



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIA**

**PAPEL DEL CARBOXILO TERMINAL DE LA CONEXINA 43 EN LA
PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIADA POR
HEMICANALES**

JORGE CASTEX PÁEZ

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

Director de Tesis:

Profesor: Dr. Agustín Martínez

Co-director:

Dr. Isaac E. Garcia

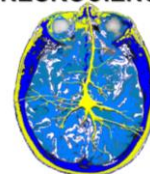
2018



**PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS, MENCIÓN
NEUROCIENCIAS**

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

Programa Magister
NEUROCIENCIA



Universidad de Valparaíso

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Coordinación de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que
la Tesis de Magíster presentada por el candidato**

JORGE CASTEX PÁEZ

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito
para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención
Neurociencia,
en el examen de defensa de Tesis rendido el 24 de Mayo de 2018**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Agustín Martínez Carrasco

Co-Director de Tesis:

Prof. Dr. Isaac García

Evaluadores:

Prof. Dr. Patricio Orio

Prof. Dr. Oliver Smachtenberg

A mi familia: lo más importante en mi vida. Sin ustedes esta Aventura no habría sido posible.

Gracias por su incondicional comprensión, apoyo y tolerancia.

.

AGRADECIMIENTOS:

A mi professor, Dr. Agustín Martínez, por su orientación y guía, necesarios para que este proyecto pudiera ver la luz, pero principalmente por su profunda humanidad que me acompañó y respaldó en todo momento.

No puedo dejar de agradecer el constante apoyo de todos los integrantes del laboratorio que tuve el privilegio de conocer, Ricardo Ceriani, Miguel Fuentes, Catherine Estay, Oscar Jara, Andrés Canales, Isaac García, Carolina Flores, Ana Abbott, Helmut Sanchez, Mauricio Reyna y particularmente a Jaime Maripillán, quien con su experiencia, innumerables consejos e infinita paciencia, ayudó a que este proceso llegara a buen Puerto.

INDICE

INDICE	III
ABREVIATURAS	V
LISTA DE FIGURAS Y ANEXO	VI
RESUMEN	VIII
SUMMARY	XI
I.- INTRODUCCIÓN	1
1) Formación y tráfico de Cxs a la membrana plasmática	4
2) Función de HCs	7
3) Regulación de la actividad de los HCs	8
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1) HIPÓTESIS	14
2) OBJETIVOS	14
2a) Objetivo general	14
2b) Objetivos específicos	14
III.- MATERIALES Y METODOS	15
1) Cultivo celular	15
2) Inmunocitoquímica	15
3) Obtención de ADN de Cx43Tr257 y Cx43Tr251	16
4) Transfección de células	17

5) Electroforesis y Western blot	17
6) Biotinilación de proteínas de superficie celular	18
7) Captación de colorante	19
8) Análisis estadístico	21
IV.- RESULTADOS	22
1) Cx43, Cx43Tr257 y Cx43Tr251 se encuentran en la membrana celular	22
2) Células HeLa que expresan Cx43 y sus variantes truncadas captan Etd, pero no los trazadores más grandes, en medio con cationes divalentes	25
3) Captación diferencial de trazadores de acuerdo a la extensión del CT en medio sin cationes divalentes	28
4) Los HCs formados por la Cx43Tr257 presentan una mayor permeabilidad a trazadores grandes que los HCs formados por la Cx43Tr251	30
V.- DISCUSIÓN	32
1) Inmunolocalización de Cx43 y sus variantes truncadas	32
2) Captación de marcadores de ácidos nucleicos en medio con cationes divalentes	34
3) Captación de marcadores de ácidos nucleicos en medio sin cationes divalentes	34
5) La captación de trazadores se correlaciona con la expresión de Cx43 y sus variantes truncadas en células HeLa	36

VI.- CONCLUSIONES	40
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

ABREVIATURAS

Cx: Conexina	HeLa y C6: Líneas de células cancerosas
UH: Unión en Hendidura	HP: HeLa Parenteral
HC: Hemicanal	ROS: Especies de oxígeno reactivo
Etd: Etidio	M: Molar
YP: Yo-pro-1	PKA: Proteína quinasa A
Prd: Propidio	PKC: Proteína quinasa C
Cx43tr257: Cx43 truncada en el C terminal desde el aminoácido 257	MAPK: MAP quinasa
Cx43tr251: Cx43 truncada en el C terminal desde el aminoácido 251	Src: Proteína quinasa
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico (complementario)	CK1 (p34 cdc2): Ciclina dependiente de quinasa
EL: loops extracelular	SDS/PAGE: Electroforesis denaturante
TM: región transmembranal	
ZO: Zonula Occludens	aa: Aminoácido
Å: Amstrong	Ser: Aminoácido serina
mARN: Ácido Ribonucleico (mensajero)	Asp: Aminoácido Aspártico
RE: Retículo endoplásmico	His: Aminoácido Histidina
Ca ²⁺ : Ión Calcio	HA: Hemaglutinina
PDZ: Dominio de la proteína ZO-1	PBS: Tampón Fosfato salino
CT: Región carboxilo terminal	GFP: Proteína Fluorescente verde
Cbx: carbenoxolona	Kpn 1 y Not 1: Enzimas de restricción
AMPc: AMP cíclico	PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
nm: nanometro	mA: Miliamper
ATP: Adenosín trifosfato	V: Volt
NAD ⁺ : Coenzima	TBS: Tampón tris salino
IP ₃ : Inositol trifosfato	SEM: Error estándar medio

LISTA DE FIGURAS Y ANEXO

FIGURAS:

Figura 1: Esquema que ilustra la estructura básica de las Cxs	2
Figura 2: Tráfico intracelular de Cx43	6
Figura 3: Representación topológica de Cx43	11
Figura 4: Gating de canales de Cx43 por interacción entre LC-CT	13
Figura 5: Expresión y localización subcelular de la Cx43 y variantes truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251 tranfectadas en células HeLa	23
Figura 6: Biotinilación de Cx43, Cx43tr257 y Cx43Tr251 en la membrana plasmática de células HeLa	24
Figura 7: Tasa de captación de Etd, YP, Prd en células HeLa (A), HeLa transfectadas con Cx43His (B), Cx43Tr257 (C) o Cx43Tr251 (D) en solución con cationes divalentes por 10 minutos	26
Figura 8: Promedio de las pendientes de captación de Etd y su bloqueo con 100 μ M de cbx en HeLa parenteral (HP), HeLa Cx43 (Cx43), y sus variantes truncadas (Cx43Tr257 y Cx43Tr251) en medio con cationes divalentes durante 10 minutos	27
Figura 9: Tasa de captación de Etd, YP y Prd en células HP (A), HP transfectadas con Cx43His (B), Cx43Tr257(C) o Cx43Tr251 (D) por 30 minutos en solución sin cationes divalentes	29

Figura 10: Promedio de las pendientes de captación para Etd (A), YP (B) y Prd (C) en células HeLa parenteral (HP), HeLa Cx43 (Cx43), y sus variantes truncadas (Cx43Tr257 y Cx43Tr251) en medio libre de cationes divalentes durante 30 minutos	30
Figura 11: Captación de Etd, YP y Prd en células HeLa que expresan Cx43Tr257 y Cx43Tr251 en la membrana plasmática es directamente proporcional a la fluorescencia total de GFP	31
Figura 12: Diagrama que ilustra un posible modelo de regulación química de la apertura y cierre de HCs de Cx43	39
ANEXO:	
Imagen complementaria de Biotinilación	50

RESUMEN

Los hemicanales (HCs) son estructuras hexaméricas formadas por conexinas (Cxs), que en la membrana celular forman canales presentando una baja probabilidad de apertura en condiciones de reposo; sin embargo, se abren bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas contribuyendo a los cambios en la permeabilidad de la membrana celular requeridas como vías de señalización y/o como parte de los mecanismos de muerte celular. El carboxilo terminal (CT) de la Cx43 posee una gran cantidad de dominios de interacción de proteínas y sitios de fosforilación que podrían jugar un rol importante en la regulación de los HCs. Por este motivo, se analizó el papel del CT en la permeabilidad de los HCs formados por Cx43. Para responder a estos objetivos se analizó el efecto de la eliminación del CT de la Cx43 a partir de las posiciones 257 (Cx43Tr257) y 251 (Cx43Tr251). Se utilizaron células HeLa transfectadas con Cx43, Cx43Tr257 y Cx43Tr251, y se determinó el grado de expresión y la localización de estas Cxs en la superficie celular por medio de la expresión de reportero GFP, inmunocitoquímica y biotilación de proteínas de superficie. Tanto la Cx43Tr257 como la Cx43Tr251 son detectadas en la membrana plasmática de las células, indicando que forman HCs libres. Sin embargo, ambas proteínas forman menos Uniones en Hendidura que la Cx43 silvestre, siendo mucho más escasas para la Cx43Tr251. Se evaluó el grado de permeabilidad de la membrana plasmática utilizando diferentes marcadores de ácidos nucleicos de distinto tamaño, encontrando que la permeabilidad de la membrana plasmática en células que expresan Cx43Tr257 y Cx43Tr251, es varias veces mayor que las células que expresan Cx43 silvestre. Estos resultados

sugieren que el CT de la Cx43 es esencial en la regulación de la actividad y/o permeabilidad de los HCs formados por Cx43.

SUMMARY

The hemichannels (HCs) are hexameric structures formed by connexins (Cxs), which in the cell membrane form channels that communicate the cytoplasm with the extracellular milieu. Under normal conditions, HCs present low open probability, however, under certain physiological or pathological conditions these channels open increasing the cell membrane permeability and signaling pathways, which, under extreme conditions, could activate cell death mechanisms. The carboxyl terminal (CT) of Cx43 has a large number of protein interaction domains and phosphorylation sites that could play important roles in the regulation of HCs. However, the role of Cx43 CT domain in the permeability of HCs is unknown. In order to respond to this question, I studied the effect of removing different portions of Cx43 CT domain on permeability and plasma membrane localization of HCs. HeLa cells were transfected with full length Cx43, or with Cx43 truncated at amino acid 257 (Cx43Tr257) or 251 (Cx43Tr251), and the degree of expression and localization of these Cxs on the cell surface was determined by means of GFP reporter expression, immunocytochemistry and biotinylation of surface proteins. Both Cx43Tr257 and Cx43Tr251 were detected in the plasma membrane, indicating that they form HCs at non-appositional cell membranes. However, both proteins form fewer Gap Junctions compared to that observed in cells transfected with normal Cx43, being much scarcer for Cx43Tr251. The degree of permeability of the plasma membrane was evaluated using different nucleic acid markers of different size, finding that the permeability of the plasma membrane in cells expressing Cx43Tr257 and Cx43Tr 251, is several times greater than cells expressing

wild Cx43. These results suggest that CT of Cx43 is essential in the regulation of the activity and / or permeability of the HCs formed by Cx43.

I.- INTRODUCCIÓN

Las células animales interactúan entre sí en complejas redes formadas por vías de comunicación independientes, incluyendo un sistema de señales paracrinas, y el contacto directo célula-célula (1). Un ejemplo de estas interacciones son los hemicanales (HCs) que comunican el citoplasma con el espacio extracelular, y los canales de unión en hendidura (UH), que se forman al unirse dos HCs de células adyacentes en las membranas de aposición celular, permitiendo de esta forma una comunicación intercelular directa entre las células.

Las conexinas (Cxs) son proteínas codificadas por una familia de genes y hasta el momento se han identificado 21 isoformas diferentes en humanos y 20 genes de Cxs en ratones (2). Cada una de las Cxs se denomina según su peso molecular teórico obtenido del ADNc para estas proteínas expresada en kilodalton (kDa), es así como la conexina 26 (Cx26) se caracteriza por pesar 26 kDa (2). Se unen en hexámeros formando HCs los cuales pueden estar constituidos por solo un tipo de Cxs (homoméricos) o bien por isoformas de Cxs diferentes (heteroméricos) (3); siendo la estructura primaria de las Cxs y/o proteínas asociadas las responsables de una u otra conformación (4). Diferentes tipos de Cxs son a menudo co-expresados en un tipo celular; por ejemplo astrocitos expresan predominantemente Cx43 pero también Cx30 y oligodendrocitos co-expresan Cx32 y Cx47 (5).

