

Is the extracellular ATP a key in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease and in inherited non-syndromic deafness?

Ezequiel Mas del Molino

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Is the extracellular ATP a key in X-linked Charcot- Marie-Tooth disease and in inherited non- syndromic deafness?

Programa de Doctorat en Biomedicina

Bienni 2006-2008

Doctorand: Ezequiel Mas del Molino

Director de Tesi: Carles Solsona Sancho

Barcelona, January del 2011

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina (Campus de Bellvitge), Universitat de Barcelona

Summary

INTRODUCCIÓN

El ATP es una molécula ampliamente conocida por su papel en muchas funciones como la homeostasis celular, el mantenimiento de gradientes iónicos, el mantenimiento del pH en gránulos secretores, el almacenamiento energético, regulador de la interacción actina-miosina, etc. Además, el ATP puede actuar como molécula señalizadora a través de los receptores purinérgicos P2. De receptores P2 hay de dos tipos, los P2X, que son ionotrópicos, y los P2Y que son metabotrópicos. Los primeros son una familia de canales iónicos permeables a cationes que se abren cuando se les une el ATP. Los segundos son receptores acoplados a proteínas G, y la unión del ATP desencadena diferentes reacciones metabólicas. Ambos tipos de receptores se han relacionado con diferentes patologías.

Los metabolitos del ATP fruto de su hidrólisis por las E-NTPDasas (ADP, AMP y Adenosina) también pueden activar otros receptores purinérgicos denominados P1 o receptores de Adenosina que están acoplados a proteínas G (*Figura S1*).

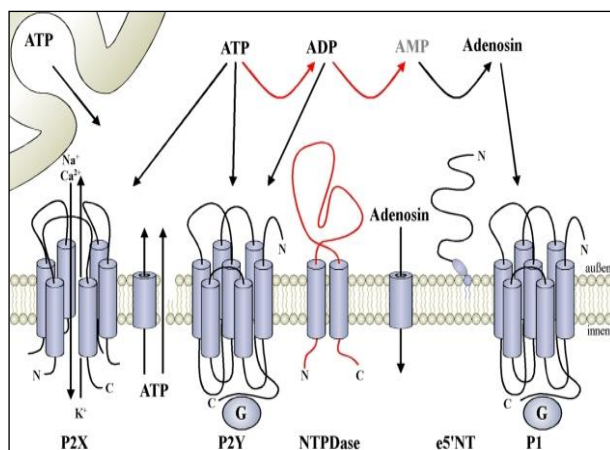


Figura S1 | Esquema de la señalización purinérgica. Podemos observar como el ATP directamente puede activar los receptores P2, sin embargo, metabolitos del ATP (ADP, AMP y Adenosina) también activan otro tipo de receptores, los P1 ⁽¹⁾.

Como el ATP es muy hidrofílico no puede cruzar espontáneamente la membrana plasmática que es de naturaleza lipídica e hidrofóbica. Por eso está ampliamente aceptado que la liberación celular de ATP es por exocitosis o por transportadores de ATP. Investigaciones recientes indican que algunos hemicanales formados por conexinas pueden liberar ATP mediante estímulo.

Las conexinas son proteínas de membrana formadas por cuatro dominios transmembrana y con los extremos amino y carboxi terminal citoplasmáticos. Las 21 conexinas descritas en el hombre difieren entre ellas por pocos aminoácidos. Esto hace que tengan diferentes pesos moleculares. La nomenclatura que recibe cada conexina es "Cx" seguida del peso molecular correspondiente. Una letra antes de Cx indicará la especie animal a la que pertenece (h=human, m=mouse, r=rat).

Las conexinas forman hexámeros llamados conexones. Dos conexones de dos células adyacentes forman una unión tipo comunicante o "gap junction". Cuando un conexón se encuentra en una membrana que no está en contacto con otra célula forma un canal llamado hemicanal (*Figura S2*).

Se sabe que los hemicanales pueden abrirse en condiciones fisiológicas y en condiciones patológicas y también se ha podido estudiar que estos hemicanales son permeables a iones (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} ...) y a metabolitos (ATP, cAMP, IP_3 ...). Algunos estudios sugieren que algunos hemicanales son permeables al ATP, o sea, que en ciertas condiciones éstas, liberan ATP al medio extracelular.

Los canales formados por conexinas tienen una sensibilidad compleja. La mayoría de ellos tienen una conductancia sensible al potencial eléctrico de interunión (V_j , diferencia de potencial eléctrico entre los citoplasmas de dos células adyacentes). Además, muchos

canales formados por conexinas son también sensibles al potencial de membrana (V_m , diferencia de voltaje entre el interior i el exterior de la célula).

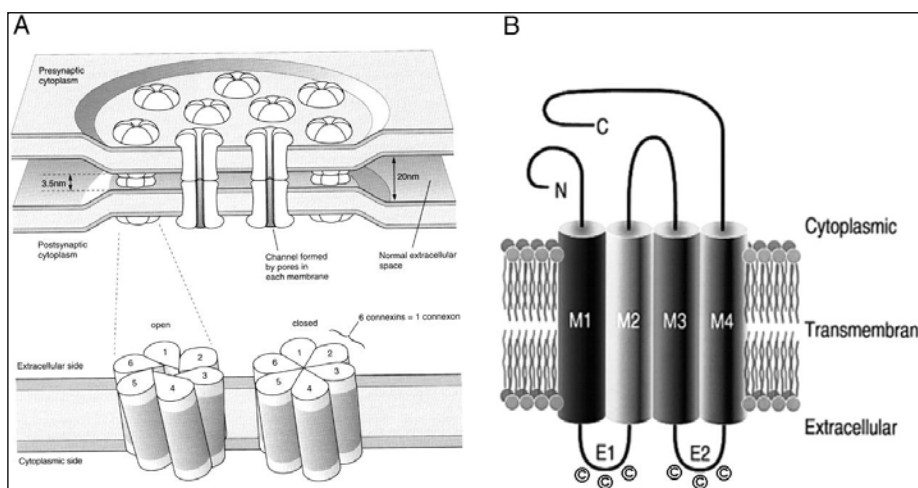


Figura S2 | A; Dibujo esquemático de las Gap Junctions. Cada célula contribuye con un conexón para formar una Gap Junction. Cada conexón está formado por 6 subunidades proteicas llamadas conexinas. **B;** Modelo topológico de una conexina. Los cilindros representan los dominios transmembrana (M1-M4). Hay dos asas extracelulares y una de intracelular. Los extremos amino y carboxi terminales son intracelulares ⁽²⁾.

1. Conexina hCx32

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) agrupa a varias formas de neuropatías periféricas hereditarias, afectando tanto la función motora como la sensorial, y tienen, en relación a las enfermedades neuromusculares, una elevada prevalencia en la población (1:2500).

