

Funciones del dominio C-terminal de la conexina 43 en condrocitos articulares adultos

Raquel Gago Fuentes

Tesis Doctoral UDC / 2016

Directora: Dra. María Dolores Mayán Santos

Co-director: Dr. Francisco Javier García Blanco

Departamento de Medicina

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud¹



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

¹ Programa regulado polo RD 1393/2007: Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

La **Dra. María D. Mayán Santos**, Investigadora y coordinadora del grupo de investigación CellCOM-SB del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y el **Dr. Francisco J. Blanco García**, Director Científico del INIBIC, Reumatólogo del *Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña* (CHUAC – XXIAC) y coordinador del grupo de Reumatología del INIBIC

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de tesis titulada “**Funciones del dominio C-terminal de la Cx43 en condrocitos articulares adultos**” presentada por Doña Raquel Gago Fuentes, para optar al Grado de Doctor, está en disposición de ser presentada para optar al grado de Doctor y cumple los requisitos pertinentes para obtener la mención de Doctor internacional.

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 26 de Enero de 2015.

Fdo. Dra. María D. Mayán Santos

Fdo. Dr. Francisco J. Blanco García

Fdo. Raquel Gago Fuentes

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Gustaríame agradecer ós meus directores de tese a Dra. María Dolores Mayán Santos e ó Dr. Francisco Javier Blanco García a oportunidade brindada hai catro anos. Así como a meu tutor o Dr. Javier de Toro.

Gracias María, gracias por ensinarme o mundo da investigación, a paixón polo traballo, as ganas de querer aprender, de facer máis, de como “isto” ademais dun traballo forma parte de nós. Gracias por confiar en min todos estes anos, por valorarnos como iguais, por ser compañeira, por coidarnos, por preocuparte, por todo, moitas gracias. Gracias porque podo presumir de que desfruto traballando. Un pracer traballar contigo, dubido me atope outra xefa coma ti!!!

Gracias a tódolos meus compañeiros do INIBIC, gracias por contestar sempre a meu moi empregado –*Mira, perdona, esto era...???*- ou –*Vós non teredes...???*- Gracias proteómicos: Beucha, Lucía, Carol, Valentina, Jesús e Patri (Patri, o MALDI foi quen de sobrevivirnos!!); ós xenómicos: Merce, Sara, Ángel, María Eugenia e Estefa; a Mar, Raquel, Isa e Moisés (Moe, gracias por ser o informático de confianza a calquera momento!!!), a Mariajo subministradora de células, a Tamara organizadora de eventos -festivos, a Fani por todos eses escaneos, a Puri, Dolo, María Arufe, Susana, Paloma, Romi, Laura, e seguro me quedará xente ... Gracias a todos por moi bos momentos, foron moitas risas e *friquismos* compartidos e ata aquí podo ler porque o que pasa na cociña alí queda!!!

Gracias a meus compis de café, empezamos sendo grupo reducido –Noa, Marta (“casada” – “virus”) e Marta (“a nosa”) e fomos ampliando; Juan, Adrián, Rocío e Andrés. Gracias chic@s, que a media mañá un “desconectar” sempre ven ben, e quen di a media mañá di a medio pasillo... pero sempre moi xustificado e moi necesario, gracias cafecitos!!

Seguindo polo laboratorio, agradecer ao Dr. Christian Naus e ao Dr. Luc Leybaert o bo trato recibido durante as estadias, agradecemento que se estende a tódolos membros do grupo, en especial a John Bechberger e Nan Wang pola súa inagotable paciencia. A Dr. María de los Ángeles Freire Picos pola súa axuda no laboratorio de departamento de Bioquímica e Bioloxía Celular da Universidade, así como a todo o laboratorio.

Gracias a meus compis de clase que despois de catro anos, seguides sendo “os de clase”, gracias por esas quedadas Roberto, Yas, Laura, Lucía e Miguel.

Agradecimientos

Gracias a miña familia, tí@s e prim@s, que en todas as comidas familiares non se olvidan de preguntarme –*E ti con eso que fas, cómo vas?? Acabas agora??*-, gracias a miñas abuelas por presumir de neta enfermeira... é que eu, a estas alturas, desisto, declárome enfermeira!!

Gracias a meu irmán, Dieguiño meu pobre, que se comeu tódolos *cabreos* e *estreses* habidos e por haber*sorry*, ou non, porque total isto non vai cambiar nunca ;-)!!!

Gracias a miña outra familia especialmente a miñas sempre nenas Noe, Rouchi, Yenía. Gracias porque o peor dos días despois dunhas cañitas con vos bórrase, gracias por aguantarme, que eu creo que a licenciatura en bioloxía deberíadela engadir ao *curriculum*, en serio; porque entre que o herbario máis da metade e de Yenía, o coñecemento dos rodaballos transxénicos de Outi, as preguntas interesadas (que non por cumprir!) de Héctor, os consellos “nada taxantes” de Noe, a atención de Rouchi, o criterio *Apple - Windows* de Diego, ...ahh, Mierdas, non me esquezo da explicación da fotosíntese! Gracias por estar aí, porque para que psicólogos nin terapias si vos teño a vós!!!

Gracias Pauli, chica, estás en varios parágrafos, así que póñoche un todo para ti, que van moitos anos que me sofres, e me sofres, dende aqueles fin de semanas de estudio *modo recluídas on...* ata estes días te aburras das veces que che pregunto polo depósito da tese. Moitas gracias porque a carreira, o mestrado e estes anos de doutorado non serían o mesmo!! (Agora non, pero para investigadores *sénior* (ou como sexa...) ben podemos buscar algo cerquiña!!)

Gracias Anxo, gracias pola túa paciencia, por volver o gris branco, por ver sempre o lado positivo (incluso se non o hai) e ensinarmo (e volvermo a ensinar... *again*), gracias por crer en min máis do que eu o fago, e non cansarte de facelo, gracias!!!

É por último, gracias as dúas persoas cas que sen elas non estaría escribindo isto, gracias porque mo destes todo e mo seguides dando, e creo que nunca chegarei a agradecérvolo o suficiente, mamá papá, moitas gracias!!!

En resumo, moitísimas gracias a todos, todos formades parte desta tese, polo que.....NORABOA DOUTORES!!!

Resumen

RESUMEN

La degeneración de la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular es un evento característico de la artrosis (OA). La comunicación celular a través de canales de conexinas (Cxs) es imprescindible para la correcta coordinación y función de cualquier tejido. Los resultados de este trabajo de tesis demuestran que los condrocitos expresan diferentes tipos de Cxs, formando canales funcionales que permiten la comunicación directa entre dos células en contacto o bien entre la célula y la matriz. Además, se han detectado cambios en la expresión y localización de la conexina 43 (Cx43) y la conexina 45 (Cx45) en el caso de condrocitos en el cartílago de pacientes con OA. Los estudios desarrollados en este trabajo sugieren que el dominio C-terminal (CTD) de la Cx43 a través de interacciones con proteínas podría ejercer funciones diferentes en condrocitos sanos y condrocitos con OA. La delección del CTD en modelos animales disminuye la comunicación celular, afecta a la integridad de la matriz y aumenta la proliferación de los condrocitos. Estos resultados sugieren que alteraciones en la función del CTD de la Cx43 podrían estar implicadas en los cambios de fenotipo que se observan en los condrocitos de pacientes con OA y que desencadenan en la degradación de la MEC del tejido.

RESUMO

A dexeneración da matriz extracelular (MEC) da cartilaxe articular é un evento característico da artrose (OA). A comunicación celular a través das canles de conexas (Cxs) é imprescindible para a correcta coordinación e función de calquer tecido. Os resultados deste traballo de tese demostran que os condrocitos expresan diferentes tipos de Cxs, formando canles funcionais que permiten a comunicación directa entre dúas células en contacto ou ben entre a célula e a matriz. Ademais, detectáronse cambios na expresión e localización da conexina 43 (Cx43) e a da conexina 45 (Cx45) no caso de condrocitos illados da cartilaxe de pacientes con OA. Os estudos desenvolto neste traballo suxiren que o dominio C-terminal (CTD) da Cx43 a través das interaccións con proteínas podería exercer funcións diferentes en condrocitos sans e condrocitos OA. A delección do CTD en modelos animais diminúe a comunicación celular, afecta a integridade da matriz e aumenta a proliferación dos condrocitos. Estes resultados suxiren que alteracións na función do CTD da Cx43 poderían estar implicadas no cambio de fenotipo que se observa nos condrocitos de pacientes con OA e que desencadean a degradación da MEC do tecido.

ABSTRACT

Extracellular matrix (ECM) degeneration of the articular cartilage is characteristic event of osteoarthritis (OA). Cell communication through connexin (Cxs) channels is essential for the correct coordination and function of all tissues. The results of this thesis demonstrate that chondrocytes express different types of Cxs, and form functional channels, which allow the direct communication between two adjacent cells and between the cell and the matrix. Changes in the expression and localization of connexin 43(Cx43) and connexin 45 (Cx45) have been detected in OA chondrocytes. Besides, the interaction of different proteins with the C-terminal domain of Cx43 (CTD) may explain the different functions of Cx43 in healthy chondrocytes and chondrocytes from OA patients. Deletion of the CTD of Cx43 in animal models decreased cell communication, affected the matrix integrity and increase chondrocytes proliferation. These results suggest that changes in the Cx43 functions may be involved in the phenotypic changes observed in chondrocytes from OA patients that trigger cartilage ECM degeneration.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. La artrosis: Definición, prevalencia, factores de riesgo y tratamiento	3
2. El cartílago articular: Composición y funciones	5
2.1. Estructura del cartílago articular y alteraciones asociadas al desarrollo de la artrosis	7
3. Comunicación celular	11
3.1. Conexinas: Tipos de conexinas y estructura	13
3.2. Canales de conexinas: Hemicanales y uniones comunicantes	15
3.3. Funciones: Hemicanales y uniones comunicantes	19
3.4. Conexinas: Enfermedades asociadas	21
3.5. Conexina 43	26

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

Justificación del estudio y objetivos	33
---------------------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras de tejido	37
1.1. Procesamiento de explantes de cartílago	37
1.2. Aislamiento de células del cartílago articular	38
2. Técnicas de microscopía	39
2.1. Microscopía electrónica de barrido	39
2.2. Microscopía óptica y fluorescente	40
2.2.1. Hematoxilina eosina	40
2.2.2. Safranina O <i>fast green</i>	40
2.2.3. Azul de toluidina	40
2.2.4. Procesamiento de las muestras para su análisis mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	41
2.2.5. Inmunohistoquímica	43
2.2.6. Inmunofluorescencia	44
3. Análisis de la expresión génica	46
3.1. Extracción de ARN	46
3.2. Retrotranscripción de ARN	46

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	47
4. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa	47
5. <i>Western blot</i>	49
6. Técnicas para el estudio de la funcionalidad de los canales	53
6.1. <i>Dual voltage clamp</i> e inyección de una molécula fluorescente	53
6.2. Electroporación <i>in situ</i>	53
6.3. Ensayo de hemicanales	55
6.4. <i>Scrape loading</i>	57
7. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	58
7.1. Inmunoprecipitación	59
7.2. SDS-PAGE con tinción en plata y <i>western blot</i>	60
7.3. SDS-PAGE tinción con azul de coomassie, digestión proteica, extracción y purificación de péptidos	61
7.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia	62
7.5. Espectrometría de masas	63
7.6. Ontología de genes	64
8. Ensayo de proliferación	65
RESULTADOS	
1. Estudio de la comunicación celular en condrocitos y cartílago articular	69
1.1. Análisis de la estructura de los condrocitos en cartílago articular	69
1.2. Estudio de la expresión de conexinas en condrocitos primarios	71
1.3. Estudio de la funcionalidad de los canales de la conexina 43 en condrocitos	73
1.4. Estudio de la expresión de conexina 43 en tejido	75
1.5. Estudio de proliferación celular en cartílago articular	78
1.6. Expresión de conexinas en cartílago articular	80
2. Estudio de la actividad de los canales de conexinas en la línea celular de condrocitos T/C-28a2	82
3. Identificación de proteínas que interaccionan con el dominio C-terminal de la conexina 43	90
3.1. Identificación de las proteínas que interaccionan con la conexina 43 en condrocitos aislados de cartílago articular de donantes sanos	90

3.2. Colocalización de la conexina 43 y proteínas identificadas por espectrometría de masas que interaccionan con su dominio C-terminal en condrocitos primarios	95
3.3. Proteínas con localización nuclear que interaccionan con la conexina 43	97
3.4. Proteínas que interaccionan con la conexina 43 en condrocitos aislados de cartílago articular de pacientes con artrosis	99
3.5. Comparación de las proteínas identificadas en este y otros estudio	104
4. Estudio de la función del dominio C-terminal de la conexina 43 en condrocitos primarios y cartílago articular con un modelo animal	106
4.1. Estudio de la comunicación célula – célula, fenotipo celular y proliferación en condrocitos primarios	109
4.2. Estudio del fenotipo de ratones con el dominio C-terminal delecionado en el cartílago articular	111
DISCUSIÓN	
1. Comunicación celular en condrocitos primarios y cartílago articular	117
2. Estudio de los canales de conexinas en la línea celular de condrocitos T/C-28a2 para su potencial uso como modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la artrosis	121
3. Identificación de proteínas que interaccionan con el dominio C-terminal de la conexina 43	123
4. Estudio de la función del dominio C-terminal de la conexina 43 en condrocitos articulares	127
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXOS	165
ARTÍCULOS	205
<i>CURRICULUM VITAE</i>	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Artrosis de rodilla: Gonartrosis	4
Figura 2. Articulación sinovial	5
Figura 3. Estructura del cartílago articular	9
Figura 4. Complejos de unión	12
Figura 5. Representación de los diferentes dominios de la Cx43 en la membrana plasmática	14
Figura 6. Tipos de hemicanales o conexones	16
Figura 7. Tipos de uniones comunicantes según el tipo de Cxs	17
Figura 8. Esquema del proceso de internalización de UCs, formando la estructura <i>annular gap junctions</i>	18
Figura 9. Cámaras de cultivo de 8 pocillos	42
Figura 10. <i>In situ</i> Porator	54
Figura 11. Esquema de las diferentes técnicas realizadas para la identificación de las proteínas que interactúan con el CTD de la Cx43	58
Figura 12. Proyecciones citoplasmáticas entre condrocitos en el cartílago articular	70
Figura 13. Análisis de la expresión de Cxs en condrocitos, primarios aislados de cartílago articular humano	72
Figura 14. Condrocitos primarios de cartílago articular humano forman UCs funcionales	74
Figura 15. Incremento de Cx43 en cartílago articular de pacientes OA	77
Figura 16. Positividad de PCNA en cartílago articular de donantes sanos y pacientes OA	79
Figura 17. Presencia de Cx45, Cx32 y Cx46 en cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA	81
Figura 18. Expresión de Cx43 y estudio de la funcionalidad de los canales de Cxs en condrocitos T/C-28a2	84
Figura 19. Estudio de la comunicación a través de UCs entre condrocitos T/C-28a2	86
Figura 20. Funcionalidad de los hemicanales en condrocitos T/C-28a2 y HCS-2/8	89
Figura 21. Identificación de las proteínas que interactúan con la Cx43	92
Figura 22. Colocalización mediante inmunofluorescencia de la Cx43 con proteínas identificadas por espectrometría de masas	96

Figura 23. Proteínas identificadas por espectrometría de masas y con localización nuclear y perinuclear	98
Figura 24. Clasificación de las proteínas identificadas en condrocitos aislados de cartílago de donantes sanos y pacientes con OA	100
Figura 25. Meta-análisis del total de proteínas que interaccionan con la Cx43	105
Figura 26. Ratones con el CTD de la Cx43 deleccionado exhiben menor talla que ratones con el fenotipo silvestre	108
Figura 27. Ratones con el CTD de la Cx43 deleccionado presentan alteraciones en su comportamiento celular y en su fenotipo	110
Figura 28. Ratones con el CTD de la Cx43 deleccionado presentan alteraciones en la composición de la MEC	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en diferentes Cxs	24
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la realización de las IHQs	43
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la realización de las inmunofluorescencia	45
Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados	48
Tabla 5. Concentración de los reactivos para elaborar un gel de electroforesis SDS-PAGE	49
Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la realización de <i>western blot</i>	52
Tabla 7. Gradiente de elución utilizado en la cromatografía líquida	63
Tabla 8. Proteínas que interaccionan con la Cx43 en donantes sanos relacionadas con el transporte de conexinas y en el ensamblaje - degradación de UCs	93
Tabla 9. Ejemplos de proteínas que interaccionan con la Cx43 en donantes sanos clasificados según el proceso celular en el que participan	94
Tabla 10. Proteínas identificadas exclusivamente en cada grupo	101
Tabla 11. Proteínas identificadas en este estudio y previamente publicadas como relacionadas con el desarrollo y/o progreso de la OA	103

Abreviaturas

ABREVIATURAS

%	del inglés <i>coverage</i>
µg	microgramos
µL	microlitros
ACN	acetonitrilo
AD	alexa dextrano
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNsa	desoxirribonucleasa
ADP	adenosín difosfato
AH	ácido hialurónico
AINE	antiantiinflamatorios no esteroideos
AmBi	bicarbonato amónico
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ácido ribonucleico interferente
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ASB	albúmina sérica bovina
AT	azul de toluidina
ATP	adenosin trifosfato
cAMP	adensín monofosfato cíclico, del inglés <i>cyclic adenosin monophosphate</i>
cap-5'	caperuza 5'
CB	carbofluoresceína
Cbx	del inglés <i>carbonoxolone</i>
CCD	del inglés <i>charge coupled device</i>
ChIP	del inglés <i>chromatin immunoprecipitation</i>
CMTX	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
Co-IP	co-inmunoprecipitación
COL2A	colágeno tipo II
CP	condrocitos primarios
CS	condroitín sulfato
CTD	dominio C-terminal, del inglés <i>C-terminal domain</i>
Cx	conexina
Da	dalton
DAB	diaminobencidina

Abreviaturas

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ddNTPs	didesoxinucleótidos
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
dNTPs	desoxinucleótidos
DTT	ditiotreitol
ECM	del inglés <i>extracellular matrix</i>
ECT	extracto celular total
EDTA	ácido etildiaminotetraacético, del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	ácido tetraacético etileno glicol, del inglés <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EKV	eritroqueratoderma variable, del inglés <i>erythrokeratoderma variabilis</i>
EL	<i>loop</i> extracelular, del inglés <i>extracellular loop</i>
FN	fibronectina
g	gramos
GAG	glucosaminoglicanos
GAP19	del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid 19</i>
GAP27	del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid 27</i>
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GJ	del inglés <i>gap junctions</i>
GO	ontología de genes, del inglés <i>gene ontology</i>
HA	del inglés <i>hematoglutin</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HE	hematoxilina eosina
HID	icitosis ligada a <i>Hystrix</i> con sordera, del inglés <i>hystrix-like ichthyosis with deafness</i>
HPCL	cromatografía líquida de alta eficiencia, del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>
HPRT1	del inglés <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HSP	del inglés <i>heat shock protein</i>
I	intensidad
IAA	iodoacetamida
IHQ	inmunohistoquímica
IL	<i>loop</i> intracelular, del inglés <i>intracellular loop</i>
IL1 β	interleuquina 1 β
IP	inmunoprecipitación
IP ₃	inositol fosfato 3, del inglés <i>inositol phosphate 3</i>
IRES	del inglés <i>internal ribosome entry site</i>

KID	síndrome de queratitis-ictiosis-sordera, del inglés <i>Keratitis-ichthyosis-deafness</i>
KS	queratán sulfato
l	litros
LY	del inglés <i>lucifer yellow</i>
m	mili
M	molaridad
m/z	masa/carga
MALDI	del inglés <i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
mARN	micro ácido ribonucleico
MEC	matriz extracelular
MMP	del inglés <i>matrix metalloproteinase</i>
MS	espectometría de masas
NLS	secuencia de localización nuclear, del inglés <i>nuclear localization sequence</i>
Nº	número
NTD	dominio N-terminal, del inglés <i>N-terminal domain</i>
OA	osteoartritis
ODDD	displasia oculodentodigital, del inglés <i>oculodentodigital dysplasia</i>
OPN	osteopontina
ORF	del inglés <i>open reading frame</i>
Panx	panexina
PBS	del inglés <i>phosphate buffer saline</i>
PBST	del inglés <i>phosphate buffer saline tween</i>
PCNA	del inglés <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PG	proteoglicanos
PMLD	enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher
PMSF	del inglés <i>phenylmethyisulfonyl fluoride</i>
PVDF	del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i>
qPCR	del inglés <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	del inglés <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
ROS	especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	del inglés <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SBF	suero bovino fetal

Abreviaturas

SCR	del inglés <i>score</i>
SDS	del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>
PAGE	del inglés <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEB	suero de embrión bovino
SEM	del inglés <i>standard error of the mean</i>
SO - FG	safranina O <i>fast green</i>
SRY	del inglés <i>sex determining region Y</i>
SV40-LT	del inglés <i>simios virus 40 long T</i>
SYSADOA	del inglés <i>symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis</i>
TBS	del inglés <i>tris buffered saline</i>
TC	T/C-28a2
TFA	trifluoroacético
TIMP	del inglés <i>tissue inhibitors of metalloproteases</i>
T _m	del inglés <i>melting temperature</i>
TM	dominio transmembrana, del inglés <i>transmembrane</i>
TNF α	del inglés <i>tumor necrosis factor α</i>
TOF	del inglés <i>time of fly</i>
TTBS	del inglés <i>tween tris buffered saline</i>
U	unidad
UC	unión comunicante
UTR	del inglés <i>untranslated region</i>
V	voltios
vol	volumen
ZO-1	del inglés <i>zonula occludens 1</i>

Introducción

1. LA ARTROSIS: DEFINICIÓN, PREVALENCIA, FACTORES DE RIESGO Y TRATAMIENTO

La Sociedad Española de Reumatología (SER) define la osteoartritis o artrosis (OA) como una patología reumática que lesiona el cartílago articular lo que produce dolor, rigidez e incapacidad funcional (**Figura 1**). Según la OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*), la OA es una patología que afecta a las articulaciones móviles, caracterizada por la degradación del cartílago, remodelamiento óseo, formación de osteofitos, inflamación de la articulación y pérdida de su función. Normalmente la OA se desarrolla en la columna cervical y lumbar, algunas articulaciones del hombro y de los dedos de las manos, la cadera, la rodilla y la articulación del comienzo del dedo gordo del pie.