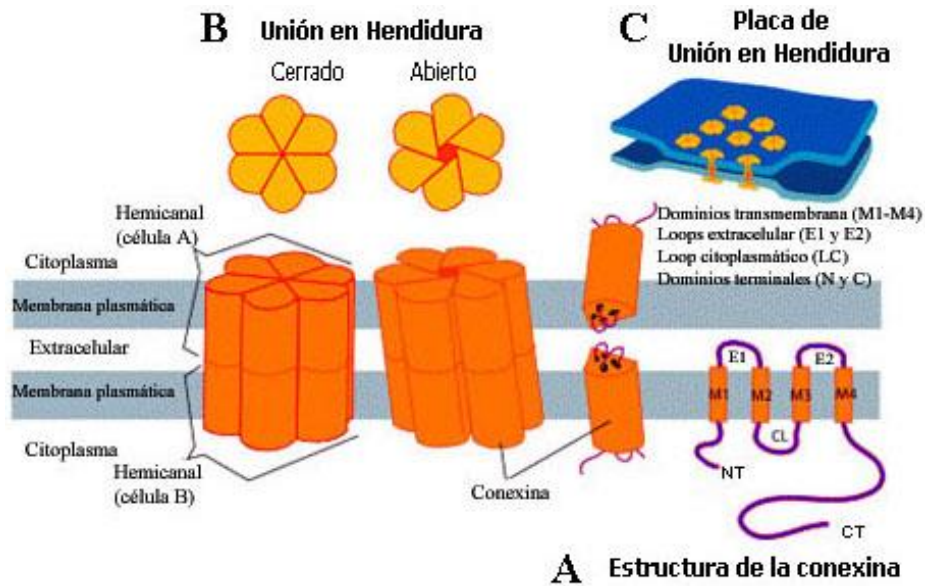


Figura 1: Esquema que ilustra la estructura básica de las Cxs (A), la organización topológica de la UH formada por la unión de dos HCs de células vecinas (B), y de una placa de UH (C). A.- La topología de Cxs consiste en cuatro dominios transmembrana (M1 al M4), dos asas extracelulares (E1 y E2) y un asa citoplasmática (LC). Tanto el amino terminal (NT) como el carboxilo terminal, (CT) se encuentran orientados hacia el citoplasma. B.- Cada HC está formado por seis Cxs que oligomerizan formando un poro, el cual puede abrirse o cerrarse de acuerdo a ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. C.- Varios canales intercelulares se agrupan en las membranas de aposición celular para formar una placa de UH. Extraído de www.answers.com/topic/connexin.

Las Cxs comparten una arquitectura que es común a todas ellas (figura 1). La región extracelular está compuesta por dos asas extracelulares (E1 y E2) conteniendo alrededor de 31 y 34 aminoácidos respectivamente. Estos dominios son altamente conservados y covalentemente conectados por tres residuos de cisteínas unidas por uniones disulfuros, esenciales para formar la estructura terciaria, e involucrados en el acoplamiento entre Cxs de células adyacentes para la formación de una UH. La región transmembranal posee cuatro dominios (M1 al M4) con una conformación α -hélice, los cuales son responsables del acoplamiento a la membrana plasmática. Los dominios transmembrana M1, M2 y M4 contienen principalmente residuos aminoácidos hidrofóbicos, mientras que M3 contiene residuos aminoácidos cargados positiva y negativamente, otorgándole una cara hidrofílica

al poro del canal. Por último presentan tres dominios intracelulares correspondientes a la región amino terminal (NT), un asa intracelular o citoplasmática (LC) que se encuentra entre M3 y M4 y el dominio carboxilo terminal (CT) (1,3,5–8). Estos tres dominios intracelulares son diferentes entre las Cxs, exhibiendo el LC y sobre todo el dominio CT, una amplia variedad en tamaño y composición aminocídica, lo cual es especialmente importante en la interacción proteína-proteína (3,4). Estos dominios contienen zonas que participan tanto en uniones inter e intramoleculares, induciendo en algunos casos cambios conformacionales que proporcionan un mecanismo para la regulación de los canales (5).

Aunque hay probablemente algunas variaciones estructurales entre las isoformas de las Cxs, una visión común es que las áreas que contribuyen a la formación del poro del canal son E1 en el extracelular; M1 en el espacio transmembrana; el NT y/o LC en el lado citoplasmático del poro (9).

En 1999 Unger y sus colaboradores, demostraron mediante electro cristalografía, que la unión de dos HCs forman las UHs; presentando cada HC un diámetro externo de ~ 70 Å en la región intracelular y de ~ 50 Å en la región extracelular; mientras que el poro del canal presentó un diámetro de ~ 40 Å en el lado citoplásmico y ~ 15 Å en la cara extracelular de la membrana celular.

El apareamiento entre dos conexones es un ejemplo notable de una alta afinidad en la interacción proteína-proteína, ya que cuando una UH recién formada se abre, no hay pérdida de iones hacia el espacio extracelular. Este cierre hermético en condiciones normales es irreversible debido a los cambios conformacionales que se producen en la unión de los HCs (5).

Las UHs están ampliamente distribuidas en las células de los vertebrados, tanto en el desarrollo como en diferentes tejidos de un organismo adulto, a excepción de espermatozoides, eritrocitos, trombocitos y en el músculo esquelético adulto (6,8). La comunicación a través de las UHs parece ser crítica en el desarrollo de los organismos, ya que ratones que carecen de Cx26 y Cx45 mueren en el útero, ratones hembras que carecen de Cx37 son infértiles y ratones deficientes de Cx43 mueren rápidamente después del nacimiento (7).

1) Formación y tráfico de Cxs a la membrana plasmática

La formación y degradación de HCs y UH (figura 2) son procesos muy dinámicos, reportándose una vida media de las Cxs de solo unas pocas horas en cultivo celular y en tejidos (4,10). Como la mayoría de las proteínas integrales de membrana, la biosíntesis de las Cxs comienza con los mRNAs que dejan el núcleo y son trasladadas al retículo endoplásmico rugoso. Sin embargo, dependiendo del subtipo de Cx, la oligomerización para formar HCs puede ocurrir ya sea en los compartimientos intermedios entre RE y Golgi como la Cx32, o como en el caso de la Cx43 que oligomeriza en el Golgi trans (3,4,10).

Durante la exportación hacia la membrana celular los HCs permanecen cerrados, debido posiblemente a un gradiente en los niveles de Ca^{2+} generado por la separación de endomembranas y mantenidos por un grupo de receptores y bombas de iones (1); siendo liberados dentro de vesículas transportadoras, las cuales pueden viajar a través de dos vías: microtúbulos o filamentos de actina (3,4). Ambas vías también participan en el movimiento

de estos canales dentro de la membrana plasmática y de regreso al interior de la célula para su posterior degradación (4).

Al llegar a la membrana plasmática los HCs pueden permanecer transitoriamente libres en la superficie de la célula en balsas de lípidos (subdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingomiélin) o bien pueden dirigirse directamente a las zonas de aposicionamiento celular en donde se acoplan con HCs de células adyacentes para formar UHs (figura 2). La aglutinación de muchos de estos canales forman las placas de UHs caracterizadas por formas geométricas (3,4,8). Estas estructuras son muy dinámicas, agregándose permanentemente canales en los bordes de las placas, proceso que es balanceado por la continua remoción de UHs desde el área central. El número de UHs en las placas, varía enormemente de unos cuantos canales hasta 200.000 como en el órgano de Corti del oído interno (11); sin embargo, en la mayoría de los tejidos este número es mucho menor.

La degradación de la UH desde la membrana celular, ocurre a través de su internalización por múltiples métodos, incluyendo endocitosis y la formación de doble membrana denominada UHs anulares o conexomas, los cuales son llevados hasta lisosomas o proteosomas para su posterior degradación (figura 2). La regulación de estos procesos, o por qué una vía degradativa podría predominar sobre la otra aún no se ha esclarecido, pero parece ser dependiente del tipo celular específico, ya que en el mismo tipo celular, el método utilizado podría depender del estado metabólico-patológico de la célula (3,4,10).

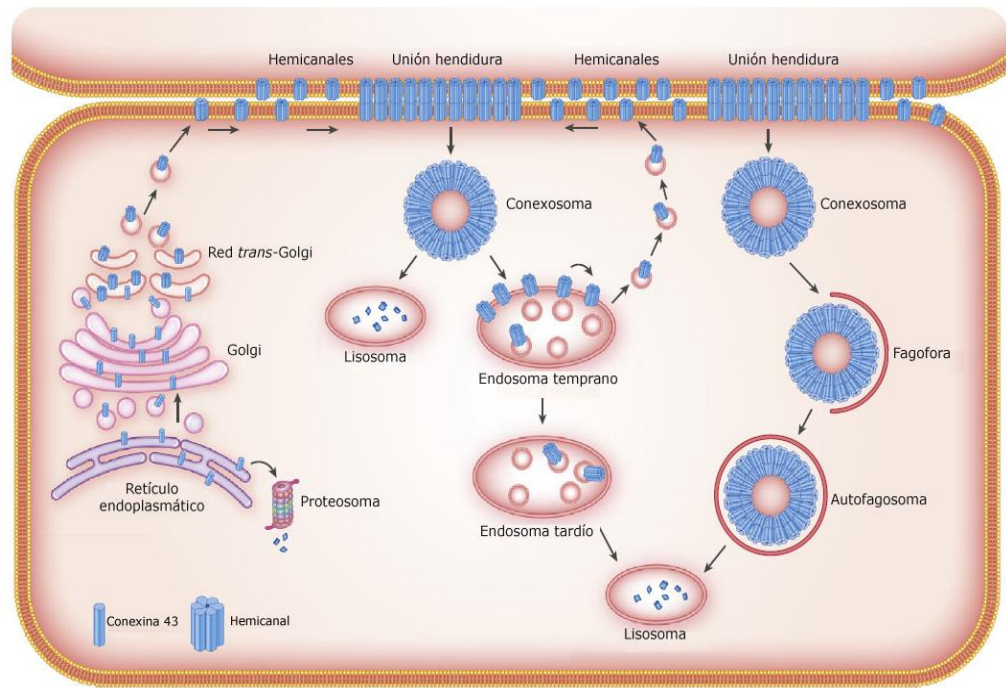


Figura 2: Tráfico intracelular de Cx43. Cx43 es insertada en el retículo endoplasmático. Un grupo de Cx43 puede ser enviado a degradación protosomal. Las Cx43 no destruidas son transportadas al aparato de Golgi. La oligomerización de la Cx43 en HCs ocurre después de la salida del retículo endoplasmático, probablemente en la red Golgi trans. Las vesículas que contienen HCs son dirigidas hasta una región de no aposicionamiento celular de la membrana plasmática, continuando con su difusión lateral en la bicapa lipídica hasta fusionarse con los bordes de las UHs existentes. Ahí se unen con HCs de células adyacentes para formar canales de UHs. Los más antiguos son eliminados del centro de la placa por endocitosis; durante la cual ambas membranas son internalizadas en una de las células adyacentes formando conexosoma. Estos pueden fusionarse directamente a lisosoma o enviados a las vías endolisosomal y autofagosomal. La primera vía involucra el envío de la Cx43 a endosoma temprano (donde puede ser reciclada hacia la membrana celular) y endosoma tardío, antes de su degradación lisosomal. La vía autofagosomal involucra la formación de una estructura de doble membrana conocida como fagofora que al cerrarse forma un autofagosoma. Este luego se fusiona con lisosomas. El CT de la Cx43 tiene un importante rol en la modulación de la endocitosis de las UHs y en la tasa de degradación de la Cx43. Extraído de Leithe (12).

La exportación de los HCs a la membrana plasmática, su tráfico, ensamble para formar UHs, la apertura, cierre y degradación de estos canales, se encuentran reguladas por modificaciones postranslacionales de las Cxs e interacciones con otras proteínas (7,10); por lo que es de gran importancia en el análisis de las funciones de los HCs establecer donde y con qué proteínas accesorias se asocian estando en la membrana plasmática o durante el

tránsito hacia ésta. En el caso de la Cx43, el dominio CT interactúa con varias proteínas intracelulares tales como ocludina, claudina, tubulina, drebrina, p120 catenina, CIP150, integrina $\alpha 5$, calmodulina, y el segundo dominio PDZ de ZO-1 (1).