La forma de esta enfermedad ligada al cromosoma X (CMTX) se debe a las mutaciones en el gen que codifica la conexina 32 (Cx32 o hCx32). Se sabe que hay más de 290 mutaciones en el gen Gap

Junction β -1 (*gjb1*) relacionadas con la CMTX (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>).

Se conoce que la Cx32 está localizada en las hendiduras de Schmidt-Lanterman y en las zonas paranodales de las células de Schwann, pero no se sabe qué papel fisiológico están jugando. Uno de los hipotéticos roles es crear un atajo para comunicar de manera rápida la zona perinuclear y la zona periaxonal de la célula de Schwann. Nuestra hipótesis es que las células de Schwann se mantienen diferenciadas gracias a un mecanismo purinérgico autocrino, dado que expresan en su superficie distintos tipos de receptores de ATP de tipo P2X y P2Y. En consecuencia, el papel de la Cx32, sería facilitar la liberación de ATP. La Cx32, en forma de hemicanal en la membrana plasmática de las células de Schwann, permitiría el paso del ATP de forma fisiológica. Las mutaciones en la Cx32 desequilibrarían la liberación de ATP. Bien sea un aumento o una disminución en el ATP liberado, la célula de Schwann entraría en apoptosis, produciéndose una lesión en la fibra nerviosa (*Figura S3*).

2. Conexinas hCx26 y hCx30

La sordera es aquel conjunto de problemas relacionados con la capacidad auditiva determinados por una audiometría por debajo del umbral considerado normal. Hay diferentes tipos de sordera, pero el que corresponde a mutaciones en las conexinas se denomina sordera sensorineural (porque afecta a la parte interna del oído), no sindrómica (ya que no presenta anomalías visibles en los órganos del oído) y prelingual (ya que esta aparece antes del lenguaje).

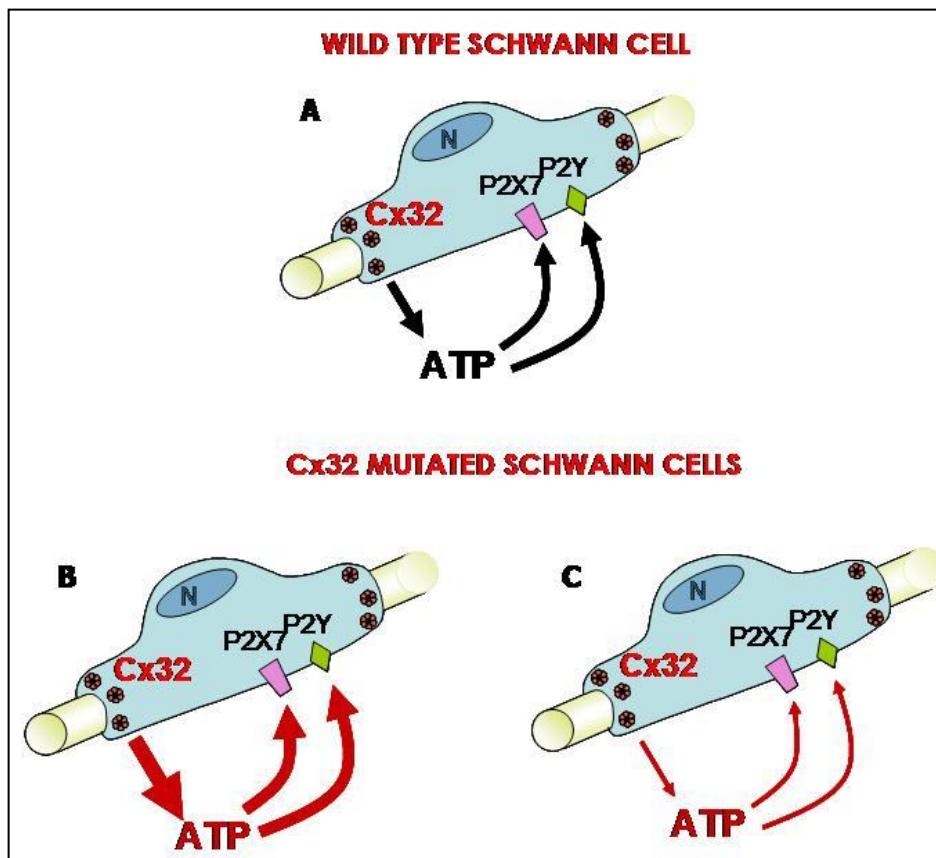


Figura S3 | Representación esquemática de una célula de Schwann en tres diferentes situaciones. A: En una célula de Schwann expresando la Cx32 WT el ATP es liberado a través de estas para una correcta función de la célula. **B:** Una célula de Schwann expresando una mutación de la Cx32. En este caso la mutación incrementa la cantidad de ATP liberado. Esto lleva a la célula a una hiperactivación de los receptores P2X y P2Y. **C:** Una célula de Schwann expresando una mutación de la Cx32. En este caso la mutación disminuye la cantidad de ATP liberado. Esto lleva a la célula a una hipoactivación de los receptores P2X y P2Y. En los casos **B** y **C** esa desregulación llevaría a la desdiferenciación de la célula de Schwann y la consecuente desmielinización.

El oído está formado por el oído externo, el medio y el interno. El oído interno está formado por el laberinto que consta del vestíbulo, los canales semicirculares y de la cóclea. La cóclea o caracol es el órgano que se encarga de convertir las vibraciones mecánicas del sonido en impulsos nerviosos. Está formado por una especie de tubo enrollado

de aquí el nombre de caracol. Este tubo está dividido en tres cavidades: Scala Vestibuli, Scala Media y Scala Tympani. La Scala Media está bañada por endolinfa mientras las otras dos están bañadas por perilinfa. La perilinfa es una solución extracelular con una composición iónica muy parecida a cualquier otra solución extracelular, sin embargo la endolinfa tiene una composición mucho más parecida al interior de una célula, donde el ion más abundante es el K^+ . Además también tiene un bajo contenido en Ca^{2+} . Formando parte de la Scala Media encontramos el órgano de Corti, que contiene, entre muchos otros tipos celulares, las células pilosas sensoriales internas y externas. Estas células son las que convertirán las vibraciones en estímulos nerviosos.

En este estudio nos hemos focalizado en las conexinas 26 y 30. Mutaciones en cualquier de estas dos proteínas puede causar sordera de una manera recesiva o dominante dependiendo de la mutación.

Hasta el día de hoy se sabe que estas dos conexinas están formando redes que comunican, mediante las "gap junctions", a células epiteliales y conectivas de la cóclea (*Figura S4*). Además, también se ha demostrado que estas conexinas forman hemicanales, en células epiteliales, que desembocan en espacios bañados tanto por perilinfa como por endolinfa (*Figura S5*).

Nuestro objetivo es caracterizar las propiedades iónicas y la permeabilidad para el ATP de los hemicanales formados por hCx26, los formados por hCx30 y los formados por diferentes mutaciones de la hCx26 y de la hCx30.

