

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE Facultad de Ciencias Biológicas Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Ciencias Fisiológicas

Tesis Doctoral: REGULACIÓN DE LOS CANALES FORMADOS POR PANEXINA 1 POR PKA Y CAMKII

Por XIMENA MONSERRAT LÓPEZ LAGOS

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Sáez Carreño

Abril 2020

REGULACIÓN DE LOS CANALES FORMADOS POR PANEXINA 1 POR PKA Y CAMKII

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Ciencias Fisiológicas.

Por XIMENA MONSERRAT LÓPEZ LAGOS

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Sáez Carreño

Abril 2020

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mi familia, especialmente a mi compañero de vida Sebastián y nuestros dos pequeñitos, Antonia y Simón. Son lo más importante y mi mayor logro en la vida. Ustedes son parte de cada célula de mi cuerpo y están en cada pensamiento. Cada paso con ustedes es una aventura maravillosa.

> "Yo te llevo dentro, hasta la raíz Y por más que crezca, vas a estar aquí Aunque yo me oculte tras la montaña Y encuentre un campo lleno de caña No habrá manera, mi rayo de luna Que tú te vayas"

"Hasta la raíz" Natalia Lafourcade, 2015.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia. A mi amado esposo Sebastián, que ha sido el pilar de nuestra familia y un apoyo incondicional en cada paso de mi carrera profesional desde que entré a estudiar bioquímica y que además es el papá de nuestros pequeños Antonia y Simón. Agradezco a estos pequeñitos seres que desde su inocencia y ternura nos enseñan la incondicionalidad del amor y a ser mejores personas; sin duda son el mejor motor para superar con optimismo cualquier obstáculo que se presente y la mejor motivación para plantearnos nuevos desafíos. Mis agradecimientos también van para mi mamá Laura, por estar siempre ahí cuando lo he necesitado y por ser un ejemplo a seguir, para mi papá Hernán por ser mi ángel y estar siempre presente desde mi corazón y para mi hermano Álvaro y mi cuñada Jenny por su apoyo y amor. También para mi suegra Soledad porque su cariño y cuidados a nuestros hijos permitieron que yo pudiera seguir trabajando y lograr mis objetivos.

Estoy muy agradecida también por mi tutor de tesis, el Dr. Juan Carlos Sáez, por haber confiado en mi trabajo y por todas las conversaciones y discusiones de resultados que tuvimos, porque me han dado la oportunidad de crecer y confiar más en mi desempeño. En su laboratorio conocí a gente hermosa a la cual agradezco cada segundo vivido, especialmente a Paola, Teresita, Rosalba, Elsa, Aníbal, Bruno, Fujiko, Elisa, Carlitos y Juan. Son un tremendo apoyo profesional, técnico y emocional. Gracias por seguir ahí.

Muchas gracias a mi comisión de seguimiento, integrada por los profesores Dr. Ricardo Moreno, Dr. Agustín Martínez, Dra. María Isabel Yussef y Dra. Mirentxu Iruretagoyena, por sus correcciones y contribuciones que permitieron que mi tesis alcanzara del nivel esperado para una tesis doctoral. Finalmente, quiero agradecer por el financiamiento de esta tesis: el proyecto FONDECYT N° 1150291, el proyecto de la Iniciativa Científica Milenio (ICM)-ECONOMIA P09-022-F y la Beca de Doctorado Nacional CONICYT Folio 21140955.

INDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE MATERIAS	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	3
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	10
Canales formados por panexina 1	10
Activación de canales formados por Panx1	11
Modificaciones postraduccionales en Panx1	17
Canales iónicos sensibles a estrés mecánico	19
Hipótesis	24
Objetivo General	24
Objetivos específicos	24
MATERIALES	25
Reactivos	25
Líneas celulares	25
Plásmidos	26
MÉTODOS	27
Evaluación de la actividad de los canales formados por panexina 1 (Panx1 Chs).	27
Señal de Ca ²⁺ intracelular	28
Transfecciones	28
Morfolino contra Piezo 1	29

Microscopía confocal	29
Búsqueda bioinformática de potenciales sitios de fosforilación en Panx1 por Ca PKA	MKII y 30
Mutaciones puntuales	30
RT-PCR del receptor Piezo 1 y receptores de adenosina	34
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
El aumento en la actividad de los Panx1 Chs inducido por estrés mecánico en co Panx1 es dependiente de la activación de canales iónicos sensibles a estrés meca ingreso del ion calcio extracelular.	élulas HeLa ánico y del 36
La activación de Panx1 Chs inducida por EM en células HeLa Panx1 es depend actividad de CaMKII.	liente de la 43
La serina 394 participa en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM	46
Inhibición de Panx1 Chs por análogos de cAMP y adenosina	56
La inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP depende de la actividad PKA	l de la cinasa 60
La fosforilación en la treonina 302 o en la serina 328 es necesaria para la inhibi Panx1 Chs inducida por Db-cAMP	ción de los 62
DISCUSIÓN	68
Aumento de la actividad de Panx1 Chs por estrés mecánico	68
La adenosina disminuye la actividad de los Panx1 Chs	79
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aumento en la actividad de Panx1 Chs inducido por EM en células HeLa Panx1.	37
Figura 2: El aumento en la actividad de Panx1 Chs por EM es dependiente de la actividad d MSCs y la presencia de Ca ²⁺ extracelular.	le 39
Figura 3: La activación del canal Piezo 1 aumenta la actividad de los Panx1 Chs.	42
Figura 4: La activación de los Panx1 Chs inducida por estrés mecánico en células HeLa Panx1 depende del complejo Ca ²⁺ - calmodulina y de la actividad de la cinasa CaMKII.	45
Figura 5: Localización de potenciales sitios de fosforilación en rPanx1 por CaMKII y PKA.	.47
Figura 6: La serina 394 participa en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM.	50
 Figura 7: Distribución de la Panx1 silvestre y de la mutante S394D fusionadas a EGFP lueg de 12 h de transfección con y sin pretratamiento de 12 h con 100 μM suramina. 53- 	30 -53
Figura 8: La fosforilación de la serina 394 de Panx1 aumenta la actividad de los Panx1 Chs en forma basal	55
Figura 9: Ado reduce la actividad de los Panx1 Chs.	58
Figura 10: Un aumento de la concentración intracelular de cAMP reduce la actividad de los Panx1 Chs.	59
Figura 11: La inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP es dependiente de la actividad de la cinasa PKA.	61
Figura 12: La fosforilación en la treonina 302 o en la serina 328 es necesaria para la inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP.	65
Figura 13: Regulación de la actividad de Panx1 Chs en células HeLa Panx1 por estimulació mecánica y adenosina.	ón 87

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Potenciales sitios de fosforilación en rPanx1 por CaMKII y PKA ¡Error! Marcador no definido.
Tabla N° 2: Diseño de partidores para realizar mutaciones sitio dirigidas de residuos de amino ácidos de rPanx1.
Tabla N° 3: Secuenciación de mutantes de potenciales sitios fosforilables por CaMKII en rPanx1 a alanina y aspartato.
Tabla N° 4: Secuenciación de mutantes de potenciales sitios fosforilables por PKA en rPanx1 a alanina o aspartato.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-CPT-cAMP: 8-(4-clorofeniltio) adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

Ado: Adenosina

BIM I: Bisindolilmaleimida I

Ca²⁺: Ion calcio

CsA: ciclosporina A

CBX: Carbenoxolona

DAPI: 4 ',6-diamino-2-fenilindol

Db-cAMP: N⁶,2'-O-dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

HeLa-P: Células HeLa parentales

HeLa Panx1: Células HeLa transfectadas con el cDNA de panexina 1

La³⁺: Ion lantano

Mg²⁺: Ion magnesio

MSCs: Canales iónicos sensibles a estrés mecánico

P2X₇R: Receptor P2X₇

Panx1: Panexina 1

Panx1 Chs: Canales formados por panexina 1

Panxs: Panexinas

SFKs: Cinasas de la familia Src

RESUMEN

Los canales formados por panexina 1 permiten el paso de iones monovalentes, metabolitos y pequeñas moléculas de señalización entre los compartimentos intra y extracelulares. La actividad de estos canales se puede modular mediante modificaciones postraduccionales, tales como N-glicosilación y S-nitrosilación, como también por fosforilación en las tirosinas 198 y 308 y en la serina 206. Sin embargo, se desconoce si son afectados por otros cambios en su estado de fosforilación. En general, se cree que los canales formados por panexina 1 se abren en respuesta al estrés mecánico, sin embargo el mecanismo subyacente no ha sido identificado. En esta tesis se plantea que en este proceso de activación de los canales formados por panexina 1 participan canales mecanosensibles permeables al Ca^{2+} , seguido de la activación de una vía de señalización de proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} , la que al fosforilar el canal aumenta su actividad funcional.

Se evaluó la actividad de los canales formados por panexina 1 a través de ensayos de captación de DAPI, un colorante al cual estos canales son permeables, en células HeLa transfectadas con el cDNA de panexina 1 de rata y células HeLa sin transfectar, como control negativo. Para inducir la activación de los canales formados por panexina 1, se sometió las células a estrés mecánico realizado mediante el goteo de 6 ml de solución de registro a una distancia de 10 cm. La captación de DAPI inducida por el estrés mecánico se detectó sólo en las células HeLa transfectadas con el cDNA de panexina 1.

La activación de los canales formados por panexina 1 requirió de la presencia de Ca^{2+} y no de Mg^{2+} en el medio extracelular y fue prevenida por La^{3+} , un bloqueador de canales

permeables a Ca²⁺ incluidos los canales mecanosensibles. La activación del canal mecanosensible Piezo 1 con su agonista Yoda 1 aumentó la captación de colorante de células HeLa Panx1 y este efecto fue bloqueado por 10 μ M CBX, indicando que dicho aumento en la captación de colorante es mediado por los canales formados por panexina 1. Por otro lado, la activación de los canales formados por panexina 1 mediante estimulación mecánica fue prevenida parcialmente con el uso de un morfolino contra Piezo 1. Estos dos resultados dan cuenta de que tanto la estimulación farmacológica como mecánica de Piezo 1 activa a los canales formados por panexina 1. La activación de los canales formados por panexina 1 requirió de la formación del complejo Ca²⁺ - calmodulina seguido de la activación de la cinasa CaMKII, ya que el antagonista de calmodulina W-7 y el inhibidor de CaMKII KN62 previnieron la activación de los canales. La mutación de panexina 1 en la serina 394 a alanina, un sitio potencial de fosforilación por CaMKII localizado en el extremo carboxilo terminal previno la activación de los canales formados por panexina 1, lo que indica que este residuo aminoacídico participa en la activación de los canales formados por panexina 1 inducida por estrés mecánico y sugiere fuertemente que CaMKII fosforila a panexina 1, produciendo un cambio conformacional del canal causando su activación. Por el contrario y en línea con lo anterior, la mutación fosfomimética de la serina 394 por aspartato (S394D) generó un canal hiperactivo que en forma basal favoreció su internalización, la que fue parcialmente prevenida por suramina (un bloqueador de receptores P2, que participan en la internalización del canal formado por panexina 1 inducida por una alta concentración de ATP extracelular, favoreciendo la detección del canal hiperactivo en la superficie celular.

Por otro lado, el tratamiento agudo con adenosina o con análogos de AMP cíclico que cruzan la membrana plasmática inhibió la actividad de los canales formados por panexina 1

previamente activados por estrés mecánico. Usando inhibición farmacológica selectiva, se encontró que el efecto del análogo de AMP cíclico Db-cAMP dependía de PKA pero no de PKC, p38 MAPK, Akt o PKG, ya que fue prevenida por PKI, un inhibidor de PKA y no así por bisindolilmaleimida, SB302580, AKTi y KT5823, inhibidores respectivos de las cinasas PKC, p38 MAPK, Akt y PKG. Por lo tanto, se propuso que PKA podría fosforilar a panexina 1 y así reduciría la actividad de los canales formados por ésta. La mutación de panexina 1 en la treonina 302 o en la serina 328 a alanina, dos sitios potenciales de fosforilación por PKA localizados en el extremo carboxilo terminal, previno la inhibición de la actividad de los canales formados por panexina 1 inducida por Db-cAMP. Es más, la mutación fosfomimética de estos residuos aminoacídicos a aspartato favoreció un estado cerrado de los canales formados por panexina 1, haciéndolos insensibles al estrés mecánico y siendo esto consistente con la noción que propone que PKA fosforila a panexina 1 y de esta manera inhibe a los canales formados por panexina 1.

En base a los resultados de esta tesis, se propone que los canales formados por panexina 1 no son directamente sensibles al estrés mecánico y requieren de un flujo de Ca^{2+} a través de canales mecanosensibles como Piezo 1. Este flujo permite un aumento citoplasmático de la concentración de Ca^{2+} libre que se uniría a calmodulina y el complejo Ca^{2+} - calmodulina activaría a CaMKII para posteriormente activar a los canales formados por panexina 1 probablemente por fosforilación en la serina 394. Además, se propone que un aumento de AMP cíclico induce la fosforilación de panexina 1 en la treonina 302 y/o serina 328 dependiente de PKA, lo cual inhibe la actividad de los canales formados por panexina 1. Esto sugiere que la comunicación paracrina a través de canales formados por panexina 1 podría ser modulada por distintos receptores acoplados a proteína G, asociados a la subunidad

ABSTRACT

Pannexin 1 channels allow the passage of monovalent ions, metabolites and small signaling molecules between the intra and extracellular compartments. The activity of these channels can be modulated by post-translational modifications such as N-glycosylation and S-nitrosylation as well as phosphorylation in tyrosines 198 and 308 and in serine 206. However, it is unknown whether they can be affected by phosphorylation of other amino acid residues. It is believed that pannexin 1 channels activate in response to mechanical stress; however the underlying mechanism remains unclear. Here, it is proposed that mechanosensitive ion channels permeable to Ca^{2+} allow Ca^{2+} influx leading to activation of a Ca^{2+} - dependent protein kinase signaling pathway that phosphorylates the channels favoring their activity.

Pannexin 1 channel activity was evaluated through dye uptake assays using DAPI, which pass through pannexin 1 channels, in HeLa cells transfected with rat pannexin 1 cDNA and untransfected HeLa cells, as a control. To induce pannexin 1 channel activation, cells were subjected to mechanical stress performed by a 6 ml dripping of recording solution at a distance of 10 cm. DAPI uptake induced by mechanical stress was detected only in HeLa cells transfected with pannexin 1 cDNA.

Pannexin 1 channel activation required the presence of extracellular Ca^{2+} and not Mg^{2+} and was prevented by La^{3+} , a Ca^{2+} channel blocker including mechanosensitive ion channels. Activation of the mechanosensitive ion channel Piezo 1 using Yoda 1 induced pannexin 1 channel activation, which was blocked by 10 μ M carbenoxolone. Additionally, mechanical activation of pannexin 1 channels was partially prevented by the use of a morpholino against Piezo 1, indicating that pharmacological and mechanical activation of Piezo 1 leads to pannexin 1 channel activation. Pannexin 1 channel activation required the formation of Ca²⁺ - calmodulin complex and the activation of CaMKII, since the calmodulin antagonist W-7 and the CaMKII inhibitor KN62 prevented the activation of the channels. The mutation of pannexin 1 in serine 394 to alanine, a potential site of phosphorylation by CaMKII located at the carboxyl terminus, prevented pannexin 1 channel activation. Thus, it was concluded that this amino acid residue participates in pannexin 1 channel activation induced by mechanical stress and allows us to speculate that CaMKII phosphorylates it and thus induces this effect. In contrast, phosphomimetic mutation of the serine 394 to aspartate (S394D) generated a hyperactive channel that under basal conditions favored its internalization that was partially prevented by suramin (blocker of P2 receptors that participate in the internalization of pannexin 1 channels induced by a high extracelular ATP concentration, allowing the detection of the hyperactive channel in the cell membrane).

On the other hand, in pannexin 1 channels activated by mechanical stress, acute treatment with adenosine or cyclic AMP analogs that cross the plasma membrane inhibited their activity. Using selective pharmacological inhibition, it was found that this inhibition depended on PKA but not on PKC, p38 MAPK, Akt or PKG, since it was prevented only by treatment with PKA inhibitor PKI and not by bisindolylmaleimide, SB302580, AKTi and KT5823, respective inhibitors of the other kinases. These results suggest that PKA could phosphorylate pannexin 1 and thus inhibit the channels formed by it. Mutation of pannexin 1 in threonine 302 or in serine 328 to alanine, two potential sites of phosphorylation by PKA located at the carboxyl terminus prevented the inhibition of pannexin 1 channels induced by a cyclic AMP analogue. Moreover, the phosphorimetic mutation of these amino acid residues

to aspartate inhibited pannexin 1 channels and, therefore, strongly suggests that PKA phosphorylates them and thus induces their inhibition.

Based on the above results, it is proposed that pannexin 1 channels are not directly sensitive to mechanical stress and require a flow of Ca^{2+} through mechanosensitive ion channels such as Piezo 1. The later allows a cytoplasmic increase in Ca^{2+} concentration and activation of CaMKII through the complex Ca^{2+} - calmodulin, to later activate pannexin 1 channels probably by phosphorylation in serine 394. In addition, it is proposed that adenosine or a cyclic AMP increase induce pannexin 1 phosphorylation in threonine 302 and/or serine 328 dependent on PKA, which inhibits pannexin 1 channel activity. This suggests that paracrine communication through pannexin 1 channels could be modulated by different G protein-coupled receptors associated to the α s subunit, for example, neurotransmitter receptors such as dopamine receptor D1 and β adrenergic receptors, and hormones, such as the glucagon receptor.

INTRODUCCIÓN

Canales formados por panexina 1

Las panexinas (Panxs) son glicoproteínas expresadas en vertebrados, que tienen homología de secuencia con las inexinas, que son proteínas que forman uniones en hendidura y hemicanales en invertebrados (Panchin et al., 2000; Baranova et al., 2004; Phelan, 2005). Hasta el momento se han reportado tres subtipos de Panxs (Panx1, Panx2 y Panx3), siendo la Panx1 la que se expresa de manera ubicua (Baranova et al., 2004). Recientemente se reportó que los canales formados por Panx1 (Panx1 Chs) están formados por siete monómeros de Panx1 (Michalski et al., 2020), no por seis como se pensaba y tienen una topología y sensibilidad farmacológica similar a los canales formados por las conexinas (Giaume et al., 2013). Éstos funcionan como canales no selectivos y además forman un poro de gran tamaño (hasta ~500 pS), que permite el traspaso de moléculas de hasta 1,5 kDa (Bao et al., 2004); por lo tanto, una apertura regulada es relevante para no comprometer la integridad de la célula. Se ha propuesto que las Panxs también son un tipo de proteína formadora de uniones en hendidura (Bruzzone et al., 2003) junto a conexinas e inexinas, ya que en sistemas de sobreexpresión en células HeLa se ha observado que forman este tipo de uniones (no así en células PC-12 o neuro 2A) (Sahu et al., 2014). Sin embargo, esta capacidad disminuye al aumentar su estado de glicosilación en residuos de asparagina, impidiendo que funcionen como canales intercelulares pero permitiendo que se ensamblen como canales de membrana individuales (Beckmann et al., 2016; Penuela et al., 2007; Sosinsky et al., 2011).