Estudios epidemiológicos han permitido determinar diversos factores de riesgo en el desarrollo de la OA¹. Se consideran factores de riesgo: edad, sexo, estrógenos, origen étnico, susceptibilidad génica, hipercolesterolemia, obesidad, malformaciones congénitas o adquiridas, traumatismos, patología meniscal y meniscectomía, actividad profesional y deportiva y fuerza muscular. A día de hoy no se puede afirmar que la OA sea una enfermedad hereditaria ya que no presenta un patrón fijo de herencia y de hecho, en la gran mayoría de los casos probablemente se origine por una influencia multifactorial.

La prevalencia de la OA difiere según la articulación afectada y según se utilice una definición radiológica o sintomática de la enfermedad². Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2003 un 28 % de la población mundial mayor de 60 años padecía OA y un 80 % de ella presentaba limitaciones en sus movimientos³. En España* se calcula que la OA afecta al 10 % de la población general. Siete millones de españoles mayores de 20 años padecen artrosis de rodilla, mano o columna. Según el estudio EPISER* de la SER, la OA sintomática de rodilla tiene una prevalencia puntual del 10,2 % y la artrosis de mano del 6,2 %. Alrededor de la mitad de la población adulta de más de 50 años muestra signos radiológicos de la OA de rodilla aunque es más frecuente en mujeres, sobre todo a partir de 55 años (* Datos del 2014).

En España los pacientes con OA representan el 25 % del total de consultas atendidas por los reumatólogos. La Guía de Buena Práctica Clínica en OA del Ministerio de Sanidad y Consumo recoge en 2014 que un 35 % de las visitas a atención primaria son ocasionadas por la OA y es responsable de más del 30 % de las bajas laborales, tanto temporales como permanentes.

A día de hoy, el tratamiento de la OA se basa en una combinación de medidas que actúen en conjunto para reducir el dolor y mejorar la función articular. A día de hoy no es posible prevenir la progresión de la enfermedad. Por este motivo el tratamiento de la OA se centra principalmente en controlar el dolor. Para ello farmacológicamente se utilizan analgésicos simples como el paracetamol, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los fármacos de acción lenta (SYSADOA, del inglés *symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis*) como el condroitín sulfato, la glucosamina o la diacereina. Si esta primera aproximación no es eficaz se puede utilizar analgésicos alternativos como el tramadol y también están indicadas las inyecciones de corticoides o ácido hialurónico. En los casos de OA severa, el tratamiento final es la cirugía protésica sustituyendo la articulación completa por una prótesis sintética⁴.

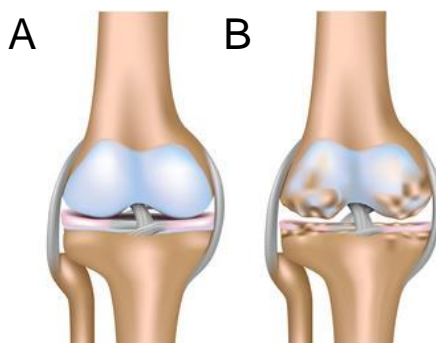


Figura 1. Representación de la artrosis de rodilla: Gonartrosis. (A) Rodilla sana, cartílago articular (tejido representado de color blanco-azulado) no lesionado. (B) Rodilla OA, cartílago articular lesionado. Imagen obtenida a partir del siguiente enlace: <http://www.creasalud.com/artrosis.html>.

A partir de bases de datos administrativas se han realizado estimaciones del peso económico de la OA en diferentes países. En España según el estudio ARTROCAD* sobre la utilización de recursos sanitarios y la repercusión socioeconómica de la OA de rodilla y cadera, el coste anual medio de ambas patologías ascienden a 1.502 € por paciente, suponiendo un total de 4.738 millones de euros anuales, lo que representa un 5,5 % del PIB (Producto Interior Bruto) español. Este gasto incluye: gastos asistenciales (46 %), bajas laborales (22 %), ingresos hospitalarios (13 %), pruebas diagnósticas (17 %) y medicamentos (5 %).

2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR: COMPOSICIÓN Y FUNCIONES

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado que recubre las superficies de los huesos en las articulaciones móviles, también denominadas sinoviales o diartrodiales, permitiendo el movimiento del esqueleto sin que se produzca dolor. Este tipo de articulaciones presentan una cápsula fibrosa externa y un tejido o membrana sinovial interna (**Figura 2**). Las células de la membrana sinovial son las responsables de secretar el líquido sinovial, un líquido viscoso, de color amarillo pálido y transparente cuyas funciones son reducir el rozamiento de las superficies articulares, lubricar la articulación y nutrir los condrocitos articulares⁵.

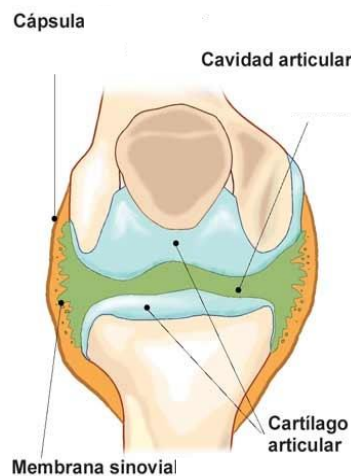


Figura 2. Representación de una articulación sinovial. En la imagen se muestra: (i) la cápsula articular formada por tejido fibroso; (ii) cavidad articular con el líquido sinovial; (iii) cartílago articular y (iv) membrana o tejido sinovial que recubre internamente la cápsula articular. Imagen obtenida a partir del siguiente enlace: http://www.wikideporte.com/wiki/Cavidad_articular.

El cartílago articular proporciona una superficie de aspecto liso y color blanquecino con especiales características biomecánicas. Los componentes que forman la matriz extracelular (MEC) son los responsables de las propiedades físicas que caracterizan al tejido y que hacen que su superficie se deforme ante presiones, retornando a su espesor original cuando las fuerzas cesan. Su espesor varía entre 0.2 y 2 mm siendo mayor en los puntos de presión y de deslizamiento de la articulación. El cartílago articular es un

tejido elástico a la presión y se comporta como un elemento de amortiguación frente a golpes. Su desaparición acarrea el desgaste rápido del hueso por presión y frotamiento recíproco⁶. Cabe destacar que el cartílago articular de adultos no posee vasos sanguíneos, linfáticos y no está innervado. Debido a estas características, se cree que las células que lo forman se nutren por difusión de los nutrientes y moléculas provenientes del líquido sinovial o bien del hueso subcondral^{7, 8}.

Las articulaciones sinoviales están diseñadas para soportar el desgaste debido al peso del cuerpo a lo largo de la vida. En la OA se produce una degeneración progresiva del cartílago articular lo que disminuye la absorción de impactos y la lubricación en la articulación. Como resultado las articulaciones se hacen más vulnerables a la fricción repetida que tiene lugar durante los movimientos, lo que causa dolor y rigidez. El cartílago articular pierde su estructura y función^{9,10,11,12}.

Este tejido está compuesto por un único tipo celular, los condrocitos que son las células encargadas de sintetizar los componentes que forman la MEC constituida principalmente por colágenos, proteoglicanos (PGs), agua y otras glicoproteínas¹³.

El agua representa entre el 65 – 80 % del volumen total del cartílago articular. El porcentaje de agua disminuye desde la zona superficial (80 %) hasta la zona profunda (65 %) y permite al tejido deformarse en función de la carga sufrida durante el movimiento. Actúa como lubricante de la zona superficial disminuyendo las fricciones durante los deslizamientos.

Entre un 10 – 20 % total de la MEC está constituido por diferentes tipos de colágenos, principalmente por colágeno tipo II (COL2A). Los diferentes tipos de colágeno forman un entramado de microfibrillas (**Figura 3A**) donde cada tipo tiene su función. El COL2A es el tipo de colágeno más abundante en la MEC (90 – 95 %) proporcionando resistencia a las fuerzas de tracción. El colágeno tipo VI se encuentra principalmente en la matriz pericelular y participa en el proceso de adhesión de los condrocitos a la MEC. El colágeno tipo IX se entrecruza a las superficies de las macrofibras proporcionando resistencia a las fuerzas de tensión y actuando en la conexión interfibrilar. El colágeno tipo XI que participa en la formación de fibras. Por otra parte, el colágeno tipo X está vinculado a células hipertróficas en la zona de calcificación participando en la mineralización del cartílago.

Los PGs suponen entre el 10 – 20 % del peso total de la MEC proporcionando resistencia a las fuerzas de compresión. Están compuestos por una proteína central a la cual se unen cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son disacáridos

compuestos por ácido glucurónico alternado con N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Los GAGs se unen a una serina de la proteína central por medio de un trisacárido formado por galactosil-galactosil-xilosa. Por su naturaleza estructural (grupos carboxilo y sulfato), los GAGs, son aniónicos. Además el ácido glucorónico a pH fisiológico se ioniza y estas cargas negativas atraen a un gran número de moléculas de agua². En el cartílago los principales GAGs son el condroitín-sulfato y el queratán-sulfato. Hay dos tipos de condroitín-sulfato, tipo 4 y tipo 6. El condroitín-sulfato tipo 6 permanece constante a lo largo de la vida mientras que el tipo 4 disminuye con la edad¹³. El agregano es el principal proteoglicano del cartílago (**Figura 3A**), está compuesto por una proteína central de 230 kDa a los que se unen condroitín-sulfato y queratán-sulfato. La masa molecular total puede llegar hasta los 2.200 kDa¹. A su vez, las moléculas de agregano se unen mediante una cadena central de ácido hialurónico. Otros PGs, de menor peso molecular incluyen a la decorina, biglicano o fibromodulina. Los PGs mantienen el balance hídrico y de electrolíticos en el cartílago. Los grupos sulfato y carboxilo de los GAGs atraen a moléculas con carga positiva y repelen a las de carga negativa. Esto incrementa la concentración de iones inorgánicos en la matriz, incrementando la osmolaridad en el cartílago.

Los condrocitos representan entre 1 – 5 % del volumen total del tejido, se encargan de sintetizar todos los componentes de la MEC y regular su metabolismo. Los condrocitos se caracterizan por¹³: (i) estar localizados en lagunas dentro de MEC, (ii) alta actividad metabólica que permite la síntesis y mantenimiento de la MEC, (iv) supervivencia a bajas concentraciones de oxígeno y (v) niveles bajos de proliferación celular en el cartílago adulto. Las cargas mecánicas de la articulación son muy importantes porque van a regular el funcionamiento del tejido y fenotipo celular.

2.1. Estructura del cartílago articular y alteraciones asociadas al desarrollo de la OA

En el cartílago articular se diferencian morfológicamente cuatro zonas desde la zona superficial, en contacto con el líquido sinovial, hasta la zona calcificada que se extiende hasta el hueso subcondral. Histológicamente se observa dicha división en función de la profundidad ya que los condrocitos presentan características morfológicas diferentes en cada zona. A continuación se detallan las características de cada zona que aparecen representadas en la **Figura 3C**.

Zona Superficial. La zona superficial es la capa más fina, en ella se encuentran condrocitos elipsoidales y aplanados, orientados paralelamente a la superficie de la articulación y cubiertos por líquido sinovial. La MEC en esta zona está compuesta mayoritariamente por fibras de colágeno dispuestas paralelamente proporcionando resistencia a fuerzas de tensión. Alteraciones en la zona superficial conllevan cambios en las propiedades mecánicas del cartílago, lo que contribuye al desarrollo de OA. La zona superficial impide el paso de macromoléculas al interior del cartílago, tales como las del sistema inflamatorio presentes en el líquido sinovial.

Zona Intermedia. Presenta una baja densidad celular, donde predominan condrocitos de forma esferoidal embebidos la MEC. Las fibras de colágeno se disponen al azar y aumenta la concentración de PGs.

Zona Profunda. Los condrocitos se disponen perpendicularmente a la superficie y tienen una forma esferoidal. En esta zona se dan las mayores concentraciones de PGs y colágeno y la menor densidad celular en el caso de cartílago de adultos.

Zona calcificada. Se caracteriza por tener un menor número de condrocitos embebidos en una MEC mineralizada y con una baja actividad metabólica. Se ha descrito que estos condrocitos sintetizan colágeno tipo X, el cual aporta integridad estructural y junto con el hueso subcondral participan en los procesos de amortiguación. La zona calcificada está separada de la zona profunda por una línea visible denominada línea de marea (del inglés *tidemark*). La *tidemark* tiene especial afinidad por las tinciones básicas, como el azul de toluidina (AT). Esta zona actúa como zona de transición entre el cartílago y el hueso subcondral, donde se pierden las propiedades elásticas y de resistencia que el cartílago aporta¹⁴. En 1992, Hunzinker *et al.* demostraron que los condrocitos de la zona calcificada son metabólicamente activos e incluso especuló sobre alteraciones temporales de su metabolismo después de daños sufridos en el cartílago¹⁵. Éste y otros trabajos han dado lugar a nuevos estudios que tratan de entender la comunicación entre el cartílago y el hueso subcondral y su implicación en el desarrollo de patologías tales como la OA^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23}.

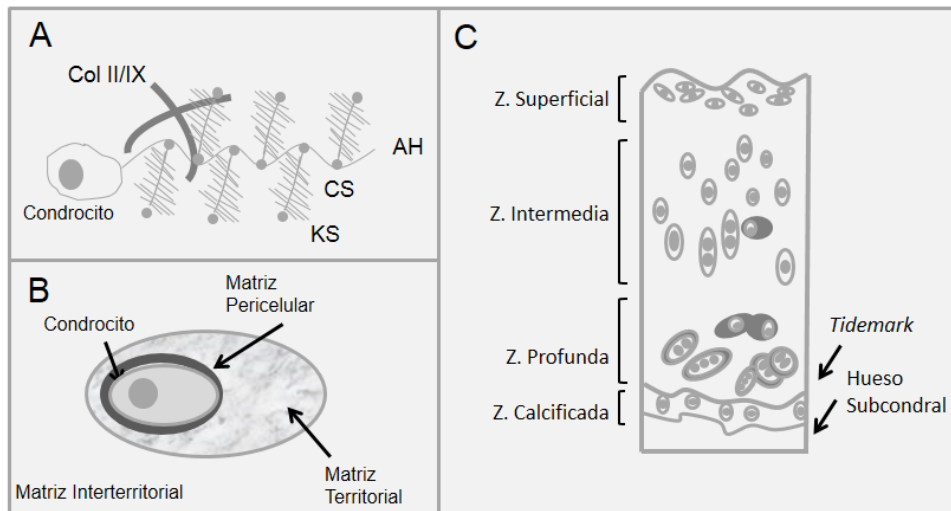


Figura 3. Estructura del cartílago articular. (A) Esquema representativo de la estructura del agregano (CS = condroitín sulfato / KS = queratán sulfato / AH = ácido hialurónico) secretado por un condrocito. En la MEC también se representan las fibras de COL2A (Col II) y colágeno tipo IX (Col IX). (B) Esquema de la organización de una laguna indicando la localización de la matriz pericelular, territorial e interterritorial alrededor de un condrocito. (C) Esquema de las cuatro zonas en las que se puede dividir el cartílago articular. Imagen adaptada de: Bhosale et al.¹³.

La MEC varía su composición no sólo con la profundidad del cartílago articular sino también con la distancia al condrocito (**Figura 3B**). Así diferenciamos entre matriz pericelular, territorial e interterritorial¹³. La matriz pericelular se dispone alrededor del condrocito, en contacto con la membrana celular. Los PGs y las proteínas no colágenas son abundantes en esta región, también hay colágeno no fibrilar como el colágeno tipo VI. La matriz territorial envuelve la matriz pericelular de condrocitos individuales o de un grupo de condrocitos dentro de la misma laguna (formación conocida como condrón) y está presente en todo el cartílago²⁴. Las fibras de colágeno se disponen entrecruzadamente rodeando los condrones protegiéndolos de impactos mecánicos. La matriz interterritorial es la representa un mayor volumen en la MEC. En ella nos encontramos con las fibras de colágenos de mayor diámetro, orientadas según la zona del cartílago respecto a la profundidad del tejido, en paralelo en la zona superficial y en perpendicular en la zona profunda. A diferencia de la matriz pericelular y territorial, en la matriz intraterritorial hay agregación de PGs, como el agregano.

Como se ha dicho anteriormente, entre las funciones de la MEC se podrían destacar: (i) proteger a los condrocitos de cargas mecánicas regulando su fenotipo, (ii) permitir el

contacto con diferentes moléculas tales como citoquinas y factores de crecimiento, (iii) participar en la difusión de nutrientes entre condrocitos y (iv) actuar como elemento de transducción de señales entre células localizadas entre lagunas proximales y distantes.

La OA es una enfermedad articular crónica y degenerativa; que causa dolor, rigidez y pérdida de función en las articulaciones. Se caracteriza por la degradación del cartílago articular, inflamación de la articulación y alteraciones a nivel del hueso^{25, 26}. Aunque la OA afecta a todos los tejidos que forman la articulación²⁷, un aspecto importante es la destrucción y pérdida del cartílago articular. Se desconoce el mecanismo molecular implicado en la pérdida de la homeostasis y la incapacidad de reparación del cartílago articular en los pacientes con OA, sin embargo se ha descrito que la causa final de daño en el cartílago se debe a la degradación de los componentes que forman la MEC, especialmente colágeno y PGs²⁸ debido a un aumento de la expresión de enzimas que degradan la MEC, tales como diferentes metaloproteasas (MMPs)²⁹. El desequilibrio entre las reacciones de anabolismo y catabolismo; la formación y degradación del tejido, conllevaría a una pérdida de la homeostasis tisular.

Las MMPs representan una extensa familia de proteínas codificadas por 24 genes en humanos y 23 en ratón³⁰. Como su nombre indica requieren de iones metálicos, en concreto, de zinc para poder hidrolizar sus correspondientes sustratos. Entre las MMPs se encuentran diferentes tipos de colagenasas, estromelisininas y gelatinasas entre otras^{31, 32, 33}. Su principal función es la remodelación de la MEC de los tejidos, aunque desde hace años se ha aceptado que las MMPs no solo actúan sobre sustratos de la matriz extracelular, sino también sobre factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas^{31, 32}. Incluso se ha observado que son capaces de escindir proteínas intracelulares lo que permite su participación en una amplia variedad de funciones celulares tales como: diferenciación, migración celular, regulación de la actividad de factores de crecimiento, supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis o procesos inflamatorios³⁰. La actividad de las MMPs está regulada a nivel transcripcional, por su activación proenzimática y por la inhibición endógena mediante las proteínas denominadas TIMPs (del inglés, *tissue inhibitors of metalloproteases*).

3. COMUNICACIÓN CELULAR

El prerequisite básico para el mantenimiento de la homeostasis de un tejido es la interacción de las diferentes redes de señalización extracelular, intracelular e intercelular entre las células que lo conforman³⁴. La aparición de organismos multicelulares impulsó el estudio de mecanismos implicados en la comunicación celular directa, que permitan que las células actúen de forma coordinada. Algunos de estos mecanismos dependen de la difusión intercelular de moléculas de señalización y otros requieren del contacto célula - célula o célula - matriz³⁵.