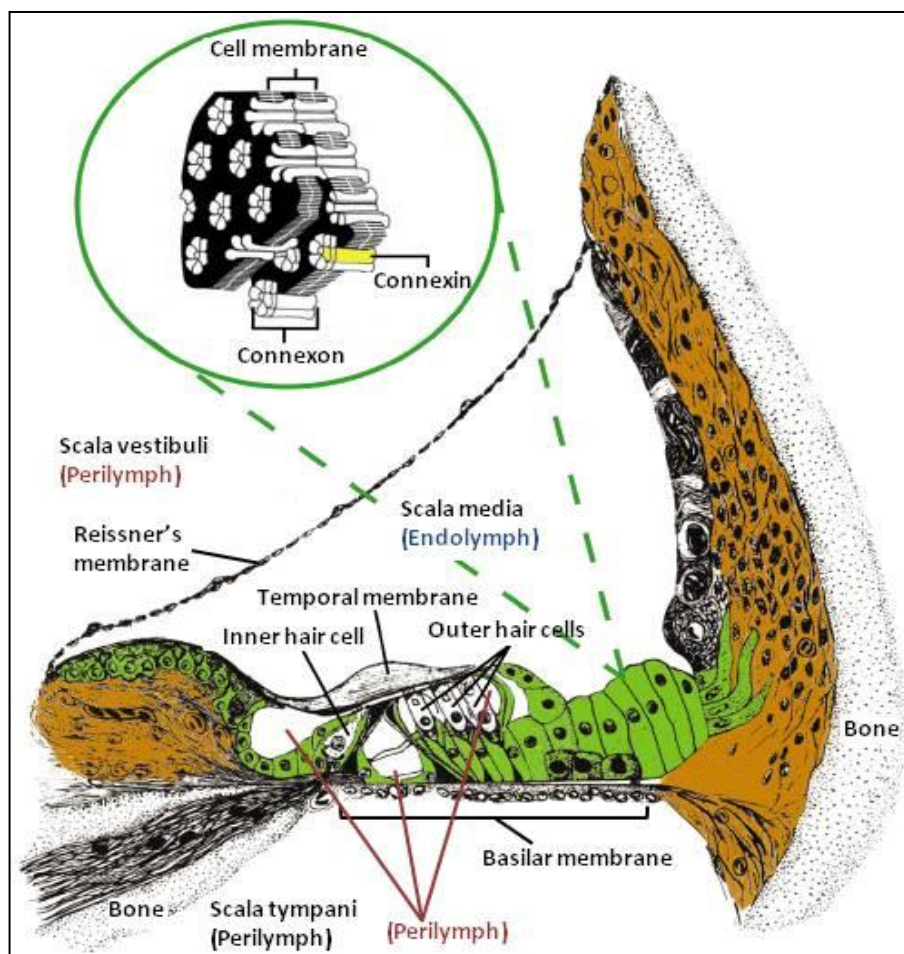


Figura S4 | Esquema del órgano de Corti y diferentes partes que lo forman y lo rodean. Observamos diferentes partes del órgano de Corti y las soluciones externas que bañan la cóclea. En verde están resaltadas esas células endoteliales que contienen conexinas y en marrón aquellas células del tejido conectivo que también las expresan ⁽³⁾.

Debido a los resultados que se han ido obteniendo y que se ha descrito que la hCx26 y la hCx30 co-localizan y co-ensamblan, también hemos querido caracterizar los hemicanales formados por ambas conexinas y combinaciones de hCx30 con mutaciones de la hCx26 y viceversa.

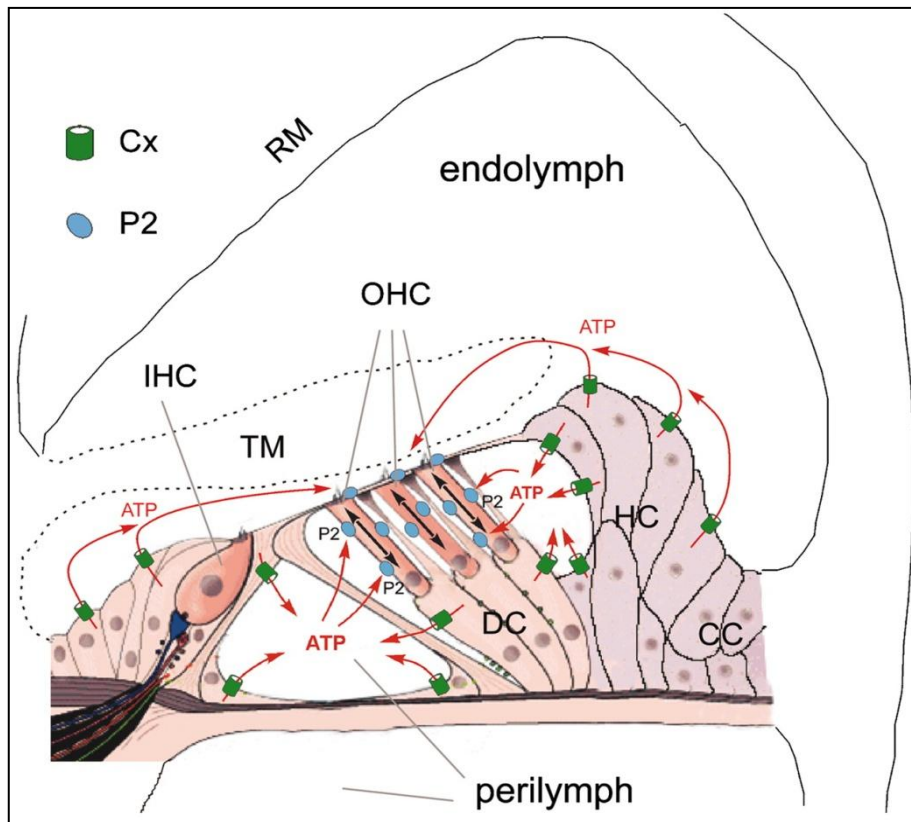


Figura S5 | Mapa purinérgico de la cóclea. Observamos como las hemicanales liberarían ATP a los espacios tanto bañados por perilinfa como por endolinfa (4).

OBJETIVOS

1. Estudiar la liberación de ATP en los nervios ciáticos de ratones
2. Estudiar las corrientes iónicas y la permeabilidad "in vitro" de las Cx32, Cx26 y Cx30 al ATP, en función del potencial eléctrico de membrana, cuando forman hemicanales.
3. Investigar la permeabilidad en algunas mutaciones relacionadas con las enfermedades descritas anteriormente.