De manera general, la Panx1 participa en la señalización purinérgica a través de la liberación de ATP en distintos tipos celulares, incluyendo neuronas, astrocitos, células del paladar, células endoteliales, eritrocitos y células del sistema inmune (Bao et al., 2004; Dahl, 2015; Huang et al., 2007; Woehrle et al., 2010; Chandrasekhar y Bera, 2012). Las funciones de los Panx1 Chs dependen entonces de los distintos sistemas en los cuales están presentes. Además, se ha propuesto que participan en la activación del inflamasoma constituido por NLRP1 o NLRP3 en macrófagos, neuronas y astrocitos, dependiente del receptor $P2X_7$ (P2X₇R) (Bernier 2012; Pelegrin y Surprenant, 2006, Silverman et al., 2009), lo cual produce apoptosis (Cheung et al., 2016; Gulbransen et al., 2012; Locovei et al., 2007). Otras funciones de los Panx1 Chs son las de promover la activación de los linfocitos T CD4⁺ (Schenk *et al.*, 2008; Woehrle et al., 2010), participar en la activación del endotelio ante una infección para permitir la diapédesis de leucocitos (Lohman et al., 2015), acelerar la migración de células dendríticas (Sáez et al., 2017) y ante estímulos gustativos permitir que las células receptoras de las papilas gustativas secreten ATP, el cual funciona como una molécula señalizadora en el paladar (Huang et al., 2007).

Activación de canales formados por Panx1

Los Panx1 Chs pueden activarse en condiciones fisiológicas o patológicas, describiéndose dos estados de permeabilidad y conductancia dependiendo del tipo de estimulación (Wang *et al.*, 2014). El estado de baja permeabilidad, con conductancias unitarias de 14 a 80 pS, se caracteriza por ser altamente selectivo a iones cloruro e impermeable a cationes y ATP (Ma *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Por otro lado, el estado de máxima

conductancia de ~550 pS con múltiples estados de subconductancia se caracteriza por ser permeable a moléculas de un máximo de 1,5 kDa como cationes, ATP y a moléculas cargadas positivamente como YO-PRO-1 (Dahl, 2015; Wang & Dahl, 2018). Cabe destacar que la secreción de ATP por parte de una célula no sólo puede estar mediada por Panx1 Chs, sino también por vesículas, canales maxianión (Maroto y Hamill, 2001; Bal-Price *et al.*, 2002; Sabirov y Okada, 2005; Locovei *et al.*, 2006b; Reigada *et al.*, 2008; Seminario-Vidal *et al.*, 2011) o hemicanales formados por conexinas (Cotrina *et al.*, 1998).

Se han descrito varios fenómenos que pueden llevar a la activación de estos canales.

Depolarización: Experimentalmente, los Panx1 Chs pueden abrirse mediante la aplicación de comandos de voltaje depolarizantes. Estos canales permanecen cerrados a voltajes menores de -20 mV (Bao *et al.*, 2004) y su probabilidad de apertura aumenta a voltajes positivos, por lo tanto, no es una condición que pueda ocurrir fisiológicamente, excepto en células eléctricamente excitables durante el pico de un potencial de acción (Dahl, 2015). En estas condiciones, la conductancia del canal es baja (50 pS), siendo selectivo a iones cloruro (Wang y Dahl, 2018).

 K^+ extracelular: Silverman *et al.* (2009) describieron que al mantener ovocitos de *Xenopus laevis* en una solución extracelular que contiene 130 mM KCl a un voltaje al que normalmente están cerrados los Panx1 Chs (-50 mV) y aplicar pulsos depolarizantes de 10 mV, se observa un aumento en la corriente proporcional al aumento progresivo de voltaje, el cual es sensible a carbenoxolona (CBX). En estas condiciones, el canal tiene una conductancia alta de 550 pS, permitiendo el paso de moléculas de hasta 1,5 kDa y siendo permeable a ATP (Wang y Dahl, 2018). Esta corriente no se activa por depolarización producto de la

eliminación del gradiente de K⁺ transmembrana, sino que ocurre cuando las células están a un potencial en reposo y se ve favorecida por la depolarización: por lo tanto, se ha propuesto que posiblemente los iones K⁺ se unirían a algún sitio de la región extracelular de Panx1 o de alguna molécula auxiliar, causando un cambio conformacional que favorece la apertura de los canales (Silverman *et al.*, 2009).

Baja presión de oxígeno en eritrocitos y neuronas: Frente a una baja en la presión de oxígeno (isquemia), los eritrocitos liberan ATP a través de Panx1 Chs (Qiu *et al.*, 2011; Sridharan *et al.*, 2010). En el caso de las neuronas piramidales, durante los accidentes cerebrovasculares la baja presión de oxígeno y baja concentración de glucosa gatillan la activación de Panx1 Chs, los cuales permiten que haya una desregulación iónica que finalmente lleve a la necrosis del tejido en pocos minutos (Thompson *et al.*, 2006).

Corte del extremo C- terminal: En estadios tempranos de apoptosis se ha observado la activación irreversible de Panx1 Chs, interpretada como la consecuencia del corte proteolítico del extremo C- terminal mediado por las caspasas 3 y 7 (Chekeni *et al.*, 2010; Elliott *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2011). Panx1 contiene una región inmediatamente distal al sitio de corte de las caspasas que en condiciones basales interactúa con el poro del canal y lo mantiene cerrado (Sandilos *et al.*, 2012), de manera que el corte elimina esta interacción y abre los canales. Existen reportes que mencionan que la activación de los Panx1 Chs por proteólisis permite la liberación de nucleótidos como ATP y UTP (Elliott *et al.*, 2009); sin embargo, esto se observa frente a estímulos que superan las 4 a 8 h de incubación (Boyd-Tessler *et al.*, 2014; Chiu *et al.*, 2017). La conductancia unitaria de los canales cortados por caspasas es muy similar a los activados por depolarización (12 o 13 pS a potenciales negativos y ~75 pS a potenciales

positivos) (Chiu *et al.*, 2017) y además, son altamente permeables a Cl⁻ pero no a ATP (Wang y Dahl 2018), por tanto, este tipo de activación activa más bien un canal de baja conductibilidad.

Activación de receptores purinérgicos y aumento de Ca^{2+} intracelular: En diversas condiciones, aunque no en todas las descritas, la activación de los Panx1 Chs permite la salida de ATP, el cual activa a receptores purinérgicos P2X y P2Y. La activación de éstos a su vez activa a los Panx1 Chs en un mecanismo reverberante. En el caso de los receptores P2X, se ha descrito un acoplamiento de éstos y Panx1 Chs principalmente en contextos fisiológicos asociados a células del sistema inmune, como la activación del inflamasoma (Pelegrin y Surprenant, 2006), quimiotaxis en macrófagos (Elliott et al., 2009) y la activación de linfocitos T CD4⁺ (Schenk et al., 2008; Woerhle et al., 2010). Sin embargo, también se ha identificado en otros tipos celulares como en la glándula pituitaria (Li et al., 2011) y en la liberación de ATP en oligodendrocitos y células epiteliales sometidas a daño isquémico (Domercq et al., 2010; Riteau et al., 2010). El mecanismo mediante el cual los Panx1 Chs se activan tras una activación de los receptores P2X podría depender de las tirosina cinasas de la familia Src (SFKs), ya que en la línea celular de macrófagos J774 es prevenido por PP2, un bloqueador de dichas cinasas. Sin embargo, la falta de fosforilación de Panx1 en tirosina en respuesta a la estimulación del P2X₇R indican que habría otras moléculas adicionales mediando el proceso (Iglesias et al., 2008). Junto con esto, la activación de los Panx1 Chs tras una activación de receptores P2X se podría explicar por un aumento de Ca^{2+} intracelular, el cual puede ocurrir a través de estos receptores purinérgicos que son ionotrópicos y permeables a Ca²⁺ (Woerhle *et al.*, 2010). Además, el efecto del Ca²⁺ no sería por interacción directa con la Panx1, ya que ésta no cuenta con sitios de unión al Ca^{2+} (Riguelme *et al.*, 2013).

Pese a que se puede dar este mecanismo reverberante de activación de los Panx1 Chs, en el cual la activación de éstos lleva a la salida de ATP, posterior activación de receptores P2X y subsecuentemente, la activación de otros Panx1 Chs, un exceso de ATP extracelular inhibe a los Panx1 Chs, generando un mecanismo de retroalimentación negativo (Qiu y Dahl, 2009; Iwabuchi y Kawahara, 2011). Asimismo, una estimulación prolongada (15 min) por alta concentración de ATP induce internalización del canal (*down regulation*) (Boyce *et al.*, 2015).

En el caso de los receptores metabotrópicos P2Y, los Panx1 Chs se pueden activar a través de los receptores P2Y1 y P2Y2, lo cual involucra el aumento de Ca²⁺ intracelular a través de la señalización por fosfolipasa C e IP3 (Locovei *et al.*, 2006a). Tal como el caso de los receptores P2Y1 y P2Y2, también se ha estudiado la activación de los Panx1 Chs inducida por otros receptores acoplados a proteína G (GPCRs) asociados a la subunidad αq . En el contexto de la vasoconstricción de arterias de resistencia inducida por epinefrina, la activación del receptor $\alpha 1$ induce la activación de Panx1 Chs, los cuales permiten la salida de ATP y la vasoconstricción dependiente de este último. La activación de Panx1 Chs por el receptor $\alpha 1$ se explicaría por la interacción funcional directa entre ambos, ya que coinmunoprecipitan desde tejidos de arterias de resistencia (Billaud *et al.*, 2011). En células endoteliales de vena umbilical humana, la activación del receptor PAR-1 (otro GPCR asociado a la subunidad αq) con trombina también induce la secreción de ATP a través de Panx1 Chs (Gödecke *et al.*, 2012). Es posible que ambos receptores compartan un mecanismo que les permita modular la actividad de los Panx1 Chs.

Estrés mecánico: Uno de los estímulos que se ha descrito puede llevar a la activación de los Panx1 Chs es el estrés mecánico (EM). Existen distintos fenómenos fisiológicos en los

cuales las células epiteliales y eritrocitos pueden estar sometidos a EM, como por ejemplo el *shear stress*, hipotonicidad y fuerzas mecánicas durante la respiración y tos.

En retinas de vacuno puestas en una cámara de presión, el aumento en la presión hidrostática produjo un aumento en la liberación de ATP, el cual es inhibido por 10 µM CBX, un bloqueador de los Panx1 Chs (Reigada et al., 2008). En la misma línea Bao et al. (2004) describieron a los Panx1 Chs como canales mecanosensibles. En experimentos de *patch clamp* en configuración *cell attached* y parches de membrana escindidos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el mRNA de Panx1, observaron que al aplicar una rampa de voltaje desde -50 a +50 mV y además al generar un EM a través de una succión aplicada a la pipeta (presión negativa de ~40 mbar), aumenta la probabilidad de apertura de los Panx1 Chs respecto a la condición en ausencia de la presión negativa. El mismo grupo obtuvo resultados similares en parches de membranas escindidos de eritrocitros (Locovei et al., 2006b). Esto podría dar cuenta de una propiedad mecanosensible intrínseca de Panx1. Sin embargo, un mecanismo distinto podría estar presente en el caso de células de epitelio de vías aéreas de ratón, donde la secreción de ATP mediada por Panx1 Chs inducida por un estímulo hipotónico requiere de la activación de TRPV4 (canal permeable a Ca2+), RhoA y la fosforilación de la cadena liviana de la miosina dependiente de Rho cinasa (Seminario-Vidal et al., 2011). Reyes et al. (2009) también sostienen que los Panx1 Chs no son intrínsecamente mecanosensibles, ya que en células HEK 293T transfectadas con el cDNA de Panx1 expuestas a un medio hipotónico, no detectaron captación de etidio (lo cual constituye una forma de estudiar la activación de los Panx1 Chs).

Modificaciones postraduccionales en Panx1

Los fenómenos nombrados en el punto anterior pueden llevar a la modulación de los Panx1 Chs mediante modificaciones postraduccionales. La actividad de estos canales se modula por:

N-glicosilación: La N-glicosilación es la adición de oligosacáridos a proteínas en residuos de asparagina. Panx1 puede estar sin glicosilar (Gly0) o glicosilada en el residuo N254, ubicado en la segunda asa extracelular, donde puede tener unida una alta manosa (Gly1) o una especie compleja (Gly2) (Penuela et al., 2014). Los distintos patrones de N-glicosilación regulan la localización y función de Panx1. Al tener glicosilaciones de los tipos Gly0 y Gly1, Panx1 se localiza de forma intracelular, mientras que con la glicosilación Gly2, se localiza preferencialmente en la membrana plasmática. Cuando tiene glicosilaciones de tipo Gly0 y Gly1 puede interactuar con Panx2 y 3, mientras que esto no se observa con la glicosilación Gly2 (Penuela et al., 2009). Se ha propuesto que esta última glicosilación confiere un impedimento estérico para que dos Panx1 Chs de células adyacentes puedan formar una estructura de tipo unión en hendidura (Boassa et al., 2007). Pese a que la Panx1 no glicosilada (Gly0) suele localizarse de forma intracelular, no se puede descartar que forme canales de uniones en hendidura en la membrana plasmática, ya que la glicosilación de una proteína es una modificación postraduccional que puede ser heterogénea dentro de una misma célula, encontrándose no glicosilada o glicosilada en diferente grado en diferentes compartimentos de la misma célula (van Kooyk y Rabinovich, 2008).

S-nitrosilación: La S-nitrosilación es la adición de grupos nitrosilo en residuos de cisteína. El grupo de Brant Isakson (Lohman *et al.*, 2012) describió que en células HEK 293T

que expresan Panx1 y células endoteliales de aorta de ratón, el tratamiento con donadores de óxido nítrico (como GSNO) atenúa las corrientes de los Panx1 Chs, lo cual está asociado a la S-nitrosilación de los residuos C40 y C346; por tanto, la nitrosilación en estas cisteínas inhibe la actividad de los Panx1 Chs.

Fosforilación: Recientemente se ha descubierto que Panx1 es una fosfoproteína (Riquelme *et al.*, 2013) y que este tipo de modificación postraduccional puede modular la actividad de los Panx1 Chs. Lohman *et al.* (2015) describieron que la Panx1 juega un rol fundamental en la inflamación vascular aguda, donde la activación del endotelio es necesaria para que ocurra la diapédesis de leucocitos a través de la pared endotelial postcapilar. En este proceso, ocurre la liberación de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el cual activa a receptores de TNF- α de tipo 1 en células endoteliales, llevando al reclutamiento de SFKs, las cuales median la fosforilación de Panx1 en la tirosina 198 y aumentan la actividad de los canales formados por ésta. Posteriormente, se libera ATP a través de los Panx1 Chs, llevando a la activación de receptores P2Y y a la expresión de moléculas de adhesión como VCAM1, lo cual permite la adhesión de leucocitos a la barrera endotelial y su posterior emigración a los tejidos inflamados.

Existe otro caso descrito en que la fosforilación de una tirosina en Panx1 mediada por SFKs induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs. Los Panx1 Chs pueden ser activados por anoxia o por la activación de receptores de NMDA. Weilinger *et al.* (2012), en base a experimentos de electrofisiología en configuración de célula completa en neuronas piramidales CA1 descubrieron que en ambos casos (anoxia o la aplicación exógena de NMDA) se activan las SFKs. El uso PP2, un inhibidor de las SFKs, previene tanto la activación de éstas como la apertura de los Panx1 Chs durante la anoxia. Mediante el uso de un péptido interferente contra el sitio de fosforilación consenso para las SFKs en Panx1, la tirosina 308, se previene la depolarización inducida por anoxia, pero no se afecta la activación de las SFKs. Por lo tanto, la activación de los receptores de NMDA durante la anoxia recluta a las SFKs, las cuales permiten la apertura de los Panx1 Chs a través de la fosforilación de la tirosina 308, haciendo que haya depolarizaciones neuronales sostenidas.

Sin embargo, la fosforilación de residuos de aminoácidos de Panx1 no sólo podría explicar un aumento en la actividad de los canales formados por ésta, sino que también una disminución en la misma. Tal es el caso descrito por Poornima *et al.* (2015), quienes describieron que las corrientes asociadas a Panx1 Chs en células HEK 293T transfectadas con el cDNA de Panx1, son atenuadas por óxido nítrico, lo cual se explica por la activación de guanilato ciclasa y posteriormente de la cinasa dependiente de cGMP (PKG), quien media la fosforilación de la serina 206 y de esta manera inhibe la actividad de los Panx1 Chs.

Canales iónicos sensibles a estrés mecánico

Como se mencionó anteriormente, los Panx1 Chs se pueden activar de manera indirecta cuando son sometidos a EM (Reyes *et al.*, 2009). La activación indirecta de éstos podría requerir de la activación de canales iónicos sensibles a EM (MSCs), los cuales se activan por tensión directa de la bicapa lipídica (Sachs, 2010), por tensión ocasionada por componentes de la matrix extracelular o del citoesqueleto adyacentes al canal iónico o por un mecanismo indirecto que involucre la activación de un primer mecanorreceptor, el cual permita el aumento de un segundo mensajero que finalmente medie la apertura del canal iónico (Patel *et al.*, 2010).

Los MSCs actúan como sensores de fuerzas que afectan a la membrana plasmática y además como efectores que responden cambiando su forma entre estados cerrado y abierto y mediando las corrientes iónicas. Estas corrientes permiten aliviar la presión osmótica y prevenir la lisis celular como resultado de la acumulación de metabolitos o de cambios en la osmolaridad extracelular, cambiar el potencial de membrana o iniciar la señalización química (Sukharev y Sachs, 2012). Con este principio, existen mecanismos que permiten escuchar, sentir con el tacto y regular variables sistémicas como la presión arterial.

Los MSCs son muy variados en los organismos vertebrados. Dentro de éstos se encuentran algunos miembros de la superfamilia de los canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRPs,) como los receptores TRPV4, TRPC1 y TRPC6. TRPC1 es un canal de Ca^{2+} operado por depósito (SOCs, por sus siglas en inglés), el cual permite la entrada de Ca^{2+} una vez que se han agotado las reservas intracelulares y está implicado en la mecanotransducción del músculo esquelético, mientras que TRPC6 es un canal no selectivo permeable a Ca^{2+} que actúa en la regulación del tono miogénico (Patel *et al.*, 2010). TRPC6 se activa indirectamente por EM y requiere de la presencia de un GPCR asociado a la subunidad $\alpha_{q'11}$, como el receptor de angiotensina II, AT1. La activación del receptor TRPC6 ocurre en ausencia del agonista del GPCR y por activación de la cascada $G_{q'11}$ /fosfolipasa C/diacilglicerol/TRPC6 (Patel *et al.*, 2010). El receptor TRPV4 se expresa en el hígado, corazón, pulmones, tráquea, testículos, bazo, glándulas salivales, cóclea y células endoteliales (Yin y Kuebler, 2010). En estas últimas, cuando son sometidas a *shear- stress* induce la entrada de Ca²⁺, produciendo vasodilatación mediada por óxido nítrico. Dentro de los MSCs también están los canales TRAAK y TREK1, que corresponden a canales de potasio que se expresan en neuronas de mamíferos (Patel *et al.*, 1998; Maingret *et al.*, 1999).