La comunicación celular es la capacidad que tienen las células de intercambiar información con el medio extracelular y/o con otras células, permitiendo responder coordinadamente ante estímulos internos o externos. Podemos diferenciar entre tres sistemas de comunicación: extracelular, intracelular e intercelular³⁶. En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio de la comunicación intercelular, la comunicación entre dos células adyacentes mediante el desarrollo de uniones intercelulares especializadas denominadas complejos de adhesión que permiten la formación de canales de comunicación directa (**Figura 4**). Los complejos de adhesión proporcionan solidez estructural al tejido (uniones adherentes, uniones estrechas y desmosomas), permitiendo que las células adyacentes se mantengan muy próximas entre sí y puedan formar canales de conexinas (Cxs) entre ambas células que permiten el contacto entre citoplasmas celulares (uniones comunicantes, UCs). La alteración de los complejos de adhesión y de las UCs afecta a la función del tejido pudiendo desencadenar el desarrollo de patologías entre las que se incluyen diferentes tumores³⁷. Entre los complejos de adhesión, la comunicación intercelular mediada por UCs podría describirse como la más crítica para el mantenimiento de la homeostasis y función tisular^{36, 38}, debido a que regula numerosos procesos fisiológicos, tales como proliferación celular, acoplamiento metabólicos, químico y eléctrico o transmisión de señales de muerte celular, entre otros procesos^{39, 40, 41, 42}.

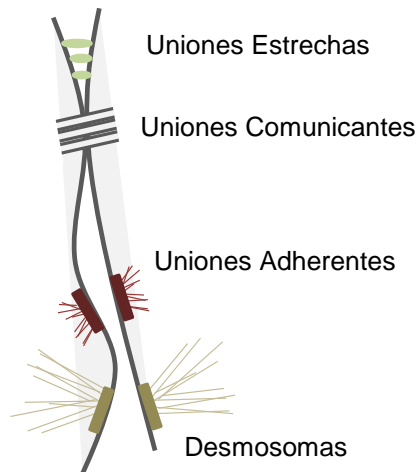


Figura 4. Complejos de unión. En la figura se representan esquemáticamente diferentes tipos de complejos de unión entre los que destacan: (i) las uniones estrechas, (ii) las UCs que forman canales de comunicación entre las células adyacentes permitiendo el paso de señales metabólicas, químicas y eléctricas, (iii) uniones adherentes y (iv) desmosomas. Imagen adaptada del siguiente enlace: <http://www.asturnatura.com/articulos/envoltura-celular/membrana-plasmatica-uniones-intercelulares.php>.

En organismos invertebrados las UCs están formadas por inexas, mientras que en vertebrados están formadas por Cxs⁴³. Ambas familias proteicas comparten características estructurales aunque presentan poca homología entre sus secuencias de aminoácidos. Por otra parte, las inexas presentan características estructurales y de secuencia similares con las panexas (Panx)⁴⁴, otra familia de proteínas capaces de formar hemicanales en vertebrados pero que a día de hoy, todavía no está claro si son capaces de formar UCs. La capacidad de formación de UCs por parte de las Panxs podría estar limitada por los procesos de glicosilación que sufren en sus dominios extracelulares⁴⁵. Sin embargo, el descubrimiento de las Panxs⁴⁶ ha complicado el estudio de las funciones de las Cxs, ya que ambas presentan una topología muy similar y permiten el flujo pasivo de pequeñas moléculas entre el interior celular y el medio extracelular^{47, 48, 49}.

3.1. Conexinas: Tipos de conexinas y estructura

Las Cxs son proteínas transmembrana responsables de la comunicación célula - célula mediante la formación de UCs y célula - matriz mediante la formación de conexiones o hemicanales⁵⁰. A día de hoy se han descrito 21 tipos de Cxs en humanos y 20 en ratones⁵¹. Las Cxs se denominan según su peso molecular (de 26 a 59 kDa) precedido de Cx, por ejemplo: Cx26, Cx32 o Cx43⁵². Cuando dos o más Cxs tienen un peso molecular muy similar se utiliza el punto decimal para diferenciarlas, por ejemplo Cx30.3 o Cx31.1⁵³. Según la similitud de secuencia y la longitud de los dominios citoplasmáticos se dividen en cinco subgrupos: α , β , γ , δ y ϵ ⁵⁴, utilizando el prefijo GJ (UC, del inglés *Gap Junctions*) seguido del número que indica el orden de descubrimiento. Por ejemplo: GJ β 1 (Cx32, la primera Cx descubierta del subgrupo β) o GJ α 1 (Cx43, la primera Cx descubierta del grupo α). La nomenclatura más común es la primera⁴⁹.

A nivel de secuencia génica, la mayoría de las Cxs presentan una estructura común que consiste en dos exones separados por un intrón. La longitud del intrón varía entre las diferentes Cxs. El primer exón contiene únicamente la región 5'-UTR mientras que el segundo exón contiene la región codificante completa. La transcripción de las Cxs está regulada por una combinación de factores de transcripción, algunos de ellos específicos de tejido. La regulación de su expresión ocurre en un período de tiempo muy corto en respuesta a cambios fisiológicos⁵⁴.

Las Cxs son co-traduccionalmente insertadas en la membrana del retículo endoplasmático donde son plegadas con la ayuda de las chaperonas. En el caso de no alcanzar una correcta conformación son degradadas a través de la vía proteosomal^{55, 56}. Durante su transporte entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi las Cxs se ensamblan en hexámeros dejando un poro hidrofílico central; estas estructuras se denominan hemicanales o conexones^{57, 58}.

Respecto a la topología de las Cxs, estas proteínas están formadas por nueve dominios⁵³, tal y como se muestra en la **Figura 5**: cuatro dominios transmembrana: TM1, TM2, TM3 y TM4, un dominio N-terminal (NTD, del inglés *N-terminal domain*), un dominio C-terminal (CTD, del inglés *C-terminal domain*) y tres dominios hidrofílicos (2 *loops* extracelulares, EL1 y EL2; y un *loop* intracelular, IL1).

Los cuatro dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana y los dos *loops* extracelulares contienen residuos o sustituciones conservadas entre las diferentes Cxs. En cambio, los dominios citoplasmáticos (IL1 y CTD) presentan menor homología entre

las diferentes Cxs. El CTD es el dominio más variable tanto en longitud como en su composición de aminoácidos⁵³.

Las regiones extracelulares son las responsables del acoplamiento de los hemicanales entre células adyacentes mediante fuerzas no covalentes formando así las UCs⁵⁹. En los *loops* extracelulares, destacan seis residuos de cisteína, tres en cada *loop*. Estudios bioquímicos han demostrado que estas cisteínas participan en la formación de puentes disulfuro intramoleculares pero no intermoleculares^{60, 61}, se ha descrito que mutaciones en alguno de estos residuos de cisteínas por serinas impide la formación del canal^{62, 63} que representa no solo el acoplamiento eléctrico y químico si no también la especificidad, la formación selectiva de uniones heterotípicas^{64, 65}. En el caso de la Cx43, Cx46 y Cx56 las interacciones heterotípicas entre hemicanales compuestos por diferentes Cxs parecen depender por la secuencia del EL2⁶⁶.

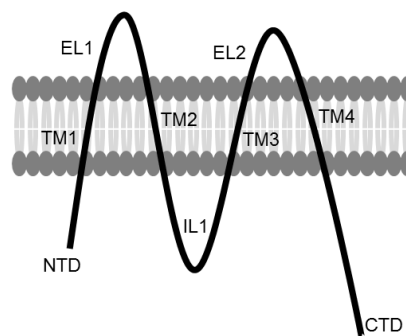


Figura 5. Representación de los diferentes dominios de la Cx43 insertada en la membrana plasmática.

Las modificaciones químicas que sufren las conexinas después de su traducción son una importante herramienta para la regulación de la actividad de las UCs y hemicanales. Las modificaciones posttraduccionales que se han descrito para las Cxs incluyen: fosforilación, ubiquitinización, hidroxilación, acetilación, γ -carboxilación, metilación, deaminación, unión de grupos sulfuro, S-nitrosilación, palmitoilación o sumoilación^{67, 68, 69, 70, 60}. Algunas modificaciones están implicadas en actividades de la proteína que son independientes de los canales, en la apertura y cierre del canal o en el acoplamiento metabólico de las células a través de las UCs. Otras modificaciones están implicadas en la regulación del ciclo de vida de las Cxs: transporte, ensamblaje, desensamblaje y

degradación. La ubiquitinización por ejemplo se ha descrito que regula el transporte y el remplazo de las Cxs⁵⁴.

La fosforilación de las Cxs es la modificación posttraduccional más estudiada. Fue descubierta en los años 80⁷¹ y desde entonces se han identificado una amplia variedad de sitios de fosforilación especialmente dentro de la secuencia de la Cx43. La fosforilación mediada por diferentes quinasas en los residuos de serina, treonina y tirosina dentro del CTD, se ha definido como el mayor evento regulador bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Además de modificar la interacción de las Cxs con otras proteínas⁷², la fosforilación se ha descrito como marca esencial durante el ensamblaje de las Cxs en hemicanales y en la correcta composición y función de las UCs. La fosforilación también afecta a funciones de las Cxs que ocurren de forma independiente a la actividad del canal, como por ejemplo el control de la proliferación celular ejercido por la Cx43⁷³.

3.2. Canales de conexinas: hemicanales y uniones comunicantes.

Los hemicanales pueden estar formados por seis Cxs idénticas (homomérico) o diferentes (heteromérico), tal y como se detalla en la **Figura 6**, la mayoría de las células expresan dos o más tipos de Cxs. En algunos casos, la coexpresión de diferentes Cxs en la misma célula permite la existencia de mecanismos compensatorios ante pérdidas o mutaciones en alguna Cxs, tal como la coexpresión de Cx26 y Cx32 en hepatocitos, donde en ciertas condiciones la pérdida de función de la Cx26 debido a mutaciones no afecta a la función de la Cx en el hígado^{74, 75, 76}. Sin embargo existen multitud de casos en que el efecto no es compensatorio, tal como ocurre por ejemplo en la piel, donde se conoce la expresión de múltiples Cxs y mutaciones o pérdida de la función de una determinada Cx da lugar al desarrollo de determinadas enfermedades y síndromes, tal y como ocurre por ejemplo con mutaciones en la secuencia de la Cx26^{77, 78}.

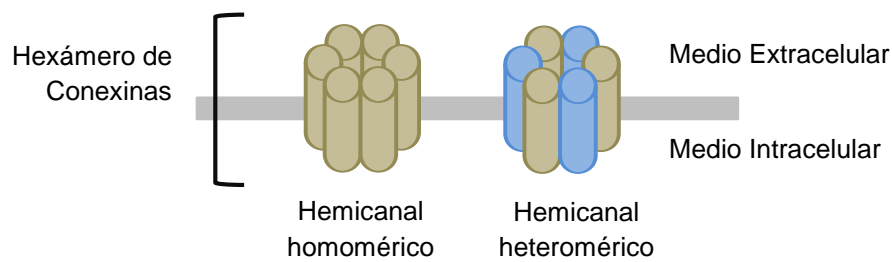


Figura 6. Representación de hemicanales o conexones homoméricos y heteroméricos.

Un vez ensambladas las Cxs en hemicanales, estos son envueltos en vesículas en el aparato de Golgi y transportados hasta la membrana plasmática a través de los microtúbulos^{79, 80}. Los hemicanales se insertan en la membrana donde se agrupan entre 10 y 10.000 hemicanales³⁶. Cada uno de estos hemicanales puede acoplarse con hemicanales de otra célula en estrecho contacto, formando así canales intercelulares, cerrados al espacio extracelular y que ponen en contacto ambos citoplasmas. Los hemicanales y UCs^{81, 55} forman agrupaciones en la membrana que se conocen como placas³⁶. Proteínas como la ZO-1 o cadherinas juegan un papel importante en el proceso que determina la ubicación específica de las placas en la superficie celular⁸² y en la colocalización de las UCs con uniones adherentes⁸³.

Las UCs pueden estar formadas por dos hemicanales homoméricos (homotípicos) o por hemicanales heteroméricos (heterotípicos) (**Figura 7**). Virtualmente, todas las células que forman tejidos sólidos están unidas mediante UCs. En vertebrados se han descrito UCs en prácticamente todos los tipos celulares, con algunas excepciones como los glóbulos rojos^{84, 85, 86, 87}. Este tipo de canales se observaron por primera vez en las sinapsis eléctricas de las células de Mauthner⁸⁸. Revel y Kamovsky acuñaron posteriormente el término UC en el año 1967, al observar estas unidades hexaméricas en miocardio e hígado de ratón⁸⁹.

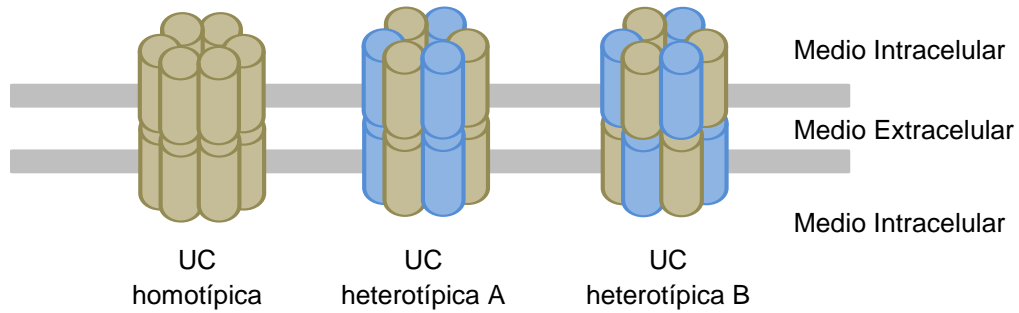


Figura 7. Representación de diferentes tipos de UCs según el tipo de Cxs que forman cada hemicanal. En el caso de las UCs heterotípicas las interacciones entre los hemicanales heteroméricos se pueden establecer a través del mismo tipo de Cx (UC heterotípica A) o por diferentes Cxs (UC heterotípica B).

Las Cxs tienen un ciclo de vida media corto, de unas pocas horas (1 – 5 horas)^{90, 91, 92, 93, 55}. La síntesis de Cxs y su inserción en la membrana está acoplado a la internalización de las UCs (o placa) y su posterior degradación^{93, 94}. Se ha sugerido que la inserción de nuevos hemicanales en la membrana sucede en los bordes de las placas de las UCs, mientras que los hemicanales más antiguos que serían degradados se localizan en el centro de la placa⁹⁵. La degradación de Cxs, hemicanales y UCs y su reemplazo en la membrana dependen de condiciones fisiológicas y patológicas (migración celular, mitosis, isquemia, etc.)⁹⁶. Las UCs se internalizan desde la superficie celular en vesículas de doble membrana denominadas *annular gap junctions*⁹⁷ (**Figura 8**), actuando una de las células como receptora y otra como donadora, el canal formado por los hemicanales de las dos células se internaliza por completo en una de las dos células.

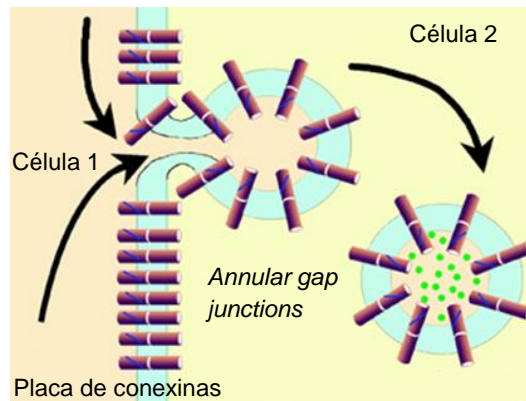


Figura 8. Esquema del proceso de internalización de UCs formando la estructura denominada *annular gap junctions*. Imagen modificada del siguiente enlace: <http://www.sanpatricio.co.uk/Innexins/pg4%20sal.php>.

La fosforilación y la ubiquitinización de las Cxs juegan un papel esencial tanto para la internalización de la UCs como para su degradación⁹⁸. Se han descrito dos vías de degradación de la denominada *annular gap junctions*: lisosomal y proteosomal, es probable que *in vivo* ambas vías participen en la degradación de las Cxs, hemicanales y UCs, dependiendo de las condiciones o del tipo celular. El disponer de diferentes vías proteolíticas permitiría a las células compensar posibles alteraciones en alguno de los procesos de regeneración o degradación dotando a las células de una mejor capacidad de adaptación y respuesta⁹⁸. La combinación de inhibidores lisosomales y proteosomales ha sugerido que la degradación es susceptible a las dos vías pero de manera no aditiva, aunque hay evidencias que apoyan la actuación secuencial de ambas⁹⁹. Se ha descrito que el proceso de internalización de los hemicanales o UCs seguida de su degradación vía lisosomal está mediada por monoubiquitinización mientras que la degradación vía proteosomal requiere de poliubiquitinización¹⁰⁰. Sin embargo, a día de hoy todavía no se entiende bien el papel que juega el proteosoma en la degradación de la estructura *annular gap junctions*. A mayores, se ha descrito recientemente un nuevo mecanismo de renovación y degradación de la *annular gap junctions* centrado en el proceso de autofagia¹⁰¹.

3.3. Funciones: Hemicanales y uniones comunicantes

Se podría resumir que las Cxs tienen tres tipos de funciones: (i) formar los hemicanales que permiten la comunicación entre la célula y la matriz extracelular, (ii) formar las UCs que permiten la transferencia de pequeñas moléculas entre células adyacentes y (iii) funciones que pueden ejercer de forma independiente a la actividad del canal tales como control de la proliferación celular¹⁰². La pérdida de homología entre los CTDs de las diferentes Cxs, junto con los resultados publicados por varios grupos de investigación, sugiere que el CTD podría estar implicado en este tipo de funciones que no dependen de la actividad de las UCs y hemicanales¹⁰³ y entre las que se incluyen la regulación de adhesión y migración celular y control del ciclo celular^{104, 105, 106, 73}. Estas funciones podrían ser ejercidas mediante su participación directa en rutas de señalización y/o interfiriendo o interaccionando con diferentes proteínas^{105, 106, 107, 108}.

Loewenstein *et al.*, en 1966 fueron los primeros en observar la pérdida de comunicación intercelular en células hepáticas cancerosas respecto a células hepáticas normales¹⁰⁹, sugiriendo que alteraciones en la comunicación celular a menudo resultan en una desregulación del crecimiento celular y en la aparición de tumores. Desde entonces, han sido numerosos los estudios dedicados a entender el papel de la comunicación célula - célula y de diferentes Cxs en el desarrollo y progresión de tumores^{110, 111}.

Respecto a las funciones de los hemicanales, estos no son simples precursores de las UCs, hace tiempo que se han convertido en objeto de estudio como entidad individual. Los hemicanales permiten el intercambio de pequeñas moléculas e iones entre el interior celular y medio extracelular (comunicación célula - matriz). Está aceptado que la célula en estado de reposo mantiene preferentemente los hemicanales cerrados, para evitar un desequilibrio en el balance electrolítico, despolarización de la membrana y pérdida de pequeñas moléculas intracelulares como el ATP^{112, 113}. Aunque desde 1991, año en el que se describió por primera vez que la apertura de los hemicanales estaba implicada en procesos inflamatorios y de muerte celular en oocitos de *Xenopus* inyectados con ARN de Cx46¹¹⁴, se ha ido ampliando su estudio y existen evidencias de mecanismos específicos de regulación de la apertura y el cierre de hemicanales en células en cultivo⁵³. Por ejemplo, se ha demostrado que la baja concentración de calcio promueve la apertura de los hemicanales en ciertos tipos celulares, así como el efecto del pH extracelular o de diferentes bloqueantes, tanto específicos como inespecíficos⁵³.

Las UCs juegan un papel activo en la comunicación y señalización intercelular y están sometidas a complejos mecanismos de regulación. Estos canales permiten el

acoplamiento metabólico mediante el paso de pequeños metabolitos y moléculas tales como aminoácidos, azúcares o péptidos; y el acoplamiento químico y eléctrico a través del intercambio de segundos mensajeros e iones como K^+ , Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} entre células adyacentes⁵³. Además participan en el control de la proliferación y migración celular y en la regulación de la expresión génica a través del transporte de segundos mensajeros, pequeños oligonucleótidos como ARN de interferencia (ARNi) y reguladores génicos (Ca^{2+} , cAMP, IP_3)^{115, 116, 117}. Muchas de estas funciones van a depender del tipo de Cx y/o Cxs que formen las UCs, que determinará la permeabilidad, apertura y cierre y especificidad en el ensamblaje de las UCs¹¹⁸.