METODOLOGIA

1. Liberación de ATP en nervio ciático

Mediante una cámara de registro construida en los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona para poner el nervio y poder perfundir soluciones y una cámara fotográfica ultrasensible ImageEM (Hamamatsu, Japón) pudimos registrar, mediante fotografía y video, la salida de ATP de un nervio ciático utilizando diferentes estímulos:

- Estímulo mecánico (contacto físico, hipotonicidad)
- Estímulo eléctrico
- Estímulo químico (baja concentración de iones divalentes)

2. Liberación de ATP en cultivos celulares

Para esto utilizamos cultivos de células de Schwann, una técnica ya puesta a punto en el laboratorio, y el lector de placas. La técnica consiste en hacer cultivos de estas células en placas de 12 pocillos y, una vez en el lector de placas, realizarle el estímulo por shock osmótico. Este aparato nos mide la luminiscencia. Haciendo curvas patrón con soluciones de ATP de concentración conocida pudimos cuantificar el ATP que liberan las células de un pocillo. Previamente se hizo un recuento de las células que contiene cada pocillo. De esta manera obtuvo la cantidad de ATP liberado por 10^4 células.

Las células HeLa son una línea celular que está descrito que no tienen cantidades detectables de conexinas. Por eso, previamente a mi llegada en el laboratorio, se utilizó esta línea para transfectarla establemente con el gen de la hCx32. Las células HeLa y las células HeLa establemente transfectadas con el gen de la hCx32 se utilizaron

para hacer el mismo tipo de experimento que en los cultivos de células de Schwann.

3. Two electrode voltage clamp

Esta técnica consiste en inyectar un cRNA de una proteína de membrana en oocitos de *Xenopus laevis* y realizar experimentos electrofisiológicos con ellos. Una vez tenemos los hemicanales expresados en los oocitos se les aplicó un protocolo de despolarización donde pasamos de -40 mV a +80 mV durante 30 s y otra vez vuelta a -40 mV para la hCx32; para la hCx26 y la hCx30 aplicamos estímulos de 10 s de -80 mV a +100 mV para volver a -80 mV. De esta manera obtuvimos unas corrientes de salida seguidas de unas corrientes de entrada llamadas corrientes de cola. Mediante la reacción de la Luciferina-Luciferasa si había liberación de ATP lo pudimos detectar y, gracias a la aplicación de cantidades conocidas de ATP a través de un nanoinyector, pudimos cuantificar los fmoles de ATP liberado por oocito. Esta técnica nos permitió registrar, simultáneamente, corrientes iónicas y liberación de ATP. Una vez conocido el comportamiento de estos canales pasamos a estudiar si había diferencias en estas corrientes y en la liberación de ATP entre los canales de hCx32, hCx26, hCx30 y las diferentes mutaciones descritas en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X y la pérdida de audición.

RESULTADOS

1. Conexina hCx32

Las imágenes de inmunofluorescencia realizadas previamente por la Dra. X. Grandes en nuestro laboratorio demostraron que la

localización de la Cx32 es en las zonas paranodales de los nódulos de Ranvier y en las hendiduras de Schmidt-Lanterman (*Figura S6*).

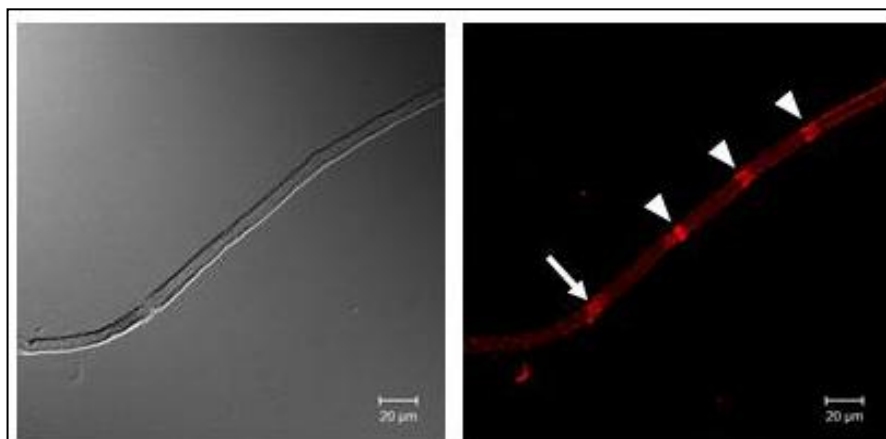


Figura S6 | Imagen de la localización de la Cx32 en una fibra nerviosa de nervio ciático de ratón. En la parte de la izquierda vemos la imagen de una fibra nerviosa con microscopía de contraste de fases. En la derecha la misma imagen se visualiza con microscopía de fluorescencia. Vemos que la fluorescencia se localiza en las zonas paranodales de un nódulo de Ranvier (flecha) y en las hendiduras de Schmidt-Lantermann (triángulos).

Aunque se utilizaron diferentes estímulos para provocar la liberación del ATP en nervio ciático, solo mediante el shock hipotónico pudimos visualizar la liberación del ATP en fibras nerviosas separadas. Estas imágenes demuestran que la liberación de ATP se localiza en las zonas paranodales de los nódulos de Ranvier (*Figura S7*). Esta liberación coincide con la localización de la Cx32 en los nervios periféricos.

Además, los cultivos de células de Schwann liberan ATP por la totalidad de la célula, y esta liberación también coincide con la localización de la Cx32 (*Figura S8*).

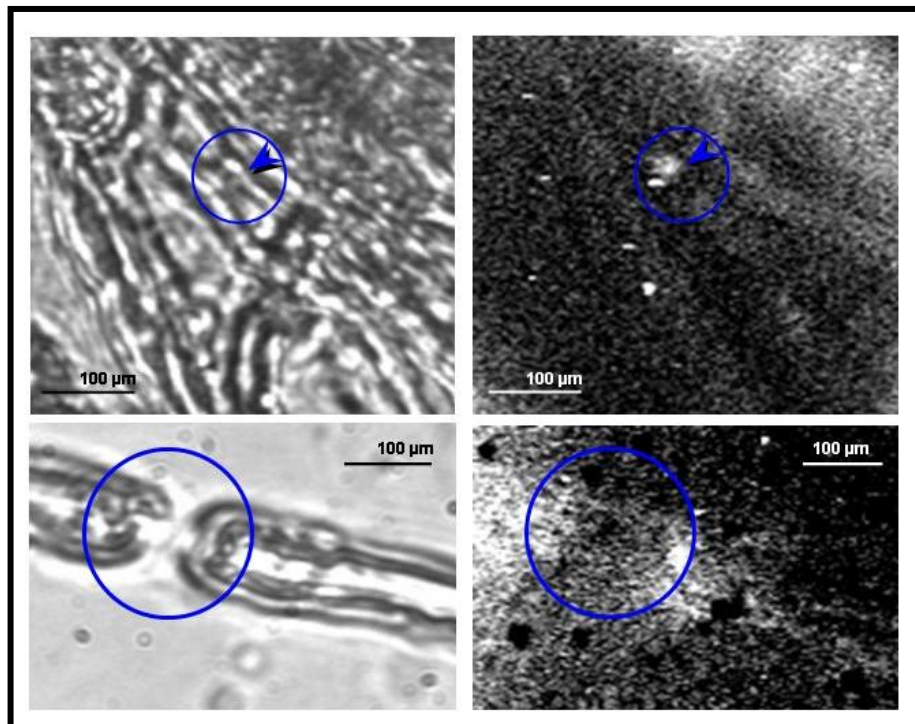


Figura S7 | Imagen de la luminiscencia creada por la reacción enzimática de la Luciferina-Luciferasa cuando el ATP es liberado. En la izquierda encontramos las imágenes en contraste de fases. A la derecha hay las imágenes de luminiscencia. Los círculos indican la localización de los nódulos de Ranvier, mientras que la flecha indica la zona paranodal donde hay la liberación de ATP.