2) *Función de HCs*

Hasta hace algunas décadas atrás se pensaba que los HCs solo se abrían cuando formaban parte de las UHs (3); sin embargo, en 1991 Paul y colaboradores, describieron por primera vez la apertura de HCs en ovocitos de *Xenopus* transfectados con Cx46, dando como resultado el hinchamiento y posterior muerte de estas células en un medio con baja concentración de Ca^{2+} . Este descubrimiento ha atraído creciente interés sobre el rol que cumplen los HCs cuando se encuentran en la membrana plasmática previa incorporación en las placas de UH, debido a su importancia en fisiología (1); ya que si la apertura es lo suficientemente breve y/o controlada en células normales, los HCs pueden ser beneficiosos, suministrando un mejoramiento en la comunicación intercelular a través de una vía paracrina en la liberación o captación de moléculas e iones.

Varios métodos han sido utilizados para investigar los HCs; algunos de estos sirven para identificar y caracterizar las subunidades de los HCs, como la inmunofluorescencia, biotilación de proteínas de superficie celular asociado con inmunoblot, microscopía electrónica y de fuerza atómica. Otros métodos como la electrofisiología (13) variación en la concentración de Ca^{2+} extracelular (14,15), liberación y captación de moléculas fluorescentes como Etd, amarillo lucifer (AL), Fura-2 y sustancias mensajeras como ATP, NAD^+ , AL y glutamato (1,13) han servido para detectar y caracterizar las funciones de los

HCs, incluyendo el intercambio de iones, pequeñas moléculas menores a 1 kDa como aminoácidos individuales, segundos mensajeros (Ca^{2+} , IP_3 , AMPc) y otros metabolitos (3,7,16,17), la regulación de varios procesos fisiológicos como la liberación de ATP y la propagación de las ondas de Ca^{2+} en células gliales (17,18), compensar la pérdida de comunicación mediada por UH durante la división celular, estrés metabólico, regulación del volumen celular, captación de ácido ascórbico y PEG; o en células epiteliales pigmentadas, donde los HCs de Cx43 juegan un rol en la retinogénesis y proliferación celular a través de la liberación de ATP, contribuyendo en la diferenciación de la retina neuronal (19). No obstante, estas funciones no se encuentran o están muy reducidas en líneas celulares que no expresan Cxs, como células HeLa y C6 (20).

La deficiencia o inapropiada función de estos canales ha sido asociada con la patogenia de ciertos desordenes como sordera producida por mutaciones en el gen de la Cx26, cataratas debido a la mutación de la Cx50, enfermedad de la piel denominada eritrokeratodermia asociada a defectos en los genes que codifican para Cx26, Cx30.3 y Cx31, la enfermedad de Charcot-Marie Tooth relacionada con la mutación de la Cx32, la cual resulta de la desmielinización de las células de Schwann que rodean los nervios periféricos, e incluso podrían aumentar el estrés metabólico y llevar a la muerte celular (1,7,21,22).

3) *Regulación de la actividad de los HCs*

Al igual que en las UHs, diferentes factores pueden regular el cierre o apertura de los HCs. Es así como se ha observado el cierre de HCs debido a una acidificación del

medio intracelular, potenciales de membrana negativos o después de la aplicación de bloqueadores de UH como Lantano (La^{3+}), octanol, heptanol, 18- α y 18- β ácido glicirretínico, carbenoxolona, oleamida y halotano.

A su vez diferentes condiciones fisiológicas pueden aumentar brevemente la probabilidad de apertura de HCs en variados tipos celulares. Ejemplo de esto se ha observado con estímulos mecánicos (23), factores de crecimiento, cambios en el estado de fosforilación de HCs (20), bajo potencial redox intracelular (24), y alcalinización extracelular (25). También se ha observado aumento anormal en la probabilidad de apertura de los HCs en eventos patológicos como la inhibición metabólica producida por isquemia, debido a sustancias que inducen inflamación como lipopolisacáridos, especies reactivas de oxígeno (ROS) (3,5,20,25), y S-nitrosilación de los residuos de cisteína que se encuentran en el lado citoplasmático de los HCs (26), generando un colapso del gradiente electroquímico, pérdida de valiosos metabolitos, recursos energéticos, moléculas de segundos mensajeros difusibles y posible muerte celular (20,22).

Otro factor que puede regular la actividad de los HCs es la concentración intra y extracelular de Ca^{2+} . En este sentido se ha observado una respuesta bimodal de los HCs de Cx43 a la concentración de Ca^{2+} intracelular; es decir, a concentraciones en torno a los 500 nM hay un aumento en la apertura de los HCs, pero se cierran cuando aumenta esta concentración (23,27). En cambio, a concentraciones extracelulares fisiológicas los HC se encuentran cerrados presentando una baja probabilidad de apertura, pero una disminución en esta concentración puede aumentar la probabilidad de apertura de los HCs (14,28). Así, a través de HCs en condiciones de cero Ca^{2+} extracelular, se produce captación de moléculas menores a 1 kDa como marcadores de ácidos nucleicos (29), liberación de ATP

tanto en astrocitos (30) como en células C6 (31) y liberación de glutamato en astrocitos en cultivo (32). Sin embargo, de mantenerse esta condición, comienza el proceso de muerte celular observado en astrocitos (22) y cardiomiocitos (33) entre otros. Esto indicaría que la actividad de los HCs puede determinar la extensión del daño celular en los tejidos (34).

Los dominios extracelulares hidrofóbicos son áreas claves en la regulación de los cambios conformacionales dependientes de Ca^{2+} permitiendo la apertura o cierre de los HCs (1,3,20); como lo sugieren estudios realizados en Cx32, donde se ha descubierto que el dominio sensitivo al cual se une el Ca^{2+} , parece ser un anillo de 12 residuos de Asp en el vestíbulo externo del poro del HC (28). Asimismo, recientes estudios realizados en cristalografía (35) y dinámica molecular de la Cx26 humana (36), indican que cerca de la entrada extracelular del poro de todas las Cxs, existe una red electrostática altamente conservada que presenta residuos cargados negativamente, jugando un rol crítico en el gating de los HCs y para la unión del Ca^{2+} (37).

Uno de los elementos más estudiados en la regulación de la actividad de los canales es el estado de fosforilación de las Cxs en la membrana plasmática (3); siendo el CT la principal región que es fosforilada, aunque la Cx56 puede ser fosforilada en éste dominio como en el LC. Sin embargo, no se ha informado de posibles sitios de fosforilación en la región NT. La única Cx que no es fosforilada es la Cx26, lo cual puede deberse a que es la más corta y solo posee unos pocos aminoácidos en el CT; sin embargo, puede formar UHs funcionales, lo que indicaría que la fosforilación no es necesaria para la formación e inserción de estos canales (7).

Una de las Cxs expresadas con mayor distribución en los animales y más extensamente estudiada es la Cx43 (figura 3), la cual esta presente en al menos 34 tejidos

diferentes y 46 tipos celulares. Esta proteína posee una región CT constituida por aproximadamente 155 aminoácidos y contiene importantes sitios de unión a proteínas y de fosforilación, donde actúan quinasas como PKA, PKC, CK1, MAPK y Src, pudiendo regular la actividad de las Cxs (1,3,10); ya que al agregarles una carga negativa del fosfato, podría afectar la permeabilidad de iones a través del poro, alterar la estructura de la alfa hélice transmembrana que influencia el tamaño del poro, o modificar la afinidad de unión de molecular involucradas en la regulación de la Cx43 (38).

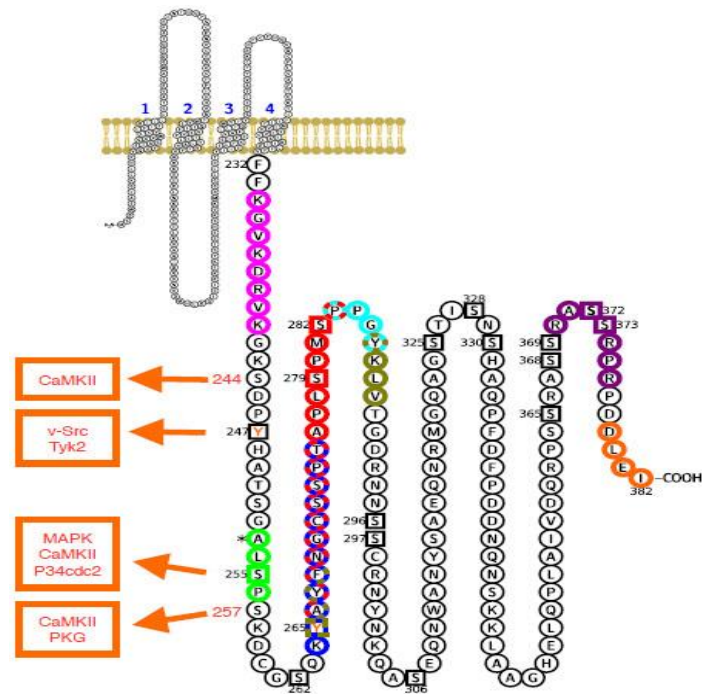


Figura 3: Representación topológica de Cx43 con detalles de los sitios específicos de fosforilación, sitios de interacción a proteínas y los motivos implicados en la degradación de la Cx43. Los sitios de unión a diferentes proteínas, son indicados por diferentes colores: Tubulina (violeta), CIP85 (verde), Debrina (azul), c-Src (rojo), NEDD4 (celeste), AP-2 (verde oscuro), 14-3-3 (morado), ZO-1 (anaranjado). Además en recuadro se muestran las enzimas que actúan en cuatro sitios de fosforilación desde el comienzo del CT hasta el aminoácido 257. * El aminoácido en posición 253 en humanos es alanina, en cambio en ratón y rata es prolina. Extraído de Leithe (12).

Es así como la apertura de los HCs de Cx43 inducidos por baja concentración de Ca^{2+} extracelular, puede bloquearse por activación de una vía dependiente de PKC, sugiriendo la participación de fosforilación de proteínas como un mecanismo que mantiene el HC cerrado (3). De hecho, cuando la Ser 368 de la Cx43, es fosforilada por PKC, se producen cambios conformacionales que resultan en una disminución en la permeabilidad de los HCs (39). Así mismo, al agregar cargas negativas al CT, la fosforilación contribuiría a la interacción entre este dominio y la región L2 (aa 119- 144) del LC, la cual posee un segmento de aminoácidos cargado positivamente, que pueden servir como un dominio receptor del CT (40,41).

La interacción entre el CT y LC fue propuesta como un modelo de cierre de las UHs en respuesta a la acidificación intracelular, denominado “bola y cadena” (42); sin embargo, esta misma interacción genera el efecto opuesto en HC de Cx43 produciendo un estado “disponible para abrirse” (Figura 4), ya sea por estímulos eléctricos o químicos (43). Esta capacidad de actuar en forma contrapuesta entre UHs y HCs, se ha observado anteriormente para lipopolisacáridos, citoquinas y factores de crecimiento (22,31,34,44), y sería parte de un delicado equilibrio para mantener la homeostasis y comunicación intercelular.

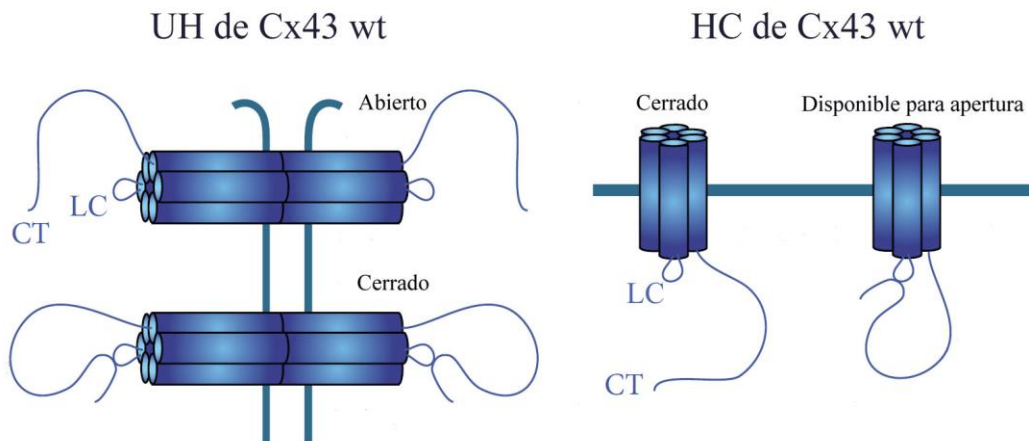


Figura 4: Gating de canales de Cx43 por interacción entre LC-CT. El CT de Cx43 está intrínsecamente involucrado en el gating de HCs y UHs. En condiciones normales las UHs están abiertas cuando el CT no interactúa con el LC. El cierre de las UHs ocurre cuando el CT se une al LC. Por el contrario, se ha propuesto que la interacción entre CT y LC, lleva a los HCs a un estado "disponible para apertura", mientras en la ausencia de tal interacción los HCs permanecen cerrados. Extraído de De Bock (43)

Para entender la regulación funcional de los canales de Cxs, se han realizado estudios con Cx43 truncada en el CT, encontrando que esta proteína es capaz de llegar a la membrana plasmática y formar UHs funcionales (45,46), pero estos manifiestan propiedades electrofisiológicas y de permeabilidad diferentes a los formados por Cx43 silvestre (7). Es así como al estudiar la formación de placas de UHs en Cx43 utilizando truncadas en los aminoácidos Ser-257 y Tir-251, se encontró que las células que expresan esta última variante presentan una limitada transferencia de la célula microinyectada con Amarillo Lucifer a las vecinas, lo cual indicaría que el CT es fundamental en la formación y permeabilidad de los canales de Cx43 (47).

