por el valor absoluto del potencial entre el interior y el exterior V_m , (datos no mostrados), como se ha reportado en otros canales de Cx (González y col., 2007), ni que el sensor de V_j sea también sensible o posea un componente de V_m , ya que no se observan asimetrías significativas en la rectificación de la conductancia de estado en función de la polaridad del V_j ; por tanto, la similitud entre la sensibilidad a voltaje entre los hemicanales Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 y sus respectivos canales sugiere que los dos mecanismos de compuerta del hemicanal y del canal completo están bajo influencia del mismo campo eléctrico, y que es el gradiente de voltaje, que se establece a través de la luz del hemicanal o del canal completo, el que modula el sensor de los dos mecanismos de compuerta.

Conforme con el modelo propuesto, los canales completos de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 podrían contener dos mecanismos de compuerta regulados por el voltaje en cada hemicanal, operando en serie con los otros dos mecanismos del otro hemicanal. Este modelo podría explicar porqué en el caso de los canales de Cx47-Met1&4, el cierre de las corrientes sigue un curso temporal biexponencial con un componente rápido y otro lento (Fig. 16); para cada polaridad de voltaje, el cierre del componente rápido podría corresponder al cierre del mecanismo de compuerta que

produce las transiciones entre el estado abierto y el subestado con la polaridad positiva, ubicado en uno de los hemicanales, y el cierre del componente lento podría ser atribuido al cierre del otro mecanismo de compuerta, él que media las transiciones del estado abierto al cerrado con la polaridad negativa perteneciente al otro hemicanal. En el caso de los canales de Cx47-Met4 en los que se observa un único componente de cierre de las corrientes con una cinética rápida y mayor sensibilidad a voltaje (Fig. 16), el cierre de los canales para cada polaridad de V_j podría ser atribuido al cierre de uno de los mecanismos de compuerta, él que en los hemicanales aislados es más rápido y más sensible a V_m y que cierra con la polaridad positiva del V_m (Fig. 13). El otro mecanismo de compuerta podría no ser funcional en el canal completo o estar enmascarado.

En el caso de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4, se observa una marcada asimetría en el cierre de las corrientes en función de la polaridad del V_j y que es consistente, en lo que respecta a las propiedades cinéticas y la sensibilidad a voltaje, con el distinto comportamiento observado en los correspondientes canales homoméricos. En los canales híbridos Cx47Met1&4-Cx47Met4 la corriente cierra para las dos polaridades del V_j con una cinética compleja, con un componente rápido y otro lento, pero la amplitud relativa y sus constantes de tiempo varían en función de la polaridad o del hemicanal que se despolariza o hiperpolariza relativamente. Para la polaridad positiva de V_j vista desde el interior del hemicanal Cx47-Met4, la amplitud del componente rápido es mayor y se cierra más y con una mayor sensibilidad a voltaje sugiriendo que este comportamiento es atribuible al mecanismo que en los hemicanales aislados de Cx47-Met1&4 cierra con la polaridad positiva del V_m y que el cierre del componente lento corresponde al mecanismo que cierra con polaridad negativa del V_m del hemicanal Cx47-Met4. Para la otra polaridad de V_j vista desde la misma célula, participarían el mecanismo de cierre para la polaridad negativa de V_m del hemicanal Met1&4 y el mecanismo de cierre para la polaridad positiva del V_m del hemicanal Met4.

Los canales heterotípicos Met1&4-Met4 muestran además de la rectificación del valor de estado de la conductancia con el V_j , ya comentada, también una rectificación del valor inicial de la conductancia; una propiedad que no puede predecirse a partir del comportamiento a nivel macroscópico de los correspondiente canales homotípicos Met1&4 y Met4. Encontramos una buena correlación entre las propiedades de rectificación iónica y las diferencias de permeabilidad a los

colorantes aniónicos y catiónicos entre los canales homotípicos de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 encontradas en los estudios de permeabilidad a colorantes, en los que se ha podido observar una distinta capacidad por parte de las dos construcciones a permear moléculas de carga opuesta, sugiriéndose que las dos conexinas podrían tener propiedades de permoselectividad y conductancia unitaria distintas.

A diferencia de la rectificación del valor de estado de la conductancia, en la que la conductancia se reduce para las dos polaridades del V_j , la rectificación del valor inicial de la conductancia consiste en un incremento progresivo de su valor con el incremento del V_j de polaridad positiva relativa en el hemicanal Met4, o de polaridad negativa relativa en el hemicanal Met1&4. En los canales heterotípicos de Cx26-Cx32 con una marcada rectificación de este tipo a nivel macroscópico (Barrio y col., 1991), a nivel unitario se corresponde con una variación instantánea del valor de la conductancia unitaria en función de la polaridad del V_j (Bukauskas y col., 1995). Este tipo de rectificación iónica asimétrica con el voltaje es única entre los canales iónicos y se genera cuando los dos hemicanales que componen el canal difieren en sus propiedades de poro, i.e., conductancia unitaria y permeabilidad iónica (Suchyna y col., 1999). En estos canales, cuando se aplica un gradiente de voltaje, inicialmente se produce un desajuste de las corrientes portadas por aniones y cationes dentro de los hemicanales como consecuencia de las diferencias en conductancia y permeabilidad iónica, ya que de los estudios homotípicos de estos canales se ha podido atribuir una conductancia de 55pS y de 135pS a la Cx32 y la Cx26 respectivamente, además de una preferencia de la Cx26 para el paso de cationes y de aniones en el caso de la Cx32. Este desajuste puede ser parcialmente aliviado por la distorsión de la caída de voltaje que se produce a lo largo del poro del canal, ya que en el hemicanal con mayor conductancia o diámetro, compuesto por la Cx26, esta caída de voltaje es menor y por tanto el gradiente es menor. Sin embargo, el desajuste persiste, produciéndose en el caso que el hemicanal de Cx26 es positivo, una mayor entrada de aniones y cationes en este hemicanal, que los que salen hacia el hemicanal de Cx32. Por el contrario, cuando el hemicanal de Cx26 es negativo, ocurre la situación opuesta, la salida de iones es mayor que la entrada. Como consecuencia de ello, se produce respectivamente una acumulación o una deleción de los iones dentro del poro respecto a la concentración en el citoplasma, creándose un gradiente de concentración que en el primer caso (Cx26 positivo) se opone a la entrada y favorece la salida, equilibrando el flujo de la corriente aniónica y

catiónica en cada hemicanal. El resultado neto es que cuando el hemicanal de Cx26 es positivo, el gradiente de voltaje se aplica a través de una concentración iónica que es significativamente mayor que la concentración iónica citoplasmática y cuando es negativo, la concentración iónica dentro del poro es significativamente menor, lo que conduce al fenómeno de rectificación. En el caso de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx47Met4, la rectificación instantánea podría generarse por un mecanismo similar, como consecuencia de la unión en serie de dos hemicanales diferentes en permosselectividad (i.e., conductancia unitaria y selectividad iónica). Como se ha mencionado previamente, los canales de Cx47-Met1&4 y Cx47-Met4 tienen distintas propiedades de permeabilidad a colorante en función de su carga; los canales de Cx47-Met1&4 permean mejor los colorantes catiónicos (YP) que los aniónicos (CF), mientras que los canales de Cx47-Met4 solo muestran una ligera preferencia o no preferencia por los colorantes aniónicos sobre los catiónicos (Fig. 18, D). Además, los canales de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 también podrían diferir en el valor de conductancia unitaria, que en el caso de la Met4 se ha medido en los registros unitarios (~ 55 pS, Teubner y col., 2001; Orthmann y col., 2007) y que para Met1&4, por las diferencias de conductancia macroscópica con los de Met4 (Fig. 15) podemos inferir que podría corresponderse a la mitad de su valor.