Varios estudios en los que se midió la conductancia, la selectividad a iones y la permeabilidad utilizando moléculas fluorescentes de diferente tamaño, carga y composición química revelaron una amplia variedad de propiedades del poro. Ningún ion atómico es tan grande como para no poder atravesar los canales homotípicos de Cx43, Cx40, Cx37 y Cx45, los cuales muestran una permeabilidad similar a cationes monovalentes, tales como el potasio o el sodio^{119, 120, 121, 122}. Sin embargo la selectividad de carga varía desde la preferencia de aniones (Cx32) a una alta selectividad de cationes (Cx40, Cx43)^{122, 123, 119}. El uso inicial de trazadores fluorescentes y moléculas no cargadas proporcionó información respecto a la limitación del diámetro del poro de las Cxs, resultando que las UCs formadas por Cx43 presentaban mayor diámetro de poro¹²⁴. A su vez, las propiedades de permeabilidad de un canal son moduladas de forma reversible por modificaciones posttraduccionales tales como la fosforilación o por interacciones proteicas⁵⁴. Son bien conocidos el intercambio y paso de segundos mensajeros y metabolitos tales como el ATP o ADP, Ca^{2+} , cAMP, IP_3 , glutamato, glutatión y ARNi a través de canales homoméricos de Cx26, Cx32 y Cx43 y heteroméricos de Cx32/Cx30 o Cx32. Los canales formados por Cx43 presenta de 100 a 300 veces más selectividad por el ATP que los canales de Cx32; el glutamato, glutatión y ADP muestran de 10 a 20 veces más permeabilidad a canales de Cx43 y la adenosina es 10 veces más permeable a los canales de Cx32⁵⁴. Las diferencias de permeabilidad entre diferentes Cxs, podrían explicar la necesidad de diferentes tipos de Cxs para regular la comunicación celular en los diferentes tipos celulares y tejidos.

Resultados de varios estudios *in vitro* muestran como cada Cx exhibe propiedades funcionales únicas¹²⁵, como por ejemplo tamaño, forma y carga de las moléculas que pueden pasar por el canal¹²⁶.

3.4. Conexinas: Enfermedades asociadas

Como ya se ha descrito, la comunicación célula – célula permite la coordinación eléctrica, química y metabólica^{127, 128, 129}, y participa en procesos de apoptosis, expresión génica, respuestas inflamatorias o crecimiento celular^{130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 116, 126}. Existe una amplia variedad de enfermedades humanas hereditarias que se deben a mutaciones en los genes de las Cxs^{144, 145}. Algunos de estos ejemplos están recogidos en la **Tabla 1**. Estas enfermedades suelen presentarse en los primeros años de vida y causan anomalías o defectos en los procesos de oligomerización y plegamiento de la proteína o en la capacidad de controlar los mecanismos de apertura y cierre del canal entre otras alteraciones¹⁴⁶. Además de las enfermedades causadas por mutaciones en los genes de las Cxs, existen otras patologías asociadas a Cxs pero causadas por alteraciones en las funciones de la proteína. Entre estas patologías se incluyen procesos inflamatorios, OA, desarrollo de tumores y procesos de metástasis, Alzheimer, Parkinson, epilepsia o migrañas¹⁴⁷.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMTX) se debe a mutaciones en el gen de la Cx32 y es una enfermedad neurológica que afecta a las capacidades motoras y sensoriales de los pacientes^{148, 149}. Actualmente existen más de 400 mutaciones diferentes descritas en el gen de la Cx32, GJB1, relacionadas con el desarrollo de CMTX¹⁴⁸. La Cx32 se expresa en muchos tipos celulares entre ellos en oligodendrocitos y células de Schwann, donde forma UCs que permiten el paso de iones y moléculas de señalización a través de la vaina de mielina¹⁵⁰. Sin embargo, a pesar del amplio patrón de expresión de la Cx32 la neuropatía periférica es la única manifestación clínica de la CMTX, posiblemente la coexpresión de otras Cxs compensen el daño causado por la pérdida de la Cx32 en otros tejidos¹⁴⁸.

En el caso de la enfermedad Pelizaeus-Merzbacher (PMLD), una leucoencefalopatía autosómica recesiva hereditaria, se desencadena por mutaciones en el gen GJA12 que codifica para la Cx47 y se caracteriza por nistagmo seguido de ataxia, espasticidad e hipomielinización¹⁵¹. La Cx47 se expresa principalmente en los cuerpos celulares de los oligodendrocitos mientras que la proteína mutada parece acumularse parcialmente en el retículo endoplasmático. Las mutaciones asociadas a PMLD alteran las UCs formadas por Cx47 y por Cx47/Cx43 entre oligodendrocitos y astrocitos, lo que produce la pérdida del acoplamiento entre las células de la glía^{152, 153, 154}.

La Cx40, entre otros tejidos, se expresa en el miocardio formando UCs de baja resistencia que permiten la propagación del impulso cardíaco. Una mutación del gen codificador de la Cx40, GJA5, que resulta en la traducción incompleta de la proteína

(Q49X), da lugar a fibrilación auricular idiopática. Utilizando líneas celulares deficientes en Cx40 se observó que la proteína mutada se localizaba mayoritariamente a nivel citoplasmático y no se detectaron placas de UCs en las superficies celulares¹⁵⁵.

El cristalino es un tejido avascular donde se han detectado la Cx43, la Cx46 y la Cx50. Se han descrito nueve mutaciones en el gen de la Cx46 (GHA3)^{156, 157, 158, 159, 160, 161, 162} y cuatro mutaciones en el gen que codifica la Cx50 (GJA8)^{163, 164, 165, 166} como causantes de cataratas.

Un ejemplo de patología asociada a alteraciones en la función o localización de las Cxs no asociadas a mutaciones, son las lesiones a nivel cerebral. Estas pueden causar la muerte de células neuronales y de la glía de forma inmediata, extendiéndose el daño al tejido nervioso adyacente a través de la liberación e intercambio de moléculas lo que promueve la respuesta inflamatoria, formación de radicales libres y excitotoxicidad^{167, 168}. Por ejemplo, se ha observado que las UCs formadas por Cx43 en astrocitos de roedores aumentan después de una lesión de este tipo en el sistema nervioso central¹⁶⁹. El tratamiento con un péptido mimético de la Cx43 reduce el daño en el tejido circundante a donde se produjo la lesión¹⁷⁰.

En el caso del Alzheimer, se detectó un incremento en la expresión de la Cx43 y Cx30, en las proximidades de la mayoría de las placas de la β -amiloide en modelos de ratón con Alzheimer¹⁷¹. Además, se ha observado que la β -amiloide promueve la activación y liberación de glutamato y ATP a través de hemicanales de Cx43 en astrocitos, produciendo muerte neuronal por la activación (apertura) de hemicanales de Cx36 en las neuronas¹⁷².

Cambios en la actividad de los hemicanales se han relacionado con ciertas patologías¹⁷³. Aunque la mayoría de estos resultados proceden de ensayos *in vitro*, lo que dificulta determinar su relevancia clínica, resultados publicados indican la implicación de los hemicanales en enfermedades tales como la arterioesclerosis, o en procesos inflamatorios e infecciones bacterianas^{173, 174, 175, 176, 177}. Además, varios estudios han demostrado que ciertas condiciones patológicas desencadenan en la apertura descontrolada y masiva de hemicanales, lo que se denomina en inglés *leaky hemichannels*, afectando negativamente al mantenimiento de la homeostasis celular e induciendo muerte celular¹⁷⁸.

Patrones anormales de expresión o de localización subcelular de las Cxs han sido observados en varios tumores^{179, 180, 181, 182}. Se ha descrito la pérdida de localización de la Cx32 en cánceres gástricos humanos en relación con el grado de diferenciación

celular del tumor¹⁸³ y como al disminuir los niveles de Cx32 se incrementa la proliferación celular en líneas celulares de rata con hepatoma¹⁸⁴. En modelos animales de ratón de diferentes cánceres de pulmón inducidos químicamente se han observado alteraciones en los niveles de expresión de ciertas Cxs, tales como la Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 y Cx46^{185, 186}. Niveles reducidos de Cx26 y Cx43 se relacionan con el desarrollo de varios cánceres, entre ellos el cáncer de mama. La expresión de Cx26 o Cx43 en diferentes modelos celulares inhibe significativamente la proliferación celular de células tumorales^{187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195}.

ENFERMEDAD	MANIFESTACIÓN CLÍNICA	Cx
<i>Enfermedades neurodegenerativas</i>		
Charcot-Marie-Tooth (CMTX)	Debilidad en las extremidades. Desmielinización progresiva de los axones periféricos	Cx32
Pelizaeus-Merzbacher(PMLD)	Neuropatía periférica leve	Cx46 Cx47
<i>Enfermedades cardiovasculares</i>		
Fibrilación Auricular Idiopática	Arritmia auricular e insuficiencia cardíaca congestiva	Cx40
Heterotaxia Visceroauricular	Malformaciones cardíacas y defectos en los órganos viscerales	Cx43
<i>Enfermedades de la piel</i>		
Síndrome de Vohwinkel	Queratodermia palmoplantar con ictiosis y la pérdida de audición	Cx26
Síndrome de Queratitis-Ictiosis-Sordera (KID)	Queratitis vascularizante con lesiones cutáneas hiperqueratósicas y sordera	Cx30 Cx26
Eritroqueratoderma Variable (EKV)	Crecimiento lento de manchas eritematosas y queratodermas estáticos, sordera sin mutación de la Cx31	Cx30.3 Cx26
Displasia Ectodérmica Clouston's <i>Hidrotic</i>	Hipotricosis, queratodermia palmoplantar, distrofia ungueal y/o hiperpigmentación	Cx30
Psoriasis	Hiperproliferación de queratinocitos epidérmicos que resulta en escamosas, enrojecimiento de la piel, pápulas y placas	Cx26
Ictiosis ligada a <i>Hystrix</i> con sordera (HID)	Ictiosis severa y pérdida de audición	Cx26
Síndrome de Bart-Pumphrey	Hiperqueratosis sobre las articulaciones interfalángicas y metacarpofalángicas proximales y distales y pérdida de audición.	Cx26 Cx26 Cx30
Sordera sindrómica y no sindrómica	Pérdida auditiva sensorial. En la sordera sindrómica se asocia a los desórdenes en la hiperproliferación de la piel.	Cx31 Cx43 Cx46
Cataratas <i>Zonular Pulverulent</i>	Cataratas congénitas	Cx50
Displasia Oculodentodigital (ODDD)	Síndrome que incluye trastornos oftalmológicos, dentales, craneofaciales, del hueso y desórdenes en las extremidades	Cx43

Tabla 1. Enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en diferentes Cxs. Tabla adaptada de Grek *et al.* 2014¹⁹⁶.

Para el estudio de enfermedades humanas relacionadas con mutaciones en genes que codifican Cxs se han desarrollado modelos animales basados en ratones *Knockout*. El hecho de que el fenotipo *knockout* para la Cx26¹⁹⁷ y la Cx45¹⁹⁸ sean letales a nivel embrionario y que los ratones con fenotipo *knockout* para la Cx43 mueran a las pocas horas de su nacimiento debido a anomalías congénitas en el miocardio¹⁹⁹ claramente indican la importancia de las Cxs.

Los ratones *knockout* para la Cx32 son viables y fértiles pero presentan menor peso que el fenotipo silvestre. En ellos la estimulación eléctrica del sistema nervioso simpático en el hígado moviliza un 78 % menos de glucosa de las reservas de glucógeno respecto al fenotipo silvestre, así como presentan una menor expresión de Cx26 en el hígado y el área total de las UCs se reduce unas mil veces respecto al fenotipo silvestre. Contrariamente a los pacientes, los ratones deficientes en Cx32 que sufren CMTX no presentan anomalías neurológicas a los tres meses de edad, aunque sí pueden desarrollarlas más tarde²⁰⁰. Este modelo animal también se emplea para el estudio de la Cx32 en tumorigénesis^{200, 201, 202}.

Los canales de Cx26 parecen ser esenciales para la transferencia de nutrientes desde la madre al embrión¹⁹⁷. Los ratones *knockout* homocigotos para la Cx26 mueren en el útero antes del inicio de la segunda mitad del período gestacional, alrededor del día 11 post *coitum*. En ellos la absorción de glucosa del embrión homocigoto deficiente en Cx26 desde la sangre materna no es suficiente para la rápida organogénesis que sufre el embrión durante el periodo gestacional.

Los embriones deficientes en Cx45 muestran llamativas anomalías en el desarrollo vascular y mueren entre el día 9,5 y 10,5 post *coitum*. Tanto la diferenciación como la posición de las células endoteliales parece ser normal, pero el desarrollo de los vasos sanguíneos revela daños. La vasculogénesis ocurre de forma normal pero la transformación a vasos maduros está interrumpida, aunque este daño no se produce por igual en todos los vasos, reflejando la compensación por otras Cxs en los diferentes tipos de vasos sanguíneos¹⁹⁸. Los ratones *knockout* para la Cx30 (fenotipo homocigoto) nacen con la frecuencia esperada, un desarrollo normal y son fértiles pero exhiben una discapacidad auditiva severa y constitutiva²⁰³.

3.5. Conexina 43

La Cx43 es la conexina más estudiada expresándose en multitud de tipos celulares, entre los que se incluyen cardiomiocitos, queratinocitos, astrocitos, células endoteliales o hepatocitos²⁰⁴. Incluso en tejidos como el cartílago articular, donde las células se encuentran aisladas en lagunas distantes separadas unas de otras, se demostró su expresión por primera vez en 1995 en cartílago articular bovino²⁰⁵ y en el año 2009, en cartílago articular humano^{206, 207}.

La Cx43 fue descrita por primera vez en 1987 por Beyer *et al.*, en miocardio de rata⁵². Posteriormente en 1990, Glenn *et al.*, describieron la longitud total del transcrito primario de la Cx43 en miocardio humano y de rata. El gen de la Cx43 en humanos, se localiza en el cromosoma 6 (6q22.31; ID: 2697), dando lugar a un transcrito de 14.168 pb que se traduce en 382 aminoácidos.

Normalmente el inicio de la traducción en eucariotas depende de la unión del ARNm (ARN mensajero) a través de su caperuza 5' (cap-5') al ribosoma, pero se han descrito ARNm que presentan la capacidad de traducirse sin necesidad de la estructura cap-5', entre ellos el ARNm de la Cx43²⁰⁸. Esta iniciación de la traducción independiente de cap-5' requiere de la presencia en el ARNm de secuencias denominadas IRES (del inglés *internal ribosome entry site*)^{209, 210}. Las secuencias IRES han sido encontradas en ARNm de genes que codifican proteínas cuya presencia es necesaria en condiciones donde la traducción mediada por cap-5' está dañada, tales como los genes de algunos factores de transcripción^{211, 212}, de las HSP (del inglés *heat shock proteins*)²¹³, de proteínas implicadas en apoptosis²¹⁴ o de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular²¹⁴.

La fosforilación de las Cxs, especialmente la de la Cx43, tiene lugar en las primeras etapas de su síntesis y tráfico intracelular^{215, 216}. La Cx43 contiene un total de 66 residuos de serina, tirosina y treonina; 32 de los cuales se encuentran en su CTD^{217, 70}. Los ratones Cx43K258stop sufren una delección de 125 aminoácidos en el CTD de la Cx43, en el caso de los individuos homocigotos los recién nacidos son viables *per se*, indicando que la delección del CTD-Cx43 no perjudica gravemente el desarrollo embrionario. Postnatalmente, menos de un 3 % de los ratones con el fenotipo Cx43K258stop homocigoto sobreviven hasta la edad adulta (sobre 4 meses). Esta letalidad se debe a defectos en la permeabilidad de la barrera epidérmica²¹⁸. La mayoría de los ratones con fenotipo Cx43K258stop homocigoto mueren durante los 2 primeros días de vida debido a la completa pérdida de permeabilidad de la barrera epidérmica; únicamente aquellos ratones que exhiben defectos de forma interrumpida, sin que afecte a toda la superficie corporal, alcanzan la madurez de forma semejante a los ratones que

sufren la supresión de la desmocolina-1²¹⁹. Las hembras con fenotipo homocigoto que alcanzan la madurez son infértiles debido a defectos en la foliculogénesis.

El fenotipo heterocigoto, los cuales presentan niveles de expresión de Cx43K258stop incrementados respecto al homocigoto debido a la compensación de dosis génica, alcanzan la madurez. En estos ratones se ha visto como en los discos intercalados del miocardio, la organización espacial de las UCs está alterada, lo que afecta a las funciones del canal²²⁰. También se observa un incremento del diámetro de las placas de UCs en la membrana celular junto con el aumento del tiempo de vida media de la Cx43²²¹. Por otra parte, en el modelo de ratón *knockout* para la Cx43 (Cx43cKO) los embriones homocigotos mueren al nacer debido a fallos en el intercambio gaseoso causado por la inflamación y obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho del corazón²²².

La regulación de la fosforilación del CTD de la Cx43 es crítica no sólo por su efecto en la organización y funcionalidad de los canales que forma, sino también porque facilita o inhibe interacciones de otras proteínas con la Cx43, las cuales van a regular diferentes rutas de señalización o modular procesos tales como proliferación celular⁷⁰. Las quinasas Akt, PKA y CK1 participan como reguladores de los procesos de tráfico intercelular y ensamblaje de la Cx43. Park *et al.*, propusieron que la fosforilación de los residuos de serina 369 y 373 (S369 y S373) por la quinasa Akt (PKB) son necesarios para la interacción de la Cx43 con las proteínas 14-3-3, unión que promueven el transporte de la Cx43 desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y hacia la membrana plasmática^{215, 216}. Las quinasas PKA y CK1 incrementan el número de UCs de Cx43 en las placas en la membrana plasmática²¹⁷. Por otra parte, la fosforilación en la S365 por PKA estabiliza las UCs en las placas al prevenir la fosforilación de S368 por PKC⁷⁰. Una vez las UCs de Cx43 están incorporadas en las placas en la membrana plasmática, varios eventos pueden desencadenar la apertura y cierre del canal o la internalización y degradación de las UCs⁷⁰. Varias quinasas están implicadas en estos procesos de fosforilación en los residuos de serina y tirosina^{223, 224, 225}.

La apertura y cierre del canal están regulados en respuesta a cambios en el voltaje, en la concentración de calcio, en el pH o por las interacciones de proteínas con el CTD, entre otros factores^{226, 227, 228, 229, 230, 54}. Los mutantes donde el CTD de la Cx43 está incompleto se pierde la rapidez en la apertura y el cierre del canal²³¹ y sensibiliza el canal al pH²³². Aunque todavía no está claro el rango de concentración de Ca²⁺ necesario para desacoplar UCs, se ha sugerido que el Ca²⁺ actúa por la vía de la calmodulina y se ha demostrado que inhibidores de la calmodulina previenen el

desacoplamiento de las UCs en diversos tipos celulares²³³. En el caso de la Cx43 se ha sugerido que la calmodulina podría estar unida al *loop* citoplasmático en una región superpuesta con el CTD²³⁴.

Los canales de Cx43 ejercen importantes funciones mediando la comunicación celular en sistemas como el vascular, digestivo, reproductor o nervioso⁵⁴. La Cx43 está implicada en el correcto desarrollo del corazón, tal y como se observó con los ratones *knockout* homocigotos para Cx43¹⁹⁹. En los vasos sanguíneos participa en la regulación de la presión sanguínea y en el sistema vascular la Cx43 permite la propagación del potencial de acción entre los cardiomiocitos, junto con la Cx40 y la Cx37. Se ha descrito la presencia de la Cx43 a nivel mitocondrial en los cardiomiocitos, donde ejerce una función protectora esencial para la supervivencia tras un proceso de isquemia, asociada a la protección que ejerce el denominado precondicionamiento (del inglés *preconditioning*), el cual permite a las células aumentar su resistencia al proceso isquémico^{235, 236, 237, 238, 239, 227}.

A nivel intestinal, se ha descrito que la Cx43 participa en la motilidad del intestino, mediando la comunicación entre las células intersticiales de Cajal y el músculo liso. En los órganos reproductivos femeninos todos los tejidos presentan UCs. En ratones deficientes en la expresión de Cx43 los folículos presentan anomalías morfológicas que incluso impiden la fertilización *in vitro* de los óvulos²⁴⁰. En el caso de los órganos reproductivos masculinos la Cx43 es la Cxs más ampliamente expresada y se cree es necesaria para la correcta espermatogénesis²⁴¹. En el sistema nervioso la Cx43 forma parte de las sinapsis eléctricas en las neuronas y también se expresa en las células de la glía y astrocitos. En el ojo, el cristalino es un órgano avascular y sus células puede recibir los nutrientes necesarios mediante su transporte desde el exterior hacia el interior a través de estas UCs²⁴². En la piel, como respuesta ante lesiones, la expresión de Cx43 cambia dinámicamente, lo que se correlaciona con los eventos necesarios para la cicatrización de las heridas^{243, 244, 245, 246, 247, 248}.

El CTD de la Cx43 actúa a modo de *scaffolding* para su asociación con proteínas estructurales del citoesqueleto, proteínas de señalización y/o factores de transcripción que dirigen la regulación de diferentes rutas de señalización celular de forma independientemente de la actividad de las UCs²⁴⁹. Esta propiedad del CTD de la Cx43 representa una base estructural para las funciones independientes del canal que por definición no requieren el intercambio de moléculas entre células adyacentes (UCs) o entre el citosol y el espacio extracelular¹⁰⁷.