Otro tipo importante de MSCs descubiertos recientemente por el grupo de Ardem Patapoutian son los canales Piezo (Coste *et al.*, 2010). En los vertebrados existen dos miembros, Piezo 1 y Piezo 2. El canal Piezo 1 se expresa en tejidos sensoriales y especialmente en tejidos no sensoriales expuestos a la presión de fluido y flujo (por ejemplo, en riñones, vejiga, glóbulos rojos, células endoteliales, condrocitos, colon, pulmones y piel) (Coste *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2017), mientras que Piezo 2 se encuentra altamente expresado en tejidos sensoriales que responden al tacto (por ejemplo, neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal y ganglio trigémino y en las células de Merkel), aunque también se ha observado en la vejiga, colon y pulmones (Coste *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016).

Las subunidades de Piezo 1 forman un tetrámero (Coste *et al.*, 2012) y el canal resultante es permeable a Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, teniendo mayor permeabilidad a Ca²⁺. Este canal puede ser inhibido por rojo rutenio y gadolinio, bloqueadores de MSCs permeables a cationes (Hamil y Martinac, 2001; Drew *et al.*, 2002; Coste *et al.*, 2010) y se activa específicamente con el péptido Yoda 1 (Syeda *et al.*, 2015), indicando que este canal puede ser activado farmacológicamente en ausencia de EM.

Dado que los MSCs como Piezo 1 son permeables a Ca^{2+} , su activación lleva a un aumento en la concentración citoplasmática de este ión y a la activación de rutas de señalización mediadas por este segundo mensajero (Miyamoto *et al.*, 2014). Una de las rutas más descritas es la unión de cuatro átomos de Ca^{2+} a una molécula de calmodulina, la cual puede activar a una serie de enzimas, dentro de las que se encuentran los miembros de la familia de las Ser/Thr cinasas dependientes de calmodulina (CaM- cinasas), las cuales pueden fosforilar distintos blancos celulares y mediar diversas respuestas (Swulius y Waxham, 2008).

A nuestro saber existen cuatro evidencias que hablan de que los Panx1 Chs pueden activarse río debajo de la activación de Piezo 1 en células sometidas a EM, lo que permite la liberación de ATP y activación de receptores P2. La primera viene del grupo de Makoto Tominaga y habla de que el tejido de recubrimiento de la vejiga, llamado urotelio sensa la extensión de la vejiga a través de la activación de canales Piezo 1 y responde secretando neurotransmisores, incluido el ATP. Este nucleótido actúa sobre receptores P2X de nervios aferentes para transmitir la señal de llenado de la vejiga. En este trabajo no indagaron en el mecanismo de liberación de ATP (Miyamoto et al., 2014). La segunda evidencia es del grupo de Stefan Offermanns, quienes describieron que en los vasos sanguíneos el distrés mecánico producido por el flujo sanguíneo produce vasodilatación mediada por óxido nítrico. En este proceso se activa el canal Piezo 1, el cual induce la liberación de ATP en parte a través de los Panx1 Chs. Posteriormente, el ATP activa a receptores P2Y2, lo cual lleva a la activación de una ruta de señalización que induce la fosforilación y activación de Akt y de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial, la cual produce el vasodilatador óxido nítrico. En este trabajo comprobaron que la liberación de ATP ocurre a través de Panx1 Chs, ya que utilizando un siRNA contra las panexinas 1 y 2 (ambas son expresadas en las células HUVEC utilizadas como modelo) redujeron significativamente la liberación de ATP en células sometidas al distrés mecánico de flujo (Wang et al., 2016). Como tercera evidencia, el canal Piezo 1 cumple un importante rol en la mantención del volumen celular de eritrocitos. Cuando estas células son sometidas a distrés mecánico por flujo o estrés osmótico, ocurre un ingreso de Ca²⁺

a través de canales Piezo 1, lo cual induce la liberación de ATP a través de Panx1 Chs. Subsecuentemente se activan distintos receptores P2 que estimulan variadas rutas de señalización, permitiendo regular el volumen celular (Wei *et al.*, 2019). La última evidencia ocurre en células madre mesenquimales, las cuales ante un estímulo de EM se activa Piezo 1, lo cual estimula la liberación de ATP como una señal autocrina que activa receptores P2 e induce la proliferación, migración y diferenciación de estas células. La liberación de ATP en este proceso ocurre probablemente a través de Panx1 Chs, ya que en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea sometidas a estrés de flujo ocurre la liberación de ATP a través de Panx1 Chs y posteriormente la activación de receptores P2Y, lo cual induce la proliferación de estas células (Wei *et al.*, 2019).

En base a estos antecedentes que sugieren que la activación de los Panx1 Chs por EM ocurre probablemente de manera indirecta, la primera parte de esta tesis busca determinar si este proceso involucra la participación de MSCs como Piezo 1 y si esto activa alguna ruta de señalización que produzca cambios en el estado de fosforilación de Panx1, como las mediadas por CaM- cinasas.

Por otro lado, experimentos preliminares de esta tesis realizados en células HeLa transfectadas con el cDNA de Panx1 de rata (HeLa Panx1) sugerían que los Panx1 Chs son modulados negativamente por adenosina (Ado), en un mecanismo que podría involucrar el aumento de cAMP y por tanto, la activación de PKA (Sassone-Corsi, 2012). Es por esto que la segunda parte de la tesis consiste en corroborar lo anterior y estudiar si el mecanismo detrás de este fenómeno involucra cambios en el estado de fosforilación de Panx1.

Hipótesis

La activación de los Panx1 Chs inducida por estrés mecánico depende de la activación de canales iónicos sensibles a estrés mecánico y se previene por la activación de PKA, en células HeLa Panx1.

Objetivo General

Dilucidar el mecanismo de compuerta o *gating* de los Panx1 Chs en respuesta a estrés mecánico y de inhibición inducida por adenosina en células HeLa Panx1.

Objetivos específicos

- Evaluar si la actividad de Panx1 Chs de células HeLa Panx1 es afectada por bloqueadores de la señalización de canales iónicos sensibles a estrés mecánico (MSCs).
- Evaluar si activadores de PKA modulan la actividad de Panx1 Chs en células HeLa Panx1.
- Determinar si la compuerta (*gating*) de los Panx1 Chs es dependiente de la actividad de proteínas cinasas.
- Determinar posibles sitios de fosforilación en Panx1 y su relación con el gating de los Panx1 Chs.

MATERIALES

Reactivos

Los siguientes reactivos: carbenoxolona (CBX), lantano (III) cloruro (La³⁺), KN62, ciclosporina A (CsA), PP2, adenosina (Ado), 8- CPT-cAMP, Db-cAMP, PKI, SB203580, AKTi son de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA); DAPI y FURA–2 AM son de Invitrogen, los medios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) y RPMI 1640 son de Gibco y el reactivo Turbo Fect es de Thermo Scientific, siendo las tres marcas de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA); Yoda 1 es de Tocris (Bristol, Reino Unido); bisindolilmaleimida (BIM I) es de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA) y W-7 es una gentil donación del Dr. Agustín Martínez de la Universidad de Valparaíso.

Líneas celulares

Las células HeLa parentales (HeLa – P) son una donación del Dr. Agustín Martínez de la Universidad de Valparaíso, mientras que las células HeLa transfectadas con el cDNA de Panx1 (HeLa Panx1) son donadas por el Dr. Felixas Bukaukas (Departamento de Neurociencia, *Albert Einstein College of Medicine*, Bronx, NY). Ambos tipos celulares se cultivan en medio DMEM. Las células Jurkat son una donación del Dr. Mauricio Henríquez de la Universidad de Chile y se cultivan en medio RPMI 1640. Todos los tipos celulares se cultivan en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina y se mantienen a pH 7.4, a 37°C en una incubadora con una atmósfera de 5% CO₂/95% aire. Para mantener estable la transfección de las células HeLa Panx1, éstas se cultivan con 1 mg/ml G418 (Invitrogen, MA, EUA).

Plásmidos

En plásmido pRK5 rPanx1 EGFP es una gentil donación del Dr. Agustín Martínez de la Universidad de Valparaíso. El plásmido pRK5 vacío es generado para esta tesis digiriendo el plásmido pRK5 rPanx1 EGFP con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), para la cual existe un sitio de corte en el sitio de multiclonamiento río arriba del inserto de rPanx1 y hacia el final del inserto mismo, lo cual permite que una vez que el plásmido sea ligado, no cambie el marco de lectura para EGFP y se pueda detectar las células transfectadas con el plásmido pRK5 vacío por su fluorescencia verde. Los plásmidos que contienen las distintas mutaciones de Panx1 son generados para esta tesis según lo expuesto en la sección métodos. El plásmido pEGFP C1 es donado gentilmente por el Dr. José Luis Vega y el tesista de doctorado de la Universidad de Antofagasta – CINV Juan Güiza.

MÉTODOS

Evaluación de la actividad de los canales formados por panexina 1 (Panx1 Chs).

Para evaluar la actividad de los Panx1 Chs, se siembran células HeLa Panx1 en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro con un 25% de confluencia. Veinticuatro horas más tarde, se realizan ensayos de captación de trazadores de permeabilidad. Para esto, se traspasan los cubreobjetos a una cámara de registro, se lavan con solución Krebs (en mM: 118 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 KH₂PO₄: 1,2 MgSO₄; 4,2 NaHCO₃; 2 CaCl₂; 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4) y se agrega una concentración final de 5 µM DAPI en solución Krebs. Se seleccionan las regiones de interés, correspondientes a los núcleos celulares y se mide la intensidad de fluorescencia en el tiempo. Las imágenes se capturan cada 30 s, utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Eclipse Ti, marca Nikon y el software de control NIS Elements (Nikon, Japón). Posteriormente, se analiza la intensidad de fluorescencia en el mismo software. Se realizan registros de 5 min por cada condición y se comparan las tasas de captación de cada periodo o condición, correspondiente a la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) dividido por el tiempo en minutos (UA/min). En las figuras se grafica la tasa de captación en cada condición normalizada por la tasa de captación basal, de manera que se muestran las veces de cambio en la pendiente de captación respecto a la basal.

Señal de Ca²⁺ intracelular

Para medir la señal de Ca²⁺ intracelular se siembran células HeLa Panx1 en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro a una confluencia de 25%. Veinticuatro horas más tarde, se lavan dos veces los cubreobjetos con medio DMEM y las células se cargan con 5 μ M FURA–2AM (Invitrogen, MA, EUA) por 30 min a 37°C en medio DMEM. Posteriormente, los cubreobjetos son lavados cuatro veces con medio DMEM, incubados 5 min a 37° y a continuación, lavados cuatro veces con PBS. Posteriormente, las células son expuestas a medio Krebs y se mide la intensidad de fluorescencia a 340 y 380 nm cada 3 s, utilizando un microscopio Eclipse Ti, marca Nikon y el *software* de control NIS Elements (Nikon, Japón). La cuantificación de la razón F_{340}/F_{380} se realiza con el mismo software y se analiza el área bajo la curva utilizando el programa Excel de Microsoft Office 2010.

Transfecciones

Para todas las transfecciones se utiliza Turbo Fect, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. En 400 μ l de DMEM se resuspenden 4 μ g de cada plásmido o el volumen necesario para tener 250 o 500 nM de morfolino, según sea el caso, y se agrega 6 μ l de reactivo TurboFect, previamente resuspendido como lo indica el proveedor. La mezcla se incuba por 20 min a temperatura ambiente y posteriormente, se agrega mediante un goteo a células HeLa Panx1 que han sido sembradas en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro a un 50% de confluencia.
Morfolino contra Piezo 1

Se solicita a la empresa Gene Tools Oligo Desing (Philomath, Oregon, EUA) el diseño de una secuencia de oligonucleótidos que actúe como morfolino contra el mRNA de Piezo 1 humano, utilizando como referencia la secuencia de NCBI NM_001142864.4. La secuencia de oligonucleótidos diseñada es, de 5' a 3': TCTCCTCTTCCTCCTTCTCCTTCGG. Como control negativo se utiliza una secuencia de oligonucleótidos estándar, ofrecida por la misma empresa, la cual es complementaria a una mutación en un intrón de la beta- globina humana que causa talasemia y que no es complementaria a otra secuencia de mRNA humana; su secuencia es, de 5' a 3': CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA. Para realizar el ensayo con los morfolinos contra Piezo 1 y control, se siembran células HeLa Panx1 con un 12,5% de confluencia. Veinticuatro horas más tarde se transfectan las células utilizando Turbo Fect con 250 o 500 nM de cada morfolino y con 4 µg del plásmido pEGFP C1, el cual contiene el inserto de la proteína fluorescente verde y permite identificar células que posiblemente han sido transfectadas por los morfolinos. Veinticuatro horas posteriores a la transfección, se estudia la actividad de los Panx1 Chs de acuerdo al punto 1 de los Métodos.

Microscopía confocal

Se sembró células HeLa parentales en cubreobjetos de 10 mm de díametro con un 70% de confluencia y 12 h más tarde fueron transfectadas con el vector pRK5 que contiene el inserto de la Panx1 de rata silvestre o con la mutación S394D, fusionadas a GFP. Las células se incubaron por 12 h en presencia y ausencia de 100 µM suramina y posteriormente fueron lavadas con PBS, fijadas con PFA al 4% por 5 min y lavadas 4 veces con solución de bloqueo

(1% BSA, 50 mM NH₄Cl, 0,1% Tritón X-100 en PBS, pH 7,42). Posteriormente se montaron en portaobjetos con DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA). Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio Nikon D-eclipse C1 con un aumento de 100x con el software EZ-C1 (Nikon, Japón). Se hicieron stacks cada 1 micra (5 fotos en total) y éstas fueron procesadas en el software NIS Elements (Nikon, Japón).

Búsqueda bioinformática de potenciales sitios de fosforilación en Panx1 por CaMKII y PKA

Para determinar los sitios putativos de fosforilación de Panx1 en los distintos estados del canal y las cinasas implicadas en cada proceso, se realiza una búsqueda bioinformática de potenciales sitios de fosforilación en Panx1 por CaMKII y PKA (serinas o treoninas), utilizando los softwares NetPhosK 3.1, GPS 3.0, Kinase Phos y PhosphoSitePlus, disponibles de manera gratuita en internet. Para determinar la localización de los residuos arrojados por la búsqueda bioinformática, se utiliza el *software Protter- visualize proteoforms* (Omasits *et al.*, 2014), el cual también es gratuito y permite filtrar la información obtenida hasta obtener los residuos que estarían localizados en la región intracelular. La búsqueda arroja los siguientes resultados (tabla N°1): aquellos potencialmente fosforilables por PKA son: T21, S205, T302 y S328 y por CaMKII: T302, S384 y S394.

Mutaciones puntuales

Se realizan mutaciones de los residuos mencionados en el punto anterior a un residuo de alanina y además en el caso de la T302, S328 y S394 a un residuo de aspartato. Para esto,

se diseñan pares de partidores específicos que contienen la secuencia mutagénica en el partidor *forward*. Las mutaciones y partidores a utilizar se muestran en la tabla N°2; los codones que generan la mutación están destacados con letras en negrita. Cabe mencionar que estos partidores fueron diseñados de forma manual y son sintetizados por la empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT, Skokie, IL, EUA), conteniendo los extremos 5' fosforilados. Las mutaciones se realizan con el *Phusion Site- Directed Mutagenesis Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se realiza una reacción de PCR, utilizando como molde el plásmido pRK5 que contiene el inserto de la Panx1 de rata fusionada a EGFP (pRK5- rPanx1 EGFP), los plásmidos que correspondan a la mutación a realizar y los reactivos contenidos en el kit. Esta reacción permite obtener un producto correspondiente al plásmido completo, linealizado y con la mutación.

Residuo	Cinasa	Localización
T21	РКА	N - terminal
S205	РКА	Asa intracelular
Т302	ΡΚΑ Υ CAMKII	C - terminal
S328	РКА	C - terminal
S384	САМКІІ	C - terminal
S394	САМКІІ	C - terminal

Tabla N° 1: Potenciales sitios de fosforilación en rPanx1 por CaMKII y PKA

Mutación	Partidores	
T21A	Forward	GGAGCCC GCC GAGCCCA
	Reverse	TTCAGCAAGAAGTCCGAGAACAC
S205A	Forward	CGAAGAAGAAC GCC AGTCACCTAAT
	Reverse	TCTTCAAGTACTGCTCCACGATC
T302A	Forward	GGCAGAAG GCC GACGTCCT
	Reverse	GGAACGGGACGAAGAGCGT
T302D	Forward	GGCAGAAG GAC GACGTCCT
	Reverse	GGAACGGGACGAAGAGCGT
S328A	Forward	CAACGACTTG GCC CTCTACAACC
	Reverse	TAGCCTTCAGACTTGAAATGTAGAACATC
S328D	Forward	CAACGACTTG GAC CTCTACAACC
	Reverse	TAGCCTTCAGACTTGAAATGTAGAACATC
S384A	Forward	GTCCCCATG GCC CTACAGAC
	Reverse	TTTTCCATCAATGACGTCCATCT
S394A	Forward	ACCAGGGC GCC CAGAGAATG
	Reverse	CCTCTCCCTTGGTCTGTAGGGACAT
S394D	Forward	ACCAGGGC GAC CAGAGAATG
	Reverse	CCTCTCCCTTGGTCTGTAGGGACAT

Tabla N° 2: Diseño de partidores para realizar mutaciones sitio dirigidas de residuos de amino ácidos de rPanx1.

Posteriormente, se realiza una reacción de ligación utilizando el *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) y se transforman bacterias competentes con los distintos plásmidos mutantes, dejándolas en medio LB agar (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) con 100 µg/ml ampicilina por 24 h en una incubadora a 37°C. A continuación, se crecen 5 colonias por cada transformación en caldo LB (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) por 24 h. Luego, se purifican los plásmidos desde cada suspensión bacteriana utilizando el *E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit II* (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA) y para comprobar que los plásmidos obtenidos contienen las mutaciones deseadas se realiza secuenciación de éstos en la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica con un equipo ABI PRISM 3500 xl (Applied Biosystems, CONICYT – FONDEQUIP EQM150077). Una vez seleccionados los plásmidos que contienen la mutación y que no tienen afectados los marcos de lectura para rPanx1 ni EGFP, se emplean para transfectar de manera transitoria células HeLa parentales, utilizando el reactivo TurboFect.

