

Programa de Doctorat de Neurobiologia  
Bienni 2001-2003

**Mecanismes d'alliberació d'ATP a través  
de la membrana plasmàtica: paper de la  
CD39 i les Connexines.**

Tesi doctoral

Director de tesi

Laia Bahima Borràs

Dr. Carles Solsona Sancho



# ÍNDIX

<b>ABREVIATURES</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>15</b>
<b>1. L'ATP com a senyal de comunicació cel·lular</b>	<b>18</b>
1.1 L'ATP com a neurotransmissor	18
1.2 Receptors purinèrgics	20
1.3 Metabolisme extracel·lular de l'ATP	25
<b>2. Connexines</b>	<b>28</b>
2.1 Unions gap i hemicanals	28
2.2 Aspectes generals i estructura de les connexines	32
2.4 Formació i degradació de les connexines	34
2.5 Expressió de Connexines en el Sistema Nerviós Central	36
2.6 Expressió de Connexines en el Sistema Nerviós Perifèric: la connexina 32.	39
2.7 Expressió de connexines en oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	46
<b>3. Mecanismes implicats en l'alliberació d'ATP</b>	<b>46</b>
3.1 Exocitosi	47
3.2 CD39	48
3.3 Connexines	48
3.4 Proteïnes de la família ABC: CFTR i glicoproteïna P	51
3.5 Canals aniònics	52
<b>4. El model experimental de <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>53</b>

---

4.1 Avantatges de la utilització d'aquest model	53
4.2 Histologia de l'oòcit	54
<b>OBJECTIUS</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>61</b>
<b>1. Composició de les solucions</b>	<b>63</b>
<b>2. Obtenció del material d'injecció</b>	<b>64</b>
2.1 Obtenció de l'RNA antisentit de CD39	64
2.2 Obtenció de l'RNA antisentit de Cx38	64
2.3 Clonatge i sobreexpressió de la Cx38	64
2.4 Obtenció del cRNA de Cx32 humana	65
<b>3. Tècniques de DNA recombinant</b>	<b>66</b>
3.1 Transformació de bacteris	66
3.2 Selecció de les colònies d'interès i obtenció del DNA plasmídic	66
3.3 Producció d'mRNA	67
<b>4. Preparació dels oòcits de <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>67</b>
4.1 Obtenció i manteniment dels oòcits	67
4.2 Injecció de cRNA en els oòcits de <i>Xenopus</i>	68
4.3 Tractament dels oòcits amb col·lagenasa	69
<b>5. Mesura de l'activitat NTPDasa</b>	<b>70</b>
<b>6. Assaig per la determinació de l'alliberació d'ATP amb luciferina/luciferasa</b>	<b>72</b>
6.1 Purificació de la luciferina-luciferasa (L-L)	72

---

6.2 Tractament dels oòcits per mesurar l'alliberació d'ATP a través de Cx38 i l'ATP total contingut en cada oòcit.	73
6.3 Mètode de mesura de l'ATP	74
<b>7. Registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes</b>	<b>75</b>
7.1 Tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes	75
7.2 Components del set-up de voltage clamp	76
7.3 Preparació del material per al registre de fixació de voltatge	77
7.4 Registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes	78
7.5 Registre simultani de corrent i d'alliberació d'ATP en el set-up de <i>voltage clamp</i>	79
<b>8. Mesura de l'alliberació de Lucifer Yellow (LY) a través d'hemicanals</b>	<b>79</b>
8.1 Lucifer Yellow	79
8.2 Injecció dels oòcits amb LY	80
8.3 Mesura de l'alliberació de LY en un fluorímetre	80
<b>9. Mesura de la capacitància de membrana dels oòcits</b>	<b>80</b>
<b><u>RESULTATS</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b>1. Síntesi i validació d'un oligonucleòtid antisentit contra la proteïna NTPDasa1 (CD39) de <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>85</b>
1.1 Síntesi d'un oligonucleòtid antisentit per la NTPDasa1 (CD39) de <i>Xenopus laevis</i>	87
1.2 Validació dels oligonucleòtids ASCD3911 i ASCD3922	89

---

<b>2. Paper dels hemicanals endògens en l'alliberació d'ATP en oòcits de <i>Xenopus</i></b>	<b>95</b>
2.1 ABSTRACT	99
2.2 INTRODUCTION	101
2.3 MATERIALS AND METHODS	103
2.3 RESULTS	110
2.4 DISCUSSION	120
<b>3. Alliberació d'ATP a través de la connexina32 expressada en oòcits de <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>127</b>
3.1 Obtenció de cRNA de la connexina 32	129
3.2 Activació de la connexina 32 i alliberació d'ATP	130
3.3 Relació entre l'alliberació d'ATP i el corrent de cua	132
3.4 Influència de l'absència d'ions divalents en l'activació de la Cx32 i l'alliberació d'ATP	134
3.5 L'alliberació d'ATP per activació de la Cx32 és independent de la via d'alliberació d'ATP per exocitosi	135
3.6 L'ATP alliberat a través de Cx32 és capaç d'activar receptors purinèrgics P2X <sub>1</sub>	139
<b><u>DISCUSSIÓ</u></b>	<b>141</b>
<b>1. Alliberació d'ATP a través de la proteïna CD39 endògena de <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>143</b>
<b>2. Alliberació d'ATP a través d'hemicanals</b>	<b>145</b>
2.1 Alliberació d'ATP a través dels hemicanals endògens d'oòcits de <i>Xenopus</i>	147
2.2 Alliberació d'ATP a través de la connexina 32 expressada de manera heteròloga en oòcits de <i>Xenopus</i>	150

<b>3. Consideracions finals</b>	<b>154</b>
<b><u>CONCLUSIONS</u></b>	<b><u>155</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b><u>159</u></b>
<b><u>ANNEX</u></b>	<b><u>185</u></b>





## **ABREVIATURES**



<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette
<b>ADP</b>	Adenosina 5'-difosfat
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-monofosfat
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfat cíclica
<b>ASCD39</b>	Antisentit CD39
<b>ASCx38</b>	Antisentit Cx38
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfat
<b>BFA</b>	Brefeldina A
<b>cDNA</b>	Àcid desoxiribonucleic complementari
<b>CFTR</b>	Regulador Transmembrana de Fibrosi Quística
<b>CHN</b>	Neuropatia Hipomielinitzant Congènita
<b>CMT</b>	Charcot-Marie-Tooth
<b>CMTX</b>	Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X
<b>cRNA</b>	Àcid Ribonucleic complementari
<b>Cx</b>	Connexina
<b>Cm</b>	Capacitància elèctrica de membrana
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonat
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfòxid
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>DO</b>	Densitat òptica
<b>DSS</b>	Dejerine Sottas
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetracètic
<b>E-NPP</b>	Ectonucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa
<b>E-NTPDasa</b>	Ectonucleòsid trifosfat difosfohidrolasa
<b>F</b>	Faraday
<b>GPI</b>	Glicosil Fosfatidil Inositol
<b>HMSN</b>	Neuropatia Hereditària Sensorial i Motora
<b>HRM</b>	Ringer Hipertònic Manitol

---

<b>InsP3</b>	Inositol Trifosfat
<b>KDa</b>	kiloDalton
<b>KIR</b>	Inwardly Rectifying Potassium channel
<b>LITAF</b>	Lipopolysaccharide Induced Tumour-necrosis Factor (TNF)- $\alpha$
<b>LB</b>	Medi Luria-Bertani
<b>L-L</b>	Luciferina-Luciferasa
<b>LY</b>	Lucifer Yellow
<b>MNR</b>	Ringer Normal Modificat
<b>MPZ o PO</b>	Proteïna Zero de la Mielina
<b>MRP</b>	Multidrug Resistance Protein
<b>mRNA</b>	Àcid Ribonucleic missatger
<b>mV</b>	miliVolts
<b>nA</b>	nanoAmpers
<b>NR</b>	Ringer Normal
<b>P2R</b>	Receptor Purinèrgics
<b>P2X</b>	P2R ionotròpics
<b>P2Y</b>	P2R metabotròpics
<b>pb</b>	Parells de bases
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>Pi</b>	Fosfat Inorgànic
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMP22</b>	Proteïna Perifèrica de la mielina
<b>PPi</b>	Pirofosfat inorgànic
<b>pS</b>	picoSiemens
<b>RNA</b>	Àcid Ribonucleic
<b>SNA</b>	Sistema Nerviós Autònom
<b>SNC</b>	Sistema Nerviós Central
<b>SNP</b>	Sistema Nerviós Perifèric

<b>SUR</b>	Receptor de sulfonilurea
<b>TCA</b>	Àcid Tricloracètic
<b>UTP</b>	Uracil 5'-trifosfat
<b>VRAC</b>	Canals Aniónics Regulats per Volum



## **INTRODUCCIÓ**





L'ATP és una molècula ben coneguda formada per adenina, ribosa i tres grups fosfat altament energètics. L'ATP juga moltes funcions en la homeòstasi cel·lular: la seva hidròlisi permet mantenir els gradients iònics respecte el medi extracel·lular, establir els gradients de pH en l'interior dels orgànuls, alimentar el moviment cel·lular regulant la interacció entre l'actina i la miosina o modificar la funció d'algunes proteïnes a través de les quinases.

A més a més d'aquestes funcions intracel·lulars, l'ATP és un senyal de comunicació intercel·lular que s'estableix a través de l'activació de receptors purinèrgics tipus P2X i P2Y. Tot i que s'ha progressat molt en el camp de la investigació dels receptors purinèrgics, els mecanismes que regulen l'alliberació d'ATP no són tan coneguts. Degut a que l'ATP és una molècula molt hidrofílica, es creu que no pot traspasar la membrana cel·lular, que és altament hidrofòbica.

En realitat, les cèl·lules poden alliberar ATP de manera controlada a través de dos mecanismes bàsics: exocitosi de grànuls de secreció i alliberació a través de transportadors electrogènics. En aquesta tesi, s'han investigat dos d'aquests mecanismes: alliberació a través de la proteïna CD39 i alliberació a través d'hemicanals formats per connexines.

La següent introducció està estructurada de manera que porti informació sobre tots els aspectes de l'estudi. El primer punt fa referència a l'ATP com a neurotransmissor, als receptors purinèrgics i a les molècules que metabolitzen l'ATP, entre les que es troba la proteïna CD39. El segon punt aporta informació sobre les unions gap, hemicanals i connexines. S'explica la seva síntesi, la degradació, l'estructura i la expressió tant en el sistema

nerviós central com en el perifèric, posant especial èmfasi en la connexina 32, objecte del nostre estudi. En tercer lloc, relacionant els dos punts anteriors, es fa una revisió dels diferents mecanismes d'alliberació d'ATP, posant en antecedents els mecanismes en els quals nosaltres estem interessats: l'alliberació d'ATP a través de CD39 i alliberació d'ATP a través de connecines. Finalment, un petit apartat sobre el model experimental amb el qual treballarem, els oòcits de *Xenopus laevis*, per conèixer els avantatges i les limitacions amb què ens hem trobat.

## **1. L'ATP com a senyal de comunicació cel·lular**

### **1.1 L'ATP com a neurotransmissor**

L'ATP (trifosfat d'adenosina) presenta funcions intracel·lulars essencials en totes les cèl·lules i representa el compost central per emmagatzemar energia química, la qual és necessària en molts processos cel·lulars essencials. L'ATP és utilitzat per a la biosíntesi de macromolècules, fosforilació de metabòlits o proteïnes o bé, unint-se a determinats enzims, serveix com a efector de la seva activitat. També està implicat en la regulació de fenòmens de transport actiu i treball mecànic.

La molècula d'ATP està formada per tres components: una adenina, una ribosa i tres grups fosfat (Figura I-1).



**Figura I-1: Estructura molecular de l'ATP.**

La idea d'un possible paper de l'ATP com a neurotransmissor en el sistema nerviós va sorgir a partir dels estudis de Pamela Holton (1959) demostrant l'alliberació d'ATP durant l'estimulació dels nervis sensorials. Però no va ser fins al 1972, que Burnstock va donar a l'ATP el paper de neurotransmissor principal en neurones no-adrenèrgiques, no-colinèrgiques del múscul llis formulant la seva hipòtesi purinèrgica (Burnstock et al., 1970; Burnstock, 1972).

A partir d'aquests estudis, s'ha comprovat el seu paper com a neurotransmissor en el sistema nerviós central (Edwards, 1992; Bardoni et al., 1997; Nieber et al., 1997; Pankratov et al., 1998), el sistema nerviós perifèric (Burnstock, 1986) i el sistema nerviós autònom (Burnstock et al., 1970; Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992). Per altra banda, també s'ha descrit com a cotransmissor tant en el sistema nerviós central com en el perifèric (Silinsky, 1975; Burnstock, 2004a) i també es considera mediador d'altres tipus de senyalització en epitelis (Schwiebert et al., 2003),

plaquetes (Gachet, 2006; Di Virgilio, 2001) i diferents línies cel·lulars (Raffaghello et al., 2006).

## **1.2 Receptors purinèrgics**

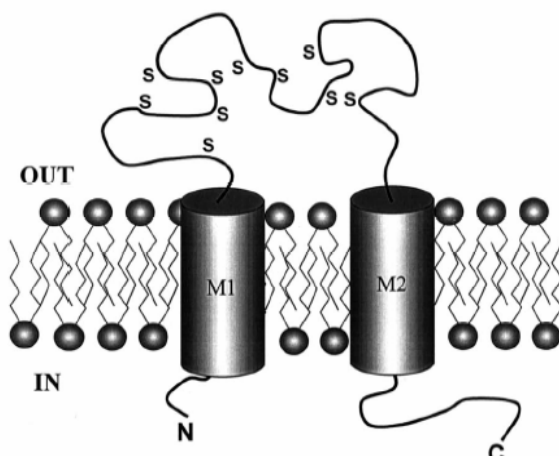
Els receptors purinèrgics es van definir per primera vegada al 1976 i, dos anys més tard, estudis farmacològics i fisiològics van permetre classificar-los en dues categories principals: els receptors P1 i els receptors P2 (Burnstock et al., 1978). Els receptors P1 s'uneixen preferentment a l'adenosina i modulen l'activitat de l'adenilat ciclase, mentre que els receptors P2 són més selectius per l'ATP i modulen l'activitat de la fosfolipasa C i la concentració intracel·lular de  $Ca^{+2}$ . Es coneixen 4 tipus de receptors P1 (A1, A2A, A2B y A3) i 15 de tipus P2 (Fredholm et al., 1997). En aquesta tesis, centrarem el nostre interès en els receptors P2, ja que són els que tenen l'ATP com a agonista principal.

Es coneixen dues famílies de receptors d'ATP: els receptors P2X, que són canals iònics, i els receptors P2Y, acoblats a proteïna G (Abbracchio i Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1997).

### **1.2.1 Receptors P2X**

S'han clonat set subunitats diferents de receptor P2X (P2X<sub>1-7</sub>). El receptor funcional és un canal catiònic format per 3 o 4 subunitats homomèriques o heteromèriques (Barnard et al., 1997; Ralevic et al., 1998; Khakh, 2001). L'estructura terciària d'aquestes subunitats està formada per dos dominis transmembrana amb un llarg domini extracel·lular entremig i uns dominis C-terminal i N-terminal citoplasmàtics més curts,

excepte en el cas dels receptors P2X<sub>2</sub> i P2X<sub>7</sub> que tenen un domini C-terminal més llarg (Figura I-2).



**Figura I-2: Representació esquemàtica d'un receptor P2X**, amb els dominis intracel·lulars N- i C-terminals, dos dominis transmembrana (M1 i M2) i una llarga nansa extracel·lular que conté 10 residus conservats de cisteïna amb capacitat de formar ponts disulfur. (Extret de Dunn et al., 2001).

L'activació d'aquests canals provoca l'activació de la cèl·lula per despolarització en produir-se un augment no selectiu de la permeabilitat a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>+2</sup> (Surprenant, 1996). En humans, els receptors P2X es troben àmpliament distribuïts en tots els teixits realitzant diverses funcions, especialment en neurones, músculs i macròfags (Taula I-1).

	Chromosome (Human)	Agonist	Potential Coassembly*	Phenotype of Knockout Mice
P2X <sub>1</sub>	17p13.2	ATP	1, 2, 3, 5, 6	Reduced vas deferens contraction, male infertility Reduced neurogenic vasoconstriction Reduced autoregulation of renal blood flow
P2X <sub>2</sub>	12q24.33	ATP	1, 2, 3, 5, 6	Reduced ventilatory response to hypoxia
P2X <sub>3</sub>	11q12	ATP	1, 2, 3, 5	Urinary bladder hyporeflexia Reduced pain response to ATP and formalin
P2X <sub>4</sub>	12q24.31	ATP	4, 5, 6	
P2X <sub>5</sub>	17p13.3	ATP	1, 2, 3, 4, 5, 6	
P2X <sub>6</sub>	22q11	ATP	1, 2, 4, 5, 6	
P2X <sub>7</sub>	12q24.31	ATP	7	Reduced ATP-mediated mycobacteria killing and cytokine production in macrophages Alterations of bone formation and resorption

\*This column gives the subscript of P2X subunits with which each P2X subunit can form oligomers.

**Taula I-1: Receptors P2X** (Extret de Boeynaems et al., 2005).

Les tècniques d'hibridació "in-situ" de mRNA, detecció de proteïnes i estudis electrofisiològics funcionals ens donen la localització tissular de cadascun dels tipus de receptors, formats presumiblement per subunitats homomèriques:

- P2X<sub>1</sub> (Valera et al., 1994): implicat en la transmissió sinàptica entre neurones i des de les neurones al múscul llis. En el sistema nerviós de rata, s'ha descrit en el córtex, hipocamp, neurones de Purkinge, medul·la espinal i ganglis del sistema nerviós autònom (SNA) (Kidd et al., 1995).
- P2X<sub>2</sub> (Lynch et al., 1999): es troba al pàncreas, relacionat amb el sistema neuroendocrí, a la glàndula pituitària, la medul·la espinal, l'amígdala i el cervell. En cervell de rata té expressió molt àmplia i és molt abundant a l'escorça, hipocamp, cerebel, medul·la espinal, sistemes sensorials i SNA (Kanjhan et al., 1999).
- P2X<sub>3</sub> (García-Guzmán et al., 1997a): en humans es troba exclusivament a la medul·la espinal i al cor. En canvi, en rata, és el receptor majoritari present en els terminals nerviosos del sistema sensorial perifèric.
- P2X<sub>4</sub> (García-Guzmán et al., 1997b): té un ampli patró d'expressió, ja que s'ha trobat en cervell, cor, medul·la espinal, fetge, ronyó, múscul esquelètic i tràquea. Estudis en cervell de rata descriuen expressió de P2X<sub>4</sub> principalment al bulb olfatori i la medul·la espinal (Le et al., 1998).
- P2X<sub>5</sub> (Le et al., 1997): s'expressa majoritàriament en cervell i sistema immune. En rata està present en

neurones sensorials i en motoneurones de la medulla espinal (Collo et al., 1996).

- P2X<sub>6</sub> (Urano et al., 1997): expressat específicament al múscul llis. En rata es troba en el cervell i en SNA, però a baixos nivells d'expressió (Collo et al., 1996).
- P2X<sub>7</sub> (Rassendren et al., 1997): molt expressat al pàncreas, fetge, cor i timus i, en nivells moderats, al cervell, múscul esquelètic, pulmons, placenta, leucòcits, testicles, pròstata i melsa. En rata, només s'ha trobat en cèl·lules ganglionars de retina (Brandle et al., 1998) i en el gangli espiral de la còclea (Brandle et al., 1999).

### 1.2.2 Receptors P2Y

Pertanyen a la família de receptors acoblats a proteïnes G (Barnard et al., 1994; North et al., 1997). L'estructura terciària d'aquestes subunitats està formada per set dominis transmembrana amb el domini C-terminal extracel·lular i el domini N-terminal citoplasmàtic (Figura I-3).



**Figura I-3: Representació esquemàtica d'un receptor P2Y**  
(Extret de Di Virgilio et al., 2001).

Així com els receptors P2X són receptors d'ATP, els receptors P2Y tenen diferents afinitats per l'ATP, l'ADP, l'UTP i l'UDP (Von Kugelguen et al., 2000). Estan implicats sobretot en agregació

plaquetària, hematopoiesi i resposta secretora en l'epiteli de les vies respiratòries i l'intestí (Taula I-2).

Receptor	Chromosome (Human)	Agonist (Human)	G-Protein	Phenotype of Knockout Mice
P2Y <sub>1</sub>	3q24-25	ADP	G <sub>q</sub>	Inhibition of platelet aggregation Increased bleeding time Resistance to thromboembolism
P2Y <sub>2</sub>	11q13.5	ATP = UTP	G <sub>q</sub> (+ G <sub>i</sub> )	Abolition of chloride secretory response to ATP/UTP in airways
P2Y <sub>4</sub>	Xq13	UTP	G <sub>q</sub> (+ G <sub>i</sub> )	Abolition of chloride secretory response to ATP/UTP in jejunum and colon
P2Y <sub>6</sub>	11q13.5	UDP	G <sub>q</sub>	In progress
P2Y <sub>11</sub>	19p31	ATP	G <sub>q</sub> + G <sub>s</sub>	No murine P2Y <sub>11</sub> gene
P2Y <sub>12</sub>	3q21-25	ADP	G <sub>i</sub>	Inhibition of platelet aggregation Increased bleeding time Resistance to thromboembolism
P2Y <sub>13</sub>	3q24-25	ADP	G <sub>i</sub>	No phenotype yet
P2Y <sub>14</sub>	3q24-25	UDP-glucose	G <sub>i</sub>	

**Taula I-2: Receptors P2Y** (Extret de Boeynaems et al., 2005).

Fins ara, s'han clonat 8 tipus de receptors (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>):

- P2Y<sub>1</sub>: es troba en la majoria de teixits humans (Moore et al., 2001), però es detecten alts nivells d'expressió en cervell, placenta i pròstata. Es relaciona amb els mecanismes d'agregació plaquetària (Jin et al., 1998).
- P2Y<sub>2</sub>: molt expressat al cor i al múscul esquelètic, però es troba, en uns nivells d'expressió variables, en la majoria de teixits humans (Moore et al., 2001). La seva funció és especialment rellevant en les cèl·lules epitelials de les vies respiratòries on la seva activació estimula la secreció de clorur en resposta a ATP (Boeynaems et al., 2005).
- P2Y<sub>4</sub>: es detecta en molts teixits, però majoritàriament en la placenta, la glàndula pituitària i el cervell (Moore et al., 2001).



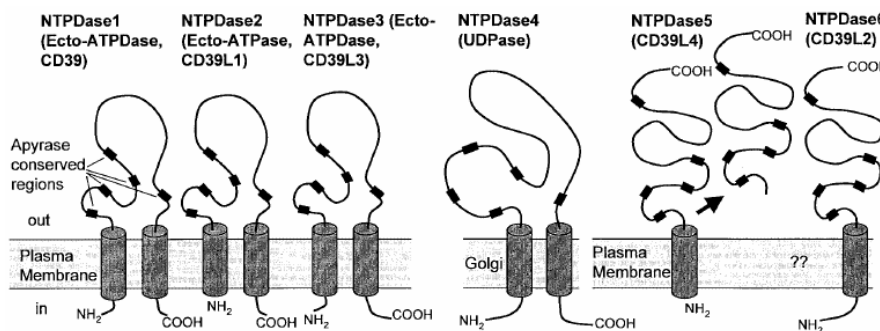
- P2Y<sub>6</sub>: present sobretot en ronyó, melsa i placenta (Moore et al., 2001).
- P2Y<sub>11</sub>: es troba a nivells d'expressió força alts en tots els teixits, en comparació als altres receptors P2Y, però té una expressió especialment més alta en cervell i glàndula pituitària, així com també a la melsa i l'intestí (Moore et al., 2001).
- P2Y<sub>12</sub>: es troba en plaquetes i en sistema nerviós (Hollopeter et al., 2001).
- P2Y<sub>13</sub>: caracteritzat recentment (Communi et al., 2001), es troba al cervell, la melsa i la placenta.
- P2Y<sub>14</sub>: àmpliament distribuït en teixits humans, tot i que els nivells més alts d'expressió s'observen a la placenta, teixit adipós, intestí i estómac, amb nivells moderats en regions del cervell, melsa, pulmons i cor (Chambers et al., 2000).

### **1.3 Metabolisme extracel·lular de l'ATP**

Les vies de senyalització intercel·lular sovint requereixen mecanismes d'eliminació o inactivació de la molècula senyalitzadora. En el cas de l'ATP, el mecanisme d'inactivació és la hidròlisi per enzims específics, que dona lloc a adenosina i fosfat lliure. Es coneixen diferents famílies d'enzims que intervenen en l'eliminació de l'ATP extracel·lular: la família de les E-NTPDases (ectonucleòsid trifosfat difosfohidrolasa), la família de les E-NPP (ectonucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa), les fosfatases alcalines i l'ecto-5'-nucleotidasa. Totes tenen una àmplia distribució en tots els teixits.

### 1.3.1 Les E-NTPDases

Hidrolitzen nucleòtids trifosfat i difosfat fins a nucleòtids monofosfat amb diferent afinitat per a cada nucleòtid segons el tipus d'enzim. Tots els membres d'aquesta família comparteixen cinc dominis apirasa altament conservats (Handa i Guidotti, 1996; Schulte am Esch et al., 1999) i requereixen cations divalents ( $\text{Ca}^{+2}$  i/o  $\text{Mg}^{+2}$ ) com a cofactors. S'anomenen de la NTPDasa1 fins a la 8 (Figura I-4), segons la localització cel·lular del seu domini catalític i la seva afinitat per l'ATP o l'ADP (Zimmermann, 2000).



**Figura I-4: Estructura dels membres de la família de les E-NTPDases** (Extret de Zimmermann, 2000). No apareixen la NTPDasa7 (Shi et al., 2001) ni la NTPDasa 8 (Bigonnesse et al., 2004) degut a que van ser clonades més tard.

### 1.3.2 Les E-NPP

Presenten un sol domini transmembrana amb un extrem C-terminal extracel·lular que pot alliberar-se en forma soluble (Figura I-5). La seva activitat catalítica és depenent d'ions divalents. Poden hidrolitzar cAMP a AMP, ATP a AMP i P<sub>i</sub>, ADP a AMP i P<sub>i</sub> i NAD<sup>+</sup> a AMP. Tant els nucleòtids de purines com els de pirimidines poden servir de substrat.

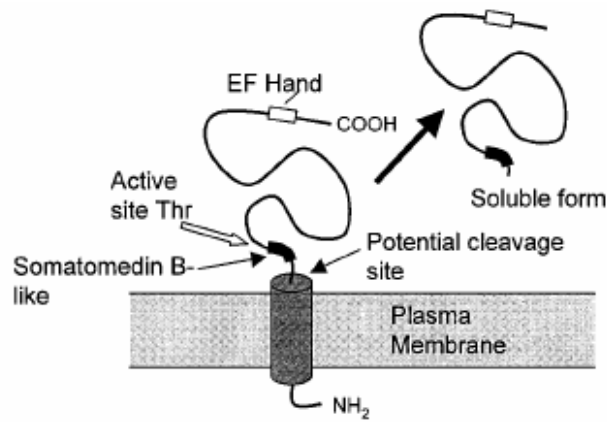


Figura I-4: Estructura dels membres de la família de les E-NPP

### 1.3.3 Les fosfatases alcalines

Hidrolitzen nucleòtids trifosfat, difosfat i monofosfat i també pirofosfats inorgànics (PPi). Són proteïnes totalment extracel·lulars que s'ancoren a la membrana a través d'un glicosilfosfatidil inositol (GPI) per l'extrem N-terminal (Figura I-5).

### 1.3.4 Ecto-5'-nucleotidasa

És el responsable del pas final en la degradació extracel·lular de nucleòtids, hidrolitza específicament nucleòtids monofosfats donant lloc al nucleòsid corresponent i fosfat inorgànic (Pi). És el principal enzim responsable de la formació d'adenosina extracel·lular a partir dels nucleòtids d'adenina alliberats (AMP → Adenosina). És un metal·loenzim associat a  $Zn^{2+}$ , és totalment extracel·lular i s'uneix a la membrana per una ancoratge de GPI en l'extrem C-terminal. També existeix en forma soluble, en trencar-se aquesta unió (Figura I-6).

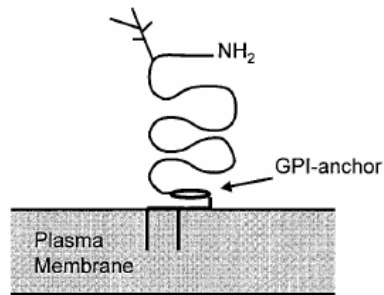


Figura I-5: Estructura de la fosfatasa alcalina

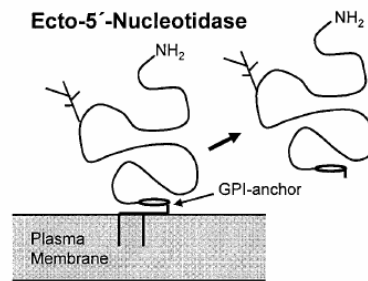


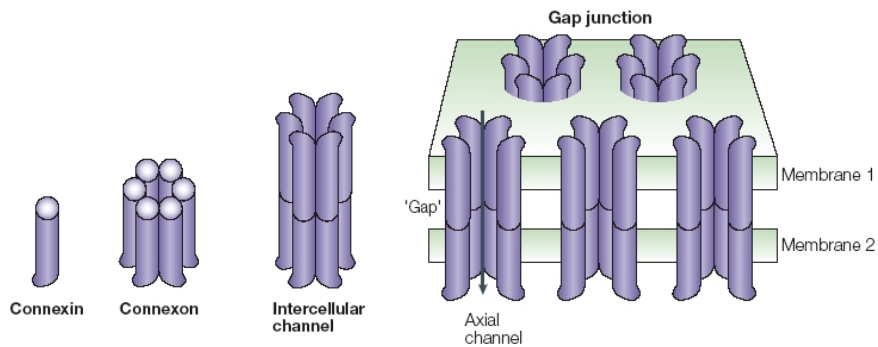
Figura I-6: Estructura de l'ecto-5'-nucleotidasa

## 2. Connexines

### 2.1 Unions gap i hemicanals

Les **unions gap** són canals intercel·lulars que permeten l'intercanvi directe d'ions, metabòlits i altres petites molècules (< 1 kDa) i la comunicació elèctrica entre els citoplasmes de cèl·lules veïnes. Estan formades per dues subunitats multimèriques anomenades **hemicanals** o **connexons**, situades una en cada una de les membranes de les dues cèl·lules adjacents. Cada hemicanal està format per sis proteïnes anomenades **connexines** (Figura I-7), que es descriuen utilitzant una "**Cx**" seguida del pes molecular aproximat de la proteïna. Els connexons homomèrics estan formats per sis connexines idèntiques i els connexons heteromèrics estan formats per connexines diferents. Els connexons homomèrics i heteromèrics poden formar unions gap homotípiques (dos connexons idèntics) o heterotípiques (dos connexons homomèrics o heteromèrics diferents) (Kumar i Gilula, 1996). Les propietats elèctriques i la

permeabilitat de les unions gap depenen de la composició de les seves subunitats (Bennett i Zukin, 2004).



**Figura I-7: Connexines, connexons i unions gap.** L'esquema mostra la relació entre un monòmer de connexina, l'ensamblatge hexamèric de connexines per formar un connexó i la unió de dos connexons per formar un canal intercel·lular o unió gap (Extret de Goodenough i Paul, 2003).

Durant molt temps es va creure que els hemicanals es mantenen tancats fins que s'acobraven amb un altre hemicanal d'una cèl·lula adjacent per formar una unió gap, però, en l'última dècada, un gran nombre de dades han documentat l'existència d'hemicanals que, a més a més de servir com a precursors en la formació d'unions gap, poden funcionar com a canals iònics transmembrana regulables (revisat per Ebihara, 2003; Goodenough i Paul, 2003; Saez et al., 2003b; Saez et al., 2005). Al 1991, Paul et al., van descriure per primer cop l'obertura d'hemicanals en oòcits de *Xenopus* que expressaven la Cx46. Poc després, al 1992, De Vries i Schwartz van publicar un estudi sobre els hemicanals de les cèl·lules horitzontals de la retina dels silurs. Com a conseqüència d'aquests primers treballs, actualment s'han caracteritzat un gran nombre de corrents iònics d'hemicanals de diferents connexines expressades en oòcits de *Xenopus* o en línies

cel·lulars de mamífers (Barrio et al., 1991; Ebihara et al., 1993; Gupta et al., 1994; Ebihara et al., 1995; Ebihara, 1996; Li et al., 1996; Trexler et al., 1996; Kondo et al., 2000; Quist et al., 2000; Plotkin et al., 2002; Stout et al., 2002; Valiunas, 2002).

Els hemicanals són canals iònics de membrana d'alta conductància. Per exemple, la conductància unitària per la Cx32 és de 90 pS (Gomez-Hernández et al., 2003) i per la Cx43 de 220 pS (Contreras et al., 2003). Quan s'obren poden actuar com a conductes per al pas de diverses molècules com l'ATP, NAD<sup>+</sup>, glutamat, prostaglandines o poliamines (Bruzzone et al., 2001; Bennett et al., 2003, Ebihara et al., 2003; Enkvetchakul et al., 2003; Goodenough i Paul, 2003; Ye et al., 2003; Cherian et al., 2005).

### **2.1.1 Obertura dels hemicanals**

Tot i que l'obertura dels hemicanals en condicions de repòs és poc freqüent, s'han descrit hemicanals funcionals en molts tipus cel·lulars diferents regulats per diferents factors:

- Els hemicanals estan tancats a concentracions milimolars normals de calci extracel·lular, però s'obren quan el calci disminueix (Thimm et al., 2005). Concentracions baixes de calci extracel·lular estimulen l'obertura d'hemicanals formats per la Cx38 endògena en els oòcits de *Xenopus* (Ebihara, 1996; Enkvetchakul et al., 2003) i per la Cx43 en miòcits (John et al., 1999; Kondo et al., 2000), en astròcits (Hofer i Dermietzel, 1998; Stout et al., 2002) i en osteoblasts (Romanello i D'Andrea, 2001).

- L'estimulació mecànica indueix l'obertura d'hemicanals formats per la Cx43 en cultius d'astròcits (Stout et al., 2002) i per la Cx46 (Bao et al., 2004).
- La droga antimalàrica quinina potencia l'activació dels hemicanals en neurones de la retina (Malchow et al., 1994) i dels hemicanals endògens dels oòcits de *Xenopus* (Ripps et al., 2002).
- La despolarització de la membrana produeix l'obertura de diversos hemicanals com els formats per la Cx32 i per la Cx26 expressades de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* (Barrio et al., 1991), per la Cx46 (Trexler et al., 1996) o per la Cx45 transfectada en cèl·lules de mamífer (Valiunas, 2002).
- La inhibició metabòlica augmenta la permeabilitat dels astròcits per les molècules que poden passar a través de les unions gap degut a que produeix una obertura dels hemicanals formats per la Cx43 en aquestes cèl·lules (Contreras et al., 2002).
- Una invasió per *Shigella* en cèl·lules epitelials produeix l'obertura d'hemicanals formats per la Cx26 provocant l'alliberació d'ATP a través d'ells (Tran Van Nhieu et al., 2003).
- La presència de determinats cations monovalents extracel·lulars potencia els corrents dels hemicanals en oòcits que expressen la Cx50 (Srinivas et al., 2006).

### **2.1.2 Tancament dels hemicanals**

El tancament dels hemicanals s'ha observat després de l'aplicació de cations trivalents com el lantà, o el gadolini, o del

tractament amb bloquejants de les unions gap com l'octanol, l'heptanol, la carbenoxolona, l'oleamida, l'halotà i l'àcid glicirretínic. L'acidificació intracel·lular també tanca els hemicanals formats per diverses connexines, com la Cx38 (Ripps et al., 2002), la Cx46 (Trexler et al., 1996) o la Cx50 (Zampighi et al., 1999). Per altra banda, alguns bloquejants de canals de clorur, com l'àcid flufenàmic o l'àcid niflúmic també poden inhibir els hemicanals endògens dels oòcits de *Xenopus*, formats per la Cx38, i els hemicanals formats per la Cx50 i la Cx46 expressades en oòcits de *Xenopus* (Eskandari et al., 2002). Finalment, <sup>43</sup>gap 26 i <sup>43</sup>gap 27, pèptids mimètics per la nansa extracel·lular de la Cx43, poden bloquejar aquesta connexina transfectada en cèl·lules HeLa (Braet et al., 2003a) i <sup>32</sup>gap 24 i <sup>32</sup>gap 27 bloquegen específicament els hemicanals formats per la Cx32 (De Vuyst et al., 2006).

## **2.2 Aspectes generals i estructura de les connexines**

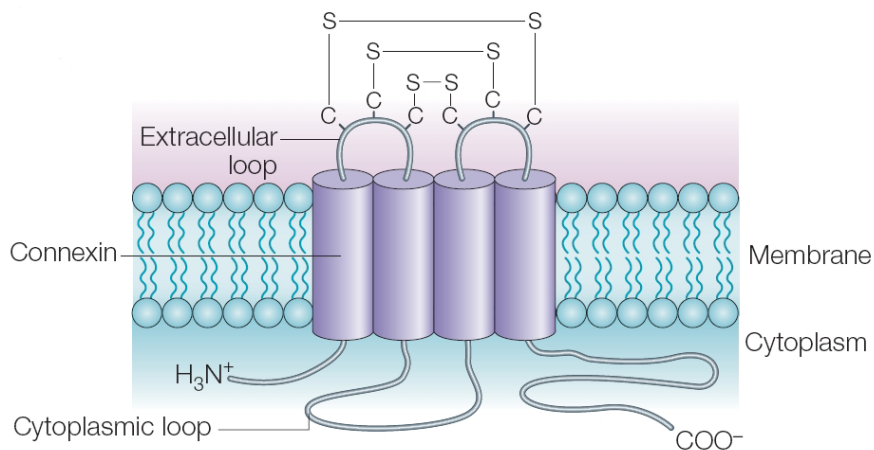
Fins ara, s'han descrit 20 connexines de ratolí i 21 humanes (Willecke et al., 2002; Söhl i Willecke, 2003), amb un pes molecular que va des de 26 a 62 KDa. S'han identificat en tots els òrgans i teixits de vertebrats i, en la majoria, s'ha trobat expressió de més d'un tipus de connexina (revisat per Laird, 2006).