La Cx43 regula la proliferación y migración celular y estos efectos parecen ser principalmente dependientes de la presencia del CTD de la Cx43¹⁰⁷. Se ha descrito que el CTD (desde el aminoácido 257 al 382) es suficiente para promover la migración celular²⁵⁰ y su expresión es capaz de inhibir la proliferación celular^{251, 252}. Cuando se induce la expresión del CTD en cardiomiocitos y en células HeLa, el CTD se localiza a lo largo del citoplasma e incluso en el núcleo. A mayores, la localización nuclear del CTD podría ejercer efectos sobre la expresión génica²⁵³. La Cx43 participa en la regulación del crecimiento celular, vía interacción con proteínas tales como p21 y control de la expresión génica de proteínas implicadas en el control del ciclo celular.

En gliomas se ha observado el efecto supresor de tumores de la Cx43 a la vez que su capacidad de aumentar la migración de las células tumorales, como en el caso de la línea celular de glioma LN18²⁵², a través de mecanismos en los que el CTD y elementos de actina del citoesqueleto parecen estar implicados. Esta ambivalencia podría explicarse por la heterogeneidad de su expresión y la variedad de sus funciones. Las células tumorales de las que se espera migren expresan Cx43 mientras que las que no expresan Cx43 son más proliferativas²⁵⁴. Este efecto sugiere que la Cx43 podría estar ejerciendo funciones diferenciales durante el desarrollo del tumor y el proceso de metástasis. Alguna de estas funciones podría no depender de la actividad de los canales de conexinas.

Finalmente, se han publicaron evidencias de la traducción interna de un fragmento de 20 kDa a partir de un transcrito del gen de la Cx43^{255, 256, 257}. Recientemente nuevos estudios han confirmado que la fracción de 20 kDa de la Cx43 se corresponde con parte de su CTD, y dicho fragmento se ha detectado en una amplia variedad de líneas celulares y células primarias humanas y bajo diferentes condiciones.

Justificación del estudio y objetivos

A día de hoy no se conocen los mecanismos moleculares implicados en la degradación del cartílago articular que ocurre en pacientes que sufren OA, lo que no permite desarrollar tratamientos eficaces para frenar el avance de la enfermedad o que permitan regenerar el tejido dañado.

Alteraciones en la comunicación celular desencadenan en el desarrollo de numerosas enfermedades y síndromes. Dada la importancia de la Cx43 en los procesos de comunicación celular y su potencial implicación en el desarrollo de la OA, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Estudio de la comunicación célula – célula y célula –matriz a través de canales de Cxs en modelos animales, líneas celulares de condrocitos, condrocitos primarios y cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA.
2. Estudio de la función del CTD de la Cx43 en los procesos de comunicación celular, en cambios en el fenotipo de los condrocitos y en los procesos de síntesis y degradación de los componentes de la MEC.

Material y métodos

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de cartílago articular provenientes de: (i) articulaciones de rodilla de *Sus scrofa* donadas por la *Unidade de Ciruxía Experimental do Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña* (CHUAC – *Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña*, XXIAC), (ii) articulaciones de rodilla o cadera de donantes sanos (individuos que han sufrido una fractura en la articulación que requiere su sustitución por una prótesis artificial), (iii) pacientes con OA después de la cirugía de reemplazo de estas articulaciones por una articulación sintética y (iv) articulaciones de rodilla de ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO, enviados por el Dr. Christian Naus (*British Columbia University*, Vancouver, Canadá) a la Dra. María Dolores Mayán Santos siguiendo todos los requisitos de envío, autorizaciones y tratamiento de las muestras.

Se incluyen las muestras obtenidas de articulaciones de rodilla de miembros inferiores amputados en el *Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña* (CHUAC – *Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña*, XXIAC) y depositadas en el Servicio de Anatomía Patológica. En este caso, dichas muestras de tejido sólo se han utilizado para cultivos primarios (condrocitos aislados de tejido). Donantes y pacientes pertenecen al CHUAC y todas las muestras están incluidas en la Colección Privada de Muestras Biológicas Humanas (C. 0000424. Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III. Grupo de Reumatología del INIBIC). El uso de dicha colección como la realización de este estudio han sido autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC) (2012/094 – PII3/00591).

Las muestras empleadas (cartílagos de donantes sanos y pacientes con OA) se clasificaron según el método de *Mankin score* con ligeras modificaciones²⁵⁸ y utilizando tinciones entre las que se incluyen tinciones de hematoxilina eosina (HE), safranina O *fast green* (SO - FG) y AT entre otras, así como la historia clínica de los pacientes con OA y donantes sanos.

1.1. Procesamiento de explantes de cartílago

Los explantes de cartílago se procesaron inmediatamente después de la cirugía en el caso de donantes sanos, pacientes con OA y muestras de *Sus scrofa*, e inmediatamente

después del sacrificio en el caso del modelo animal (ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO).

Los explantes de tejido se obtuvieron realizando cortes en paralelo a la superficie de la articulación con un bisturí (*Swann Morton*, Reino Unido), los cuales se procesaron de diferente forma según su finalidad:

- Congelación *in situ* en *ependorfs* (*Eppendorf*, Alemania) sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Muestras para la extracción de ARN.
- Congelación *in situ* en *Criomold Standard* usando el medio criosolidificable *Tissue – Tek O.C.T. Compound* (*Sakura Finetek*, Holanda) e isopentano (*Merk*, Alemania) previamente llevado a su punto de congelación (-50 °C) con el uso de nitrógeno líquido (-180 °C). Posteriormente estos bloques fueron almacenados a -80 °C. Estas muestras se utilizaron para la realización de técnicas histológicas.
- Fijación en formol durante 16 – 18 horas y colocación en *cassettes* (*Tissue Teck*, Holanda) para ser embebidos en etanol (*Panreac Química*, España) de 70° durante 10 minutos y posterior inclusión en parafina (*Merck*, Alemania) utilizando el inclusor automático *STP 120 Tissue processor* (*Myr*, España). Para la formación de los bloques de parafina se utilizó un centro modular *Leica EG1150* (*Leica Microsystems*, Alemania), los bloques se almacenaron a temperatura ambiente. Las muestras se utilizaron para la realización de técnicas histológicas.

1.2. Aislamiento de células del cartílago articular

Para el aislamiento de condrocitos, las superficies articulares fueron lavadas con solución salina (*Fresenius Kabi*, España). Se realizaron cortes paralelos a la superficie articular con un bisturí, separando el cartílago articular de hueso subcondral y obteniendo láminas de cartílago articular que se digirieron mecánica y químicamente como se describe a continuación. Las láminas de cartílago fueron cortadas en trozos pequeños sobre una placa *petri* (*Soria Genlab S.A.*, Madrid) para facilitar su posterior digestión química. Este troceado se incubó con una solución de tripsina - EDTA (0,5 mg/ml) (*Sigma*, Alemania) durante 10 minutos a 37 °C en agitación, se decantó y se incubó con colagenasa tipo IV de *Clostridium*, 2 mg/ml (*Gibco BRL*, *Invitrogen*, EEUU) en DMEM (*Dulbecco´s modified eagle´s medium*, *Invitrogen*) suplementado al 5 % con

suero fetal bovino (*SFB, Gibco, Invitrogen*) durante 16 – 18 horas a 37 °C en agitación, para liberar las células de la MEC. Esta solución se pasó por filtros de 100 µm de poro (*BD Falcon, Francia*) para eliminar los restos de cartílago no digerido. El filtrado se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se descartó y las células se contaron en una cámara de *Neubauer (Marienfeld, Alemania)* para cultivar las células según el número obtenido en frascos de cultivo de 25 cm² (*BD Falcon, Francia*) – 250.000 células, 75 cm² (*BD Falcon, Francia*) – 2x10⁶ células o 162 cm² (*Costar Corning Incorporated, EEUU*) – 3x10⁶ células, para su crecimiento y la realización de experimentos. Los condrocitos se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con 15 % de suero de embrión bovino (*SEB, Life Technologies Ltd, España*) y con 100 µg/ml de Primocin (*InvivoGen Primocin™, EEUU*) en incubadores humificados a 37 °C y 5 % de CO₂ en aire (*Steri-Cult Co2 Incubator HEPA Class 100, Termo Electron Corporation, Madrid*). Cuando los condrocitos alcanzaron una confluencia del 70 – 80 % se expandieron a otro frasco mediante tripsinización o se recogieron para la realización de experimentos. El tiempo de cultivo no se prolongó más allá de la quinta semana para evitar la desdiferenciación a fibroblastos²⁵⁹.

En el caso de condrocitos en cultivo, también se han utilizado las líneas celulares: (i) T/C-28a2, condrocitos aislados de cartílago costal de una hembra de 15 años inmortalizados con el antígeno T grande del virus de simios 40 (SV40-LT)²⁶⁰, dicha línea celular fue donada por la Dra. Mary Goldring por petición de la Dra. María Dolores Mayán Santos y la línea de condrocitos (ii) HCS-2/8, condrocitos obtenidos de un condrosarcoma de la zona proximal del húmero de un varón de 72 años, sin haber recibido quimioterapia ni radioterapia²⁶¹, esta línea celular fue donada por el Dr. Masaharu Takigawa por petición de la Dra. María Dolores Mayán Santos.

2. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

2.1. Microscopía electrónica de barrido

Los explantes de cartílago congelados en *Tissue Teck O.C.T Compound* se cortaron con un bisturí, se descongelaron a temperatura ambiente mediante inmersiones en tampón de cacodilato 0,2 M a pH 7,4, se deshidrataron en concentraciones seriadas de etanol, se secaron y se recubrieron con oro mediante pulverización catiónica. Las imágenes se obtuvieron usando el microscopio electrónico *Jeol JEM 6400 Scanning*

Electron Microscope a 20 kV visualizando las imágenes con el programa *Inca Energy V.2000*.

2.2. Microscopía óptica y fluorescente

2.2.1. Hematoxilina eosina

La tinción de hematoxilina eosina, es una de las tinciones más empleadas en histología al permitir valorar la estructura y morfología general de los tejidos. La hematoxilina es un colorante catiónico o básico que tiñe estructuras ácidas como los núcleos celulares en tonos color azul o violeta. La eosina es un colorante aniónico que tiñe estructuras básicas como la matriz y el citoplasma celular de color rosa. Los portaobjetos con los cortes ya preparados (secciones de 4 µm de grosor), se introdujeron en hematoxilina de Harris (*Merk*, Alemania) durante 5 minutos y se hizo el viraje en agua hasta que el colorante se volvió azul o azulón, después se sumergieron en eosina cinco minutos. Se deshidrataron con varios pases en etanol de 96° y etanol absoluto y se aclararon en xilol. El montaje se realizó con el medio permanente DePex (*SERVA*, Alemania).

2.2.2. Safranina O fast green

La SO es un colorante catiónico que tiñe GAGs, por lo que indica la presencia de proteoglicanos. La muestra adquiere distintas tonalidades de color rojo, siendo la intensidad de la tinción proporcional al contenido en proteoglicanos. Los portaobjetos con los explantes fijados y secos se tiñeron con SO en etanol de 50° durante 30 minutos y se lavaron con un pase en agua destilada. Después se tiñeron con verde luz (verde luz, agua destilada, ácido acético glacial y agua acética) con cuatro pases. Se deshidrataron con etanol 100°, se aclararon en xilol y se montaron en DePex.

2.2.3. Azul de Toluidina

El AT es un colorante derivado del aminotoluol, homóloga de la anilina derivada del toluol. El azul de toluidina es un colorante que se puede comportar como colorante ortrocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta - rojo) dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida. En suspensión presenta un color azul y cuando se expone a estructuras ricas en enlaces amínicos, como los proteoglicanos, las moléculas de este compuesto toman un color violeta - rojo

(metacromasia). Los núcleos y los citoplasmas se ven en color azul (ortocromasia). Los explantes ya preparados en los portaobjetos se tiñeron con el colorante azul de toluidina al 0,2 % en tampón acetato (30 ml solución A (2,7 g de acetato de sodio en 100 ml de agua destilada) y 90 ml de solución B (1,1 ml de ácido acético 0,5 M en 100 ml de agua destilada)) a pH 4,2 durante 2 – 5 minutos, después las muestras se lavaron con el mismo tampón y se trataron con una solución acuosa al 4 % de molibdato de amonio (*Panreac Química S.A.*, España) durante 10 minutos. Se aclararon con agua destilada, se deshidrataron y se montaron con DePex.

2.2.4. Procesamiento de las muestras para su análisis mediante las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Todas las inmunohistoquímicas (IHQs) se contratiñeron con hematoxilina de Gill y las inmunofluorescencias con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, *Sigma*, EEUU).

Las diferentes técnicas histológicas se realizaron en:

- Explantes de cartílago congelados en *Tissue Teck O.C.T. Compound*
- Explantes de cartílago en bloques de parafina
- Células fijadas *in vivo* (cámara de cultivo)

Los explantes de cartílago articular congelados en *Tissue Teck O.C.T. Compound* fueron tallados en el criostato *Leica CM150* (*Leica Microsystems*, Alemania) a -20 °C con un grosor de 4 µm y se colocaron en portaobjetos (*Thermo Scientific*, EEUU), donde se fijaron por deshidratación celular en acetona a 4 °C durante 10 minutos. Se secaron a temperatura ambiente. De este modo fueron procesadas las muestras de cartílago de donantes sanos, pacientes con OA y *Sus scrofa*.

Los explantes de cartílago de ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO, embebidos en bloques de parafina se tallaron en el microtomo *Leica RM2155* (*Leica Microsystems*, Alemania), con un grosor de 4 µm y se colocaron en los portaobjetos. Los cortes se secaron en una estufa a 37 °C. Antes de realizar la técnica histológica los cortes se desparafinaron en una estufa a 60 – 65 °C durante 10 minutos y se introdujeron en xilol (*Panreac Química*, España) durante 10 minutos, seguidamente en etanol de 100° y 96° durante cinco minutos en cada uno, terminando en agua destilada.

Para la realización de técnicas inmunohistoquímicas *in vivo*, las células se cultivaron en cámaras de 8 pocillos (**Figura 9**), pudiendo utilizar un anticuerpo diferente en cada uno

de ellos. Las células se fijaron en formaldehído al 4 % (*Panreac Química S.A.*, España) en PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline* (*MP Biomedicals INC*, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los restos de fijador se eliminaron con varios lavados de PBS. En caso necesario, las muestras pueden conservarse en PBS a 4 °C durante una semana. Para la inmunofluorescencia la fijación se hizo con metanol frío (-20 °C) durante 5 minutos a 4 °C. Se hicieron tres lavados de 5 minutos con el tampón TBS* (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0,7 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Na₂H₂PO₄ 0,6 mM, ajustando el pH a 7,4).



Figura 9. Cámaras de cultivo de 8 pocillos. A la izquierda se observa la cámara de cultivo y a la derecha la misma cámara desmontada después de realizar la técnica histológica.

Todas las técnicas histológicas de microscopía óptica se visualizaron con el microscopio *Olympus BX61* con la cámara digital *DP71* (*Olympus*, Alemania). El ajuste y cuantificación de las imágenes se realizó con el programa *AnalySISD V.5.0* (*Olympus Boissystems*, Alemania). En el caso de inmunofluorescencia, las muestras se visualizaron con los microscopios: (i) *Leica TCS-Sp5 (AOBS) Laser scanning confocal* (*Leica Microsystems*, Alemania) usando el objetivo *63X HCX PLAPO 1.4 N.A* con aceite de inmersión y el programa *LAS AF 2.6* (*Leica Microsystems*, Alemania) e *Image J 1.47s* (*NIH*), (ii) *Nikon Eclipse Ti* utilizando el programa *NIS-Elements AR* versión 3.0 (*Nikon*, Japón), (iii) *Nikon Eclipse TE2000E // Nis-Elements F3.0* (*Nikon*, Japón) y (iv) *AXIOCAM MRm ZEISS - HBO100* (*Zeiss*, Alemania) con el programa *Axioplan 2* (*Zeiss*, Alemania).

2.2.5. Inmunohistoquímica

Los explantes fijados y secos en los portaobjetos se lavaron con PBS con 0,1 % de Tween-20 a pH 7,6 (PBST) durante 10 minutos. Antes de la tinción se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ y metanol *Peroxidase Blocking Solution* (Dako, Dinamarca) durante 10 minutos y se lavó con PBST. El anticuerpo primario se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después para eliminar el anticuerpo no unido se lavó 3 veces durante 10 minutos con PBST. Como control de la técnica una de las muestras no fue incubada con el anticuerpo primario (**Tabla 1**). El anticuerpo secundario utilizado, el *Polymered Envision plus policlonal kit Envision™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Labelled polymer-HPRT, Dako, Dinamarca)* se incubó durante 1 hora. Después se lavó 3 veces con PBST durante 10 minutos. Para revelar la reacción de la peroxidasa se utilizó el cromóforo DAB (diaminobencidina), la solución con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina a pH 7,5 en la proporción 1:50, se preparó antes de su utilización. Después de 2 – 5 minutos se dio por terminada la reacción observando las muestras al microscopio óptico (*Leica DMLS (Leica, Alemania)*) para determinar el momento de parar la reacción. El DAB se decantó y la muestra se lavó con agua destilada. Por último, los explantes fueron contrateñidos con hematoxilina de Gill III (*Merk, Alemania*). Las muestras se deshidrataron con una gradación creciente de alcoholes (70°, 96°, 100°), se aclararon en xilol y se montaron en DePex. En uno de los experimentos la contratinción se realizó con DAPI (**Figura 23**, Resultados)

Proteína	Dilución	Anticuerpo
Sox-9	1:100	Ratón anti-Sox-9, ab76997, <i>Abcam</i> , Reino Unido
COL2A	1:200	Ratón anti-colágeno II, MAB1330, <i>Millipore</i> , Alemania
Cx43	1:50	Ratón anti-conexina 43, 610062, <i>BD Transduction Laboratories™</i> , EEUU
Cx45	1:1000	Ratón anti-conexina 45, MAB 3101, <i>Millipore</i> , Alemania
PCNA	1:100	Ratón anti-PCNA, NA03, <i>Calbiochem®</i> , Alemania
Cx46	1:100	Ratón anti-conexina 46, sc-365394, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU
Cx32	1:50	Ratón anti-conexina 32, ab66020, <i>Abcam</i> , Reino Unido
c-Src	1:40	Ratón anti-c-src, sc-19, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la realización de las técnicas de IHQ. Se indica la dilución utilizada para cada caso, referencia y casa comercial.

2.2.6. Inmunofluorescencia

Se realizó esta técnica con células *in vivo* para el estudio de la colocalización de la Cx43 y HSP90 β y Cx43 con vimentina. Después de la fijación en metanol, como se explicó anteriormente, las células se pretrataron con Tritón X-100 1 % (vol/vol) (*Sigma*, EEUU) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con TBS* tres veces 5 minutos y se bloqueó con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y 0,5% solución de bloqueo²⁶² (*Boehringer*, Alemania) durante 30 minutos a 37 °C y se incubó con el anticuerpo primario (**Tabla 3**) durante 30 minutos a 37 °C en humedad. Se lavó con TBS* durante 5 minutos 3 veces. Se incubó el segundo anticuerpo primario (**Tabla 3**) 30 minutos a 37 °C y se lavó, se incubó el segundo anticuerpo secundario 20 minutos a 37 °C, se lavó y se tiñó con DAPI 1/1000 durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 5 minutos con TBS* y se montó con glicergel (*Dako*, Dinamarca). Para la Cx43 se utilizó el anticuerpo secundario *policlonal conejo anti-ratón inmunoglobulinas/FITC* (F0313, *Dako Cytomation*, Dinamarca) en color verde y el *policlonal cabra anti-ratón inmunoglobulinas/RPE* (SC-3755, *Santa Cruz Biotechnology*, EEUU) como anticuerpo secundario para la vimentina y HSP90 β en color rojo. Las incubaciones de los anticuerpos se realizaron en oscuridad. La inmunofluorescencia se observó con el microscopio confocal *Leica TCS-Sp5 (AOBS) Laser scanning confocal* (*Leica Microsystems*, Alemania) usando el objetivo *63X HCX PLAPO 1.4 N.A* con aceite de inmersión y el programa *LAS AF 2.6* (*Leica Microsystems*, Alemania). La intensidad se reguló con *Image J 1.47s* (*NIH*). Se almacenaron en oscuridad a 4 °C para prolongar la fluorescencia. El análisis de estas muestras se realizó en colaboración con la Unidad de Microscopía Confocal del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid).

Los condrocitos *in vivo* aislados de los ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO se cultivaron en cubreobjetos (*Marienfeld*, Alemania) tratados con polilisina (*Sigma*, EEUU). La polilisina es un polímero comúnmente utilizado para favorecer la adherencia de las células a la superficie de cultivo²⁶³. Las células sobre los cubreobjetos se trataron con una solución de bloqueo compuesta por albúmina sérica bovina al 2,5 % (*ASB*, *Invitrogen*, EEUU) con 3,67 % de Tritón X-100 al 10 % y PBS durante 10 minutos. El exceso se eliminó con lavados de PBS. El anticuerpo primario y secundario se diluyeron en la solución de bloqueo y se incubaron cada uno 1 hora a temperatura ambiente, el anticuerpo secundario (**Tabla 3**) en oscuridad. Después de cada incubación, las células se lavaron 4 veces durante 10 minutos con PBS en agitación. Para el montaje se empleó *Prolong® Gold Antifade Reagent with DAPI* (P36931, *Life Technologies*, EEUU), que

incluye DAPI. Los cubreobjetos se guardaron en oscuridad a 4 °C. Las muestras fueron visualizadas en el microscopio AXIOCAM MRm ZEISS - HBO100 (Zeiss, Alemania).