RT-PCR del receptor Piezo 1 y receptores de adenosina

Para detectar los mRNAs del receptor Piezo 1 y de los receptores de adenosina A_{2A} y A_{2B} en células HeLa Panx1, se extrae el RNA total a partir de 5 millones de células Jurkat (control positivo) y 1 millón de células HeLa Panx1, utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies), el extracto se trata con la DNasa RQ1 RNase- Free (Promega) para degradar el DNA contaminante y se sintetiza el cDNA, utilizando el kit SuperScript First- Strand Syntesis System for RT- PCR (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Se realizan las PCRs para GAPDH como control de carga, utilizando los partidores *forward* 5'

ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' y reverse 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3', obteniendo un amplicón de 452 pb; para el receptor Piezo 1, utilizando los partidores *forward* 5' CAACGTCACCGTCATCATCT 3' y reverse 5' CGGACTCAAACAGGAAGTAGTC 3', obteniendo un amplicón de 608 pb; para el receptor de adenosina A_{2A}, utilizando los partidores *forward* 5' TGCAGAACGTCACCAACTAC 3'y reverse 5' GCCAGGAAGATCCGCAAATA 3', obteniendo un amplicón de 499 pb y para el receptor de adenosina A_{2B}, utilizando los partidores *forward* 5'TGTGTGTCCCGCTCAGGTATAA 3' y *reverse* 5' TCGGTTCCGGTAAGCATAGA 3', obteniendo un amplicón de 564 pb. En todos los casos se utiliza como control negativo la reacción sin DNA molde. Los partidores son sintetizados por la empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT, Skokie, IL, EUA).

Análisis estadístico

Las tasas de captación de colorante se muestran como el promedio de la captación de colorante dividido por el tiempo \pm el error estándar, normalizados con respecto a la tasa de captación de colorante basal. Las diferencias significativas entre grupos fueron determinados utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, CA, EUA) usando ANOVA de dos vías con un post-test Tukey para realizar comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas significativas con p<0,05 (*p<0,05; **p<0,005 y ***p<0,001). El número de repeticiones de cada experimento se menciona en el pie de cada figura.

RESULTADOS

El aumento en la actividad de los Panx1 Chs inducido por estrés mecánico en células HeLa Panx1 es dependiente de la activación de canales iónicos sensibles a estrés mecánico y del ingreso del ion calcio extracelular.

En primer lugar, se corroboró que los Panx1 Chs se activan tras generar un estrés mecánico (EM) a las células. Previamente en el laboratorio se calibró un método para inducir la activación de los Panx1 Chs mediante EM. Para esto, se realizaron experimentos de captación de colorantes en células HeLa Panx1 en los cuales se seleccionaron campos al azar y se midió la intensidad de fluorescencia basal de DAPI en los núcleos. A continuación, se dejó caer distintos volúmenes de solución de registro sobre las células (1 - 8 ml) en forma de goteo desde 10 cm de altura, observándose una relación lineal entre el volumen del EM y el aumento en la captación de DAPI, dándose un efecto máximo a partir del estímulo de 6 ml. Esto se inhibió con 10 µM carbenoxolona (CBX), un bloqueador de los Panx1 Chs (resultados no publicados). Para corroborar los resultados, se realizaron experimentos de captación de colorantes similares en células HeLa-P y HeLa Panx1. En condiciones basales, tanto en células HeLa-P como en células HeLa Panx1 la intensidad de fluorescencia fue muy baja y prácticamente constante. Sin embargo, pocos segundos post EM la intensidad de fluorescencia de las células HeLa-Panx1 aumentó progresivamente debido al ingreso de DAPI que fluoresce al unirse a los ácidos nucleicos en el espacio intracelular (Figura 1A), alcanzando una pendiente de captación aproximadamente 3,4 veces mayor al basal (Figura 1B). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia y la tasa de captación de DAPI de las células HeLa-P no mostraron cambios significativos post EM (Figura 1A y B), lo cual es consistente con la



Figura 1: Aumento en la actividad de Panx1 Chs inducido por EM en células HeLa Panx1. Se estudió la actividad de los Panx1 Chs mediante ensayos de captación de colorantes (DAPI) en células HeLa-P y HeLa Panx1. Para inducir la activación de los Panx1 Chs se sometió a las células a EM producido por goteo de la solución extracelular sobre las células que estaban siendo analizadas. (A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de DAPI en células HeLa-P (círculos negros) y HeLa-Panx1 (círculos blancos) en condición basal, bajo EM y tras el tratamiento con 10 μ M carbenoxolona (CBX). (B) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa-P (columnas negras) y HeLa Panx1 (columnas blancas) bajo las mismas condiciones que en A. *p<0,05 y **p<0,005. Cada valor en B corresponde al promedio \pm error estándar de un total de tres experimentos independientes.

ausencia de Panx1 Chs (Figura 1B). Al agregar 10 μ M CBX, la pendiente de captación de DAPI de las células HeLa Panx1 fue de sólo ~1,6 veces mayor al basal, de manera que no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la pendiente basal (Figura 1B), atribuyendo el aumento de captación correspondiente al tramo posterior al EM al aumento de la actividad de Panx1 Chs. La tasa de captación no cambió en células HeLa-P frente a los distintos estímulos.

Debido a que el EM induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs y a que estos canales no son activables directamente por el EM (Reyes et al., 2009), se quiso determinar si el aumento de la actividad de los Panx1 Chs podría depender de la activación de reconocidos canales sensibles a EM (MSCs), los cuales se activan por tensión en la membrana celular (Sachs, 2010). Para esto, se realizaron experimentos de captación de colorantes en células HeLa Panx1 pre tratadas por 30 min con 200 µM La³⁺, un bloqueador de diversos canales permeables a Ca²⁺, incluyendo los MSCs (Sachs, 2010) y se realizó además los experimentos en presencia de La³⁺. La pendiente de captación de DAPI en células no tratadas con La³⁺ (barra 1) fue ~3,4 veces mayor que la basal, mientras que en las células pre tratadas con La^{3+} (barra 2), fue de ~1,3; es decir, muy cercana al valor basal y no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a ésta (Figura 2A). Por lo tanto, la activación de los Panx1 Chs inducida por EM depende de la activación de uno o más canales inhibidos por La³⁺, los que podrían corresponder a MSCs. Cabe mencionar que la captación de DAPI de células HeLa Panx1 sometidas a EM no se alteró al adicionar La³⁺ (Figura 2B), lo que indica que los Panx1 Chs activados por EM no son bloqueados por La^{3+} , lo que sí se ha descrito que ocurre para los hemicanales formados por conexinas (John et al., 1999).



Figura 2: El aumento en la actividad de Panx1 Chs por EM es dependiente de la actividad de MSCs y la presencia de Ca²⁺ extracelular. Para evaluar si los MSCs participan en el aumento de actividad de los Panx1 Chs inducido por EM, se preincubó células HeLa Panx1 con 200 μ M La³⁺ por 30 min y además se realizaron ensayos de captación de colorantes en presencia de 200 μ M La³⁺ en células HeLa Panx1. (A) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 sometidas a EM, tratadas o no con La³⁺. (B) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 sometidas a EM y posteriormente tratadas (La³⁺ agudo) o no con 200 μ M La³⁺. Para evaluar si es necesaria la presencia de Ca²⁺ y/o Mg²⁺ extracelular para producir un aumento en la actividad de los Panx1 Chs por estrés mecánico, se realizaron experimentos de captación de colorante en presencia de ambos iones, ausencia de cada uno y ausencia de ambos; (C) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 sometidas a EM en presencia y ausencia de Ca²⁺ y/o Mg²⁺ extracelular. *p<0,05; **p<0,005 y ***p<0,001. Cada valor en A, B y C corresponde al promedio ± error estándar de un total de tres a cuatro experimentos independientes.

Debido a que los MSCs son permeables a Mg^{2+} y Ca^{2+} (Hamill y Martinac B, 2001; Staruschenko *et al.*, 2006), se quiso determinar si la activación de los Panx1 Chs de células sometidas a EM depende de la presencia de estos cationes divalentes en la solución extracelular. Para esto, se realizaron experimentos de captación de colorantes en células HeLa Panx1 utilizando solución de registro Krebs completa, o en solución de registro sin Mg^{2+} o Ca^{2+} o en ausencia de ambos. Las tasas de captación de DAPI obtenidas al someter las células a EM en ausencia de Ca^{2+} y no de Mg^{2+} extracelular condicionaron la activación de los Panx1 Chs, ya que en ausencia de Ca^{2+} (barra 3, ~1,1 veces respecto al basal) o ausencia de ambos cationes divalentes (barra 4, ~1,3 veces respecto al basal), la tasa de captación de DAPI frente al EM fue similar a la basal, mientras que en ausencia de Mg^{2+} , la tasa de captación de DAPI fue similar a la obtenida tras someter las células a EM en medio Krebs completo (~2,3 versus ~3,4 veces respecto al basal, respectivamente). Este resultado sugiere que la estimulación mecánica de células HeLa Panx1 activa MSCs, los cuales permitirían la entrada de Ca^{2+} y posteriormente, la activación de Panx1 Chs.

A continuación, se quiso indagar en la participación del canal Piezo 1, un tipo de MSC que se ha sugerido puede mediar la activación de Panx1 Chs en células sometidas a estrés mecánico (Miyamoto *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2019). Este canal se expresa en tejidos no sensoriales expuestos a presión de fluido y flujo (por ejemplo, en los riñones y eritrocitos) (Wu *et al.*, 2016) y puede ser activado farmacológicamente con la molécula Yoda 1 (Syeda *et al.*, 2015). Aquí se quiso estudiar si la activación de Piezo 1 induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs. En primer lugar, se realizó un RT-PCR para determinar si las células HeLa Panx1 expresaban el mRNA de Piezo 1. En primer lugar se extrajo RNA total de las células HeLa Panx1, se generó el cDNA y posteriormente, se realizó un PCR para el

receptor Piezo 1, de acuerdo a lo expuesto en Métodos. Como control positivo, se utilizó el cDNA de células Jurkat. Los productos se separaron en geles de agarosa. En panel superior se ilustra un resultado representativo de PCR para Piezo 1, mientras que en el panel inferior se muestra el amplicón del PCR de GAPDH, utilizado como control de expresión constitutiva. Para ambas amplificaciones por PCR, se muestran los resultados obtenidos por el control negativo (C-, sin DNA molde), por el control positivo (C+, cDNA de células Jurkat) y por el cDNA de células HeLa Panx1. Utilizando como molde el cDNA de células HeLa Panx1, se observa una banda tenue, al igual que para el control positivo (Inserto Figura 3A). A continuación, se cargó células HeLa Panx1 con FURA-2AM y se midió la señal de Ca²⁺ a partir de la razón de las emisiones F_{340}/F_{380} al tratar las células con 25 μ M Yoda 1, en presencia y ausencia de Ca²⁺ extracelular. La figura 3A muestra un resultado representativo, mientras que la figura 3B corresponde al promedio del área bajo la curva en la señal de Ca²⁺ de tres experimentos independientes. En ambas figuras se observa que el tratamiento con Yoda 1 indujo un aumento de la señal de Ca²⁺ intracelular en las células expuestas a una solución extracelular con Ca²⁺. Este resultado es consistente con lo observado por Syeda y colaboradores, ya que Yoda 1 induce un aumento en la señal de Ca²⁺ por entrada del ion desde el exterior. Para determinar si la activación de Piezo 1 por Yoda 1 induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs, se realizaron ensayos de captación de colorantes en células HeLa Panx1 utilizando distintas concentraciones de Yoda 1. La tasa de captación de DAPI en células tratadas con 25 µM Yoda aumentó ~3,7 veces respecto al basal, mientras que en células tratadas con 50 μ M Yoda aumentó ~5,7 veces respecto al basal (Figura 3C), obteniéndose aumentos significativos en la captación de colorante en ambas concentraciones y un efecto concentración dependiente. La captación de colorante inducida por 25 µM Yoda 1 se



Figura 3: La activación del canal Piezo 1 aumenta la actividad de los Panx1 Chs. (A) Imagen de la señal de Ca²⁺ representativa medida como la razón de las emisiones a F_{340}/F_{380} en células HeLa Panx1 precargadas con FURA-2AM, expuestas o no a Ca²⁺ extracelular y tratadas con 25 µM Yoda 1 en el momento indicado por la flecha. Inserto: RT-PCR del receptor Piezo 1 en células HeLa Panx1. Se utilizó como control negativo la reacción de PCR sin DNA molde y como control positivo, el cDNA de células Jurkat. GAPDH fue utilizado como control de expresión constitutiva. (B) Promedio del cálculo del área bajo la curva de tres experimentos independientes como el mostrado en A. (C) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 tratadas con distintas concentraciones de Yoda 1 (n=3) y (D) con 25 µM Yoda 1 y posteriormente con 10 µM CBX (n=3). (E) Tasa de captación de DAPI de células HeLa Panx1 sometidas a EM y transfectadas con 250 o 500 nM de morfolino contra Piezo 1 (morfolino Piezo 1), respecto a la tasa de captación de DAPI de células HeLa Panx1 sometidas con 250 o 500 nM de morfolino control, respectivamente (n=3). *p<0,05; **p<0,005 y ***p<0.001. Cada valor en B, C, D y E corresponde al promedio ± error estándar.

bloqueó parcialmente con 10 μ M CBX (Figura 3D), indicando que el tratamiento con Yoda 1 induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs. Sin embargo, esto último debe ser considerado con cautela, ya que debido a que el tratamiento con 10 μ M CBX bloqueó de forma parcial la captación de colorante inducida por Yoda 1, es posible que el canal Piezo 1 sea permeable al colorante (nuestros experimentos no descartan que Piezo 1 sea permeable a DAPI y tampoco existen reportes en bibliografía que describan esto) y además, se desconoce si CBX afecta al canal Piezo 1.

Para corroborar que la activación de Piezo 1 por EM induce un aumento en la actividad de los Panx1 Chs, se realizaron experimentos de captación de DAPI en células que habían sido transfectadas 48 h antes con un oligómero morfolino control o uno contra Piezo 1. La tasa de captación de colorante tras el EM en células Panx1 transfectadas con 250 µM morfolino Piezo 1 redujo la captación de colorante a un 43,3%, y en las células transfectadas con 500 µM se redujo a un 46,3%, con respecto a la captación de un morfolino control (Figura 3E). Estos resultados permiten concluir que la activación de Piezo 1, ya sea mediante Yoda 1 o EM, lleva al aumento en la actividad de los Panx1 Chs.

La activación de Panx1 Chs inducida por EM en células HeLa Panx1 es dependiente de la actividad de CaMKII.

Debido a que los resultados anteriores sugieren la entrada de Ca^{2+} a través de MSCs (como Piezo 1) en células tratadas con EM, se decidió evaluar si la activación de los Panx1 Chs es dependiente del complejo Ca^{2+} calmodulina. Para esto, se preincubó células HeLa Panx1 con W-7, un antagonista de calmodulina, por 30 min y se realizaron experimentos de captación de colorantes en presencia de W-7. La tasa de captación de DAPI de células HeLa Panx1 tratadas con 100 μ M W-7 fue de ~1,6 veces mayor en comparación a la basal (barra 2) versus ~3,5 veces mayor respecto al basal en ausencia de W-7 (barra 1) (Figura 4), lo cual constituye una diferencia significativa.

En vista de que el complejo Ca^{2+} calmodulina puede activar a la cinasa CaMKII (Swulius y Waxham, 2008), se decidió evaluar si la activación de los Panx1 Chs frente al EM es dependiente de la actividad de esta cinasa. Además, se quiso evaluar si la activación de estos canales depende de la fosfatasa calcineurina, la cual también se activa por el complejo Ca^{2+} calmodulina (Rumi-Masante *et al.*, 2012). Para evaluar esto, se preincubó células HeLa Panx1 con KN62 (10 μ M), un inhibidor de CaMKII o con ciclosporina A (CsA, 50 μ g/ml), un inhibidor de calcineurina, por 30 min y posteriormente se llevó a cabo experimentos de captación de colorantes en presencia de cada inhibidor. La tasa de captación de DAPI en células tratadas con KN62 fue ~1,6 veces mayor respecto al basal (barra 3) y en células tratadas con CsA fue ~3,7 veces respecto al basal (barra 4) versus ~3,5 en ausencia de inhibidores, obteniéndose diferencia significativa en el caso de la preincubación con KN62. A partir de estos resultados se concluye que la activación de los Panx1 Chs inducida por EM depende del complejo Ca^{2+} - calmodulina y de la actividad de la cinasa CaMKII.

En paralelo, se quiso estudiar si el aumento en la actividad de los Panx1 Chs inducido por EM es dependiente de las SFKs, ya que se ha descrito que estas cinasas inducen un aumento en la actividad de los Panx1 Chs mediante la fosforilación de las tirosinas 198 y 308 (Lohman *et al.*, 2015; Weilinger *et al.*, 2012). Para esto, se pre trató células HeLa Panx1 por 30 min con PP2, un inhibidor de las SFKs y se realizó experimentos de captación de colorante



Figura 4: La activación de los Panx1 Chs inducida por estrés mecánico en células HeLa Panx1 depende del complejo Ca²⁺ - calmodulina y de la actividad de la cinasa CaMKII. Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 pretratadas o no por 30 min con 100 μ M W7, 10 μ M KN62, 50 μ g/ml CsA o 10 μ M PP2, sometidas a EM. Los ensayos de captación también se realizaron en presencia de los compuestos mencionados anteriormente, según corresponde. **p<0,005 y ***p<0,001. Cada valor corresponde al promedio ± error estándar de un total de tres a cuatro experimentos independientes.

en presencia de PP2. Al someter las células a EM se produjo un aumento de ésta de 3 veces el basal, lo cual no es una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la tasa de captación observada en ausencia de inhibidores (~3,5 veces mayor al basal) (Figura 4). Por lo tanto, las SFKs no participan en el aumento de la actividad de los Panx1 Chs inducido por EM.

La serina 394 participa en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM

Debido a que los resultados anteriores indican que la activación de los Panx1 Chs inducida por EM depende del complejo Ca^{2+} - calmodulina y de la actividad de la cinasa CaMKII, se quiso evaluar si CaMKII fosforila a Panx1 y de esta manera modula la activación de los canales formados por ésta. Para ello, se realizó una búsqueda bioinformática de los potenciales sitios de fosforilación en Panx1 por CaMKII (Tabla N°1, sección Métodos), utilizando los softwares NetPhosK 3.1, GPS 3.0, Kinase Phos y PhosphoSite Plus. La búsqueda arrojó tres sitios potencialmente fosforilables por CaMKII localizados en la región intracelular de Panx1, de los cuales, la herramienta bioinformática Plotter predice que están localizados en el extremo carboxilo terminal (Figura 5): la treonina 302 (T302) y las serinas 384 (S384) y 394 (S394). A continuación, se diseñaron partidores para realizar mutaciones sitio dirigidas de estos residuos, ya sea serina o treonina a alanina, de manera que no puedan ser fosforilables en dichos residuos de aminoácidos (Tabla N°2). Las mutaciones se llevaron a cabo empleando el Phusion Site- Directed Mutagenesis Kit, utilizando como DNA molde el plásmido pRK5 que contiene el inserto de la Panx1 de rata fusionada a EGFP (pRK5- rPanx1 EGFP). En la tabla N°3 se muestran segmentos de las secuenciaciones de los constructos



Protter - visualize proteoforms Omasits et al., Bioinformatics. 2013 Nov 21.

Figura 5: Localización de potenciales sitios de fosforilación en rPanx1 por CaMKII y PKA. Imagen obtenida mediante el software Protter (Protter - visualize proteoforms. Omasits et al., Bioinformatics. 2013, Nov 21).