En invertebrats, les proteïnes que formen els canals intercel·lulars es van anomenar innexines (Phelan et al., 1998). Aquestes no tenen homologia de seqüència amb les connexines, tot i que sí que presenten una estructura molt similar i les mateixes funcions. Recentment, homòlegs de les innexines s'han descrit en diferents grups, inclosos els vertebrats, i s'han reclassificat en una



família de proteïnes més gran anomenades pannexines (Panchin et al., 2000; Panchin, 2005).

L'estructura de les connexines presenta quatre dominis transmembrana, dues nanses extracel·lulars i una intracel·lular, amb els extrems amino i c-terminal situats a la part intracel·lular (Figura I-8). Les dues nanses extracel·lulars es troben altament conservades i uneixen el primer domini transmembrana amb el segon i el tercer amb el quart. També s'uneixen entre sí mitjançant ponts disulfur. La presència dels residus de cisteïna conservats en cada una de les nanses és molt important per l'ancoratge de la proteïna. La nansa intracel·lular és molt variable tant en seqüència com en mida i connecta el segon domini transmembrana amb el tercer. L'extrem amino terminal citoplasmàtic és curt, d'uns 20 aminoàcids, i l'extrem citoplasmàtic carboxi terminal és de mida variable (18 aminoàcids en la Cx26, 156 aminoàcids en la Cx43 i 275 aminoàcids en la Cx57), i la seva llargada determina la mida total de la proteïna.

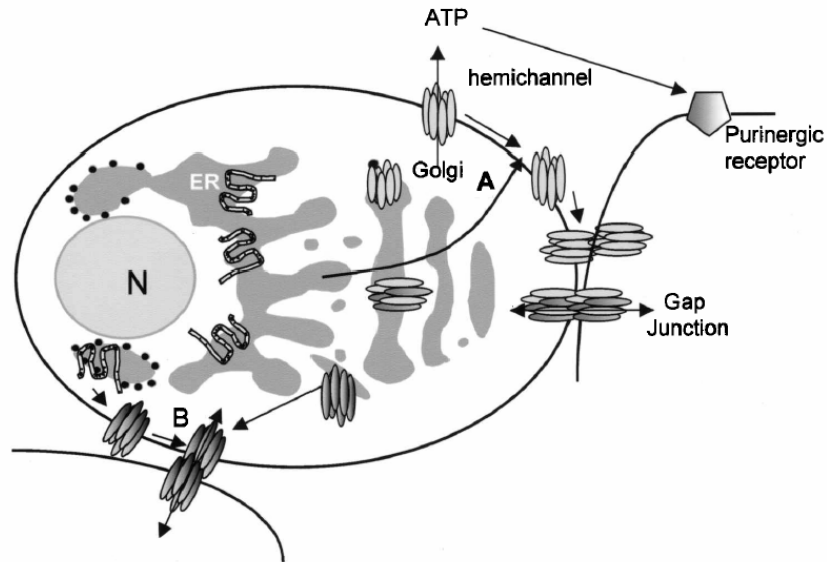


**Figura I-8: Esquema de l'estructura d'una connexina.** Podem observar els quatre dominis transmembrana que presenta, dues nanses extracel·lulars i els

extrems amino terminal i carboxi terminal situats a la part intracel·lular de la proteïna (Extret de Söhl et al., 2005).

## **2.4 Formació i degradació de les connexines**

Les connexines tenen un cicle de vida de poques hores. L'RNA missatger que codifica per la connexina va des del nucli fins al reticle endoplasmàtic, on es tradueix i es forma el connexó. A partir d'aquí, s'han descrit dues vies diferents per a la inserció del connexó en la membrana plasmàtica (Martin et al., 2001): una via secretora, sensible a Brefeldina A, una droga que trenca el compartiment de Golgi, i una via alternativa, sensible al nodocazol, una droga que trenca els microtúbuls. La majoria de les connexines segueixen la via secretora o exocítica, per la qual van al compartiment de Golgi i són transportades en vesícules fins a la membrana plasmàtica. La connexina 26, però, segueix la via alternativa i va des del reticle endoplasmàtic directament a la membrana de la cèl·lula sense passar pel compartiment de Golgi (Ahmad et al., 2002). Un cop es troben a la membrana plasmàtica, els hemicanals poden estar lliures o bé ajuntar-se amb un hemicanal d'una cèl·lula adjacent, en una zona de contacte entre dues cèl·lules, per formar una unió gap (revisat per Laird, 2006).



**Fig 1-9: Diferents vies de formació i transport dels hemicanals fins a la membrana plasmàtica.** (A) En la via secretora clàssica, les connexines són traduïdes en el reticle endoplasmàtic i inserides a la membrana després del seu pas a través del compartiment de Golgi. (B) En la via alternativa, utilitzada majoritàriament per la Cx26, el compartiment de Golgi no està implicat i el pas a la membrana plasmàtica es fa directament des del reticle endoplasmàtic (Extret de Evans i Martin, 2002).

La degradació de les connexines es produeix en els lisosomes i en els proteosomes i és dependent d'ubiquitina (revisat per Berthoud et al., 2004). Les unions gap s'interioritzen formant una estructura anular anomenada connexosoma que, mitjançant la seva interacció amb filaments d'actina, és portada fins als lisosomes. Per altra banda, les connexines mal plegades o els hemicanals ubiquitinitzats són degradats en els proteosomes.

## 2.5 Expressió de Connexines en el Sistema Nerviós

### Central

Fins ara, s'han identificat al menys sis connexines (Cx26, Cx29, Cx30, Cx32, Cx36, Cx43) formant unions gap en el sistema nerviós central (Taula I-3). Cinc connexines més (Cx31, Cx37, Cx45, Cx47, Cx57) s'han identificat en teixit neural (Nagy et al., 2004). Les unions gap entre neurones estan formades bàsicament per Cx36. Tot i això, depenent del tipus de neurona, també poden estar formades per Cx45 i Cx57 (Söhl et al., 2005). Per altra banda, les cèl·lules de la glia (astròcits i oligodendròcits), expressen Cx43, Cx30 i Cx26 i Cx32, Cx29 i Cx47, respectivament (Nagy et al., 2004 i Theis et al., 2005).

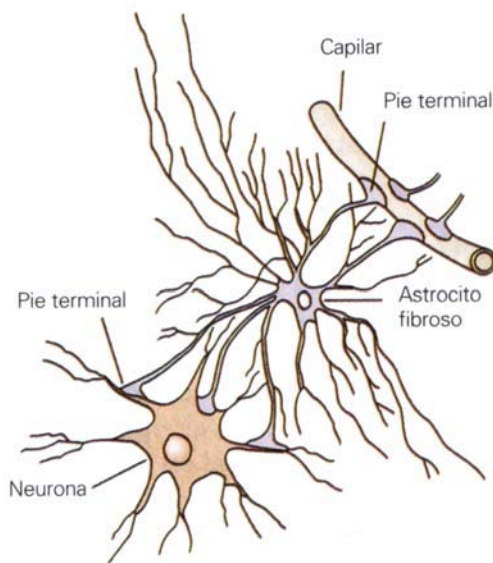
Cell Type	Connexin	Citation
<b>Neurons</b>		
Neocortex	Cx36	Belluardo et al., 2000; Rash et al., 2000, 2001
Neocortex, P1-P14, adult CA3, cerebellum	Cx45	Condorelli et al., 2003; Maxeiner et al., 2003
Inferior olive	Cx36	Belluardo et al., 2000
Mitral cells, olfactory bulb	Cx36	Belluardo et al., 2000
	Cx43, Cx45	Miragall et al., 1996; Zhang et al., 2000; Zhang and Restrepo, 2002
Motoneurons	Cx36, Cx43, Cx47	Chang et al., 1999, 2000
Locus coeruleus	Cx43	Alvarez-Maubecin et al., 2000
<b>Retina</b>		
Rods, cones, All amacrine cells	Cx36	Deans et al., 2002
Horizontal cells	Cx57	Massey et al., 2003
Astrocytes	Cx43, Cx26, Cx30	Nagy et al., 2003a, 2003b
Oligodendrocytes	Cx32	Nagy et al., 2003a, 2003b
	Cx29 (probably does not mediate coupling)	Altevogt et al., 2002; Nagy et al., 2003a, 2003b
Microglia	Cx47	Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003
	Cx43	Eugenin et al., 2001
	Cx36	Parenti et al., 2002

**Taula I-3: Connexines expressades en les cèl·lules del sistema nerviós central de mamífer** (extret de Bennett i Zukin, 2004).

#### 2.5.1 Expressió de connexines en astròcits

Una bona part del les cèl·lules glials en el SNC són astròcits. Tenen funcions molt importants en el desenvolupament del sistema nerviós, en la regulació de les concentracions extracel·lulars d'ions, metabòlits o neurotransmissors i de suport a

la funció sinàptica i neuronal. Mitjançant els seus peus terminals són capaços d'unir-se per una banda l'endoteli dels capil·lars sanguinis i per altra banda a les neurones i actuar de cèl·lula d'unió entre ells, fent de barrera i regulant el pas de nutrients i altres substàncies cap a les neurones (Figura I-10).

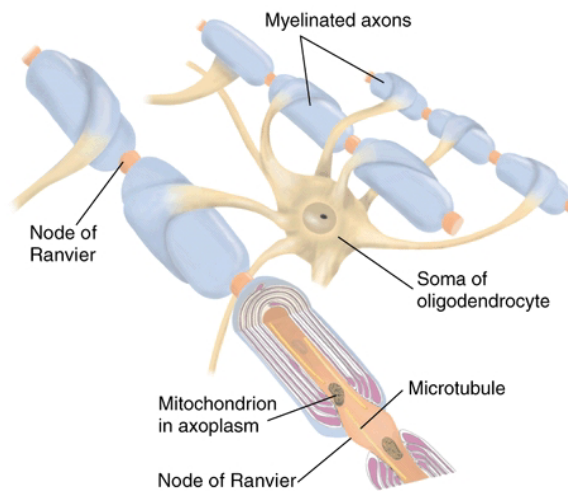


**Figura I-10: Imatge d'un astròcit.** Es mostren els peus terminals que el connecten tant amb els capil·lars sanguinis com amb les neurones. A més a més, la gran quantitat de ramificacions li serveixen per contactar amb astròcits propers i formar una xarxa de comunicació important per a la regulació de la homeòstasi neuronal. (Extret de Kandel et al., 2000).

A més a més, els astròcits estan interconnectats els uns amb els altres mitjançant unions gap. La Cx43 és la connexina majoritària en els astròcits, però també s'ha descrit expressió de la Cx26 o la Cx30 (Nagy et al., 2004; Theis et al., 2005). Les tres connexines també estan presents en les unions gap que es formen entre els astròcits i els oligodendròcits.

### 2.5.2 Expressió de connexines en oligodendròcits

Els oligodendròcits formen les beines de mielina que envolten els axons en el sistema nerviós central, augmentant la velocitat de propagació del potencial d'acció al llarg de l'axó (Figura I-11). La connexina 32 va ser la primera connexina descrita en els oligodendròcits. Es localitza al llarg de la fibra de mielina (Dermietzel et al., 1989), mentre que la Cx29 (homòloga a la Cx31.3 humana), també expressada en els oligodendròcits, s'ha detectat en les regions internodals i juxtaparanodals de la beina de mielina (Altevogt et al., 2002). Finalment, la Cx47 es troba present en la part oligodendrocítica de les unions gap que es formen entre els oligodendròcits i els astròcits (Odermatt et al., 2003; Menichella et al., 2003).



**Figura I-11: Imatge d'un oligodendròcit formant les beines de mielina en diferents axons.** Extret de <http://homepage.psy.utexas.edu/homepage/class/Psy332/Salinas/Cells/oligo.gif>

## **2.6 Expressió de Connexines en el Sistema Nerviós**

### **Perifèric: la connexina 32.**

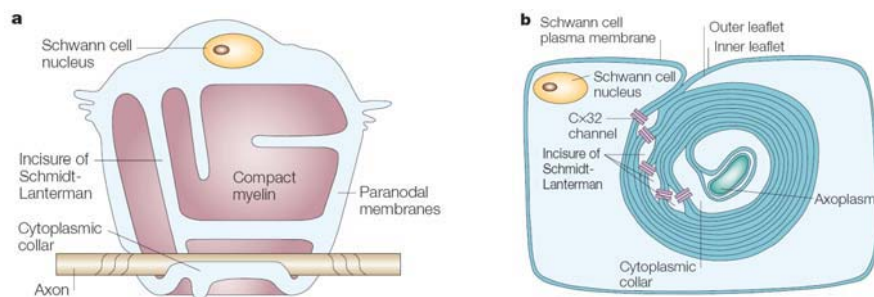
#### **2.6.1 Descripció general de la connexina 32**

La connexina 32 va ser la primera connexina en ser clonada i es va anomenar d'acord amb el pes molecular esperat de la proteïna, 32 KDa. El seu mRNA té aproximadament 1500 pb i està molt conservada, ja que la seqüència de la proteïna humana és idèntica en un 98% a la de rata i ratolí (Kumar i Gilula, 1986; Paul, 1986). A part de formar connexons homomèrics, també pot formar hemicanals heteromèrics amb la Cx26 i unions gap heterotípiques amb la Cx26 i la Cx30 (Harris, 2001). Tot i que la Cx32 abunda majoritàriament al fetge, també s'expressa en altres teixits com el ronyó, l'intestí, els pulmons, la melsa, l'estómac, el pàncreas, l'úter, els testicles, el cervell i els nervis perifèrics.

Mitjançant tècniques electrofisiològiques s'ha vist que la Cx32 és capaç de formar hemicanals funcionals que s'activen per despolarització de la membrana (Castro et al., 1998). Aquests hemicanals tenen una conductància d'aproximadament 90 pS, amb la presència de subestats de 18 pS, i són regulats depenent de la concentració externa de calci (Gómez-Hernández et al., 2003). Recentment, també s'ha descrit que l'augment de calci intracel·lular produeix l'obertura d'hemicanals formats per Cx32, que és inhibida amb bloquejants de les unions gap i amb els pèptids específics per la Cx32 <sup>32</sup>gap27 (s'uneix als residus 110-122 de la segona nansa extracel·lular de la Cx32) i <sup>32</sup>gap24 (s'uneix a una part de la seqüència de la nansa intracel·lular de la Cx32) (De Vuyst et al., 2006).

### 2.6.2 Expressió de connexines en cèl·lules de Schwann

La connexina 32 és la connexina principal de la mielina dels nervis perifèrics (Bergoffen et al., 1993). És molt abundant en les regions paranodals i en les incisures d'Schmidt Lanterman de les cèl·lules de Schwann (Scherer et al., 1995), que produeixen la mielina en el sistema nerviós perifèric (Figura I-12a). Curiosament, la Cx32 no forma unions gap amb les cèl·lules adjacents, sinó que es concentra en aquestes estructures, que són regions de mielina no compacta on el citoplasma queda retingut en cada una de les capes de mielina (Figura I-12b). Aquestes unions gap, que s'han anomenat reflexives, serveixen d'unió entre les successives capes de citoplasma creant una via de comunicació directa entre les capes de mielina més internes i les més externes (Balice-Gordon et al., 1998).



**Figura I-12: Expressió de la Cx32 en les cèl·lules de Schwann del sistema nerviós perifèric.** (a) Cèl·lula de Schwann formant la mielina que envolta l'axó, on podem observar les zones de mielina no-compacta, les incisures d'Schmidt Lanterman i les regions paranodals. (b) Detall de la cèl·lula de Schwann on es mostren les unions gap que forma la Cx32 unint les diferents capes de citoplasma que queden entre les capes de mielina. (Extret de Goodenough i Paul, 2003).



Recentment, s'ha descrit també expressió de Cx29 en cervell i en les cèl·lules de Schwann dels nervis perifèrics, però no en altres teixits, indicant que podria tractar-se d'una connexina específica del teixit neural (Söhl et al., 2001; Altevogt et al., 2002). La Cx29 es troba en les regions juxtapanodals i colocalitza amb la Cx32 en les incisures d'Schmidt Lanterman (Huang et al., 2005).

### **2.6.3 Malaltia de Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X (CMTX)**

La malaltia de Charcot-Marie-Tooth (CMT), també coneguda com a neuropatia hereditària sensorial i motora (HMSN), és un grup heterogeni de neuropaties perifèriques hereditàries que cursen d'una manera crònica i progressiva. La CMT va ser descrita per primera vegada al 1886 per Charcot i Marie (1886) i, independentment, per Tooth (1886), i una família amb la malaltia lligada al cromosoma X va ser descrita per Herringham (1889) poc després. La malaltia de CMT causa una feblesa progressiva i una atròfia dels músculs distals, així com pèrdua sensorial i pèrdua de reflexes. En base a les característiques clíniques, l'histopatologia i les velocitats de conducció nerviosa, menors o majors de 38 m/s, la CMT es va dividir en dos tipus (Dyck i Lambert, 1968a,b): CMT1 (desmielinitzant) i CMT2 (axonal) respectivament. La CMT1 és més comú i apareix en la primera o segona dècada de vida. Biòpsies del nervi d'aquests pacients mostren desmielinització i pèrdua axonal. La CMT2 apareix més tard i s'associa amb pèrdua axonal. Aquests criteris de classificació van anar variant a mida que avançaven els estudis

genètics sobre la malaltia i, actualment, la CMT es divideix tres grans grups (Suter i Scherer, 2003):

- Neuropaties desmielinitzants dominants, autosòmiques o lligades al cromosoma X: CMT1 (CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D i CMTX).
- Neuropaties axonals: CMT2 (CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E i CMT2-P0).
- Neuropaties desmielinitzants autosòmiques recessives: CMT4 (CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F i CMT4).

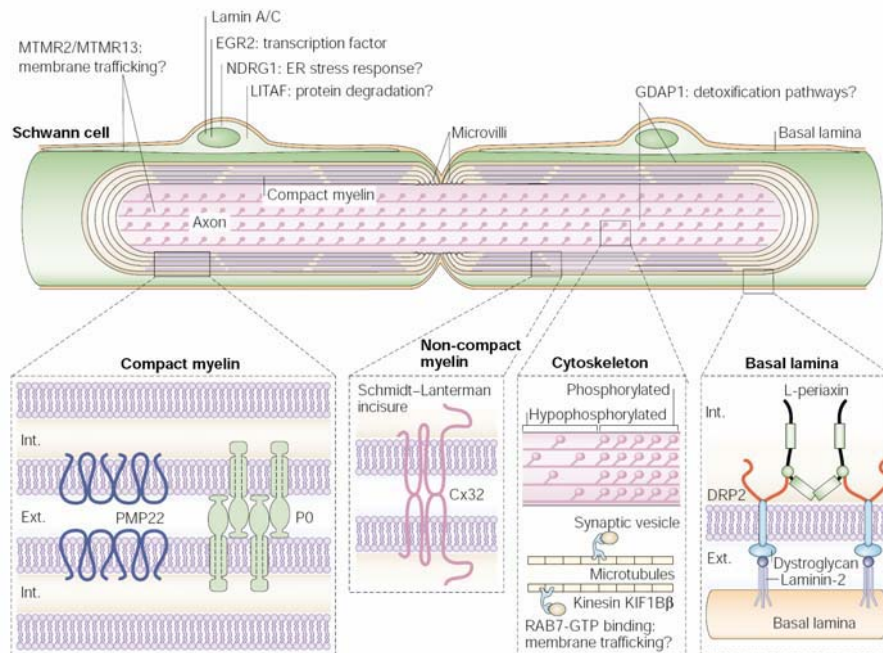
Algun autor (Suter i Scherer, 2003) també inclou en aquesta classificació les neuropaties desmielinitzants severes com el síndrome de Dejerine-Sottas (DSS) o la neuropatia hipomielinitzant congènita (CHN), formant part de el tipus III de CMT (CMT3).

Estudis de lligament van permetre subdividir la CMT1 en quatre formes genètiques:

- **CMT1A:** lligada al cromosoma 17 i produïda majoritàriament per duplicacions de la proteïna perifèrica de la mielina (PMP22) (Yoshikawa et al., 1994). Apareix entre la primera i la segona dècada de vida i es caracteritza per presentar debilitat, atròfia muscular i pèrdua sensorial, començant en els peus i progressant per totes les extremitats.
- **CMT1B:** lligada al cromosoma 1 i produïda per mutacions en la proteïna zero de la mielina (MPZ o P0). El seu curs clínic és molt similar al de la CMT1A, però apareix en edats més joves i es manifesta d'una manera més severa.
- **CMT1C:** lligada al cromosoma 16 i produïda per mutacions en el gen LITAF (lipopolysaccharide-induced tumour-

necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , també anomenat SIMPLE). El fenotip que provoca és similar al de CMT1A. Les velocitats de conducció nerviosa disminueixen fins a 20 m/s.

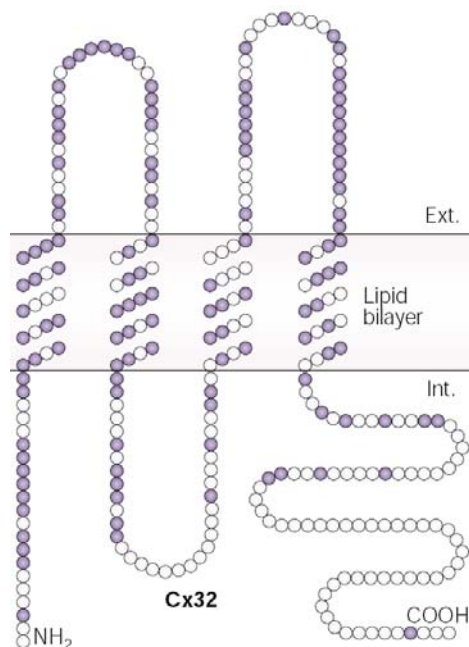
- **CMT1X**: lligada al cromosoma X i produïda per mutacions en la connexina 32 (Cx32) (Figura I-13). És similar a la CMT1A, però l'atròfia distal és més pronunciada. En totes les edats, els homes es veuen més afectats que les dones.



**Figura I-13: Esquema de l'organització molecular dels axons mielinitzats, destacant les proteïnes implicades en la malaltia de Charcot-Marie-Tooth (CMT).** (Extret de Suter i Scherer, 2003).

La CMT afecta un de cada 3000 individus, un 10-20 % dels quals tenen la CMTX, fent que sigui la forma de la malaltia més comú després de la CMT1A (Ionasescu et al., 1993). En homes, els símptomes comencen cap a l'adolescència i es van agreujant cap a la tercera dècada de vida. Les dones portadores

normalment estan menys afectades que els homes en la mateixa edat i algunes poden ser clínicament asimptomàtiques, tot i que tenen la velocitat de conducció nerviosa disminuïda. Les biòpsies de nervis de pacients amb CMTX mostren tant pèrdua axonal com desmielinització (beines de mielina molt primes, formació de bulbs indicant la degeneració de la mielina i collars periaxonaux més grans) i les velocitats de conducció nerviosa estan lleugerament disminuïdes (entre 25 i 40 m/s en homes i entre 25 i 50 m/s en dones heterozigotes), essent 50 m/s una velocitat considerada normal (Nicholson i Nash, 1993). Des que es van descriure les primeres mutacions de la Cx32 (Bergoffen et al., 1993), s'han identificat més de 240 mutacions diferents en la Cx32 associades a la CMTX (Nelis et al., 1999), presents en tots els dominis de la proteïna (Figura I-14).



**Figura I-14: Localització de les mutacions en la proteïna Cx32 que causen la malaltia de Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X** (Extret de Suter i Scherer, 2003).

La majoria d'aquestes mutacions causen pèrdua de funció. Molts mutants no formen canals funcionals quan s'expressen en oòcits de *Xenopus* o en cèl·lules de mamífer i altres formen canals funcionals però amb les característiques biofísiques alterades (Abrams et al., 2000). A més a més, alguns mutants relacionats amb la malaltia causen desmielinització tot i que poden formar canals completament funcionals (Castro et al., 1999).

Es coneix poc sobre els efectes de les mutacions de la Cx32 en el sistema nerviós central de pacients amb CMTX (Paulson et al., 2002; Takashima et al., 2003), però es creu que les conseqüències fisiològiques de les mutacions en la Cx32 podrien ser compensades més fàcilment en els oligodendròcits del SNC que en les cèl·lules de Schwann del SNP.

#### **2.6.4 Ratolins Knock-out per la connexina 32**

Tot i que els primers experiments, fets amb ratolins joves, suggerien que els ratolins knock-out per la Cx32 no presentaven cap tipus de neuropatia (Nelles et al., 1996), experiments posteriors confirmen que aquests ratolins desenvolupen una neuropatia perifèrica progressiva, que comença als tres mesos d'edat i que afecta d'una manera més severa les fibres motores que les sensorials (Anzini et al., 1997; Scherer et al., 1998). Igual que els humans que tenen la malaltia, els ratolins knock-out també presenten desmielinització (beines de mielina molt primes, formació de bulbs indicant la degeneració de la mielina i collars periaxonals més grans), en canvi, les velocitats de conducció nerviosa només estan reduïdes lleugerament (Scherer et al., 1998). A part dels canvis esperats en el sistema nerviós perifèric,

també s'ha observat un fenotip anormal en el fetge dels ratolins, un òrgan on la Cx32 és molt abundant, on s'ha descrit una alliberació reduïda de glucosa hepàtica després d'una estimulació simpàtica (Stümpel et al., 1998). A més a més, aquests animals tenen una probabilitat més alta de patir formació de tumors hepàtics espontanis (Temme et al., 1997). També presenten una secreció més gran d'amilasa en el pàncreas exocrí (Chanson et al., 1998). Per contra, en humans amb mutacions de Cx32, no s'ha descrit cap tipus d'anomalia en la funció hepàtica ni augment en la incidència de càncers (revisat per White i Paul, 1999).

## **2.7 Expressió de connexines en oòcits de *Xenopus laevis***

Fins ara, s'han identificat quatre connexines en *Xenopus*: Cx43 (Gimlich et al., 1988), Cx30 (Gimlich et al., 1990), Cx41 (Yoshizaki et al., 1995) i Cx38 (Ebihara et al., 1989). De les quatre, només la Cx38 és una connexina materna i es troba present en els oòcits. L'RNA de la Cx38 té aproximadament 1600 pb, s'expressa en oòcits i la seva expressió es manté en els embrions primerencs fins a la neurulació (Ebihara et al., 1989; Gimlich et al., 1990). Recentment, s'han caracteritzat altres connexines maternes (Cx31 i Cx43.4), que estarien inactives en els oòcits i augmentarien la seva activitat en els embrions primerencs (Landesman et al. 2003).

## **3. Mecanismes implicats en l'alliberació d'ATP**

L'estudi de l'alliberació d'ATP ha guanyat molt interès en l'última dècada i és ben conegut que les cèl·lules excitable alliberen

ATP que actua com a missatger o neurotransmissor en diferents cèl·lules o teixits. Posteriorment, però, també s'ha posat de manifest el fet que les cèl·lules no excitable també alliberen ATP en resposta a una àmplia varietat d'estímuls: estímuls mecànics (Stout et al., 2002), estrès (Cherian et al., 2005), hipotonicitat (Mitchell et al., 1998; Boudreault i Grygorczyk, 2004), distensió (Knight et al., 2002), elevació intracel·lular de l'inositol trifosfat (InsP<sub>3</sub>) (Braet et al., 2003b) o exposició a concentracions baixes de calci extracel·lular (Arcuino et al., 2002). Els mecanismes d'alliberació d'ATP involucrats són igualment diversos (revisat per Lazarowsky et al., 2003) i inclouen: alliberació vesicular, CD39, hemicanals de connexines, CFTR, glicoproteïna P o canals aniònics.

### **3.1 Exocitosi**

En les neurones del sistema nerviós central i perifèric, l'ATP colocalitza i és cosecretat amb els neurotransmissors convencionals com les catecolamines o l'acetilcolina. A part de les neurones, les cèl·lules cromafins, les plaquetes i cèl·lules secretores, inclosos els mastòcits i els acinis pancreàtics, controlen l'alliberació d'ATP, neurotransmissors i altres missatgers extracel·lulars, empaquetant-los en grànuls especialitzats que s'anomenen vesícules sinàptiques, grànuls cromafins o grànuls densos (Evans et al., 1992; Holmsen, 1994; Burnstock, 1997; Sorensen i Novak, 2001). En els grànuls cromafins de la medulla adrenal la concentració d'ATP arriba fins 100 mM en comparació amb la concentració de 3-5 mM en el citoplasma. Altres treballs també han descrit alliberació vesicular d'ATP en oòcits de *Xenopus* en resposta a estímuls mecànics (Maroto i

Hamill, 2001), en astròcits en condicions de concentracions fisiològiques de calci (Coco et al., 2003) i en cèl·lules endotelials en resposta a estrès osmòtic (Bodin i Burnstock, 2001a).

### **3.2 CD39**

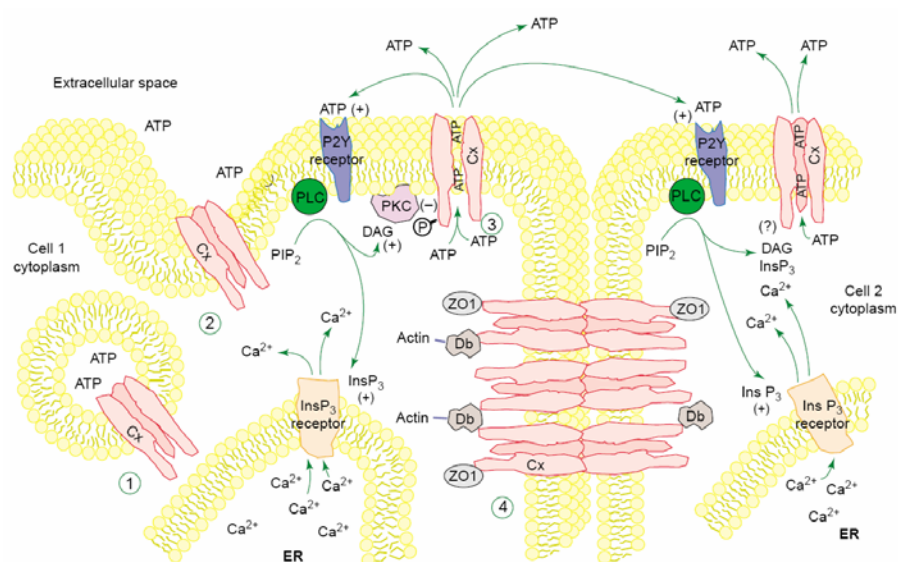
En resultats anteriors del nostre laboratori (Bodas et al., 2000) es va observar, en oòcits de *Xenopus*, que durant l'aplicació de polsos hiperpolaritzants en els oòcits, la permeabilitat per l'ATP era 4000 vegades més alta que la del clorur. El corrent que es produïa durant la hiperpolarització era sensible a gadolini, suggerint que canals activats per estirament de la membrana podrien estar-hi implicats. A més a més, l'expressió de la proteïna CD39 en els oòcits augmentava el corrent generat per l'alliberació d'ATP, suggerint que la mateixa proteïna podria estar involucrada tant en l'alliberació d'ATP com en la seva degradació (Abraham et al., 2001).

### **3.3 Connexines**

L'alliberació d'ATP regulada per unions gap es va suggerir per primera vegada en línies cel·lulars (Cotrina et al., 1998) on es va veure que si s'augmentava l'expressió de connexines en cèl·lules C6 i HeLa, deficientes en unions gap, es potenciava l'alliberació d'ATP i que la senyalització intercel·lular de calci en aquestes cèl·lules era sensible a la manipulació d'ATP extracel·lular. En treballs posteriors es va corroborar la importància de l'ATP extracel·lular per a la propagació de les onades de calci en astròcits (Guthrie et al., 1999; Cotrina et al., 2000) i en osteoblasts (Jorgensen et al., 2002). Finalment, es va descriure que l'alliberació d'ATP a través d'hemicanals formats



per Cx43 en astròcits (Stout et al., 2002) era un dels mecanismes implicats en la senyalització intercel·lular de calci. En aquest model (Figura I-15), l'ATP alliberat al medi extracel·lular a través dels hemicanals, activaria els receptors purinèrgics P2 de la cèl·lula adjacent, estimulando la producció de  $\text{InsP}_3$  i augmentant la concentració intracel·lular de calci. Per un mecanisme encara no descrit, això activaria els hemicanals, permetent que l'ATP del citosol sortís de la cèl·lula. Així, el cicle tornaria a començar, propagant l'onada de calci (revisat per Stout et al., 2004).



**Figura I-15: Model d'alliberació d'ATP a través d'hemicanals i propagació de les onades de calci.** Un estímul com l'estrès mecànic, causa l'activació de la fosfolipasa C (PLC), la síntesi de  $\text{InsP}_3$  i la mobilització de calci intracel·lular. Els hemicanals s'obren i s'allibera ATP. L'unió de l'ATP a un receptor purinèrgic 2Y (P2Y) de la cèl·lula veïna, fa que s'iniciï la propagació de l'onada de calci (extret de Stout et al., 2004).

Recolzant aquest model, trobem les següents observacions: en primer lloc, l'expressió de connexines exògenes potencia l'alliberació d'ATP; en segon lloc, l'alliberació d'ATP induïda per concentracions baixes de calci extracel·lular està suprimida per bloquejants dels hemicanals; i finalment, hi ha una bona correlació entre l'alliberació d'ATP i l'activitat dels hemicanals.

Per contra, l'alliberació d'ATP activada per estímuls mecànics no es veu afectada pels inhibidors dels hemicanals (Coco et al., 2003; Anderson et al., 2004), indicant que seria possible que hi haguessin diferents mecanismes que reguessin l'alliberació d'ATP en resposta a diferents estímuls.

A més a més, recentment s'han publicat nous resultats (Suadicani et al., 2006) que indiquen que els bloquejants de les unions gap també són antagonistes dels receptors P2X<sub>7</sub> i que aquests receptors, i no els hemicanals de Cx43, són els que contribueixen a l'alliberació d'ATP que amplifica les onades de calci en astròcits.

A part de tots els estudis citats en cèl·lules glials, també s'ha descrit alliberació d'ATP a través d'hemicanals relacionada amb la senyalització per calci en altres tipus cel·lulars. En osteoblasts, l'estimulació mecànica de cèl·lules que expressen Cx43 dona lloc a una onada de calci que és inhibida per suramina i apirasa, que fan disminuir els nivells d'ATP, i per bloquejants dels hemicanals, suggerint que tant els hemicanals com l'ATP hi estan implicats (Romanello et al., 2003). En cèl·lules endotelials bovines de la còrnea, les onades de calci i l'alliberació d'ATP que es produeix després d'un estímul mecànic és inhibida per bloquejants dels hemicanals (Gomes et al., 2005).

Finalment, en un altre context, s'ha descrit alliberació d'ATP a través d'hemicanals en l'epiteli pigmentari de la retina regulant la proliferació de la retina neural (Pearson et al., 2005) i en la còclea controlant la sensibilitat de la funció auditiva en mamífers (Zhao et al., 2005).

### **3.4 Proteïnes de la família ABC: CFTR i glicoproteïna P**

Alguns estudis donen suport a la teoria que els membres de la família de transportadors ABC (ATP binding cassette), com la CFTR i la glicoproteïna P, funcionen com a canals iònics permeables a l'ATP, però altres estudis suggereixen el contrari.

D'una banda, s'ha descrit alliberació d'ATP en cèl·lules glials que és inhibida per bloquejants de les proteïnes de la família ABC, suggerint així la seva implicació en l'alliberació d'ATP en aquestes cèl·lules (Ballerini et al., 2003). A més a més, també s'ha vist que tant la proteïna CFTR com el transport vesicular, estan implicats en l'alliberació d'ATP en cèl·lules epitelials de la retina. (Reigada i Mitchell, 2004). En eritròcits humans i de conill també s'ha relacionat la presència de CFTR amb l'alliberació d'ATP induïda per deformació mecànica (Sprague et al., 1998). En l'epiteli de les vies aèrees en humans, CFTR regula la concentració intracel·lular de calci mitjançant alliberació d'ATP, que activa els receptors purinèrgics de les cèl·lules epitelials (Walsh et al., 2001). En la línia cel·lular de ratolí C1271 transfectada amb CFTR humana, també s'ha descrit la permeabilitat per l'ATP de les proteïnes CFTR i glicoproteïna P (Prat et al., 1996). La glicoproteïna P també s'ha relacionat amb l'alliberació d'ATP en línies cel·lulars de colon humà (Abraham et al., 1997) i en cèl·lules hepàtiques (Roman et al., 2001).

Per altra banda, diferents treballs posen en dubte la permeabilitat de les proteïnes ABC per l'ATP. En cèl·lules epitelials activades mitjançant estímuls mecànics, els nivells d'expressió de CFTR i els nivells d'AMPC del medi no varien la concentració externa d'ATP (Grygorczyc i Hanrahan, 1997). L'activació per hipotonicitat de l'alliberació d'ATP en una línia de cèl·lules epitelials humanes no es veu afectada per inhibidors dels canals de clorur ni per l'absència de CFTR (Hazama et al., 1999). Tot i que existeix alliberació d'ATP en resposta a estímuls mecànics en les cèl·lules epitelials de les vies aèrees que pot activar els receptors purinèrgics en aquestes cèl·lules, els nivells d'ATP mesurats no varien entre individus amb fibrosi quística i individus normals, indicant que l'alliberació d'ATP és independent de CFTR (Watt et al., 1998; Donaldson et al., 2000).