En conjunto, la comparación de las propiedades electrofisiológicas entre los hemicanales/canales de Cx47-Met1&4 y de la Cx47-Met4 indican que la presencia o ausencia respectivamente, del triplete de residuos Met-Thr-Asn en el extremo 5' del dominio del NT es un importante determinante molecular de las propiedades del poro (i.e., conductancia unitaria y permosselectividad) y de las propiedades de regulación por voltaje originando un aparente incremento de la sensibilidad a voltaje del mecanismo de compuerta que cierra con la polaridad positiva del V_m en los hemicanales y del V_j en los canales completos.

En la estructura tridimensional de los canales de la Cx26 (Maeda y col., 2009), el único canal de Cx's que se ha cristalizado hasta la fecha, el poro del canal está constituido por un vestíbulo citoplasmático formado por parte de los dominios transmembrana M2 y M3, una región en embudo y una cavidad extracelular. El dominio del NT está ubicado dentro de este vestíbulo citoplasmático formando la cara interna del embudo y originando una constricción de la luz del canal; el tamaño y carga de las cadenas laterales de los residuos de las posiciones 2 a 9, que forman esta región tienen una importante influencia en las propiedades de

permeabilidad, por excluir por tamaño y en función de la carga (Oh y col., 2008). Las diferencias de permeabilidad (i.e., conductancia unitaria y permeabilidad) encontradas entre los hemicanales/canales de Cx47-Met1&4 y de Cx47-Met4 son consistentes con este modelo estructural y la ubicación del filtro o barrera para la difusión de los iones y otras moléculas.

En relación con el mecanismo de compuerta regulado por voltaje, que media las transiciones entre el estado abierto y el subestado de baja conductancia, que en la literatura se conoce como mecanismo “rápido” (Fasciani y col., 2013), se ha propuesto que los seis dominios del NT que forman la región del embudo son móviles y se encuentran anclados a la pared interna del vestíbulo mediante interacciones hidrofóbicas entre el Trp3 y la Met34 para mantener abierto el canal (Maeda y col., 2009). El modelo predice para la Cx26, que cuando el potencial relativo en el interior se hace positivo los seis α hélices del NT rompen los enlaces que los fijan a la pared del vestíbulo y forman una estructura circular estabilizada por enlaces de hidrógeno entre los residuos Asp2 y la Thr5 produciendo la oclusión física del poro (Maeda y col., 2009; Oshima y col., 2007). En este contexto es concebible que la presencia o ausencia del triplete Met-Thr-Asn sea capaz de modificar el funcionamiento de este mecanismo de voltaje.

5.2. Bases moleculares de la comunicación intercelular en el sincitio panglial. Barrera oligodendro-astrocitaria.

Los estudios anatómicos y funcionales indican que los oligodendrocitos y los astrocitos se comunican entre sí por canales intercelulares y que también existe acoplamiento entre oligodendrocitos y astrocitos mediante uniones heterólogas, formando en su conjunto lo que se conoce como “sincitio panglial” (Rash, 2010). Nosotros hemos analizado las posibles interacciones funcionales que podrían establecerse entre las conexinas que se expresan en los oligodendrocitos, en los astrocitos y las que podrían participar en las uniones heterólogas oligodendrocito-astrocito. Los hallazgos originales que hemos encontrado se discuten a continuación.

Nuestros estudios funcionales sugieren que la Cx47 nativa es la que se sintetiza a partir de la primera metionina presente en el mRNA y que da lugar a una proteína de 439 aa., que forma canales homotípicos con propiedades electrofisiológicas bien distintas a las observadas en los canales de Cx47 sintetizados a partir de la segunda metionina de mRNA de 436 aa.

No va a ser fácil determinar cuál de las dos proteínas sintetizan los oligodendrocitos. Sin embargo, las propiedades que muestran los canales de Cx47 de 439 aa. (i.e., Cx47-Met1&4), en los estudios *in vitro*, como son el relativo bajo nivel de acoplamiento por colorante y la mayor permeabilidad a colorantes catiónicos que a aniónicos, que contrastan con los niveles de acoplamiento más elevados y la ausencia de permosselectividad a colorantes aniónicos y catiónicos de los canales de Cx47 con 436 aa. (i.e., Cx47-Met4) (Fig. 15 y Fig. 18), son consistentes con la mayoría de la información disponible sobre las propiedades del acoplamiento entre los oligodendrocitos en los estudios *in vivo*, ya que en los estudios *in vivo* realizados en el nervio óptico de la retina adulta de conejo mediante la técnica de difusión intercelular de colorantes (Lucifer yellow: -2; 443 Da, y biotina:+1; 287 Da), también se encontró un porcentaje de acoplamiento entre oligodendrocitos bajo, y mayor para biotina (30%) que para LY (2%). De forma similar, en el cuerpo caloso, en el que fue determinado que el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito está principalmente mediado por la expresión de Cx47, se observa un extenso acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito por biocitina (sin carga; 372 Da) mientras que cuando se usa el colorante Alexa Fluor 594 raramente se observa acoplamiento (Maglione y col., 2010).

En relación con las otras conexinas oligodendrocitarias que participan en el acoplamiento intra e inter-oligodendrocitario, nuestros estudios muestran que la Cx47 de 439 aa. no forma canales heterotípicos con la Cx32, como se había determinado previamente con la Cx47 de 436 aa. (Kleopas y col., 2004; Orthmann y col., 2007; Magnotti y col., 2011), ni tampoco se combina para formar canales heteroméricos, pero si pueden co-existir en paralelo canales homotípicos de Cx32-Cx32 y de Cx47-Cx47 *in vitro* (Fig. 19 y 20). El hallazgo original, es que la Cx47 es capaz de formar canales heterotípicos, pero no heteroméricos, con la Cx31.3 (Fig. 19). En los estudios previos se había demostrado la funcionalidad de los hemicanales de Cx31.3 mediante la captación de colorante (Sargiannidou y col., 2008), y la incapacidad de la Cx31.3 para formar canales intercelulares (Ahn y col., 2007), aunque si es capaz de formar canales heteroméricos con la Cx32 (Altevogt y col., 2002). El nivel de acoplamiento eléctrico inducido por los canales de Cx47-Cx31.3 es muy bajo y de tipo rectificador instantáneo; desconocemos cuál podría ser la relevancia funcional o fisiológica de estos canales a nivel intra e inter-oligodendrocitario.