Muchos trabajos se han realizado para entender el mecanismo de apertura y cierre de las UHs, sin embargo, el conocimiento del funcionamiento del HC de esta Cx no está completamente esclarecido. Estudios recientes (29) han mostrado la cinética de la

permeabilidad de los HCs de Cx43 a ciertos marcadores de ácidos nucleicos como Etd, DAPI y Prd en soluciones libres de cationes divalentes; sin embargo, poco se conoce sobre el papel del CT en regular la permeabilidad de estos HCs. El presente estudio pretende aportar mayor conocimiento con el fin de esclarecer cuál es el rol que cumpliría el CT de la Cx43 en la permeabilidad de los HCs insertos en la membrana plasmática.

En base a estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1) Hipótesis

El CT de la Cx43 juega un rol importante en la regulación de la permeabilidad de la membrana plasmática mediada por HCs formados por Cx43

2) Objetivos

2a) Objetivo general

Estudiar la permeabilidad de la membrana plasmática mediada por HCs formados por Cx43 o por Cx43 truncadas en diferentes posiciones del CT en células HeLa.

2b) Objetivos específicos

1.- Determinar el grado de permeabilidad de la membrana plasmática mediada por HCs en células HeLa transfectadas con ADNc de la Cx43 o sus variantes truncadas en el aminoácido 251 o 257, a través de la captación de diferentes moléculas marcadoras de ácidos nucleicos.

2.- Determinar niveles de Cx43 normal y sus variantes truncadas en la membrana plasmática, mediante biotinización de proteínas de membrana.

III.- MATERIALES Y METODOS

1) Cultivo celular: Se utilizaron células HeLa establemente transfectadas con Cx43 de rata (HeLa Cx43) y células transitoriamente transfectadas con Cx43 truncada en el aminoácido 257 del CT (HeLa Cx43Tr257) y truncada en el aminoácido 251 de dicho extremo (HeLa Cx43Tr251), realizadas en el Laboratorio de Conexinas del Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. El nivel de expresión de las truncadas, fue confirmado por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpo policlonal de conejo. Como control se usaron células HeLa parentales (HP) que no expresan Cxs o HeLa Cx43. Para su identificación inmunológica el constructo de ADNc de Cx43 cuentan con el epitope His y las truncadas con el epitope hemaglutinina (HA; 9 aminoácidos), ambos unidos al CT.

Las células HeLa fueron mantenidas en medio MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO) a pH 7.2 suplementado con 10 % suero fetal bovino (Biological Industries), L-Glutamina 2 mM (Hyclone), aminoácidos esenciales y Penicilina-estreptomicina 1X (Invitrogen), en incubadora a 37°C con una mezcla de 5% de CO₂ y cerca de un 100% de humedad relativa. Las células crecieron hasta confluir en un 50% a 60% para la realización de los experimentos.

2) Inmunocitoquímica: Las células transitoriamente trasfectadas con DNAc de Cx43HA, Cx43Tr257HA y Cx43Tr251HA, se sembraron en placas con cubreobjetos para que se

adheran a éstos; fijándolas posteriormente con una solución de PBS 1X más Paraformaldehído al 4% y lavadas con PBS 1X. A continuación se agregó solución permeabilizadora (PBS 1X con 1% Tritón X-100) por 30 minutos, reemplazándola por solución bloqueadora de sitios inespecíficos (sol. permeabilizadora más 2% de Suero Normal de Cabra) por 30 minutos. Luego las células se incubaron con anticuerpo primario (ver tabla anticuerpos) en cámara húmeda por 12 hrs a 4 °C. Posteriormente las células se lavaron con solución permeabilizadora y se incubaron con anticuerpo secundario policlonal conjugado con fluoróforo (ver tabla anticuerpos) en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Las células fueron lavadas con solución permeabilizadora, montándose finalmente los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio, con medio de montaje (Dako). Una vez secos se pudieron observar al microscopio de fluorescencia invertido Eclipse TE2000-U (Nikon), y luego se obtuvieron imágenes mediante una cámara CCD (DS- MBWc Nikon).

Tabla Anticuerpos

Primarios	Marca	Dilución para inmunocitoquímica
Rabbit anti Cx43	Sigma	1:500
Rabbit anti HA	Invitrogen	1:500

Secundarios		
anti-Rabbit IgG-Cy2	Jackson ImmunoResearch	1:1000
anti-Rabbit IgG-Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:1000

3) Obtención de ADN de Cx43Tr257 y Cx43Tr251: Los ADNc circular de Cx43Tr257 y Cx43Tr251 se fusionaron por separado con pTracer-CMV2 (Invitrogen), un vector que

contiene la información para expresar la proteína fluorescente verde (GFP) al introducirse al material genético de las células HeLa; y de esta forma poder visualizar y evaluar en los experimentos solo aquellas células que efectivamente se transfectaron. Para esto se utilizaron las enzimas de restricción Kpn I y Not I, con las cuales se liberaron las secuencias de las proteínas del vector pcDNA3.1 y se aislaron realizando extracción del gel mediante kit de extracción QIA quick n° cat 28704. Al mismo tiempo se abrió el vector pTracer con las mismas enzimas señaladas anteriormente, para luego efectuar la unión con el ADN de las proteínas de interés. Esto se envía a secuenciar para tener la seguridad que la inserción del material genético fue exitosa.

4) *Transfección de células:* Células HeLa se transfectaron en forma transitoria según el protocolo descrito para “Lipofectamine 2000” (Invitrogen) con una concentración apropiada de ADNc circular de Cx43Tr257, Cx43Tr251. A las 24 horas de realizada la transfección se pudieron llevar a cabo ya sea las biotinizaciones o los experimentos.

5) *Electroforesis y Western blot:* Placas con células HeLa crecieron hasta un 70% de confluencia y luego transfectadas. Posteriormente fueron cosechadas y lisadas en frío midiendo posteriormente la concentración de proteínas totales. Para realizar electroforesis (SDS-PAGE) se preparó gel resolvidor al 12% y gel apilador al 5% siguiendo los protocolos descritos en minigeles (BioRad), corriéndolo a 90 V por dos horas. Posteriormente se efectuó un Western blot, en el cual las proteínas fueron electrotransferidas desde el gel a una membrana de PVDF (Amersham) en una cámara semiseca (BioRad) a 17 V y 300 mA por una hora. A continuación la membrana se trató

con solución bloqueadora (Tampón TBS 1X, 0.1% Tween 20 y 8% leche descremada) incubándose a temperatura ambiente y agitación durante una hora. Luego la membrana se incubó con anticuerpo primario tres horas a temperatura ambiente con agitación o toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana fue lavada con Tampón TBS 1X con 0.1% Tween 20, varias veces con el fin de descartar el exceso del anticuerpo primario que no se unió. A continuación se incubó la membrana con anticuerpo secundario conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) una hora a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, se lavó con Tampón TBS 1X con 0.1% Tween 20, cinco veces. Para la detección de los anticuerpos la membrana fue incubada con ECL Plus (Amersham) en oscuridad, visualizando las marcas en una cámara de transiluminación digital conectada a un computador con el programa Labworks 46.

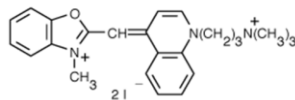
6) Biotinilación de proteínas de superficie celular: Células HeLa fueron incubadas hasta alcanzar la confluencia deseada y transfectadas con el ADN de interés. Luego se lavaron con PBS frío sobre hielo, para posteriormente incubarlas en PBS con EZ-link Sulfo- NHS – LC- Biotin (PIERCE) (0,5 mg/ml) a 4°C. Las células así biotiniladas se lavaron con PBS frío más 15 mM de glicina, para saturar los sitios de unión de biotina libre, cosechándolas y lisándolas; determinando posteriormente la concentración de proteínas mediante fluorómetro Qubit (Invitrogen). A continuación las proteínas biotiniladas fueron precipitadas con estreptavidina-agarosa (ThermoScientific) por 30 minutos a 4°C en agitación y centrifugadas, rescatando el sobrenadante que constituye la fracción no biotinilada en otro tubo. El pellet se lavó con PBS y 0,25% Tritón X-100 más inhibidores de proteasas y fosfatasa en frío y luego con PBS frío sin detergente. A los tubos que

contenían las fracciones biotiniladas y no biotiniladas, se les agregó tampón de carga con 5% de β -mercaptoetanol y se hirvió a 95 °C por 3 minutos. De esta forma las muestras quedaron aptas para electroforesis y Western blot.

7) Captación de colorante: Para observar la cinética de difusión a través de la membrana plasmática en células HeLa Cx43 y sus variantes truncadas, se utilizó: YOPRO, yoduro de Propidio y bromuro de Etidio. Estos marcadores emiten fluorescencia al interactuar con ácidos nucleicos. La membrana plasmática intacta es impermeable a estos marcadores, pero son capaces de pasar a través de HCs. Así mismo, estas moléculas poseen características distintivas como peso, forma, carga y espectro de absorción y emisión.

1.- YOPRO (YP) (Invitrogen): Molécula trazadora impermeable a la membrana plasmática, que al estar en contacto con ADN se une a éste permitiendo el análisis de células apoptóticas sin interferir con la viabilidad celular. Posee un espectro de absorción a 491 nm y de emisión a 509 nm.

Formula Molecular: $C_{24}H_{29}I_2N_3O$

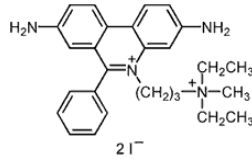


Peso Molecular: 629.32 Da

2.- Yoduro de Propidio (Prd) (Invitrogen): Molécula trazadora que se puede unir al ADN y ARN, es menos permeable a la membrana plasmática que el bromuro de Etidio, aunque

ambos son generalmente excluidos de las células viables. Es estructuralmente similar al bromuro de Etidio. Posee un espectro de absorción a 535 nm y de emisión a 617 nm.

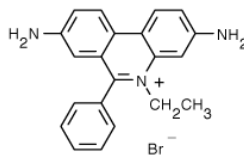
Formula Molecular: $C_{27}H_{34}I_2N_4$



Peso Molecular: 668.40 Da

3.- Bromuro de Etidio (Etd) (Invitrogen): Molécula trazadora que se puede unir al ADN y ARN. Es impermeable a la membrana plasmática y excluido de las células viables. Posee un espectro de absorción a 518 nm y de emisión a 605 nm.

Formula Molecular: $C_{21}H_{20}BrN_3$



Peso Molecular: 394.31 Da

Antes de realizar registros, las células en placas fueron lavadas con una solución con Ca^{2+} (Ham-F12) y durante el período de registro control las células se mantuvieron en Ham-F12 más las moléculas marcadoras (YP, Prd o Etd) por 10 min. Para el segundo período de registro de 30 min, se indujo la apertura de los HCs lavando la misma placa varias veces con la solución salina balanceada de Hank's (libre de cationes divalentes), añadiendo por último Hank's con las moléculas trazadoras (YP, Prd o Etd). Como

bloqueador de la captación a través de HCs, se utilizó carbenoxolona (cbx) a una concentración de 100 μ M. Con el fin de visualizar la señal fluorescente de YP, Prd y Etd, se utilizaron filtros de epifluorescencia FGP (R)- LP (excitación 450-490 nm.), G-2A (excitación 510-560 nm.) y TRITC (excitación 545-565 nm.), respectivamente.