### **3.5 Canals aniònics**

Al contrari que en el cas anterior, molts treballs recolzen unànimement la implicació de canals aniònics de diferent tipus en l'alliberació d'ATP. En les cèl·lules d'una línia cel·lular de càncer de pròstata estimulades per hipotonicitat, l'alliberació d'ATP és inhibida mitjançant el tractament amb bloquejants dels canals aniònics, fet que suggereix la relació d'aquests canals amb l'alliberació d'ATP (Sauer et al., 2000). Els canals aniònics regulats per volum (VRAC) activats per hipotonicitat alliberen ATP en una línia de cèl·lules epitelials d'aorta bovina (Hisadome et al., 2002). Altres treballs han descrit que els canals aniònics d'alta conductància també són permeables a l'ATP en la màcula densa (Bell et al., 2003) i en cèl·lules mamàries d'una

línia cel·lular de ratolí activades per hipotonicitat (Sabirot et al. 2001).

#### **4. El model experimental de *Xenopus laevis***

Com a model experimental, en aquest treball hem utilitzat oòcits de la granota sud-africana *Xenopus laevis*, adquirida en el Centre d'Elevage de Xenopus (Montpellier, France).

A l'estabulari del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona, es mantenen en gàbies individuals amb aigua amb el 2% de NaCl i s'alimentaven amb cor de vedella.

##### **4.1 Avantatges de la utilització d'aquest model**

El model de *Xenopus laevis* és àmpliament utilitzat en electrofisiologia per a l'expressió i l'estudi de canals iònics, receptors i transportadors de membrana degut als nombrosos avantatges que presenta.

Una de les característiques més rellevants de l'oòcit és la possibilitat d'obtenir moltes cèl·lules d'un mateix donador sense necessitat de sacrificar la granota en cada operació. Un mateix donant pot ser utilitzat diverses vegades.

Un altre avantatge és la possibilitat d'obtenir, en els ovaris d'un mateix individu, oòcits de l'estadi embrionari que ens interressi durant tot l'any, ja que la granota *Xenopus laevis* es caracteritza per la seva capacitat d'iniciar cicles sexuals a qualsevol època de l'any, presentant una ovulació asincrònica dels oòcits. A més a més, els oòcits de *Xenopus* són cèl·lules fàcils de manipular degut a la seva mida (1-1.5 mm de diàmetre) i molt senzilles de mantenir.

D'altra banda, aquest sistema suposa una eina molt útil degut a la seva capacitat de sintetitzar i expressar molt eficientment, en la seva membrana proteïnes exògenes a partir de material genètic forani injectat. Aquesta característica ha convertit els oòcits de *Xenopus* en el model d'expressió heteròloga escollit per a l'estudi de receptors, canals iònics i transportadors de membrana. La grandària considerable de la cèl·lula facilita la injecció del material genètic en l'oòcit i permet introduir diversos elèctrodes a través de la seva membrana, la qual cosa facilita els estudis electrofisiològics (Barnard et al., 1982).

## **4.2 Histologia de l'oòcit**

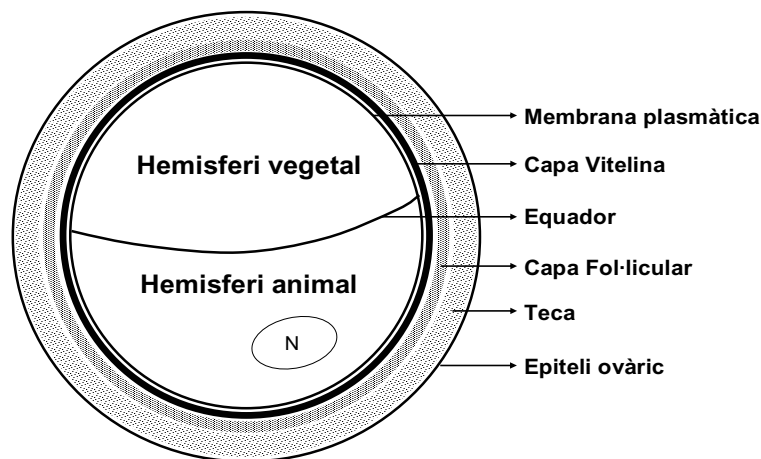
L'ovari de la granota està format per diversos lòbuls o sacs ovàrics que estan units entre si per diversos teixits, principalment teixit connectiu. En la majoria d'estudis d'expressió de proteïnes, així com en els nostres experiments, s'han utilitzat oòcits immadurs dels estadis de major grau de creixement, els estadis V i VI (segons la classificació de Dummont, 1972), principalment per la seva mida més gran.

En aquests estadis embrionaris, els oòcits tenen una mida d'entre 1-1.5 mm de diàmetre i són cèl·lules polaritzades, tant morfològicament com funcionalment. S'hi reconeixen dos hemisferis, l'hemisferi vegetal (de color groguenc) i l'hemisferi animal (de color marró fosc, que conté el nucli) ben diferenciats, separats per una banda central més clara que s'anomena equador.

L'oòcit, tant en l'ovari com quan és separat manualment, no és una estructura aïllada sinó que presenta una sèrie d'envolcalls amb una funció mecànica de protecció i de comunicació de

l'oòcit amb el medi extern. Així doncs, podem diferenciar les següents capes, ordenades de l'interior a l'exterior (Figura I-16):

- Membrana vitelina: Capa acel·lular fibrosa unida a la membrana plasmàtica de l'oòcit i que en recobreix tota la superfície.
- Capa fol·licular: és una capa de cèl·lules nucleades en contacte amb la membrana plasmàtica de l'oòcit a través d'unions gap (Browne et al., 1979; Browne i Werner, 1984) formades per Cx38, que permeten el pas de molècules de fins a 1 KDa i la connexió elèctrica amb l'oòcit. A més a més, les cèl·lules fol·liculars presenten una gran varietat de canals i receptors de neurotransmissors i hormones.
- Teca: és una capa formada per colagen, fibroblasts, cèl·lules musculars llises, vasos sanguinis i fibres nervioses.
- Capa epitelial o teixit ovàric intern: es situa en contacte amb el medi extracel·lular, envoltant totes les capes anteriors.



**Figura I-16: Esquema de la morfologia d'un oòcit de *Xenopus* on es mostren els dos hemisferis i les diferents capes que l'envolten.**

L'existència d'aquestes capes que protegeixen a l'oòcit suposa un problema per a l'estudi de canals i receptors expressats de manera heteròloga, ja que dificulta l'aplicació de les tècniques electrofisiològiques de registre i contamina els resultats degut a la presència dels receptors o canals membrana endògens. Per això s'utilitzen diferents estratègies per tal d'eliminar o desacoblar aquests envolcalls, com són mètodes enzimàtics (tractament amb colagenasa), mecànics o osmòtics. D'aquesta manera aconseguim aïllar l'oòcit de la resta de membranes i podem portar a terme l'estudi electrofisiològic d'una manera fiable.



**OBJECTIUS**



Tot i que la senyalització purinèrgica està present en la majoria d'òrgans i la funció dels receptors P2 és àmpliament estudiada, el mecanisme d'alliberació d'ATP dels diferents tipus cel·lulars no és tan conegut. Degut a la seva càrrega negativa, l'ATP no és capaç de traspasar la membrana plasmàtica i les cèl·lules el secreten per exocitosi de vesícules o grànuls. Tot i això, es creu que l'ATP també s'allibera de les cèl·lules, d'una manera regulada, via rutes proteiques que travessen la membrana plasmàtica. L'estudi d'aquesta altra via d'alliberació d'ATP és, des de fa uns anys, una de les principals línies d'investigació del laboratori. Per tot això, el nostre objectiu general va ser **l'estudi de l'alliberació d'ATP a través de la membrana plasmàtica.**

Estudis previs del nostre laboratori suggerien que, aplicant polsos hiperpolaritzants en la membrana dels oòcits de *Xenopus laevis*, l'ectoenzim NTPDase1 (CD39) podia esdevenir permeable per l'ATP (Bodas et al., 2000). Per estudiar també la implicació d'aquesta NTPDase en l'alliberació d'ATP induïda per estrès hipertònic en oòcits, el nostre primer objectiu va ser **synthetitzar i validar un oligonucleòtid antisentit contra la proteïna CD39** (Capítol 1 de Resultats).

En diferents tipus cel·lulars, com els astròcits o els miòcits, s'havia descrit la implicació dels hemicanals presents en aquestes cèl·lules en l'alliberació d'ATP. L'interès del laboratori en l'estudi de nous mecanismes d'alliberació d'ATP, ens va portar a investigar la permeabilitat per l'ATP dels hemicanals endògens formats per connexina 38 (Cx38) presents en el nostre model experimental, els oòcits de *Xenopus*. Per tant, el nostre segon

objectiu va ser **l'estudi de l'alliberació d'ATP a través dels hemicanals formats per la Cx38** (Capítol 2 de Resultats).

La connexina 32 (Cx32) humana es troba, entre molts altres òrgans, a les cèl·lules de Schwann del Sistema Nerviós Perifèric formant hemicanals. Mutacions en aquesta proteïna donen lloc a una pèrdua de mielina que causa la malaltia senso-motora de Charcot Marie Tooth lligada al cromosoma X (CMTX). El nostre interès per la malaltia i el coneixement d'altres connexines permeables per l'ATP ens va portar a plantejar-nos, com darrer objectiu, **l'estudi de l'alliberació d'ATP a través dels hemicanals formats per la Cx32** (Capítol 3 de Resultats).

## **MATERIALS I MÈTODES**



## 1. Composició de les solucions

<p><u>Ringer Normal (NR):</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM HEPES 10 mM pH 7.4</p> <p><u>Ringer Mg<sup>2+</sup>:</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM HEPES 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM pH 7.4</p> <p><u>Ringer Modificat (MNR):</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM HEPES 10 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.4</p> <p><u>Ringer 0Ca:</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM EDTA 2 mM HEPES 10 mM pH 7.4</p> <p><u>Medi Luria-Bertani (LB):</u></p> <p>Triptona 10% Extracte de llevat 5% NaCl 10% pH 7.0</p>	<p><u>Ringer hipertònic manitol (HRM):</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM HEPES 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM Manitol 360 mM 552 mosmol/L pH 7.4</p> <p><u>Ringer 0Ca- Mg<sup>2+</sup>:</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM EDTA 2 mM HEPES 10 mM pH 7.4</p> <p><u>Barth's:</u></p> <p>NaCl 88 mM KCl 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33 mM CaCl<sub>2</sub> 0.41 mM NaHCO<sub>3</sub> 2.40 mM MgSO<sub>4</sub> 0.82 mM HEPES 20 mM Penicilina G (100 U/ml) Streptomicona (100 µg/ml) pH 7.5</p> <p><u>LB agar:</u></p> <p>Medi LB 15 g/ L Bacto agar</p>
---	--

## **2. Obtenció del material d'injecció**

### **2.1 Obtenció de l'RNA antisentit de CD39**

A partir de seqüències consensus humanes, de rata, de ratolí, de vaca, de gall i de *Torpedo marmorata* es va dissenyar un oligonucleòtid antisentit complementari a l'mRNA de CD39 (antiCD39):

5,-TGTTGGTCAAGTTCAGCATGTAGCCCAG-3

L'oligonucleòtid, sintetitzat per Invitrogen (Barcelona), es va rehidratar en aigua ultrapura i es va injectar (50 nl, 2 mg ml<sup>-1</sup>) en els oòcits entre 48-72h abans de realitzar els registres electrofisiològics per tal d'inhibir l'expressió endògena de CD39.

### **2.2 Obtenció de l'RNA antisentit de Cx38**

Un nucleòtid antisentit complementari a l'mRNA de Cx38 (ASCx38) 5'-GCTTTAGTAATCCCATCCTGCCATGTTTC-3' (Barrio et al., 1991) va ser sintetitzat per Invitrogen-Life Technologies S.A. (Barcelona). L'oligonucleòtid es va rehidratar amb aigua ultrapura i es va injectar (50 nl, 2 mg ml<sup>-1</sup>) en els oòcits 24-48h abans del registre per inhibir l'expressió endògena de Cx38.

### **2.3 Clonatge i sobreexpressió de la Cx38**

Utilitzant el sistema d'extracció d'RNA Ultraspect (Biotech, Houston, TX) es va purificar l'RNA total dels oòcits de *Xenopus*. Es va dur a terme la transcripció reversa de 5 µg d'RNA total d'acord amb les instruccions del kit First-Strand cDNAsynthesis (Amersham Biosciences, Barcelona) i el producte resultant es va utilitzar com a motllo per una PCR amb els següents encebadors específics de Cx38 (Invitrogen S.A., Barcelona):



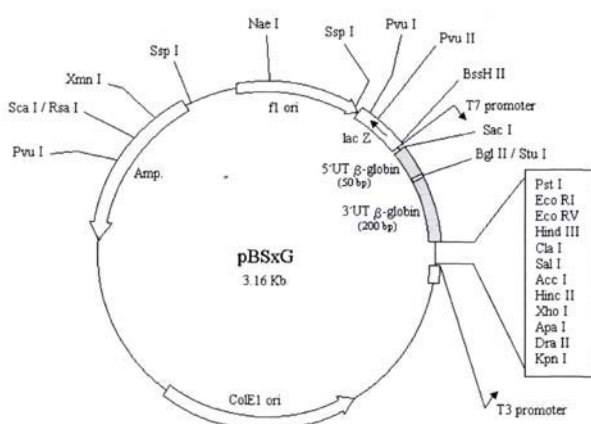
directe 5'ATGGCAGGATGGGAATTACTAAAGCT 3'

invers 5'AACATACTGCTGCTTGGGAAGAGG 3'

El cDNA (des del nucleòtid 121 al 1123 del Gene Bank Acc No 214045) es va clonar en el vector pSTBlue-1 (Novagen, Madrid) i es va seqüenciar. L'obtenció del cRNA de Cx38 es va portar a terme mitjançant la utilització de les tècniques de DNA recombinant indicades en l'apartat 3.

## 2.4 Obtenció del cRNA de Cx32 humana

El plàsmid amb el cDNA de la Cx32 humana ens va ser cedit pel Dr. Luís Barrio de l'Hospital Ramón i Cajal de Madrid. El cDNA de la Cx32 estava clonat en el vector pBSxG (Figura M-1) inserit en el lloc de restricció StuI.



**Figura M-1: Esquema del vector pBSxG, derivat del pBluescript SKII (Stratagene).**

L'insert de Cx32 humana està clonat en el lloc de restricció StuI del plàsmid i està orientat de manera que s'obtingui l'RNA fent la transcripció amb la polimerasa T7.

L'obtenció del cRNA de Cx32 es va portar a terme mitjançant la utilització de les tècniques de DNA recombinant indicades en l'apartat 3.

### **3. Tècniques de DNA recombinant**

#### **3.1 Transformació de bacteris**

Per aconseguir la quantitat òptima de plasmidi per dur a terme la reacció de transcripció, es van transformar els bacteris competents de la soca XL1-Blue, preparats al laboratori pel mètode del  $\text{CaCl}_2$ . Per cada transformació es va utilitzar una alíquota de 200  $\mu\text{l}$  de bacteris, s'hi va afegir el plàsmid a transformar i es va deixar reposar en gel durant 30 min. Passat aquest temps es va fer un xoc tèrmic portant la barreja a  $42^\circ\text{C}$  i mantenint-la a aquesta temperatura durant 45 seg. Es va tornar immediatament al gel, s'hi van afegir 800  $\mu\text{l}$  de medi LB i es va fer créixer a  $37^\circ\text{C}$  en agitació durant 1h. Finalment, es van sembrar de 50  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$  del cultiu en una placa de medi LB agar amb una concentració d'ampicilina de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i es van incubar tota la nit a  $37^\circ\text{C}$ .

#### **3.2 Selecció de les colònies d'interès i obtenció del DNA plasmídic**

Es van picar varies de les colònies que havien crescut i es van inocular en cultius amb 3 ml de medi LB amb ampicil·lina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i es van deixar créixer durant tota la nit en agitació i a  $37^\circ\text{C}$ .

Per determinar quines colònies havien incorporat el plàsmid, es va realitzar una purificació de DNA plasmídic a petita escala amb un kit comercial (BIOTOOLS), es van digerir les mostres obtingudes amb l'enzim de restricció corresponent i les digestions es van córrer en un gel d'agarosa. Es va escollir una de les colònies que havia incorporat el plàsmid, es va inocular

en un cultiu amb 250 ml de medi LB amb ampicil·lina (50 µg/ml) i es va deixar créixer durant tota la nit en agitació i a 37°C.

El DNA plasmídic es va extreure mitjançant el kit Midiprep de QIAGEN a partir del cultiu de bacteris de 250 ml per poder purificar una quantitat prou gran de DNA.

### **3.3 Producció d'mRNA**

10 µg del plàsmid es van liniaritzar amb l'enzim de restricció corresponent i es va procedir a realitzar la reacció de transcripció seguint les indicacions de l'mCAP RNA Capping Kit (Stratagene, protocol #200350). Seguidament es va realitzar un tractament amb 4 unitats de DNAsa I del mateix kit per eliminar el DNA sobrant i es va precipitar el cRNA a -20°C durant 30 minuts amb acetat sòdic 3M a proporció 1:10 i amb 2.5 volums d'etanol absolut. Es va centrifugar la barreja durant 20 minuts a 4°C, es va descartar el sobrenedant, es va ressuspendre el cRNA en aigua lliure d'RNAses tractada amb DEPC i es va quantificar i comprovar en un gel d'agarosa d'RNA. Es van obtenir 10 µl de volum final de cRNA que es van al·licotar de 2 µl en 2 µl en tubs eppendorf i es van conservar a -80 °C fins al seu ús.

El cRNA obtingut es va injectar (50 nl, 1–2 mg/ml) en els oòcits 3 dies abans de realitzar els registres electrofisiològics.

## **4. Preparació dels oòcits de *Xenopus laevis***

### **4.1 Obtenció i manteniment dels oòcits**

Per a l'obtenció del oòcits, s'anestesiaven les femelles de *Xenopus* amb 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma) a una concentració 0.3% en aigua. Es practicava una petita incisió

abdominal i s'extreien algunes bosses de l'ovari que es disposaven en una placa de Petri estèril que contenia solució Barth, una solució fisiològica isotònica. Es cosia la ferida amb fil de seda estèril de 0.2 mm de gruix i es deixava reposar l'animal durant un període no inferior als tres mesos abans d'una nova operació. El protocol de manipulació dels *Xenopus* va ser aprovat pel comitè ètic d'experimentació animal.

En la placa i sota una lupa (Sz-40, Olympus), es separaven els oòcits del teixit connectiu que els uneix amb l'ajuda d'unes pinces de rellotger (World Precision Instruments núm. 55). S'escollien els oòcits en bon estat que es trobaven en els estats V i VI (Sive et al., 2000) del desenvolupament (distingibles a simple vista), ja que en aquests estats són cèl·lules grans i amb una bona activitat traduccional.

Els oòcits seleccionats es mantenien en plaques de Petri amb medi Barth en un incubador a 18°C i cada dia se'ls canviava el medi i s'eliminaven els oòcits morts. Així s'aconseguia una supervivència aproximada del 90-95%.

#### **4.2 Injecció de cRNA en els oòcits de *Xenopus***

Les micropipetes per a la injecció del cRNA s'obtenien a partir d'un capil·lar de vidre (4878 World Precision Instruments, Inc., E.U.A) i utilitzant un protocol d'estirament en dos passos en un estirador programable P-97 (Sutter Instrument Co. E.U.A). Un cop fetes les pipetes, se'ls trencava una mica la punta per tal que assolís el diàmetre adequat (5-15 µm) per a la injecció. Les puntes preparades es posaven un mínim de 4h en una estufa de 200 °C per esterilitzar-les.

Per la injecció de RNA, tot el material utilitzat, així com també la superfície d'injecció, havia de ser estèril. Amb una xeringa, s'omplia una micropipeta amb oli mineral (Sigma) fins a la meitat per evitar que la mostra estigués en contacte directe amb l'èmbol del nanoinjector i es pogués contaminar. Es col·locava la micropipeta en el nanoinjector (WPI, model A203XVZ) i es subjectava amb un micromanipulador (Narishige, model MMN-3R, Japó). Es posava una gota de la mostra a injectar en el tap del mateix eppendorf on estava al·liquotada i posant la punta de la micropipeta en contacte amb la gota, s'omplia amb la mostra fins a la meitat. Els oòcits, en grups reduïts, es posaven en un motlle de parafilm amb forats d'1 mm aproximadament en els que s'hi acomodaven els oòcits, que es mantenien humits durant tot el procés d'injecció. L'oòcit es punxava en el pol vegetal, prop de l'equador, per no malmetre el nucli i se li injectaven 50 nl de mostra a una concentració entre 1-2 mg/ml. El temps d'expressió variava entre 24-72h, depenent de la mostra utilitzada.

### **4.3 Tractament dels oòcits amb col·lagenasa**

Abans de realitzar els registres electrofisiològics amb els oòcits se'ls va eliminar la capa fol·licular, ja que aquesta representava un obstacle mecànic per a la penetració de l'elèctrode d'enregistrament i, a més a més, els canals iònics i les unions gap pròpies d'aquesta capa podien interferir en els registres dels canals de la membrana plasmàtica.

Els oòcits es col·locaven en vials de vidre amb una solució Ringer amb 0.5 mg/ml de l'enzim Col·lagenasa IA (Sigma, St. Louis, E.U.A) i aquests vials es posaven a girar a temperatura

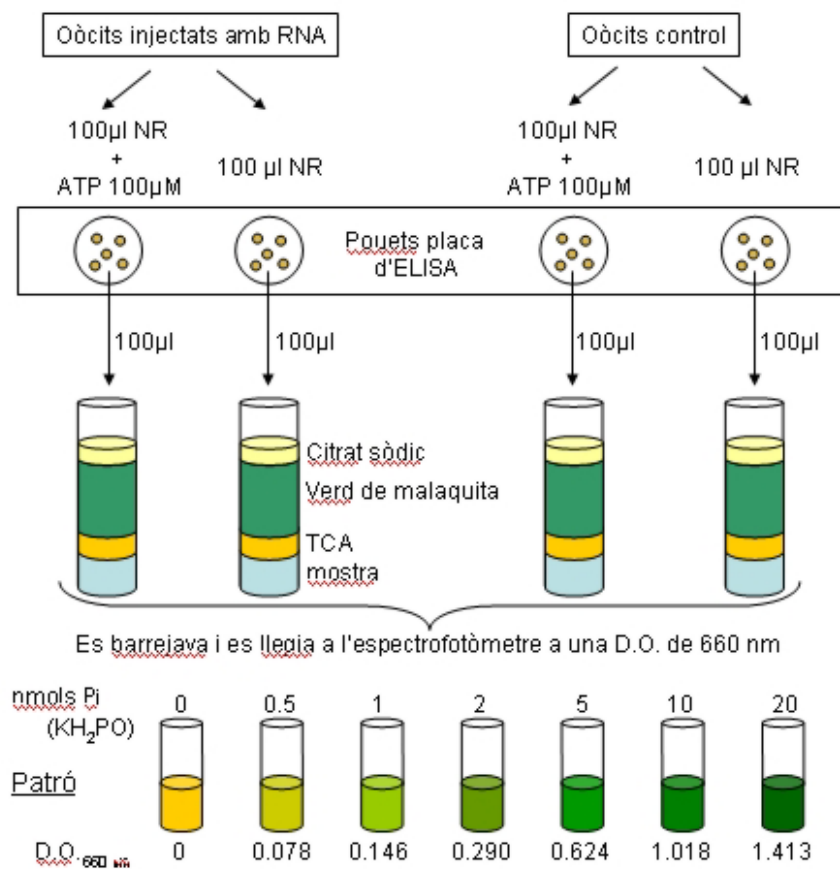
ambient en un agitador orbital a unes 10 rpm fins que s'observava que es començaven a desprendre les capes fol·liculars (aproximadament 45 min). Per aturar el tractament, es feien 5 rentats seguits amb 1 ml de solució Ringer als oòcits i, finalment, es retornaven a l'incubador en plaques de Petri amb solució Barth fins al moment del registre.

### **5. Mesura de l'activitat NTPDasa**

Per a la determinació de l'activitat ecto-ATPàsica dels oòcits de *Xenopus* es va utilitzar el mateix mètode descrit per Ziganshin et al., 1995.

En plaques d'ELISA s'omplien els pouets amb grups de 5 oòcits prèviament tractats amb col·lagenasa i 100 µl de NR. Seguidament es feia un rentat previ amb NR i després s'afegien 100 µl de NR amb ATP o sense ATP (a una concentració final de 100 µM) segons correspongués. Com a control de l'experiment, es van omplir alguns pouets amb 100 µl de solució Ringer 0Ca, ja que és necessària la presència de calci o magnesi al medi per a l'activitat de l'enzim. Es deixava incubar durant 20 minuts. Al cap d'aquest temps es retirava la solució de cada un dels pouets i es traspassava a tubs d'assaig. S'aturava la degradació de l'ATP afegint 10 µl d'àcid tricloracètic (TCA) al 50% a cada tub. Per detectar el fosfat inorgànic alliberat per la hidròlisi de l'ATP es va utilitzar el mètode colorimètric de Lanzetta (Lanzetta et al., 1979) segons el qual s'afegien 800 µl de verd de malaquita a tots els tubs, es barrejaven i es deixaven reposar exactament durant 1 minut després del qual s'aturava la reacció afegint a cada tub 100 µl de citrat sòdic 34%. S'esperava uns 10 minuts i es llegia l'absorvència de cada tub a

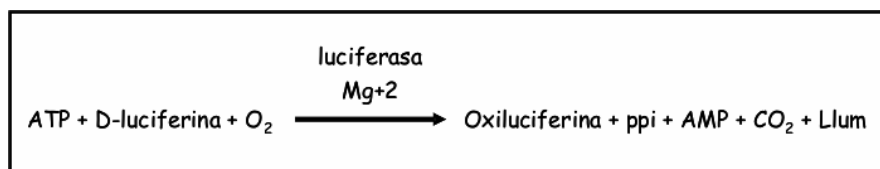
una densitat òptica de 660 nm en un espectrofotòmetre comparant-los amb un patró preparat anteriorment amb quantitats conegudes de Pi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , de 0 a 20 nmols). Les activitats específiques es calculaven en forma de fmols Pi per oòcit i per minut.



**Figura M-2: Mètode de mesura de l'activitat ecto-ATPàsica en els oòcits de *Xenopus*.**

## 6. Assaig per la determinació de l'alliberació d'ATP amb luciferina/luciferasa

Un dels principals sistemes utilitzats per a la mesura de l'ATP és el basat en la reacció luminiscent de la luciferina/luciferasa (McElroy, 1947). Aquest mètode permet una determinació directa i contínua dels nivells d'ATP presents en una solució. Es basa en la luminiscència emesa per l'oxiluciferina que es genera en la següent reacció catalitzada per l'enzim luciferasa obtinguda de *Photinus pyralis* (American firefly).



És un mètode molt sensible que pot detectar concentracions d'ATP en el rang picomolar-micromolar.

### 6.1 Purificació de la luciferina-luciferasa (L-L)

Per obtenir la barreja de L-L es diluïa un vial de luciferasa (firefly lantern extract de Sigma) en 1 ml del tampó de treball. Es centrifugava la suspensió resultant 2 minuts a 12.000 rpm i a 4 °C. Seguidament es traspassava el sobrenadant a una columna de separació per mida (10 ml, 10 DG Bio-Rad) prèviament equilibrada 3 vegades amb el mateix tampó de treball. Un cop la luciferasa era eluïda se li afegien 200 µl de D-luciferina (concentració final 1 mg/ml) (Sigma) i es centrifugava un altre cop 1 minut a màxima velocitat i a 4°C per eliminar la D-luciferina no dissolta. Un cop obtinguda la luciferina/luciferasa final, es feien alíquotes que es guardaven a - 20°C fins al moment d'utilitzar-les.



## **6.2 Tractament dels oòcits per mesurar l'alliberació d'ATP a través de Cx38 i l'ATP total contingut en cada oòcit.**

Per la mesura de l'alliberació d'ATP a través de Cx38 i la seva inhibició per l'octanol i l'àcid flufenàmic, es van posar 3 grups d'entre 20 i 50 oòcits tractats amb colagenasa en un tub eppendorf que contenia 500 µl de solució NR. Es va rentar un dels grups amb 500 µl d'una solució Ringer 0Ca amb 50 µM d'àcid flufenàmic i un altre amb 500 µl d'una solució Ringer 0Ca amb 1.5 mM d'octanol. El grup d'oòcits control només es va rentar amb la solució Ringer 0Ca. Cada 2 minuts, durant un total de 10 minuts, s'agafaven 30µl de mostra, que es congelava a -20°C, per determinar després la quantitat d'ATP alliberat.

Per la mesura de l'alliberació d'ATP a través de la Cx38 i la seva inhibició per l'ASCx38 i el seu augment en la sobreexpressió de Cx38, es va injectar l'oligonucleòtid ASCx38 o el cRNA de Cx38 en un grup de 20-50 oòcits. 48 h després de la injecció, es van tractar els oòcits amb colagenasa, es van posar en un tub eppendorf que contenia 500 µl de solució NR i es van rentar amb 500 µl d'una solució Ringer 0Ca. Com a control es varen utilitzar oòcits injectats amb aigua. Cada 2 minuts, durant un total de 10 minuts, es van agafar 30µl de mostra, que es van congelar a -20°C, per mesurar després la quantitat d'ATP alliberat.

Per la determinació del contingut total d'ATP en els oòcits, es va posar un oòcit en un tub eppendorf que contenia 30 µl de NR + 5% de TCA. Es va homogenitzar l'oòcit i, després de centrifugar-lo, es va barrejar el sobrenedant amb 1 ml d'éter saturat amb

aigua per extreure el TCA (es va repetir aquest procés 5 vegades). Es van agafar mostres de 10 µl per a la posterior determinació de la quantitat d'ATP.

### **6.3 Mètode de mesura de l'ATP**

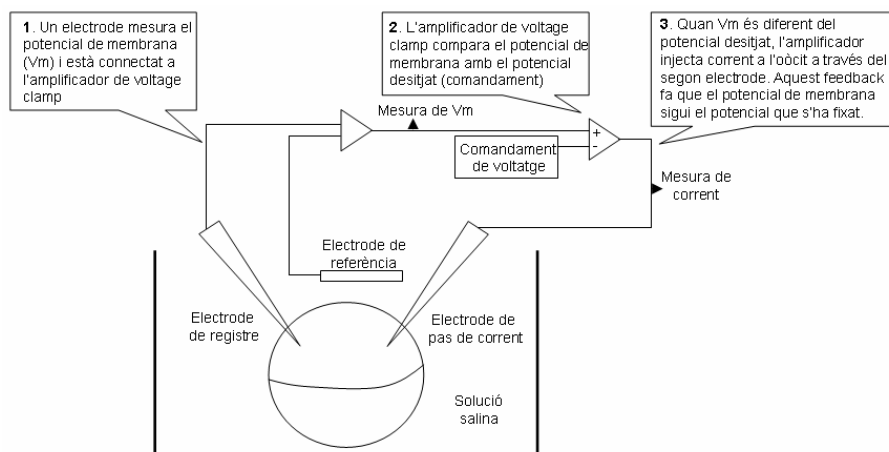
Es va mesurar l'ATP extracel·lular alliberat pels oòcits, tractats tal com s'explica en el punt anterior, amb la reacció luminiscent de la L-L de la següent manera: en un tub d'assaig amb 300 µl de la solució de treball (MNR), s'hi van afegir 40 µl de la solució final L-L, 10 o 25 µl de la mostra a mesurar (vegeu apartat anterior) i dues dosis conegudes d'ATP (forma disòdica) d'entre 100 i 1500 fmols. Les quantitats d'ATP alliberades en cada condició experimental es van calcular mesurant les àrees sota de les corbes obtingudes, prenent com a referència les obtingudes amb les dosis d'ATP conegudes.

Les mesures d'ATP de cada mostra es van realitzar en un tub d'assaig introduït en una cambra fosca, on la mostra de treball estava en constant agitació gràcies a un imán que es trobava a l'interior del tub d'assaig. La llum emesa per la reacció enzimàtica es va capturar mitjançant un fototub (R374, Hamamatsu Photonics, Iberia, Spain), alimentat amb una font contínua a 850 V, que transduïa el senyal lluminós en senyal elèctric, que era amplificat (5A22N, Tektronix), filtrat a 3 Hz (Bessel, Frequency Devices) i digitalitzat per una tarjeta TL-1 Labmaster (Axon Instruments) controlada pel software Axotape 1.2.01 (Axon Instruments) en un PC 486.

## 7. Registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes

### 7.1 Tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes

Aquesta tècnica consisteix en un elèctrode que monitoritza el potencial intracel·lular (la diferència de potencial entre l'interior de l'oòcit i el bany que l'envolta) i en un segon elèctrode que injecta el corrent necessari per mantenir el potencial de membrana constant a un valor desitjat. Això s'aconsegueix mitjançant un circuit de retroalimentació de l'amplificador de *voltage clamp* (Figura M-3). Quan s'obren els canals iònics de la membrana, fixada a un potencial determinat, el sistema passa un corrent de la mateixa intensitat i de sentit oposat al corrent que flueix pels canals iònics per mantenir la membrana a aquell potencial.



**Figura M-3:** Esquema de la cambra de registre i del circuit elèctric que realitza la funció de fixació de voltatge.

## 7.2 Components del set-up de voltage clamp

En els registres amb la tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes, l'oòcit es situava en una cambreta de plàstic transparent de 250 µl amb un canal per on passava el fluid i al mig del qual hi havia un forat de 1-2 mm de diàmetre on es dipositava l'oòcit amb una pipeta Pasteur. En aquesta posició, l'oòcit es punxava amb els dos microelèctrodes. Per sota i per sobre de la cambreta hi havia fibra òptica per poder captar la llum emesa per la reacció de la luciferina/luciferasa amb l'ATP alliberat per l'oòcit. La cambra estava fixada sota d'una lupa Olympus i il·luminada amb llum freda Olympus Highlight 3000 que ens permetia veure i punxar correctament l'oòcit. La lupa estava situada sobre una taula antivibratòria TMC (Technical Manufacturing Corporation, E.U.A) per evitar possibles vibracions que poguessin fer malbé l'oòcit durant el registre electrofisiològic. La taula estava envoltada per una gàbia metàl·lica de Faraday opaca. El fluid s'aplicava des d'un tub que desembocava per gravitació a un dels extrems del canal, des d'un sistema de vuit xeringues de 70 ml de volum situades a una alçada d'uns 80 cm. El flux de les diferents xeringues, a una velocitat d'entre 6 i 10 ml/min, es controlava mitjançant un sistema de vàlvules BPS-8 Valve Control System (ALA Scientific Instruments, E.U.A). El fluid transcorria pel canal, mullava l'oòcit i s'extreia per l'altre extrem del canal mitjançant un capilar unit a un tub connectat a la xarxa de buit de l'edifici a través de dos vasos kitasato que a la vegada feien d'aïllant elèctric entre la xarxa de buit i el bany de la cambreta.

L'oòcit es punxava amb dos elèctrodes intracel·lulars col·locats en els holders dels preamplificadors connectats a un

amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments, E.U.A), que al seu torn estava connectat a una tarja digitalitzadora BNC-2090 (National Instruments, E.U.A) que passava els senyals a l'ordinador mitjançant el programa Whole Cell Analysis del professor J. Dempster (Strathclyde University, Escòcia). Per altra banda, el senyal també es visualitzava amb un oscil·loscopi Tektronix TDS 420A (Tektronix, E.U.A).

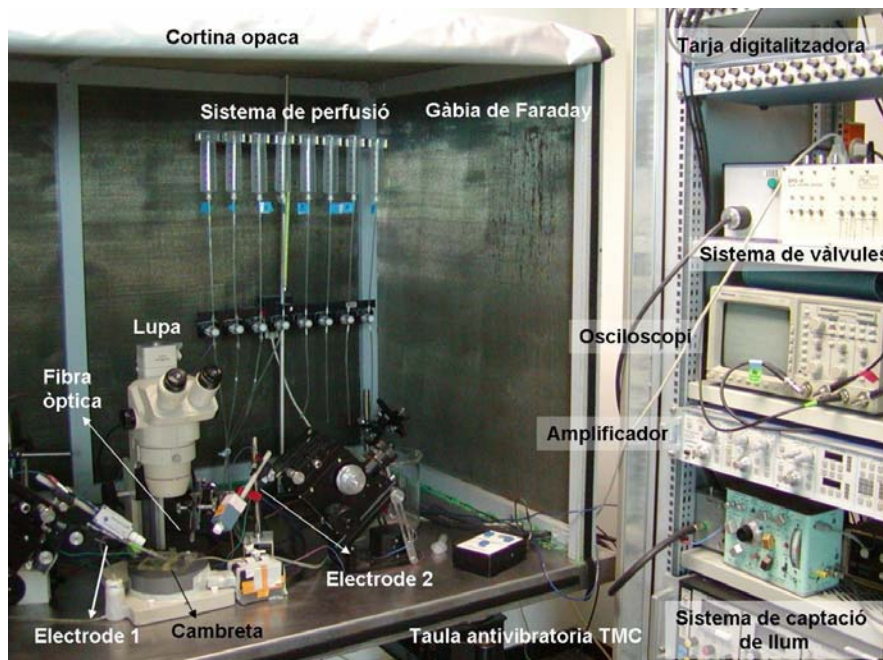


Figura M-4: Imatge dels diferents components del set-up de *voltage clamp*.