En relación con el acoplamiento oligodendrocito-astrocito, hemos podido

demostrar que la Cx47-Met1&4, como previamente se había descrito para la Cx47-Met4, es capaz de formar canales heterotípicos con la Cx43 astrocitaria, con la Cx30 pero no con la Cx26 astrocitarias (Magnotti y col., 2011; Orthmann y col., 2007). Aún cuando, como se acaba de mencionar, la Cx47-Met1&4 y la Cx47-Met4 forman canales funcionales con la Cx43, los canales resultantes muestran distintas propiedades electrofisiológicas (Fig. 24 y 26, D). En nuestros registros el grado de acoplamiento eléctrico inducido por los canales de Cx47Met1&4-Cx43 es significativamente menor que en el caso de los canales Cx47Met4-Cx43 y el acoplamiento es de tipo rectificador “instantáneo”, a diferencia del comportamiento lineal de la conductancia de los canales Cx47-Met4 (Orthmann y col., 2007, Fig. 24). La rectificación “instantánea” del flujo de corriente a través de los canales heterotípicos Cx47Met1&4-Cx43 es dependiente de la polaridad del V_j y se caracteriza por un aumento progresivo de la conductancia intercelular cuanto más se hiperpolariza la célula que expresa la Cx47 oligodendrocitaria respecto al potencial de membrana de la célula que expresa la Cx43 astrocitaria, y viceversa, disminuye más cuanto más está depolarizada la célula Cx47 respecto a la célula Cx43. En nuestros estudios hemos podido correlacionar este tipo de rectificación iónica con la presencia de direccionalidad en la difusión de colorante entre las células que expresan la Cx47 oligodendrocitaria y la Cx43 astrocitaria. En estos estudios observamos un mayor porcentaje de acoplamiento por el colorante catiónico YP que por el colorante aniónico CF y una menor transferencia del colorante aniónico desde la célula Cx47-Met1&4 a la célula Cx43, que en la dirección opuesta. La direccionalidad observada para la difusión del colorante aniónico CF en el caso de los canales Cx47Met1&4-Cx43, no ocurre en el caso del colorante catiónico, el YP, ni tampoco se observa en los pares de Cx47Met4-Cx43, sugiriendo la existencia de una barrera unidireccional para la difusión de moléculas cargadas negativamente en las uniones Cx47Met1&4-Cx43 (Fig. 26). La rectificación instantánea y la barrera para la difusión a colorantes aniónicos desaparece en los canales formados por la Cx43 astrocitaria y la Cx47-Met4 (Fig. 24 y 26), en los que se han deleccionado los tres primeros residuos de la proteína, indicando que el factor limitante de la difusión probablemente reside en el extremo 5' del amino terminal de la Cx47 que forma la región más angosta o embudo en el vestíbulo citoplasmático del poro del canal.

La Cx47 también podría contribuir al acoplamiento oligodendrocito-astrocito formando canales heterotípicos con la Cx30 (Fig. 23 y 27). La formación de canales heterotípicos entre la Cx47 y la Cx30 ha sido motivo de controversia, inicialmente se

describió que ambas conexinas no se combinaban heterotípicamente (Orthmann y col., 2007) y posteriormente se demostró su funcionalidad por acoplamiento por colorante (Magnotti y col., 2011). En los estudios *in vivo* se ha observado co-localización de la Cx47 y Cx30 (Altevogt y Paul, 2004) y en las rodajas de cuerpo caloso de ratones deficientes para la Cx43, en los que el acoplamiento por biocitina ya estaba muy reducido, la supresión adicional de la expresión de la Cx30 conduce a una pérdida completa de acoplamiento entre los astrocitos y los oligodendrocitos (Maglione y col., 2010, Tress y col., 2012). En este contexto es interesante resaltar que, como previamente se había descrito, la otra conexina oligodendrocitaria, la Cx32, también forma canales heterotípicos con la Cx30 y la Cx26 astrocitaria, pudiendo contribuir al acoplamiento oligodendrocito-astrocito; los canales de Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26 también muestran un comportamiento rectificador instantáneo, en el mismo sentido que el de los canales de Cx47-Cx43, pero aún más marcado (Fig. 27).

La existencia de una barrera para la difusión de moléculas entre los oligodendrocitos y los astrocitos ya se había propuesto hace años basándose en los estudios de acoplamiento por colorante entre los astrocitos y los oligodendrocitos del nervio óptico (Robinson y col., 1993). Mediante la técnica de difusión de colorante en este estudio se observó que cuando se inyectaban los astrocitos con LY (-2; 443 Da) y con biotina (+1; 287 Da), en el 100% de los casos se observaba acoplamiento oligodendrocito-astrocito, pero si se inyectaban los colorantes a los oligodendrocitos raramente difundían hacia los astrocitos, ya que en ningún caso se observó difusión del LY y con la biotina solo en un 26%. En un estudio más reciente en rodajas de corteza de rata, en donde el acoplamiento oligodendrocito-astrocito podría estar exclusivamente mediado por canales de Cx47-Cx43, se ha observado un mayor porcentaje de acoplamiento de oligodendrocito a astrocito por LY (5/7 casos) pero es posible que en estos estudios, por lo que se puede observar en las figuras, se ha inyectado una cantidad excesiva de colorante y que en esta circunstancia, el efecto de barrera podría sobrepasarse (Wasseff y col., 2011), como nosotros hemos observado en nuestras condiciones experimentales (Fig. 26D, i).

En conjunto, nuestros resultados muestran que todos los canales que se forman entre las conexinas oligodendrocitarias y astrocitarias son de tipo heterotípico, en los que por el lado oligodendrocitario participa la Cx47 (Cx47-Cx43 y Cx47-Cx30) o la Cx32 (Cx32-Cx30 y Cx32-Cx26) y que todas ellos muestran un comportamiento de tipo rectificador instantáneo que produce una asimetría en el

flujo de las corrientes para la misma polaridad del voltaje intercelular, las corrientes disminuyen con la polaridad positiva relativa en la célula que expresa la conexina oligodendrocitaria y aumenta con la polaridad negativa. En el caso de los canales de Cx32-Cx26, se ha propuesto que la asimetría en la conductividad iónica se genera como consecuencia de las diferencias de selectividad iónica y/o conductancia unitaria de los dos hemicanales; el modelo basado en las ecuaciones de Nernst-Planck para las concentraciones iónicas y la ecuación de Poisson para el potencial eléctrico dentro del canal, predice que las asimetrías en la conductancia y permeabilidad de los hemicanales producen tanto acumulación como depleción iónica dentro del poro del canal, dependiendo de la polaridad del voltaje intercelular, y que como consecuencia de ello se produce la rectificación (Suchyna y col., 1999). En el caso de moléculas de mayor tamaño, nuestros resultados muestran que, al menos en el caso de los canales Cx47Met1&4-Cx43, hay unidireccionalidad en la difusión en función de la carga. Ambos fenómenos reflejan la existencia de un filtro o barrera que limita la movilidad y confiere direccionalidad a la difusión de iones y otras moléculas en función de su carga, entre los oligodendrocitos y los astrocitos. Desconocemos cuál podría ser el papel que desempeña esta barrera oligodendro-astrocitaria para la difusión de moléculas, en relación con el intercambio metabólico o para la difusión de moléculas de señalización trófica, pero la existencia de direccionalidad necesariamente implica el establecimiento de una organización jerárquica dentro del sincitio panglial. La mayor selectividad catiónica de los canales homoméricos de Cx47-Met1&4 y la asimetría en la selectividad iónica presente en los canales Cx47Met1&4-Cx43 podrían tener relevancia en el mecanismo de aclaramiento del K^+ periaxonal a través del sincitio panglial. La difusión del K^+ entre los oligodendrocitos y desde los oligodendrocitos a los astrocitos ocurre a favor de gradiente químico y eléctrico (Rash y col., 2010). Como consecuencia de la acumulación del K^+ en el espacio periaxonal, en el oligodendrocito el potencial de membrana se va a depolarizar y la concentración intracelular de K^+ tiende a aumentar. En estas condiciones el K^+ va a difundir desde los oligodendrocitos depolarizados a los oligodendrocitos vecinos (por gradiente intercelular a través de canales de baja conductancia estimada en ~ 27 pS) no depolarizados (potencial de membrana ~ -71 mV) (Waseff y col., 2011) y su flujo va a estar además facilitado por la selectividad positiva a cationes de los canales de Cx47-Cx47.