Mutación	Segmento DNA	Segmento Proteína
rPanx1 rPanx1_T302A	CAGAAG <mark>ACG</mark> GACGTC CAGAAG <u>GCC</u> GACGTC *****	VPFRQKTDVLKVY VPFRQKADVLKVY *****:
rPanx1 rPanx1_S384A	CCCATGTCCCTACAG CCCATGGCCCTACAG *****	DGKVPM <mark>S</mark> LQTKGE DGKVPMALQTKGE *****:
rPanx1 rPanx1_S394A	CAGGGCAGCCAGAGA CAGGGCGCCCAGAGA *****	KGEDQG <mark>S</mark> QRMDFK KGEDQGAQRMDFK *****
rPanx1 rPanx1_S394D	CAGGGCAGCCAGAGA CAGGGCGCCCAGAGA *****	KGEDQG <mark>S</mark> QRMDFK KGEDQGDQRMDFK *****

Tabla N° 3: Secuenciación de mutantes de potenciales sitios fosforilables por CaMKII en rPanx1 a alanina y aspartato.

mutantes, donde se puede ver destacado en los recuadros de la columna 2, el codón que originalmente da paso a una treonina o serina y en el caso de la secuenciación del constructo mutante, se observa el codón que da paso a una alanina (GCC). En la columna 3 de la misma tabla se observan segmentos de la cadena aminoacídica correspondiente a la región mutada, donde se puede observar el cambio de aminoácido, ya sea treonina o serina a alanina. Con los constructos mutantes se transfectó células HeLa-P y 24 h más tarde se evaluó la actividad de los Panx1 Chs en base a ensayos de captación de DAPI. Como control negativo, se evaluó la actividad de Panx1 Chs en células HeLa-P sin transfectar o transfectadas con el vector pRK5 que contiene sólo el inserto de EGFP (vector vacío), el cual fue generado de acuerdo a lo expuesto en Materiales. Las células HeLa-P no transfectadas o las transfectadas con el vector vacío fueron insensibles al EM (Figura 6). En el caso de las células transfectadas con el constructo que contiene la Panx1 silvestre, se observa que éstas fueron sensibles al EM, obteniéndose un aumento en la tasa de captación de ~4 veces mayor que el basal (Figura 6). En el caso de las mutantes T302A y S384A, las tasas de captación fueron comparables a las obtenidas en las células transfectadas con la Panx1 silvestre, obteniéndose valores de ~3,6 y ~3,1 veces mayor que el basal, respectivamente (Figura 6). Finalmente, en el caso de la mutante S394A, la tasa de captación fue de 0,9 UA/min, es decir, comparable a los controles de células HeLa-P sin transfectar o transfectadas con el vector vacío.

El resultado anterior sugiere que la S394 está involucrada en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM; sin embargo, para confirmarlo se procedió a mutar este residuo por aspartato, de manera que pudiera simularse una fosforilación permanente del mismo. Para esto se diseñaron los partidores que permitieran generar dicha mutación, los cuales se muestran en la última fila de la Tabla N°2 de la sección Métodos. Se realizó la mutación siguiendo el



Figura 6: La serina 394 participa en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM. Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal de células HeLa-P sometidas a EM no transfectadas o transfectadas con el vector pRK5 con o sin los siguientes insertos: rPanx1 silvestre, rPanx1 T302A, rPanx1 S384A o rPanx1 S394A. El ensayo de captación de colorantes se realizó 24 h post - transfección. *p<0,05 y ***p<0,001. Cada valor corresponde al promedio \pm error estándar de un total de tres a ocho experimentos independientes.

mismo protocolo que para las otras mutantes. En la última fila de la Tabla N°3 se muestran secciones de la secuencia de la Panx1 de rata silvestre y de la Panx1 mutada, donde se puede observar el cambio de codón generado por la mutación. En la columna de la derecha se observa el cambio aminoacídico al cual la mutación da origen. Se transfectó células HeLa-P y se evaluó la actividad de los Panx1 Chs a las 6, 12 y 24 h. Se determinó que a las 12 h post transfección los Panx1 Chs estaban más activos en comparación a los otros tiempos, por lo tanto, se decidió trabajar a las 12 h posteriores a la transfección. Una vez que se cumplió la incubación, las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia, observándose un patrón punteado en la distribución de la Panx1 fusionada a EGFP en las células transfectadas con el constructo mutante y no así en el caso de las transfectadas con la Panx1 silvestre. A continuación, para corroborar que en el caso de las células transfectadas con la Panx1 mutante la distribución de Panx1 era de tipo punteado, se sembraron células en cubreobjetos de 10 mm de diámetro, se las tranfectó con cada uno de los constructos y se las trató o no con 100 µM suramina y luego de 12 h se las fijó con 4% PFA y se las montó en un portaobjeto con DAPI Fluoromount-G para observarlas mediante microscopía confocal (Figura 7). Las células HeLa transfectadas con la Panx1 silvestre, ya sea con o sin pretratamiento con suramina tenían un patrón de distribución homogéneo de la Panx1 fusionada a GFP. Sin embargo, en el caso de las células HeLa transfectadas con la Panx1 S394D se observó un patrón punteado en la distribución de la Panx1 mutante fusionada a GFP, donde se observaron estructuras de tipo vesícula de un diámetro aproximado de 2 µm. Esto sugiere que la Panx1 S394D que alcanzó la membrana podría estar siendo internalizada en un endosoma, ya que las vesículas de internalización pueden tener un tamaño de entre $\sim 1-5 \,\mu\text{m}$ de diámetro, mientras que las



Figura 7: Distribución de la Panx1 silvestre y de la mutante S394D fusionadas a EGFP luego de 12 h de transfección con y sin pretratamiento de 12 h con 100 μ M suramina. Micrografías confocales representativas de células HeLa tranfectadas transientemente por 12 h con el cDNA de la Panx1 silvestre o Panx1 S394D fusionadas a GFP, tratadas o no con 100 μ M suramina durante todo el periodo de transfección. En los paneles de la izquierda se muestra un plano general de cada condición (barra de calibración: 25 μ m), mientras que en los paneles de la derecha se muestra una magnificación de los recuadros blancos marcados en las imágenes de la izquierda (barra de calibración: 2 μ m).

vesículas exocíticas son más pequeñas (~ 100–500 nm de diámetro) (Flašker *et al.*, 2013; Piehl *et al.*, 2007). Esto sugiere que en estas condiciones el canal hiperactivo favorece su internalización, ya que es sabido que altas concentraciones de ATP extracelular no sólo inhiben a los Panx1 Chs, sino que pasado unos 15 min se produce su internalización a través de un mecanismo que involucra a receptores P2 (Boyce *et al.*, 2015). Consecuentemente, para prevenir esta internalización, durante las 12 h en que se realizó el ensayo de captación posteriores a la transfección, se incubó las células con 100 μ M suramina, un bloqueador de receptores P2. En las células HeLa-P transfectadas con la Panx1 silvestre, con o sin suramina la distribución vesicular de la Panx1 fusionada a EGFP fue mínima. En las células HeLa transfectadas con la mutante S394D tratadas con suramina, la distribución de la Panx1 fusionada a EGFP fue similar a la de las células transfectadas con la Panx1 silvestre (Figura 7).

Posteriormente, se evaluó la actividad de los Panx1 Chs de células HeLa-P transfectadas con Panx1 silvestre o con la mutante S394D. En el panel de la izquierda de la figura 8A se observan experimentos representativos que dan cuenta de que la captación de colorantes en células HeLa-P transfectadas con la Panx1 silvestre y tratadas con 100 μ M suramina fue similar a las células no tratadas. Lo mismo ocurrió con células HeLa-P transfectadas con 100 μ M suramina y pretratadas por 30 min con el inhibidor de los Panx1 Chs ¹⁰Panx (200 μ M). Por otro lado, el panel de la derecha de la figura 8A muestra que las células HeLa-P transfectadas con la mutante S394D y tratadas con 100 μ M suramina tuvieron una alta captación de colorantes en comparación a las no tratadas con suramina. Esta alta captación se explica por un aumento en la actividad de los Panx1 Chs, ya que al preincubar estas células por 30 min con 200 μ M ¹⁰Panx, la captación fue similar a la



Figura 8: La fosforilación de la serina 394 de Panx1 aumenta la actividad de los Panx1 Chs en forma basal. (A) Captación de DAPI representativa para células HeLa transfectadas con Panx1 silvestre o con la mutante S394D, sin pretratar y con pretratamiento por 12 h con 100 μ M suramina y por 30 min con 200 μ M ¹⁰Panx. (B) Tasa de captación de DAPI (UA/min) en células HeLa-P, HeLa-P transfectadas con la Panx1 silvestre sin y con pretratamiento de 12 h con 100 μ M suramina y HeLa-P transfectadas con la mutante de Panx1 S394D sin y con pretratamiento de 12 h con 100 μ M suramina. Los ensayos de captación de colorantes se realizaron 12 h post-transfección. ***p<0,001. Cada valor corresponde al promedio ± error estándar de un total de tres experimentos independientes.

condición sin suramina. En la figura 8B se observa el promedio de la tasa de captación de DAPI medida en unidades arbitrarias dividido por el tiempo de un total de 3 experimentos independientes. Las tasas de captación para las células HeLa-P, HeLa-P transfectadas con la Panx1 silvestre sin y con suramina y HeLa-P transfectadas con la mutante S394D sin y con suramina fueron de 0,03; 0,11; 0,14; 0,08 y 0,62 UA/min; respectivamente, obteniéndose diferencias significativas sólo en el caso de las células HeLa-P transfectadas con la mutante S394D tratadas con suramina con respecto a los otros grupos. Estos resultados permiten concluir que la S394 participa en la activación de los Panx1 Chs inducida por EM y se puede especular que CaMKII fosforila este residuo e induce de esta manera la activación de los Panx1 Chs.

Inhibición de Panx1 Chs por análogos de cAMP y adenosina

En esta tesis se exploró también el efecto de Ado sobre Panx1 Chs activados por EM. Primero, se quiso determinar si las células HeLa Panx1 expresan el mRNA de los receptores de Ado A_{2A} y A_{2B} . Para probar esto, se extrajo RNA total de las células HeLa Panx1, se generó el cDNA y posteriormente, se realizaron PCRs para los receptores A_{2A} y A_{2B} , de acuerdo a lo expuesto en Métodos. Como control positivo, se utilizó el cDNA de células Jurkat. Los productos se separaron en geles de agarosa y en panel superior se ilustra un resultado representativo de PCR para el receptor de Ado A_{2A} , en el panel central, el amplicón del receptor de Ado A_{2B} y en el panel inferior se muestra el amplicón del PCR de GAPDH, utilizado como control de expresión constitutiva. Para las tres amplificaciones por PCR, se muestran los resultados obtenidos por el control negativo (C-, sin DNA molde), por el control positivo (C+, cDNA de células Jurkat) y por el cDNA de células HeLa Panx1. Utilizando como molde el cDNA de células HeLa Panx1, se observan tenues bandas para ambos receptores de Ado (Figura 9A). De esta manera se comprueba que las células HeLa Panx1 contienen el mRNA de los receptores de Ado A_{2A} y A_{2B} .

Posteriormente, se realizó ensayos de captaciones de colorantes en células HeLa Panx1. En células sometidas a EM, se produjo un aumento en la captación de DAPI con respecto a la captación basal (Figura 9B), tal como en los experimentos anteriores y posteriormente, al tratar las células con 500 μ M Ado, la pendiente de captación disminuyó. En la figura 9C se muestra el promedio en las tasas de captación de DAPI de tres a siete experimentos independientes con distintas concentraciones de Ado (50 a 1000 μ M), observándose un efecto concentración dependiente en la inhibición de los Panx1 Chs por Ado.

Debido a que los receptores de Ado A_{2A} y A_{2B} son del tipo acoplado a proteína $G_{\alpha s}$ y por tanto, su activación induce un aumento en la concentración intracelular de cAMP (Haskó *et al.*, 2008), se decidió determinar si la inhibición de los Panx1 Chs activados por EM depende del aumento intracelular de cAMP. Para esto, se realizaron experimentos de captación de colorantes en células HeLa Panx1 y posteriormente se simuló un aumento de la concentración intracelular de cAMP utilizando dos análogos de cAMP (8-CPT-cAMP y Db-cAMP) a los cuales la membrana celular es permeable e imitan un aumento de cAMP citoplasmático. Al someter las células a EM hubo un aumento en la captación de DAPI con respecto a la captación basal, tal como en los experimentos anteriores y posteriormente, al tratar las células con 500 µM 8-CPT-cAMP, la pendiente de captación disminuyó (Figura 10A). Ambos análogos inhibieron la tasa de captación de los Panx1 Chs inducida por EM



Figura 9: Ado reduce la actividad de los Panx1 Chs. (A) RT-PCR de receptores de Ado A2A y A2B en células HeLa Panx1. Se utilizó como control negativo la reacción de PCR sin DNA molde y como control positivo, el cDNA de células Jurkat. GAPDH fue utilizado como control de expresión constitutiva. (B) Curso temporal de la captación de DAPI en células HeLa-Panx1 en condición basal, bajo EM y tras el tratamiento con 500 μ M Ado. (C) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 sometidas a EM y posteriormente tratadas con distintas concentraciones de Ado. *p<0,05; **p<0,005 y ***p<0,001. Cada valor en C corresponde al promedio ± error estándar de un total de tres a siete experimentos independientes.



Figura 10: Un aumento de la concentración intracelular de cAMP reduce la actividad de los Panx1 Chs. (A) Curso temporal de la captación de DAPI en células HeLa-Panx1 en condición basal, bajo EM y tras el tratamiento con 500 μ M 8-CPT-cAMP. (B) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa – P (barras negras) y HeLa Panx1 (barras blancas) sometidas a EM y posteriormente tratadas con 8- CPT-cAMP y/o Db-cAMP. ***p<0,001. Cada valor en B corresponde al promedio ± error estándar de un total de cuatro a diez experimentos independientes.

(Figura 10B). De estos experimentos se concluye que los Panx1 Chs son inhibidos por un mecanismo activado por Ado y por un aumento intracelular de cAMP.

La inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP depende de la actividad de la cinasa PKA

Debido a que los análogos de cAMP utilizados inhiben a los Panx1 Chs, se quiso evaluar si este efecto es mediado por la activación de PKA, la cual se activa por un aumento en la concentración citoplasmática de cAMP (Haskó *et al.*, 2008). Para esto, se realizaron experimentos de captación de DAPI similares a los anteriores en células HeLa Panx1, pre tratándolas por 30 min con 20 μ M PKI, un inhibidor específico de PKA (Dalton y Dewey, 2006), y realizando el experimento en presencia del inhibidor. No se observó que PKI afectara la activación de los Panx1 Chs inducida por EM. Sin embargo, el tratamiento con 500 μ M Db-cAMP, el análogo de cAMP, sólo inhibió la captación de DAPI en las células HeLa Panx1 no tratadas con PKI. En la figura 11B se grafican las tasas de captación de DAPI de tres experimentos independientes, dando cuenta de que el tratamiento con PKI previene la inhibición de los Panx1 Chs inducida por el nucleótido cíclico.

Para evaluar si la inhibición de los canales observada tras el tratamiento con el análogo de cAMP es dependiente alguna otra proteína cinasa, se realizaron experimentos de captación de DAPI en células pre tratadas con inhibidores de PKC (10 μ M bisindolilmaleimida, BIM I), p38 MAPK (10 μ M SB203580), Akt (10 μ M AKTi) o PKG (10 μ M KT5823) y los experimentos se realizaron además en presencia de cada inhibidor. Estos cuatro compuestos no previnieron la inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP (Figura 11C), ya que los



Figura 11: La inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP es dependiente de la actividad de la cinasa PKA. (A) Curso temporal de la captación de DAPI en células HeLa-Panx1 en la condición basal, bajo EM y tras el tratamiento con 500 μ M Db-cAMP, pretratadas (círculos negros) o no (círculos blancos) con 20 μ M PKI (B) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa Panx1 pretratadas y no pretratadas con 20 μ M PKI o (C) 10 μ M bisindolilmaleimida (BIM I), 10 μ M SB203580 o 10 μ M AKTi, sometidas a EM y posteriormente tratadas con 500 μ M Db-cAMP. Los ensayos de captación también se realizaron en presencia de los compuestos mencionados anteriormente, según corresponde. ***p<0.001. Cada valor en B y C corresponde al promedio ± error estándar de un total de tres a cinco experimentos independientes.

resultados fueron similares a los de la condición control (Control: con EM ~3,8 y Db-cAMP ~1,1 veces el basal; BIM I: con EM ~3,6 y Db-cAMP ~1,4 veces el basal; SB203580: con EM ~3,5 y Db-cAMP ~1,4 veces el basal; AKTi: con EM ~4,3 y Db-cAMP ~1,1 veces el basal y PKG: con EM ~3,6 y Db-cAMP ~1,5 veces el basal). Esto descarta que el efecto de PKA sobre los Panx1 Chs incluya un *crosstalk* alguna de estas cuatro cinasas y además sugiere que PKA podría fosforilar a Panx1 e inducir la inhibición de los canales formados por ésta.