### 7.3 Preparació del material per al registre de fixació de voltatge

Els dos microelèctrodes que punxaven l'oòcit tenien una resistència d'entre 0.5-3 M $\Omega$  i estaven fets amb uns capil·lars de vidre amb filament intern del tipus GC120TF-7.5 (Harvard Apparatus, UK) utilitzant un estirador P-97 (Sutter Instrument Co.,

E.U.A) per estirar els capil·lars amb un programa de dos passos. Aquests microelèctrodes, plens amb una solució 3M de KCl, recobrien l'elèctrode de plata clorurat de 0.25 mm de diàmetre i estaven connectats als *holders* (Axon Instruments, E.U.A) col·locats en els preamplificadors o *headstages* HS-2 (Axon Instruments, E.U.A). Els preamplificadors, els *holders* i els microelèctrodes es controlaven mitjançant micromanipuladors (Narishige, Japó). El bany es connectava a un elèctrode de plata clorurat de referència que estava connectat al terra de la xarxa.

#### **7.4 Registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes**

Un cop l'oòcit estava col·locat en la seva posició dins de la cambreta, els microelèctrodes es sumergien en el líquid de perfusió que cobria el canal de la cambreta i es corregia el desplaçament inicial (*offset* dels elèctrodes) ajustant-lo a zero. Es penetrava l'oòcit amb els dos microelèctrodes amb un angle d'aproximadament 90°C entre un i l'altre. En aquest moment, en l'amplificador, es determinava el potencial de membrana i només s'enregistrava l'oòcit si el potencial era inferior a -20 mV, ja que potencials superiors indicaven que l'oòcit no es trobava en condicions òptimes. Per començar el registre es posava l'amplificador en mode *voltage clamp* i es fixava el potencial a -60 mV o -40mV depenent del tipus d'experiment. Seguidament es calculava la resistència de l'oòcit llegint la diferència de corrent que hi havia entre els potencials -60 i -40mV i aplicant la llei d'Ohm i es començava l'enregistrament.

## **7.5 Registre simultani de corrent i d'alliberació d'ATP en el set-up de *voltage clamp***

Per a la detecció de l'alliberació d'ATP produïda per canvis de voltatge en un sol oòcit, es situava l'oòcit en la cambreta de registre plena amb solució Ringer-Mg<sup>2+</sup> i la barreja de luciferina/luciferasa (preparada tal com s'indica en l'apartat 6.1), s'encarava una fibra òptica d'1 mm de diàmetre just sobre la superfície de l'oòcit i es deixava tot a les fosques tapant amb una cortina opaca. S'enregistrava l'oòcit tal com s'ha explicat anteriorment i, si l'oòcit alliberava ATP, la llum resultant de la reacció de l'ATP amb la L-L arribava a través de la fibra òptica fins a un fotomultiplicador amb una cortina de tancament i el senyal era amplificat, filtrat, digitalitzat i gravat en un PC a través del mateix programa Whole Cell Analysis.

Aquesta configuració de registre és la mateixa utilitzada per Bodas et al., 2000 i Aleu et al., 2003.

## **8. Mesura de l'alliberació de Lucifer Yellow (LY) a través d'hemicanals**

### **8.1 Lucifer Yellow**

Lucifer Yellow (LY, Sigma) és un marcador fluorescent de color groc, de baix pes molecular (< 1kDa) i que ha estat descrit i utilitzat com a eina eficaç per testar la presència i la funcionalitat dels hemicanals (Paul et al., 1991; De Vries i Schwartz, 1992).

## **8.2 Injecció dels oòcits amb LY**

Per a la injecció de LY en els oòcits es van utilitzar les mateixes pipetes d'injecció, el mateix aparell injector i la mateixa tècnica ja descrita anteriorment en l'apartat 3.2. S'injectaven 9.2 nl/oòcit de LY 5% en oòcits control (prèviament injectats amb aigua miliQ) i en oòcits injectats amb ASCx38. Es realitzava la injecció 6h abans de fer la mesura i, 3h abans, es tractaven els oòcits amb col·lagenasa.

## **8.3 Mesura de l'alliberació de LY en un fluorímetre**

Per a la mesura de l'alliberació de LY es col·locava un grup d'entre 20-50 oòcits en un tub que contenia 1 ml de solució NR. Després de 5 minuts es rentaven els oòcits i es substituïa el NR per 1 ml de solució Ringer 0Ca. Al cap de 8 minuts s'aturava l'alliberació de LY tornant a posar els oòcits durant 5 minuts en solució NR. Durant tot aquest procés s'agafaven 25 µl de mostra cada 30 segons i es transferien a una cuveta de fluorímetre que contenia 500 µl d'aigua miliQ. La quantitat de LY alliberat es mesurava utilitzant un espectrofotòmetre de fluorescència F-2000 (Hitachi) amb el filtre d'excitació a 428 nm i el d'emissió a 520 nm.

## **9. Mesura de la capacítància de membrana dels oòcits**

La capacítància és la propietat de les membranes per acumular càrregues. En les membranes biològiques, la capacítància específica és de 0.5 µF/cm<sup>2</sup> (Solsona et al., 1998) i és proporcional a la superfície de la membrana. Així doncs, la



mesura de la capacitància permet l'estudi directe dels processos d'endocitosi i d'exocitosi.

Durant els registres de fixació de voltatge amb dos elèctrodes, vam mesurar la capacitància abans i després de l'activació del corrent, aplicant un pols quadrat hiperpolaritzant, des de -40 mV fins a -60 mV durant 10 ms. Vam mesurar la capacitància, expressada en Faradays (F), com una funció del corrent transitori registrat per canvis de voltatge:  $C = \sigma \cdot I / \Delta V$ .



## **RESULTATS**



***1. Síntesi i validació d'un oligonucleòtid antisentit contra la proteïna NTPDasa1 (CD39) de *Xenopus laevis****



Resultats anteriors del laboratori suggerien que, aplicant polsos hiperpolaritzants en la membrana dels oòcits de *Xenopus laevis*, l'ectoenzim NTPDasa1, també anomenat CD39, podia esdevenir permeable per l'ATP (Bodas et al., 2000). Continuant amb l'estudi d'aquesta proteïna, es va voler determinar també si estava relacionada amb l'alliberació d'ATP induïda per estrès hipertònic descrita en oòcits. Per portar a terme aquests estudis, era necessari aconseguir un oligonucleòtid antisentit contra la CD39 dels oòcits de *Xenopus*, ja que d'aquesta manera podríem inhibir la funció de la proteïna i determinar fins a quin punt la seva funcionalitat podia afectar l'alliberació d'ATP. Per tant, el nostre primer objectiu va ser sintetitzar i validar aquest oligonucleòtid, per tal de poder-lo utilitzar posteriorment a l'hora de fer els experiments.

### **1.1 Síntesi d'un oligonucleòtid antisentit per la NTPDasa1 (CD39) de *Xenopus laevis***

Degut a que la NTPDasa1 de *Xenopus* no estava encara clonada, l'oligonucleòtid antisentit complementari al mRNA de CD39 (antiCD39) va ser dissenyat a partir de seqüències consens de diferents espècies (Figura R-1.1): humana (Gene Bank accession number: NM\_001776.2), vaca (Gene Bank accession number: AF005940.1), rata (Gene Bank accession number: NM\_022587.1), ratolí (Gene Bank accession number: NM\_009848.1) i *Torpedo marmorata* (Gene Bank accession number: AF323909.1).

Vam escollir dues regions conservades en totes aquestes espècies i vam dissenyar els oligonucleòtids antisentit corresponents, que vam anomenar ASCD3911 (5'

TCCCGTAGCACAGGAAGCTGTGTGTGTACA 3') i ASCD3922 (5' TGTTGGTCAAGTTCAGCATGTAGCCCAG 3') i van ser sintetitzats per Invitrogen-Life Technologies. Aquests dos oligonucleòtids són els que vam utilitzar per determinar si realment bloquejaven o no la CD39.

<b>ASCD3911</b>	<b>5' tgtacacacacagcttcctgtg 3'</b>
Human	<sup>947</sup> tctacacacatagcttcttgtg <sup>968</sup>
Cow	<sup>814</sup> tacacacacagcttcctgtg <sup>833</sup>
Rat	<sup>815</sup> tgtacacacacagcttcctgtg <sup>836</sup>
Mouse	<sup>806</sup> tgtacacacacagcttcctgtg <sup>827</sup>
Torpedo	<sup>1</sup> tgtacacacacagcttcctgtg <sup>22</sup>
<b>ASCD3922</b>	<b>5' ctgggctacatgctgaacttgaccaaca 3'</b>
Human	<sup>1559</sup> tgggctacatgctgaacttgaccaaca <sup>1585</sup>
Cow	<sup>1433</sup> tgggctacatgctgaacttgaccaaca <sup>1459</sup>
Rat	<sup>1433</sup> tgggctacatgctgaacttgaccaaca <sup>1459</sup>
Mouse	<sup>1421</sup> tgggctacatgctgaacttgaccaaca <sup>1447</sup>
Torpedo	<sup>1</sup> ctgggctacatgctgaacttgaccaaca <sup>28</sup>

**Figura R-1.1: Seqüències consensu a partir de les quals vam dissenyar els oligonucleòtids antisentit ASCD3911 i ASCD3922.**

Recentment, s'ha obtingut la seqüència nucleotídica de la NTPDasa1 de *Xenopus* (Massé et al., 2005) i hem pogut comprovar que les dues seqüències consensu que vam escollir per dissenyar els oligonucleòtids antisentit, també existeixen i estan conservades en els oòcits de *Xenopus* (Figura R-1.2.).



ASCD3911 Xenopus	5' <b>tgtacacacacagcttcctgtg</b> 3' 940 caacagcaccagcttcttaga <sup>962</sup>
ASCD3922 Xenopus	5' <b>ctgggctacatgctgaacttgaccaaca</b> 3' 1372 ttggctatatgctgaacctgaccaata <sup>1399</sup>

**Figura R-1.2: Comparació de les seqüències a partir de les quals es van dissenyar els oligonucleòtids ASCD3911 i ASCD3922, amb la seqüència nucleotídica de la NTPDasa1 de *Xenopus laevis*. En vermell es marquen els nucleòtids no coincidents.**

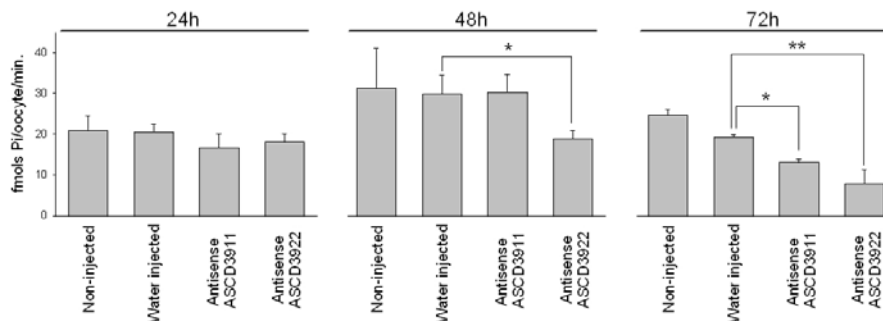
Tal i com mostra la figura R-1.2., el grau de similitud entre ASCD3922 i la seqüència corresponent de la NTPDasa1 de *Xenopus* és molt més gran que en el cas de ASCD3911. Aquest fet concorda amb els resultats exposats en l'apartat següent, on vam poder comprovar que, efectivament, l'oligonucleòtid ASCD3922, que presenta una major homologia en la seqüència, també aconsegueix una major inhibició de la expressió de la proteïna.

## 1.2 Validació dels oligonucleòtids ASCD3911 i ASCD3922

Un cop obtinguts els oligonucleòtids antisentit, vam voler comprovar si realment funcionaven com a bloquejants de la proteïna CD39. Com ja s'ha dit, els enzims de la família de les NTPDases, com la CD39, hidrolitzen nucleòtids trifosfat i difosfat fins a nucleòtids monofosfat. Aquesta activitat NTPDàsica es pot determinar mesurant el fosfat inorgànic que s'allibera en cada reacció d'hidròlisi de l'ATP.

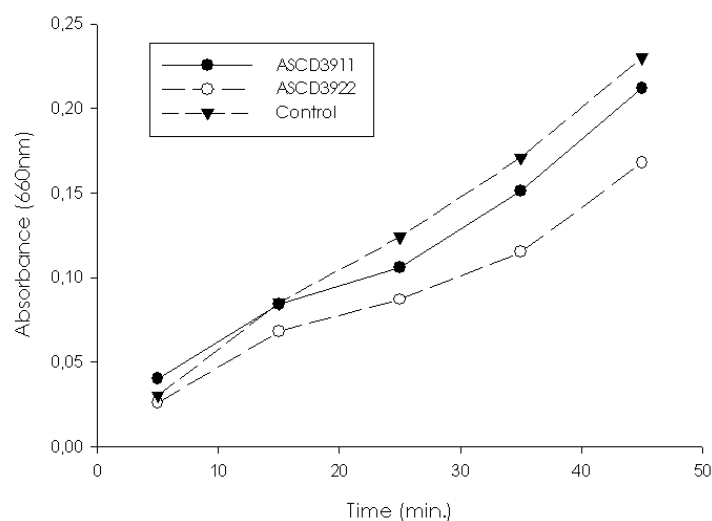
Vam injectar oòcits amb l'ASCD3911 (10 ng/oòcit) i oòcits amb l'ASCD3922 (10 ng/oòcit) i vam determinar l'activitat NTPDàsica

de les cèl·lules al cap de 24h, 48h i 72h, tal com es descriu en l'apartat 5 de Materials i Mètodes. Com es mostra en la figura R-1.3, l'ASCD3922 comença a fer disminuir l'activitat NTPDàsica de manera significativa al cap de 48h de la injecció en l'òcit i, al cap de 72h, la inhibició és superior al 50%. En canvi, l'ASCD3911 sembla no donar tan bons resultats i no observem una inhibició significativa fins al cap de les 72h d'injecció.



**Figura R-1.3: Mesura de l'activitat NTPDàsica en els òcits de *Xenopus* injectats amb ASCD3911, ASCD3922 i control al llarg del temps: 24h, 48h i 72h.**

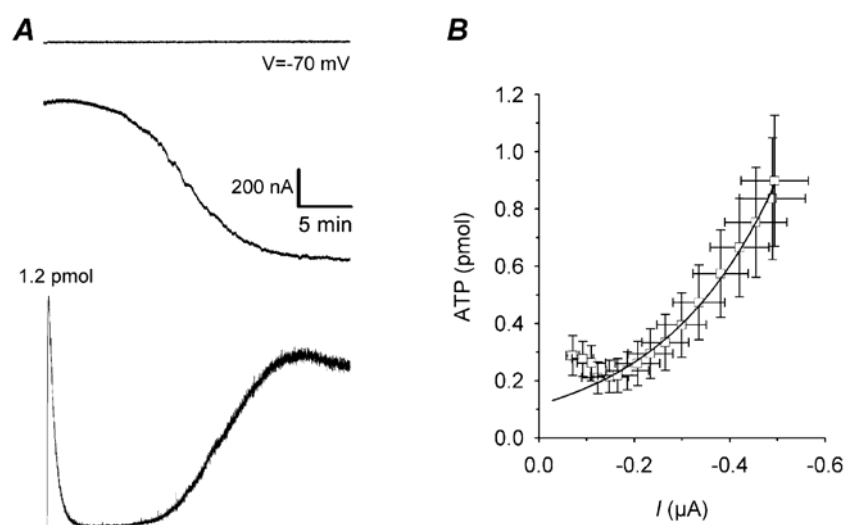
En la figura R-1.4. es mostra la cinètica de formació de Pi al llarg d'un període de 45 minuts en òcits control i òcits injectats 48h abans amb els oligonucleòtids antisentit. En comparació amb els òcits control, s'observa una disminució de la formació de Pi en els òcits injectats amb els anti-CD39, sobretot en aquells injectats amb ASCD3922, des dels minuts inicials de l'experiment i assolint nivells màxims cap al minut 35.



**Figura R-1.4: Detecció del Pi format extracel·lularment (veure apartat 5 de Materials i Mètodes) mesurant l'absorbància a una longitud d'ona de 660nm, al llarg de 45 min després de 48h des de la injecció de l'ASCD3911 i l'ASCD3922 en els oòcits.**

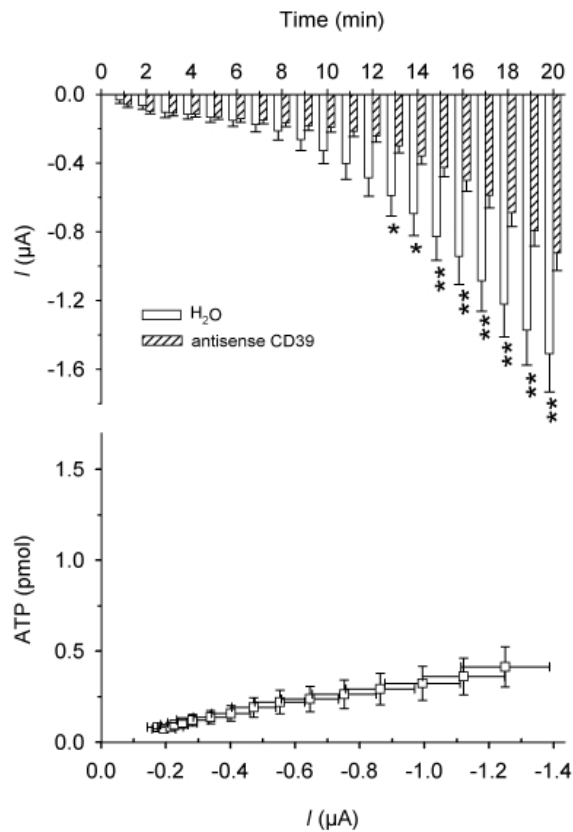
Considerant aquests resultats, vam escollir l'oligonucleòtid antisentit ASCD3922 per realitzar els experiments d'alliberació d'ATP induïda per estrès hipertònic i determinar-ne la implicació de la NTPDasa1 (CD39).

En primer lloc, es va registrar simultàniament, amb la tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes (veure apartat 7 de Materials i Mètodes), l'alliberació d'ATP i els corrents iònics en oòcits estressats amb una solució hipertònica. El medi hipertònic induïa la producció d'un corrent d'entrada i l'alliberació d'ATP en els oòcits (Figura R-1.5).



**Figura R-1.5: Registre simultani de l'alliberació d'ATP i dels corrents iònics en un sol oòcit estressat amb una solució hipertònica.** (A) Registre d'un oòcit sotmès a un medi hipertònic dos minuts abans de l'experiment. Part superior: voltatge de la membrana, fixat a -70 mV. Part del mig: corrent de membrana. Part inferior: alliberació d'ATP, on es va afegir una dosi d'ATP coneguda (1.2 pmol) per poder evaluar-ne l'alliberació. (B) Alliberació d'ATP en funció del corrent i del temps (cada punt representa l'ATP alliberat en funció de l'amplitud de corrent durant cada minut de registre des del minut 4 fins al 20) (n=20) (extret d'Aleu et al., 2003).

Un cop determinat l'efecte del tractament hipertònic en els corrents iònics i l'alliberació d'ATP en oòcits control, es va registrar el corrent iònic i l'alliberació d'ATP en oòcits injectats 40-72h abans amb l'antisentit per la CD39. Es va observar com l'antisentit per la CD39 reduïa de manera significativa l'alliberació d'ATP i el corrent iònic després de 13 minuts d'exposició hipertònica (Figura R-1.6).



**Figura R-1.6. Corrents de membrana activats per xoc hipertònic i alliberació d'ATP en oòcits injectats amb un oligonucleòtid antisentit complementari al mRNA de CD39.** Panell superior: mitjana de l'amplitud del corrent en cada minut de registre en oòcits injectats amb aigua (control) (n=8) i oòcits injectats amb l'antisentit de CD39 (n=13). Panell inferior: Alliberació d'ATP en funció del corrent i del temps (cada punt representa l'ATP alliberat en funció de l'amplitud

de corrent durant cada minut de registre des del minut 7 fins al 20) (extret d'Aleu et al., 2003).

El conjunt de resultats obtinguts en l'estudi d'alliberació d'ATP en condicions d'estrès hipertònic van ser publicats per Aleu et al., 2003 en l'article *Release of ATP induced by hypertonic solutions in Xenopus oocytes*, que es pot consultar en l'apartat Annex 1.



***2. Paper dels hemicanals endògens en  
l'alliberació d'ATP en oòcits de Xenopus***





Aquest capítol correspon a l'article **Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes**, publicat a la revista *Journal of Cell Biology*, 206:95-102 (2006).

En ell es descriu en primer lloc la presència d'un corrent d'entrada d'activació lenta durant la perfusió dels oòcits de *Xenopus* amb una solució lliure d'ions divalents. Quan s'afegeix de nou al medi una solució que conté calci, aquest corrent s'inactiva d'una manera reversible. S'observa que, un cop activat, aquest corrent es pot inhibir utilitzant octanol o àcid flufenàmic, dos inhibidors de les unions gap.

Així mateix, es descriu, a través de tècniques d'injecció i expressió de cRNA en els oòcits, la dependència d'aquest corrent sensible a calci de l'expressió de la proteïna connexina 38 (Cx38). Injectant en els oòcits un RNA antisentit contra la Cx38 (ASCx38) s'observa una important disminució del corrent sensible a calci. En canvi, en oòcits que sobreexpressen la Cx38, s'observa un augment significatiu d'aquest corrent.

Per altra banda, es demostra el pas de Lucifer Yellow (LY) a través dels hemicanals formats per Cx38 en presència de la solució lliure d'ions divalents, indicant una relació entre la generació del corrent d'entrada i l'obertura dels hemicanals.

En un segon bloc experimental d'aquest article s'estableix una relació entre l'activació de la Cx38 i l'alliberació d'ATP. Mitjançant el mètode de mesura basat en la reacció de la luciferina-luciferasa, es mostra que, durant la incubació dels oòcits amb la solució sense calci, es produeix una alliberació d'ATP que és inhibida quan els oòcits s'incuben amb octanol o àcid flufenàmic o quan s'injecten amb l'ASCx38. En canvi, quan es sobreexpressa la Cx38 en els oòcits, l'alliberació d'ATP

augmenta. A més a més, s'observa que quan es produeix un corrent d'entrada inespecífic que no és degut a l'activació de la Cx38, no es detecta alliberació d'ATP.

Finalment, també es demostra que l'alliberació d'ATP induïda per xoc hipertònic descrita en resultats anteriors del laboratori (Aleu et al., 2003) no es produeix a través de la Cx38.

**S'ha transcrit íntegrament la versió final publicada de l'article, amb l'únic canvi dels números de les figures que, per unificar el criteri amb la resta de figures del treball, s'han renombrat com a R-2.1 fins a R-2.7.**

## **Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes**

Laia Bahima<sup>1</sup>, Jordi Aleu<sup>1</sup>, Marc Elias<sup>1</sup>, Mireia Martín-Satué<sup>1</sup>, Ashraf Muhaisen<sup>2</sup>, Joan Blasi<sup>1</sup>, Jordi Marsal<sup>1</sup>, and Carles Solsona<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, IDIBELL-Medical School, University of Barcelona, Bellvitge Campus, Feixa Llarga s/n, E-08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

<sup>2</sup>Parc Científic de Barcelona, Cellular Neurobiology, Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, Spain.

### **2.1 ABSTRACT**

ATP is an electrically charged molecule that functions both in the supply of energy necessary for cellular activity and as an intercellular signaling molecule. Although controlled ATP secretion occurs via exocytosis of granules and vesicles, in some cells, and under certain conditions, other mechanisms control ATP release. Gap junctions, intercellular channels formed by connexins that link the cytoplasm of two adjacent cells, control the passage of ions and molecules up to 1 kDa. The channel is formed by two moieties called hemichannels, or connexons, and it has been suggested that these may represent an alternative pathway for ATP release. We have investigated the release of ATP through hemichannels from *Xenopus* oocytes that are formed by Connexin 38 (Cx38), an endogenous, specific type of connexin. These hemichannels generate an inward current that is reversibly activated by calcium-free solution and

inhibited by octanol and flufenamic acid. This calcium-sensitive current depends on Cx38 expression: it is decreased in oocytes injected with an antisense oligonucleotide against Cx38 mRNA (ASCx38) and is increased in oocytes overexpressing Cx38. Moreover, the activation of these endogenous connexons also allows transfer of Lucifer Yellow. We have found that the release of ATP is coincident with the opening of hemichannels: it is calcium-sensitive, is inhibited by octanol and flufenamic acid, is inhibited in ASCx38 injected oocytes, and is increased by overexpression of Cx38. Taken together, our results suggest that ATP is released through activated hemichannels in *Xenopus* oocytes.

## 2.2 INTRODUCTION

Purinergic signaling is present in almost any organ in which ATP acts through P2Y or P2X receptors (Burnstock, 2004b). Whilst the function of P2 receptors is well understood, little is known about the mechanism of regulated ATP release from different cell types. Because of its negative charge, ATP does not cross the plasma membrane, and cells secrete ATP, either alone or together with other mediators, by exocytosis of vesicles or granules. However, it has been suggested that ATP is also released from cells, in a regulated manner, via proteinaceous routes that cross the plasma membrane. Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Protein (CFTR) was the first protein believed to be ATP permeable. Although contradictory results have been reported, a recent paper reveals that ATP release from retinal pigmented epithelium is mediated by both vesicular exocytosis and CFTR (Reigada and Mitchell, 2004). In addition, the maxi-anion channel has also been reported to mediate electrogenic release of ATP (Bell et al., 2003; Sabirov and Okada, 2004), whilst the ectoenzyme NTPDase has been implicated in ATP release under certain restricted conditions (Bodas et al., 2000; Aleu et al., 2003). Finally, connexins have also been linked to the release of ATP (Cotrina et al., 1998).

In many organs and tissues, functional and metabolic cell synchronization is achieved by electrical coupling through gap junctions. These structures allow inter-cytoplasmic communication between neighboring cells. Each gap junction is composed of two multimeric subunits known variously as connexons, hemi-gap junction channels, or simply hemichannels

(Trexler et al., 1996). These hemichannels are hexameric complexes of connexins, a family of membrane proteins containing four-span transmembrane regions, usually designated Cx followed by the apparent molecular mass of the protein. In humans, 20 different connexins have been described. The electrophysiological properties of gap junctions are mimicked by hemichannels, which can be present at the plasma membrane as unpaired connexons (for review, see Evans & Martin, 2002; Saez et al., 2003a; Ebihara, 2003). The existence of unpaired connexons raises the question of whether they play a physiological role in the non-junctional plasma membrane, opening transiently like narrow windows to permit the exchange of small molecules.

Functional hemichannels containing Cx 43 have been described in cardiac myocytes (John et al., 1999; Kondo et al., 2000), astrocytes (Cotrina et al., 1998; Contreras et al., 2002; Stout et al., 2002), and osteoblast-like cells (Romanello & D'Andrea, 2001), and hemichannels based on Cx26 have been described in the outer retina (Kamermans et al., 2001). In *Xenopus* oocytes, hemichannels formed from endogenous Cx38 have been described (Ebihara, 1996), being permeable to polyamines after removal of divalent cations (Enkvetchakul et al., 2003). In previous reports, we have assessed some of the mechanisms of regulated ATP release from *Xenopus* oocytes (Bodas et al., 2000, Aleu et al., 2003). In the present study, we have investigated the permeability of endogenous Cx38 hemi-gap junction channels to ATP.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

### Solutions and chemicals

Isotonic Normal Ringer solution (NR, 238 mosmol l<sup>-1</sup>) contained (mM) 115 NaCl, 2 KCl, 10 (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid], HEPES/NaOH), 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.8 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4). Ca<sup>2+</sup>-free solution contained (mM) 115 NaCl, 2 KCl, 10 (HEPES/NaOH), 2 EDTA (pH 7.4). Modified Ringer solution (MNR) contained (mM) 115 NaCl, 2 KCl, 10 (HEPES/NaOH), 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4). Modified Barth's solution (MBS) contained (mM) 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO<sub>3</sub>, 20 HEPES, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 0.33 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5), supplemented with 100 IU ml<sup>-1</sup> penicillin and 0.1 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin. Hypertonic solution (HS) was prepared by adding mannitol to NR at a final concentration of 360 mM, resulting in an osmolarity of 552 mosmol l<sup>-1</sup>, as measured in a 5520 Wescor Osmometer.

Octanol, Flufenamic acid and Nystatin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Madrid, Spain). All drugs were dissolved in DMSO – Dimethyl Sulfoxide.

### Preparation of *Xenopus* oocytes

Mature female frogs (*Xenopus laevis*) were purchased from Centre d'Elevage de Xenopes (Montpellier, France). Frogs were maintained alive and handled in accordance with EU regulations and under the supervision of the Council for Animal Research Ethics of the University of Barcelona. Oocytes were prepared as follows: frogs were anaesthetized in cold distilled water containing 1.7 g l<sup>-1</sup> tricaine (ethyl 3-aminobenzoate

methanesulfonic acid; Sigma). Ovarian sacs were extracted by sterile surgical procedures and placed in MBS. The frogs were then immediately placed in a small water tank until they started to swim. Approximately 3 months after the first surgery, the frogs underwent contralateral surgery and were killed by decapitation. Stage V and VI oocytes were collected using fine-tipped forceps and maintained at 16-17 °C in MBS. The follicle envelope was removed by treatment with 0.5 mg ml<sup>-1</sup> collagenase 1A (Sigma) in NR for 45-50 min.

### **Depletion of endogenous Cx38 expression from *Xenopus* oocytes**

An antisense oligonucleotide complementary to Cx38 mRNA (ASCx38), 5'-GCTTAGTAATTCCCATCCTGCCATGTTTC-3' (Barrio et al., 1991), was synthesized by Invitrogen-Life Technologies S.A., Barcelona, Spain. The oligonucleotide was rehydrated in ultrapure water and injected (50 nl, 2 mg ml<sup>-1</sup>) into oocytes 24-48h before recording to deplete endogenous Cx38 expression.

### **Cloning and overexpression of Cx38 from *Xenopus* oocytes**

Total RNA was purified from *Xenopus* oocytes using the Ultraspect RNA isolation system (Biotecx, Houston, TX). 5 µg of total RNA were reverse transcribed using the First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) according to the manufacturer instructions, and the resulting product was amplified by PCR with the following primers: forward 5' ATGGCAGGATGGGAATTACTAAAGCT 3' and reverse 5' AACATACTGCTGCTTGAAGAGG 3' (Invitrogen S.A.,



Barcelona, Spain). The cDNA (from nucleotide 121 to 1123 of Gene Bank Acc No 214045) was cloned into the pSTBlue-1 vector (Novagen, Madrid, Spain) and full-length sequenced.

pSTBlue-1-Cx38 plasmid (10 µg) was used as a template for *in vitro* transcription using the mCAP RNA Capping Kit (Stratagene, Barcelona, Spain). The cRNA obtained was injected (50 nl, 1-2 mg ml<sup>-1</sup>) into oocytes 3 days before membrane current recordings.

### **Electrophysiological records**

Whole-cell recordings were performed using a two-microelectrode voltage-clamp configuration. The voltage and the current microelectrodes were filled with KCl (3 M) and had resistances ranging from 1 to 2 MΩ. The bath electrode was an Ag-AgCl pellet that made contact with the recording solutions through an agar bridge. Membrane potential and current were digitized through a Digidata-1200A converter (Axon Instruments). The board was controlled by the Whole Cell Analysis Program (kindly provided by John Dempster, University of Strathclyde, UK). The signal was filtered at half the frequency of acquisition. Solutions were changed by gravity and controlled by electrovalves (ALA, Scientific Instruments, New York).

### **Dye-injection studies and dye release**

Lucifer Yellow (LY, Sigma) was injected (9.2 nl, 50 mg ml<sup>-1</sup>) into each oocyte 6h prior to analysis. For measurement of LY release, a group of 20-50 defolliculated oocytes was placed in a conical flask containing 1 ml of NR solution. After 5 minutes, the oocytes were washed and the NR solution was replaced with 1 ml of a

Ca<sup>2+</sup>-free solution. After 8 minutes, the release of LY was stopped by replacing the solution with 1 ml of NR solution for 5 minutes. During incubation with NR or Ca<sup>2+</sup>-free solution, 25 µl samples were taken every 30 seconds and transferred to a fluorimeter cuvette containing 500 µl of distilled water. The amount of LY released was determined using an F-2000 fluorescence spectrophotometer (Hitachi) with the excitation filter set at 428 nm and emission at 520 nm.

### **Preparation of luminescent reaction**

A vial of luciferase extract lantern from *Photinus pyralis* (Sigma) was re-suspended in 1 ml of MNR and desalted in a 10 ml, 10 DG column (Biorad) equilibrated with MNR. In experiments using hypertonic solution, HS was used for resuspension of luciferase and column equilibration. 200 µl of D-luciferin (2.5 mg ml<sup>-1</sup>; Boehringer Mannheim) was added to the eluate and the resulting suspension was centrifuged for 30 s in a bench-top centrifuge. The eluate was frozen and maintained at -20 °C prior to use.

### **Measurement and analysis of ATP release from oocytes**

For measurement of ATP release and its inhibition by flufenamic acid and octanol, three groups of 20-50 defolliculated oocytes were placed in a conical flask containing 500 µl of NR solution. One group was quickly washed four times with 500 µl of 50 µM flufenamic acid in Ca<sup>2+</sup>-free solution and another group was washed with 500 µl of 1 mM octanol in Ca<sup>2+</sup>-free solution. Control oocytes were washed in Ca<sup>2+</sup>-free solution alone. Every 2

minutes, a 30  $\mu$ l sample was taken to measure the amount of ATP released.

For measurement of the inhibition and increase of ATP release, the oligonucleotide ASCx38 or the Cx38 cRNA were injected into a group of 20-50 oocytes. 48h after injection, the oocytes were defolliculated, placed in a conical flask containing 500  $\mu$ l of NR solution and quickly washed four times with a  $Ca^{2+}$ -free solution. Water-injected oocytes were used as controls. Samples of 30  $\mu$ l were taken every 2 minutes for ATP determination as follows:

A hemolysis tube containing 300  $\mu$ l of MNR solution was placed in a dark chamber. The following reagents and samples were added sequentially: 40  $\mu$ l of luciferase-D-luciferin mixture, 25  $\mu$ l of sample, and two known doses of ATP that were used as standards to calculate the amount of ATP released from oocytes by comparing the peak areas or amplitudes. Light from the luminescence reactions was captured by a photomultiplier (R374; Hamamatsu Photonics Iberica, Spain), amplified with a 5A22N Tektronix operational amplifier, filtered through a Bessel type filter at 3 Hz (Frequency Devices, MA), and digitized on a 486 PC using a TL-1 Labmaster card (Axon Instruments, Foster City, CA) controlled by AXOTAPE 1.2.01 software (Axon Instruments). Data in ASCII format were analyzed and the area under the curve was calculated using the WIN WHOLE CELL ANALYSIS V3.0.2 program and SIGMAPLOT 4.01 and 8.0.

For measurement and analysis of ATP release in single oocytes treated with nystatin we followed a procedure described elsewhere (Bodas et al., 2000). Briefly, one oocyte, 48h after injection with ASCx38, was placed in the recording chamber and the two electrodes were inserted. To test the effect of

ASCx38, the oocyte was bathed with calcium-free solution for a minute and returned to NR. The oocyte was then perfused with NR + 100  $\mu$ M nystatin and, when a current about 1500 nA was recorded, the flux was stopped and a small volume (20  $\mu$ l) of luciferin-luciferase mixture was added to the recording chamber, which was completely light-proof. The light generated by the enzymatic reaction was transmitted through six optic fibers placed in front of the six planes of the recording cuvette. The end of the optic fibers was focused in front of a photomultiplier (Hamamatsu, R374) and controlled by a slit. The resulting electric signal was amplified in a P16 Grass amplifier (USA), filtered at 5 Hz in a Bessel filter (Frequency Devices, USA) and collected by a BNC-2090 card (National Instruments). To calculate the amount of ATP released, a known dose of ATP was added through a third pipette, with an electronic nanoinjector (Nanoject, Drummond). This dose was registered 10 min after starting the electrophysiological recording in NR + 100  $\mu$ M Nystatin, which was made at room temperature (22-23  $^{\circ}$ C).

### **Measurement of ATP total amount in oocytes**

For measuring the content of ATP in oocytes, one oocyte was placed in an Eppendorff tube containing 30  $\mu$ l NR + 5% TCA (Trichloroacetic acid). The oocyte was homogenized and, following centrifugation, the supernatant was mixed with 1 ml. of ether saturated with water to extract the TCA (this process was repeated five times).

Samples of 1-10  $\mu$ l were taken for ATP determination as follows: a hemolysis tube containing 300  $\mu$ l of MNR solution was placed in a dark chamber. The following reagents and samples were added

sequentially: 10  $\mu$ l of luciferase-D-luciferin mixture, 1–10  $\mu$ l of sample, and two known doses of ATP that were used as standards to calculate the content of ATP in oocytes by comparing the peak areas or amplitudes. Light from the luminescence reactions was captured by a photomultiplier (R374; Hamamatsu Photonics Iberica, Spain), amplified with a 5A22N Tektronix operational amplifier, filtered through a Bessel type filter at 3 Hz (Frequency Devices, MA), and digitized on a 486 PC using a TL-1 Labmaster card (Axon Instruments, Foster City, CA) controlled by AXOTAPE 1.2.01 software (Axon Instruments). Data in ASCII format were analyzed and the area under the curve was calculated using the WIN WHOLE CELL ANALYSIS V3.0.2 program and SIGMAPLOT 4.01 and 8.0.