En el caso de las uniones oligodendrocito-astrocito mediadas fundamentalmente por los canales de Cx47Met1&4-Cx43, y conforme al modelo

propuesto para los canales de Cx32-Cx26 (Suchyna y col., 1999), la baja conductancia del hemicanal de Cx47 va a ser parcialmente compensada por la mayor caída de voltaje en el hemicanal de Cx47 de baja conductancia (estimada en ~ 55 pS) que en el hemicanal de Cx43 de alta conductancia ~ 100 pS (Fishman y col., 1990); como consecuencia de este aumento del potencial eléctrico en el hemicanal de Cx47, el flujo de entrada de los iones K^+ y de salida de Cl^- en este hemicanal aumenta y el flujo a través de los dos hemicanales va a tender a igualarse, resultando en un aumento del flujo neto.

El grado de acoplamiento entre los oligodendrocitos y entre los oligodendrocitos y los astrocitos, también está regulado por los mecanismos de compuerta que en función del gradiente de voltaje intercelular originan el cierre parcial o completo de los canales, y por tanto podría verse afectado en función de cuanto aumenta el gradiente eléctrico con el incremento de la concentración de K^+ . Aún cuando se ha calculado que el gradiente eléctrico que puede llegar a establecerse entre el espacio periaxonal y los pies vasculares astrocitarios puede llegar hasta +160 mv, la distribución de la caída de voltaje de célula a célula podría ser bastante inferior; típicamente se precisan gradientes de > 20-40 mV para que la conductancia de estado empiece a reducirse.

5.3. Mecanismos patogénicos de la leucodistrofia hipomielinizante causada por mutaciones en la Cx47.

Los resultados muestran que las tres mutaciones causan una amplia variedad de defectos y dicho defectos (Tabla 8) son específicos de cada mutación.

En nuestros estudios hemos identificado dos nuevas mutaciones recesivas en el gen de la Cx47, la mutación H252D asociada a una forma clásica de la enfermedad y la mutación Y47H que causa una forma congénita muy severa, y hemos realizado el ensayo funcional para determinar el tipo y grado de disfunción que producen estas mutaciones y otra mutación previamente identificada, la P90S. La mutación H252D es la primera mutación asociada a Pelizaeus-Merzbacher, identificada en la población española. El ensayo funcional de la mutación H252D reveló que la proteína mutada se procesa normalmente como la proteína silvestre, es capaz de formar hemicanales funcionales con propiedades indistinguibles de las que presentan los hemicanales silvestres, pero no es capaz de formar canales consigo misma ni canales heterotípicos con la Cx43 astrocitaria (Fig. 29-32 y 35 y 38). La mutación Y47H ha sido identificada en una familia de origen norteafricano,

Tabla 3. Tipo y grado de disfunción causados por la mutaciones de PMLD1 ensayadas.

		Cx47	H252D	Y47H	P90S
BIOSÍNTESIS	Proteína total	SI	=	=	=
	Proteína membrana	SI	=	↓↓	↓
UNIONES EN HENDIDURA		SI	NO	NO	SI (↓)
HEMICANALES	Colorante	SI	SI (=)	SI (↓↓)	SI (↓)
	Magnitud Corrientes	SI	SI (=)	SI (↓↓)	SI (↓)
	Dependencia de Ca ²⁺ Mg ²⁺	SI	SI (=)	SI (=)	SI (=)
	Propiedades de Voltaje	SI	SI (=)	SI (=)	SI (=)
ACOPLAMIENTO POR COLORANTE		SI IP>CF	NO	NO	SI (↓), = YP y CF
CANALES INTERCELULARES HOMOTÍPICOS		SI	NO	NO	SI(↓) (G _{jo} = G _{jss} =)
CANALES INTERCELULARES HETEROTÍPICOS Cx47		NA	SI (↓↓) (G _{jo} = G _{jss} =)	NO	SI (↓) Rectificación instantánea
CANALES INTERCELULARES HETEROMÉRICOS Cx47		NA	SI ↓↓ (=)	SI ↓↓↓ (=)	SI ↓ (=)
CANALES INTERCELULARES HETEROTÍPICOS Cx32		NO	NO	NO	NO
CANALES INTERCELULARES HETEROMÉRICOS Cx32		NO	NO	NO	NO
CANALES INTERCELULARES HETEROTÍPICOS Cx31.3		SI	NO	NO	NO
CANALES INTERCELULARES HETEROMÉRICOS Cx31.3		NO	NO	NO	NO
CANALES INTERCELULARES HETEROTÍPICOS Cx43		SI (Rectificación instantánea)	NO	NO	SI (=); NO rectificación instantánea
CANALES INTERCELULARES HETEROTÍPICOS Cx30		SI	NO	NO	NO
INHIBICIÓN DOMINANTE SOBRE LOS CANALES SILVESTRES		NA	SI (↓↓)	SI (↓↓↓)	SI (↓)

en la que se explica la homocigosis por consanguinidad. A diferencia de la mutación H252D, el procesamiento de la proteína mutada es anormal, se retiene parcialmente a nivel intracelular, forma hemicanales funcionales, también con las mismas propiedades que los hemicanales silvestres, pero con unos niveles de expresión significativamente reducidos pero, como ocurre para la mutación H252D, no es capaz de formar canales intercelulares por sí sola ni con la Cx43 astrocitaria (Fig. 29, 33, 35 y 38). Por tanto, podemos concluir que las dos mutaciones conducen a la pérdida completa de la función para formar canales funcionales. La pérdida de función también se ha descrito en otras mutaciones recesivas en homocigosis de PMLD1: I46M, G236R, G236S, M286T e I36M (Orthmann y col., 2007; Orthmann y col., 2009; Kim y col., 2013). En nuestros estudios descartamos que además de esta pérdida de función, las proteínas mutadas de Cx47 pudieran ejercer un efecto de ganancia de función, inhibiendo la funcionalidad de la otra conexina oligodendrocitaria, la Cx32, pero en estos experimentos no se encontró que hubiera ningún tipo de interacción funcional como ocurre entre la proteína silvestre de Cx47 y la Cx32 (Fig. 18, 20 y 36). A partir de estos resultados concluimos que ambas mutaciones causan la leucodistrofia aboliendo el acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito mediado por los canales de Cx47-Cx47 y el acoplamiento oligodendrocito-astrocito mediado por los canales de Cx47-Cx43. La mayor severidad de la mutación Y47H debe ser atribuida bien al defecto de procesamiento de la proteína que eventualmente podría activar la respuesta inducida por proteínas con defecto de plegamiento y puede conducir a la apoptosis oligodendrocitaria o bien a la reducción en la funcionalidad de los hemicanales, en otras mutaciones de PMLD1 también se ha reportado una pérdida completa o parcial de la funcionalidad de los hemicanales (Diekmann y col., 2010).

Actualmente se desconoce cuál podría ser la función desempeñada por los hemicanales de Cx47 oligodendrocitarios; en el caso de la CMTX ocasionada por mutaciones en la Cx32, a los hemicanales mutados se les ha implicado en la patogénesis de la neuropatía periférica (revisado por Fasciani y col., 2013; Nualart-Martí y col., 2013).

Las mutaciones H252D e Y47H se localizan en los dominios extracelulares de la Cx47, la primera en el dominio E1 y la segunda en el dominio E2 (Fig. 28, B). Sin embargo, y aún cuando ambas mutaciones forman hemicanales funcionales, i.e., los precursores del canal completo, el mecanismo molecular por el que ambas mutaciones interfieren con el proceso de unión de los hemicanales debe ser distinto,

ya que los hemicanales de H252D, pero no los de Y47H, son capaces de unirse a los hemicanales de Cx47 silvestre y formar canales heterotípicos funcionales (Fig. 33, A y B). Los canales híbridos H252D-Cx47 muestran unas propiedades de regulación por el voltaje que son indistinguibles de las observadas en los canales homoméricos de Cx47-Cx47 (Fig. 34, C), sugiriendo que esta mutación afecta específicamente a uno de los residuos directamente implicados en la unión de los hemicanales, la H252 (Maeda y col., 2009). En el caso de la mutación Y47H, el residuo mutado se ubica dentro de una estructura de α -hélice sugiriendo que causa un cambio conformacional más importante en la estructura extracelular, que inhabilita completamente el proceso de reconocimiento y la interacción de los hemicanales (Maeda y col., 2009).