La fosforilación en la treonina 302 o en la serina 328 es necesaria para la inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP

En base a los resultados anteriores, postulamos que PKA fosforila a Panx1 y de esta manera inhibe a los canales formados por ésta. Para evaluar esto se realizó una búsqueda bioinformática de los potenciales sitios de fosforilación de Panx1 por PKA, utilizando los *softwares* NetPhosK 3.1, GPS 3.0, Kinase Phos y PhosphoSite Plus. Se encontraron cuatro sitios potencialmente fosforilables por PKA, de los cuales, en base a la herramienta bioinformática Plotter, se predice están localizados en dominios intracelulares: la treonina 21 (T21) que se localizaría en el extremo amino terminal, la serina 205 (S205) que se localizaría en el extremo carboxilo terminal (Tabla N°2, sección Métodos; Figura 5). Posteriormente, se diseñaron partidores para realizar mutaciones sitio dirigidas de estos residuos, ya sea serina o treonina a alanina, de manera que no puedan ser fosforilables (Tabla N°1, sección Métodos). Las mutaciones se llevaron a cabo empleando el *Phusion Site- Directed Mutagenesis Kit*, utilizando como DNA molde el plásmido pRK5 que contiene el inserto de la Panx1 de rata fusionada a EGFP (pRK5- rPanx1 EGFP), de manera similar a las mutantes de potenciales

Mutación	Segmento DNA	Segmento Proteína
rPanx1 rPanx1_T21A	GAGCCCACCGAGCCC GAGCCCGCCGAGCCC *****	FLLKEPTEPKFKG FLLKEPAEPKFKG *****:
rPanx1 rPanx1_S205A	AAGAACTCCAGTCAC AAGAACGCCAGTCAC *****	LKTKKN <mark>S</mark> SHLIMK LKTKKN <mark>A</mark> SHLIMK *****:
rPanx1 rPanx1_T302A	CAGAAG <mark>ACG</mark> GACGTC CAGAAGGCCGACGTC *****	VPFRQKTDVLKVY VPFRQKADVLKVY *****:
rPanx1 rPanx1_T302D	CAGAAGACGGACGTC CAGAAGGACGACGTC *****	VPFRQKTDVLKVY VPFRQKDDVLKVY ***** *****
rPanx1 rPanx1_S328A	GACTTGAGCCTCTAC GACTTGGCCCTCTAC ******. ******	EGYNDLSLYNLFL EGYNDLALYNLFL *****:
rPanx1 rPanx1_S328D	GACTTGAGCCTCTAC GACTTGGACCTCTAC ***** ****	EGYNDLSLYNLFL EGYNDLDLYNLFL *****

Tabla N° 4: Secuenciación de mutantes de potenciales sitios fosforilables por PKA en rPanx1 a alanina o aspartato.

sitios fosforilables por CaMKII. En la tabla N°4 se muestran segmentos de las secuenciaciones de los constructos mutantes, donde se destaca en los recuadros de la columna 2 el codón que originalmente da paso a una treonina o serina y en el caso de la secuenciación del constructo mutante, se observa el codón que da paso a una alanina (GCC). En la columna 3 de la misma tabla se observan segmentos de la cadena aminoacídica correspondiente a la región mutada, donde se puede muestra el cambio de aminoácido, ya sea treonina o serina a alanina. Con los constructos mutantes se transfectó células HeLa-P y 24 h más tarde se evaluó la actividad de los Panx1 Chs en base a ensayos de captación de DAPI. Como control negativo, se muestran los resultados obtenidos a partir de células HeLa-P sin transfectar o transfectadas con el vector pRK5 vacío, que corresponden a los mismos datos que se muestran en la figura 6. Cabe mencionar además que para el caso de las transfecciones con la Panx1 silvestre y la mutante T302A, los resultados mostrados en la figura 12A para el caso del EM son los mismos que se mostraron en la figura 6. Se puede observar que las células HeLa-P no transfectadas o las transfectadas con el vector vacío fueron insensibles al EM. En el caso de las células transfectadas con el constructo que contiene la Panx1 silvestre, los resultados fueron comparables a los obtenidos en los experimentos anteriores, ya que tras someter las células a EM la pendiente de captación de DAPI aumentó ~3,9 veces con respecto a la condición basal, mientras que al tratar con Db-cAMP, esta alcanzó el valor de ~1,3 veces respecto a la basal, sin representar una diferencia significativa con esta última (Figura 12A). Con las mutantes T21A y la S205A, los resultados fueron similares a los obtenidos con la Panx1 silvestre, ya que al someter las células a EM las tasas de captación alcanzadas fueron de ~3,7 y ~3,9 veces mayores con respecto a la basal, respectivamente, mientras que al tratar con Db-cAMP los valores fueron de ~1,8 en la mutante T21A y ~1,5 veces la basal en la mutante S205A (Figura


Figura 12: La fosforilación en la treonina 302 o en la serina 328 es necesaria para la inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP. (A) Tasa de captación de DAPI normalizada respecto a la captación basal en células HeLa-P sometidas a EM no transfectadas o transfectadas con el vector pRK5 con o sin los siguientes insertos: rPanx1 silvestre, rPanx1 T21A, rPanx1 S205A, T302A o rPanx1 S328A, o (B) T302D o S328D. El ensayo de captación de colorantes se realizó 24 h post - transfección. ***p<0,001. Cada valor en A y B corresponde al promedio \pm error estándar de un total de tres a siete experimentos independientes.

12). En el caso de las mutantes en la T302 y en la S328, la activación de los Panx1 Chs por EM fue comparable a la Panx1 silvestre, alcanzándose valores de ~3,6 y ~3,5 veces con respecto a la basal, respectivamente (Figura 12). Sin embargo, al tratar células transfectadas con estas mutantes con Db-cAMP, no disminuyó la tasa de captación de DAPI, observándose valores de ~3 veces mayor a la basal para el caso de la mutante T302A y de ~3,3 veces la basal para la mutante S328A (Figura 12). Estos resultados nos permiten postular que la fosforilación en la T302 o en la S328 es necesaria para la inhibición de los Panx1 Chs inducida por Db-cAMP.

Para comprobar esto último, se realizaron mutaciones de los residuos T302 y S328 a aspartato, de manera que se simulara una fosforilación constitutiva de estos residuos. Para realizar esto se utilizó la misma estrategia empleada para las otras mutantes, habiendo diseñado los partidores que aparecen en la tabla Nº1 (sección Métodos). En la columna 2 de la tabla N°4, que corresponde a la secuenciación de los segmentos que DNA que se espera tengan las mutaciones, se observa destacado en los recuadros rojos los cambios de codón que originalmente dan paso a una treonina o serina, a aspartato (GAC). En la tercera columna de la misma tabla, se observa en letras rojas el cambio de residuo, ya sea de treonina o serina a aspartato. Con los constructos mutantes se transfectó células HeLa-P y 24 h más tarde se evaluó la actividad de los Panx1 Chs en base a ensayos de captación de DAPI, de manera similar a los casos anteriores. Como control negativo, muestran los resultados obtenidos en células HeLa-P sin transfectar o transfectadas con el vector pRK5 que contiene sólo el inserto de EGFP (vector vacío), que corresponden a los mismos resultados mostrados en las figuras 6 y 12A. Cabe mencionar además que para el caso de la transfección con la Panx1 silvestre, los resultados mostrados en la figura 12B son los mismos que se mostraron en la figura 6 y 12A.

Las tasas de captación registradas en las mutantes T302D y S328D fueron de ~1,3 y ~1,4 veces con respecto a la basal, respectivamente, versus 3,9 veces la basal observada en las células transfectadas con la Panx1 silvestre. Las tasas de captación de estas mutantes no presentaron diferencias significativas con respecto a las captaciones basales. Estos resultados permiten corroborar que la fosforilación en la T302 o en la S328 favorece un estado cerrado de los Panx1 Chs y por tanto, permiten sugerir fuertemente que PKA fosforila estos residuos (basta que uno de ellos esté fosforilado) e induzca el inhibición de los Panx1 Chs.

DISCUSIÓN

Aumento de la actividad de Panx1 Chs por estrés mecánico

En esta tesis se evalúa la actividad de los Panx1 Chs de células HeLa Panx1 frente a distintos estímulos en base al estudio del aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática a DAPI, un colorante del cual hemos descrito que dichos canales son permeables. Este fenómeno se atribuye a la activación de Panx1 Chs dado que es inhibido farmacológicamente con un bloqueador de estos canales, 10 µM CBX y a que además no se observa un aumento de captación de DAPI al someter las células HeLa-P a EM (Figura 1). Los resultados obtenidos no permiten discriminar el origen de un aumento o disminución en la actividad de los canales. Un cambio en la actividad de los Panx1 Chs puede estar dado por cambios en la probabilidad de apertura o conductancia unitaria del canal o por un mayor o menor tráfico de Panx1 a la membrana plasmática que controle el número de canales disponibles en la membrana. En cuanto a las propiedades del canal, se han descrito principalmente dos tipos de estado abierto, uno de baja conductancia (~50 pS) altamente selectivo a Cl⁻ y uno de alta conductancia (hasta ~550 pS en KCl) gatillado por un aumento de K^+ extracelular y otros fenómenos fisiológicos, el cual es permeable a ATP y poco selectivo a pequeñas moléculas (Wang et al., 2014; Wang et al., 2018). Dado que el EM induce la captación de DAPI, se intuye que este estímulo podría desencadenar un estado abierto de alta conductancia, ya que en estas condiciones el canal es permeable a moléculas de hasta 1,5 kDa como ATP (551,2 Da) (Bao et al., 2004). DAPI tiene un peso de 350,25 Da, muy cercano al de ATP, pero aproximadamente 10 veces mayor al de Cl⁻, el cual tiene una masa de 35,45 Da (el diámetro del CI⁻ es de 3,6 Å – calculado a partir del radio iónico de 1,81 Å -, mientras que DAPI es una molécula plana con dimensiones de 15,2 x 3,9 Å). Cabe destacar que no sólo el tamaño podría determinar que una molécula pueda atravesar Panx1 Chs, sino que otras propiedades como la carga, geometría y flexibilidad, entre otras, podrían resultar determinantes, tal como el caso de los hemicanales formados por conexina 39 (Vargas *et al.*, 2017). Para identificar si el EM aplicado a células HeLa Panx1 aumenta la probabilidad de apertura del estado de alta conductancia de los Panx1 Chs, sería necesario estimular mecánicamente las células y posteriormente realizar mediciones de las conductancias unitarias asociadas al canal en parches escindidos, de manera que se pueda conocer el tiempo que el canal permanece abierto (probabilidad de apertura) y el tamaño del poro (conductancia). Adicionalmente, se podría determinar si la estimulación mecánica permite la liberación de ATP.

Por otro lado, y sin descartar lo anterior, es posible que el EM induzca un mayor tráfico de Panx1 a la membrana o disminuya la internalización de Panx1 Chs, lo que se traduce en un mayor número de canales en la membrana celular. De acuerdo a los resultados de esta tesis el EM induce la activación de los MSCs, lo que permite la entrada de Ca^{2+} al citoplasma (Figura 2; Coste *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2010; Yin y Kuebler, 2010). Esto podría facilitar el tráfico a membrana de vesículas que contienen Panx1, ya que el Ca^{2+} está implicado en la fusión de vesículas exocíticas con la membrana plasmática. Lo anterior ha sido investigado principalmente en tejidos nerviosos como en el axón gigante de calamar, donde aumentos de Ca^{2+} desde 100 nM a 100 μ M gatillan eventos de rápidos de exocitosis en sólo 200 μ s (Lin y Scheller, 2000). Para estudiar el tráfico de Panx1 en las células HeLa Panx1, podrían observarse células vivas en un microscopio confocal, valiéndose de que el constructo con el

cual están transfectadas tiene el cDNA de Panx1 de rata fusionado a EGFP, de manera que se podría hacer el seguimiento temporal de la localización de Panx1 frente a distintos estímulos. A su vez, para estudiar si el aumento de Ca²⁺ generado por el EM gatilla un mayor tráfico de Panx1 a la membrana plasmática, se podrían realizar experimentos de microscopía confocal similares en células pretratadas con BAPTA-AM, un quelante de Ca²⁺ que atraviesa la membrana plasmática. Otra aproximación que permitiría estudiar si el EM aumenta la cantidad de Panx1 en la membrana, que resulta ser menos gráfica pero sencilla y que podría realizarse utilizando la captación de colorantes que ya está caracterizada en nuestro laboratorio, sería determinar si se previene la activación de los Panx1 Chs inducida por EM en presencia de un inhibidor de la exocitosis. Sinaptotagmina es una proteína presente en vesículas exocíticas que une Ca²⁺ y funciona como sensor de este ión, ya que frente a incrementos en la concentración intracelular de Ca²⁺ desde 100 nM a 100 µM, se une a proteínas del complejo SNARE presente en la membrana plasmática y media la fusión de membranas para que luego ocurra la exocitosis (Lin et al., 2000). Dado que sinaptotagmina responde a los incrementos de Ca²⁺, un inhibidor de ésta como Nexinhib20 sería un buen candidato a utilizar para estudiar si el aumento de Ca²⁺ inducido por el EM promueve el tráfico de Panx1 a la membrana plasmática (Johnson et al., 2016). Cabe mencionar que mediante estudios de microscopía confocal de células vivas de neuroblastoma Neuro-2A, que expresan Panx1-EGFP, se pudo demostrar la internalización de Panx1 inducida por dos condiciones que aumentan la actividad de los Panx1 Chs: una alta concentración extracelular de K^+ y una alta concentración intracelular de Ca^{2+} , produciéndose un mecanismo de retroalimentación negativo (Boyce et al., 2014). De manera similar, el ATP en concentraciones cercanas a 100 µM permite la activación de los Panx1 Chs mediada por receptores purinérgicos (P2X₇R y P2Y₂R) (Pelegrin y Surprenant, 2006; Locovei *et al.*, 2006a); sin embargo, a concentraciones mayores a 100 μ M inhibe las corrientes mediadas por los Panx1 Chs (Qiu y Dahl, 2009), mientras que en concentraciones de más altas (200 – 500 μ M), induce la internalización de Panx1 al igual que una alta concentración extracelular de K⁺ o intracelular de Ca²⁺ (Boyce *et al.*, 2015).

En los experimentos de captaciones realizadas en células HeLa Panx1 en un medio extracelular libre de Ca²⁺ no hubo activación de los Panx1 Chs cuando sometimos las células a EM, mientras que en ausencia de Mg²⁺ la activación de los Panx1 Chs es similar a la observada en las células expuestas a una solución de registro que tiene ambos cationes (Figura 2C). Sumado a lo anterior, la preincubación con 200 µM La³⁺, un bloqueador de diversos canales permeables a Ca²⁺, previene prácticamente en un 100% la activación de los Panx1 Chs frente al EM (al someter las células a EM la pendiente de captación fue de 1,3 veces el basal) (Figura 2A). Esta pequeña diferencia de 0,3 veces podría dar cuenta de una pequeña proporción de Panx1 Chs que se activaron directamente por el EM o que su activación responde a un canal distinto de los permeables a Ca²⁺. Los resultados mencionados nos permitieron inferir que para que haya una activación de los Panx1 Chs por EM, es necesario que exista un ingreso de Ca²⁺ a través de canales permeables a éste y no de Panx1 Chs, ya que pese a que se ha reportado que Panx1 puede formar canales permeables a Ca²⁺ en el retículo endoplasmático (Vanden Abeele et al., 2006), en nuestro laboratorio hemos demostrado que los de la membrana plasmática no son permeables a Ca²⁺ (Harcha et al., 2019). Experimentos preliminares de nuestro equipo donde se midió la señal de Ca²⁺ en células HeLa-P transfectadas con Panx1 silvestre muestran que la concentración de Ca²⁺ libre intracelular permanece constante, incluso al aumentar la concentración de Ca²⁺ en el medio extracelular desde 3 a 6 mM. Más aún, en células HeLa-P transfectadas con la mutante de Panx1 con ganancia de función S394D (de la cual se discute más adelante), se observó que al aumentar la concentración de Ca^{2+} a 6 o incluso 30 mM, la concentración de Ca^{2+} libre intracelular alcanza el mismo nivel que con una concentración de Ca^{2+} extracelular de 3 mM. Estos experimentos apoyan que los Panx1 Chs no son permeables a Ca^{2+} y que por lo tanto, se requiere de la activación de otro canal permeable a Ca^{2+} que lleve posteriormente a la activación de los Panx1 Chs.

Siguiendo la lógica anterior, los canales permeables a Ca2+ deberían ser los que detectan el EM y por tanto, los mecanosensibles, o bien podría haber otros canales permeables a Ca²⁺ que se podrían activar río debajo de los mecanosensibles; pero no así los Panx1 Chs. Si Panx1 es mecanosensible o no, sigue siendo un asunto discutible. Bao et al. (2004) describieron que en parches escindidos de ovocitos de rana, la aplicación de una rampa de voltaje (-50 a +50 mV) sumado a una presión negativa con la pipeta aumentaba la probabilidad de apertura de los Panx1 Chs. Este resultado sugiere que es propiamente Panx1 la que tiene la propiedad de ser mecanosensible, pero no descarta que junto a los Panx1 Chs el parche contuviera un mecanosensor no identificado. Por otro lado, Reyes et al. (2009) sostienen que los Panx1 Chs no son intrínsecamente mecanosensibles, ya que al someter a células HEK 293T transfectadas con el cDNA de Panx1 a EM dado por un medio hipotónico, no observaron la activación de los Panx1 Chs. En esta misma línea, Seminario-Vidal et al. (2011) describieron que en células de epitelio de vías aéreas de ratón sometidas a un estímulo hipotónico, se requiere de la activación del canal mecanosensible TRPV4, RhoA y fosforilación de la cadena liviana de la miosina dependiente de Rho cinasa para que posteriormente se activen Panx1 Chs. Nuestros resultados apuntan a que el EM activa a los MSCs mediante la inducción de la tensión mecánica que éste genera en la membrana plasmática; luego, los MSCs activos mediarían el ingreso de Ca²⁺, permitiendo la activación de los Panx1 Chs, por tanto, el EM activa a los Panx1 Chs de forma indirecta. Si bien el La³⁺ es un bloqueador de MSCs, no es específico para éstos (Sachs, 2010), se realizaron experimentos con un bloqueador específico para estos canales (GsMTx4; Gnanasambandam *et al.*, 2017), sin embargo, los resultados lamentablemente no fueron concluyentes.

En paralelo, se indagó en específico en la participación de Piezo 1, un tipo de MSCs en la activación de Panx1 Chs por EM, del cual se ha sugerido puede mediar la activación de Panx1 Chs en células sometidas a EM (Miyamoto et al., 2014; Wang et al., 2016; Wei et al., 2019). Para este canal afortunadamente existe un agonista específico, Yoda 1 (Syeda et al., 2015), el cual lo activa y permite la entrada de Ca²⁺ (Figuras 3A y 3B). Este compuesto indujo la activación de los Panx1 Chs (en ausencia de EM), ya que aumentó la permeabilidad a DAPI de manera concentración dependiente y ésta fue sensible a CBX, un bloqueador de los Panx1 Chs (Figuras 3C y 3D). Este resultado es interesante, ya que bajo nuestro conocimiento la única evidencia más contundente que apoya que la activación de Piezo 1 por distrés mecánico por flujo o Yoda 1 induce la activación de los Panx1 Chs es la del grupo de Stefan Offermanns en células endoteliales, donde el tratamiento con un si-RNA contra Panx1 o Panx2 previno la liberación de ATP (Wang et al., 2016). El resultado mostrado en las figuras 3C y 3D concuerda con lo reportado por este grupo. A continuación, quisimos averiguar si la activación de Piezo 1 en células HeLa Panx1 mediante estimulación mecánica también lleva a la activación de los Panx1 Chs, tal como ocurre mediante la activación farmacológica y tal como lo observó el grupo de Stefan Offermanns. Para indagar en esto, nuestra intención fue bloquear Piezo 1 y someter las células HeLa Panx1 a EM, de manera de poder estudiar si ante esto, se prevenía la activación de los Panx1 Chs. Dado que hasta el momento no se han sintetizado bloqueadores farmacológicos específicos contra Piezo 1, nuestra aproximación fue utilizar un oligomero morfolino. En células HeLa Panx1 transfectadas con el morfolino y sometidas a EM, la actividad de los Panx1 Chs se redujo a un 43,3% (250 μ M morfolino Piezo 1) y un 46,3% (500 μ M morfolino Piezo 1), con respecto a la captación de un morfolino control (Figura 3E); por consiguiente, tanto la estimulación farmacológica como la activación de Piezo 1 por EM aumentan la actividad de los Panx1 Chs. Nuestros resultados son consistentes con los trabajos realizados por Miyamoto y colaboradores (2014) y Wang y colaboradores (2016) los cuales dan luces de que podría existir una activación de Panx1 Chs río abajo de la activación de Piezo 1, ya sea en tejido de urotelio, el cual detecta a través de Piezo 1 el llenado de la vejiga y responde secretanto ATP probablemente a través de Panx1 Chs (Miyamoto *et al.*, 2014) o en células endoteliales (HUVEC), donde el estrés mecánico activa a canales Piezo 1, induciendo la liberación de ATP a través de Panx1 Chs y activando una cascada de señalización dependiente de receptores P2Y2, lo cual media la producción de óxido nítrico y produce vasodilatación (Wang *et al.*, 2016).