Los estudios con la técnica electrofisiológica del TEVC con la hCx32 han verificado que esta conexina se activa cuando el oocito que la expresa es sometido a una despolarización. Cuando esto sucede el oocito presenta una corriente de salida. Cuando la despolarización termina los hemicanales expresados en el oocito permiten una corriente de entrada que se inactiva progresivamente, y es durante la corriente de entrada que observamos una salida de ATP (*Figura S9*).

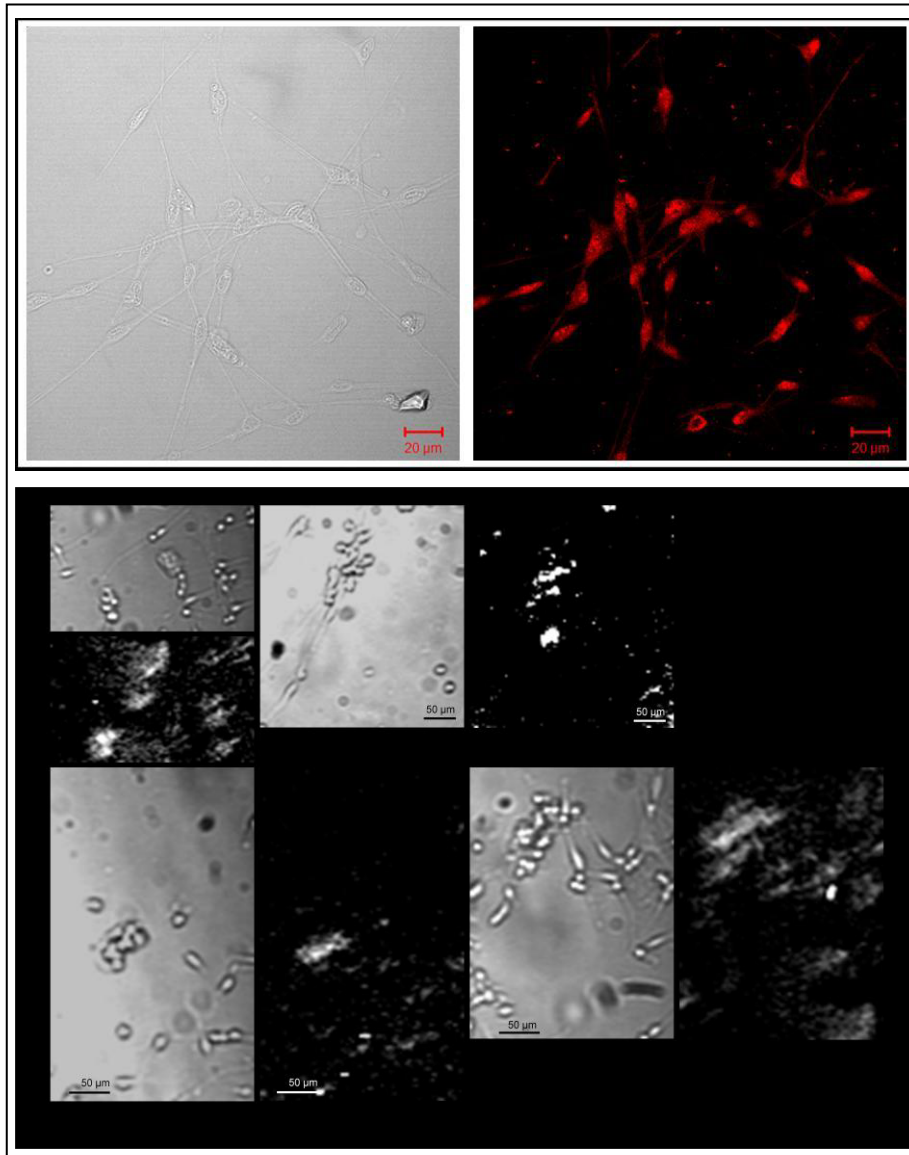


Figura S8 | Localización de la Cx32 y de la liberación de ATP en cultivos de células de Schwann. En el panel superior vemos que la Cx32 está localizada en toda la superficie de la célula de Schwann. En concordancia, en el panel inferior observamos que la luminiscencia dada de la salida de ATP se localiza en toda la célula de Schwann.

Se han realizado estudios de 5 mutaciones de esta hCx32 (S26L, P87A, Δ 111-116, D178Y y R220X) relacionadas con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Estos estudios demostraron que las mutaciones

P87A, Δ 111-116 y R220X tienen inhibidas las corrientes iónicas y la permeabilidad al ATP (*Figura S10*). Aplicando despolarizaciones muy elevadas (hasta +140 mV) hemos demostrado que estas mutaciones se expresan y se transportan a membrana en los oocitos de *Xenopus*.