En las inmunofluorescencias realizadas con las líneas celulares T/C-28a2 y HCS-2/8 las células cultivadas en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos circulares no tratados, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente con glicina (*Sigma*, EEUU) (0,19 g en 50 ml de PBS) para apantallar la autofluorescencia de la fijación con para-formaldehído al 2 % y se lavó 3 veces con PBS. Se incubaron con Tritón X-100 0,2 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las membranas celulares. Se lavó 3 veces con PBS y se bloqueó con la solución de bloqueo (1 % de ASB (*Sigma*, EEUU), 1/10 de suero de cabra (Dako, Alemania) en PBS durante 1 hora. Se lavó 3 veces con PBS y se incubó el anticuerpo primario a la dilución indicada en la solución de bloqueo (**Tabla 3**) durante 1 hora. Se lavó 3 veces e incubó con el anticuerpo secundario diluido también en solución de bloqueo (**Tabla 3**) pero en oscuridad, se lavó 3 veces con PBS y montó con el medio de montaje VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (1,5 µg/ml) (*Vector Laboratories*, EEUU). Las preparaciones fueron observadas con el microscopio Nikon Eclipse TE2000E // Nis-Elements F3.0.

Proteína	Dilución	Anticuerpo
Cx43	1:1000	Ratón anti-conexina 43, 610062, <i>BD Transduction Laboratories</i> ™, EEUU
Cx43 (ratones knockout)	1:25	Conejo anti-conexina 43, A6219, <i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU
Panx1	1:500	Conejo anti-conexina-43; 488100, <i>Invitrogen</i> , EEUU
Vimentina	1:500	Ratón anti-vimentina, ab8069, <i>Abcam</i> , Reino Unido
HSP90β	1:10	Cabra anti- HSP90β , sc-1057, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU
COL2A	1:10	Cabra anti-colágeno II, sc-7764, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU
Osteopontina	1:100	Cabra anti-osteopontina, PA1-25152, <i>Thermo Scientific</i> , EEUU
Fibronectina	1:400	Ratón anti-fibronectina, F6140, <i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU
Ki67	1:400	Conejo anti-Ki67, 556003, <i>BD Biosciences</i> , EEUU
		Cabra anti-conejo Alexa Fluor 488, 1:500; <i>Invitrogen</i> , EEUU
		Cabra anti-ratón IgM Alexa Flour 488, <i>Invitrogen</i> , EEUU
		Mono anti-cabra Alexa 568; 1:500; <i>Invitrogen</i> , EEUU

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la realización de las inmunofluorescencias. Se indica la dilución utilizada para cada caso, referencia y casa comercial.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.1. Extracción de ARN

Se hizo una extracción de ARN de condrocitos cultivados en placas de 6 pocillos (superficie de cultivo: 9,5 cm²/pocillo) que tenían una confluencia del 80 % aproximadamente. La extracción se realizó con *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. La adición de cloroformo (*Sigma*, EEUU) seguida de una centrifugación (12.000 rpm, 15 minutos, 4 °C) separa la muestra en dos fases, una fase acuosa y otra orgánica. El ARN permanece en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico (*Sigma*, EEUU) y centrifugación (12.000 rpm, 15 minutos, 4 °C). Todo el protocolo debe realizarse a 4 °C para evitar la posible degradación del ARN. Los explantes de cartílago articular (30 – 40 mg) se trocearon con un bisturí en una placa *petri* sobre nieve carbónica para mantenerlos en frío. Previamente al protocolo de *TRIZOL® Reagent*, las muestras se incubaron con un tampón de digestión (Tris-HCl 200 mM, NaCl 200 mM, 5% de SDS y citrato sódico 100 mM) que contenía proteínasa K (*Quiagen®*, Alemania), durante 16 – 18 horas a 52 °C en agitación. Después del protocolo de extracción el ARN fue tratado con 1 U/μL de desoxirribonucleasa I (ADNsa I) (*RNase-free DNase*, *Invitrogen*, EEUU) según las indicaciones del fabricante, este tratamiento elimina posibles restos de ADN. Para estimar la pureza de la extracción se utilizó el espectrofotómetro conocido como *Nanodrop ND-1000* (*Nanodrop*, EEUU), con el cual también se determinó la concentración de ARN en cada muestra. La calidad de la muestra se determinó calculando la proporción (*ratio*) entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm y entre 260 nm y 230 nm.

3.2. Retrotranscripción de ARN

Para la retrotranscripción de ARN (RT-PCR, del inglés *Reverse Tanscription-Polymerase Chain Reaction*), se utilizó *Superscript®Vilo cDNA Synthesis Kit* (*Invitrogen*, EEUU), el termociclador AB Sciences (*Applied Biosystems*, EEUU) y 1,5 μg de ARN por muestra. Antes de añadir el reactivo el ARN se desnaturalizó a 65 °C durante 10 minutos, para eliminar posibles estructuras secundarias. El programa empleado en la retrotranscripción fue: 25 °C – 10 minutos, 42 °C – 90 minutos, 85 °C – 5 minutos y 4 °C. El ADNc se diluyó 100 veces en agua *MilliQ* (*Millipore*, Alemania).

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La qPCR (del inglés, *quantitative Polimersase Chain Reaction*) es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto amplificado. La qPCR a tiempo real incluye en la reacción una molécula fluorófora (en este caso *SYBRGreen*) y se realiza en termocicladores que contienen sensores que miden la fluorescencia. El fluoróforo se intercala entre los ácidos nucleicos en cada ronda de replicación de la doble hebra. Los sensores registran la fluorescencia emitida por el fluoróforo, previamente excitado a una longitud de onda (λ) adecuada, lo que permite medir la tasa de generación del producto²⁶⁴.

Se utilizó el termociclador *LightCycler 480* (Roche, Suiza) con *LightCycler 480 SBRGreen I Master kit Real Time* (Roche, Suiza). En las placas de 96 pocillos (*Costar Corning Incorporated*, EEUU) se añadieron 5 μ l de la dilución de ADNc de cada muestra, siempre por duplicado. Los cebadores se utilizaron a una concentración 10 μ M (**Tabla 5**). Los cebadores se diseñaron en el programa *Primer3: WWW primer tool* (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>). El programa de amplificación utilizado en el termociclador fue: 95 °C – 10 minutos; 50 ciclos de 95 °C – 10 segundos, 60 °C – 10 segundos, 72 °C – 12 segundos; ciclo de desnaturalización de 95 °C a 65 °C y un ciclo de enfriamiento a 4 °C. Los productos amplificados fueron de aproximadamente 200 pb. El nivel de expresión del gen a estudiar se analizó utilizando como gen control o de referencia (en inglés *housekeeping gene*), la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1).

4. EXTRACCIÓN DE ADN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para la extracción de ADN de tejido de oreja de los ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO, el tejido se digirió con proteínasa K (*Proteinase K Solution RNA Grade Ambion, Life Technologies*, EEUU) a 50 °C durante 16 – 18 horas. Después se precipitó con etanol al 70 % y se dejó secar a 37 °C. El ADN se resuspendió en agua *MilliQ*. La PCR se realizó en el termociclador *1720 Thermal Cycles* (*Applied Biosystems*, EEUU) con el programa: 94 °C – 5 minutos; 36 ciclos de 94 °C – 1 minuto, 55 °C – 1 minuto y 72 °C – 1 minuto; 72 °C – 10 minutos y 4 °C para enfriar la reacción. La reacción

contenía: 2,5 µl tampón de PCR 10X, 1 µl MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL dNTPs 10 mM, 0,5 µl de cebadores antisentido y sentido (Tabla 4), 0,25 µl de polimerasa *Platinum Taq* y 2 µl de la dilución de ADN y agua *MilliQ* hasta un volumen final de 50 µl. De cada producto de amplificación se cargaron 25 µl en un gel de agarosa (*Sigma*, EEUU) al 0,8 % teñido con *SYBRSafe* (*Life Technologies*, EEUU). El gel se reveló en la cámara *Alphalmager* TM 4300 (*Alpha Innotech*, EEUU).

Cebador	Cadena sentido (5' - 3')	Cadena antisentido (5' - 3')
Cx26m	CTTCCTCCCGACGCAGAG	GCTCATCTCCCCACACCTC
Cx32m	TGAGACCATAGGGGACCTGT	TCATCACCCCACACACTCTC
Cx40m	AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA	TCGTATCACACCGGAAATCA
Cx43-ratones Knockout	GCATCCTCTTCAAGTCTGTCTTCG	CAAAACACCCCCCAAGGAACCTAG
Cx43m	CAATCACTTGGCGTGACTTC	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
Cx43p	TTGCAATCTGTGATCCTTGAA	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
Cx43-2	ACATGGGTGACTGGAGCGCC	ATGATCTGCAGGACCCAGAA
Cx45m	ATCTGGAAAAATTGCAATCAAAA	CTGTAAGGACGATCCGGAAG
Cx45p	TGGGTAACCGAAGTTCTGGA	TCCAGGATCCAGGTA AAAACC
Cx46m	ACCGCACGTGTGAAAGGAAT	GAAGATGAACAGCACGGTCA
Cx46p	ATGCCTGTCCTGTGGAGAAG	GAAGATGAACAGCACGGTCA
B-Gal	GGCATAACAGACCCTTGGACTCC	TGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
HPRT-1	TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG	GCCCAAAGGGAAGTATAGTC
Panx1	CAGAGCGAGTCTGGAAACCT	GCAGGCTCCATCTCTCATGT
Panx2	TGCTGGTCACCCTGGTCT	GCGTAGGGCAGGAACTTGT

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados. En esta tabla se muestran la secuencia de todos los cebadores empleados en este trabajo de tesis para la realización de qPCR, PCR convencionales y secuenciación. *p* indica transcripto primario, *m* indica ARNm.

5. WESTERN BLOT

Para determinar y cuantificar la presencia de diferentes proteínas en los condrocitos en cultivo se realizó la técnica de *western blot*. Los condrocitos en cultivo fueron tripsinizados y el *pellet* obtenido se lavó con PBS y se le añadió un tampón de lisis que contenía: NaCl 150 mM, Tris – HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NP-40 0,5 % vol/vol y Triton X-100 1% vol/vol. Los lisados se almacenaron a -80 °C.

Primero se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS – PAGE (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Los geles se hicieron en cristales de 1 mm de grosor con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del 10 %. El gel se divide en dos partes: gel concentrador y gel separador según se indica en la **Tabla 5**. Se cargó un volumen de 5 µl de cada lisado en tampón de carga 1X (10 % SDS, Tris-HCl 200 mM pH 6,8, 50 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol, 10 % β- mercaptoetanol) hirviéndolos previamente a 100 °C durante 10 minutos, se mantuvieron a 4 °C hasta su carga en el gel.

Reactivo	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3,33 ml	400 µl
Agua Destilada	4,64 ml	2,2 ml
Tris 2M pH 8,8	1,88 ml	-
Tris 1M pH 6,8	-	375 µl
10% de SDS	100 µl	30 µl
20% de PSA	25 µl	12 µl
TEMED	12 µl	3 µl

Tabla 5. Concentraciones de los reactivos para elaborar un gel de electroforesis SDS-PAGE. Volúmenes empleadas de cada reactivo para obtener un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10 %.

La electroforesis se realizó con el sistema *MiniProtean III Cell* (Bio-Rad, EEUU) en el tampón de electroforesis 1X (Tris-Base 2,5 mM, glicina 19,2 mM, 0,01 % SDS) a 60 V en el gel concentrador y a 90 V una vez las muestras alcanzaron la fase separadora.

Como marcador de pesos moleculares se utilizó *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, (Fermentas, EEUU).

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno, PVDF (*Millipore*, EEUU), previamente activada mediante su inmersión en metanol (*VWR Prolabo BDH*, EEUU) 5 minutos seguido de 5 minutos en agua destilada, el proceso se repitió dos veces, se realizó con agitación y posteriormente se dejó la membrana en tampón de equilibrado (20 % metanol, 1X de tampón de transferencia (de 58 g Trizma, 29 g de glicina y 3,7 g de SDS (10X) en agitación hasta el momento de su uso. Antes de la transferencia en el *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, EEUU), las esponjas, el gel y la membrana fueron equilibrados con el tampón de equilibrado 15 minutos a 4 °C. La transferencia semiseca se hizo a 20 V durante una hora. Después de la transferencia la membrana se bloqueó con una solución de bloqueo compuesta por un 5 % de leche (*Sigma*, EEUU) en tampón de lavado 1X (TTBS) preparado a partir de TBS 10X (Tris-Base 2 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) al que se le añadió un 0,05 % de Tween-20 (*Sigma*, EEUU). El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

El anticuerpo primario (**Tabla 6**) se incubó durante 16 – 18 horas en rotación a 4 °C, después se hicieron 5 lavados de 8 minutos para eliminar su exceso sobre la membrana. El anticuerpo secundario (**Tabla 6**) se incubó una hora a temperatura ambiente en rotación. Para el revelado se utilizó *ECL Western Blotting Detection Reagent* (*GeHealthcare*, Reino Unido) según indica el fabricante, y se visualizó en la cámara de revelado *Las3000*. En todos los *western blot* se realizó otro paralelamente para la α -tubulina que se utilizó como control de carga, ya que es una proteína de citoesqueleto expresada de forma constitutiva en las células de mamíferos.

En el caso de los *western blots* realizados con las líneas celulares T/C-28a2 y HCS-2/8 en el laboratorio liderado por el Dr. Luc Leybaert, las células se cultivaron en frascos de 75 cm² hasta su total confluencia, momento en el que fueron lisados con el tampón Rippa (Tris pH 8,2 25 mM, NaCl 50 mM, NP-40 0,5 %, deoxicholate 0,5 % y SDS 0,1 %), a 1 ml de tampón se le añadieron 20 μ l de mini-EDTA (*Life Technology*, EEUU), 1 μ l de DTT (*Sigma*, EEUU), 10 μ l de inhibidores de proteasas II (*Invitrogen*, EEUU), 10 μ l de inhibidores de proteasas III (*Invitrogen*, EEUU) y 0,055 g de glicerol fosfato (*Sigma*, EEUU) mediante el raspado del cultivo con *scalpes*, previamente se realizaron tres lavados con PBS frío. Las muestras se guardaron a -20 °C.

Las muestras se cuantificaron con el kit colorimétrico *Bio-Rad DC™ Protein Assay* (*Bio-Rad*, EEUU) como indica el fabricante y la reacción colorimétrica fue media en el

espectrofotómetro *Perkinelmer™ Precisely Wallac Victor3™ 1420 Multilabel Counter*. De cada muestra se cargaron 50 mg con 2 µl de agente reductor *NuPage Novex (Life Technologies, EEUU)* y 4µ de *LDS NuPage Novex (Life Technologies, EEUU)* en geles prefabricados con un gradiente de 4 a 12 % de acrilamida / bisacrilamida (*Life Technologies, EEUU*) previamente hervidas durante 10 minutos a 100 °C. Para la electroforesis se utilizó el tampón *NuPage Novex (Life Technologies, EEUU)* a una dilución 1/50.

La transferencia fue húmeda en el *cassette Cxell SureLock™ (Invitrogen, EEUU)* con un tampón compuesto por 3,03 g de Tris, 14,4 g de glicina, 20 % de SDS, 200 ml de metanol que se llevó hasta un volumen de 1 l con agua. Las membranas utilizadas fueron de nitrocelulosa (*ThermoFisher, EEUU*). Tras la transferencia la membrana fue tratada con *SYPRO™ Ruby Protein Blot Stain (Life Technology, EEUU)* como indica el fabricante, para comprobar la eficiencia de la transferencia.

La membrana fue bloqueada durante 1 hora con la solución de bloqueo (5 % de leche en tampón 1X TTBS) a temperatura ambiente en agitación. Se incubó con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (**Tabla 6**). Se lavó tres veces con la solución de bloqueo, lavados de 5 minutos cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario (**Tabla 6**) una hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó tres veces, 5 minutos cada lavado, en agitación con tampón TTBS 1X y se reveló con el kit *BCIP/NBT (Invitrogen, EEUU)* como indica el fabricante.

Para el estudio de la expresión de Cx43 bajo el efecto de la IL-1β y TNFα (*Invitrogen, EEUU*) las células se cultivaron en frascos de 25 cm². La concentración utilizada fue de 10 µg/ml para cada caso. Los tratamientos se realizaron durante 24 horas.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Ratón anti- α -tubulina (T9026, <i>Sigma</i> , EEUU)	1:1000	Cabra anti-ratón IgG (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:1000
Conejo anti-NTD-conexina 43 (AP1541b, Abgent, EEUU)	1:500	Cabra anti-conejo (32260, <i>Invitrogen</i> , EEUU)	1:5000
Conejo anti-conexina 43 (A6219, <i>Sigma</i> , EEUU)	1:500 1:5000	Peroxidasa de cabra anti-conejo (A6154, <i>Sigma</i> , EEUU)	1:1000
Ratón anti-vimentina (ab8069, <i>Abcam</i> , Reino Unido)	1:1000	Cabra anti-ratón IgG (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:1000
Cabra anti-HSP90 β (sc-1057, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU)	1:500	Policlonal conejo anti-cabra (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:2000
Cabra anti-RAN-GTP (sc-1156, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU)	1:500	Policlonal conejo anti-cabra (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:2000
Conejo anti-nucleolina (PAB12541, <i>Abnova</i> , Taiwan)	1:1000	ECL Mono anti-conejo IgG (NA934, <i>GE Healthcare</i> , Reino Unido)	1:1000
Ratón anti- α -cristalina (ab13496, <i>Abcam</i> , Reino Unido)	1:500	Cabra anti-ratón IgG (NA931, <i>GE Healthcare</i> , Reino Unido)	1:1000
Ratón anti-calciclina (S100A6) (sc-271396, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU y)	1:500	Cabra anti-ratón IgG (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:1000
Ratón anti-Integrina α -V (sc-376156, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU)	1:500	Cabra anti-ratón IgG (P0449, <i>DakoCytomation</i> , Dinamarca)	1:1000
Conejo anti-c-src (sc-19, <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EEUU)	1:100	ECL Mono anti-conejo IgG (NA934, <i>GE Healthcare</i> , Reino Unido)	1:1000
Conejo anti-p-src (Try416) (2101, <i>Cell Signalling Technology</i> , EEUU)	1:300	ECL Mono anti-conejo IgG (NA934, <i>GE Healthcare</i> , Reino Unido)	1:1000
Anti-GAPDH (5G4Mab6c5, <i>Hystest Ltd</i> , Finlandia)	1:5000	Cabra anti-ratón (32230, <i>Invitrogen</i> , EEUU)	1:10000
Conejo anti-conexina-43 (488100, <i>Invitrogen</i> , EEUU)	1:2000	α -conejo IgG alcalina fosfatasa producida en cabra (A8025-1ML, <i>Sigma</i> , EEUU)	1:2000

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la realización de *western blot*.

6. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS CANALES

A continuación se explican las diferentes técnicas que se utilizaron para el estudio de la funcionalidad de los canales y hemicanales.

6.1. *Dual voltaje clamp* e inyección de una molécula fluorescente

Las técnicas de *dual voltaje clamp* e inyección de una molécula fluorescente^{265, 266} fueron realizadas en el laboratorio de los doctores Peter Brink y Virgin Valiunas de la Universidad *Stony Brook* de Nueva York. Los condrocitos primarios, se enviaron desde el INIBIC en DMEM suplementado con 15% de SEB y 100 µg/ml de primocin. En el caso de la técnica *dual voltaje clamp* las células adheridas al cubreobjetos se transfirieron a cámaras experimentales montadas en un microscopio invertido *Olympus IMT2* (*Olympus*, Alemania) con sistema de fluorescencia. Para más detalles de la técnica ver las siguientes referencias^{117, 267}. Para el estudio de la transferencia de moléculas entre células en contacto se utilizó la inyección de la molécula fluorescente *Lucifer Yellow* (LY, *Molecular Probes*, EEUU). El LY no es capaz de atravesar la membrana de las células excepto a través de los hemicanales funcionales o UC dado sus propiedades físico-químicas y peso molecular (547 Da). Se preparó una solución con 2 mM/l de LY, se cargó en una micropipeta y se inyectó en una de las células. Para monitorizar la transferencia de LY se tomaron fotografías con una CCD-cámara digital con 16-bit 64000 *pixel* en escala de grises (*LYNXX2000T*, *Spectra Source Instruments*, Canadá). Para el estudio de la transferencia de glucosa y de oligonucleótidos sintéticos se utilizaron moléculas fluorescentes cuyo protocolo tiene la misma base que el protocolo de transferencia de LY^{265, 266, 268}. Los datos se analizaron según han descrito Kanaporis *et al.*²⁶⁹ y Valiunas *et al.*²⁶⁵. Para más detalles de la técnica ver las referencias^{267, 117}.