En ambos períodos de registro se obtuvieron imágenes cada un minuto en un microscopio invertido Eclipse TE2000-U (Nikon) equipado con una cámara digital Nikon (DS- MBWc) y el programa ACT-2U (Nikon), todo esto en cuarto oscuro.

En cada experimento se eligieron células de similar tamaño y forma; así las fluorescencias obtenidas fueron cuantificadas en unidades arbitrarias (U.A.) y analizadas mediante el programa “Image J”. La representación de los datos y visualización gráfica de los cambios de intensidad de fluorescencia de las células examinadas a través del tiempo, fue realizado por el programa Excel de Microsoft. Con el fin de estandarizar los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos, se calculó la razón de Intensidad de Fluorescencia (R1/R0), por medio del programa Origin 6.0 de Microcal.

8) *Análisis estadístico:* Para cada grupo de datos, los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar medio (SEM) y n expresa el número de experimentos independientes. En cada grupo analizado se comparó con el control respectivo y el nivel de significancia se determinó usando *t*-test. Las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$. Los cálculos estadísticos fueron realizados usando Microsoft Excel y Origin 6.0 de Microcal.

IV.- RESULTADOS

1) Cx43, Cx43Tr257 y Cx43Tr251 se encuentran en la membrana celular

Para determinar la presencia y localización intracelular de Cx43 y sus variantes truncadas, se realizó inmunocitoquímica, western blot y microscopía Confocal (figura 5). Estos análisis indicaron que las células transfectadas expresaron la Cx43 y sus variantes truncadas (A); sin embargo, la proporción de células que expresaban Cx43Tr251 era menor. Lo anterior se ve reflejado en el western blot que indica que la Cx43Tr251 muestra menores niveles de expresión. Debido al corte del CT, las variantes truncadas pesan mucho menos que la Cx43 (Cx43Tr257, 30 KDa y Cx43Tr251, 29,4 KDa aproximadamente), cuyas señales se ven reflejadas en el western blot (B).

La localización inmunocitoquímica (C) de la Cx43, al igual que lo publicado anteriormente (47,48), se encontró principalmente en la membrana de aposición formando placas de UHs (a). La Cx43Tr257 (b) se encontró tanto en compartimentos citoplasmáticos como en membrana plasmática formando UHs más pequeñas y en menor cantidad que las células que expresaban Cx43. En cambio Cx43Tr251 (c), se presentó más concentrada en el citoplasma y difusa en membrana celular de las células HP transfectadas.

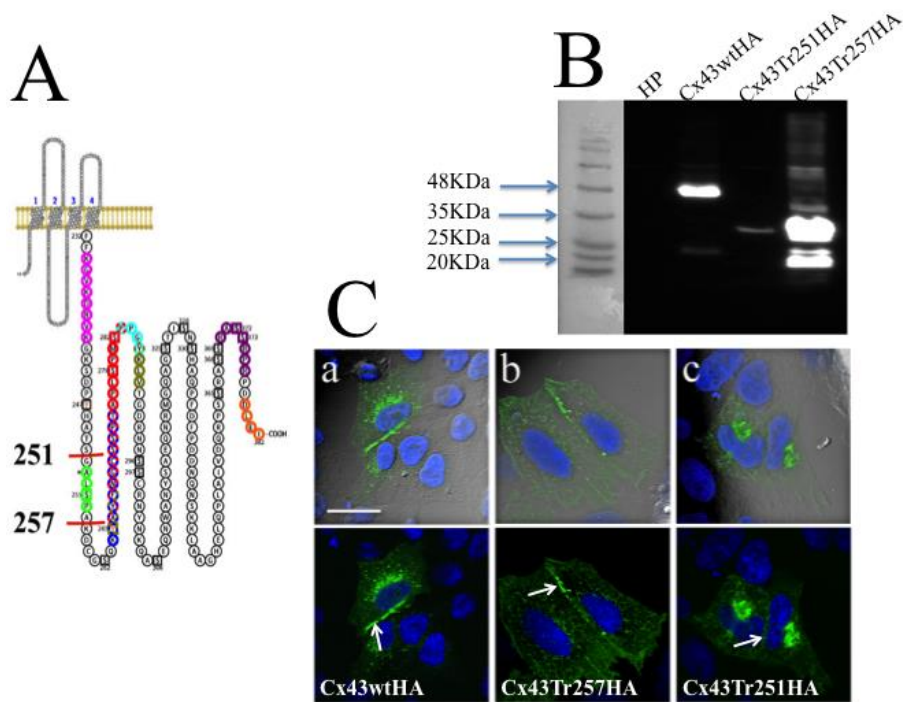


Figura 5: Expresión y localización subcelular de la Cx43 y variantes truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251 tranfectadas en células HeLa. Tanto la Cx43 como sus variantes truncadas tienen un epítipo de Hemaglutinina (HA) en el CT para poder hacer las comparaciones. (A) Esquema de la Cx43 indicando con líneas rojas los lugares de corte en el CT que generan las variantes truncadas. (B) Western blot de Cx43 y sus variantes truncadas, usando un anticuerpo que reconoce el epítipo HA ubicado en el CT. (C) La detección inmunofluorescente de Cx43 silvestre (a), Cx43Tr257 (b) y la Cx43Tr251 (c). La Cx43 forma placas de UH, la Cx43Tr257 se encuentra tanto en citoplasma como en membrana plasmática formando UHs pero en menor cantidad; en cambio Cx43Tr251 se presenta mayoritariamente en el citoplasma y en menor medida en UH pequeñas. Flechas en a, b y c indican la presencia de placas de UH. Los núcleos están teñidos de azul con DAPI y en verde la Cx43 y sus variantes truncadas con anticuerpo anti- HA. Barra 10 μm .

Debido a que tanto Cx43 como Cx43Tr257 y en menor grado Cx43Tr251, exhibieron marcaje en UHs, es posible sugerir que también pueden formar HCs libres en la membrana, de no aposición celular.

Luego, para determinar la proporción de Cx43 y sus variantes truncadas presente en citoplasma y membrana celular, se realizó biotilación de proteínas de membrana y luego se midieron los niveles de cada una de ellas mediante Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo HA localizado en extremo del CT (figura 6). En la sección A se

puede apreciar que la Cx43 y sus variantes truncadas se encuentran tanto en la membrana plasmática (biotinilada) como en forma intracelular (no biotinilada), lo cual indicaría que no hay problemas de tránsito celular para llegar hasta ella, reforzando lo visto por inmunocitoquímica y Western blot previos. En la sección B se puede apreciar que tanto Cx43 como Cx43Tr251, presentan similar porcentaje de proteína biotinilada (35,4% y 40,6% respectivamente) y por el contrario, del total de Cx43Tr257 un 66% se encontró biotinilada; lo cual indicaría que ésta última se presenta en mayor proporción que la Cx43 y Cx43Tr251 en forma de HC libre.

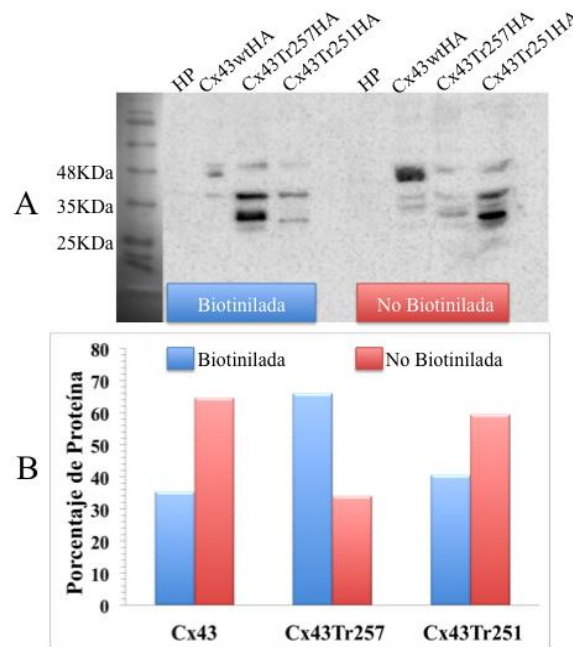


Figura 6: Biotinilación de Cx43, Cx43tr257 y Cx43Tr251 en la membrana plasmática de células HeLa. Las células fueron cultivadas a similar densidad y los niveles de la Cx43 y sus variantes truncadas se midieron mediante biotinilación de estas proteínas en membrana y posterior Western blot usando un anticuerpo que reconoce el epítoto HA ubicado en el extremo del CT (A). La posición de las marcas de los pesos moleculares se encuentran a la izquierda del Western blot, expresadas en KDa. (B) Cantidad relativa de proteína biotinilada y no biotinilada de Cx43, Cx43tr257 y Cx43Tr251 expresada en porcentaje.

2) Células HeLa que expresan Cx43 y sus variantes truncadas captan Etd, pero no los trazadores más grandes, en medio con cationes divalentes

Para determinar si los HCs libres encontrados en superficie de células HeLa transfectadas con Cx43 y sus variantes truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251 son funcionales o no, se realizaron experimentos de captación de trazadores en soluciones con y sin cationes divalentes (Ham-F12 y Hanks´ respectivamente). Esta última condición se utiliza ya que la probabilidad de apertura de los HCs aumenta en soluciones libre de cationes divalentes.

Para empezar, se estudió el estado funcional de HCs en condiciones con cationes divalentes en el medio, mediante la captación y unión de Etidio (Etd), YOPRO (YP) y Propidio (Prd) a ácidos nucleicos en el interior de la célula.

Al observar el comportamiento de los tipos celulares estudiados en medio Ham-F12, solo se detectó captación de Etd, y no de las moléculas más grandes YP o Prd, durante los 10 minutos que duró cada uno de los experimentos (figura 7). Luego para comprobar que estas captaciones se produjeron a través de HCs, se utilizó 100 μ M del bloqueador de HCs cbx, obteniéndose una reducción de la captación de Etd a niveles semejantes a los encontrados en células que no expresan Cxs (HP; figura 7).

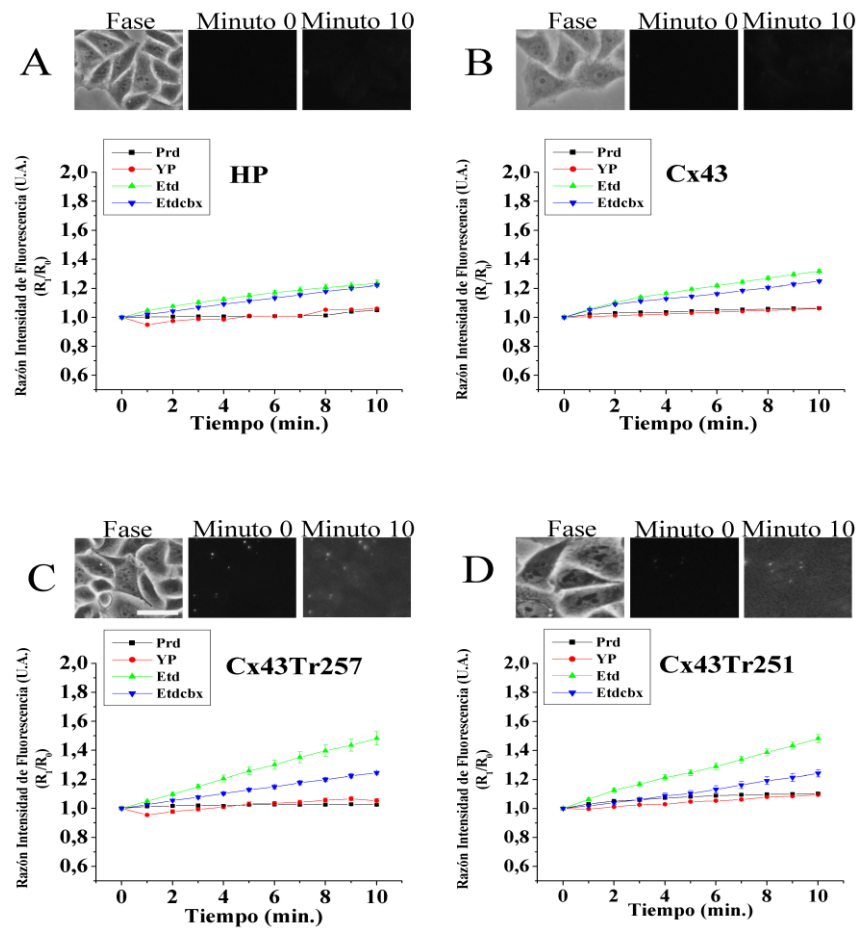


Figura 7: Tasa de captación de Etd, YP, Prd en células HeLa (A), HeLa transfectadas con Cx43His (B), Cx43Tr257 (C) o Cx43Tr251 (D) en solución con cationes divalentes más 5 μM de Etd, 0,1 μM de YP o 1,5 μM de Prd por 10 minutos. En cada tipo celular, se muestran micrografías representativas de la captación de Etd en la fase, inicio y final de los experimentos. Para bloquear HCs se utilizó 100 μM de cbx. Las captaciones obtenidas se graficaron como razón de intensidad de fluorescencia a través del tiempo. Cada valor representa el promedio \pm S.E.M. Barra de calibración en B: 10 μm .