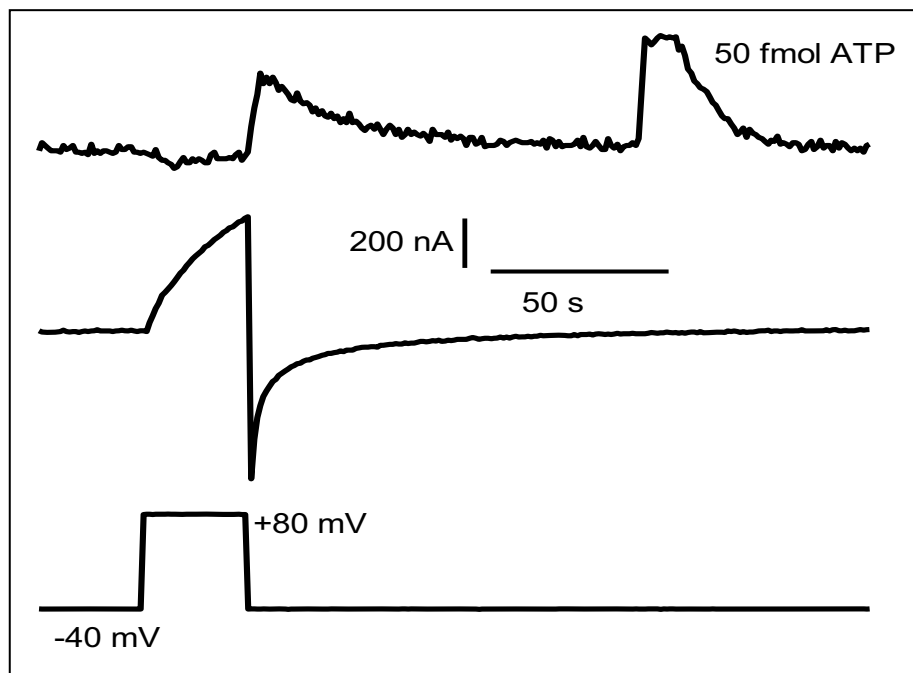


Figura S9 | Representación gráfica de la corriente y el ATP liberado por los hemicanales de hCx32 cuando son despolarizados. En la parte de arriba vemos la luz emitida gracias a la reacción de la Luciferina-Luciferasa cuando el voltaje vuelve a su estado inicial. En el medio observamos la corriente, donde destaca la corriente generada cuando el voltaje ya está de nuevo a -40 mV. La parte de abajo es una representación del pulso cuadrado que se utiliza para estimular los oocitos que expresan la hCx32.

La mutación S26L presenta corrientes de salida parecidas a las de la hCx32 normal, sin embargo las corrientes de entrada ($3.6 \pm 0.6 \mu\text{C}$, $n=10$ de S26L vs $10.7 \pm 1.7 \mu\text{C}$, $n=15$ de hCx32) ($p < 0.001$) y la cantidad de ATP liberada son estadísticamente inferiores ($20.7 \pm 6.8 \mu\text{C}$, $n=10$ de S26L vs $83.1 \pm 19.7 \mu\text{C}$, $n=15$ de hCx32) ($p < 0.05$).

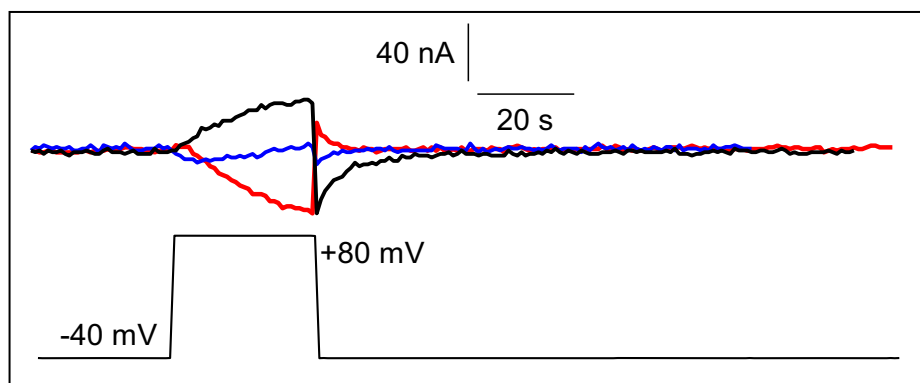


Figura S10 | Representación gráfica de las corrientes permitidas a través de los hemicanales de las mutaciones de hCx32 P87A (negro), Δ 111-116 (rojo) y R220X (azul) cuando son despolarizados. Observamos que las corrientes son insignificantes comparadas con el WT (*Figura S9*). En este caso no se ha dispuesto la parte correspondiente a la liberación de ATP ya que esta no es detectable.

Por último, la mutación D178Y no presenta diferencias en cuanto a los valores de las corrientes o del ATP liberado. Sin embargo, las cinéticas de las corrientes de entrada y de la liberación del ATP son diferentes (*Figura S11*). Esto queda demostrado al comprobar que los valores de la constante de tiempo (τ , tiempo necesario para cerrar el 63.2% de la corriente), y el "Rise Time" del ATP (tiempo requerido para el ATP para cambiar del 10% al 90% del máximo de la curva) son diferentes ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente).

2. Conexina hCx26 y hCx30

Para estudiar las corrientes y la permeabilidad para el ATP de ambas conexinas utilizamos la técnica de TEVC de la misma manera que la utilizamos para estudiar a la hCx32. Estos estudios demostraron que la hCx26 no es permeable al ATP en ninguno de los potenciales de membrana probados, ni en ninguno de los medios extracelulares ensayados (diferentes concentraciones de Ca^{2+} y de K^+) (*Figura S12*).

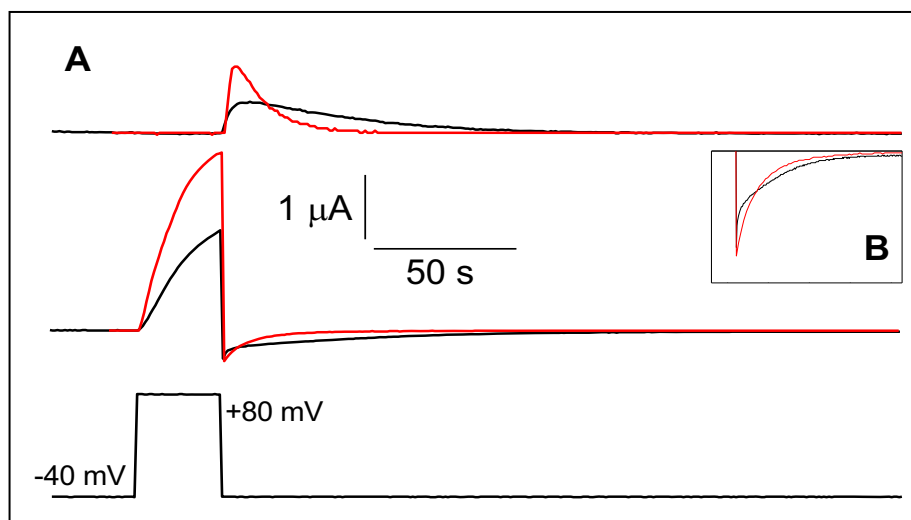


Figura S11 | Representación gráfica de las corrientes permitidas a través de los hemicanales de la mutación D178Y y de la wild type. Observamos que las corrientes de entrada (**B**) y la liberación del ATP (**A**) tienen diferentes cinéticas.

Por otro lado la hCx30 sí ha resultado ser permeable al ATP. Sin embargo en la mayoría de oocitos probados (50%), no presentan inactivación de las corrientes de entrada. El 50% restante inactivan las corrientes. De estos un 28% no liberan ATP y el 22% liberan ATP transitoriamente (*Figura S13*). En condiciones de baja concentración de Ca^{2+} , estas proporciones no cambian estadísticamente.