6.2. Electroporación *in situ*

Esta técnica se realizó utilizando el *In situ Porator* (*Cell Projects Ltd*, Reino Unido), el cual se muestra en la **Figura 10** junto con la cámara de cultivo de ocho pocillos necesaria para su uso. Cada pocillo tiene la mitad de su superficie cubierta por indio-óxido de estaño; uno de los óxidos conductores transparentes más ampliamente

utilizados debido a sus propiedades de conductividad eléctrica y transparencia óptica, así como la facilidad con la que se puede depositar en forma de capa fina.



Figura 10. *Insitu Porator*. En la imagen se muestra el *Insitu Porator* con una cámara de 8 pocillos lista para electroporar (flecha roja).

Se aplica un pulso eléctrico suave que origina poros transitorios en las membranas celulares que en presencia de LY o la molécula fluorescente que se pretenda estudiar logra entrar en las células de la mitad del pocillo, situadas sobre la superficie de indio-óxido de estaño (zona electroporada). Desde las células electroporadas se transfiere a las células en contacto que se encuentran en la mitad no recubierta por indio-óxido de estaño (zona no electroporada) mediante las UCs. La transferencia del fluoróforo se observó en un microscopio invertido con sistema de fluorescencia, *Nikon Eclipse Ti* (*Nikon*, Japón) y ocurre de forma muy rápida en los primeros minutos de contacto. La electroporación *in situ* es un proceso no traumático para las células y una gran variedad de moléculas, como péptidos, oligonucleótidos o drogas pueden introducirse instantáneamente en las células electroporadas²⁷⁰.

Las células se cultivaron en las cámaras de cultivo hasta una confluencia del 70 - 80 % en DMEM suplementado con 15 % de SEB y 100 µg/ml de primocin. Se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas dos veces con HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution 1X sin CaCl₂ ni MgCl₂*, *Gibco Invitrogen*, EEUU) sin Mg²⁺ ni Ca²⁺, para no interferir en la apertura y cierre de las UCs. Se añadió el LY (400 µl de un stock a 1 mg/ml (*Cell Projects Ltd*, Reino Unido). Se utilizó el programa *mild* a 20 V para la

electroporación. Posteriormente se retiró la solución con LY y las células se incubaron con HBSS suplementado con 10 % de SFB dializado (*Silantes*, Alemania) a 37 °C durante 4 minutos. Este tiempo es suficiente para que las células electroporadas se recuperen y que el LY se transfiera a través de las UCs. Las células se fijaron con formaldehído al 4 % en PBS durante dos minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS dos veces para eliminar los restos del fijador, la cámara se cubrió totalmente con PBS y los pocillos se taparon con un portaobjetos para poder visualizarlos al microscopio de fluorescencia invertido *Nikon Eclipse Ti* (*Nikon*, Japón) utilizando el programa *NIS-Elements AR V3.0* (*Nikon*, Japón).

La cuantificación se realizó contando las células fluorescentes presentes en la zona no electroporada. Este valor se normalizó frente al número de células electroporadas localizadas en el borde de electroporación. Paralelamente se realizó como control la electroporación *in situ* de las células en presencia de GAP27 (*Sigma*, EEUU), un péptido mimético de la Cx43 que bloquea parcialmente las UCs constituidas por Cx43. Las células fueron incubadas durante una hora a 37 °C con una concentración de 250 µg/ml de GAP27. Después de esta incubación se realizó el experimento como se ha descrito anteriormente.

6.3. Ensayo de hemicanales

Para estudiar la funcionalidad de los hemicanales se evaluó la capacidad de captación de LY por parte de las células en cultivo en monocapa. Para ello, las células se cultivaron en placas P60 (28 cm² de superficie de cultivo, *NUNC*[™], *VWR International*, EEUU) en DMEM suplementado con 15 % de SEF y 100 µg/ml de primocin hasta una confluencia del 40 - 50 %. Durante este ensayo se trató de trabajar con una confluencia entre el 50 - 60 % para evitar que las células estableciesen contactos físicos y evitar que el LY se transfiera a través de las UCs provocando falsos positivos.

Las células se lavaron con PBS - EGTA 2 mM dos veces para eliminar completamente restos del medio de cultivo. Posteriormente fueron incubadas con LY 0,4 % en PBS durante 30 minutos a 37 °C, tiempo en el que el LY del medio entra en las células por los hemicanales. Después de la incubación se lavó con PBS suplementado con 10 % de SBF dializado y 3,2 mM de CaCl₂, para favorecer el cierre de los hemicanales. El análisis y toma de imágenes se realizó utilizando el microscopio de fluorescencia invertido *Nikon Eclipse Ti* y el programa *NIS-Elements AR* versión 3.0. La cuantificación

se llevó a cabo contando el número de células fluorescentes presentes en la placa, normalizando dicho valor frente al número total de células.

La viabilidad de las células se determinó utilizando azul de tripano (*Sigma*, EEUU). Las células se visualizaron en el microscopio óptico y se contaron utilizando una cámara de *Neubauer*, obteniendo un porcentaje de viabilidad según el número de células vivas y muertas (de color azul).

En los ensayos realizados en el laboratorio del Dr. Luc Leybaert los condrocitos T/C-28a2 y HCS-2/8 fueron cultivados en placas de 4 pocillos hasta alcanzar una confluencia menor del 50 %. Las células se lavaron 2 veces con HBSS - HEPES (CaCl₂ 1,26 mM, MgCl₂-H₂O 0,5 mM, MgSO₄-7H₂O 0,5 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, NaCl 137,6 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 0,34 mM, D-glucosa (dextrosa) 5,5 mM y 25 ml de HEPES con 1,4 mM de Ca²⁺ (*Sigma*, EEUU)), 2 de los pocillos se volvieron a lavar con este tampón mientras que los otros 2 se lavaron con HBSS - HEPES con menor concentración de Ca²⁺ (CaCl₂ 1,26 mM, MgCl₂-H₂O 0,5 mM, MgSO₄-7H₂O 0,5 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, NaCl 137,6 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 0,34 mM, D-glucosa (dextrosa) 5,5 mM y 25 ml de HEPES con 1,4 mM de Ca²⁺ (*Sigma*, EEUU)). Las células fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con yoduro de propidio (*Life Technologies*, EEUU) 10 mM, todos los pocillos se lavaron 2 veces con HBSS - HEPES y se incubaron con *Hoeschst* (*ThermoFisher*, EEUU) 1 µg/ml durante 10 minutos para la tinción de núcleos. La absorción del yoduro de propidio fue observada en el microscopio *Nikon Eclipse TE2000E* con el programa *Nis-Elements F3.0*. La positividad del yoduro de propidio fue cuantificada con el programa *ImageJ*, en el cual se contaron las células totales gracias a la tinción de los núcleos y las células que habían absorbido yoduro de propidio, esta relación se expresó como porcentaje.

El ensayo de hemicanales fue realizado con bloqueantes de hemicanales inespecíficos como el *carbonoxolone* (Cbx) y específicos como el GAP19 (100 µM disuelto en agua destilada (*Tocris*, Reino Unido)). Las células fueron incubadas con cada uno de ellos durante 30 minutos a 37 °C. Después de este tiempo se realizó el conteo de células fluorescentes. En otros ensayos las células fueron estimuladas con IL-1β (*Invitrogen*, EEUU) o TNFα (*Invitrogen*, EEUU) a una concentración de 10 ng/ml durante las 24 horas previas a la realización de la técnica.

6.4. *Scrape loading*

La técnica de *scrape loading* es una técnica que permite introducir en células adherentes en cultivo en monocapa marcadores que no pueden atravesar la membrana. Para ello, se raspa la superficie de la placa de cultivo con un utensilio punzante que daña las células permitiendo que el marcador entre en ellas. Las células que se recuperan del daño y que han incorporado el marcador, lo transfieren a las células en contacto a través de las UCs. En este experimento se mide la distancia de la difusión del marcador y el número de células fluorescentes (células receptoras) que no estaban en contacto con el surco creado. Como control se puede utilizar marcadores que no pueden atravesar las UCs, por lo que solo van a teñir las células dañadas, permitiendo diferenciar las células dañadas viables en el borde del surco del resto²⁷¹. En este trabajo se usó como marcador control *Alexa Dextrano 568 (Invitrogen, EEUU)* (AD) de color rojo.

Los condrocitos primarios y condrocitos T/C-28a2 se cultivaron en placas P60 en DMEM suplementado con 15 % de SEF y 100 µg/ml de primocin hasta una confluencia del 70 - 80 %. Se eliminó el medio de cultivo y se lavó con PBS dos veces. Se añadió el LY 0,4 % en PBS y con una punta de pipeta, una cuchilla o un bisturí se realizaron tres raspados en la superficie de la placa, dibujando líneas rectas. Se dejó incubar a 37 °C durante 3 minutos. Después se lavó con PBS suplementado con 10 % de SFB dializado y la placa se observó al microscopio de fluorescencia invertido *Nikon Eclipse Ti* utilizando el programa *NIS-Elements AR V.3.0.* Como control se realizó el mismo experimento pero incubando las células previamente con GAP27 (250 µg/ml) durante una hora. En algunos casos las células fueron previamente fijadas con formaldehído antes de su análisis.

Para los condrocitos aislados de cartílago articular de los ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO se utilizó AD como control, color rojo y carbofluoresceína (CB) cuyo peso molecular es 473,39 Da, y que al igual que el LY se visualiza en color verde y atraviese las UCs (*Sigma, EEUU*). Los condrocitos se sembraron en placas de 28 cm² hasta alcanzar el 100 % de su confluencia. Las células fueron lavadas con PBS, se realizaron dos raspados con un bisturí en presencia de 0,5 % (peso/vol) de AD y 0,5 % (peso/vol) de CB, a temperatura ambiente y se incubó 2 minutos. Se lavó con DMEM y la transferencia de CB se visualizó con el microscopio *AXIOCAM MRm ZEISS - HBO100 (Zeiss, Alemania)* con el programa *Axioplan 2 (Zeiss, Alemania)*.

7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para el estudio de proteínas que interaccionan con el CTD de la Cx43 se han realizado diferentes técnicas secuencialmente; comenzando por el lisado de condrocitos primarios aislados de cartílago articular sano y de pacientes con OA con diferentes grados de la enfermedad, cuyos cultivos primarios se sometieron a una inmunoprecipitación (IP) utilizando un anticuerpo específico que reconoce el CTD de la Cx43. La especificidad y eficacia de la IP fue comprobada con geles SDS-PAGE teñidos con plata y *western blot*. En otro gel SDS - PAGE teñido con *Coomassie Brilliant Blue* (*Sigma*, EEUU), se cortaron las bandas utilizadas para la digestión de las proteínas, de las que posteriormente se extrajeron sus péptidos. Los péptidos fueron purificados con *stages tips* y separados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas. Este flujo de trabajo se resume a continuación (**Figura 11**):

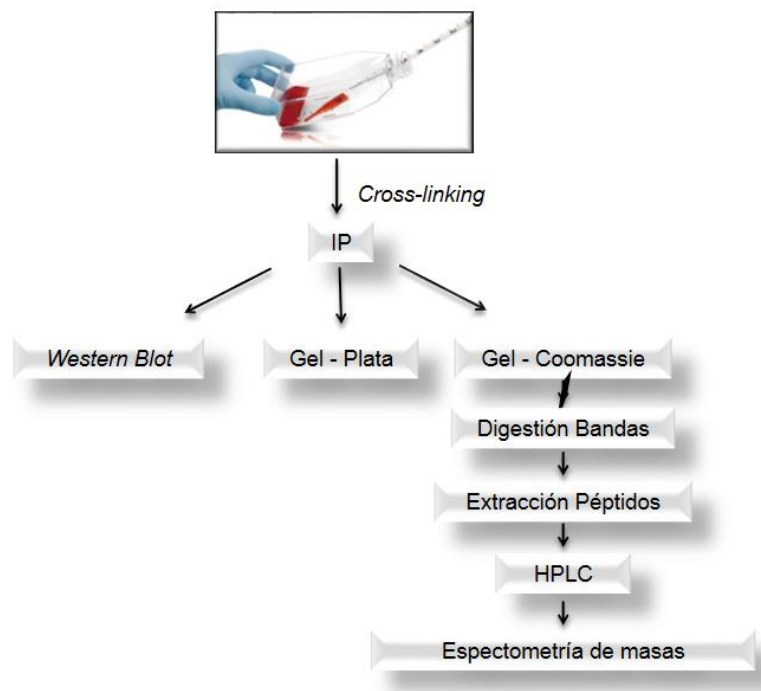


Figura 11. Esquema de las diferentes técnicas realizadas para la identificación de las proteínas que interaccionan con el CTD-Cx43.

7.1. Inmunoprecipitación

La IP es una técnica especialmente indicada para el estudio de interacciones entre proteínas endógenas, aunque presenta ciertas limitaciones: (i) concentración insuficiente de la proteína en el lisado celular, (ii) interacción transitoria entre proteínas, (iii) localización de la proteína en la célula y (iv) unión inespecífica de proteínas al soporte sólido de la IP. El protocolo seguido en esta IP se basa en el protocolo publicado por Nelson *et al.* en 2006²⁷² para la realización de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) y ajustado al estudio de interacciones de proteínas (Co-IP).

Los condrocitos se cultivaron en frascos de 162 cm² hasta una confluencia del 80 – 90 %, posteriormente se retiró el medio y se lavaron 2 veces con HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, se tripsinizaron y recogieron con DMEM suplementado con 15% de SEF con 100 µg/ml de primocin hasta un volumen de 10 ml que se incubó con 400 µl de formaldehído 37 % (peso/vol), siendo su concentración final del 1 %, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después el formaldehído fue inactivado con glicina 0,125 M, durante 10 minutos. Las células se recogieron mediante centrifugación (1500 rpm, 5 minutos, 4 °C) y se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos del sobrenadante. Las muestras se guardaron a -80 °C.

El *pellet* celular se resuspendió en el tampón de lisis-IP (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, NP-40 0,5% vol/vol, Triton X-100 1% vol/vol, NaCl 150 mM). En los casos que se intentó mejorar la detección de las proteínas de membrana se utilizó otro tampón que contenía Sakosyl y SDS para su lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, NP-40 0,5% vol/vol, Sarkosyl 0,5% vol/vol, SDS 0,1 % vol/vol y NaCl 150 mM). Ambos tampones contenían inhibidores de proteasas (*Sigma*, EEUU) y 1 mM de PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*, *Sigma*, EEUU).

Se utilizaron partículas de agarosa con proteína G unida como soporte sólido para realizar la IP. Comúnmente se denomina a la proteína G – agarosa como cuentas, en inglés *beads* (*Protein G Plus – Agarose*, *SantaCruz Biotechnology*, EEUU). Los lisados celulares en tampón de lisis-IP con inhibidores de proteasas y PMSF se incubaron con 50 µl de proteína G - agarosa durante una hora a 4 °C en rotación para eliminar posibles uniones inespecíficas a la proteína G. Se dio un pulso en la centrifuga a 2000 rpm y se desechó el *pellet* con la proteína G - agarosa unida a posibles inespecificidades. El sobrenadante que se corresponde con el extracto celular total (ECT) del que se guardaron 50 µl a -80 °C, se incubó durante una hora a 4 °C en rotación con 4 µg del anticuerpo anti-CTD-Cx43 (IP+) (sc-6560, *Santa Cruz Biotechnology*, EEUU). Se añadió 50 µl de proteína G - agarosa previamente lavadas 3 veces con una solución de IP-

PMSF y se incubaron durante 16 – 18 horas a 4 °C en rotación. Como control negativo para detectar uniones inespecíficas se realizaron IPs en las mismas condiciones pero sin añadir el anticuerpo de anti-CTD de la Cx43 (IP-).

Con el complejo proteína G - agarosa - anticuerpo anti-CTD-Cx43 - CTD-Cx43 ya formado, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 4 °C y 2000 rpm, desechando el sobrenadante y lavando el *pellet*, con tampón de lisis-IP de cuatro a seis veces. Finalmente el *pellet* fue resuspendido en tampón de carga 1X (SDS 10%, Tris 0,2 M a pH 6,8, glicerol al 50 %, azul de bromofenol 0,1 % (peso/vol) (5X) con 2-mercaptoetanol 1,42 M). Primero se incubó a 37 °C durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante y se añadió otra vez tampón de carga. La muestra se incubó a 95 °C durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se juntó con al anterior. Las partículas sólidas de agarosa se desecharon y las muestras se guardaron a -80 °C.

7.2. SDS-PAGE con tinción de plata y *western blot*

El gel SDS-PAGE se realizó tal como se describió en el apartado 4 (**4. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa**) de esta sección. Se cargaron 5 µl de ECT, 5 µl de la IP (IP+ o IP-). Para la realización de la tinción de plata, se sigue el siguiente procedimiento: fijación con 40 % de etanol absoluto, 10 % de ácido acético y agua durante 30 minutos en agitación. Se retiró el fijador y se lavó dos veces, durante 10 minutos, en agitación. Se sensibilizó el gel con 0,02 % de tiosulfato sódico durante 1 minuto en agitación, se retiró y se lavó con agua durante 1 minuto. El gel se incubó con 0,2 % de nitrato de plata en 0,075 % de formaldehído durante 30 minutos en agitación. Después del lavar con agua unos instantes, se añadió la solución reveladora (3 % de carbonato potásico y 12,5 mg/ml de tiosulfato sódico en 0,025 % de formaldehído) y se agitó hasta que la señal se empezó a quemar. La reacción se paró con una solución de 3 % Tris 3 % en 10 % de ácido acético durante 15 minutos en agitación. Se procedió a lavar con agua varias veces antes de escanear la imagen con el programa *ImageScanner* (*GeHealthcare*, Reino Unido). Además de la tinción de plata se realizaron *westerns blots* con los ECT e IP+ e IP- utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y anti- α -tubulina como control de carga (**Tabla 6**).

7.3. SDS-PAGE tinción con azul de coomassie, digestión proteica, extracción y purificación de los péptidos

Los geles SDS-PAGE cargados con las IP+ e IP- para su posterior análisis por espectrometría de masas se tiñeron con azul de *coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*, *Sigma*, EEUU). La electroforesis duró 30 minutos a 60 V, por lo que las proteínas no se separaron en bandas bien diferenciadas a lo largo del gel, sino que se encontraban concentradas al inicio del gel separador. El gel se tiñó con azul de *coomassie* 0,1 % en metanol 20 % durante 15 minutos en agitación, se fijó en 45 % de metanol y 10 % de ácido acético dos veces durante 15 minutos en agitación y se dejó lavando en agua destilada antes de escanearlo.

Cada carril se cortó en 3 bandas que se destiñeron con 50 % de metanol durante 15 minutos a 37 °C, tres veces. Las muestras se lavaron con agua HPLC (*Lab-Scan Analytical Sciences*, Polonia). Cada banda se cortó en varios trozos con la ayuda de un bisturí y un cristal como soporte. A partir de este punto todos los *ependorfs* utilizados fueron *Protein LoBind* (*Eppendorf*, Alemania), diseñados especialmente para su uso en proteómica. Con cada muestra (bandas troceadas) se siguió el siguiente procedimiento de digestión en gel basado en el protocolo de Shevchenko *et al.*²⁷³: Deshidratación con acetonitrilo (ACN grado HPLC, *Fluka Analytical*, *Sigma*, EEUU). Reducción de los puentes disulfuro con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato amónico (AmBi) 25 mM a 56 °C durante 30 minutos. Alquilación con iodoacetamida (IAA) 50 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Deshidratación con ACN e incubación a 4 °C durante tres horas con tripsina a una concentración de 6,67 µg/ml (*Roche*, Suiza). La deshidratación previa a la adición de tripsina favorece la entrada de la enzima en el interior de las bandas, la tripsina no absorbida se retiró. Se añadió AmBi 25 mM para la hidratación de las bandas que después se incubaron a 37 °C durante 13 – 16 horas.

Para la extracción de los péptidos digeridos se realizó un primer vorteo de una hora seguido de 30 minutos de sonicación y se recogió el sobrenadante. Se realizaron tres extracciones más, añadiendo a la muestra 50 % de ACN y 0,1 % de trifluoroacético (TFA grado HPLC, *Fluka Analytical*, *Sigma*, EEUU), vorteadando 1 hora y sonicando 30 minutos. Las tres extracciones se fueron añadiendo a la extracción inicial y el volumen total se evaporó en la centrífuga de vacío *Savant SPD121P SpeedVac Concentrator* (*Thermo Scientific*, EEUU). Las muestras se guardaron a -20 °C. Para su purificación los péptidos fueron reconstituidos en TFA 0,5 %, se vortearon y se sonicaron 10 minutos antes de pasarlos por las columnas. Las columnas empleadas fueron *Stage Tips C18* hechas a mano en el laboratorio empleando *Empore disk-C18*, 47 mm, 3M O (*Agilent*

Technologies, EEUU) y puntas de pipeta *Protein LoBind* (*Eppendorf*, Alemania). Las columnas se activaron con metanol y se acondicionaron con el tampón B (80 % ACN y 0,5 % TFA) y con el tampón A (0,5 % TFA), se pasaron las muestras por las columnas y se eluyeron con el tampón A seguido del tampón B. La elución se evaporó en la centrifuga de vacío y se guardó a -20 °C.