Pese a que nuestros resultados sugieren que los MSCs (como el canal Piezo 1) podrían sensar directamente el EM dado que son receptores mecanosensibles, no podemos confirmarlo a cabalidad con los experimentos realizados y es posible que existan otros actores moleculares implicados en este mecanismo, Asimismo, nuestros resultados también sugieren que el Ca²⁺ entraría a través de los MSCs para inducir la cascada de señalización de activación de los Panx1 Chs. Sin embargo, tampoco podemos descartar la participación de otros canales permeables a Ca²⁺ activados río abajo de los MSCs que podrían participar en este proceso.

La prevención de la activación de los Panx1 Chs por W-7 (antagonista de calmodulina, Hidaka *et al.*, 1981) y KN62 (inhibidor de CaMKII; Tokumitsu *et al.*, 1990) no resulta ser del 100%, ya que en ambos casos, la tasa de captación de DAPI fue de 1,6 veces respecto al basal (el basal corresponde a la condición sin EM; Figura 4). Esta diferencia de 0,6 veces podría deberse a que el Ca²⁺ no unido a calmodulina podría facilitar la fusión de vesículas exocíticas que contengan Panx1 con la membrana plasmática (Lin *et al.*, 2000). Sin embargo, como se comentó anteriormente, el aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ favorece el transporte retrógrado de Panx1 desde la membrana plasmática al interior (Boyce *et al.*, 2014). Pese a esta disyuntiva, según nuestros resultados el principal componente de la activación de los Panx1 Chs por EM está dado por Ca²⁺ unido a calmodulina y posteriormente a la activación de CaMKII.

Respecto a los resultados mencionados en el párrafo anterior, el uso de KN62 para inhibir CaMKII podría ser discutible, ya que como este compuesto también bloquea a P2X₇R (Gargett y Wiley, 1997) se podría pensar que la inhibición de los Panx1 Chs inducida por EM ocurre por el bloqueo de este receptor purinérgico, del cual se ha descrito que puede mediar la activación de los Panx1 Chs (Pelegrin y Surprenant, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Elliott *et al.*, 2009). Sin embargo, es poco probable que en nuestro modelo la prevención de la activación de los Panx1 Chs por KN62 responda a un bloqueo de P2X₇Rs, ya que la activación de los Panx1 Chs río abajo de la activación de receptores purinérgicos es dependiente de la activación de las SFKs (Iglesias *et al.*, 2008) y según nuestros resultados, el tratamiento con PP2, un inhibidor de las SFKs, no bloquea la activación de los Panx1 Chs inducida por EM (Figura 4). Por otro lado, pese a que las células HeLa expresan el mRNA de P2X₇R, presentan bajos niveles de la proteína y más aún, ésta no es funcional ya que no se caracteriza por inducir la apertura de un poro e inducir apoptosis frente al tratamiento con ATP (Welter-Stahl *et al.*, 2009). Esto apoya la tesis de que nuestros resultados no son dependientes de la activación de P2X₇R. Finalmente, el hecho de que nuestros resultados indiquen que la activación de los Panx1 Chs depende de la fosforilación de un potencial sitio de fosforilación de la proteína Panx1 por CaMKII (S394; Figuras 6 y 8), refuerza la tesis de que en el modelo usado KN62 actúa inhibiendo CaMKII y previniendo así la activación de los canales.

Hasta el momento, los estudios de los grupos de Roger J Thompson (Y308; Weilinger et al., 2012) y Brant Isakson (Y198; Lohman et al., 2015) demuestran que la fosforilación de Panx1 en residuos de tirosina por las SFKs puede activar a los Panx1 Chs. Los resultados de esta tesis indican que además, la fosforilación en serina (S394) aumenta la actividad de los Panx1 Chs, ya que la mutación S394A, la cual impide la fosforilación del residuo aminoacídico, previene la activación de los Panx1 Chs inducida por EM (Figura 6) y la mutación S394D, la cual simula una fosforilación permanente del residuo, arrojó que a las 12 h post transfección y en presencia de suramina (para evitar la internalización de Panx1, ver discusión más adelante), los Panx1 Chs tenían una actividad basal 4,4 veces más alta que los formados por la Panx1 silvestre (0,62 y 0,14 UA/min, respectivamente; figura 8). Este fenómeno no ocurre por un crosstalk con las SFKs ni posible fosforilación en tirosinas, ya que observamos que la activación de los Panx1 Chs es insensible al inhibidor de las SFKs, PP2 (Figura 4). El residuo S394 es un potencial sitio de fosforilación de CaMKII de acuerdo a la búsqueda bioinformática realizada, por tanto nuestros resultados sugieren fuertemente que esta cinasa fosforila la Panx1 y de esta manera aumenta la actividad de los canales. Para comprobar que CaMKII fosforila a Panx1 se proyecta medir los estados de fosforilación de Panx1 en células HeLa Panx1 en condición basal y sometida a EM, ya sea en ausencia como en presencia del inhibidor de CaMKII KN62. Otra aproximación es someter las células HeLa Panx1 a EM, lo cual produciría la fosforilación en la serina 394 y posteriormente medir las corrientes unitarias asociadas a los Panx1 Chs, en ausencia y en presencia de KN62.

El grupo de Leigh Anne Swayne ha indagado arduamente en el tráfico de los componentes de la familia de las Panxs. Ellos han descrito a partir de experimentos de microscopía confocal de células vivas que en células de neuroblastoma Neuro-2A que han sido transfectadas con Panx1-EGFP (las cuales además expresan endógenamente Panx1), el tratamiento con una solución extracelular alta en K⁺, lo cual constituye un estímulo para la activación de Panx1 Chs, permite la observación de vesículas EGFP positivas que transitan de manera retrógrada desde la superficie celular a regiones subcelulares. Un caso similar puede ser lo que ocurre con el tratamiento con el ionóforo de Ca^{2+} A23187, que induce un aumento en la concentración intracelular del catión divalente y por tanto, otro estímulo para la activación de Panx1 Chs. En este caso, la proporción de Panx1-EGFP localizada en la superficie celular fue menor que en la condición control sin el ionóforo (Boyce et al., 2014); sin embargo, con ambos estímulos la cuantificación a partir de micrografías confocales de la Panx1-EGFP internalizada revela que no se produce un aumento significativo de la proporción intracelular de Panx1. Por otro lado, en el mismo modelo celular una alta concentración de ATP (200 - 500 µM, según las concentraciones ensayadas) induce la internalización de Panx1 produciendo un aumento significativo y concentración dependiente de la proporción intracelular de ésta. Este fenómeno es dependiente de la activación de P2X7R, ya que el bloqueo específico de éste con A438079 inhibe dicha internalización y además, se requiere de la interacción física entre P2X₇R y la primera asa extracelular de Panx1 en dicho proceso (Boyce y Swayne, 2017). Curiosamente, esta internalización es dependiente de la activación de P2X₇R, pero no de las rutas de señalización intracelulares inducidas por éste (influjo de Ca²⁺ y activación de SKFs). Se había descrito que ATP inhibe las corrientes mediadas por los Panx1 Chs (Qiu y Dahl, 2009) y en el estudio del mecanismo implicado, se encontraron distintos residuos aminoacídicos localizados en las asas extracelulares de Panx1 que estarían implicados en la sensibilidad a ATP (Qiu *et al.*, 2012). Uno de ellos es el W74, del cual se describió que la mutación a alanina impide la internalización de los Panx1 Chs inducida por ATP (Boyce *et al.*, 2015), dado que este residuo perteneciente a la primera asa extracelular de Panx1, es necesario para la interacción física entre P2X₇R y Panx1 (Boyce y Swayne, 2017). Se desconocen los mecanismos que regulan el tráfico retrógrado de Panx1, ya que pese a que el grupo de Swayne ha encontrado secuencias consenso que interactúan con componentes claves de la endocitosis mediada por clatrina (Boyce *et al.*, 2014), más tarde dilucidaron que consiste en un mecanismo dependiente de colesterol pero independiente de clatrina, caveolina y dinamina (Boyce *et al.*, 2015).

Estos antecedentes dan cuenta de que la estimulación constante de los Panx1 Chs puede llevar a su internalización, lo cual no es extraño, ya que está ampliamente descrito que la estimulación constante de receptores o canales puede llevar a su desactivación y/o internalización (Maier *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2004). En el caso de la mutación de Panx1 S394D, luego de 12 h de tranfección con el constructo mutante nosotros observamos vesículas de un tamaño similar a lo reportado para endosomas, lo cual nos permite pensar que en estas condiciones, Panx1 llega a la membrana plasmática, pero está siendo endocitada, y no que el tráfico a la membrana está afectado, ya que las vesículas exocíticas tienen un tamaño 100 veces menor que el observado por nosotros. Esto nos sugiere, por lo tanto, que la fosforilación del residuo S394 origina un cambio conformacional que produce un canal con ganancia de

función que estaría constitutivamente activo y por tanto, podría permitir una liberación sostenida de ATP, lo cual induciría su internalización. Debido a esto, no observamos un aumento en la actividad basal de los Panx1 Chs de la mutante, respecto a los de la Panx1 silvestre. No obstante, debido a que la internalización de Panx1 inducida por ATP está mediada por P2X₇R, quisimos determinar si el tratamiento con 100 μ M suramina, un bloqueador inespecífico de receptores P2, prevenía la internalización de Panx1. De esta manera, realizamos la transfección de las células HeLa con el vector que contenía la Panx1 S394D y a continuación, tratamos las células con suramina; 12 h más tarde, las células fueron observadas en el microscopio confocal y no observamos el patrón vesicular en la distribución de la Panx1 GFP, de manera que al inhibir los receptores de tipo P2, probablemente prevenimos la internalización de Panx1. En estas condiciones, pudimos favorecer la permanencia de los Panx1 Chs en la membrana plasmática y detectamos que los canales con la mutación S394D tenían una actividad basal 4,4 veces mayor que los formados por la Panx1 silvestre (0,62 versus 0,14 UA/min). Esto nos permitió corroborar que la fosforilación de la S394 es necesaria para la activación de los Panx1 Chs por EM.

La adenosina disminuye la actividad de los Panx1 Chs

Al inicio de esta tesis se quería evaluar el efecto de adenosina en la activación de linfocitos T CD4⁺, condición en la que se produce la activación de Panx1 Chs y permiten la salida de ATP y la activación autocrina de las células (Schenk *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha establecido que la adenosina inhibe la activación de linfocitos T CD4⁺ en un efecto mediado por el receptor A_{2A} (Lappas *et al.*, 2005). Por lo tanto, habíamos hipotetizado que adenosina inhibía la actividad de los Panx1 Chs de linfocitos T CD4⁺ y de esta forma, interrumpía su activación. Para estudiar esta posibilidad se utilizó como modelo experimental células HeLa Panx1. En estas células, una vez que se indujo la activación de los Panx1 Chs mediante EM, la adenosina inhibió su actividad en un efecto concentración dependiente (Figura 9). Según nuestros resultados, lo anterior es además dependiente de un aumento intracelular de cAMP, ya que la simulación de ésto mediante el uso de análogos del nucleótido cíclico tiene el mismo efecto que adenosina (Figura 10). Tal como se discutió al comienzo de la sección anterior, estos resultados no permiten discriminar si adenosina y cAMP reducen la capacidad de apertura o conductancia de los Panx1 Chs, o bien reducen la permanencia de Panx1 en la membrana plasmática. Estas interrogantes se podrían responder mediante experimentos similares a los propuestos en la sección anterior, a través de mediciones de corrientes unitarias en parches escindidos para estudiar la probabilidad de apertura y conductancia unitaria de los Panx1 Chs frente a los tratamientos con adenosina y análogos de cAMP y experimentos de microscopía confocal para estudiar el tráfico de Panx1 en estas condiciones.

La participación de PKA en la regulación de la permeabilidad de los Panx1 Chs a DAPI se explica por los siguientes hallazgos: 1) activadores de PKA a los cuales la membrana plasmática es permeable (análogos de cAMP) lo reprodujeron, mientras que 2) un inhibidor de PKA (PKI) previno la disminución de la actividad de los Panx1 Chs inducida por cAMP, 3) el bloqueo de la captación de DAPI mediada por los Panx1 Chs por parte de los análogos de cAMP ocurre en segundos, apoyando la noción de que podría deberse a modificaciones postraduccionales como fosforilación y no una regulación transcipcional, 4) la disminución de

inhibición de las cinasas PKC, p38 MAPK, Akt o PKG (Figura 11) y 5) la mutación fosforimética de Panx1 en dos sitios potencialmente fosforilables por PKA mantiene los Panx1 Chs inactivos (Figura 12, este punto se comenta más adelante). Todo lo anterior es muy interesante, ya que se había descrito un mecanismo de inhibición de Panx1 Chs en células HEK 293T transfectadas con el cDNA de Panx1, donde frente al tratamiento con un donador de óxido nítrico se induce la activación de PKG, la cual fosforila a Panx1 en la serina 206 e inhibe a los Panx1 Chs (Poornima et al., 2015). Sin embargo, el cAMP actúa por un mecanismo distinto que no involucra la acción de ninguna de las cinasas PKC, p30 MAPK, Akt o PKG. Debido a lo anterior, decidimos indagar si PKA fosforila a Panx1. De esta manera, se buscaron potenciales sitios de fosforilación en Panx1 por PKA y se reemplazaron por alanina, un residuo de aminoácido no fosforilable y no cargado como lo es un residuo fosforilado. Las mediciones de captaciones de colorantes realizadas en esta tesis en células transfectadas con las mutantes, son consistentes con la interpretación que la fosforilación en T302 o la S328 es necesaria para que se inhiba la actividad de los Panx1 Chs inducida por el análogo de cAMP (Figura 12A). Inicialmente esta tesis incorporaba el estudio de los estados de fosforilación de la Panx1 de membrana frente a distintos estímulos, lo que permitiría corroborar la participación de PKA en la fosforilación de aquellos residuos. Esto sería realizado mediante la purificación de proteínas de membrana por biotinilación, posterior inmunoprecipitación de Panx1 utilizando un suero anti- Panx1 conjugado a esferas magnéticas y posteriormente, cuantificando la cantidad relativa por análisis de western blot utilizando el mismo suero anti- Panx1 y anticuerpos anti-P-Ser y anti-P-Thr. La parte inicial del experimento sí funcionó, ya que se obtuvieron bandas reactivas al suero anti-Panx1. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los anticuerpos anti-P-Ser y anti-P-Thr o los resultados fueron poco reproducibles. Es por esto que se recurrió a otra estrategia, que fue la de realizar mutaciones fosfomiméticas en los sitios de los que se sospechaba fosforilación. Es así como la mutación de la T302 y la S328 a aspartato dio cuenta de que la fosforilación en estos sitios inhibe la captación de colorante mediada por los Panx1 Chs (Figura 12B), lo cual podría ocurrir por un cierre de los canales, una disminución en la inserción de canales en la membrana o un aumento en el reciclaje de éstos. Estos resultados constituyen un nuevo mecanismo de regulación de los Panx1 Chs mediado por PKA, donde ocurre una inhibición de los canales por fosforilación en la T302 o en la S328.

En este trabajo se sugiere un mecanismo de regulación de los Panx1 Chs inducido por adenosina actuando probablemente sobre sus GPCRs asociados a la subunidad α s (A_{2A} y A_{2B}). Hasta donde sabemos, no se habían descrito evidencias de la regulación de Panx1 Chs por GPCRs asociados a la subunidad α s. Sin embargo, este mecanismo de regulación podría ocurrir eventualmente como producto de la activación de distintos GPCRs asociados a la subunidad as, ya que éstos también llevarían a un aumento citoplasmático de cAMP y una regulación negativa de la permeabilidad de los Panx1 Chs. En este contexto, sería interesante estudiar si la estimulación de receptores de neurotransmidores como los receptores de dopamina D1, receptores β adrenérgicos y receptores de serotonina 5-HT4/6/7 (Beaulieu *et al.*, 2011; Hoyer et al., 1994; Rasmussen et al., 2011), receptores de hormonas como el de glucagón (Authier and Desbuquois, 2008) y receptores de moléculas como el receptor de histamina H2 (Rodríguez-Pena et al., 2000) también afectan el estado funcional de los Panx1 Chs. Por el contrario, la estimulación de los GPCRs ligados a la subunidad αi/o, como los receptores adrenérgicos a2, los receptores de dopamina D2 y los receptores de serotonina 5-HT_{1/5} (Ayano, 2016; Francken et al., 1998; Hoyer et al., 1994; Schmidt y Weinshenker, 2014) podría conducir a un aumento en la actividad de los Panx1 Chs, ya que inhiben a la enzima adenilato ciclasa y por tanto, la producción de cAMP disminuye y PKA no se activa.

Independiente de que hasta ahora no se habían descrito mecanismos de regulación de los Panx1 Chs que involucren GPCRs asociados a la subunidad α s, la señalización por GPCRs asociados a la subunidad α q/11 se ha relacionado con una activación de los Panx1 Chs, ya que la activación del receptor α 1D por fenilefrina (en la respuesta de vasoconstricción de arterias de resistencia) y del receptor PAR-1 por trombina (en células endoteliales humanas de vena umbilical) índice la secreción de ATP a través de Panx1 Chs (Billaud *et al.*, 2011; Gödecke *et al.*, 2012). Existe evidencia similar con respecto a la activación de los Panx1 Chs mediada por receptores metabotrópicos P2Y. En este caso, el aumento de la actividad de los Panx1 Chs se correlaciona con un aumento citoplasmático en la concentración de Ca²⁺ a través de la señalización por fosfolipasa C (Locovei *et al.*, 2006a).

En este trabajo utilizamos células HeLa que expresan Panx1 Chs como modelo experimental para demostrar que la adenosina inhibe a los Panx1 Chs. Sin embargo, esta respuesta podría tener una importancia fisiológica en el contexto de la activación de linfocitos T CD4⁺, una condición en la que se produce la activación de Panx1 Chs para permitir la liberación de ATP y la activación autocrina de las células (Schenk et al., 2008). Por otro lado, se ha establecido que la adenosina previene la activación de las células T CD4⁺ en un efecto mediado por el receptor A2A (Lappas et al., 2005). Por lo tanto, la inhibición de los linfocitos T CD4⁺ por la adenosina podría explicarse por la inhibición de los Panx1 Chs, evitando así la activación celular. Este era inicialmente el objetivo de esta tesis, sin embargo, dado que los Panx1 Chs participan en la señalización purinérgica en diferentes tipos de células (por

ejemplo, neuronas, astrocitos, células del paladar, células endoteliales, eritrocitos y células del sistema inmunitario) (Bao et al., 2004; Huang et al., 2007; Woehrle et al., 2010; Chandrasekhar y Bera, 2012), la inhibición de estos canales por PKA podría alterar la señalización purinérgica y la propagación de las ondas de Ca²⁺ en diferentes tipos celulares, lo que llevaría a un efecto protector contra las convulsiones y la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, depresión mayor, esquizofrenia que se caracterizan por procesos neuroinflamatorios en el sistema nervioso central inducidos por ATP extracelular y activación de receptores P2 (Engel et al., 2016; Nikolic et al., 2019). Además, la inhibición de los Panx1 Chs podría provocar una alteración de la señalización del gusto y la vasodilatación en respuesta a la hipoxia (Bergfeld y Forrester, 1992; Huang et al., 2007).