En nuestros experimentos también hemos simulado la condición de heterocigosis de los portadores de las mutaciones H252D e Y47H (Fig. 33, 36 y 38). Los resultados muestran que cuando las células expresan en una relación equimolar las proteínas mutadas y la silvestre, el mutante ejerce un efecto de inhibición dominante sobre la funcionalidad de la Cx47 silvestre para formar canales intercelulares, con una reducción del acoplamiento eléctrico del 84% en el caso de la mutación H252D y aún más marcado, del 98%, en el caso de la mutación Y47H, indicando que cuando las subunidades mutadas se combinan con las silvestres inhiben la funcionalidad del canal. El cálculo de las distintas poblaciones de hemicanales y canales heteroméricos que teóricamente se pueden formar indica que en el caso del mutante Y47H, es suficiente con una sola unidad para abolir la funcionalidad, mientras que en el caso del mutante H252D, cabría la posibilidad de que con una subunidad mutada el canal fuera funcional. En ambos casos, las propiedades de regulación por el voltaje de la conductancia intercelular son indistinguibles de las de los canales homoméricos silvestres (Fig. 36). En el caso de la mutación H252D la coexpresión de la proteína mutada con la Cx47 silvestre en la formación de canales heterotípicos con la Cx43 astrocitaria tiene poco impacto, mientras que en el caso de la mutación Y47H presenta un claro efecto de inhibición dominante; en ambos casos las propiedades de rectificación instantánea y de rectificación del valor de estado de la conductancia no se modifican respecto a las de los canales de Cx47 silvestre y Cx32 (Fig. 33). Estos datos sugieren que en la condición de heterocigosis se produce una reducción del acoplamiento oligodendrocito-oligodendrocito mediado por los canales de Cx47/mutante y del acoplamiento oligodendrocito-astrocito mediado por canales Cx47/mutante-Cx43, no

reportado previamente, y que sugiere no afecta, por ser aún suficiente, a la función de mantenimiento de la mielina o que, y es especialmente el caso de la mutación Y47h, los portadores pueden estar o van a estar afectados subclínicamente en el futuro aún cuando actualmente están asintomáticos.

El panorama con la tercera mutación de PMLD1 ensayada, la P90S, que se localiza en el segundo dominio transmembrana (M2), es bien distinto. Esta mutación aún cuando se retiene parcialmente a nivel citoplasmático, retiene la habilidad para formar canales intercelulares homotípicos y/o en combinaciones heterotípicas con la Cx47 y la Cx43, aunque con nuevas propiedades electrofisiológicas. De hecho la mutación P90S no solo reduce los niveles de acoplamiento intercelular, sino que también introduce importantes cambios en las propiedades de regulación por voltaje y en las propiedades de permeabilidad del canal. Los canales homoméricos de P90S-P90S presentan las mismas propiedades de regulación por el voltaje que los canales silvestres de Cx47 (Fig. 34, A). Sin embargo en los estudios de acoplamiento por colorante no encontramos diferencias de permeabilidad entre los colorantes aniónicos y los catiónicos, que contrasta con la selectividad positiva de los canales silvestres por los colorantes aniónicos (Fig. 35, C). Estas diferencias en permeabilidad entre los canales de P90S y de la Cx47 silvestre se ponen en evidencia cuando se forman canales heterotípicos P90S-Cx47 que muestran un marcado comportamiento rectificador instantáneo. La mutación P90S tampoco interfiere con la formación de canales heterotípicos de Cx47-Cx43 pero en ellos desaparece el comportamiento rectificador característico de los canales de Cx47 silvestre con la Cx43 astrocitaria (Fig. 38, A). La mutación P90S se había ensayado previamente, pero se había descrito que provocaba una pérdida completa de la funcionalidad de la Cx47 para formar canales intercelulares consigo misma y también canales heterotípicos con la Cx43 (Orthmann y col., 2007); la discrepancia en los resultados encontrados con respecto a nuestro ensayo podría ser debida a la utilización de la construcción de Cx47-Met4 o a diferencia metodológica o al sistema de expresión exógena utilizado.

En resumen, estas tres mutaciones de PMLD1 podrían producir la leucodistrofia a través de distintos mecanismos patogénicos: en el caso de las mutaciones H252D e Y47H, una pérdida de la función que estaría eliminando la comunicación oligodendrocito-oligodendrocito y oligodendrocito-astrocito dentro del sincitio panglial y en el caso de la mutación P90S en la que la comunicación intracelular está parcialmente conservada alterando las propiedades de

permeabilidad a los iones y otras moléculas cargadas de los canales oligodendrocito-oligodendrocito y oligodendrocito-astrocito.

La desaparición de la vía de comunicación intercelular entre los oligodendrocitos y entre los oligodendrocitos y los astrocitos o, si esta comunicación persiste, el cambio de las propiedades de permeabilidad de los canales intercelulares, podrían interferir con el mecanismo de reciclaje de los iones K^+ desde la región periaxonal al lecho vascular o a líquido cefalorraquídeo y provocar el incremento anormal de la concentración de K^+ que origina depolarización y bloqueo de la conducción saltatoria, edema y destrucción de la mielina.

VI. CONCLUSIONES

En relación con la caracterización de la conexina Cx47 humana, se puede concluir que:

1. La proteína Cx47 se transduce a partir del primer triplete AUG presente en el extremo 5' de su mRNA y que, como consecuencia de ello, el número total de residuos aminoacídicos es de 439.
2. El triplete de aminoácidos Met-Thr-Asn presente en el extremo 5' del dominio amino-terminal de la Cx47 es un importante determinante molecular de las propiedades del poro del canal y del mecanismo de compuerta regulado por el voltaje intercelular sugiriendo que del dominio NT se ubica dentro del poro formando parte del vestíbulo citoplasmático del canal.

En relación con las bases moleculares y las propiedades del acoplamiento del sincitio panglial se puede concluir que:

1. La Cx47 no es capaz de combinarse con Cx32 para formar canales heterotípicos ni heteroméricos. Sin embargo, si es capaz de formar canales heterotípicos con la Cx31.3, con un grado de acoplamiento muy bajo y propiedades rectificadoras. La Cx31.3 humana no forma canales homotípicos consigo misma.
2. Las conexinas 43, 30 y 26 astrocitarias son capaces de formar canales homotípicos con altos niveles de acoplamiento eléctrico, pero solo la Cx30 y la Cx26 son capaces de combinarse entre sí para formar canales heterotípicos.
3. En relación con la comunicación oligodendrocito-astrocito, la Cx47 oligodendrocitaria es capaz de formar canales heterotípicos con la Cx43 y con la Cx30 astrocitarias, con altos y muy bajos niveles de acoplamiento respectivamente, pero no se combina con la otra conexina astrocitaria, la Cx26. El acoplamiento eléctrico mediado por los canales heterotípicos de Cx47 y Cx43 es de tipo rectificador instantáneo en función de la polaridad de voltaje intercelular (observándose un menor flujo de corriente con la depolarización relativa de la célula que expresa la Cx47 oligodendrocitaria que con la hiperpolarización). El acoplamiento por colorante a través de estos canales es bidireccional para el yoduro de propidio cargado positivamente y unidireccional para la carboxifluoresceína cargada negativamente, que solo difunde desde la célula que expresa la Cx43 a la que expresa la Cx47 pero no al revés, revelando la existencia de una barrera para la difusión de distintas

moléculas en función de la carga. Los tres primeros aa del NT de la Cx47 son los determinantes moleculares de la rectificación iónica y de la direccionalidad del acoplamiento por colorante.