Conforme a la literatura donde se demuestra que las conexinas 26 y 30 forman hemicanales heteroméricos, utilizamos esta misma técnica pero co-inyectando ambos cRNAs para que los oocitos co-expresaran ambas conexinas. El análisis de los resultados nos permite asegurar que la hCx26 tiene un papel regulador en estos hemicanales formados por ambas conexinas. Más concretamente, esta hCx26 disminuye, respecto a la hCx30, el número de oocitos que no son capaces de inactivar sus corrientes de entrada (19% vs 50%) ($p < 0.05$). Además, los hemicanales hCx26/hCx30 presentan una relación ATP/Carga-

Entrada mayor que los formados sólo por hCx30 ($p < 0.01$), significando que una mayor cantidad de los iones que forman la corriente de entrada son ATP en el caso de los hemicanales heteroméricos.

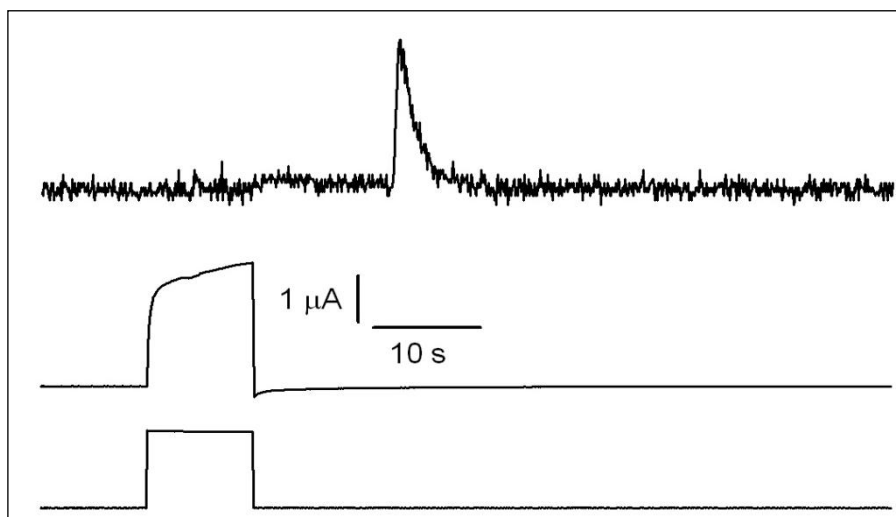


Figura S12 | Representación gráfica de la corriente y de la luminiscencia cuando oocitos que expresan hCx26 son despolarizados. En la parte de arriba vemos que no hay luz emitida cuando coincide con la corriente de entrada. La luz emitida posteriormente se debe a la dosis externa de ATP que añadimos para cuantificar. Cuando el voltaje vuelve a los -80 mV iniciales, encontramos las corrientes de entrada. Este ejemplo es en condiciones iónicas normales, entendiéndolo como normales esas concentraciones parecidas a las del suero. Sin embargo otras composiciones iónicas testadas (baja concentración de Ca^{2+} , alta proporción de K^+) no han permitido la liberación del ATP.

En cuanto a las mutaciones de la conexina hCx26 encontramos que, a excepción de la mutación N54S, todas ellas son parcialmente permeables al ATP, y todas ellas presentan alguna diferencia en las corrientes de salida y/o de entrada. Por otro lado, la mutación T5M de la hCx30, presenta corrientes más pequeñas que la forma normal pero presenta el mismo tipo de inactivación. Además tiene una relación ATP/Carga-Entrada mayor que los hemicanales wild type ($p < 0.05$).

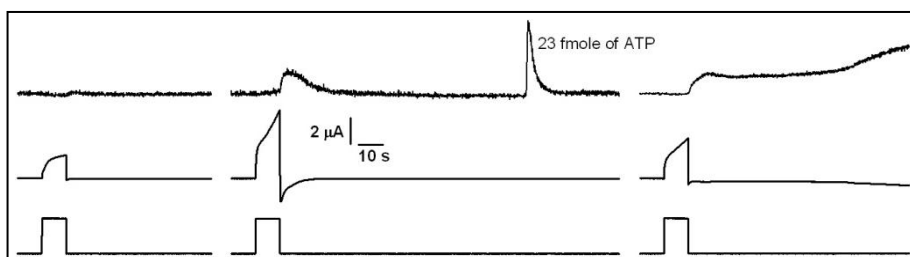


Figura S13 | Representación gráfica de la corriente y el ATP liberado por los hemicanales de hCx30 cuando son despolarizados en condiciones normales de Ca^{2+} . En la parte de la izquierda vemos un ejemplo donde no se libera ATP. En el medio vemos un ejemplo donde se libera transitoriamente ATP. Estos dos casos inactivan correctamente las corrientes de entrada. Finalmente el ejemplo de la derecha muestra como las corrientes de entrada no se inactivan conllevando a una liberación permanente de ATP.

Los hemicanales heteroméricos formados por mutaciones de la hCx26 y la hCx30 normal presentan una mortalidad en los oocitos muy elevada, haciendo que no tengamos datos suficientes de las combinaciones S17F/hCx30, D50N/hCx30 y D50Y/hCx30. Aún así, podemos afirmar que en los otros casos no se observan diferencias en la relación ATP/Carga-Entrada respecto a los hemicanales formados únicamente por hCx30. Además estos hemicanales, tampoco corrigen el número de oocitos que no inactivan las corrientes de entrada. Estos dos parámetros difieren del efecto que ejerce la hCx26 en los hemicanales formados por hCx26 y hCx30.

Finalmente los hemicanales formados por hCx26 y la mutación T5M de la hCx30 presentan corrientes de salida más pequeñas que las generadas por hemicanales de hCx30 ($p < 0.01$) o por los formados por hCx26/hCx30 ($p < 0.001$). Además, igual que sucedía con los hemicanales heteroméricos formados por mutaciones de la hCx26 y la hCx30 normal, esta combinación de conexinas no presenta diferencias con los hemicanales hCx26/hCx30 ni en la relación ATP/Carga-Entrada, ni en las proporciones de oocitos que no liberan ATP, ni en oocitos que

lo liberan transitoriamente ni en los oocitos que no inactivan sus corrientes de entrada.

DISCUSIÓN

1. Conexina hCx32

Teniendo en cuenta que la enfermedad de Charcot Marie Tooh ligada al cromosoma X está relacionada con mutaciones en la Conexina 32, hemos investigado la relación que puede tener esta proteína respecto a la permeabilidad para el ATP. El ATP puede comportarse como una señal autocrina necesaria para mantener la mielina. A lo largo de esta tesis hemos demostrado que la Cx32, ya sea la humana como la de ratón o rata, es permeable al ATP. Esta permeabilidad se da cuando los hemicanales son activados mediante diferentes estímulos aplicados usando diferentes técnicas:

- Estímulo eléctrico: en nervio ciático de rata, en nervio ciático de ratón y en oocitos de *Xenopus laevis*.
- Estímulo mecánico (presión o shock osmótico): en nervio ciático de ratón, en fibras sueltas de nervio ciático de ratón y en cultivos de células de Schwann.
- Estímulo químico (concentración baja de iones divalentes): en nervio ciático de ratón.