Al promediar las pendientes de captación (taza de captación) de Etd para los distintos grupos celulares en condición control (Ham-F12), se aprecia un aumento significativo del 34% en las células que expresaron Cx43 (figura 8; $p < 0,001$) en comparación con las HP; en cambio las células que expresan las variantes truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251, presentan un aumento en la captación basal que es aún mayor (62% y 54% respectivamente). Al analizar los resultados obtenidos con cbx, se observa que

las captaciones de las células que expresaron Cx43 y sus variantes truncadas se redujeron a valores cercanos a los obtenidos en las células control (HP), indicando que esta captación se debe a la actividad de HCs.

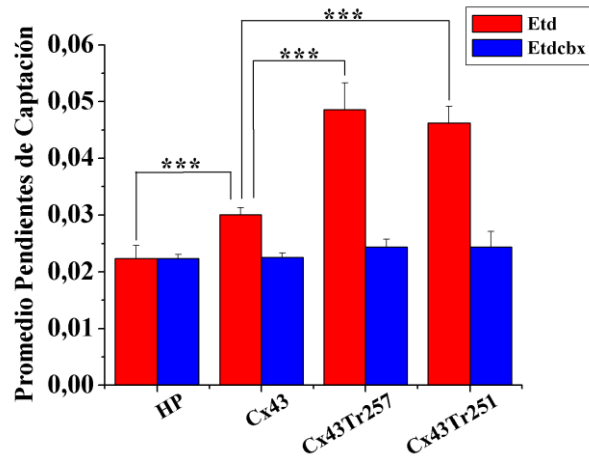


Figura 8: Promedio de las pendientes de captación de Etd y su bloqueo con 100 μ M de cbx en HeLa parenteral (HP), HeLa Cx43 (Cx43), y sus variantes truncadas (Cx43Tr257 y Cx43Tr251) en medio con cationes divalentes durante 10 minutos. *** $p < 0.001$

Analizando estas dos figuras en conjunto nos indican que pese a la presencia de cationes divalentes las células que expresan las variantes truncadas captan Etd con mayor velocidad en comparación con las que expresan Cx43. b) Las células que expresan la Cx43 normal o sus variantes truncadas no captan los trazadores de mayor tamaño.

3) Captación diferencial de trazadores de acuerdo a la extensión del CT en medio sin cationes divalentes

Debido a que los HCs aumentan su actividad en soluciones sin cationes divalentes, se evaluaron los diferentes tipos celulares estudiados en medio Hanks' encontrando un aumento en la captación de los colorantes en las células que expresaron Cx43 en comparación con las células control (HP) (figura 9); siendo la captación de Etd similar a lo reportado por Schalper (49) y Orellana (29). En cambio en las células que expresaron Cx43Tr257 y Cx43Tr251 la captación de los tres marcadores fue mucho mayor, como se observa en las imágenes captadas al comienzo y final de los experimentos (figura 9).

La magnitud del ingreso de los trazadores utilizados, se ve reflejada en los promedios de las pendientes de captación en los diferentes tipos celulares usados. Es así como comparando las captaciones de Etd en medios con y sin cationes divalentes, las células que expresaron Cx43, Cx43Tr257 y Cx43Tr251, aumentaron su captación en un 10%, 155% y 128%, respectivamente (figura 8 y 10). De igual forma, al comparar las tasas de captación de Etd entre las células que expresaron Cx43 con las truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251, se puede apreciar un aumento significativo de 2,8 y 2,2 veces respectivamente (figura 10A; $p < 0,001$). Algo similar a lo encontrado para YP, donde se aprecia un aumento significativo entre las células que expresaron Cx43 y Cx43Tr257 (3,6 veces); sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre las que expresaron Cx43 y Cx43Tr251 (figura 10B; $p > 0,05$). Es interesante observar que las velocidades de captación de Prd (figura 10C) en todos los tipos celulares estudiados, son claramente menores que las de Etd y YP; no obstante, mantienen similar patrón de comportamiento que para Etd,

observándose un aumento significativo entre las que expresaron Cx43 y las truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251; siendo los HCs formados por estas últimas, los que mejor discriminan entre los trazadores usados (figura 10C; $p < 0,001$).

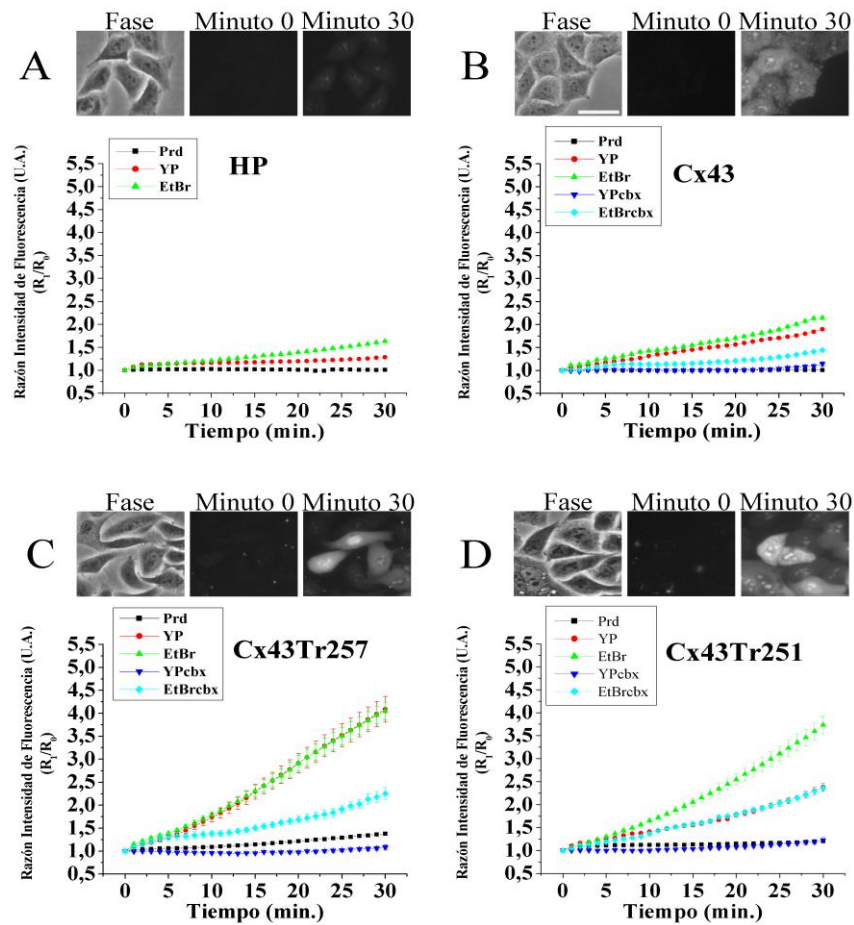


Figura 9: Tasa de captación de Etd, YP y Prd en células HP (A), HP transfectadas con Cx43His (B), Cx43Tr257(C) o Cx43Tr251(D) por 30 minutos en solución sin cationes divalentes más 5 μM de Etd, 0,1 μM de YP o 1,5 μM de Prd. Como bloqueador de HCs se utilizó 100 μM de cbx. Micrografías representativas de la captación de Etd en la fase, inicio y final de los experimentos, se muestran en cada uno de los tipos celulares. Las captaciones obtenidas se graficaron como razón de intensidad de fluorescencia a través del tiempo. Cada valor representa el promedio \pm S.E.M. Barra en B: 10 μm .

Para determinar si las captaciones se realizaron a través de HCs, se utilizó 100 μM de cbx conocido bloqueador de UHs y HCs, produciendo un bloqueo total para YP y Prd en

todos los tipos celulares estudiados y un bloqueo parcial para Etd en las truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251 (figura 9 y 10).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las células que expresaron Cx43 y sus variantes truncadas, presentan HCs funcionales en membrana plasmática, y que las truncadas se encuentran mucho más activas.

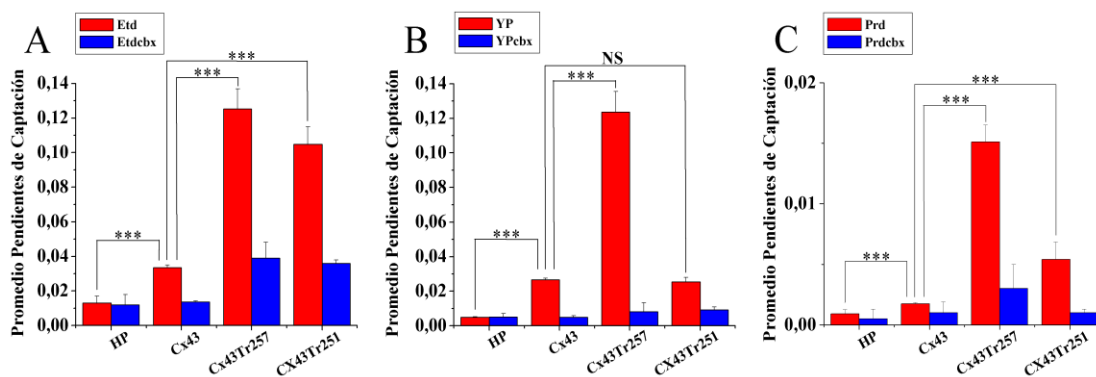


Figura 10: Promedio de las pendientes de captación para Etd (A), YP (B) y Prd (C) en células HeLa parental (HP), HeLa Cx43 (Cx43), y sus variantes truncadas (Cx43Tr257 y Cx43Tr251) en medio libre de cationes divalentes durante 30 minutos. Como bloqueador de HCs se usó 100 μ M cbx *** p <0.001; NS, no significativo.

4) Los HCs formados por la Cx43Tr257 presentan una mayor permeabilidad a trazadores grandes que los HCs formados por la Cx43Tr251

En la Figura 11 se puede observar que existe una alta correlación entre los niveles de expresión de las Cxs truncadas y los niveles de captación de todos los trazadores. Se puede apreciar que para los trazadores Etd, YP y Prd existe una estrecha correlación lineal ($R=0,92-0,96$) entre los niveles de fluorescencia total de GFP (que refleja los niveles de expresión de las variantes truncadas Cx43Tr257 y Cx43Tr251) y la captación de éstos

trazadores en solución sin cationes divalentes. Además se puede apreciar que a similar concentración de proteínas, hay mayor captación de Etd, YP y Prd por los HCs formados con Cx43Tr257 que por los formados con Cx43Tr251. Esto se ve reflejado en la magnitud de las pendientes, que para el caso de Etd son muy similares entre ambas truncadas (8,9 y 7,7 respectivamente) (A); en cambio las pendientes se discriminan mejor para YP (5,6 y 2,2 respectivamente) (B) y Prd, siendo además estos valores muy bajos (2,0 y 0,9 respectivamente). Estos análisis indican que a un mismo nivel de expresión, la Cx43Tr257 presenta una mucha mayor captación de los trazadores grandes (YP y Prd) que la Cx43Tr251. Lo anterior sugiere que existe una mayor dificultad al paso de los trazadores a través de HCs formados por Cx43Tr251 que por Cx43Tr257.