En relación con el estudio genético de la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher asociada a mutaciones de la Cx47 humana y con el ensayo funcional de las mutaciones, se puede concluir que:

1. Las dos nuevas mutaciones recesivas del gen *GJC2* identificadas en homocigosis en los pacientes con leucodistrofia, la mutación H252D y la mutación Y47H son de naturaleza patogénica y las causantes de la enfermedad.
2. Las mutaciones oligodendrocitarias H252D e Y47H impiden la formación de canales intercelulares de Cx47 y también la formación de los canales heterotípicos con la Cx43 astrocitaria, mientras que la otra mutación analizada, la mutación P90S, que retiene la capacidad de la Cx47 para formar canales homotípicos y heterotípicos con la Cx43, elimina las propiedades de permoselectividad del poro del canal de la Cx47 y la barrera para la difusión oligodendro-astrocitaria. Dichos resultados sugieren que las mutaciones en el gen de la Cx47 pueden causar la leucodistrofia a través de distintos mecanismos patogénicos: por una pérdida de función de la Cx47 para formar canales intercelulares y por una ganancia de función que altera las propiedades de permeabilidad de los canales. La desaparición de la vía de comunicación intercelular entre los oligodendrocitos y entre los oligodendrocitos y los astrocitos o, si esta comunicación persiste, el cambio de las propiedades de permeabilidad de los canales intercelulares, podrían interferir con el mecanismo de reciclaje de los iones K^+ desde la región periaxonal al lecho vascular o a líquido cefalorraquídeo y provocar el incremento anormal de la concentración de K^+ que origina depolarización y bloqueo de la conducción saltatoria, edema y destrucción de la mielina.
3. El fenotipo más severo de los pacientes con la mutación Y47H podría deberse a una reducción en la capacidad para formar hemicanales.
4. Aún cuando las mutaciones H252D e Y47H se asocian a un patrón de herencia recesivo, hemos observado en los experimentos de coexpresión *in vitro* (que simulan la condición de heterocigosis de los portadores) que la proteína mutada ejerce un marcado efecto de inhibición dominante, más

acentuado en el caso de la mutación Y47H, sobre la capacidad de la Cx47 para formar canales consigo misma y con la Cx43 astrocitaria, originándose una importante reducción de los niveles de acoplamiento intercelular que podría ser suficiente para el mantenimiento de la función de la mielina o podría conducir a una forma subclínica de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, M., Lee, J., Gustafsson, A., Enriquez, A., Lancaster, E., Sul, J., Haydon, P.G., Paul, D.L., Huang, Y., Abrams, C.K., Scherer, S.S. (2007). Cx29 and Cx32, two connexins expressed by myelinating glia, do not interact and are functionally distinct. *J. Neurosci* 28(5):992-1006.
- Altevogt, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Paul, D.L. (2002). Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *Journal of Neuroscience* 22: 6458-6470.
- Altevogt, B.M., Paul, D., (2004). Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 24 (18):4313-4323.
- Balice-Gordon, R.J., Bone, L.J., Scherer, S. S., (1998). Functional gap junction in the Schwann cell myelin sheath. *The journal of cell biology* 142 (4):1095-1104.
- Barrio, L.C., Suchyna, T., Bargiello, T., Xu, L.X., Roginski, R.S., Bennet, M.V.L., Nicholson, B.J. (1991). Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8410-8414.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F., Fischbeck, K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042.
- Brightman, M.W., Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.* 40:648-677.
- Bugiani, M., Al Shahwan, S., Lamantea, E., Bizzi, A., Bakhsh, E., Moroni, I., Balestrini, M.R., Uziel, G., Zeviani, M. (2006). GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Neurology* 67: 273-279.
- Bukauskas, F. F., Elfgang, C., Willecke, K., Weingart, R. (1995). Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.* 429: 870-872.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22:183-192.
- Cailloux, F., Gauthier-Barichard, F., Mimault, C., Isabelle, V., Courtois, V., Giraud, G., Dastugue, B., Boespflug-Tanguy, O. (2000). Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Eur. J. Hum. Genet* 8: 837-845.
- Cao, F., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, J.M., Snyder, S.A., Hulsner, D.F., Willecke, K., Nicholson, B.J. (1998). A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 1):31-43.

- Castro, C., Gómez-Hernandez, J.M., Silander, K., Barrio, L.C.(1999). Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations. *J Neurosci* 19:3752-3760.
- Cremers, F.P.M., Pfeiffer, R.A., van de Pol, T.J., Hofker, M.H., Kruse, T.A., Wieringa, B., Ropers, H.H. (1987). An interstitial duplication of X chromosome in a male allows physical fine mapping of probes from the Xq13-q22 region. *Hum Genet* 77: 23-27.
- Connors, B.W., Long, M.A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:393-418.
- Dahl, G., Miller, T., Paul, D., Voellmy, R., Werner, R. (1987). Expression of functional cell-cell channels from cloned rat liver gap junction complementary DNA. *Science* 236: 1290-1293.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H.J., Chang, Y.S., Lalley, P.A., Nicholson, B.J., Willecke, K. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 271:17903-17910.
- David, G., Barrett, J.N., Barrett, E.F. (1992). Evidence that action potentials activate an internodal potassium conductance in lizard myelinated axons. *J. Physiol.* 445:277-301.
- DeVries, S.H., Schwartz, E.A. (1992). Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J.Physiol.* 445:201-230.
- Dermietzlel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennet, M.V., Spray, D.C., Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10148-10152.
- Diekmann, S., Heeneke, M., Burckardt, B.C., Gärtner, J. (2010). Pelizaeus-Merzbacher-like disease is caused not only by a loss of connexin47 function but also by a hemichannel dysfunction. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 985-992.
- Diez, J.A., Ahamad, S., Evans, W.H. (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.
- Ebihara, L., Berthoud, V.M., Beyer, E.C. (1995). Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap-junctional channels. *Biophys. J.* 68: 1796-1803.
- Ebihara, L. (1996). *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 71: 742-748.
- Ebihara, L., Xu, X., Oberti, C., Beyer, E.C., Berthoud, V.M. (1999). Co-expression of lens fiber connexins modifies hemi-gap-junctional channels behavior. *Biophys. J.* 76 (1): 198-206.
- Eckert, R., Donaldson, P., Goldie, K., Kister, J. (1998). A distinct membrane current in rat lens fiber cells isolated under calcium-free conditions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 1280-1285.

Eghbali, B., Kessler, J.A., Spray, D.C. (1990). Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin32. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 87:1328-1331.

Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell. Biol.* 129(3):805-17.

Falk, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M., Gilula, N.B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* 16(10): 2703-2716.

Fasciani, I., Temperán, A., Pérez-Atencio, L.F., Escudero, A., Martínez-Montero, P., Molano, J., Gómez-Hernández, J.M., Paíno, C.L., González-Nieto, D., Barrio, L.C. (2013). Regulation of connexin hemichannel activity by membrane potential and the extracellular calcium in health and disease. *Neuropharm.* doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.040.

Fishman, G.I., Spray, D.C., Leinwand, L.A. (1990). Functional analysis of human cardiac gap junction channels mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(9): 3525-3529.

Gencic, S., Abuelo, D., Ambler, M., Hudson, L.D. (1989). Pelizaeus-Merzbacher disease, an X-linked neurologic disorder of myelin metabolism with a novel mutation in the gene encoding proteolipid protein. *Am J Hum Genet* 45: 435-442.