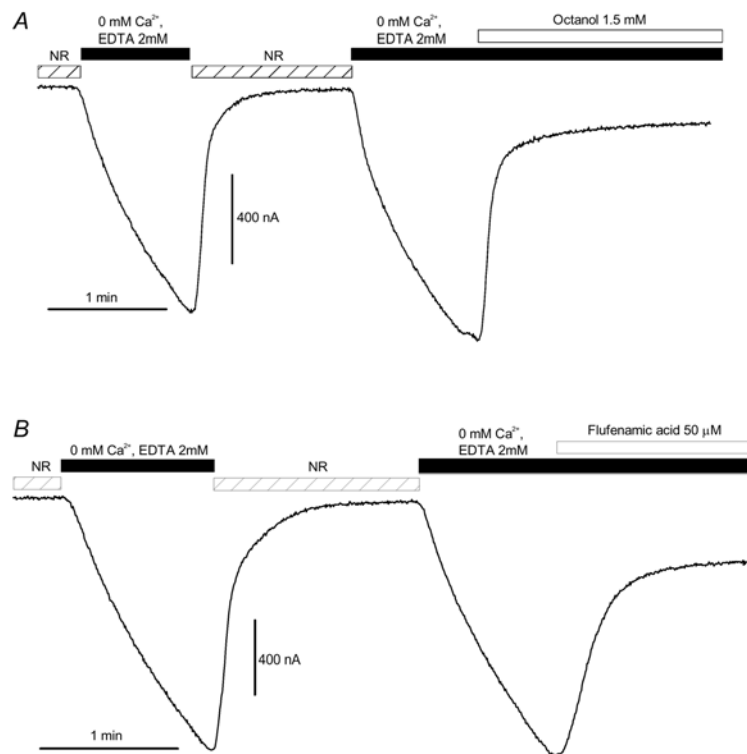
### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Sigma Stat 2.02 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Values given in the text correspond to the mean  $\pm$  S.E.M. Student's t-test was used to compare two group means of normally distributed data. A significance level of  $p < 0.05$  was adopted in all comparisons.

## 2.3 RESULTS

### **The calcium-sensitive current is inhibited by octanol and flufenamic acid**

*Xenopus* oocytes perfused with a calcium-free solution showed a slowly activated inward current that was reversibly inactivated when the calcium-containing physiological solution was replaced. After 1 minute of perfusion with the calcium-free solution, the amplitude of the current was  $760 \pm 65$  nA ( $n=53$ ). The inactivation of the current after replacing calcium was faster than its activation in calcium-free medium (Figura R-2.1). Once activated, the current was inhibited by 1.5 mM octanol in calcium-free solution. The inhibition was  $88.2 \pm 4.9$  % (Figura R-2.1A). A similar effect was obtained using 50  $\mu$ M flufenamic acid, which caused a  $76.6 \pm 2.8$  % inhibition (Figura R-2.1B).

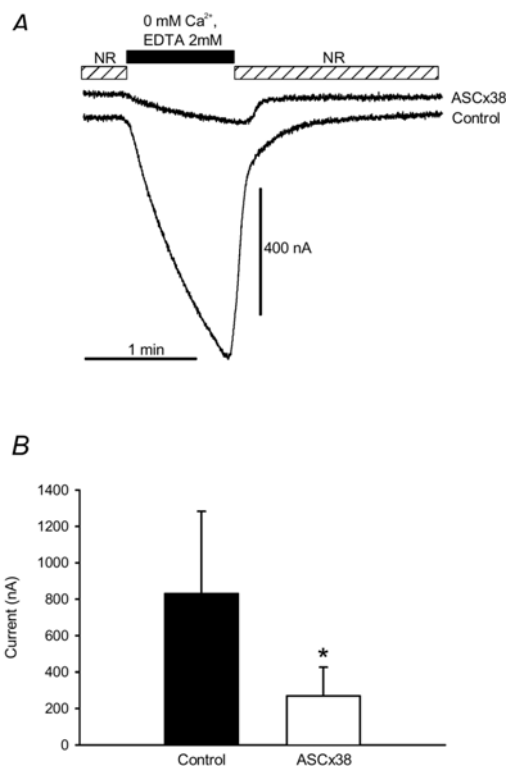


**Figura R-2.1: *Xenopus* oocytes exhibit a large calcium-sensitive current that is inhibited by octanol and flufenamic acid** (A) Oocytes display a large current induced upon removal of external calcium. The current was reversibly closed when oocytes were perfused with NR solution, and inhibited when octanol was added to the calcium-free solution. (B) The addition of flufenamic acid to the calcium-free solution inhibited the current induced by removing external calcium. Holding potential -60 mV. Bath solutions were changed as indicated.

### **The calcium-sensitive current depends on Cx38 expression**

To demonstrate the direct implication of Cx38 in the activation of the inward current in a calcium-free medium, *Xenopus* oocytes were injected, 48 h before recording, with the antisense oligonucleotide ASCx38, to decrease Cx38 expression, and with

Cx38 cRNA, to overexpress Cx38. In oocytes injected with ASCx38, a significant reduction (70%) in the amplitude of the calcium-sensitive current was observed (Figura R-2.2). The mean amplitude of the current after 1 minute of activation was  $830 \pm 202$  nA and  $268 \pm 64$  nA ( $p < 0.05$ ) in control and ASCx38-injected oocytes respectively. Replicates were obtained from 6 different donors. In oocytes injected with Cx38 cRNA, a significant increase (207%) in the amplitude of the calcium-sensitive current was observed (Figura R-2.3). The mean amplitude of the current after 1 minute of activation was  $853 \pm 48$  nA and  $1767 \pm 85$  nA ( $p < 0.001$ ) in control and Cx38 cRNA-injected oocytes respectively. Replicates were obtained from 3 different donors.

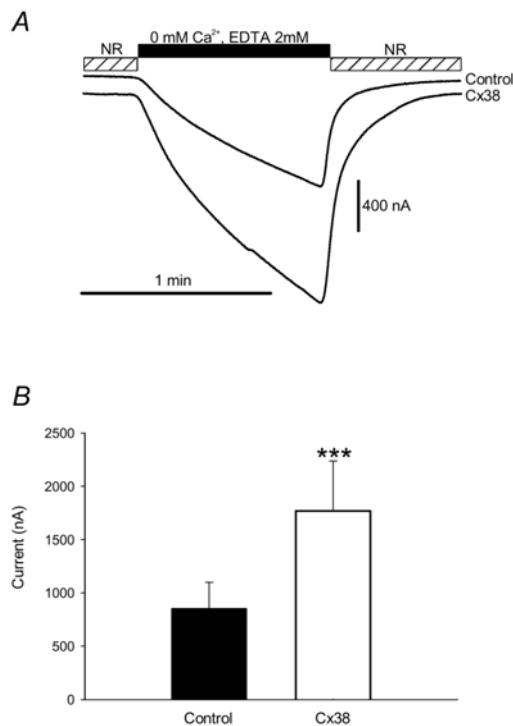


**Figura R-2.2: The calcium-sensitive current displayed by *Xenopus* oocytes decreases by depletion of endogenous Cx38.**

(A) A large current was observed in control oocytes, induced upon removal of external calcium. Cx38 antisense oligonucleotide (ASCx38)-injected *Xenopus* oocytes demonstrate a markedly reduced calcium-sensitive current. The ASCx38 was injected into oocytes 48 h before recording. (B) A significant reduced calcium-sensitive current was recorded ASCx38-injected oocytes. Oocytes were clamped at -60

mV. Bath solutions were changed as indicated. \* $p < 0.05$ ,  $n = 10$ .





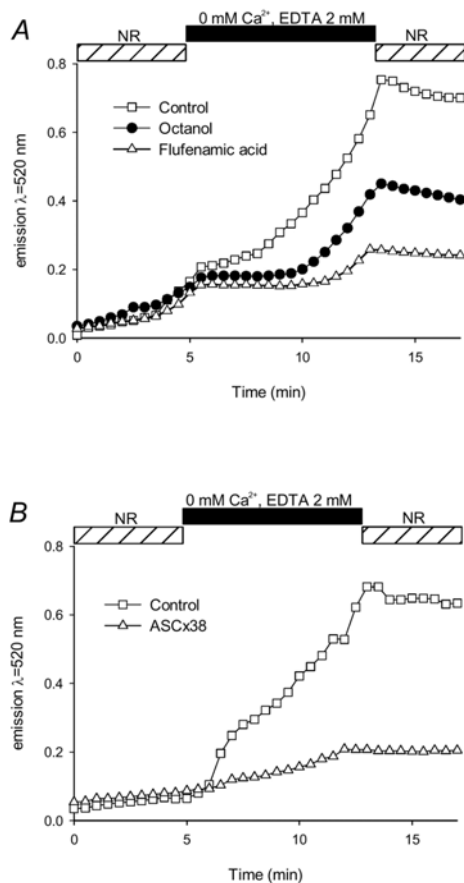
**Figura R-2.3: The calcium-sensitive current displayed by *Xenopus* oocytes is increased by overexpression of Cx38 (A)**

The current activated by the removal of external calcium was enhanced in all batches of oocytes injected with Cx38 cRNA. (B) A significantly increased calcium-sensitive current was recorded in Cx38 cRNA-injected oocytes. Oocytes were clamped at -60 mV. Bath solutions were changed as indicated. \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 30$ .

### Lucifer Yellow flows through Cx38 hemichannels

If the opening of Cx38 hemichannels is involved in the generation of the inward current generated in the absence of free calcium ions, then small molecules (<1 kDa) should also flow through the open hemichannel. To assess small molecule permeability, oocytes were preloaded with LY. In 8 out of 10 experiments we observed a leak of LY when the oocytes were bathed in calcium-free solution. The release was sustained for at least 10 min and was stopped when the calcium-free medium was replaced with a calcium-containing solution. This release of LY was prevented in oocytes incubated with 1.5 mM octanol or 50  $\mu$ M flufenamic acid (Figura R-2.4A) or previously injected with ASCx38 (Figura R-2.4B). Furthermore, throughout the time in

which the oocyte was perfused with the calcium-free solution, the current was activated (Figura R-2.4C).



**Figura R-2.4: Lucifer Yellow (LY) release from *Xenopus* oocytes**

LY was injected into oocytes 6h prior to analysis and its release was evaluated by measuring light emission at 520 nm in the supernatant of a group of oocytes immersed in the indicated solutions. A clear increase in dye release was induced by calcium-free solution in control oocytes ( $\square$ ); this stopped when calcium was added to the medium. (A) In contrast, oocytes incubated with 1.5 mM octanol ( $\bullet$ ) or 50  $\mu$ M flufenamic acid ( $\Delta$ ) and (B) oocytes previously injected with ASCx38 ( $\Delta$ ) did not show such an increase in LY release upon removal of external

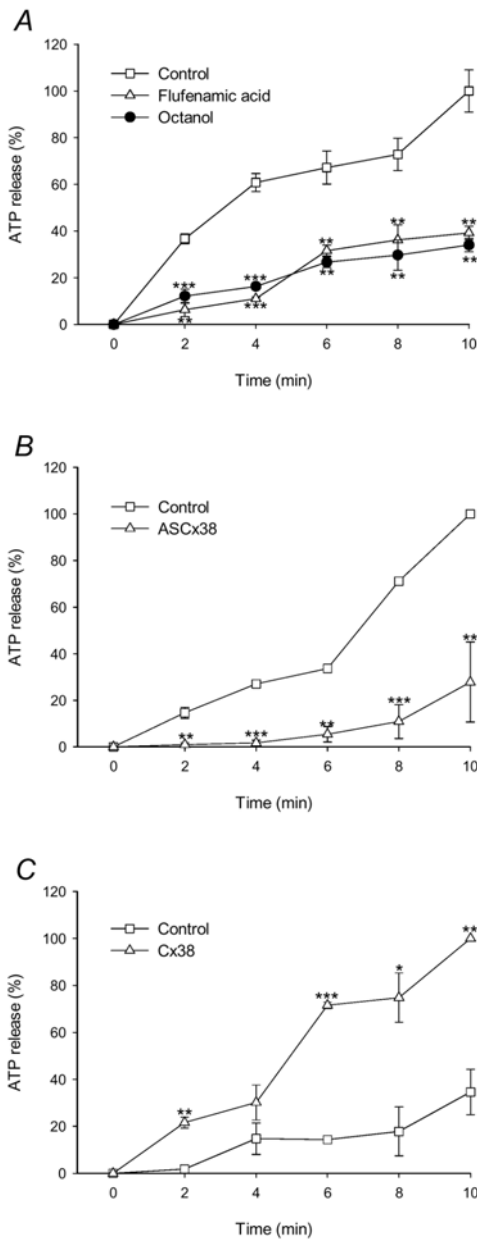
calcium. (C) The calcium-sensitive current is activated for prolonged periods, up to 10 min. Note that the scale of current amplitude is different to that presented in Figures 1, 2, and 3.

### ATP is released through hemichannels

The results presented here predict that ATP will be released through hemichannels formed by Cx38 when oocytes are incubated in calcium-free media. To assess this possibility, we used the highly sensitive luciferase-D-luciferin method to detect

ATP release from *Xenopus* oocytes. Incubation of oocytes with calcium-free solution resulted in an ATP release of  $0.04 \pm 0.023$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (n = 6), which was prevented by 1.5 mM octanol or 50  $\mu$ M flufenamic acid (Figura R-2.5A). After 10 min of incubation with calcium-free solution, the inhibition caused by octanol and flufenamic acid was 66 % and 61 % respectively, compared with untreated controls. Similarly, after 10 minutes of incubation, ASCx38-injected oocytes showed a 72% inhibition of ATP release (n=4) compared with water-injected controls (Figura R-2.5B). Moreover, ATP release showed a 300% increase (n=3) in Cx38 cRNA-injected oocytes compared with water-injected controls (Figura R-2.5C).

The differences in total amount of ATP in the different groups of oocytes were not statistically significant;  $1615 \pm 392$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> for control oocytes,  $1302 \pm 127$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> for ASCx38 injected oocytes and  $1720 \pm 323$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> for mRNA Cx38 injected oocytes. (n=5).



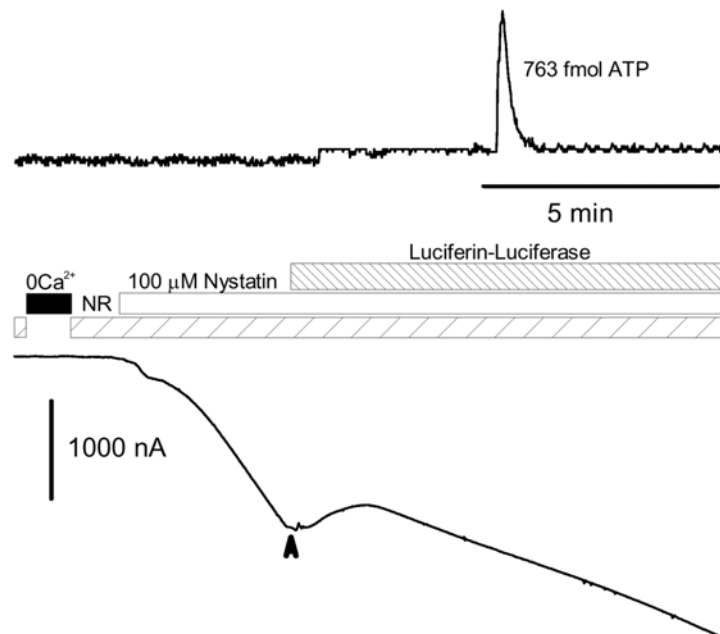
**Figura R-2.5: Cx38 mediate ATP release induced by a calcium-free solution in *Xenopus* oocytes**

A group of oocytes was placed in a small volume of calcium-free solution in the presence or absence of the indicated gap junction blocker. The content of ATP in the supernatant was measured via the chemiluminescent reaction of luciferin-luciferase. The results were normalized to the amount of ATP measured after 10 minutes in the calcium-free solution. (A) The gap junction inhibitors flufenamic acid ( $\Delta$ ) and octanol ( $\bullet$ ) caused a significant reduction in ATP release upon removal of external calcium, compared with control oocytes ( $\square$ ). (B) Injection of ASCx38 into oocytes ( $\Delta$ ) produced a significant inhibition of ATP release when they were placed in a calcium-free solution, compared with water-injected controls ( $\square$ ). (C) Cx38 cRNA injection ( $\Delta$ ) produced a significant increase in ATP release in the absence of external calcium, compared with water-injected controls ( $\square$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 4$ .

significantly increased ATP release in the absence of external calcium, compared with water-injected controls ( $\square$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 4$ .

**The current activated by nystatin does not induce ATP release in *Xenopus* oocytes with Cx38 depletion**

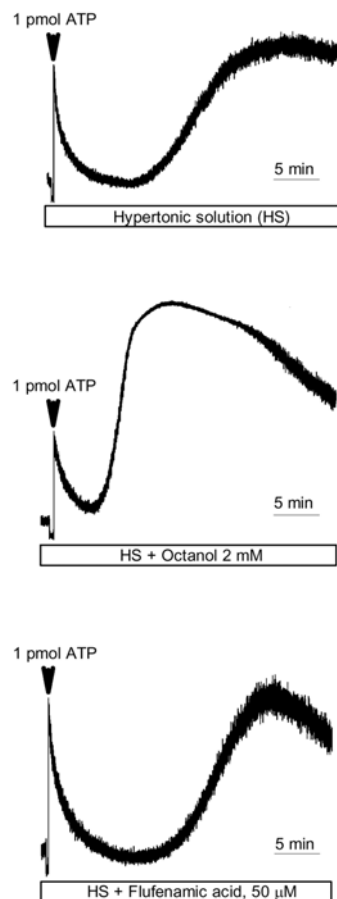
ASCx38 injected oocytes showed a significant reduced calcium sensitive current after 1 minute of perfusion with calcium-free solution that was reversibly inactivated when calcium was replaced. During long periods (up to 10 minutes) of nystatin (100  $\mu$ M) incubation, a large inward current was recorded but no ATP release was detected. Because these experiments were done in the absence of divalent chelating agents -the lack of interaction of EDTA with  $Mg^{2+}$  allowed us to measure the light generated when ATP interacts with the luciferin luciferase mixture- we recorded the nystatin induced current and the light emitted during ATP release simultaneously (Figure 6). The amplitude of the current induced by nystatin was larger than the native calcium sensitive currents but no ATP release was detected in any of the 6 experiments .



**Figura R-2.6: Nystatin does not induce ATP release in *Xenopus* oocytes with Cx38 depletion** The ASCx38 was injected into oocytes 48 h before recording. The experiment was done using a single oocyte previously injected with Cx38 antisense oligonucleotide (ASCx38). The oocyte showed a markedly reduced calcium-sensitive current reversibly inactivated when calcium was replaced. Because of its small amplitude, it cannot be seen on the graph. Perfusion with 100  $\mu$ M nystatin produced a large inward current. When that current was near 1500 nA, the flux was stopped (arrowhead) and a small volume (30  $\mu$ l) of the luciferin-luciferase mixture was added to reveal, simultaneously, the ATP release and the activation of unspecific inward current. After 3 minutes of recording, the current was still activated, no extracellular ATP was detected, and then a known dose of 763 fmol of ATP was added to test the sensitivity of the reaction. Oocytes were clamped at -60 mV. Bath solutions were changed as indicated by bars. Note that when the flux was stopped, the inward current diminished, but continued increasing after a while.

## Hemichannel inhibitors and ASCx38 have no effect on ATP release induced by hypertonic solution

Since we have previously reported that hypertonic solutions induce ATP release (Aleu et al., 2003), we tested whether this effect is mediated by Cx38. ATP release induced by hypertonic solution ( $0.05 \pm 0.008$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) was not inhibited by octanol ( $0.06 \pm 0.019$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) or flufenamic acid ( $0.05 \pm 0.014$  pmol ATP oocyte<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), as shown in Figura R-2.6 (n = 4). In addition, injection of oocytes with ASCx38 did not modify ATP release under these conditions (data not shown).



**Figura R-2.7: Hypertonicity induces ATP release from oocytes via a hemichannel-independent pathway** ATP release can be induced by hypertonicity. 10 oocytes were placed into a tube containing hypertonic solution and a luciferin-luciferase mixture, and the release of ATP was measured continuously. Upper graph: ATP release in control oocytes placed in hypertonic solution (HS). At the beginning of the recording, 1 pmol of ATP was added (arrowhead). A slow release of ATP started after 10 minutes of incubation. Octanol and flufenamic acid, known inhibitors of connexins, did not inhibit the release of ATP (middle and lower graph).

## 2.4 DISCUSSION

In organs and tissues, gap junctions couple electrically and metabolically neighboring cells, contributing to their synchronization. Members of the connexin protein family form hexameric polymers that connect with the hexamer of the adjacent cell, establishing an aqueous pore that allows the flow of ions and low molecular mass metabolites between the cells. However, connexin hexamers, also known as connexons, connexin hemichannels, or simply hemichannels, may be inserted in the plasma membrane without forming a gap junction channel with the adjacent cell. This phenomenon may be associated with the cellular turnover of connexins, representing a transient form until it is connected to the complementary hexamer of an adjacent cell to form a gap junction (Bennett et al., 2003). Alternatively, it might represent an isolated functional structure with an independent physiological role (Bennett et al., 2003).

Little is known about the cellular and molecular mechanisms of ATP release. Various possibilities have been suggested, each of which may be related to the specific biological model employed.

Several reports have highlighted the link between connexin expression and ATP release in cultured astrocytes (Cotrina et al., 1998; Cotrina et al., 2000; Stout et al., 2002; Arcuino et al., 2002; Stout et al., 2003), in which extracellular ATP mediates the propagation of calcium waves. However, the cellular heterogeneity of these cultures, together with a recently identified exocytotic component of ATP release (Coco et al., 2003; Abdipranoto et al., 2003) raises doubts as to the



mechanism through which ATP is released in this experimental model. Furthermore, results obtained using Cx43 knockout mice indicate that ATP release is independent of calcium wave propagation in the neocortex (B. Haas, et al., 2004).

To explore whether other connexins are involved in ATP release, we have used *Xenopus* oocytes as an experimental model that represents a highly homogeneous population of cells from a single donor that exhibit the same qualitative electrical properties. In our hands, all of the oocytes tested from different batches of animals displayed the calcium-sensitive inward current reported by a number of laboratories (Arellano et al., 1995; Reifarth et al., 1997; Zhang et al., 1998). This current is activated by solutions devoid of divalent cations (Weber et al., 1995) and is apparently non-selective, being described either as cationic or anionic (Ebihara, 1996; see Weber, 1999 for review). Here, we have demonstrated an inhibition of the calcium-sensitive current by the gap junction blockers flufenamic acid and octanol, along with an exquisite dependence on the levels of expression of Cx38. Oocytes injected with ASCx38 exhibited significantly lower currents, whilst those injected with Cx38 cRNA displayed significantly higher currents than controls. These results are consistent with those of previous studies (Ebihara et al., 1989, Barrio et al., 1991) and, taken together, support the view that the calcium-sensitive current is exclusively due to the opening of hemichannels formed by endogenous Cx38.

To further confirm this relationship between Cx38 hemichannels and the calcium sensitive current, we have shown that during the period of time in which the current is activated, small molecules such as the fluorescent marker LY are released

from injected oocytes. The release of LY was inhibited by the gap junction inhibitors octanol and flufenamic acid. Moreover, this release of LY is also dependent on the level of Cx38 expression. Consistent with this, the release of polyamines such as spermidine has been reported under the same experimental conditions used in this study (Enkvetchakul et al., 2003).

In this study, we have established a relationship between the opening of hemichannels and ATP release. In a previous work, we developed a method to measure the release of ATP from a single oocyte under voltage clamp recording conditions (Bodas et al., 2000). In those experiments, oocytes were bathed in a solution containing luciferin-luciferase. However, in the present study, we could not use this experimental approach because activation of the calcium-sensitive current requires that the concentration of divalent cations (either  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ) is very low, a condition in which luciferin-luciferase does not emit light in the presence of ATP. To resolve this difficulty, we immersed the oocytes in a calcium-free solution containing EDTA, removed aliquots of the supernatant at defined intervals, and then measured the amount of ATP with luciferin-luciferase containing an excess of  $\text{Mg}^{2+}$ .

As occurred with the calcium-sensitive current, gap junction inhibitors inhibited the release of ATP. Moreover, ATP release exhibited a strong dependence on Cx38 expression: oocytes expressing low levels of Cx38 also released less ATP than controls. Furthermore, overexpression of Cx38 was correlated with a higher level of ATP release. These effects are not a consequence of differences in the content of ATP in oocytes expressing higher or lower levels of Cx38 so, in our view, these

results indicate that Cx38 hemichannels permeate for ATP. Measuring the electrical charge supported by the calcium sensitive current over a period of 1 min (as the integral of the contour delimited by the current) and calculating the electrical charge due to the amount of ATP released, -given a charge of -3 per molecule-, we estimated that the ATP released contributed only 0.1% of the total activated current.

In addition to hemichannels, the classical pathway of exocytotic release of ATP should also be considered. ATP release by exocytosis has been described in *Xenopus* oocytes in response to mechanical stimulation (Maroto and Hamill, 2001). However, we ruled out this possibility because the conditions used -calcium-free solution without mechanical stimulation- do not support exocytosis.

We tested whether the ATP release described in oocytes under hypertonic stress (Aleu et al., 2003) is also mediated by Cx38. The insensitivity of hypertonicity-induced release of ATP to gap junction blockers indicates that this process is not mediated by Cx38 hemichannels.

Furthermore, in Cx43 transfected cells, small changes in external calcium concentration have been related to changes in cell volume because non-transfected cells were insensitive to alterations of external calcium (Quist et al., 2000), suggesting a role of hemichannels in cell volume control. However, *Xenopus* oocytes only respond to drastic changes in osmolarity and, in addition, the oocytes placed in a calcium-free solution did not swell (data not shown).

Because of the different experimental strategies that we have followed to activate an unspecific inward current, the

question arises as to whether any inward current supports the release of ATP. Nystatin is an antibiotic that is used to permeabilize the cell membrane to monovalent cations. This property is used to record cell currents in perforated whole cell patch-clamp configuration (Levitan et al., 1990). Here we show that nystatin irreversibly induces a large inward current. This is larger than the calcium-sensitive current but nystatin does not induce any detectable increase of ATP release. In addition, because the experiments with nystatin were done in ASCx38 injected oocytes, the results suggest that expression of Cx38 is necessary for ATP release.

However, recent studies overexpressing Cx43 (Fu et al., 2004) or in Cx43 null astrocytes (Iacobas et al., 2004) demonstrated an alteration of gene expression. It may be that in oocytes in which the Cx38 expression is increased or decreased, other genes may also be activated or inactivated, therefore we cannot completely rule out the possibility that other proteins may participate indirectly in the release of ATP.

Until recently, the general view was that exocytosis was the principal mechanism by which ATP is released from cells, although a hypothetical membrane pathway could also exist. However, in the case of *Xenopus* oocytes, various pathways of ATP release are present in the same cell: hemichannels, as shown in the present paper, a brefeldin-sensitive exocytotic pathway (Maroto and Hamill, 2001), and the electrogenic release of ATP apparently mediated by NTPDase (Bodas et al., 2000; Aleu et al., 2003). Now, in the light of these results, we suggest that different cellular and molecular mechanisms of ATP release coexist in *Xenopus* oocytes, sustaining an ATP release in

response to different stimuli. It will now be of interest to see whether the same molecular mechanisms apply to other cell types.



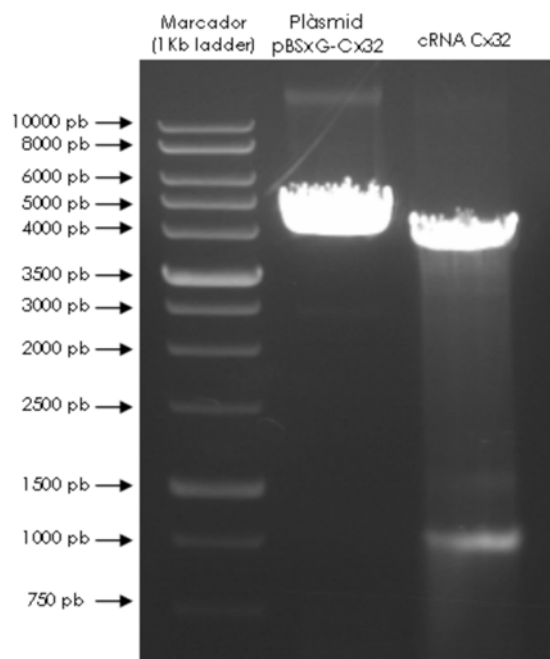
***3. Alliberació d'ATP a través de la connexina32  
expressada en oòcits de Xenopus laevis***





### 3.1 Obtenció de cRNA de la connexina 32

Per expressar la connexina 32 en els oòcits de *Xenopus* el primer que necessitàvem era obtenir el cRNA que injectaríem. El Dr. Luís Barrio, de l'Hospital Ramón i Cajal de Madrid, ens va cedir el plàsmid on hi havia clonada la Cx32 humana. Mitjançant tècniques de DNA recombinant (apartat 3 de Materials i Mètodes) vam poder aïllar i purificar un cRNA d'aproximadament 1000pb que coincidia amb l'esperat (Figura R-3.1).



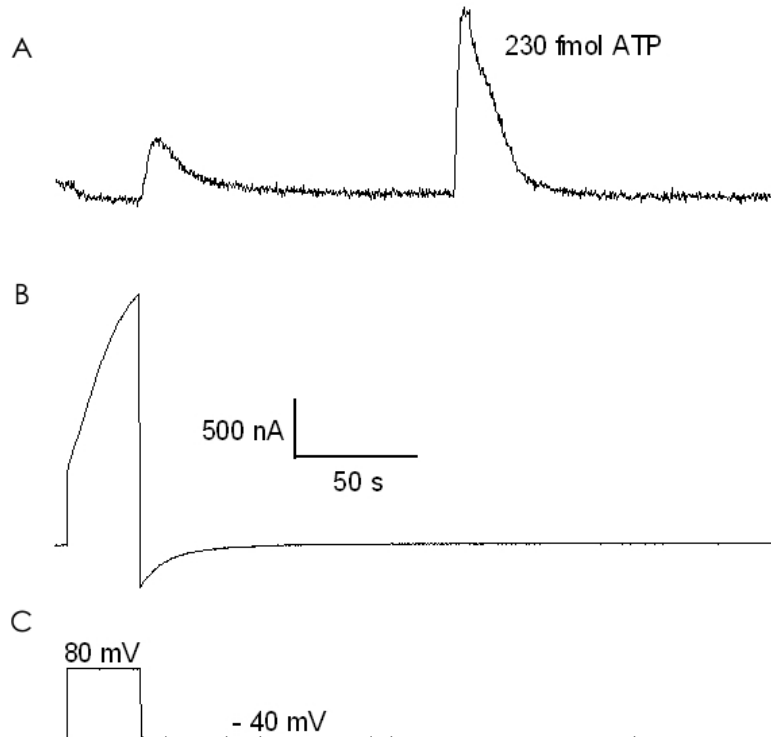
**Figura R-3.1: Producció del cRNA de la Cx32.**

Després d'obtenir el cRNA de la Cx32, es va comprovar en un gel d'agarosa que realment la mida de l'RNA obtingut es corresponia amb l'esperada, d'aproximadament 1000pb.

El cRNA obtingut s'injectava en els oòcits a una concentració 1–2 mg/ml, en un volum final de 50 nl/oòcit, 3 dies abans de fer l'experiment. Juntament amb el cRNA de la Cx32 també s'injectava un oligonucleòtid antisentit per la Cx38 (2 mg/ml), la connexina endògena dels oòcits de *Xenopus*, per tal de bloquejar-la i assegurar-nos que aquesta no interferia en els resultats obtinguts.

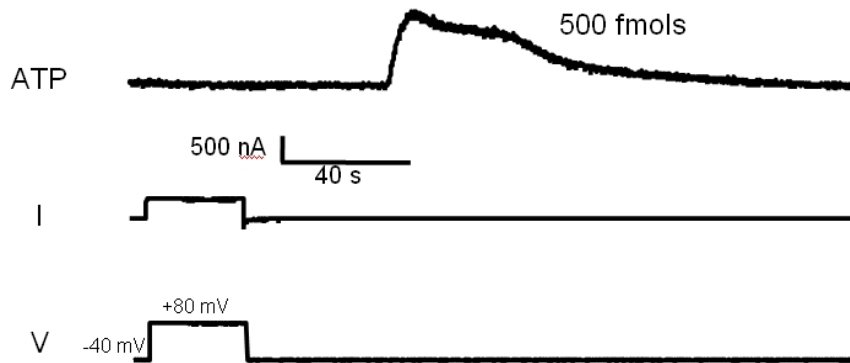
### **3.2 Activació de la connexina 32 i alliberació d'ATP**

Per activar la connexina 32 en els oòcits injectats vam utilitzar la tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes (apartat 7 de Materials i Mètodes). Vam realitzar un protocol de voltatge despolaritzant, basat en el protocol descrit per Gómez-Hernández et al., 2003, amb el qual, tenint la membrana de l'oòcit fixada a  $-40\text{mV}$ , la despolaritzàvem fins a  $+80\text{mV}$  durant 30 segons, retornant després al potencial inicial. En la Figura R-3.2 observem com, mentre la membrana està despolaritzada, es produeix un corrent de sortida d'aproximadament 1500 nA (Figura R-3.2B). Quan s'atura l'estímul després de 30 segons, es produeix un corrent de cua que finalment retorna a l'estat inicial. Coincidint amb aquest corrent és quan registrem una alliberació d'ATP (Figura R-3.2A).



**Figura R-3.2: Registre simultani d'alliberació d'ATP i de corrent iònic estimulat per voltatge degut a l'activació de la connexina 32.** (A) Alliberació d'ATP. (B) Corrent de membrana (noteu que el corrent de leak que es produeix en la despolarització no està corregit) (C) Voltatge de membrana. En el gràfic corresponent a l'alliberació d'ATP s'ha afegit una quantitat d'ATP coneguda per tal de poder evaluar la quantitat d'ATP alliberada.

En els registres control, pels quals vam utilitzar oòcits únicament injectats amb l'antisentit per la Cx38 (ASCx38), no vam registrar cap corrent de sortida significatiu en despolaritzar l'oòcit (Figura R-3.3). D'acord amb això, tampoc vam observar el corrent de cua que es produeix en la fase de repolarització, ni tampoc alliberació d'ATP.

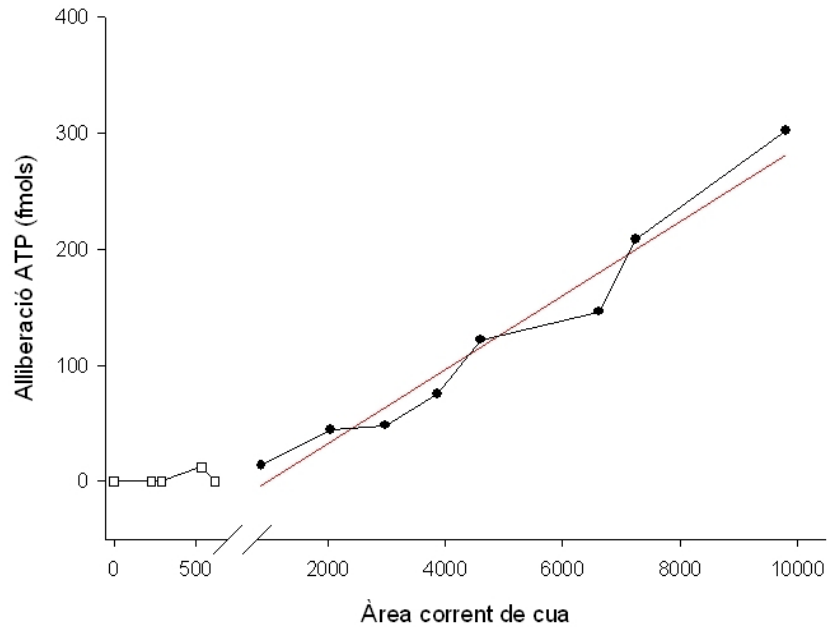


**Figura R-3.3: Registre simultani d'alliberació d'ATP i corrent iònic estimulat per voltatge amb oòcits injectats amb ASCx38 (control).** No es produeix cap tipus de corrent en despolaritzar la membrana dels oòcits que no expressen la Cx32.

### 3.3 Relació entre l'alliberació d'ATP i el corrent de cua

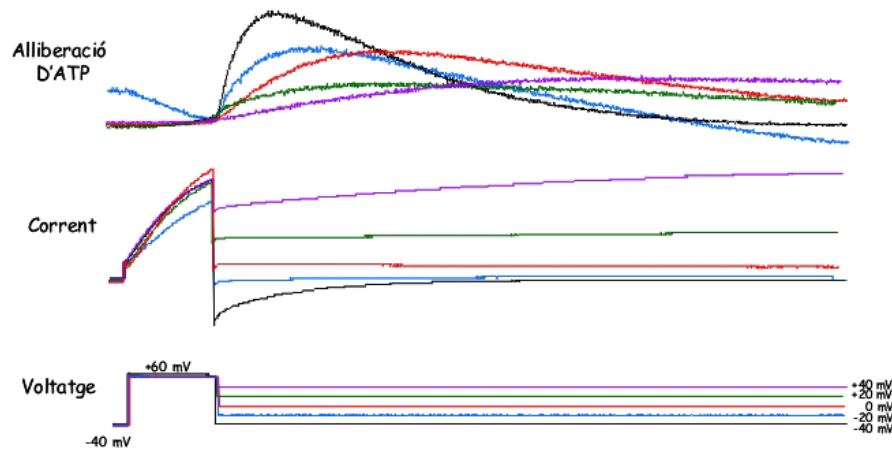
Per confirmar la relació entre el corrent de cua degut a l'activació de la Cx32 i l'alliberació d'ATP vam analitzar, per una banda, l'àrea del corrent de cua obtingut en cada registre i, per altra banda, l'alliberació d'ATP que s'havia produït. La quantitat d'ATP alliberada la mesuràvem posant l'àrea del pic d'ATP obtingut en relació amb l'àrea del pic d'ATP de calibració de quantitat coneguda que afegíem al final del registre de *voltage clamp*.