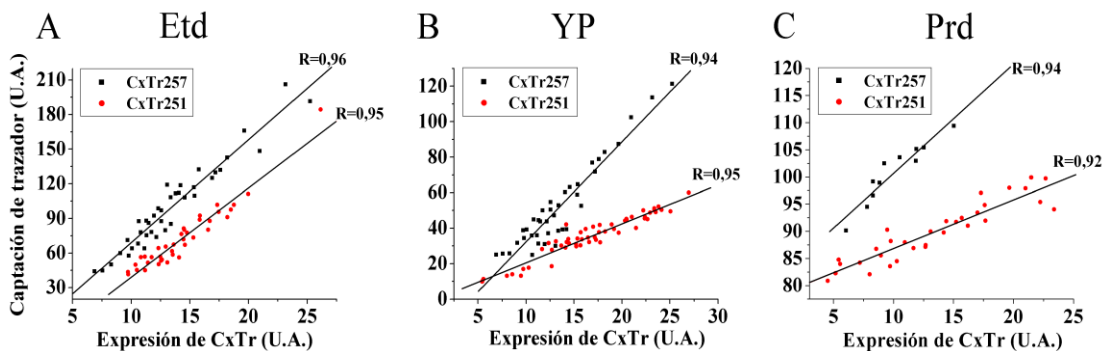


Figura 11: Captación de Etd, YP y Prd en células HeLa que expresan Cx43Tr257 y Cx43Tr251 en la membrana plasmática es directamente proporcional a la fluorescencia total de GFP. Cada uno de los tipos celulares se expuso a $5 \mu\text{M}$ de Etd (A), $0,1 \mu\text{M}$ de YP (B) o $1,5 \mu\text{M}$ de Prd (C) en solución sin cationes divalentes a los 20 minutos. Las fluorescencias totales como las captaciones de cada marcador fueron graficadas como regresión lineal.

VI.- DISCUSIÓN

En un comienzo los HCs solo se percibían como parte del ciclo de formación de las UHs, pero esta visión ha ido cambiando con recientes estudios, en donde se ha podido establecer los estímulos y moduladores que activan HCs, algunas de las funciones que cumplen y por ende su importancia en la vida de las células. Pese al avance en esta materia, aún existen algunos aspectos de estos canales que se desconocen, dentro de los cuales destaca el mecanismo de participación del CT en la regulación de la permeabilidad de HCs. Esta Tesis pretende aportar información que ayude a esclarecer la forma de participación de este dominio en la permeabilidad de la membrana plasmática, abordando el problema a través del estudio del CT de la Cx43. Se eligió esta Cx debido a que es una de las que se expresa con mayor frecuencia en las células eucariontes, y dentro de esta proteína la región CT es la zona con mayor variación dentro de las Cxs, la cual contiene múltiples sitios de regulación e interacción con otras proteínas.

1) Inmunolocalización de Cx43 y sus variantes truncadas

Al igual que lo descrito previamente (33), en esta tesis se pudo establecer que la Cx43 forma HCs funcionales en membrana plasmática sin contacto con otras células; sin embargo la gran mayoría de ellas se encuentra en las membranas de aposicionamiento celular formando placas de UHs como lo reportaron otros autores (23,46,47). De igual modo, se pudo comprobar, mediante inmunofluorescencia indirecta y biotinylación de proteínas de membrana, que la falta del extremo CT hasta el aminoácido 257 o 251, no

afecta la llegada de Cx43Tr257 o Cx43Tr251 a la membrana plasmática formando HCs funcionales; al igual que lo expuesto en estudios anteriores en los cuales algunas mutantes de la Cx43 truncadas en el dominio CT, pueden llegar a la membrana plasmática formando HCs (47,49) y UHs funcionales (45,46,50). En cambio Cx43Tr239 pueden llegar a la membrana plasmática pero no forman HCs funcionales (23).

Además, en esta tesis se encontró una mayor proporción de Cx43Tr257 biotinilada en membrana plasmática que Cx43 y Cx43Tr251. Esto podría explicarse debido a que Cx43Tr257 carece de la mayoría de los sitios que regulan el ensamble de HCs de células adyacentes para formar placas de UHs (47), su función, endocitosis y degradación; por lo que la falta de estos epítopes produciría una mayor dificultad para la formación de UHs. Cx43 y Cx43Tr251 presentaron similares proporciones de proteína no biotinilada. El mayor porcentaje de Cx43 no biotinilada puede explicarse por la presencia de grandes placas de UH encontradas en este y otros trabajos, ya que al estar presente el CT completo, forma rápidamente placas de UHs, y en esta conformación la biotina no pueden unirse a la Cx; en cambio en Cx43Tr251 el mayor nivel de proteína no biotinilada se puede explicar por un tránsito más lento hacia la membrana plasmática, acumulándose temporalmente en organelos citoplasmáticos como el aparato de Golgy, como se observó en las imágenes con Confocal (figura 5).

2) Captación de marcadores de ácidos nucleicos en medio con cationes divalentes

La captación de marcadores, ya sea en medio con o sin cationes divalentes, ha sido anteriormente utilizada como un indicador de la actividad de HCs (14,29,49). Para poder determinar el efecto de las deleciones del CT tanto en el aminoácido 257 como en el 251 de la Cx43, sobre el grado de permeabilidad de la membrana plasmática mediada por HCs, primero se midieron las captaciones de moléculas marcadoras de ácidos nucleicos con diferente forma, carga y peso molecular (Etd, YP y Prd) en solución con una concentración fisiológica de Ca^{2+} extracelular. Como era esperable, en este medio no hubo captación de los trazadores Prd y YP en HeLa que expresaban Cx43 ni sus variantes truncadas; esto debido a que, como se ha descrito antes (14,28), tanto Ca^{2+} como Mg^{2+} extracelular, pueden generar cambios conformacionales en las inmediaciones del poro externo del HC disminuyendo la probabilidad de apertura. Sin embargo, en estas mismas condiciones, estudios previos (14,29,49) han observado captación de Etd, al igual que en esta tesis. Las captaciones de Etd a través de los HCs formados por Cx43Tr257 y Cx43Tr251, son mayores que las registradas en células que expresaban Cx43, disminuyendo todas a nivel de las células HP con la aplicación de cbx, lo que refuerza la idea de captación a través de HCs.

3) Captación de marcadores de ácidos nucleicos en medio sin cationes divalentes

Al comparar los tipos celulares utilizados en medios con y sin cationes divalentes, se observaron aumentos en las captaciones de los colorantes, siendo mayores en células que

expresaron las variantes truncadas que en aquellas que expresaron Cx43. Estas captaciones fueron bloqueadas por cbx, demostrando que se realizaron por HCs funcionales. Además, como se ha demostrado previamente, en la membrana plasmática no hay cambios en los niveles de Cx43 en una solución sin cationes divalentes (13); por lo que el aumento en la intensidad de fluorescencia de cada trazador, refleja un cambio neto del paso del trazador a través de HCs, debido a un aumento en la probabilidad de apertura de los HCs (29). Es así como los resultados obtenidos en células que expresaron la Cx43 silvestre concuerdan con trabajos previos llevados a cabo en soluciones sin cationes divalentes (29,49).

De igual forma, células transfectadas con Cx43Tr257 mostraron permeabilidad de la membrana plasmática significativamente mayor a los trazadores usados, que aquellas que expresaron Cx43 silvestre; lo cual puede explicarse ya sea por una mayor proporción de HCs formados por Cx43Tr257 que por Cx43, como se observa en la biotilación de proteínas de membrana; o bien por una mayor actividad de los HCs formados por esta truncada, como lo registrado en una investigación de Scharper el año 2010 (25); en la cual, a similares concentraciones de HCs formados por Cx43 o Cx43Tr257 en membrana plasmática, las señales de calcio fueron mayores en células que expresaron Cx43Tr257 que aquellas que expresaron Cx43; y similar a lo obtenido por Kozoriz el año 2010 (50) observando una mayor captación de Prd en HCs formados por Cx43Tr258 que por Cx43 en astrocitos de ratones. Sin embargo, trabajos anteriores utilizando células C6, no registraron actividad electrofisiológica en HCs formados por Cx43Tr257 (51). Estas diferencias se deben probablemente a que los factores que determinan la respuesta de los HCs dependen del tipo de estímulo aplicado, el estado de fosforilación del CT y del tipo celular estudiado (31).

Por otro lado, llama la atención el comportamiento de los HCs formados por Cx43Tr251, ya que a pesar que la proporción de esta proteína biotinilada es semejante a la de Cx43, las captaciones de Etd y Prd son comparativamente mayores en Cx43Tr251 (al igual que lo registrado entre Cx43 y Cx43Tr257) lo que indicaría una mayor actividad de los HCs formados por Cx43Tr251; sin embargo las pendientes de captaciones de YP son semejantes. Este contraste podría ser indicador de permeabilidad selectiva debido probablemente, a la diferencia estructural, de carga y/o peso molecular entre los trazadores.

Los resultados encontrados también indican que los HCs no son la única vía de ingreso de Etd a las células, ya que en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes y usando cbx como bloqueador de HCs, tanto las HeLa parental como las transfectadas con Cx43 o sus variantes truncadas, presentaron captaciones indicando que otra vía contribuye en el ingreso de este trazador.

4) La captación de trazadores se correlaciona con la expresión de Cx43 y sus variantes truncadas en células HeLa

Investigaciones previas (14,29,49) han demostrado que, tanto en soluciones con y sin cationes divalentes, la captación de Etd a través de HCs formados por Cx43-GFP, está correlacionada directamente con los niveles de fluorescencia total de esta proteína. Al utilizar en esta tesis un vector capaz de entregar la información tanto de las Cxs truncadas como del marcador GFP a las células transfectadas, permitió normalizar los niveles de expresión de las Cxs truncadas, con las captaciones de cada marcador, en células con forma

y tamaño similares. De esta manera, se pudo comprobar la existencia de una estrecha correlación entre los niveles de expresión de Cx43Tr257 y Cx43Tr251 con las captaciones de Etd, YP y Prd inducida por un medio libre de cationes divalentes. Así mismo, se pudo constatar una diferencia entre las pendientes de Cx43Tr257 y Cx43Tr251 para YP y pendientes muy pequeñas para Prd. Una posible explicación para este fenómeno, es que existe una mayor dificultad al paso de YP y Prd por los HCs formados por Cx43Tr251, o bien a un poro de diámetro más reducido.

Lamentablemente, debido a que se utilizaron células HeLa establemente transfectadas con Cx43 que no cuentan con el epítipo GFP, no se podía previamente reconocer y cuantificar los niveles de expresión de Cx43 en aquellas células que la producían. Por lo que al no contar con esta información para correlacionarla con los datos de captación de los trazadores realizada por HCs de Cx43, no se pudo comparar adecuadamente con la información obtenida de las variantes truncadas.

Reunidos todos estos antecedentes se demuestra que el dominio CT de la Cx43 es muy importante para la regulación de la actividad de los HCs, ya que al cortarlo en dos sectores diferentes pero cercanos (aminoácidos 257 y 251), se producen cambios importantes en la cinética de permeabilidad y/o selectividad de la membrana plasmática, aumentando el tamaño del poro y/o probabilidad de apertura de los HCs (Cx43Tr257), y comienza a disminuir cuando se corta un poco más (Cx43Tr251), lo cual queda demostrado al observar los promedios de las pendientes de captación (figura 10).

Como se ha propuesto anteriormente, la interacción entre el CT con el dominio L2 (aa 119-144) ubicado en la segunda mitad del LC de la Cx43, produciría cambios conformacionales cuyas consecuencias llevaría al cierre de las UHs mediante la oclusión

física del poro, en respuesta a la acidificación intracelular (40). Posteriormente se determinó que la interacción entre el dominio L2 del LC con los 10 últimos aminoácidos del CT, es esencial pero no suficiente para la apertura de los HCs de Cx43, generando un estado “disponible para la apertura”, siendo necesarios otros estímulos como depolarización de membrana, disminución de Ca^{2+} externo o aumentos moderados de Ca^{2+} interno (menor a 500 nM), para lograr la apertura de los HCs (23). No obstante, Hirst-Jensen y colaboradores el año 2006 (52), estudiando la dependencia de pH en la interacción entre CT y el LC de la Cx43, descubrieron que múltiples dominios aminoacídicos involucrados en la dimerización del CT de la Cx43 (281-295, 299-304, 314-327, 342-348), también están involucrados en la interacción entre éste y LC, por lo tanto teóricamente podrían producir similar interacción y efecto en los HCs. En cambio cuando el Ca^{2+} interno aumenta por sobre los 500 nM, activa el sistema contráctil actino-miosina, el cual a su vez, causa una contracción del citoesqueleto, que tira al CT separándolo del LC, y produce de esta forma el cierre de los HCs (53).