Goldeberg, G.S., Valiunas, V., Brink, P.R. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1662:96-101.

González, D., Gómez-Hernandez, J.M., Barrio, L.C.(2006). Species specificity of mammalian connexin26 to form open voltage-gated hemichannels. *FASEB J.* 20, 2329-2338.

González, D., Gómez-Hernandez, J.M., Barrio, L.C.(2007). Molecular basis of voltage dependence of connexin channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94: 66-106.

Grinspan, J.B., Coulalaglou, M., Beesley, J.S. (1998). Maturation-dependent apoptotic cell death of oligodendrocytes in myelin-deficient rat. *J. Neurosci. Res.* 54:623-634.

Gupta, V.K., Berthoud, V.M., Atal, N., jarillo, J.A., Barrio, L.C., Beyer, E.C. (1994). Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 35: 3747-3758.

Hanemann, C.O., Bergmann, C., Senderek, J. (2003). Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutations. *Arch. Neurol.* 60:605-609.

Harris, A.L., D.C.Spray, and M.V.Bennett. (1981). Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol* 77:95-117.

- Harris LH. (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34:325-472.
- Henneke, M., Combes, P., Diekmann, S., Bertini, E., Brockmann, K., Burlina, A.P., Kaiser, J., Ohlenbusch, A., Plecko, B., Rodriguez, D., Boespflug-Tanguy, O., Gärtner, J., (2008). GJA12 mutations are a rare cause of Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Neurology* 70: 748-754.
- Henneke, M., Gegner, S., Plecko, B., Weschke, B., Gärtner, J., Brockmann, K., (2010). Clinical neurophysiology in GJA12-related hypomyelination vs Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 74: 1785-1789.
- Hobson, G.M., Garben J.Y. (2012). Pelizaeus-Merzbacher Disease, Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease 1, and related hypomyelinating disorders. *Semin. Neurol.* 32:62-67.
- Janssen-Bienhold, U., Schultz, K., Gelhaus, A., Schmidt, P., Ammermuller, J., Weiler, R. (2001). Identificación and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex. *Vis. Neurosci.* 18(2): 169-78.
- Jiang, J.X., Goodenough, D.A. (1996). Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 93(3):1287-1291.
- John, S.A., Kondo, R., Wang, S.Y., Goldhaber, J.I., Weiss, J.N. (1999). Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J.Biol.Chem.* 274:236-240.
- Kamasawa, N., Sik, A., Morita, M., Yasumura, T., Davidson, K.G., Nagy, J.I., Rash, J.E. (2005). Connexin-47 and connexin32 in gap junction of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-lanternman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience.*
- Kim, M.S., Gloor, G.B., Bai, D. (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):249-58.
- Kleopas, A.K., Orthmann, J.L., Enriquez, A., Paul, D.L., Scherer, S.S. (2004). Unique distribution of the gap junction proteins connexin-47 in oligodendrocytes. *Glia* 47:346-357.
- Kondo, R.P., Wang, S.Y., John, S.A., Weiss, J.N., Goldhaber, J.I. (2000). Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 32: 1859-1872.
- Kozak M., (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- Krieg, P.A., and Melton, D.A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic.Acids.Res.* 12(18):7057-7070.
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steihäuser, C., Dermietzel, R., Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* 25:11-9.

- Landis, D.M.D. (1981). Membrane structure in mammalian astrocytes: a review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes. *J. Exp. Biol.* 95:35-48.
- Levit, N.A.; Mese, G., Basaly, M.G., White, T.W. (2012). Pathological hemichannels associated with human Cx26 mutations causing Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (8): 2014-9.
- Li, X., Kamasawa, N., Ciolofan, C., Olson, C.O., Lu, S., Davidson, K.G.V., Yasumura, T., Shigemoto, R., Rash, J.E., Nagy, J.I. (2008). Connexin45 containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bi-homotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. *J. Neurosci.* 28:795-806.
- Li, H., Liu, T-F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G.S., Lampe, G.P., Johnson, R.G. (1996). Properties and regulation of gap junctional hemichannels in plasma membranes of cultured cells. *J. Cell. Biol.* 134:1019-1030.
- Loddenkemper, T., Grote, K., Evers, S., Oelerich, M., Stögbauer, F. (2004). Neurological manifestations of the oculodentodigital dysplasia syndrome. *J. Neurol* 249:584-595.
- Lutz, S.E., Zhao, Y., Gulinello, M., Lee, S.C., Raine, C.S., Brosnan, C.F (2009). Deletion of astrocyte connexin 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *J. Neurosci.* 29(24):7743-7752.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 458 (7238): 597-602.
- Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram K., Trotter, J., Willecke, K., Kettenmann, H. (2010). Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin 32. *Glia* 58: 1104-1117.
- Magnotti, L., Goodenough, D.A., Paul, D.L. (2010). Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* 59(1): 26-34.
- Malchow, R.P., Qian, H., Ripps, H. (1993). Evidence for hemi-gap junctional channels in isolated horizontal cells of the skate retina. *J. Neurosci. Res.* 35(3): 237-245.
- Martin, P.E., George, C.H., Castro, C., Kendall, J.M., Capel, J., Campbell, A.K., Revilla, A., Barrio, L.C., Evans, W.H. (1998). Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. Reporting intracellular and plasma membrane calcium environments. *J. Biol. Chem.* 273(3):1719-26.
- Mathias, R.T., White., T.W., Gong, X., (2010). Lens gap junction in growth, differentiation and homeostasis. *Physiology rev.* 90(1):179-206.
- Menichella, D.M., Goodenough, D.A., Sirkowski, E., Scherer, S.S., Paul, D.L. (2003). Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 23: 5963-5973.

- Merzbacher, L., (1910). Eine eigernarige familiär-hereditäre Erkrankungsform (Aplasia axialis extra-corticalis congenita). *Z.Gesamte Neurol. Psychiatr.* 3, 1-138.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S., Sakmann, B. (1986). Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers. Arch.* 407(6):577-88.
- Micevych, P.E., Abelson, L. (1991). Distribution of mRNAs coding for liver and heart gap junction proteins in the rat central nervous system. *J Comp, Neurol.* 305: 96-118.
- Mugnaini, E. (1986). Cell junctions of astrocytes, ependyma and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. In: *Astrocytes, Vol. I.*, pp Vernadakis 329-371. New York: Academic Press.
- Nagy, J.I., Ochalski, P.A., Hertzberg, E.L. (1997). Evidence for the co-localization of another connexin with connexin43 at astrocytic gap junctions in rat brain. *Neuroscience* 78: 533-48.
- Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A., Stelmack, G. (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* 88:447-68.
- Nagy, J.I., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W.A., Yasumura, T., Rash, J.E. (2001). Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junction and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp. Neurol.* 441: 302.23.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., Rash, J.E. (2003). Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44: 205-218.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., Rash, J.E. (2003). Connexin29 and connexin 32 at oligodendrocytes and astrocytes gap junction and in myelin of the mouse central nervous system. *J Comp Neurol.*22; 464(3): 356-370.
- Nualart-Marti, A., Mas de Molino, E., Grandes, X., Bahima, L., Martin-Satué, M., Puchal, R., Fasciani, I., González-Nieto, D., Ziganshin, B., Llobet, A., Barrio, L.C., Solsona, C. (2013). Role of connexin32 hemichannels in the release of ATP from peripheral nerves. *Glia*. In press.
- Odermatt, B., Wellershaus, K., Wallraff, A., Seifert, G., Degen, J., Euwens, C., Fuss, B., Büssow, H., Schilling, K., Steinhäuser C., Willecke, K.(2003). Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveals predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 23:4549-4559.
- Oh, S., Verselis, V.K., Bargiello, T.A. (2008). Charges dispersed over the permeation pathway determine the charge selectivity and conductance of a Cx32 chimeric hemichannel. *J. Physiol.* 586 (10):2445-61.