Tal i com mostra la figura R-3.4, vam obtenir una relació lineal ( $r^2 = 0,96$ ) entre l'amplitud del corrent de cua i l'alliberació d'ATP produïda. És a dir, com més gran era el corrent de cua, més quantitat d'ATP s'alliberava.



**Figura R-3.4: Relació entre el corrent de cua i l'alliberació d'ATP en oòcits injectats amb Cx32 i ASCx38 (●) i en oòcits control injectats només amb ASCx38 (□).**

A més a més, també vam voler comprovar que canvis en el corrent de cua es traduïen en canvis en l'alliberació d'ATP. Per això, després de despolaritzar la membrana, enlloc de fer el protocol habitual i retornar al potencial inicial (-40 mV), vam retornar a potencials de membrana diferents (-40 mV, -20 mV, 0 mV, 20 mV, 40 mV) i vam mesurar què passava amb l'alliberació d'ATP en cada un d'ells (Figura R-3.5). Degut a que en els nostres experiments la concentració d'ATP extracel·lular és gairebé zero, el potencial d'equilibri per l'ATP té valors molt positius. D'acord amb això, vam observar que com més positiu és el potencial de retorn, menys quantitat d'ATP s'alliberava, ja que es troba més proper al potencial d'equilibri per l'ATP.



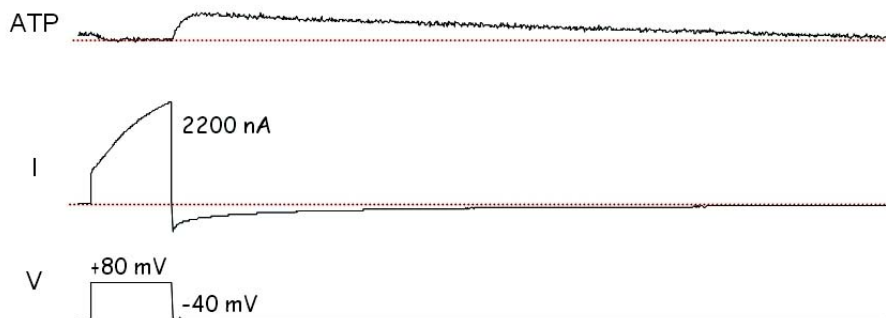
**Figura R-3.5: Registres simultanis d'activació de corrent i alliberació d'ATP realitzats amb un oòcit injectat amb Cx32.** Cada color correspon a un potencial de retorn diferent i han estat superposats per poder observar els diferents comportaments, tant del corrent de cua com de l'alliberació d'ATP, en cada un dels potencials de retorn estudiats.

### 3.4 Influència de l'absència d'ions divalents en l'activació de la Cx32 i l'alliberació d'ATP

Tal com ha estat descrit anteriorment (Gómez-Hernández et al., 2003) vam observar que, efectivament, l'absència d'ions divalents en la solució de registre, potenciava l'activació per voltatge dels oòcits injectats amb la Cx32.

La solució Ringer  $0\text{Ca-Mg}^{+2}$ , amb la qual perforíem l'oòcit, és una solució sense calci, però conté  $1\text{mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  per al correcte funcionament de la reacció de la luciferina-luciferasa. Aquesta presència de magnesi en el bany no és suficient per variar l'efecte del  $0\text{Ca}$  ja que vam comprovar que la perfusió de l'oòcit amb aquesta solució, per una banda, incrementava

l'amplitud del corrent de sortida que es produeix en activar la Cx32 per despolarització i, per altra banda, mantenia el corrent de repolarització obert durant més temps (Figura R-3.6), en comparació amb els registres fets amb la solució Ringer-Mg<sup>+2</sup>.

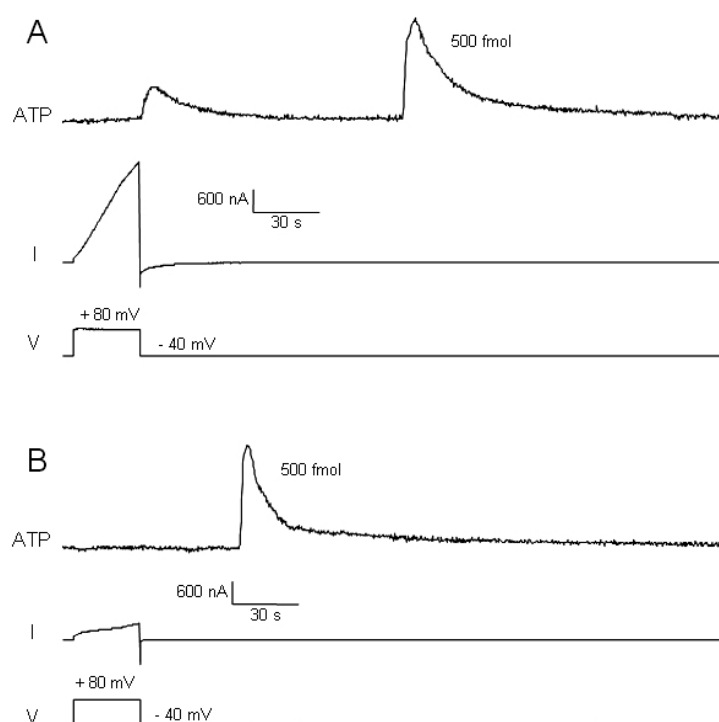


**Figura R-3.6: Registre simultani d'activació de corrent i alliberació d'ATP d'un oòcit que expressa Cx32 en una solució Ringer 0Ca-Mg<sup>+2</sup>.** Les línies vermelles discontinües indiquen els nivells de base.

### 3.5 L'alliberació d'ATP per activació de la Cx32 és independent de la via d'alliberació d'ATP per exocitosi

Per descartar totalment una implicació de la via d'alliberació d'ATP per exocitosi en els nostres experiments, vam realitzar, als oòcits prèviament injectats tant amb Cx32+ASCx38 com amb ASCx38 sol (controls), un pre-tractament amb Brefeldina A (BFA), una molècula que bloqueja l'ensamblatge vesicular en l'aparell de Golgi i, en conseqüència, l'exocitosi. Vam incubar els oòcits amb 5 µg/ml de BFA durant 2.5h i, posteriorment, vam fer els registres de voltage clamp utilitzant el protocol despolaritzant descrit anteriorment. En els resultats obtinguts no vam trobar diferències significatives entre els oòcits no tractats amb BFA i els

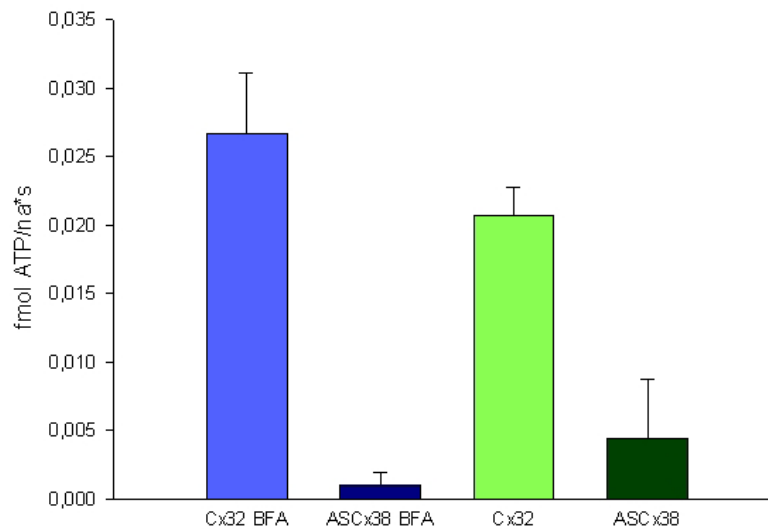
tractats amb BFA (Figura R-3.7). Els oòcits injectats amb la Cx32 i tractats amb BFA presentaven un corrent de sortida quan s'activaven per despolarització i alliberació d'ATP durant la fase de repolarització (Figura R-3.7 A) igual que ho feien els no tractats amb BFA. En els oòcits control no vam registrar alliberació d'ATP (Figura R-3.7 B).



**Figura R-3.7: Registres simultanis d'activació de corrent i alliberació d'ATP en oòcits tractats amb 5µg/ml de BFA abans del registre durant 2.5h. (A) Registre d'un oòcit injectat amb Cx32+ASCx38. (B) Registre d'un oòcit injectat amb ASCx38 (control).**



Per tant, els oòcits tractats amb BFA, amb la via d'exocitosi inhibida, continuaven alliberant ATP quan s'estimulava la Cx32. A més a més, tal i com mostra la figura R-3.8, no hi ha diferències significatives entre la quantitat d'ATP alliberada pels oòcits tractats amb BFA i la quantitat alliberada pels oòcits no tractats.



**Figura R-3.8 : Alliberació d'ATP en oòcits tractats amb BFA i oòcits no tractats, tant injectats amb Cx32 com injectats amb ASCx38.**

Per assegurar que el tractament amb BFA hagués funcionat correctament i que la via exocítica estigués realment bloquejada, vam mesurar la capacítància de la membrana dels oòcits just abans i després de fer el registre (veure apartat 9 de Materials i Mètodes). La capacítància es correlaciona amb l'àrea de la superfície de membrana i, per això, és una mesura molt utilitzada per estudiar la dinàmica de la membrana plasmàtica i els events d'exocitosi. Quan la capacítància augmenta vol dir que la superfície de membrana ha augmentat,

és a dir, s'hi han fusionat una o més vesícules. Els resultats de les mesures de capacítància es mostren en la Taula R-3.1.

Capacítància de membrana mitjana del oòcits injectats amb ASCx38 (control) abans de fer el registre	$1'575 \times 10^{-9} \pm 0,015 \text{ F}$
Capacítància de membrana mitjana del oòcits injectats amb ASCx38 (control) després de fer el registre	$1'635 \times 10^{-9} \pm 0,155 \text{ F}$
Capacítància de membrana mitjana del oòcits injectats amb Cx32+ASCx38 abans de fer el registre	$0,300 \times 10^{-9} \pm 0,071 \text{ F}$
Capacítància de membrana mitjana del oòcits injectats amb Cx32+ASCx38 després de fer el registre	$0'304 \times 10^{-9} \pm 0,075 \text{ F}$

**Taula R-3.1: Resum de les dades de mesura de la capacítància de membrana dels oòcits tractats amb BFA 5µg/ml.**

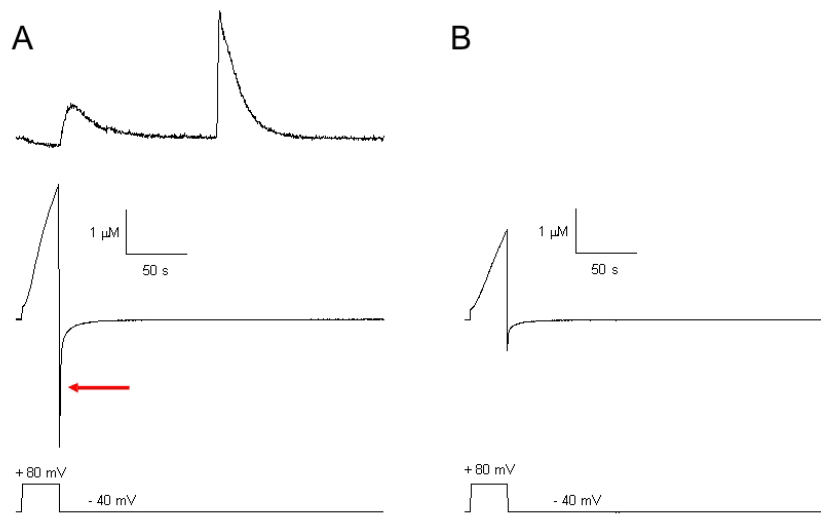
Les dades indiquen que no hi ha diferències significatives en la capacítància dels oòcits abans i després de fer els registres, per tant, podem dir que la via d'exocitosi estava realment inhibida i que no està implicada en l'alliberació d'ATP produïda per l'estímul de la Cx32 o, en tot cas, es dona en un percentatge tan petit que queda per sota dels límits de detecció dels nostres mètodes.

### **3.6 L'ATP alliberat a través de Cx32 és capaç d'activar receptors purinèrgics P2X<sub>1</sub>**

Els següents resultats van ser obtinguts per en Bulat Ziganshin, de la Universitat de Medicina de Kazan (Rússia), durant una estada al nostre laboratori l'estiu de 2005.

Partint de la base dels experiments mostrats en el capítol 3 de l'apartat de Resultats, on registràvem alliberació d'ATP en l'oòcit després d'estimular la Cx32 expressada en la membrana mitjançant un pols despolaritzant, vam voler comprovar si aquest ATP que s'alliberava era capaç d'activar receptors purinèrgics, concretament el receptor P2X<sub>1</sub>.

Per fer això, 3 dies abans de fer l'experiment, es van co-injectar oòcits amb el cRNA de la Cx32, el cRNA del receptor P2X<sub>1</sub> i també amb l'ASCx38 per tal d'inhibir la connexina 38 endògena. Al cap d'aquest temps, la Cx32, expressada en la membrana, s'estimulava durant 30 segons amb el mateix protocol despolaritzant descrit anteriorment, produïnt una alliberació d'ATP en l'oòcit (Figura R-3.9 A).



**Figura R-3.9: Expressió i activació de la Cx32 i el receptor P2X<sub>1</sub> en oòcits injectats amb Cx32, P2X<sub>1</sub> i ASCx38.** (A) Registre d'alliberació d'ATP i activació de la Cx32 per despolarització i del receptor P2X<sub>1</sub> pel mateix ATP alliberat. La fletxa assenyalava el corrent de cua augmentat. (B) Registre d'activació de la Cx32 i inhibició de l'activació del receptor P2X<sub>1</sub> mitjançant l'aplicació de suramina a la solució de registre.

L'amplitud del corrent de cua en els oòcits injectats amb Cx32+P2X<sub>1</sub>+ASCx38 era més gran que en els oòcits control, en els quals no s'hi havia injectat el receptor, indicant que una part del corrent iònic registrat era degut a l'activació dels receptors P2X<sub>1</sub> per part de l'ATP que s'alliberava a través de la Cx32.

A més a més, quan es va fer el registre aplicant suramina a l'oòcit, un inhibidor específic dels receptors P2X<sub>1</sub>, el corrent de cua disminuïa i es feia igual que en els registres control (Figura R-3.9 B), presentant només el component degut a l'activació de la Cx32. En el registre amb suramina no es va poder realitzar la mesura d'alliberació d'ATP ja que la suramina reaccionava amb la barreja de luciferina-luciferasa utilitzada.

**DISCUSSIÓ**

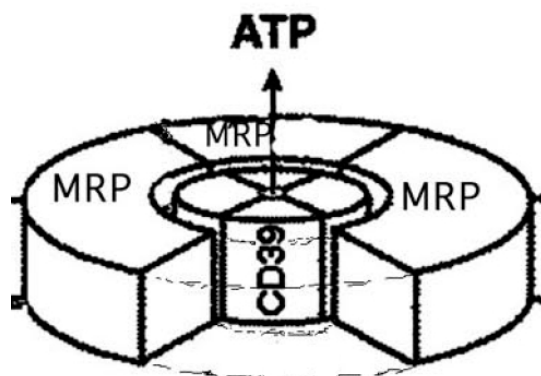


Tal com s'ha dit en la introducció, els mecanismes cel·lulars i moleculars d'alliberació d'ATP es coneixen poc. S'han suggerit diferents possibilitats, com són l'exocitosi, la CD39, les connexines, la CFTR, la glicoproteïna P o canals aniònics, que s'han estudiat en diferents models experimentals. En aquesta tesi ens hem centrat en dos d'aquests mecanismes: la CD39 i les connexines, i hem estudiat la seva implicació en l'alliberació d'ATP en el model experimental d'oòcits de *Xenopus*.

### **1. Alliberació d'ATP a través de la proteïna CD39 endògena de *Xenopus laevis***

La proteïna NTPDase1 o CD39 hidrolitza nucleòtids trifosfat i difosfat a nucleòtids monofosfat. Tot i que aquesta és la seva funció més estudiada i reconeguda, en el nostre laboratori hem treballat des de fa uns anys amb la hipòtesi de que la CD39 podria portar a terme una segona funció, en principi contrària a la primera: actuar com a proteïna transportadora d'ATP cap a fora de la cèl·lula.

Aquesta idea es basa en uns primers estudis que proposaven que la CD39 és una proteïna de membrana tetramèrica, amb una estructura molt similar als receptors P2X, al canal de potassi KIR6.2 o als canals de sodi epitelials (Wang et al., 1998), i que, en conseqüència, pot actuar com a porus o canal de membrana. En consonància amb això, Abraham et al., 2001, van hipotetitzar que un complex consistent en un nucli tetramèric de CD39 envoltat de quatre proteïnes MRP, similar al que es forma entre el receptor SUR i el canal KIR6.2 (Babenko et al., 1998), podria ser el responsable de l'alliberació d'ATP en eritròcits (Figura D-1).



**Figura D-1: Complex octamèric entre la proteïna MRP i CD39.** L'estructura tetramèrica de la CD39 li permet actuar com a canal de membrana i ser permeable a certes molècules com l'ATP (Extret d'Abraham et al., 2001).

En primer lloc, en el nostre laboratori, es va estudiar la implicació de la CD39 en l'alliberació d'ATP en oòcits de *Xenopus*, que expressen aquesta proteïna de forma endògena, estimulada mitjançant polsos hiperpolaritzants. Es va observar que, durant l'activació, es generava un corrent d'entrada que produïa una alliberació d'ATP en la cèl·lula. Tant el corrent com l'alliberació d'ATP augmentaven en oòcits en els que es va expressar de manera heteròloga la CD39 humana (Bodas et al., 2000).

Continuant amb aquests treballs es va voler estudiar també si la CD39 estava relacionada amb l'alliberació d'ATP induïda per estrès hipertònic en oòcits descrita en el nostre laboratori. Donat que no existien inhibidors específics per la CD39, vam voler sintetitzar un oligonucleòtid antisentit amb l'objectiu de conèixer quin efecte tenia el bloqueig de l'expressió de la CD39 en l'alliberació d'ATP. Com que la CD39 de *Xenopus* encara no estava clonada, vam dissenyar dos oligonucleòtids antisentit, ASCD3911 i ASCD3922, a partir de seqüències consens de



---

diferents espècies. Per comprovar que realment inhibien la CD39 vam utilitzar un mètode posat a punt anteriorment al laboratori, que es basa en mesurar l'activitat NTPDàsica de la proteïna (Bodas et al., 2000). Els resultats obtinguts posen de manifest l'eficàcia dels oligonucleòtids, sobretot de l'ASCD3922, ja que en els oòcits injectats amb aquest antisentit, l'activitat NTPDàsica de la proteïna CD39 disminuïa significativament. Cal destacar que recentment s'ha obtingut la seqüència nucleotídica de la NTPDasa1 de *Xenopus* (Massé et al., 2005) i que la seqüència de l'ASCD3922 presenta una alta homologia amb una part de la seqüència de la CD39 de *Xenopus*.

Així doncs, tornant al nostre interès en conèixer la implicació de la CD39 en l'alliberació d'ATP, vam injectar els oòcits de *Xenopus* amb l'ASCD3922 i vam mesurar el corrent iònic i l'alliberació d'ATP que es produïen quan sotmetíem l'oòcit a condicions d'estrès hipertònic. En els oòcits injectats amb l'ASCD3922, tant el corrent de membrana com l'alliberació d'ATP estaven disminuïts en comparació amb els oòcits control. En definitiva, els nostres resultats indiquen que la proteïna CD39 de *Xenopus* es pot activar mitjançant estrès hipertònic i que, en aquestes condicions, pot funcionar com un canal permeable per l'ATP. A més, l'injecció d'oligonucleòtids antisentit, és una eina vàlida per a l'estudi de la CD39 en els oòcits de *Xenopus* i, probablement, en altres tipus cel·lulars.

## **2. Alliberació d'ATP a través d'hemicanals**

Com ja s'ha dit, en diferents òrgans i teixits, les unions gap permeten la comunicació elèctrica i metabòlica entre cèl·lules

veïnes. Estan formades per dues subunitats hexamèriques de connexines, situades una en cada una de les membranes de les cèl·lules adjacents. Cada una d'aquestes subunitats s'anomena hemicanal o connexó. Se sap que aquests hemicanals poden estar formant una unió gap, juntament amb un altre hemicanal, o bé poden funcionar com a canals iònics independents (revisat per Ebihara et al., 2003 i Bennett et al., 2003).

Molts articles han posat de manifest la relació entre l'expressió de la connexina 43 i l'alliberació d'ATP en cultius d'astròcits (Cotrina et al., 1998; Cotrina et al., 2000; Stout et al., 2002; Arcuino et al., 2002; Stout et al., 2003), en osteoblasts (Romanello et al., 2003) i en cèl·lules endotelials bovines de la còrnea (Gomes et al., 2005) on l'ATP extracel·lular està implicat en la propagació de les onades de calci. Per contra, altres autors suggereixen que aquest ATP extracel·lular no s'allibera a través dels hemicanals de connexines, sinó que s'allibera per exocitosi (Coco et al., 2003; Abdipranoto et al., 2003), a través de canals aniònics (Abdipranoto et al., 2003) o mitjançant els mateixos receptors P2X<sub>7</sub> (Suadicani et al., 2006).

Per saber si altres connexines estan implicades o no en l'alliberació d'ATP, nosaltres hem utilitzat el model experimental d'oòcits de *Xenopus*, que no s'havia utilitzat abans per aquests estudis i que és una eina molt bona degut a la facilitat que tenim per expressar-hi de manera heteròloga les connexines que ens interessen i també pel fet que els oòcits representen una població de cèl·lules molt homogènia que ens permet obtenir resultats comparables.

## **2.1 Alliberació d'ATP a través dels hemicanals endògens d'oòcits de *Xenopus***

Els oòcits de *Xenopus* expressen una connexina endògena, la Cx38, de la qual sabem que pot formar hemicanals funcionals (Ebihara, 1996). Així doncs, vam voler comprovar si era permeable per l'ATP.

En condicions de repòs, aquesta connexina es manté tancada. Per activar-la, vam utilitzar una solució lliure d'ions divalents (Ebihara, 1996) que produïa un corrent sensible a calci ja descrit anteriorment per altres laboratoris (Arellano et al., 1995; Reifarh et al., 1997; Zhang et al., 1998). Aquest corrent es podia inactivar d'una manera reversible quan introduïem calci al medi. Per posar de manifest que realment es tractava d'un corrent no selectiu produït per l'activació de la Cx38, vam tractar els oòcits amb els inhibidors de les unions gap, àcid flufenàmic i octanol, i vam comprovar que tots dos eren capaços d'inhibir el corrent activat per la solució sense calci. Tot i que aquests inhibidors s'han utilitzat en molts treballs per inhibir les unions gap i també els hemicanals (Eskandari et al., 2002; Ye et al., 2003), és veritat que no són inhibidors específics per la Cx38. Per aquesta raó, vam utilitzar també un RNA antisentit contra la Cx38 (Barrio et al., 1991) per inhibir la proteïna, que injectàvem en els oòcits 48h abans de fer l'experiment. Al cap d'aquest temps, el corrent sensible a calci s'inhibia en un 70% indicant que la Cx38 era responsable de l'obertura del corrent. Al contrari, quan vam sobreexpressar la Cx38 en els oòcits vam obtenir com a resultat un augment significatiu del corrent sensible a calci. De la mateixa manera, altres autors han descrit l'alliberació

d'espermidina a través de Cx38 (Enkvetchakul et al., 2003) en les mateixes condicions experimentals utilitzades en el nostre estudi.

A més, també vam posar de manifest la relació entre els hemicanals de Cx38 i el corrent sensible a calci injectant en els oòcits el marcador fluorescent Lucifer Yellow, de baix pes molecular (521 kDa), i demostrant que s'alliberava de la cèl·lula durant el període de temps en què el corrent estava activat. L'alliberació de LY dels oòcits era inhibida per octanol i àcid flufenàmic i era dependent dels nivells d'expressió de Cx38.

En resum, els nostres resultats mostraven que el corrent iònic sensible a calci que observàvem en els oòcits de *Xenopus* es podia bloquejar amb inhibidors de les unions gap i era dependent dels nivells d'expressió de Cx38, indicant que aquest corrent era degut a l'obertura dels hemicanals formats per la Cx38, en consonància amb altres estudis realitzats anteriorment (Barrio et al., 1991; Ebihara, 1996). Així doncs, donat que disposàvem de bones eines tant per activar com per bloquejar la Cx38, el següent pas va ser comprovar si la seva activació produïa una alliberació d'ATP de l'oòcit, que era l'objectiu que ens havíem plantejat al principi de l'estudi.

Tal com esperàvem, vam comprovar que quan activàvem la Cx38 amb la solució lliure d'ions divalents, mesuràvem una alliberació d'ATP que era inhibida pels inhibidors de les unions gap, octanol i àcid flufenàmic. Aquesta alliberació també era dependent dels nivells d'expressió de la connexina, disminuint quan els nivells d'expressió de la Cx38 eren baixos i augmentant quan la Cx38 estava sobreexpressada. Per eliminar qualsevol dubte, vam comprovar, en primer lloc, que les diferències en

---

l'alliberació d'ATP no eren degudes a un contingut d'ATP diferent en cada grup d'oòcits. A més, també vam demostrar que l'alliberació d'ATP es produïa durant el corrent d'entrada generat específicament per l'activació de la Cx38, ja que quan vam induir en l'oòcit un corrent d'entrada de la mateixa amplitud, o fins i tot més gran, mitjançant l'aplicació de nistatina en oòcits que no expressaven Cx38, no vam observar alliberació d'ATP en absolut.

No obstant, a part dels hemicanals, s'han descrit altres mecanismes d'alliberació d'ATP en els oòcits de *Xenopus*. La via clàssica exocítica s'ha descrit en resposta a estimulació mecànica (Maroto i Hamill, 2001). En els nostres experiments, vam descartar aquesta via, ja que les condicions que utilitzàvem, sense calci en el medi i sense estímuls mecànics, no recolzen l'exocitosi. També, l'alliberació d'ATP en resposta a estrès hipertònic, va ser descrita anteriorment en el nostre laboratori (Aleu et al., 2003). La Cx38, però, no participaria en aquest mecanisme, ja que el tractament amb els bloquejants de les unions gap i la injecció dels oòcits amb l'ASCx38 no modifiquen l'alliberació d'ATP en condicions d'estrès hipertònic. D'altra banda, en contra del que s'ha descrit en cèl·lules que expressen Cx43 (Quist et al., 2000), on es suggereix que els hemicanals regulen el volum cel·lular en resposta al calci extracel·lular, en els nostres experiments, els oòcits tractats amb les solucions amb calci i sense calci no variaven el seu volum, indicant que la Cx38 no tindria aquesta funció reguladora.

Tenint en compte el conjunt d'experiments realitzats, tot sembla indicar que la connexina 38, activada per absència d'ions divalents extracel·lulars, és permeable a l'ATP i constitueix una

---

de les vies per les quals l'ATP és alliberat a través de la membrana plasmàtica en els oòcits de *Xenopus*.

## **2.2 Alliberació d'ATP a través de la connexina 32 expressada de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus***

Com s'ha comentat, mutacions en la Cx32 produeixen la malaltia de Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X. Donat que el mecanisme d'alliberació d'ATP a través d'hemicanals de connexines s'havia descrit en tipus cel·lulars que expressen la Cx43 (Cotrina et al., 1998; Stout et al., 2002; Arcuino et al., 2002; Romanello et al., 2003; Gomes et al., 2005) i nosaltres mateixos l'havíem estudiat en hemicanals de Cx38, ens va interessar saber si la Cx32 també era permeable a l'ATP i si, aquest fet, podia tenir alguna relació amb la malaltia de CMTX.

Vam expressar la Cx32 humana en els oòcits de *Xenopus* i vam activar-la mitjançant un protocol de despolarització similar a l'utilitzat per Castro et al., 1999, obtenint un corrent de sortida característic de l'activació d'aquesta connexina (Castro et al., 1999; Abrahams et al., 2002; Gómez-Hernández et al., 2003). A més, també vam descartar la possible participació de la Cx38 endògena dels oòcits en aquest corrent bloquejant-la amb l'ASCx38, tal com s'ha explicat en l'apartat anterior. El corrent de sortida esdevenia un corrent d'entrada un cop finalitzat l'estímul que disminuïa poc a poc fins a tancar-se. És durant aquest corrent de cua quan detectàvem, de manera simultània, alliberació d'ATP. Això té sentit, ja que en el nostre cas, l'ATP té un potencial d'equilibri molt positiu, degut a la poca quantitat (propera a zero) d'ATP extracel·lular. Per tant, a potencials molt

positius, durant la despolarització, l'ATP no pot sortir a través dels hemicanals tot i que estiguin oberts. En canvi, durant el corrent de cua, el potencial de membrana és negatiu i, alhora, els hemicanals de Cx32 encara es mantenen oberts un cert temps, permetent l'alliberació d'ATP de la cèl·lula.

Recentment, s'ha descrit que l'activació per despolarització de la Cx32 en els oòcits de *Xenopus* es veu potenciada per l'absència de calci en el medi extracel·lular (Gómez-Hernández et al., 2003). Els nostres resultats reforcen aquestes observacions, ja que, quan registràvem els oòcits injectats amb la Cx32 en solucions sense calci, obteníem amplituds de corrent més grans, tant del corrent de sortida com del corrent de cua. Cal destacar que aquest efecte es mantenia fins i tot en presència d'una concentració 1 mM de  $MgCl_2$  en el medi, que, en el nostre experiment, era necessària per al correcte funcionament de la reacció de la luciferina/luciferasa per a la mesura de l'ATP. A més, en consonància amb la major amplitud de corrent de cua que obteníem en els registres amb la solució sense calci, també vam observar una major alliberació d'ATP, posant de manifest un altre cop la relació entre l'activació de la Cx32 i la sortida d'ATP de la cèl·lula.

Com ja hem dit abans, s'ha descrit alliberació d'ATP per exocitosi en oòcits (Maroto i Hamill, 2001). En els nostres experiments vam descartar aquesta via ja que el tractament amb BFA dels oòcits que expressaven la Cx32, una molècula que bloqueja l'ensamblatge vesicular en l'aparell de Golgi, no va fer disminuir l'alliberació d'ATP. A més, reforçant aquest resultat, la capacitància de la membrana abans i després de fer l'experiment no va variar significativament. Per tant, podem dir

que l'ATP, en aquestes condicions, no s'allibera majoritàriament per exocitosi, tot i que no podem descartar que hi hagi una mínima alliberació exocítica que no podem detectar amb la nostra metodologia.

Per últim, per demostrar des d'un altre punt de vista la relació entre l'obertura dels hemicanals de Cx32 i l'alliberació d'ATP, vam co-injectar en els oòcits la Cx32 i el receptor P2X<sub>1</sub>. Així, si realment s'alliberava ATP, aquest seria capaç d'activar el seu receptor. Efectivament, vam poder comprovar que l'ATP que s'alliberava estimulada la Cx32 era capaç d'actuar sobre el receptor P2X<sub>1</sub> i activar-lo. Aquesta activació es podia inhibir amb suramina, un antagonista dels receptors P2X.

Així doncs, podem dir que la Cx32 expressada en els oòcits de *Xenopus* pot activar-se per voltatge i que, en aquestes condicions, és permeable per l'ATP.

Ara bé, de quina manera podria estar relacionada l'alliberació d'ATP a través de la Cx32 amb la malaltia de CMTX?

En les cèl·lules de Schwann normals, s'ha descrit alliberació d'ATP en resposta a glutamat (Liu i Bennett, 2003) i en resposta a UTP (Liu et al., 2005) relacionada amb processos exocítics i canals aniònics. Així com en altres cèl·lules glials, com els astròcits, hi ha diferents mecanismes pels quals l'ATP surt de la cel·lula, com l'exocitosi (Bal-Price et al., 2002), els hemicanals (Stout et al., 2002) o els canals aniònics (Abdipranoto et al., 2003), nosaltres proposem que en les cèl·lules de Schwann també es podria alliberar l'ATP mitjançant diferents mecanismes, entre ells, els hemicanals de Cx32. Per tant, en condicions normals, la Cx32 alliberaria petites concentracions d'ATP a



l'espai extracel·lular que actuaria sobre els receptors purinèrgics P2X<sub>7</sub> i P2Y<sub>2</sub> presents en les cèl·lules de Schwann (Colomar i Amedée, 2001; Lyons et al., 1994). El receptor P2X<sub>7</sub>, però, és relativament insensible a l'ATP i necessita quantitats d'ATP de l'ordre de milimolar per a la seva màxima activació, així, en condicions normals, estaria inactiu. En canvi, el receptor P2Y<sub>2</sub> pot activar-se a concentracions d'ATP més baixes i la seva activació produeix un augment del calci intracel·lular.

Considerant tot això, segons la nostra hipòtesi, en la malaltia de CMTX, on la Cx32 està mutada, podríem trobar-nos amb dues situacions:

D'una banda, la mutació de la Cx32 faria que la proteïna no arribés a la membrana de la cèl·lula o bé que hi arribés, però no fos funcional. En aquest cas, la quantitat d'ATP extracel·lular disminuiria, produint una menor activació dels receptors P2Y<sub>2</sub> i provocant la mort cel·lular per la incapacitat de la cèl·lula de modular i portar a terme processos cel·lulars bàsics.

D'altra banda, la mutació de la Cx32 faria que el canal fos funcional, però que estigués massa actiu. En aquest cas, grans quantitats d'ATP s'alliberarien a l'espai extracel·lular activant no només els receptors P2Y<sub>2</sub> sinó també els receptors P2X<sub>7</sub>, provocant en última instància la mort de la cèl·lula per apoptosi. Una hipòtesi similar s'ha proposat per explicar la resposta de les cèl·lules glials del SNC enfront un dany cel·lular (James i Butt, 2002).

Així doncs, per aprofundir en aquesta idea, seria interessant en un futur poder treballar amb cultius cel·lulars de cèl·lules de Schwann i estudiar els mecanismes d'alliberació d'ATP en aquestes cèl·lules, així com també treballar amb diferents

mutacions de la Cx32, caracteritzar-les i poder observar de quina manera afecten l'alliberació d'ATP.

### **3. Consideracions finals**

Fins no fa massa, la visió general era que l'exocitosi era el mecanisme principal pel qual l'ATP s'allibera de les cèl·lules. No obstant, en els últims anys la idea de que existeix una via directa d'alliberació d'ATP a través de la membrana va guanyant força. Després del nostre estudi podem dir que en els oòcits de *Xenopus*, més d'una via d'alliberació d'ATP està present en la mateixa cèl·lula. Així, els oòcits poden alliberar ATP per exocitosi (Maroto i Hamill, 2001) o a través de les proteïnes de membrana CD39 (Bodas et al., 2000) i connexines.

Cada una d'aquestes vies s'activa per estímuls diferents i, segurament, per mecanismes moleculars diferents. Ara, cal saber quins són aquests mecanismes i veure si es poden aplicar de la mateixa manera en altres tipus cel·lulars.

## **CONCLUSIONS**



- L'ús d'oligonucleòtids antisentit és una bona eina per a la inhibició específica de la proteïna CD39 endògena d'oòcits de *Xenopus*.
- La proteïna CD39, en condicions d'estrès hipertònic, està implicada en l'alliberació d'ATP en els oòcits de *Xenopus*.
- La connexina 38 endògena dels oòcits de *Xenopus* s'activa en en absència d'ions divalents i, en aquestes condicions, és permeable per l'ATP. La proteïna i, en conseqüència, l'alliberació d'ATP es poden bloquejar mitjançant l'ús dels inhibidors de les unions gap octanol i àcid flufenàmic i, més específicament, utilitzant oligonucleòtids antisentit.
- L'alliberació d'ATP que es produeix en els oòcits activats per absència d'ions divalents és independent de la fusió de membranes.
- La connexina 32 humana expressada en oòcits de *Xenopus* s'activa per despolarització de la membrana i és permeable per l'ATP. Aquests efectes es potencien en absència de calci en el medi. L'alliberació d'ATP mesurada en aquestes condicions d'activació és independent d'exocitosi.
- L'ATP que s'allibera a través de la connexina 32 humana expressada en els oòcits és capaç d'activar receptors P2X<sub>1</sub> expressats en el mateix oòcit.



## **BIBLIOGRAFIA**





**Abbracchio MP, Burnstock G.** 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**, 445-475.

**Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL, Bennett MR.** 2003. Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine trifosfate. *Neuroreport* **14**(17), 2177-2181.

**Abraham EH, Okunieff P, Scala S, Vos P, Oosterveld MJ, Chen AY, Shrivastav B.** 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and adenosine triphosphate. *Science* **275**, 1324-1326.

**Abraham EH, Sterling KM, Kim RJ, Salikhova AY, Huffman HB, Crockett MA, Johnston N, Parker HW, Boyle WE, Jr., Hartov A, Demidenko E, Efirid J, Kahn J, Grubman SA, Jefferson DM, Robson SC, Thakar JH, Lorico A, Rappa G, Sartorelli AC, Okunieff P.** 2001. Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Cells Mol Dis* **27**, 165-180.

**Abrams CK, Bennett MV, Verselis VK, Bargiello TA.** 2002. Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3980-3984.

**Aleu J, Martin-Satue M, Navarro P, Perez dL, I, Bahima L, Marsal J, Solsona C.** 2003. Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **547**, 209-219.

**Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL.** 2002. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* **22**, 6458-6470.

**Álvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ.** 2000. Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* **20**, 4091-4098.

**Anderson CM, Bergher JP, Swanson RA.** 2004. ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* **88**, 246-256.

**Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R.** 1997. Structural abnormalities and deficient

---

maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* **17**, 4545-4551.

**Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M.** 2002. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9840-9845.

**Arellano RO, Woodward RM, Miledi R.** 1995. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **484**, 593-604.

**Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J.** 1998. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol* **60**, 667-687.

**Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS.** 1998. Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* **142**, 1095-1104.

**Ballerini P, Di IP, Ciccarelli R, Nargi E, D'Alimonte I, Traversa U, Rathbone MP, Caciagli F.** 2002. Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport* **13**, 1789-1792.

**Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC.** 2002. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* **40**, 312-323.

**Bao L, Sachs F, Dahl G.** 2004. Connexins are mechanosensitive. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1389-C1395.

**Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott AB.** 1997. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* **17**, 5297-5304.

**Barnard EA, Simon J, Webb TE.** 1997. Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms. *Mol Neurobiol* **15**, 103-129.

**Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MV, Nicholson BJ.** 1991. Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8410-8414.

---

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

**Belluardo N, Mudò G, Trovato-Salinaro A, Le GS, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, Condorelli DF.** 2000. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* **865**, 121-138.

**Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC.** 2003. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* **26**, 610-617.

**Bennett MV, Zukin RS.** 2004. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* **41**, 495-511.

**Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH.** 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**, 2039-2042.

**Berthoud VM, Minogue PJ, Laing JG, Beyer EC.** 2004. Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc Res* **62**, 256-267.

**Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J.** 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* **43**, 5511-5519.

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

**Bodin P, Burnstock G.** 2001a. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**, 900-908.

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

**Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B.** 2005. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* **31**, 139-149.

**Boudreault F, Grygorczyk R.** 2004. Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J Physiol* **561**, 499-513.

**Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, Willecke K, Martin PE, Evans WH, Leybaert L.** 2003. Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *J Cell Physiol* **197**, 205-213.

**Braet K, Vandamme W, Martin PE, Evans WH, Leybaert L.** 2003. Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium* **33**, 37-48.

**Brandle U, Guenther E, Irrle C, Wheeler-Schilling TH.** 1998. Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* **59**, 269-272.

**Brandle U, Zenner HP, Ruppertsberg JP.** 1999. Gene expression of P2X-receptors in the developing inner ear of the rat. *Neurosci Lett* **273**, 105-108.

**Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG, Schwiebert EM.** 2001. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem* **276**, 6621-6630.

**Browne CL, Werner W.** 1984. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* **230**, 105-113.

**Browne CL, Wiley HS, Dumont JN.** 1979. Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science* **203**, 182-183.

---

**Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De FA.** 2001. Connexin 43 hemi channels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *FASEB J* **15**, 10-12.

**Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A.** 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **40**, 668-688.

**Burnstock G.** 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**, 509-581.

**Burnstock G.** 1986. The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **280**, 1-15.

**Burnstock G.** 1997. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* **36**, 1127-1139.

**Burnstock G.** 2004a. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 47-52.

**Burnstock G.** 2004b. Introduction, P2 receptors. *Curr Top Med Chem* **4**, 793-803.

**Burnstock G.** 2006. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S172-81., S172-S181.

**Castro C, Gomez-Hernandez JM, Silander K, Barrio LC.** 1999. Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations. *J Neurosci* **19**, 3752-3760.

**Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP.** 2000. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* **275**, 10767-10771.

**Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ.** 1999. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* **19**, 10813-10828.

**Chang Q, Pereda A, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ.** 2000. Nerve injury induces gap junctional coupling among axotomized adult motor neurons. *J Neurosci* **20**, 674-684.

**Chanson M, Fanjul M, Bosco D, Nelles E, Suter S, Willecke K, Meda P.** 1998. Enhanced secretion of amylase from exocrine pancreas of connexin32-deficient mice. *J Cell Biol* **141**, 1267-1275.

**Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX.** 2005. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* **16**, 3100-3106.

**Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C.** 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* **278**, 1354-1362.

**Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G.** 1996. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* **16**, 2495-2507.

**Colomar A, Amedée T.** 2001. ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci* **14**, 927-936.

**Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM.** 2001. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* **276**, 41479-41485.

**Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N.** 2003. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* **18**, 1807-1827.

**Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett MV.** 2003. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11388-11393.

**Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC.** 2002. 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 U S A* **99**, 495-500.

**Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M.** 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15735-15740.

**Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M.** 2000. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* **20**, 2835-2844.

**De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, Leybaert L.** 2006. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J* **25**, 34-44.

**Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL.** 2002. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* **36**, 703-712.

**Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K.** 1989. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10148-10152.

**DeVries SH, Schwartz EA.** 1992. Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J Physiol* **445:201-30.**, 201-230.

**Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR.** 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**, 587-600.

**Donaldson SH, Lazarowski ER, Picher M, Knowles MR, Stutts MJ, Boucher RC.** 2000. Basal nucleotide levels, release, and metabolism in normal and cystic fibrosis airways. *Mol Med* **6**, 969-982.

**Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G.** 2001. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* **65**, 107-134.

**Dyck PJ, Lambert EH.** 1968a. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and

---

electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* **18**, 603-618.

**Dyck PJ, Lambert EH.** 1968b. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* **18**, 619-625.

**Ebihara L, Berthoud VM, Beyer EC.** 1995. Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap-junctional channels. *Biophys J* **68**, 1796-1803.

**Ebihara L, Beyer EC, Swenson KI, Paul DL, Goodenough DA.** 1989. Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junction protein. *Science* **243**, 1194-1195.

**Ebihara L, Steiner E.** 1993. Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* **102**, 59-74.

**Ebihara L.** 1996. *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **71**, 742-748.

**Ebihara L.** 2003. New roles for connexons. *News Physiol Sci* **18**, 100-103.

**Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D.** 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**, 144-147.

**Enkvetchakul D, Ebihara L, Nichols CG.** 2003. Polyamine flux in *Xenopus* oocytes through hemi-gap junctional channels. *J Physiol* **553**, 95-100.

**Eskandari S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM, Loo DD.** 2002. Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol* **185**, 93-102.

**Eugenin EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC.** 2001. Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4190-4195.



**Evans RJ, Derkach V, Surprenant A.** 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357**, 503-505.

**Evans WH, Martin PE.** 2002. Gap junctions, structure and function. *Mol Membr Biol* **19**, 121-136.

**Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ.** 1997. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? *J Physiol* **505**, 503-511.

**Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M.** 1997. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 79-82.

**Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC.** 2004. CCN3 (NOV) interacts with Connexin43 in C6 Glioma Cells. *J Biol Chem* **279**, 36943-36950.

**Gachet C.** 2006. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46:277-300.**, 277-300.

**Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, Stuhmer W.** 1997. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* **51**, 109-118.

**Garcia-Guzman M, Stuhmer W, Soto F.** 1997. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res* **47**, 59-66.

**Gimlich RL, Kumar NM, Gilula NB.** 1988. Sequence and developmental expression of mRNA coding for a gap junction protein in *Xenopus*. *J Cell Biol* **107**, 1065-1073.

**Gimlich RL, Kumar NM, Gilula NB.** 1990. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* **110**, 597-605.

**Gomes P, Srinivas SP, Van DW, Vereecke J, Himpens B.** 2005. ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 1208-1218.

**Gomez-Hernandez JM, de MM, Larrosa B, Gonzalez D, Barrio LC.** 2003. Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16030-16035.

**Goodenough DA, Paul DL.** 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 285-294.

**Grierson JP, Meldolesi J.** 1995. Shear stress-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem* **270**, 4451-4456.

**Grygorczyk R, Hanrahan JW.** 1997. CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* **272**, C1058-C1066.

**Gupta VK, Berthoud VM, Atal N, Jarillo JA, Barrio LC, Beyer EC.** 1994. Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**, 3747-3758.

**Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB.** 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* **19**, 520-528.

**Haas B, Schipke CG, Peters O, Soehl G, Willecke K, Kettenmann H.** 2004. Program No.405.6 2004 Abstract. Viewer / Itinerary planner. Washington, DC, Society for Neuroscience, 2004.

**Handa M, Guidotti G.** 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 916-923.

**Harris AL.** 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* **34**, 325-472.

**Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E, Okada Y.** 1999. Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive  $Cl(-)$  channels. *J Gen Physiol* **114**, 525-533.

**Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M.** 2002. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* **119**, 511-520.

**Hofer A, Dermietzel R.** 1998. Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia* **24**, 141-154.

**Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB.** 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202-207.

**Holmsen H.** 1994. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest* **24 Suppl 1:3-8.**, 3-8.

**Huang Y, Sirkowski EE, Stickney JT, Scherer SS.** 2005. Prenylation-defective human connexin32 mutants are normally localized and function equivalently to wild-type connexin32 in myelinating Schwann cells. *J Neurosci* **25**, 7111-7120.

**Iacobas DA, Scemes E, Spray DC.** 2004. Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem Int* **45**, 243-250.

**Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C.** 1993. Screening of dominantly inherited Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Muscle Nerve* **16**, 1232-1238.

**James G, Butt AM.** 2002. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* **447**, 247-260.

**Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP.** 1998. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* **273**, 2030-2034.

**John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JI, Weiss JN.** 1999. Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J Biol Chem* **274**, 236-240.

**Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Eriksen EF, Civitelli R, Steinberg TH.** 2002. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *J Biol Chem* **277**, 7574-7580.

**Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R.** 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* **292**, 1178-1180.

**Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM.** Principles of neural science. 2000. 4<sup>th</sup> edition. Center for neurobiology and behavior college of physicians and surgeons of Columbia University and the Howard Hughes Medical Institute.

**Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF.** 1999. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **407**, 11-32.

**Khakh BS.** 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**, 165-174.

**Kidd EJ, Grahames CB, Simon J, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP.** 1995. Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol* **48**, 569-573.

**Knight GE, Bodin P, De Groat WC, Burnstock G.** 2002. ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F281-F288.

**Kondo RP, Wang SY, John SA, Weiss JN, Goldhaber JI.** 2000. Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 1859-1872.

**Kumar NM, Gilula NB.** 1986. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol* **103**, 767-776.

**Kumar NM, Gilula NB.** 1996. The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.

**Laird DW.** 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-543.

**Landesman Y, Postma FR, Goodenough DA, Paul DL.** 2003. Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo. *J.Cell Sci.* **116**, 29-38.

**Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA.** 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal.Biochem.* **100**, 95-97.

**Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK.** 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol.Pharmacol.* **64**, 785-795.

**Lê KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K, Seguela P.** 1997. Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett.* **418**, 195-199.

**Lê KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P.** 1998. Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience.* **83**, 177-190.

**Levitan ES, Kramer RH.** 1990. Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch-clamp configuration. *Nature* **348**, 545-7.

**Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG.** 1996. Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J.Cell Biol.* **134**, 1019-1030.

**Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van BT, Kowaluk EA, Jarvis MF.** 1999. Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol.Pharmacol.* **56**, 1171-1181.

**Lyons SA, Morell P, McCarthy KD.** 1994. Schwann cells exhibit P2Y purinergic receptors that regulate intracellular calcium and are up-regulated by cyclic AMP analogues. *J Neurochem* **63**, 552-560.

**Malchow RP, Qian H, Ripps H.** 1994. A novel action of quinine and quinidine on the membrane conductance of neurons from the vertebrate retina. *J.Gen.Physiol.* **104**, 1039-1055.

**Maroto R, Hamill OP.** 2001. Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem* **276**, 23867-23872.

**Marteau F, Le PE, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS.** 2003. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol.Pharmacol.* **64**, 104-112.

**Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH.** 2001. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J.Cell Sci.* **114**, 3845-3855.

**Massey SC, O'Brien JJ, Trexler EB, Li W, Keung JW, Mills SL, O'Brien J.** 2003. Multiple neuronal connexins in the mammalian retina. *Cell Commun.Adhes.* **10**, 425-430.

**Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K.** 2003. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience.* **119**, 689-700.

**Mayer C, Quasthoff S, Grafe P.** 1998. Differences in the sensitivity to purinergic stimulation of myelinating and non-myelinating Schwann cells in peripheral human and rat nerve. *Glia* **23**, 374-382.

**McElroy WD.** 1947. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **33**, 342-345.

- Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL.** 2003. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J.Neurosci.* **23**, 5963-5973.
- Miragall F, Simburger E, Dermietzel R.** 1996. Mitral and tufted cells of the mouse olfactory bulb possess gap junctions and express connexin43 mRNA. *Neurosci.Lett.* **216**, 199-202.
- Mitchell CH, Carre DA, McGlenn AM, Stone RA, Civan MM.** 1998. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 7174-7178.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR.** 2001. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim.Biophys.Acta.* **1521**, 107-119.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE.** 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **47**, 191-215.
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE.** 2003a. Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J.Comp Neurol.* **464**, 356-370.
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE.** 2003b. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia.* **44**, 205-218.
- Nelis E, Haites N, Van BC.** 1999. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum.Mutat.* **13**, 11-28.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K.** 1996. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 9565-9570.

**Nicholson G, Nash J.** 1993. Intermediate nerve conduction velocities define X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy families. *Neurology*. **43**, 2558-2564.

**Nieber K, Poelchen W, Illes P.** 1997. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 423-430.

**Novak I.** 2003. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci.* **18:12-7.**, 12-17.

**Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Bussow H, Schilling K, Steinhäuser C, Willecke K.** 2003. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J.Neurosci.* **23**, 4549-4559.

**Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S.** 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr.Biol.* **10**, R473-R474.

**Panchin YV.** 2005. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J.Exp.Biol.* **208**, 1415-1419.

**Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O.** 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* **10**, 3898-3902.

**Parenti R, Campisi A, Vanella A, Cicirata F.** 2002. Immunocytochemical and RT-PCR analysis of connexin36 in cultures of mammalian glial cells. *Arch.Ital.Biol.* **140**, 101-108.

**Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, Swenson KI, Goodenough DA.** 1991. Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J.Cell Biol.* **115**, 1077-1089.

**Paul DL.** 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J.Cell Biol.* **103**, 123-134.



**Paulson HL, Garbern JY, Hoban TF, Krajewski KM, Lewis RA, Fischbeck KH, Grossman RI, Lenkinski R, Kamholz JA, Shy ME.** 2002. Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann.Neurol.* **52**, 429-434.

**Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P.** 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron.* **46**, 731-744.

**Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, Baines RA, Barnes TM, Ford C, Hekimi S, Lee R, Shaw JE, Starich TA, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ.** 1998. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* **14**, 348-349.

**Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T.** 2002. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J.Biol.Chem.* **277**, 8648-8657.

**Pratt AG, Reisin IL, Ausiello DA, Cantiello HF.** 1996. Cellular ATP release by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am.J.Physiol.* **270**, C538-C545.

**Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R.** 2000. Physiological role of gap-junctional hemichannels, extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol* **148**, 1063–1074.

**Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di VF, Pistoia V.** 2006. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.* **66**, 907-914.

**Ralevic V, Burnstock G.** 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* **50**, 413-492.

**Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI.** 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 7573-7578.

**Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI.** 2001. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J.Neurosci.* **21**, 1983-2000.

**Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A.** 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J.Biol.Chem.* **272**, 5482-5486.

**Reifarh FW, Amasheh S, Clauss W, Weber W.** 1997. The Ca<sup>2+</sup>-inactivated Cl<sup>-</sup> channel at work, selectivity, blocker kinetics and transport visualization. *J Membr Biol* **155**, 95-104.

**Reigada D, Mitchell CH.** 2004. Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C132-40.

**Ripps H, Qian H, Zakevicius J.** 2002. Pharmacological enhancement of hemi-gap-junctional currents in *Xenopus* oocytes. *J.Neurosci.Methods.* **121**, 81-92.

**Roman RM, Lomri N, Braunstein G, Feranchak AP, Simeoni LA, Davison AK, Mechetner E, Schwiebert EM, Fitz JG.** 2001. Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. *J.Membr.Biol.* **183**, 165-173.

**Romanello M, D'Andrea P.** 2001. Dual mechanism of intercellular communication in HOBIT osteoblastic cells, a role for gap-junctional hemichannels. *J Bone Miner Res* **16**, 1465-1476.

**Romanello M, Veronesi V, D'Andrea P.** 2003. Mechanosensitivity and intercellular communication in HOBIT osteoblastic cells: a possible role for gap junction hemichannels. *Biorheology.* **40**, 119-121.

**Sabirov RZ, Okada Y.** 2004. Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J* **87**, 1672-1685

**Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC.** 2003b. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* **83**, 1359-1400.

**Saez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA, Bennett MV.** 2003a. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand* **179**, 9-22.

- Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV.** 2005. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim.Biophys.Acta.* **1711**, 215-224.
- Sauer H, Hescheler J, Wartenberg M.** 2000. Mechanical strain-induced Ca(2+) waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **279**, C295-C307.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL.** 1995. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J.Neurosci.* **15**, 8281-8294.
- Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ.** 1998. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia.* **24**, 8-20.
- Schulte am EJ, Sevigny J, Kaczmarek E, Siegel JB, Imai M, Koziak K, Beaudoin AR, Robson SC.** 1999. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry.* **38**, 2248-2258.
- Schwiebert EM, Zsembery A.** 2003. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta.* **1615**, 7-32.
- Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, voodi-Semiromi A, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX.** 2001. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J.Biol.Chem.* **276**, 17474-17478.
- Silinsky EM.** 1975. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J.Physiol.* **247**, 145-162.
- Sive HL, Grainger RM, Harland, RM.** 2000. Early development of *Xenopus laevis*. A laboratory manual. Cold Spring harbor laboratory press. Cold Spring Harbor, New York.
- Söhl G, Eiberger J, Jung YT, Kozak CA, Willecke K.** 2001. The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *Biol.Chem.* **382**, 973-978.

- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K.** 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat.Rev.Neurosci.* **6**, 191-200.
- Söhl G, Odermatt B, Maxeiner S, Degen J, Willecke K.** 2004. New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **47**, 245-259.
- Söhl G, Willecke K.** 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun.Adhes.* **10**, 173-180.
- Sorensen CE, Novak I.** 2001. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J.Biol.Chem.* **276**, 32925-32932.
- Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ.** 1998. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am.J.Physiol.* **275**, H1726-H1732.
- Srinivas M, Calderon DP, Kronengold J, Verselis VK.** 2006. Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations. *J.Gen.Physiol.* **127**, 67-75.
- Stout C, Charles A.** 2003. Modulation of intercellular calcium signaling in astrocytes by extracellular calcium and magnesium. *Glia* **43**, 265-273.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC.** 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **277**, 10482-10488.
- Stümpel F, Ott T, Willecke K, Jungermann K.** 1998. Connexin 32 gap junctions enhance stimulation of glucose output by glucagon and noradrenaline in mouse liver. *Hepatology.* **28**, 1616-1620.
- Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E.** 2006. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J.Neurosci.* **26**, 1378-1385.
- Surprenant A.** 1996. Functional properties of native and cloned P2X receptors. *Ciba Found.Symp.* **198:208-19; discussion 219-22.**, 208-219.
- Suter U, Scherer SS.** 2003. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat.Rev.Neurosci.* **4**, 714-726.

- Takashima H, Nakagawa M, Umehara F, Hirata K, Suehara M, Mayumi H, Yoshishige K, Matsuyama W, Saito M, Jonosono M, Arimura K, Osame M.** 2003. Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol.Scand.* **107**, 31-37.
- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K.** 1997. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr.Biol.* **7**, 713-716.
- Theis M, Sohl G, Eiberger J, Willecke K.** 2005. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* **28**, 188-195.
- Thimm J, Mechler A, Lin H, Rhee S, Lal R.** 2005. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J.Biol.Chem.* **280**, 10646-10654.
- Tran Van NG, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P, Combettes L.** 2003. Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells. *Nat.Cell Biol.* **5**, 720-726.
- Trexler EB, Bennett MV, Bargiello TA, Verselis VK.** 1996. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5836-5841.
- Urano T, Nishimori H, Han H, Furuhata T, Kimura Y, Nakamura Y, Tokino T.** 1997. Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer Res.* **57**, 3281-3287.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G.** 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature.* **371**, 516-519.
- Valiunas V.** 2002. Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells. *J.Gen.Physiol.* **119**, 147-164.
- Walsh DE, Harvey BJ, Urbach V.** 2000. CFTR regulation of intracellular calcium in normal and cystic fibrosis human airway epithelia. *J.Membr.Biol.* **177**, 209-219.

**Wang TF, Ou Y, Guidotti G.** 1998. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J.Biol.Chem.* **273**, 24814-24821.

**Watt WC, Lazarowski ER, Boucher RC.** 1998. Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia. *J.Biol.Chem.* **273**, 14053-14058.

**Weber W.** 1999. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes, state of the art. *Biochim Biophys Acta* **1421**, 213-233.

**Weber WM, Liebold KM, Reifarh FW, Uhr U, Clauss W.** 1995. Influence of extracellular Ca<sup>2+</sup> on endogenous Cl<sup>-</sup> in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **429**(6), 820-4.

**White TW, Paul DL.** 1999. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu.Rev.Physiol.* **61:283-310.**, 283-310.

**Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G.** 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol.Chem.* **383**, 725-737.

**Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR.** 2003. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J.Neurosci.* **23**, 3588-3596.

**Yoshikawa H, Nishimura T, Nakatsuji Y, Fujimura H, Himoro M, Hayasaka K, Sakoda S, Yanagihara T.** 1994. Elevated expression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in biopsied peripheral nerves of patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Ann.Neurol.* **35**, 445-450.

**Yoshizaki G, Patino R.** 1995. Molecular cloning, tissue distribution, and hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript. *Mol.Reprod.Dev.* **42**, 7-18.

**Zampighi GA, Loo DD, Kreman M, Eskandari S, Wright EM.** 1999. Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J.Gen.Physiol.* **113**, 507-524.

**Zhang C, Finger TE, Restrepo D.** 2000. Mature olfactory receptor neurons express connexin 43. *J.Comp Neurol.* **426**, 1-12.

**Zhang C, Restrepo D.** 2002. Expression of connexin 45 in the olfactory system. *Brain Res.* **929**, 37-47.

**Zhang Y, McBride DWJ, Hamill OP.** 1998. The ion selectivity of a membrane conductance inactivated by extracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **508**, 763-776.

**Zhao HB, Yu N, Fleming CR.** 2005. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 18724-18729.

**Zhong X, Malhotra R, Guidotti G.** 2003. ATP uptake in the Golgi and extracellular release require Mcd4 protein and the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J.Biol.Chem.* **278**, 33436-33444.

**Ziganshin AU, Ziganshina LE, King BE, Burnstock G.** 1995. Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch.* **429**, 412-418.

**Zimmermann H.** 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**, 299-309.





**ANNEX**



## Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes

Jordi Aleu, Mireia Martín-Satué, Piedad Navarro, Ivanna Pérez de Lara, Laia Bahima, Jordi Marsal and Carles Solsona

Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology, Department of Cell Biology, Medical School, Hospital of Bellvitge, University of Barcelona-Campus of Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L' Hospitalet de Llobregat, E-08907 Spain

ATP mediates intercellular communication. Mechanical stress and changes in cell volume induce ATP release from various cell types, both secretory and non-secretory. In the present study, we stressed *Xenopus* oocytes with a hypertonic solution enriched in mannitol (300 mM). We measured simultaneously ATP release and ionic currents from a single oocyte. A decrease in cell volume, the activation of an inward current and ATP release were coincident. We found two components of ATP release: the first was associated with granule or vesicle exocytosis, because it was inhibited by tetanus neurotoxin, and the second was related to the inward current. A single exponential described the correlation between ATP release and the hypertonic-activated current. Gadolinium ions, which block mechanically activated ionic channels, inhibited the ATP release and the inward current but did not affect the decrease in volume. Oocytes expressing CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) released ATP under hypertonic shock, but ATP release was significantly inhibited in the first component: that related to granule exocytosis. Since the ATP measured is the balance between ATP release and ATP degradation by ecto-enzymes, we measured the nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) activity of the oocyte surface during osmotic stress, as the calcium-dependent hydrolysis of ATP, which was inhibited by more than 50% in hypertonic conditions. The best-characterized membrane protein showing NTPDase activity is CD39. Oocytes injected with an antisense oligonucleotide complementary to CD39 mRNA released less ATP and showed a lower amplitude in the inward current than those oocytes injected with water.

(Received 14 August 2002; accepted after revision 27 November 2002; first published online 20 December 2002)

**Corresponding author** C. Solsona: Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology, Department of Cell Biology, Medical School, Hospital of Bellvitge, University of Barcelona-Campus of Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L' Hospitalet de Llobregat, E-08907 Spain. Email: solsona@bellvitge.bvg.ub.es

Purinergic signalling is almost ubiquitous. It is well known that ATP is kept inside cells because it is highly hydrophilic and does not permeate through lipidic cell membranes. However, ATP release has been reported in various cell types. Neuronal cells release ATP during synaptic transmission (Silinsky & Redman, 1996; Vizi *et al.* 2000), and it is generally supposed that all synaptic vesicles contain ATP, which is co-released with the main neurotransmitter, albeit in some cases some synaptic vesicles may only contain ATP (Bodin & Burnstock, 2001). Several laboratories have recorded ATP release from other non-neuronal cells such as astrocytes (Cotrina *et al.* 1998; Guthrie *et al.* 1999; Newman, 2001; Verderio & Matteoli, 2001; Stout *et al.* 2002) and from skeletal muscle fibres (Forrester, 1972). The purinergic signalling is especially relevant in the heart-vascular system, where P2 receptors have been detected in epithelial and smooth muscle fibres. This and the presence of P2 receptors in the same cells strongly suggest an autocrine purinergic loop. Endothelial cells also release ATP during shear stress or under hypotonic challenge (Yegutkin *et al.* 2000; Hashimoto *et*

*al.* 2001; Buxton *et al.* 2001; Koyama *et al.* 2001; Hisadome *et al.* 2002; Schwiebert *et al.* 2002). Mechanically induced release of ATP has been confirmed in every cell type studied (Grygorczyk & Guyot, 2001). The sensitivity to gadolinium suggests that ATP release is related to some type of mechanically activated ionic channel(s) (Hamill & Martinac, 2001).

Purinergic receptors have been described in the ovarian follicle of the amphibian *Xenopus laevis* (Lotan *et al.* 1982; 1986; Arellano *et al.* 1996; King *et al.* 1996a,b) and also in granulosa and luteal cells from pigs or humans (Kamada *et al.* 1994). Moreover, ionic currents activated or regulated via purinergic receptors have been described in *Xenopus* follicles (Arellano *et al.* 1998; Pérez-Sanmartín *et al.* 2000) and mouse cumulus cell-enclosed oocytes (Arellano *et al.* 2002). Although the stimulation of these receptors and ion channels has been implicated in the development of the oocyte (Eppig *et al.* 1985; Billig & Rosberg, 1986; Downs *et al.* 1986), the cellular mechanisms involved are poorly understood.

*Xenopus* oocytes release ATP in resting conditions, but they increase the efflux of ATP when expressing purinergic PY receptors (Nakamura & Strittmatter, 1996) and CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator; Jiang *et al.* 1998), and under local mechanical stress (Maroto & Hamill, 2001) and hyperpolarizing pulses (Bodas *et al.* 2000). Some endogenous currents of *Xenopus* oocytes are linked to mechanically gated channels (Zhang & Hamill, 2000). Currents activated by hyperpolarization or hypertonic solutions share some common features: they are inward currents in oocytes clamped at  $-60$  mV, they are non-selective and, finally, they are permeable to large cations and anions (Zhang & Hamill, 2000). Since we have already demonstrated that hyperpolarization pulses induce the release of ATP (Bodas *et al.* 2000), we aimed to explore the release of ATP in oocytes shrunk by hypertonic solutions that activate an inward current.

## METHODS

### Solutions and chemicals

Isotonic Ringer solution (NR, also Normal Ringer solution,  $238 \text{ mosmol l}^{-1}$ ) contained (mM): 115 NaCl, 2 KCl, 10 (Hepes/NaOH), 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.8 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4). Modified Barth's solution (MBS) contained (mM): 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO<sub>3</sub>, 20 Hepes, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 0.33 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5), supplemented with 100 IU ml<sup>-1</sup> of penicillin and 0.1 mg ml<sup>-1</sup> of streptomycin. Hypertonic solution (HS) was prepared by adding 300 mM mannitol to NR, which resulted in an osmolarity of 543 mosmol l<sup>-1</sup>, which was measured in a 5520 Wescor Osmometer.

### Preparation of *Xenopus* oocytes

Mature female frogs (*Xenopus laevis*) were purchased from Centre d'Elevage de Xenopes (Montpellier, France). Frogs were maintained alive and handled in accordance with the EU laws and under the supervision of the Council for Animal Research Ethics of University of Barcelona. Oocytes were prepared as follows: frogs were anaesthetized in cold distilled water containing 1.7 g l<sup>-1</sup> of tricaine (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid, Sigma). Ovarian sacs were extracted by sterile surgical procedures and placed in NR. The frogs were immediately placed in a small water tank until they started to swim. Approximately 3 months after the first surgery, the frogs underwent contralateral surgery and were killed by decapitation. Oocytes of stages V and VI were collected using fine tip forceps and kept at 16–17 °C in MBS. The follicle envelope was removed by collagenase (Sigma, 1A; 0.5 mg ml<sup>-1</sup>) treatment in NR for 45–50 min. Electrophysiological measurements were made 3–48 h after defolliculation.

### Electrophysiological records

Whole-cell data were recorded using a two-microelectrode voltage-clamp configuration. The voltage and the current microelectrodes were filled with KCl (3 M) and had resistances ranging from 1 to 2 MΩ. The bath electrode was an Ag–AgCl pellet that made contact with the recording solutions through an agar bridge. Membrane potential and current were digitized by a PC computer through a Digidata-1200A (Axon Instruments) converter. The board was controlled by the Whole Cell Analysis Program (kindly provided by John Dempster, University of Strathclyde, UK). The signal was filtered at half the frequency of acquisition. Solutions were changed by gravity and controlled by electrovalves (ALA, Scientific Instruments, New York).

### Preparation of luminescent reaction

A vial of luciferase extract lantern from *Photinus pyralis* (Sigma) was resuspended in 1 ml of HS and desalted in a 10 ml 10 DG-Biorad column equilibrated with HS. 200 μl of D-luciferin (2.5 mg ml<sup>-1</sup>, Boehringer Mannheim) was added to the eluate and the resulting suspension was centrifuged for 30 s in a bench-top centrifuge. The eluate was frozen and maintained at  $-20$  °C until use. An aliquot was thawed on ice and maintained at 4 °C until it was added to the recording chamber (125 μl).

### Measurement and analysis of ATP release

We followed a procedure described elsewhere (Bodas *et al.* 2000). Briefly, oocytes were placed in the recording chamber and the two electrodes were inserted. After the chamber was equilibrated with HS (1–2 min), a small volume (5–20 μl) of luciferin–luciferase mixture was added to the recording chamber, which was completely light-proof. The light generated by the enzymatic reaction was transmitted through six optic fibres placed in front of the six planes of the recording cuvette. The end of the optic fibres was focused in front of a photomultiplier (Hamamatsu, R374) and controlled by a slit. The resulting electric signal was amplified in a P16 Grass amplifier (USA), filtered at 5 Hz in a Bessel filter (Frequency Devices, USA) and collected by the Digidata-1200A converter (Axon Instruments). To calculate the amount of ATP released, a known dose of ATP was added through a third pipette, with an electronic nanoinjector (Nanoject, Drummond). This dose was usually registered 2–6 min after starting the electrophysiological recording in HS, which was made at room temperature (22–23 °C).

To analyse ATP release, we integrated the light signal over a 1 min period and the amount of ATP enclosed in the area was calculated by comparison with the dose signal.

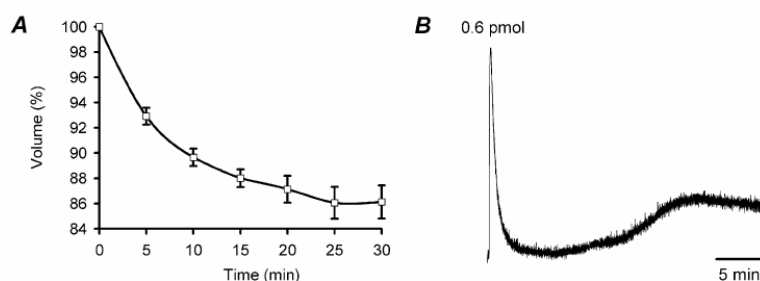
In some experiments, the light chain of tetanus toxin (L-TeNT) was injected 20–30 h before recording. The final concentration in the oocytes was around 10 nM. Tetanus toxin was prepared and kindly provided by Professor J. Blasi (University of Barcelona).

### Estimation of *Xenopus* oocyte volume

Oocytes placed in a Petri dish containing NR were observed on an inverted microscope (Olympus CK 40) and the images digitized through an Olympus DP10 camera. Individual oocytes were transferred to a new Petri dish containing HS. Images were recorded for the period indicated. Assuming that oocytes are spherical in shape, cell volume was  $4/3 \pi r^3$ , where  $r$  is the radius. At  $t = 0$ , the volume of the oocyte was taken as 100 %.

### NTPDase activity (ecto-ATPase activity)

The NTPDase activity of defolliculated *Xenopus* oocytes was assessed as described elsewhere (Ziganshin *et al.* 1995). Groups of six oocytes were placed in 96 ELISA wells, in a volume of 100 μl of NR. Two groups of oocytes were assayed in the presence of NR or HS. In both cases, a subgroup of oocytes was incubated in the corresponding media, and calcium was replaced by 1 mM EGTA. Oocytes were first washed and subsequently incubated in the above medium for 30 min at room temperature. Media were then carefully replaced by fresh solutions supplemented or not by 100 μM ATP. After an additional 30 min incubation period, the media were removed and their phosphate contents were determined using the malachite green method (Lanzetta *et al.* 1979). Each condition was assayed in triplicate and results are shown as the means ± S.E.M. from four independent experiments. In some experiments, the mannitol in HS was replaced by sucrose or sorbitol. In other experiments, NTPDase activity was assayed in potato apyrase (grade VII, Sigma).



**Figure 1. Macroscopic changes induced by hypertonic shock in *Xenopus* oocytes**

A, reduction in cell volume (%) in 6 oocytes. B, example of ATP release measured in a single oocyte by means of the luciferin–luciferase reaction. This oocyte was not penetrated with fine-tipped electrodes. The trace corresponds to changes in light intensity, reflecting the presence of ATP in the medium. Just at the beginning of the recording, a known dose of ATP (0.6 pmol) was added to evaluate the amount of ATP released by the oocyte.

#### Expression of human CFTR in *Xenopus* oocytes

Plasmid containing full length cDNA for CFTR (pBS6.2-CFTR) was generously supplied by Professor Johanna Rommens (Department of Genetics, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada). The plasmid (10  $\mu$ g) was linearized with *Xho*I (Promega) and the resultant product was used for mRNA synthesis *in vitro* using the mCAP RNA Capping Kit (Stratagene). The mRNA obtained was injected (50 nl, 1–2 mg ml<sup>-1</sup>) into oocytes 3 days before membrane current recordings. CFTR-activated ionic currents were elicited with NR supplemented with 100  $\mu$ M 8-Br-cAMP (Sigma), 1 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma) and 1  $\mu$ M forskolin (Sigma). Only oocytes exhibiting the activated current were further stimulated with the hypertonic protocol.

#### Injection of DNA antisense oligonucleotide complementary to CD39 mRNA in *Xenopus* oocytes

An antisense oligonucleotide complementary to CD39 mRNA (antiCD39): 5'-TGTTGGTCAAGTTCAGCATGTAGCCCAG-3' was designed from consensus sequences of human, rat, mouse, cow, chicken and *Torpedo marmorata* and synthesized by Invitrogen-Life Technologies. The oligonucleotide was rehydrated in ultra-pure water and injected (50 nl, 2 mg ml<sup>-1</sup>) into oocytes 40–72 h before membrane current recordings.

#### Statistical analysis

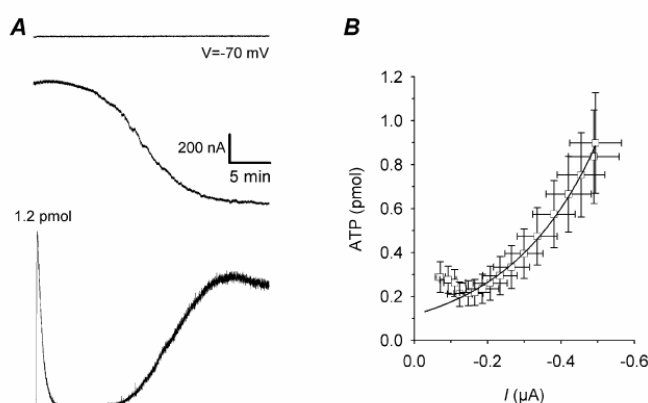
Curves were fitted using Sigma Plot (SPSS). Statistical analysis was performed using Sigma Stat software (SPSS). Unless otherwise specified, values given in the text correspond to the mean  $\pm$  s.e.m. When comparing two-group means of normally distributed data, the Student's *t* test was used. Otherwise, the Mann-Whitney rank sum test was applied. A significance level of  $P < 0.05$  was adopted in all comparisons.

## RESULTS

Oocytes in hypertonic (543 mosmol l<sup>-1</sup>) conditions showed a reversible decrease in volume of  $13 \pm 3\%$  ( $n = 6$ ), and reached a steady state within  $\sim 10$  min, depending on the oocyte batch (Fig. 1A). During shrinkage, the oocytes released ATP (Fig. 1B). When they were recorded individually in voltage-clamp conditions with a membrane voltage ( $V_m$ ) of  $-70$  mV, the hypertonic medium induced an inward current and ATP release (Fig. 2). The time course of currents varied from one oocyte to another. At the beginning of recording, the amount of ATP released was apparently independent of

**Figure 2. Simultaneous recording of ATP release and ionic currents from a single oocyte stressed by hypertonic solution**

A, single oocyte superfused in hypertonic solution 2 min before the experiment. Upper trace: membrane voltage. Middle trace: membrane current. Bottom trace: ATP release. Note that in the light trace, we added a known dose of ATP (1.2 pmol) to evaluate the release of ATP. B, example illustrating a plot of ATP release vs. current and time (each point represents the ATP release vs. current amplitude during each minute of recording from minute 4 to minute 20). An exponential curve fitted the data obtained between minute 10 and minute 20 ( $n = 20$ ).