Hemos utilizado la técnica del TEVC para comparar la hCx32 con mutaciones de esta conexina que están relacionadas con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Esta técnica nos ha permitido determinar diferencias entre la forma normal de la hCx32 y las mutaciones en diferentes parámetros. Las mutaciones P87A, Δ 111-116 y R220X, forman hemicanales con una sensibilidad al voltaje diferente al de la forma normal. Esto hace que estas formas mutadas no

permitan el paso de iones ni sean permeables al ATP en las mismas condiciones que la forma normal. La mutación S26L forma hemicanales que permiten el paso de iones de manera parecida a la forma normal en cuanto a las corrientes de salida. Sin embargo, cuando comparamos las corrientes de entrada y la permeabilidad al ATP encontramos que en este caso están significativamente reducidas. En último lugar los hemicanales formados por la mutación D178Y no presentan diferencias ni en las corrientes ni en la cantidad de ATP liberada. Sin embargo, estudiando las cinéticas de los hemicanales formados por D178Y y los formados por la hCx32 normal, encontramos que el valor de τ de las corrientes de entrada y el "Rise Time" del ATP son diferentes ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente).

Estas diferencias encontradas en cada una de las mutaciones apoyan nuestra hipótesis de una liberación de ATP disminuida o anómala en las células de Schwann y podría ser la causa de la desmielinización de las fibras nerviosas.

2. Conexinas hCx26 y hCx30

Es posible que la permeabilidad a ATP sea una propiedad que presentan todas las conexinas cuando forman hemicanales. En este sentido, podría ser que otras conexinas en las que sus mutaciones están ligadas a algunas enfermedades puedan presentar variaciones en la forma y cantidad de ATP liberado. Las conexinas hCx26 y hCx30 están relacionadas con algunas formas de sordera congénita. Hemos investigado mediante la misma metodología empleada para el estudio de la hCx32, la relación entre activación dependiente de voltaje y la liberación de ATP.

Hemos demostrado que, usando el estímulo eléctrico, los hemicanales formados por hCx26 se abren y permiten el paso de ciertos iones registrando corrientes de entrada y de salida. Sin

embargo, el ATP no se cuenta entre los iones que son liberados a través de estos hemicanales.

La hCx30, en cambio, es permeable al ATP. Estos hemicanales, con todo, no presentan inactivación de las corrientes de entrada en muchos de los casos (50%). Este hecho y lo ya descrito en la literatura, nos hizo pensar en la posibilidad de co-exresar ambas conexinas (hCx26 y hCx30). En los registros obtenidos vemos una gran reducción en el número de oocitos que no inactivan las corrientes de entrada (19%) ($p < 0.05$). Asimismo, la relación ATP/Carga-Entrada es mayor que la de los hemicanales formados únicamente por hCx30.

De esta manera podemos afirmar que la hCx26, cuando forma hemicanales heteroméricos con la hCx30, regula la inactivación y la permeabilidad al ATP.

Las cinco mutaciones de hCx26 (G12R, S17F, D50N, D50Y y N54S) también han sido estudiadas de la misma forma que la hCx26. Todas con excepción de la N54S presentan liberación de ATP. Esta, sin embargo, permite un paso mayor de iones que la hCx26. Esto respalda la hipótesis de que una mala señalización purinérgica debida a una liberación de ATP diferente a la normal, puede ser una de las razones de la aparición de problemas auditivos cuando esta hCx26 está mutada.

Cuando la mutación probada ha sido la de la hCx30 (T5M), esta, aún presentando corrientes más pequeñas que la hCx30, libera el mismo ATP, hecho que se traduce con una relación ATP/Carga-Entrada mayor ($p < 0.05$). Además en esta mutación las proporciones de oocitos que no inactivan las corrientes son similares a las de la hCx30 normal. En este caso vemos diferencias en el patrón de liberación de ATP respecto a la forma normal de la hCx30. Esto también concuerda con la hipótesis de la causa de la sordera.

Todas las mutaciones de hCx26 han sido estudiadas cuando forman hemicanales heteroméricos con la forma normal de la hCx30, así como la mutación T5M de la hCx30 ha sido estudiada formando hemicanales heteroméricos con la forma normal de la hCx26. Sorprendentemente, estas combinaciones incrementan la mortalidad de los oocitos. Aún teniendo un número bajo de experimentos, hemos podido demostrar que estas mutaciones no ejercen el mismo efecto en la permeabilidad a los diferentes iones que ejerce la hCx26. Esto se traduce en que estos hemicanales no reducen el porcentaje de oocitos que no se inactivan. Además, estas mutaciones no reducen el valor de la relación ATP/Carga-Entrada que sí reduce la hCx26 cuando forma hemicanales con la hCx30. Estos datos también coinciden con la hipótesis de la deficiente señalización purinérgica como un motivo causante de la sordera, ya que la señal autocrina de supervivencia estaría sensiblemente dañada.

CONCLUSIONES

1. Conexina hCx32

- Los nervios ciáticos, in vitro, liberan ATP, según los estímulos aplicados
- La conexina 32 se localiza en las zonas paranodales de los nódulos de Ranvier.
- La liberación de ATP se localiza en las zonas paranodales de los nódulos de Ranvier.
- Las células de Schwann cultivadas expresan Cx32 de forma constitutiva y liberan ATP frente a estímulos mecánicos.

- La Cx32 expresada *in vitro* en oocitos de *Xenopus* es permeable al ATP al ser estimulados por pulsos cuadrados de voltaje. Las mutaciones de hCx32 relacionadas con CMTX (S26L, P87A, Δ 111-116, D178Y y R220X) que se han estudiado tienen inhibida su permeabilidad a ATP o alterado el curso temporal de la liberación de ATP. La hCx26 no es permeable al ATP frente a pulsos de voltaje.

2. Conexinas hCx26 y hCx30

- La hCx26 no es permeable al ATP en el modelo utilizado
- La hCx30 es permeable al ATP pero en muchos casos la corriente de entrada no se inactiva y queda permanentemente activa.
- La hCx26 cuando forma hemicanales hereoméricos con la hCx30 reduce el número de oocitos con corrientes permanentemente activadas y aumenta la permeabilidad al ATP
- Todas las mutaciones estudiadas de la hCx26 (G12R, S17F, D50N, D50Y y N54S) liberan ATP exceptuando la N54S.
- Las mutaciones estudiadas de la hCx26 presentan diferencias en las corrientes de entrada y/o salida, respecto a la hCx26 nativa.
- La mutación de la hCx30 (T5M) presenta corrientes más pequeñas, aumenta la relación ATP/Carga-Entrada y conserva el mismo tipo de inactivación que la hCx30 normal
- Las mutaciones de hCx26 y de hCx30 cuando forman hemicanales heteroméricos con las formas normales de la hCx30 y de la hCx26 respectivamente, no modifican la inactivación de las corrientes de cola de hCx30 ni aumentan la permeabilidad al ATP a diferencia de lo que hace la hCx26 normal.