- Orthmann-Murphy, J.L., Enriquez, A.D., Abrams, C.K., Scherer, S.S.(2007). Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Cell Neurosci* 34:629-641.
- Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S., Abrams, C.K. (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexions. *J.Neurosci.* 27:13949-57.
- Orthmann-Murphy, J.L., Abrams, C.K., Scherer, S.S. (2008). Gap junction couple astrocytes and oligodendrocytes. *J. Mol. Neurosci* 35(1): 101-116.
- Orthmann-Murphy, J.L., Salsano, E., Abrams, C.K., Bizzi, A., Uziel, G., Freidin, M.M, Lamantea, E., Zeviani, M., Scherer, S., Pareyson, D., (2009). Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain* 132: 426-438.
- Osaka, H., Hamanoue, H., Yamamoto, R., Nezu, A., Sasaki, M., Saitsu, H., Kurosawa, K., Shimbo, H., Matsumoto, N., Inoue, K. (2010). Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Ann.Neurol.* 68(2):250-4.
- Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Sosinsky, G. (2007). Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (24): 10034-10039.
- Parnekas, W.A., Boyadjiev, S.A., Shapiro, R.E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C.E., Innis, J.W., Dinulos, M.B., Christian, C., Hannibal, M.C., Jabs, E.W.(2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72:408-418.
- Paul, D.L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I., Goodenough, D.A.(1991). Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Biol.* 115: 1077-1089.
- Paulson, H.L., Garbern, J.Y., Hoban, T.F., Krajewski, K.M., Lewis, R.A., Fischbeck, K.H. (2002). Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann. Neurol.* 52:429-34.
- Pelizaeus, F. (1885). Über eine eigenthümliche Form spast Lähmung mit Cerebralerschinunge auf hereditärer Grundlage (Multiple Sklerose). *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 16, 698-710.
- Plotkin, L.I., Bellido, T. (2001). Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43. *Cell. Adhes. Commun.* 8(4-6): 377-382.
- Rash, J.E., Duffy, H.S., Dudek, F.E., Bilhartz, B.L., Whalen, L.R., Yasumura, T. (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.* 388:265-292.
- Rash, J.E., (2010). Molecular disruption of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal salutatory conduction: pertinence to neuromyelitis optical and other demyelinating disease of the central nervous system. *Neuroscience* 168: 982-

1008.

Rash, J.E., Yasumura, T., Dudek, F.E., Nagy, J.I. (2001). Cell-expression of connexins, and evidence for restricted gap junction coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21:1983-2001.

Raskind, W.H., Williams, C.A., Hudson, L.D., Bird, T.D. (1991). Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Hum Gen* 49: 1355-1360.

Renier, W.O., Gabreëls, F.J., Hustinx, T.W., Jaspar, H.H., Geelen, J.A., Van Haelst, U.J., Lommen, E.J., TerHaar, B.G. (1981). Connatal Pelizaeus-Merzbacher disease with congenital stridor in two maternal cousins. *Acta Neuropath* 54: 11-17.

Revilla, A., Castro, C., Barrio, L.C. (1999). Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin-32 and connexin-43 junctions. *Biophys. J* 77(3):1374-83.

Robinson, R., Hampson, C.G.M., Munro, M.N., Vaney, D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* 262: (5136):1072-4.

Sargiannidou, I., Ahn, M., Enriquez, A.D., Peinado, A., Reynolds, R., Abrams, C., Scherer, S., Kleopa, K.A. (2008). Human oligodendrocytes express Cx31.3: function and interactions with Cx32 mutants. *Neurobiol. Dis.* 30: 221-233.

Saugier-Veber, P., Munnich, A., Bonneau, D., Rozet, J.M., LeMerrer, M., Gil, R., Boespflug-Tanguy, O. (1994). X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat. Genet.* 6(3):257-62.

Scherer, S.S., Deschênes, S.M., Xu, Y.T., Grinspan, J.B., Fischbeck, K.H., Paul, D.L. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15:8281-8294.

Scherer, S.S., Xu, Y.T., Nelles, E., Fischbeck, K., Willecke, K., Bone, L.J. (1998). Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24: 8-20.

Spray, D.C., Harris, A.L., Bennet, M.V.L. (1981). Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol.* 77:77-93.

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.* 270:6768-6772.

Suchyna, T.M., Nitsche, J.M., Chilton, M., Harris, A.L., Veenstra, R.D., Nicholson, B.J. (1999). Different selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophys. J.* 77: 2968-2987.

Takashima, H., Nakagawa, M., Umehara, F., Hirata, K., Suehara, M., Mayumi, H., Yoshishige, K., Matsuyama, W., Saito, M., Jonosono, M., Arimura, K., Osame, M. (2003). Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol. Scand*, 107 (1):31-7.

Teubner, B., Odermatt, B., Guldenagel, M., Söhl, G., Delgen, J., Bukauskas, F., Kronengold, J., Verselis, V.K., Jung, Y.T., Kozak, C.A., Schilling, K., Willecke, K. (2001). Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J Neurosci* 21:1117-1126.

Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci* 23:766-776.

Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J., Willecke, K. (2004). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends in Neurosci.* 28(4).

Tikole, S., Sankararamakrishnan, R. (2008). Prediction of translation initiation sites in human mRNA sequences with AUG start codon in weak Kozak context: A neural network approach. *Biochemical and biophysical Research Communications* 369 1166-1168.

Tress, O., Maglione, M., Zlomuzica, A., May, D., Dicke, N., Degen, J., Dere, E., Kettenmann, H., Hartmann, D., Willecke, K. (2011). Pathologic and phenotypic alterations in a mouse expressing a connexin47 missense mutation that causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease in humans. *Plos Genetics* 7 (7): e1002146.

Tress, O., Maglione, M., May, D., Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., Binder, S., Zlomuzica, A., Seifert, G., Theis, M., Dere, E., Kettenmann, H., Willecke, K. (2012). Pansial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J. Neurosci.* 32(22):7499-7518.

Uhlenberg B., Schuelke M., Rüschemdorf F., Ruf N., Kaindl A.M., Henneke M., Thiele H., Stoltenburg-Didinger G., Aksu F., Topaloglu H., Nürnberg P., Hübner C., Weschke B., Gärtner J. (2004). Mutations in the Gene encoding Gap Junction Protein α 12 (Connexin 46.6) Cause Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease. *Am.J.Hum.Genet.* 75:251-260.

Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Beyer, E.C., Brink, P.R. (1994). Selective and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin-45. *Circ Res.* 75 (3): 483-90.

Wasseff, S.K., Scherer, S.S. (2011). Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol. Dis.* 42(3):506-13.

White, T.W., Bruzzone, R., Woolfram, S., Paul, D.L., Goodenough, D.A. (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: 879-892.

White TW, Bruzzone R. (1996). Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *J Bioenerg Biomemb* 28:339-350.

Wilders, R., Jongsma, H.J. (1992). Limitations of the dual voltage clamp method in assaying conductance and kinetics of gap junction channels. *Biophys. J.* 63: 942-953.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383(5):725-37.

Yamamoto, T., Hertzberg, E.L., Nagy, J.I. (1990). Epitopes of gap junctional proteins localized to neuronal subsurface cisterns. *Brain-Res.* 527:135-139.

Yum 2007

Zahs, K.R., Kofuji, P., Meier, C., Dermietzel, R. (2003). Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 455 (4):531-46.