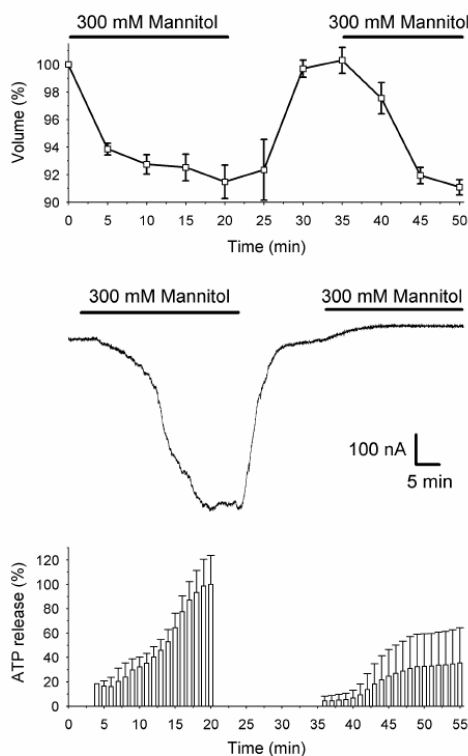


the amplitude of the current. However, after 8 min, this correlation fitted an exponential curve ( $\text{ATP release} = a \times \exp(b \times \text{current})$ ), where  $b$  was  $10^{-4}$  and  $a$  was 116;  $R = 0.997$ ). The total amount of ATP released at the end of minute 20 of recording was  $7 \pm 2$  pmol ( $n = 24$ ).

The effect of the hypertonic solution applied for periods of 20 min was reversible (Fig. 3) and the initial volume was restored a short time after returning the oocytes to the isotonic solution. A second challenge with hypertonic solution reduced the cellular volume again, reaching the same values as recorded in the first perfusion. However, the hypertonic shock-activated inward current was blocked after a second hypertonic shock and ATP release was also inhibited. This inhibitory effect was not observed when oocytes were perfused with hypertonic solution for

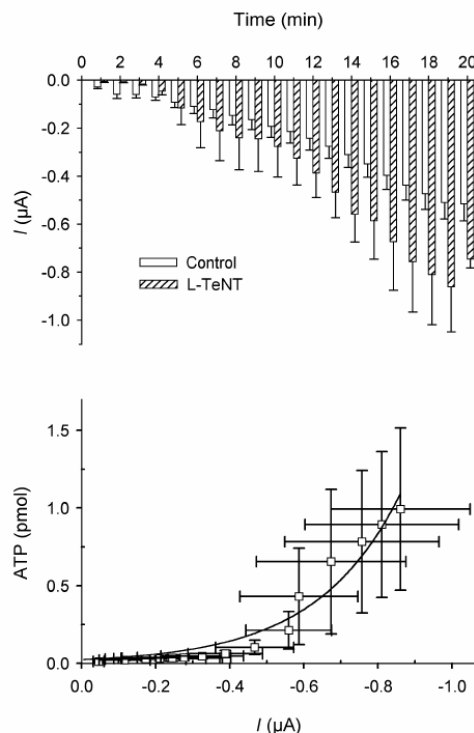
shorter periods such as 10 min. In these cases, hypertonic-activated current and ATP release after a second hypertonic stimulus were slightly inhibited (data not shown).

To test the possible exocytotic source of ATP, we treated some oocytes with tetanus neurotoxin (TeNT). Oocytes previously micro-injected with the light chain of tetanus neurotoxin (L-TeNT) did not show any significant change in the hypertonic shock-activated membrane currents (Fig. 4). However, the correlation between the current and the amount of ATP released could be fitted with an exponential function ( $\text{ATP release} = a \times \exp(b \times \text{current})$ ), where  $b$  was  $10^{-4}$  and  $a$  was 25;  $R = 0.975$ ). This fit included all points measured. The amount of ATP released at the beginning of the recording was decreased (compared with Fig. 2).



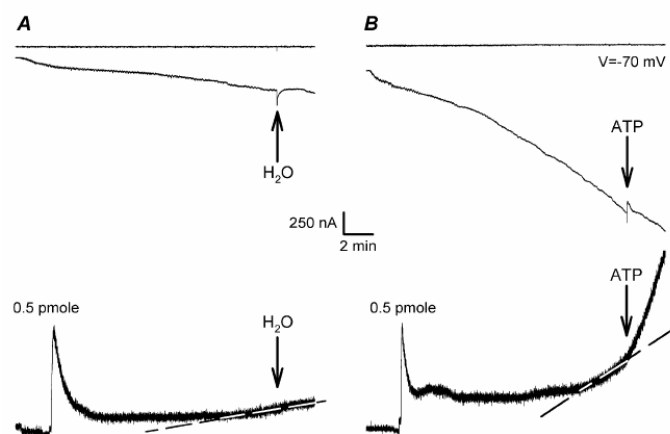
**Figure 3.** Effect of two consecutive hypertonic shocks on cell volume, inward current and ATP release

Upper graph: decrease in cell volume in 6 oocytes superfused twice (indicated with horizontal bars) in hypertonic solution. Middle trace: example of ionic currents recorded in one oocyte clamped at  $V_m = -70$  mV in which two consecutive hypertonic superfusions (indicated with horizontal bars) were applied. Lower graph: percentage of ATP release with respect to the maximal release measured after the first period of 20 min of hypertonic perfusion ( $n = 3$ ).



**Figure 4.** Effect of tetanus toxin on hypertonic shock-activated membrane current and ATP release

Upper graph: average of current amplitudes during 1 min of recording in non-injected oocytes ( $\square$ ,  $n = 33$ ) and in L-TeNT injected oocytes ( $\square$ ,  $n = 4$ ). Lower graph: plot of ATP release vs. current and time (each point represents the ATP release vs. current amplitude during each minute of recording from minute 4 to minute 20). An exponential function fitted the values of all the data represented. Compare the amount of ATP released in this condition and that in Fig. 2.



**Figure 5. Effect of intracellular ATP injection on ATP release and ionic current elicited by a hypertonic solution**

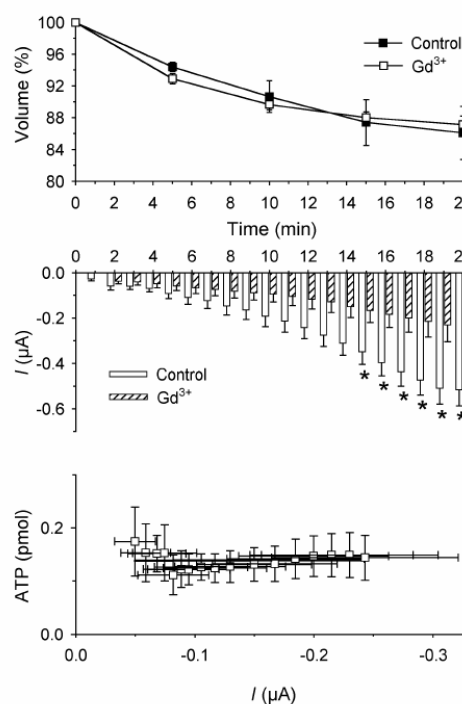
The cytoplasmic ATP concentration was increased by a direct injection of a small volume of an ATP solution. Examples of recordings in two oocytes superfused in hypertonic solution into which we injected 9.2 nl of distilled water (A) and 9.2 nl of 250 mM ATP (B). Upper traces: membrane voltage. Middle traces: membrane current. Bottom traces: ATP release. Note that in both light traces, we added a known dose of ATP (0.5 pmole) to evaluate the release of ATP. Arrows indicate the injection of solutions. Dashed lines indicate the slope of ATP release before injections.

We increased the cytoplasmic ATP concentration by injecting 9.2 nl of  $K_2ATP$  (250 mM,  $pH \approx 7$ ). In six oocytes we found an increase in the rate of ATP release (Fig. 5). The increase of ATP release was only recorded when oocytes were shrunk and the inward current was activated. When the same solution of ATP was injected into oocytes in isotonic conditions, no ATP release was detected (data not shown). In hypertonically stressed oocytes injected with ultra-pure water (9.2 nl), no increase in ATP was detected (Fig. 5).

To determine the influence of mechanically activated ionic channels, oocytes were treated with gadolinium. In all experiments, a known dose of ATP was applied in the presence of gadolinium, in order to check for any interference by gadolinium ions in the luciferin-luciferase-ATP reaction. When oocytes were preincubated for 10 min with an isotonic solution containing  $GdCl_3$  (200  $\mu M$ ), and then with a hypertonic solution containing the same concentration of  $GdCl_3$ , we did not observe any change in the reduction of their

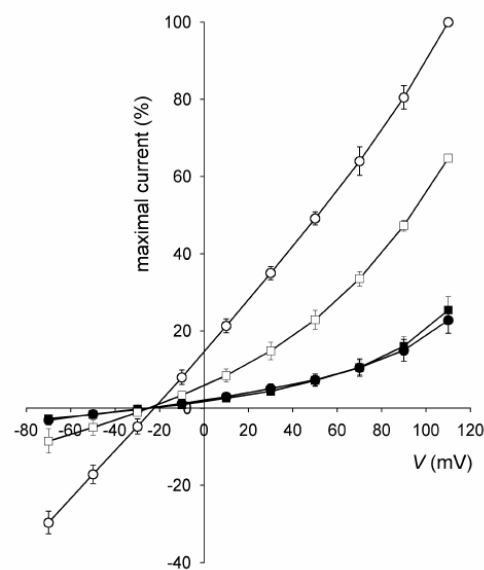
**Figure 6. Effect of gadolinium on cell volume, membrane current and ATP release during a hypertonic shock**

Upper graph: decrease in cell volume in oocytes superfused in hypertonic solution. The value at time 0 was set at 100%. ●, hypertonic solution ( $n = 6$ ); ○, hypertonic solution plus 200  $\mu M$   $GdCl_3$  ( $n = 6$ ). Middle graph: average of current amplitudes during 1 min of recording. □, non-treated oocytes ( $n = 33$ ); ▨, gadolinium-treated oocytes ( $n = 11$ ). \* $P < 0.05$ . Lower graph: plot of ATP release vs. current and time (each point represents the ATP release vs. current amplitude during each minute of recording from minute 4 to minute 20) showing the inhibition of ATP release and the hypertonic shock-activated currents.



volume (Fig. 6). Hypertonic shock-activated currents were significantly inhibited (66%) after 20 min, throughout all the phases of the currents. The plot of ATP release vs. inward current is a flat horizontal line, revealing that the second component of ATP release (the ionic mechanism) was blocked, but the first component (the exocytotic mechanism) was not affected by gadolinium ions. We also explored the relationship between voltage and current in shrunken oocytes: the effect of gadolinium on the  $I$ - $V$  ratio of the hypertonic shock-activated currents is summarized in Fig. 7. While the currents in hypertonic conditions were linear, we found a slight rectification in the presence of gadolinium. The reversal potential was  $-30 \pm 1$  mV in isotonic solution,  $-28 \pm 1$  mV in isotonic solution plus gadolinium,  $-23 \pm 1$  mV in hypertonic solution and  $-29 \pm 1$  mV in hypertonic solution plus gadolinium ( $n = 6$ , in all conditions).

Some specific proteins like CFTR have been implicated in the extrusion of ATP from cells. Oocytes injected with 50–100 ng of mRNA encoding CFTR were tested with a solution containing 100  $\mu$ M 8-Br-cAMP, 1 mM IBMX and 1  $\mu$ M forskolin before being stimulated with hypertonic solutions. The current elicited by this solution was reversible and we did not detect any release of ATP. When

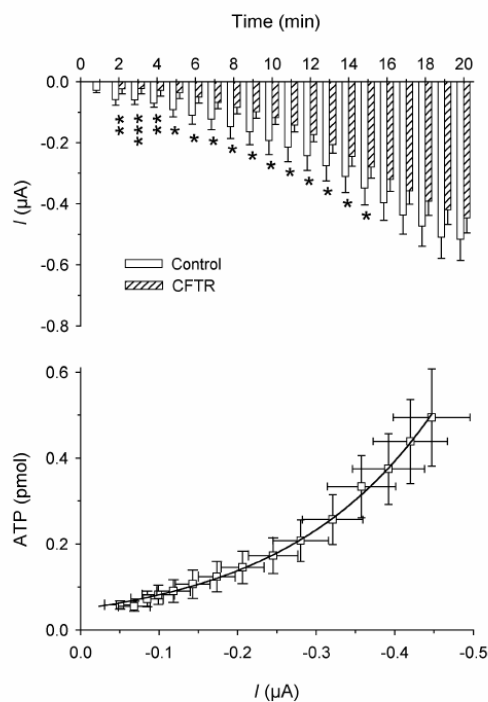


**Figure 7.**  $I$ - $V$  relationship of hypertonic shock-activated currents

Current amplitudes are represented as a percentage of the amplitude of the current measured in non-treated oocytes in hypertonic medium at +110 mV. Circles: non-treated oocytes ( $n = 6$ ) in isotonic (●) and hypertonic (○) media. Squares: gadolinium-treated oocytes ( $n = 6$ ) in isotonic (■) and hypertonic (□) media.

the oocytes expressing CFTR were stressed by hypertonic solution, we found a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in the activated inward current (up to minute 15) and in ATP release (up to minute 9) (Fig 8). The plot of ATP released vs. current reveals an exponential function from minute 4 to minute 20 (ATP release =  $a \times \exp(b \times \text{current})$ ), where  $b$  was  $10^{-4}$  and  $a$  was 48;  $R = 0.998$ ).

The ATP measured above is the result of the equilibrium between ATP release and ATP degradation by ectoenzymes such as NTPDases. The NTPDase activity of the intact oocyte surface was measured in isotonic and hypertonic conditions (Fig. 9) as the calcium-dependent ATPase activity. At low calcium concentrations (1 mM EGTA), the hydrolysis of ATP was much lower ( $0.03 \pm 0.01$  nmol inorganic phosphate ( $P_i$ ) oocyte $^{-1}$  (30 min) $^{-1}$ ) than in the presence of 1.8 mM  $CaCl_2$  ( $0.28 \pm 0.02$  nmol  $P_i$  oocyte $^{-1}$  (30 min) $^{-1}$ ). After 30 min in hypertonic solution, the activity in medium containing



**Figure 8.** Hypertonic shock-activated membrane currents and ATP release in oocytes expressing CFTR

Upper graph: average of current amplitudes during 1 min of recording: □, non-injected oocytes ( $n = 33$ ); ▨, oocytes expressing CFTR ( $n = 17$ ). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Lower graph: plot of ATP release vs. current and time (each point represents the ATP release vs. current amplitude during each minute of recording from minute 4 to minute 20). An exponential curve fitted all the data represented.



1 mM EGTA did not differ ( $0.03 \pm 0.02$  nmol  $P_i$  oocyte<sup>-1</sup> (30 min)<sup>-1</sup>) from that measured in isotonic conditions. However, the calcium-dependent activity was reduced to  $0.12 \pm 0.02$  nmol  $P_i$  oocyte<sup>-1</sup> (30 min)<sup>-1</sup>, which represents about a 56% inhibition of NTPDase activity. To rule out the direct inhibition of NTPDase activity by mannitol, we assayed other NTPDases. NTPDase activity from potato was  $(112 \pm 20) \times 10^3$  nmol (mg protein)<sup>-1</sup> (30 min)<sup>-1</sup> and  $(113 \pm 20) \times 10^3$  nmol (mg protein)<sup>-1</sup> (30 min)<sup>-1</sup> when 300 mM mannitol was added ( $n = 3$ ).

Finally, we recorded ionic current and ATP release from CD39 antisense-injected oocytes ( $n = 13$ ) and from water-injected oocytes ( $n = 8$ ). In 13 of the 14 oocytes CD39 antisense oligonucleotide significantly reduced ATP release and the ionic current after 13 min of hypertonic exposure (Fig. 10).

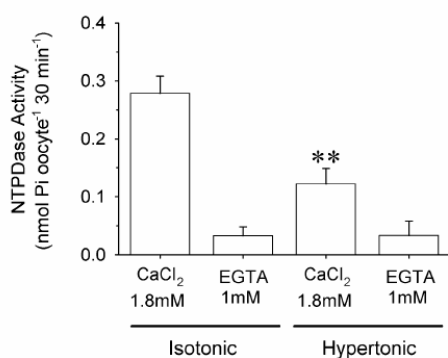
## DISCUSSION

Cell volume regulation is a complex cellular response, that involves at least three steps (Montrose-Rafizadeh & Guggino, 1990). First, the cell must be able to detect changes in cell volume; second, it must initiate regulatory processes that alter intracellular solute content, and third, the cell must remember its initial volume and shut down the volume regulatory process. Mammalian cells show regulatory cell volume decrease under hypotonic conditions, but they do not always exhibit regulatory cell volume increase under hypertonic conditions (Montrose-Rafizadeh & Guggino, 1990).

Cell shrinkage elicited by a hyperosmotic solution promotes subsequent influx of ions and water; regulatory

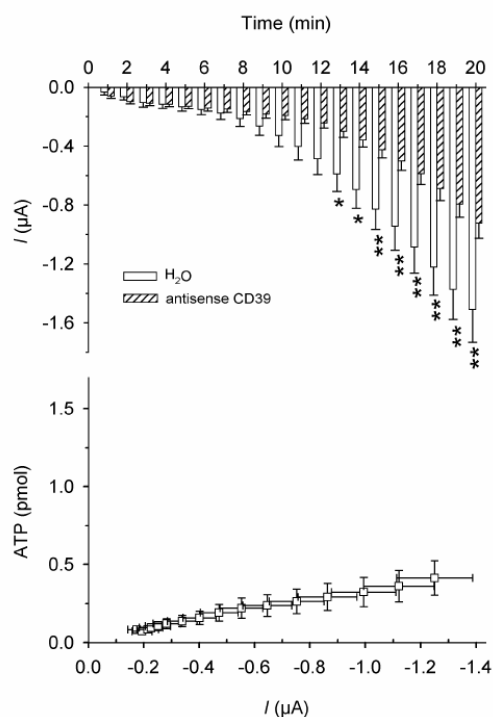
volume increase is mediated either by  $Na^+K^+Cl^-$  cotransport or by the coupled activities of  $Na^+H^+$  exchange (NHE) and  $Cl^-HCO_3^-$  anion exchange (Goss *et al.* 2001). Several isoforms from mammalian and non-mammalian cells have been cloned, including *Xenopus* oocytes. To achieve a regulatory volume increase *Xenopus* oocytes must co-express the endogenous ion transporter xNHE and at least the anion exchanger AE2 (Jiang *et al.* 1997), cloned from mouse (Grinstein *et al.* 1992). This indicates that *Xenopus* oocytes share the same first steps of cell volume regulation as mammalian cells and therefore the release of ATP induced by cell shrinkage should be a considered a general phenomenon related to volume adaptation.

Changes in cell volume are associated with ATP release, which is usually detected during cell swelling in hypotonic



**Figure 9. External NTPDase activity of oocytes during hypertonic shock**

The bar histogram shows the NTPDase activity as ATP hydrolysis stimulated by calcium. We investigated the activity in isotonic and hypertonic conditions. Calcium-independent activity was very low and was insensitive to hypertonic shock. However, the calcium-stimulated activity was inhibited by 56%. \*\* $P < 0.01$  ( $n = 4$ ).



**Figure 10. Hypertonic shock-activated membrane currents and ATP release in oocytes injected with an antisense oligonucleotide complementary to CD39 mRNA**

Upper graph: average of current amplitudes during 1 min of recording. □, water-injected oocytes ( $n = 8$ ); ▨, CD39 antisense-injected oocytes ( $n = 13$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Lower graph: plot of ATP release vs. current and time in CD39 antisense-injected oocytes (each point represents the ATP release vs. current amplitude during each minute of recording from minute 7 to minute 20).

conditions (Hazama *et al.* 2000; Grygorczyk & Guyot, 2001; Koyama *et al.* 2001; Okada *et al.* 2001; Sabirov *et al.* 2001; Boudreault & Grygorczyk, 2002). Several reports have shown that hypotonic shock-activated currents are observed only in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes (Arellano & Miledi, 1993, 1995; Ackerman *et al.* 1994; Aleu *et al.* 1997). We tested defolliculated *Xenopus* oocytes in hypotonic conditions (95 mosmol l<sup>-1</sup>) and we did not detect any release of ATP or activation of any ionic current. Moreover, we did not detect ATP release in oocytes in which even the vitelline envelope had been completely removed (data not shown). In contrast, oocytes challenged with hypertonic solution released ATP and showed a reduction in volume. We also recorded ATP release in oocytes that were not impaled by glass microelectrodes, which revealed that the release was not due to leakage around the electrodes during cell shrinkage. A hypertonic challenge in *Xenopus* oocytes also activated an inward current that has been described elsewhere (Zhang & Hamill, 2000) and is reminiscent of that activated by mechanical stress (Saitou *et al.* 2000).

The release of ATP was accompanied by activation of an inward current. While the effect of hypertonic solution on cell volume was reversible, even after a second application, activation of the inward current was totally blocked during a second hypertonic challenge and release of ATP, though still detectable, represented only 35% of the amount of ATP released during the first hypertonic stimulus.

The hypertonic shock-activated inward current was completely reversible, but was blocked after a second hypertonic challenge, suggesting an association between the opening of the current and some disruption between the cytoskeleton and the plasma membrane. In fact, hypertonic solutions applied to *Xenopus* oocytes have been shown to induce the formation of individual cytoskeleton-free vesicles (Zhang *et al.* 2000). Such vesicles showed a reduced sensitivity to mechanically activated channels. The association between the cytoskeleton and mechanically activated channels has been reported in other experimental models such as neurons, in which the use of cytochalasin or colchicines disrupts the assembly of cytoskeleton and decreases the activity of mechanically activated channels (Cho *et al.* 2002).

The ATP release–current relationship described two major components of hypertonic shock-activated ATP release. The first component took place during the first 10 min of shrinkage, where the amount of ATP released and the amplitude of the inward current were not correlated. This indicates that a non-ionic process is involved, for example exocytosis. The second component began when oocyte volume reached a minimum. In this phase the amount of ATP released correlated with the amplitude of the inward current.

It is well known that exocytosis is inhibited by clostridial toxins (Rosseto *et al.* 2001; Aleu *et al.* 2002). To analyse the possible exocytotic origin of ATP release we used tetanus neurotoxin (TeNT). To verify the action of this toxin, we injected the light chain of TeNT (L-TeNT) instead of superfusing the oocytes with the holotoxin, because it is not known whether *Xenopus* oocytes express any receptors to clostridial toxins on their surface. We found that L-TeNT injected into oocytes inhibited the first component of ATP release induced by the hypertonic stimulus. In oocytes injected with L-TeNT, all points analysed fitted an exponential curve, and the fitted curves in L-TeNT-treated and non-L-TeNT-treated oocytes were very similar, suggesting that both describe the same cellular mechanism. Since only the release of ATP during shrinkage (the first component) is sensitive to L-TeNT, this component may correspond to an exocytosis-mediated release. In agreement with these results, a recent study provided evidence that ATP release from *Xenopus* oocytes stressed with local mechanical stimulation is sensitive to Brefeldin A, which interrupts the traffic of vesicles from the Golgi apparatus to the cell surface, suggesting an exocytotic pathway for ATP release (Maroto & Hamill, 2001). In other non-secretory cells also, such as those from the pig ureter epithelium (Knight *et al.* 2002), the release of ATP is associated with the exocytosis of small vesicles.

The second component of ATP release (once oocyte volume reached the minimum) was strongly inhibited by gadolinium, a classical blocker of mechanically activated ionic channels, but during the shrinking process (first component) there was no significant difference between control and gadolinium-treated oocytes: this implies that the first component of ATP release (the exocytotic process) is not affected by gadolinium. It has been reported that gadolinium also enhances ATP release during cell swelling owing to its membrane fusogenic activity (Boudreault & Grygorczyk, 2002), but we ruled out this possibility in *Xenopus* oocytes because, at the concentrations tested, ATP release did not increase.

During hypertonic challenge, gadolinium did not inhibit shrinkage of the oocytes, but the hypertonic shock-activated current was strongly inhibited. Similar results were obtained during the activation of osmoreceptors in supraoptic neurons (Oliet & Bourque, 1996) and the concentrations at which gadolinium was more active were in the range of 100–500  $\mu$ M. *Xenopus* oocytes may thus be sensitive to hypertonic solutions in a manner similar to neurons. However, in oocytes the gadolinium-induced inhibition of the hypertonic-activated current was coincident with the inhibition of ATP release. The inhibitory effect of gadolinium on both the current and ATP release was observed throughout the period of current activation.

The reversal potential of the hypertonic-activated current was the same under all conditions tested and was very close to the reversal potential of  $\text{Cl}^-$  in *Xenopus* oocytes calculated according to their intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration (Dascal, 1986). Gadolinium did not change the reversal potential in isotonic or hypertonic solutions. If ATP is released as a charged molecule, only a small fraction of the current (1%) would be supported by the anionic ATP, and this net ATP current would be masked by the background noise of the amplifier. This explains why, when the intracellular concentration of ATP was increased, we recorded a clear increase in ATP release but not in current amplitude. An increase in ATP release was only detected when the inward current was activated and the oocyte had shrunk.

A link between ATP release and chloride flux has been demonstrated in *Xenopus* oocytes expressing functional CFTR (Jiang *et al.* 1998). We did not detect ATP release when activating CFTR with cAMP, as reported by other groups, supporting the view that CFTR is not permeable to ATP (Grygorczyk & Hanrahan, 1997; Watt *et al.* 1998; Braunstein *et al.* 2001). In oocytes injected with CFTR during the shrinking process, the current activated by the hypertonic stimulus was inhibited, but there was little effect on the ionic current recorded after the oocytes reached their minimum volumes. CFTR and L-TeNT inhibited ATP release during the first minutes of recording but not later, suggesting that they affect the same processes of ATP secretion. This would support one of the hypotheses formulated by Devidas & Guggino (1997), who propose that CFTR indirectly controls the exocytosis of ATP.

The membrane protein CD39 is also related to ATP transport through the cell plasma membrane, as suggested elsewhere (Wang *et al.* 1998; Bodas *et al.* 2000; Abraham *et al.* 2001). CD39 has two transmembrane domains and a small hydrophobic loop (Wang *et al.* 1998), which is analogous to other ionic channels. CD39 is a member of the family of type 1 NTPDases, since it hydrolyses ATP or ADP in a calcium-dependent manner (see Zimmermann, 2000 for review). Endogenous NTPDase activity has been described in *Xenopus* oocytes (Ziganshin *et al.* 1995; Bodas *et al.* 2000; Aguilar *et al.* 2001). In our study, NTPDase activity was inhibited by more than 50% at the end of the period of hypertonic challenge. This inhibition is likely to contribute to the exponential increase in ATP detected because the probability of ATP being degraded decreases with time. We ruled out a direct effect of mannitol, since mannitol had no inhibitory effect on the NTPDase activity of potato apyrase. The amino acid sequence responsible for the activity of NTPDase has been conserved in all types of NTPDases, including potato apyrase, so any direct inhibitory effects of mannitol would be apparent in all of them. The inhibition of NTPDase activity may also be due to endocytosis of the endogenous CD39, which has been

associated with caveolae (Koziaik *et al.* 2000). However, under the condition of hypertonic stimulus, we detected a release of ATP that was sensitive to clostridial toxins, indicating an increase in the rate of exocytosis. Since the increase in ATP release is coincident with inhibition of NTPDase activity, and we have suggested that CD39 is involved in plasma membrane ATP transport (Bodas *et al.* 2000), CD39 may have two conformations: one in which it behaves as a hydrolysing enzyme and another in which it behaves as a transporter. In hypertonic conditions, a significant part of the endogenous CD39 of oocytes would adopt the transporter conformation, thus reducing the number of molecules acting as NTPDase. The experiments performed in oocytes injected with CD39 antisense oligonucleotide showed a decrease in ATP and also in inward current (second component), reinforcing the view that CD39 is involved, directly or indirectly, in ATP release induced by hypertonic stress. Moreover these experiments also relate the transport of ATP to the inward current. In addition, our group has demonstrated that in *Xenopus* oocytes expressing human CD39 there is an increase in the hyperpolarizing-activated current associated with ATP release (Bodas *et al.* 2000).

Our studies have focused entirely on ATP release induced by hypertonic stress, but ATP release may also be induced in *Xenopus* oocytes by mechanical stress (Maroto & Hamill, 2001) and hyperpolarizing pulses (Bodas *et al.* 2000). Other mechanisms implicated in ATP release involve hemi-gap junctions, as recently described in astrocytes (Stout *et al.* 2002). *Xenopus* oocytes express endogenous hemi-gap channels Cx38 (Ebihara, 1996), and they may be involved in ATP release in this system.

Finally, we conclude that ATP release is induced by hypertonic stress in *Xenopus* oocytes via two different mechanisms: one related to exocytosis and the other related to an ionic current. CD39 is, directly or indirectly, implicated in this process.

## REFERENCES

- Abraham EH, Sterling KM, Kim RJ, Saliknova AY, Huffman HB, Crockett MA, Johnston N, Parker HW, Boyle WE Jr, Hartov A, Demidenko E, Efrid J, Kahn J, Grubman SA, Jefferson DM, Robson SC, Thakar JH, Lorico A, Rappa G, Sartorelli AC & Okunieff P (2001). Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Cell Mol Dis* 27, 165–180.
- Ackerman MJ, Wickman KD, & Clapham DE (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103, 153–179.
- Aguilar JS, Reyes R, Asensio AC, Oaknin S, Rotllan P & Miledi R (2001). Ecto-enzymatic breakdown of diadenosine polyphosphates by *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem* 268, 1289–1297.

- Aleu J, Blasi J, Solsona C & Marsal J (2002). Calcium-dependent acetylcholine release from *Xenopus* oocytes: simultaneous ionic current and acetylcholine release recordings. *Eur J Neurosci* **16**, 1442–1448.
- Aleu J, Ivorra I, Lejarreta M, González-Ros JM, Morales A & Ferragut JA (1997). Functional incorporation of P-glycoprotein into *Xenopus* oocyte plasma membrane fails to elicit a swelling-evoked conductance. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 407–412.
- Arellano RO, Gary E & Miledi R (1998). Cl<sup>-</sup> currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am J Physiol* **274**, C333–340.
- Arellano RO, Martínez-Torres A & Garay E (2002). Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod* **67**, 837–846.
- Arellano RO & Miledi R (1993). Novel Cl<sup>-</sup> currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* **102**, 833–857.
- Arellano RO & Miledi R (1995). Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl<sup>-</sup> currents in *Xenopus* follicles. *J Physiol* **488**, 351–357.
- Arellano RO, Woodward RM & Miledi R (1996). Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In *Ion Channels*, vol. 4, pp. 203–259. Plenum press, New York.
- Billig H & Rosberg S (1986). Gonadotropin depression of adenosine triphosphate levels and interaction with adenosine in rat granulosa cells. *Endocrinology* **118**, 645–652.
- Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martín-Satué M, Marsal J & Solsona C (2000). ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **275**, 20268–20273.
- Bodin P & Burnstock G (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **26**, 959–969.
- Boudreaux F & Grygorczyk R (2002). Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C219–226.
- Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG & Schwiebert EM (2001). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem* **276**, 6621–6630.
- Buxton IL, Kaiser RA, Oxhorn BC & Cheek DJ (2001). Evidence supporting the Nucleotide Axis Hypothesis: ATP release and metabolism by coronary endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1657–1666.
- Cho H, Shin J, Shin CY, Lee SY & Oh U (2002). Mechanosensitive ion channels in cultured sensory neurons of neonatal rats. *J Neurosci* **22**, 1238–1247.
- Cotrina ML, Lin JH & Nedergaard M (1998). Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J Neurosci* **18**, 8794–8804.
- Dasal N (1986). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 317–387.
- Devidas S & Guggino WB (1997). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 547–552.
- Downs SM, Coleman DL & Eppig JJ (1986). Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev Biol* **117**, 174–183.
- Ebihara L (1996). *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **71**, 742–748.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF & Coleman DL (1985). Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* **33**, 1041–1049.
- Forrester T (1972). An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J Physiol* **224**, 611–628.
- Goss GG, Jiang L, Vandorpe DH, Kieller D, Chernova MN, Robertson M & Alper SL (2001). Role of JNK in hypertonic activation of Cl<sup>-</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1978–1990.
- Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J & Rotin D (1992). Activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* **267**, 23823–23828.
- Grygorczyk R & Guyot A (2001). Osmotic swelling-induced ATP release: a new role for tyrosine and Rho-kinases? *J Physiol* **532**, 582.
- Grygorczyk R & Hanrahan JW (1997). CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* **272**, C1058–1066.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC & Kater SB (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* **19**, 520–528.
- Hamill OP & Martinac B (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* **81**, 685–740.
- Hashimoto M, Shinozuka K, Sasaki T, Tanaka N, Hossain S, Kubota Y, Tamura K, Shido O & Kunitomo M (2001). Nicorandil-induced ATP release in endothelial cells of rat caudal artery is associated with increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Pharmacol* **416**, 179–183.
- Hazama A, Fan HT, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y & Okada Y (2000). Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl<sup>-</sup> conductances in murine C127 cells. *J Physiol* **523**, 1–11.
- Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y & Oike M (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* **119**, 511–520.
- Jiang L, Chernova MN & Alper SL (1997). Secondary regulatory volume increase conferred on *Xenopus* oocytes by expression of AE2 anion exchanger. *Am J Physiol* **272**, C191–202.
- Jiang Q, Mak D, Devidas S, Schwiebert EM, Bragin A, Zhang Y, Skach WR, Guggino WB, Foskett JK & Engelhardt JF (1998). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J Cell Biol* **143**, 645–657.
- Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K & Hodgen GD (1994). Existence of P2-purinoreceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocr Metab* **78**, 650–656.
- King BF, Pintor J, Wang S, Ziganshin AU, Ziganshina LE & Burnstock G (1996a). A novel P1 purinoreceptor activates an outward K<sup>+</sup> current in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 93–100.
- King BF, Wang S & Burnstock G (1996b). P2 purinoreceptor-activated inward currents in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Physiol* **494**, 17–28.
- Knight GE, Bodin P, De Groat WC & Burnstock G (2002). ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F281–288.
- Koyama T, Oike M & Ito Y (2001). Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol* **532**, 759–769.

- Koziak K, Kaczmarek E, Kittel A, Sevigny J, Blusztajn JK, Schulte Am Esch J 2nd, Imai M, Guckelberger O, Goepfert C, Qawi I & Robson SC (2000). Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. *J Biol Chem* **275**, 2057–2062.
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS & Candia OA (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**, 95–97.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y (1982). Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature* **296**, 572–574.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y (1986). ATP-evoked membrane responses in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* **406**, 158–162.
- Maroto R & Hamill OP (2001). Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem* **276**, 23867–23872.
- Montrose-Rafizadeh C & Guggino WB (1990). Cell volume regulation in the nephron. *Annu Rev Physiol* **52**, 761–772.
- Nakamura F & Strittmatter SM (1996). P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10465–10470.
- Newman EA (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* **21**, 2215–2223.
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J & Morishima S (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* **532**, 3–16.
- Oliet SH & Bourque CW (1996). Gadolinium uncouples mechanical detection and osmoreceptor potential in supraoptic neurons. *Neuron* **16**, 175–181.
- Pérez-Sanmartín AL, Miledi R & Arellano RO (2000). Activation of volume-regulated Cl<sup>-</sup> channels by ACh and ATP in *Xenopus* follicles. *J Physiol* **525**, 721–734.
- Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G & Montecucco C (2001). Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicol* **39**, 27–41.
- Sabirov RZ, Dutta AK & Okada Y (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol* **118**, 251–266.
- Saitou T, Ishikawa T, Obara K & Nakayama K (2000). Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* **440**, 858–865.
- Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL & Schwiebert EM (2002). Extracellular ATP signalling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C289–301.
- Silinsky EM & Redman RS (1996). Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol* **492**, 815–822.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC & Charles AC (2002). Intercellular calcium signalling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **277**, 10482–10488.
- Wang TF, Ou Y & Guidotti G (1998). The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* **273**, 24814–24821.
- Watt WC, Lazarowski ER & Boucher RC (1998). Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia. *J Biol Chem* **273**, 14053–14058.
- Verderio C & Matteoli M (2001). ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN- $\gamma$ . *J Immunol* **166**, 6383–6391.
- Vizi ES, Nitahara K, Sato K & Sperlagh B (2000). Stimulation-dependent release, breakdown, and action of endogenous ATP in mouse hemidiaphragm preparation: the possible role of ATP in neuromuscular transmission. *J Auton Nerv Syst* **81**, 278–284.
- Yegutkin G, Bodin P & Burnstock G (2000). Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Brit J Pharmacol* **129**, 921–926.
- Zhang Y, Gao F, Popov VL, Wen JW & Hamill OP (2000). Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. Zhang Y & Hamill OP (2000). Calcium-, voltage- and osmotic stress-sensitive currents in *Xenopus* oocytes and their relationship to single mechanically gated channels. *J Physiol* **523**, 83–99.
- J Physiol* **523**, 117–130.
- Ziganshin AU, Ziganshina LE, King BE & Burnstock G (1995). Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflügers Arch* **429**, 412–418.
- Zimmermann H (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *N-S Arch Pharmacol* **362**, 299–309.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (DGI) of the Spanish Government, the CIRIT of the Generalitat de Catalunya, the Fundació La Marató de TV3 and the Fundació August Pi i Sunyer. We thank Professor Blasi for the gift of L-TeNT and helpful comments. We also thank the Language Advisory Service of the Universitat de Barcelona for linguistic help. The Whole Cell Analysis Program was kindly provided by John Dempster (University of Strathclyde, Scotland, UK). Finally, we are indebted to Professor Johanna Rommens, Department of Genetics, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada, for the generous gift of cDNA encoding CFTR.