Con los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere que existe al menos otra zona de unión entre el LC y un sitio del CT ubicado entre los aa 239 y 257 (figura 12); ya que en éste segmento del CT, existen 4 sitios específicos de fosforilación en la Cx43 (Ser 244, Tyr 247, Ser 255 y Ser 257) los cuales al ser fosforilados por diferentes quinasas (54), pueden generar cargas negativas contribuyendo con la interacción entre la región L2 del LC y este segmento del CT de las Cxs truncadas. Además, es muy probable que ésta interacción no sea regulada por el sistema actino-miosina del citoesqueleto, ya que aún en soluciones con concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , los HCs formados por las variantes truncadas se encuentran más activos. Esto también explicaría la mayor captación de trazadores en

soluciones libre de cationes divalentes en las células que expresan Cx43Tr257 y Cx43Tr251 comparadas con las que expresan Cx43 silvestre. Finalmente, al cortar aún más el CT (aa 239) no se produciría la interacción entre el segmento resultante de este corte del CT y el LC, y por lo tanto el HC permanecería cerrado aún en soluciones libre de cationes divalentes, como se ha descrito anteriormente (23,31).

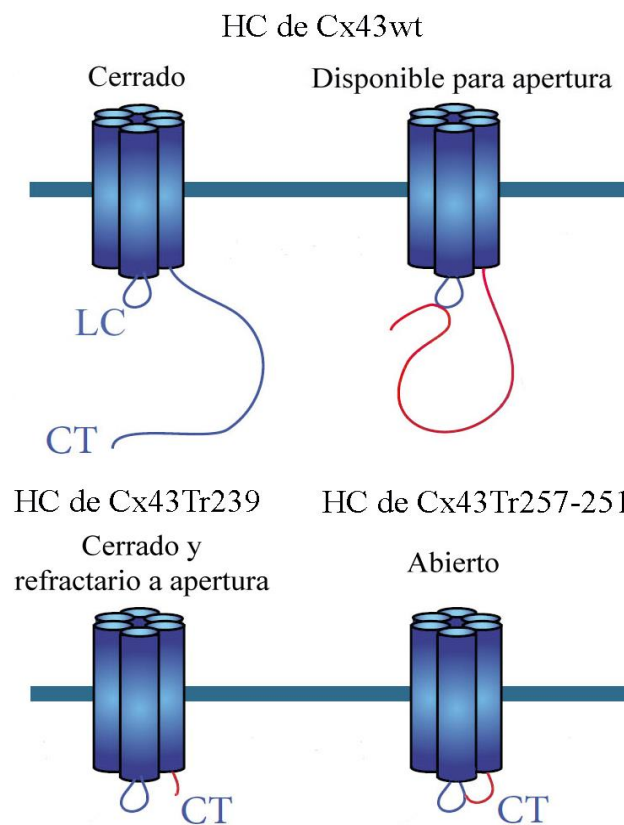


Figura 12: Diagrama que ilustra un posible modelo de regulación química de la apertura y cierre de HCs de Cx43. En condiciones fisiológicas normales, el CT se encuentra apartado del LC, con lo cual el HC permanece cerrado. Sin embargo, al entrar en contacto con el LC, lleva al HC a un estado “disponible para abrirse”, lográndolo con estímulos apropiados (Ca^{2+} , pH, etc). En cambio, cuando el CT es cortado a nivel del aa 257 o 251, la unión con el LC permanecería al no poder actuar el sistema actino-miosina del citoesqueleto que tracciona al CT separándolo del LC para el cierre del canal. Un corte a nivel del aa 239 produce un HC cerrado y refractario a la apertura aún con estímulos apropiados, debido a la imposibilidad de la interacción entre LC y CT (Adaptación de De Bock (43)).

V.- CONCLUSIONES

- Se comprobó la presencia de HCs funcionales de Cx43, Cx43Tr257 y Cx43Tr251 en la membrana plasmática, lo que indicaría que no hay problema en el tránsito hacia la membrana; sin embargo, Cx43Tr257 se encuentra mayor proporción que la Cx43 y Cx43Tr251, lo que podría explicar en parte el aumento de captación en las variantes truncadas.
- En soluciones con cationes divalentes los HCs formados por Cx43Tr257 y Cx43Tr251, no pueden cerrarse correctamente al faltar parte importante del CT de la Cx43.
- La falta de una parte importante del CT produce un aumento gradual de la captación de marcadores de ADN; así como también una permeabilidad selectiva entre los distintos trazadores, la cual se hace evidente en Cx43Tr251 en ausencia de cationes divalentes en el medio extracelular.
- Las estrechas correlaciones entre las captaciones de los marcadores usados (Etd, YP y Prd) y los niveles de expresión de las mutantes (Cx43Tr257 y Cx43Tr251), indicaría la existencia de una relación directa entre superficie y niveles totales de HCs de estas proteínas en medio libre de cationes divalentes.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* [Internet]. 2006;397(1):1–14. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20060175>
2. Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* [Internet]. 2003;10(4–6):173–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/cac.10.4-6.173.180>
3. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* [Internet]. 2003;83(4):1359–400. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00007.2003>
4. Olk S, Zoidl G, Dermietzel R. Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66(11):1000–16.
5. Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal. *Glia*. 2006;54(7):758–73.
6. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* [Internet]. 2002;383(5):725–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12108537
7. Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(7):1171–86.

8. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):191–200.
9. Sáez JC, Schalper KA, Retamal MA, Orellana JA, Shoji KF, Bennett MVL. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. Vol. 316, *Experimental Cell Research*. 2010. p. 2377–89.
10. Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* [Internet]. 2009;419(2):261–72. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20082319>
11. Forge A. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp*. 1999;219:134–50.
12. Leithe E, Mesnil M, Aasen T. The connexin 43 C-terminus: a tail of many tales. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2018;1860(1):48–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.008>
13. Schalper KA, Palacios-Prado N, Orellana JA, Sáez JC. Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes*. 2008;15(1–2):207–18.
14. Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett M V. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Sep 30;100(20):11388–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13130072
15. Squecco R, Sassoli C, Nuti F, Martinesi M, Chellini F, Nosi D, et al. Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role

- for a gap junction-dependent and -independent function. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2006;17(11):4896–910. Available from:
<http://www.molbiolcell.org/content/17/11/4896%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635397/pdf/zmk4896.pdf>
16. Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, et al. Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol*. 1996;134(4):1019–30.
 17. Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* [Internet]. 2000;20(8):2835–44. Available from:
<http://www.jneurosci.org/content/20/8/2835.long%5Cpapers3://publication/uuid/CAC9B753-F04A-4027-9243-15AF85250B3D>
 18. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8648–57.
 19. Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*. 2005;46(5):731–44.
 20. Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MVL. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2005;1711(2 SPEC. ISS.):215–24.
 21. Abrams CK, Bennett MVL, Verselis VK, Bargiello TA. Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002;99(6):3980–4. Available from:

<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.261713499>

22. Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, et al. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002;99(1):495–500. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.012589799>
23. Ponsaerts R, De Vuyst E, Retamal M, D'hondt C, Vermeire D, Wang N, et al. Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *FASEB J* [Internet]. 2010;24(11):4378–95. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.09-153007>
24. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MVL, Saez JC. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(20):8322–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702456104>
25. Schalper KA, Sanchez HA, Lee SC, Altenberg GA, Nathanson MH, Saez JC. Connexin 43 hemichannels mediate the Ca²⁺ influx induced by extracellular alkalization. *AJP Cell Physiol* [Internet]. 2010;299(6):C1504–15. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00015.2010>
26. Retamal MA, Cortés CJ, Reuss L, Bennett MVL, Sáez JC. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: Induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc Natl Acad Sci United States Am* [Internet]. 2006 Mar 21;103(12):4475–80. Available from: <http://www.pnas.org/content/103/12/4475.abstract>

27. De Vuyst E, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, Van Moorhem M, et al. Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium*. 2009;46(3):176–87.
28. Gómez-Hernández JM, de Miguel M, Larrosa B, González D, Barrio LC, Gomez-Hernandez JM, et al. Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(26):16030–5. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=307687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Orellana JA, Díaz E, Schalper KA, Vargas AA, Bennett MVL, Sáez JC. Cation permeation through connexin 43 hemichannels is cooperative, competitive and saturable with parameters depending on the permeant species. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011;409(4):603–9. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11007911>
30. Stout CE, Costantin JL, Naus CCG, Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10482–8.
31. De Vuyst E, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH, et al. Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2007 Jan 1;18(1):34–46. Available from:
<http://www.molbiolcell.org/content/18/1/34.abstract>
32. Ye Z-C, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in

- astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*. 2003;23(9):3588–96.
33. John SA, Kondo R, Wang S-Y, Goldhaber JI, Weiss JN. Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Jan 1;274(1):236–40. Available from: <http://www.jbc.org/content/274/1/236.abstract>
34. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, et al. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(50):13781–92. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2042-07.2007>
35. Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, et al. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 ?? resolution. *Nature* [Internet]. 2009;458(7238):597–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07869>
36. Kwon T, Roux B, Jo S, Klauda JB, Harris AL, Bargiello TA. Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: Insights into voltage-dependent loop-gating. *Biophys J*. 2012;102(6):1341–51.
37. Lopez W, Ramachandran J, Alsamarah A, Luo Y, Harris AL, Contreras JE. Mechanism of gating by calcium in connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113(49):E7986–95. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1609378113>
38. Li H, Spagnol G, Zheng L, Stauch KL, Sorgen PL. Regulation of connexin43 function and expression by tyrosine kinase 2. *J Biol Chem*. 2016;291(30):15867–80.

39. Bao X, Reuss L, Altenberg GA. Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 368. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20058–66.
40. Duffy HS, Sorgen PL, Girvin ME, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, et al. pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J Biol Chem*. 2002;277(39):36706–14.
41. Seki A. Modifications in the biophysical properties of connexin43 channels by a peptide of the cytoplasmic loop region. *Circ Res* [Internet]. 2004;95(4):e22–8. Available from:
<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000140737.62245.c5>
42. Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):268–75.
43. De Bock M, Wang N, Decrock E, Bultynck G, Leybaert L. Intracellular cleavage of the Cx43 C-Terminal domain by matrix-metalloproteases: a novel contributor to inflammation? *Mediators Inflamm*. 2015;2015(i).
44. Schalper KA, Riquelme MA, Brañes MC, Martínez AD, Vega JL, Berthoud VM, et al. Modulation of gap junction channels and hemichannels by growth factors. *Mol Biosyst* [Internet]. 2012;8(3):685. Available from:
<http://xlink.rsc.org/?DOI=c1mb05294b>
45. Moreno AP, Chanson M, Anumonwo J, Scerri I, Gu H, Taffet SM, et al. Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ Res*. 2002;90(4):450–7.
46. Maass K, Shibayama J, Chase SE, Willecke K, Delmar M. C-terminal truncation of

- connexin43 changes number, size, and localization of cardiac gap junction plaques. *Circ Res* [Internet]. 2007 Dec 7;101(12):1283–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932323>
47. Martínez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap junction plaque formation but not for homo- or hetero-oligomerization. *Cell Commun Adhes*. 2003;10:323–8.
 48. Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* [Internet]. 2002 May 31;90(10):1100–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039800>
 49. Schalper KA. Connexin hemichannel composition determines the FGF-1–induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses. *Mol Biol Cell*. 2008;19:3501–13.
 50. Kozoriz MG, Bechberger JF, Bechberger GR, Suen MWH, Moreno AP, Maass K, et al. The Connexin43 C-terminal region mediates neuroprotection during stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(2):196–206.
 51. Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, et al. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* [Internet]. 2008 Apr 30;28(18):4702 LP-4711. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/28/18/4702.abstract>
 52. Hirst-Jensen BJ, Sahoo P, Kieken F, Delmar M, Sorgen PL. Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Feb 23;282(8):5801–13. Available from:

<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M605233200>

53. Ponsaerts R, Wang N, Himpens B, Leybaert L, Bultynck G. The contractile system as a negative regulator of the connexin 43 hemichannel. *Biol Cell*. 2012;104(7):367–77.
54. Axelsen LN, Calloe K, Holstein-Rathlou N-H, Nielsen MS. Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol* [Internet]. 2013 Oct 22;4(October):130. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00130/abstract>

VIII ANEXO

Imagen complementaria de Biotinilación

En esta imagen complementaria de la biotinilación, puede observarse claramente las fracciones biotinilada y no biotinilada de la Cx43 y Cx43Tr251, transfectadas en células HeLa; así como también la marca del anticuerpo contra tubulina utilizado como marcador de proteína citoplasmática, encontrándose como era de esperar solo en la fracción no biotinilada.