Pese a que la inhibición de Panx1 Chs por una concentración extracelular de ATP más allá del rango requerido para la activación del P2X₇R podría ser suficiente para regular los canales (Qiu *et al.*, 2009), nuestros resultados podrían dar cuenta de un complejo sistema de regulación de la actividad de los Panx1 Chs, en donde la estimulación mecánica activaría a Piezo 1, lo cual permitiría la entrada de Ca²⁺, éste se uniría a calmodulina para activar a CaMKII, mediando ésta la activación de los Panx1 Chs. Como estos canales median la salida de ATP, las células podrían entonces liberar el nucleótido, el cual activa a los receptores P2 que aumentan el Ca²⁺ intracelular que puede activar CAMKII que posteriormente activa a los Panx1 Chs, induciendo la liberación de más y más ATP en un mecanismo reverberante. Para regular esta respuesta, la ectonucleotidasa CD39 podría degradar ATP a AMP y la ectonucleotidasa CD73 podría degradar AMP a adenosina (Allard *et al.*, 2017) y esta última podría activar a los receptores P1 A_{2A} y A_{2B}, dando paso a la inhibición de los Panx1 Chs mediada por un aumento intracelular de cAMP y por la actividad de PKA. De esta forma

podría haber una regulación de la actividad de los Panx1 Chs sometidos a EM, de manera que no queden permanentemente activos. Esta vía podría ser especialmente importante en la regulación de la respuesta inmune, ya que las acciones de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se han descrito ampliamente en las células del sistema inmune.

CONCLUSIONES

- En células HeLa Panx1, la activación de los Panx1 Chs requiere de la activación de MSCs como Piezo 1 y la presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular.
- La activación de los Panx1 Chs requeriría de la entrada de Ca²⁺, la cual podría ocurrir directamente a través de MSCs o a través de otros canales permeables a Ca²⁺ activados río abajo de MSCs.
- El complejo Ca²⁺ calmodulina activa a CaMKII, la cual media la activación de los Panx1 Chs a través de la fosforilación en el residuo aminoacídico S394.
- Adenosina inhibe a los Panx1 Chs a través de un aumento de la concentración de cAMP intracelular.
- El cAMP activa a PKA, la cual media la fosforilación de Panx1 en la T302 o S328, lo que inhibe la actividad de los canales formados por ésta.



Figura 13: Regulación de la actividad de Panx1 Chs en células HeLa Panx1 por estimulación mecánica y adenosina. Modelo de las cascadas de señalización que serían activadas tras el estrés mecánico y el tratamiento con adenosina: [1] El estrés mecánico activa directa o indirectamente a MSCs como Piezo 1, [2] permitiendo un aumento en la concentración citoplasmática de Ca²⁺ probablemente por el ingreso del catión divalente a través de los MSCs o de manera indirecta a través de algún canal permeable a Ca²⁺ activado río debajo de los MSCs [3] Ca²⁺ se une a calmodulina y [4] el complejo Ca²⁺ - calmodulina activa a CaMKII. [5] Esta cinasa media la activación de los Panx1 Chs por fosforilación de la serina 394. Por otro lado, [6] adenosina activa una ruta de señalización probablemente a través de sus GPCRs asociados a la subunidad α s (receptores de adenosina A_{2A} y A_{2B}), [7] lo cual activa una ruta intracelular que induce el aumento de cAMP, probablemente por activación de adenilato ciclasa. [8] El aumento citoplasmático en la concentración de cAMP activa a PKA. [9] Esta cinasa inhibe la actividad de los Panx1 Chs mediante la fosforilación de la treonina 302 y/o la serina 328.

REFERENCIAS

Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. Immunol Rev. 2017, 276(1): 121–144.

Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. Cell Mol Life Sci. 2008, 65(12):1880-99.

Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. J Ment Disord Treat 2016, 2:2.

Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. Glia. 2002, 40(3):312-23.

Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett. 2004, 572(1-3):65-8.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics. 2004, 83(4):706-16.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev. 2011, 63(1):182-217.

Beckmann A, Grissmer A, Krause E, Tschernig T, Meier C. Pannexin-1 channels show distinct morphology and no gap junction characteristics in mammalian cells. Cell Tissue Res. 2016, 363(3):751-63.

Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. Cardiovasc Res. 1992, 26(1):40-7.

Bernier LP. Purinergic regulation of inflammasome activation after central nervous system injury. J Gen Physiol. 2012, 140(5):571-5.

Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK, Chekeni FB, Ravichandran KS, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. Circ Res. 2011, 109(1):80-5.

Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. J Biol Chem. 2007, 282(43):31733-43.

Boyce AK, Prager RT, Wicki-Stordeur LE, Swayne LA. Pore positioning: current concepts in Pannexin channel trafficking. Channels (Austin). 2014, 8(2):110-7

Boyce AK, Kim MS, Wicki-Stordeur LE, Swayne LA. ATP stimulates pannexin 1 internalization to endosomal compartments. Biochem J. 2015, 470(3):319-30.

Boyce AK, Swayne LA. P2X7 receptor cross-talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. Biochem J. 2017, 474(13):2133-2144

Boyd-Tressler A, Penuela S, Laird DW, Dubyak GR. Chemotherapeutic drugs induce ATP release via caspase-gated pannexin-1 channels and a caspase/pannexin-1-independent mechanism. J Biol Chem. 2014, 289(39):27246-63.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100(23):13644-9.

Chandrasekhar A, Bera AK. Hemichannels: permeants and their effect on development, physiology and death. Cell Biochem Funct. 2012, 30(2):89-100.

Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS. Pannexin 1

channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. Nature. 2010, 467(7317):863-7.

Cheung WY, Fritton JC, Morgan SA, Seref-Ferlengez Z, Basta-Pljakic J, Thi MM, Suadicani SO, Spray DC, Majeska RJ, Schaffler MB. Pannexin-1 and P2X7-Receptor Are Required for Apoptotic Osteocytes in Fatigued Bone to Trigger RANKL Production in Neighboring Bystander Osteocytes. J Bone Miner Res. 2016, 31(4):890-9.

Chiu YH, Jin X, Medina CB, Leonhardt SA, Kiessling V, Bennett BC, Shu S, Tamm LK, Yeager M, Ravichandran KS, Bayliss DA. A quantized mechanism for activation of pannexin channels. Nat Commun. 2017, 8:14324.

Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science. 2010, 330(6000):55-60.

Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. Nature. 2012, 483(7388):176-81.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95(26):15735-40.

Dahl G. ATP release through pannexon channels. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015, 370(1672).

Dalton GD, Dewey WL. Protein kinase inhibitor peptide (PKI): A family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function. Neuropeptides. 2006, 40(1):23-34.

Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. Glia. 2010, 58(6):730-40.

Drew LJ, Wood JN, Cesare P. Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons. J Neurosci. 2002, 22(12):RC228.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature. 2009, 461(7261):282-6.

Engel T, Alves M, Sheedy C, Henshall DC. ATPergic signalling during seizures and epilepsy. Neuropharmacology. 2016, 104:140-53.

Francken BJ, Jurzak M, Vanhauwe JF, Luyten WH, Leysen JE. The human 5-ht5A receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. Eur J Pharmacol. 1998, 361(2-3):299-309.

Flašker A, Jorgačevski J, Calejo AI, Kreft M, Zorec R. Vesicle size determines unitary exocytic properties and their sensitivity to sphingosine. Mol Cell Endocrinol. 2013, 376(1-2):136-47.,

Gargett CE, Wiley JS. The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. Br J Pharmacol. 1997, 120(8):1483-90.

Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Sáez JC. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. Front Pharmacol. 2013, 4:88.

Gnanasambandam R, Ghatak C, Yasmann A, Nishizawa K, Sachs F, Ladokhin AS, Sukharev SI, Suchyna TM. GsMTx4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels. Biophys J. 2017, 112(1):31-45.

Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2012, 302(6):C915-23.

Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. Nat Med. 2012, 18(4):600-4.

Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. Physiol Rev. 2001, 81(2):685-740.

Harcha PA, López X, Sáez PJ, Fernández P, Barría I, Martínez AD, Sáez JC. Pannexin-1 Channels Are Essential for Mast Cell Degranulation Triggered During Type I Hypersensitivity Reactions. Front Immunol. 2019,10:2703.

Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat Rev Drug Discov. 2008, 7(9): 759–70.

Hidaka H, Sasaki Y, Tanaka T, Endo T, Ohno S, Fujii Y, Nagata T. N-(6-aminohexyl)-5chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981, 78(7):4354-7.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacol Rev. 1994, 46(2):157-203.

Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. Proc Natl Acad Sci USA. 2007, 104(15):6436-41.

Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. Am J Physiol Cell Physiol. 2008, 295(3):C752-60. Iwabuchi S, Kawahara K. Functional significance of the negative-feedback regulation of ATP release via pannexin-1 hemichannels under ischemic stress in astrocytes. Neurochem Int. 2011, 58(3):376-84.

John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JI, Weiss JN. Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. J Biol Chem. 1999, 274(1):236-40.

Johnson JL, Ramadass M, He J, Brown SJ, Zhang J, Abgaryan L, Biris N, Gavathiotis E, Rosen H, Catz SD. Identification of Neutrophil Exocytosis Inhibitors (Nexinhibs), Small Molecule Inhibitors of Neutrophil Exocytosis and Inflammation: Druggability of the small GTPase Rab27a. J Biol Chem. 2016, 291(50):25965-25982.

Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4⁺ T cells. J Immunol. 2005, 174(2):1073-80.

Li S, Tomić M, Stojilkovic SS. Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels. Gen Comp Endocrinol. 2011, 174(2):202-10.

Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:19-49.

Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Lett. 2006a, 580(1):239-44.

Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. Proc Natl Acad Sci USA. 2006b, 103(20):7655-9.

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. FEBS Lett. 2007, 581(3):483-8.

Lohman AW, Weaver JL, Billaud M, Sandilos JK, Griffiths R, Straub AC, Penuela S, Leitinger N, Laird DW, Bayliss DA, Isakson BE. S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. J Biol Chem. 2012, 287(47):39602-12.

Lohman AW, Leskov IL, Butcher JT, Johnstone SR, Stokes TA, Begandt D, DeLalio LJ, Best AK, Penuela S, Leitinger N, Ravichandran KS, Stokes KY, Isakson BE. Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. Nat Commun. 2015, 6:7965.

Maier PJ, Marin I, Grampp T, Sommer A, Benke D. Sustained glutamate receptor activation down-regulates GABAB receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. J Biol Chem. 2010, 285(46):35606-14.

Michalski K, Syrjanen JL, Henze E, Kumpf J, Furukawa H, Kawate T. The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. Elife. 2020, 9.

Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K+ channel. J Biol Chem. 1999, 274(3):1381-7.

Ma W, Compan V, Zheng W, Martin E, North RA, Verkhratsky A, Surprenant A. Pannexin 1 forms an anion-selective channel. Pflugers Arch. 2012, 463(4):585-92.

Maroto R, Hamill OP. Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from Xenopus oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. J Biol Chem. 2001, 276(26):23867-72.

Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in urothelial cell cultures. J Biol Chem. 2014, 289(23):16565-75.

Nikolic L, Nobili P, Shen W, Audinat E. Role of astrocyte purinergic signaling in epilepsy. Glia. 2019, 1–15.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Bioinformatics. 2014, 30(6):884-6.

Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. Curr Biol. 2000, 10(13):R473-4.

Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K+ channel. EMBO J. 1998, 17(15):4283-90.

Patel A, Sharif-Naeini R, Folgering JR, Bichet D, Duprat F, Honoré E. Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states. Pflugers Arch. 2010, 460(3):571-81.

Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X₇ receptor. EMBO J. 2006, 25(21):5071-82.

Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. J Cell Sci. 2007, 120(Pt 21):3772-83.

Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. Mol Biol Cell. 2009, 20(20):4313-23.

Penuela S, Simek J, Thompson RJ. Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. FEBS Lett. 2014, 588(8):1411-5.

Phelan P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. Biochim Biophys Acta. 2005, 1711(2):225-45.

Piehl M, Lehmann C, Gumpert A, Denizot JP, Segretain D, Falk MM. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. Mol Biol Cell. 2007, 18(2):337-47.

Poornima V, Vallabhaneni S, Mukhopadhyay M, Bera AK. Nitric oxide inhibits the pannexin 1 channel through a cGMP-PKG dependent pathway. Nitric Oxide. 2015, 47:77-84.

Qiu F, Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. Am J Physiol Cell Physiol. 2009, 296(2):C250-5.

Qiu F, Wang J, Spray DC, Scemes E, Dahl G. Two non-vesicular ATP release pathways in the mouse erythrocyte membrane. FEBS Lett. 2011, 585(21):3430-5.

Qiu F, Wang J, Dahl G. Alanine substitution scanning of pannexin1 reveals amino acid residues mediating ATP sensitivity. Purinergic Signal. 2012, 8(1):81-90.

Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE, Dubyak GR, Hackos D, Dixit VM. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. J Immunol. 2011, 186(11):6553-61.

Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. Nature. 2011, 477(7366):549-55.

Reigada D, Lu W, Zhang M, Mitchell CH. Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. Neuroscience. 2008, 157(2):396-404.

Reyes JP, Hernández-Carballo CY, Pérez-Flores G, Pérez-Cornejo P, Arreola J. Lack of coupling between membrane stretching and pannexin-1 hemichannels. Biochem Biophys Res Commun. 2009, 380(1): 50-3.

Riquelme MA, Cea LA, Vega JL, Boric MP, Monyer H, Bennett MV, Frank M, Willecke K, Sáez JC. The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels. Neuropharmacology. 2013, 75:594-603.

Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2010, 182(6):774-83.

Rodriíguez-Pena MS, Timmerman H, Leurs R. Modulation of histamine H(2) receptor signalling by G-protein-coupled receptor kinase 2 and 3. Br J Pharmacol. 2000, 131(8):1707-15.

Rumi-Masante J, Rusinga FI, Lester TE, Dunlap TB, Williams TD, Dunker AK, Weis DD, Creamer TP. Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. J Mol Biol. 2012, 415(2):307-17.

Sabirov RZ, Okada Y. ATP release via anion channels. Purinergic Signal. 2005, 1(4):311-28.

Sachs F. Stretch-Activated Ion Channels: What Are They? Physiology. 2010, 25: 50-6.

Sáez PJ, Vargas P, Shoji KF, Harcha PA, Lennon-Duménil AM, Sáez JC. ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors. Sci Signal. 2017, 10(506).

Sahu G, Sukumaran S, Bera AK. Pannexins form gap junctions with electrophysiological and pharmacological properties distinct from connexins. Sci Rep. 2014, 4:4955.

Sandilos JK, Chiu YH, Chekeni FB, Armstrong AJ, Walk SF, Ravichandran KS, Bayliss DA. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. J Biol Chem. 2012, 287(14):11303-11.

Sassone-Corsi P. The cyclic AMP pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012, 4:a011148.

Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Oyarzo MP. Possible role of hemichannels in cancer. Front Physiol. 2014, 5:237.

Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. Sci Signal. 2008, 1(39):ra6.

Scott DB, Michailidis I, Mu Y, Logothetis D, Ehlers MD. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. J Neurosci. 2004, 24(32):7096-109.

Seminario-Vidal L, Okada SF, Sesma JI, Kreda SM, van Heusden CA, Zhu Y, Jones LC, O'Neal WK, Penuela S, Laird DW, Boucher RC, Lazarowski ER. Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. J Biol Chem. 2011, 286(30):26277-86.

Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. J Biol Chem. 2009, 284(27):18143-51.

Schmidt KT, Weinshenker D. Adrenaline rush: the role of adrenergic receptors in stimulant-induced behaviors. Mol Pharmacol. 2014, 85(4):640-50.

Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. Channels (Austin). 2011, 5(3):193-7.

Sridharan M, Adderley SP, Bowles EA, Egan TM, Stephenson AH, Ellsworth ML, Sprague RS. Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010, 299(4):H1146-52.

Staruschenko AV, Sudarikova AV, Negulyaev YA, Morachevskaya EA. Magnesium permeation through mechanosensitive channels: single-current measurements. Cell Res. 2006, 16(8):723-30.

Sugimoto A, Miyazaki A, Kawarabayashi K, Shono M, Akazawa Y, Hasegawa T, Ueda-Yamaguchi K, Kitamura T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Iwamoto T. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells. Sci Rep. 2017, 7(1):17696.

Sukharev S, Sachs F. Molecular force transduction by ion channels: diversity and unifying principles. J Cell Sci. 2012, 125(Pt 13):3075-83.

Swulius MT, Waxham MN. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases. Cell Mol Life Sci. 2008, 65(17): 2637–57.

Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, Petrassi HM, Schumacher AM, Montal M, Bandell M, Patapoutian A. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. Elife. 2015, 4.

Thompson RJ, Zhou N, MacVicar BA. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. Science. 2006, 312(5775):924-7.

Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazi ne, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem. 1990, 265(8):4315-20.

Van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. Nat Immunol. 2008, 9(6):593-601.

Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. J Cell Biol. 2006, 174(4):535-46.

Vargas AA, Cisterna BA, Saavedra-Leiva F, Urrutia C, Cea LA, Vielma AH, Gutierrez-Maldonado SE, Martin AJ, Pareja-Barrueto C, Escalona Y, Schmachtenberg O, Lagos CF, Perez-Acle T, Sáez JC. On Biophysical Properties and Sensitivity to Gap Junction Blockers of Connexin 39 Hemichannels Expressed in HeLa Cells. Front Physiol. 2017, 8:38. Wang J, Ambrosi C, Qiu F, Jackson DG, Sosinsky G, Dahl G. The membrane protein Pannexin1 forms two open-channel conformations depending on the mode of activation. Sci Signal. 2014, 7(335):ra69.

Wang J, Dahl G. Pannexin1: a multifunction and multiconductance and/or permeability membrane channel. Am J Physiol Cell Physiol. 2018, 315(3):C290-C299.

Wang J, Jackson DG, Dahl G. Cationic control of Panx1 channel function. Am J Physiol Cell Physiol. 2018, 315(3):C279-C289.

Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S. Endothelial cation channel Piezo1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. J Clin Invest. 2016, 126(12):4527-4536.

Wei L, Mousawi F, Li D, Roger S, Li J, Yang X, Jiang LH. Adenosine Triphosphate Release and P2 Receptor Signaling in Piezo1 Channel-Dependent Mechanoregulation. Front Pharmacol. 2019,10:1304.

Weilinger NL, Tang PL, Thompson RJ. Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases. J Neurosci. 2012, 32(36):12579-88.

Welter-Stahl L, da Silva CM, Schachter J, Persechini PM, Souza HS, Ojcius DM, Coutinho-Silva R. Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFNgamma in human epithelial cells. Biochim Biophys Acta. 2009, 1788(5):1176-87.

Woehrle T, Yip L, Elkhal A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, Junger WG. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. Blood. 2010, 116(18):3475-84.

Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. Trends Biochem Sci. 2017, 42(1):57-71.
Yin J, Kuebler WM. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. Cell Biochem Biophys. 2010, 56(1):1-18.