7.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia

En este estudio, se ha realizado una cromatografía en fase reversa que separa las proteínas por su hidrofobicidad. Es una cromatografía de reparto en la que la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar de carácter orgánico. Los péptidos son apolares por lo que se quedan retenidos en la columna y su elución se realiza incrementando el porcentaje de fase orgánica.

Los péptidos purificados y evaporados se reconstituyeron en 7 µl de la solución 0,1 % TFA y 2 % ACN se vortearon y sonicaron durante 30 minutos. Se pasaron a viales especiales para la cromatografía en fase reversa en un *Tempo™ Nano-LC system* (*ABSciex*, EEUU). De cada fracción se inyectaron 5 µl a un flujo de 15 µl durante 15 minutos en una precolumna C18 (*Michtrom* 0,5*0,2 mm) para la eliminación de las sales y concentración de los péptidos. Después se cargaron en una nanocolumna (*Intergrafit C18, Proteopep™ II, 75 µm id, 15 cm, 5 µm, 300 Å, New Objective*, EEUU) a un flujo constante de 350 nl/min con un gradiente inicial de 95 % fase móvil A (0,1 % TFA y 5 % ACN) y 5 % fase móvil B (0,1 % TFA y 80 %ACN) (**Tabla 7**). La columna se lavó y reconstituyó con la fase móvil B al 80 % durante 5 minutos. Después de eliminar todo el material apolar y no peptídico, las columnas se reequilibraron bajo las condiciones iniciales durante 15 minutos. Las fracciones peptídicas a medida que eluían se dispusieron automáticamente sobre una placa MALDI cada 15 segundos. Mezclándose con la matriz de α-ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (3 mg/ml en 0,1 % de TFA y 70 % de ACN) mediante el sistema de fraccionamiento *Sun Collect MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector* (*SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH*, Alemania).

Tiempo (min)	% Fase Móvil A	% Fase Móvil B
0	95	5
3	95	5
30	50	50
32	20	80
34	20	80
38	95	5
50	95	5

Tabla 7. Gradiente de elución utilizado en la cromatografía líquida.

7.5. Espectrometría de masas

El análisis mediante espectrometría de masas (MS) se compone de varias etapas: (i) ionización de la muestra, (ii) separación de los iones según su relación m/z y (iii) recuento de cada tipo de iones mediante un detector. En este trabajo se utilizó el espectrómetro de masas *MALDI-TOF/TOF (4800 ABSciex, EEUU)*. En este espectrómetro la fuente de ionización es de desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI, del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*). La muestra sólida se mezcló con una matriz orgánica y la ionización se produjo por sublimación al incidir el láser sobre ella. En MALDI, la mayoría de los péptidos se ionizan con una carga positiva. La identificación de proteínas se realiza a través de los péptidos obtenidos de la digestión con una enzima, en este caso, la tripsina. La identificación de una proteína se realiza comparando las masas obtenidas (empíricas) con las masas resultantes de una digestión *in silico* a partir de una base de datos proteómica o genómica^{274, 275, 276}. Para la identificación de proteínas en muestras complejas se usa el espectro de fragmentación de MS/MS, que proporciona información sobre su secuencia de aminoácidos. De la cromatografía HPLC en fase reversa se obtuvo la separación de cada muestra, cromatograma, sobre una placa MALDI. Las diferentes posiciones que tiene la placa se denominan *spots*. Aunque una misma placa sirva para el fraccionamiento de varias muestras, el análisis de masas se hizo separadamente para cada cromatograma. Antes de introducir la placa en el espectrofotómetro se añadieron calibrantes (8 *spots* en la placa). Los calibrantes están constituidos por péptidos de angiotensina de masa conocida diluidos en la matriz a una concentración de 3 fmol/*spot*,

con ellos se hizo una calibración interna con el estándar m/z 1046,5. Primero se realizó el análisis de MS que proporcionó los espectros que permitieron la identificación por huella peptídica. Hasta 12 de los iones con una señal más intensa por *spot* se seleccionaron con una señal/ruido mayor de 80 como precursores para el análisis de MS/MS, excluyendo picos (masas) de la tripsina y de la matriz. En este segundo análisis se seleccionaron los precursores con una señal/ruido mayor de 25 – 40 para identificar las proteínas.

Los datos de MS/MS fueron adquiridos por el programa *4000 Series Explorer V3.5.1* y se identificaron mediante el programa informático *ProteinPilot 3.0* (Applied Biosystems, EEUU). Este programa identifica las proteínas utilizando el algoritmo de búsqueda Paragon para comparar las secuencias de los aminoácidos de los péptidos obtenidos con las secuencias teóricas de la base de datos *Uniprot-SwissProt* (versión 2012_05:536,029 entradas). Los parámetros empleados en la búsqueda fueron: tripsina como enzima de digestión y IAA como agente alquilante de los residuos de cisteína. Solo se incluyeron en los resultados aquellas proteínas identificadas con dos o más péptidos diferentes con un 95 % de confianza (*Unused Score* mayor o igual a 1,3). Cada proteína identificada presenta tres valores: *unused*, *coverage* y *number of peptide*. *Unused* refleja los péptidos identificados únicamente relacionados con esa proteína. *Coverage*: el porcentaje de la secuencia de aminoácidos de la proteína que es cubierta por los aminoácidos identificados por MS/MS. *Number of peptide*: el número de péptidos obtenidos por MS/MS que han servido para identificar una proteína

7.6. Ontología de genes

En 1998, representantes de las bases de datos de tres organismos ‘modelo’ –*Drosophila* (*FlyBase*), *Saccharomyces Genome Database* y *Mouse Genome Database*– fundaron el Consorcio GO (Ontología de genes (GO, del inglés *Gene Ontology*)²⁷⁷. La GO es un esfuerzo colaborativo para establecer descripciones consistentes de los productos génicos anotados en bases de datos diferentes La Ontología de Genes agrupa realmente tres ontologías que se corresponden con tres aspectos diferentes de la biología celular: función molecular, proceso biológico y componente o localización sub-celular: (i) proceso biológico: los procesos biológicos implican generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares. (ii) función molecular: describe actividades que ocurren a nivel molecular; sus términos representan a las actividades y no a las entidades (moléculas o complejos moleculares) que llevan a cabo las acciones, sin especificar cuándo, dónde,

o en qué contexto ocurren. (iii) Componente celular se refiere al espacio celular donde se encuentra el producto génico.

Para el análisis de los datos de MS y para su representación con los términos de GO, los datos fueron analizados utilizando *Protein Information and Knowledge Extractor (PIKE)*, <http://proteo.cnb.csic.es/pike/>), el cual es un enlace para el sistema web *DAVID* que proporciona una medida de la calidad de las interacciones proteínicas de acuerdo con GO.

8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se realizaron diferentes ensayos de proliferación celular utilizando condrocitos aislados de la articulación de la rodilla de los ratones de la serie Cx43K258stop y Cx43cKO. La proliferación celular se cuantificó mediante el conteo de las células utilizando el contador automático *Beckman Coulter Z1 Coulter™* (Beckman, EEUU). Las células en cultivo fueron tripsinizadas y contadas en una cámara Neubauer, siendo sembradas en placas P60 el mismo número de células. El experimento se realizó por triplicado; de cada fenotipo se sembraron tres placas para realizar el conteo celular el día 1, 3, 4, 6 y 7 y cada medida se tomó tres veces. Con los datos obtenidos se obtuvo el factor de crecimiento. Este ensayo fue validado utilizando inmunofluorescencia y un anticuerpo anti-Ki67.

Resultados

1. ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN CELULAR EN CONDROCITOS Y CARTÍLAGO ARTICULAR

La mayoría de los resultados que se describen a continuación han sido publicados en las siguientes revistas indexadas (ver ANEXOS): *American Journal of Pathology*, *Annals of the Rheumatic Diseases*, *Osteoarthritis and Cartilage* y en *Molecular and Cellular Proteomics*. Algunos de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral están siendo utilizados para el registro de dos patentes de invención por lo que no pueden ser mostrados.

1.1. Análisis de la estructura de los condrocitos en cartílago articular

Para realizar este estudio se han utilizado secciones de cartílago articular de *Sus scrofa* (cerdo) de la *Unidade de Ciruxía Experimental del Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña* (CHUAC, *Xerencia de Xestión Integrada A Coruña*, XXIAC) y muestras biológicas humanas procedentes de donantes sanos del CHUAC-XXIAC (PI13/00591).

En la tinción con hematoxilina de Gill III de secciones de 4 µm de cartílago articular de *Sus scrofa* (**Figura 12A**) se observó la presencia de proyecciones o prolongaciones del citoplasma entre los condrocitos localizados en lagunas distantes. El uso de cartílago articular de *Sus scrofa* para llevar a cabo estos estudios facilitó el análisis mediante técnicas de microscopía por ser cartílago procedente de animales jóvenes y por tanto con mayor número de condrocitos respecto al cartílago procedente de donantes adultos.

Cuando se realizaron las técnicas de IHQ utilizando cartílago articular humano para analizar la presencia de las proteínas Sox9 (del inglés, *SRY (Sex Determining Region Y) – box 9*) y COL2A (**Figura 12B**), se detectó positividad para ambas proteínas a lo largo de las proyecciones citoplasmáticas. Las imágenes obtenidas muestran que Sox9 también está presente en el citoplasma de condrocitos de cartílago de donantes adultos. Como era esperable se detectaron altos niveles de positividad para COL2A en la MEC.

Con el objetivo de confirmar la presencia de brazos o extensiones del citoplasma se analizaron muestras de cartílago utilizando microscopía electrónica de barrido. Las imágenes obtenidas muestran la presencia de proyecciones o extensiones del citoplasma que viajan a lo largo de la MEC y conectan con condrocitos localizados en lagunas distantes tanto en el cartílago articular de *Sus scrofa* como en el cartílago articular humano (**Figura 12C**).

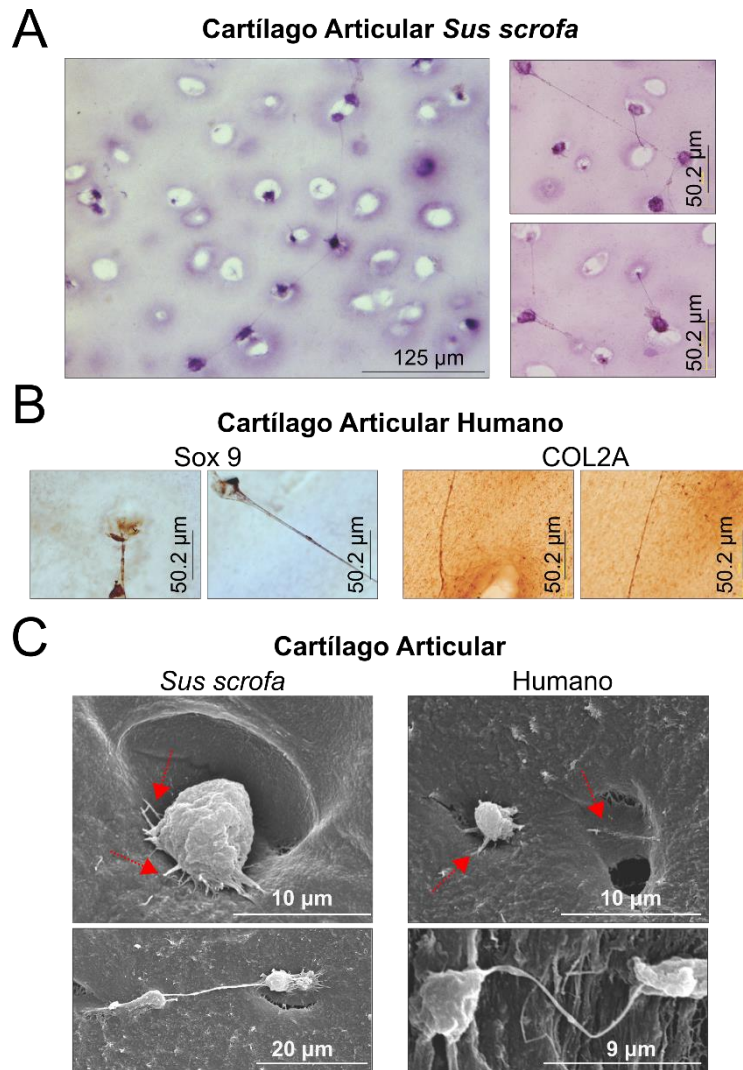


Figura 12. Proyecciones citoplasmáticas entre condrocitos en el cartílago articular. (A) Las imágenes se corresponden con tinciones de hematoxilina de Gill III de secciones del cartílago articular de *Sus scrofa* (3 meses de edad). **(B)** Imágenes obtenidas tras el análisis mediante IHQ de criosecciones de cartílago articular humano utilizando los anticuerpos, anti-Sox9 y anti-COL2A. Ambas proteínas se detectan en color marrón. **(C)** Las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido confirmaron la presencia de extensiones (flechas rojas) y brazos citoplasmáticos o prolongaciones de la membrana plasmática (flechas rojas) de condrocitos en cartílago articular de *Sus scrofa* y cartílago articular humano. Los condrocitos y sus extensiones se observan en color gris claro. Las imágenes mostradas se corresponden con imágenes originales no procesadas, obtenidas utilizando el microscopio de barrido *Joel JEM 6400* y el programa *Inca Energy V 200*. Dichas extensiones presentaron un tamaño de entre 5 – 150 μm de longitud y 200 nm de ancho.

1.2. Estudio de la expresión de conexinas en condrocitos primarios

Una vez demostrada la comunicación física entre condrocitos de cartílago articular a través de proyecciones citoplasmáticas, el siguiente paso fue estudiar si los condrocitos expresaban alguna de las proteínas implicadas en la comunicación directa célula - célula que ocurre a través de UCs formadas por Cxs.

Para este estudio se utilizaron condrocitos aislados de cartílago articular de donantes sanos. Los condrocitos se mantuvieron en cultivo en monocapa de 2 a 5 semanas en incubadores a 37 °C y con un 5 % de CO₂. Para comprobar si con las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio (descritas en *Material y Métodos*) los condrocitos mantenían su fenotipo, se analizó la presencia del principal marcador de condrocitos articulares, COL2A, mediante IHQ^{278, 279} (**Figura 13A**). Los resultados obtenidos mostraron que los condrocitos en las condiciones utilizadas para su cultivo expresaban altos niveles de COL2A.

El análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR utilizando condrocitos primarios aislados de donantes sanos reveló altos niveles del ARNm de la Cx43 (**Figura 13B**). Utilizando *western blot* se detectaron niveles elevados de proteína en el caso de condrocitos primarios aislados de dos donantes (CP - 1 y CP - 2) en comparación con la línea celular HeLa Cx43H10 que sobreexpresa Cx43 (**Figura 13C**). La localización celular de la Cx43 se estudió en condrocitos primarios mediante IHQ utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y la contratinción de hematoxilina de Gill III. Como se muestran en las imágenes de la **Figura 13D** se detectó positividad para la Cx43 principalmente en el citoplasma y alrededor del núcleo, en la membrana plasmática y en los puntos en contacto entre dos células.

Posteriormente se estudió la expresión génica de otras Cxs en condrocitos primarios tales como la Cx45, Cx46, Cx26, Cx40 y Cx32. Se detectó ARNm para la Cx45, pero no se detectó la proteína mediante IHQ.

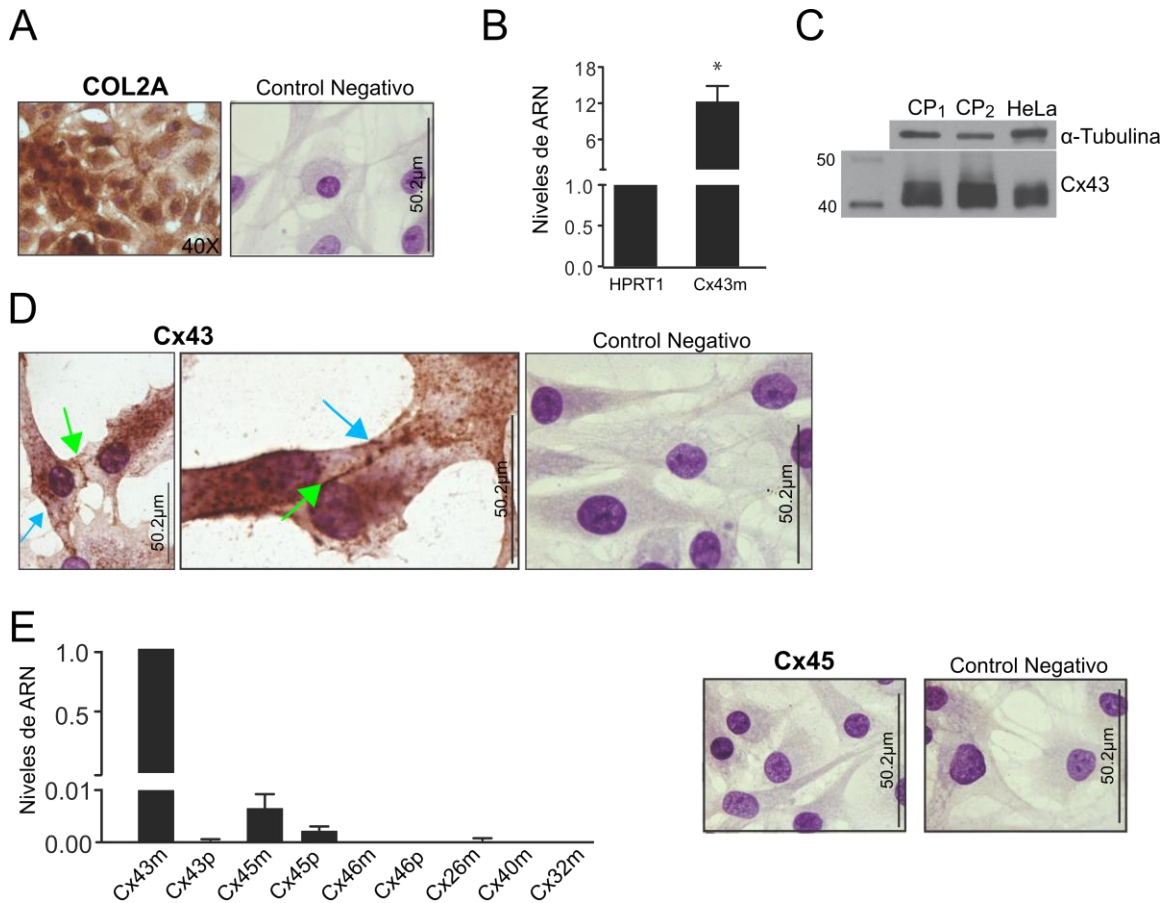


Figura 13. Análisis de la expresión de Cxs en condrocitos primarios aislados de cartílago articular humano. (A) IHQ de condrocitos utilizando el anticuerpo anti-COL2A y la contratinción con hematoxilina de Gill III. Este tipo de contratinción permite diferenciar los núcleos celulares (color violeta oscuro) del citoplasma (color violeta claro). (B) Análisis mediante *western blot* utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y condrocitos primarios de dos individuos sanos (CP - 1 y CP - 2). Como control se utilizó una línea celular HeLa Cx43H10 que sobreexpresa Cx43. (C) Análisis de la expresión génica de HPRT1 y de Cx43 mediante qRT-PCR en condrocitos primarios aislados de cartílago articular de donantes sanos. Los datos están normalizados utilizando HPRT1 y se muestran como Media \pm S.E.M, $n = 4$, $*p < 0.05$; test de Mann-Whitney: HPRT-1 frente a Cx43m. (D) IHQ de condrocitos primarios utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y la contratinción con hematoxilina de Gill III. Se detectó positividad para Cx43 (color marrón) en los bordes de la superficie celular entre dos células en contacto (flechas verdes), en el citoplasma y en la membrana plasmática (flechas azules). (E) Análisis de la expresión génica de varias Cxs mediante qRT-PCR y condrocitos primarios aislados de cartílago articular de donantes sanos ($n = 6$). Los datos están normalizados utilizando HPRT1 y se representan frente a Cx43m. Media \pm S.E.M.. A la derecha, imágenes del análisis IHQ utilizando condrocitos primarios y el anticuerpo anti-Cx45 con la contratinción con hematoxilina de Gill III y el control negativo.

1.3. Estudio de la funcionalidad de los canales de conexina 43 en condrocitos

Para poder estudiar si la Cx43 detectada en la membrana de los condrocitos en cultivo primario forma canales funcionales, se realizaron diferentes técnicas de electrofisiología. Estas técnicas fueron realizadas en colaboración con el grupo de el Dr. Peter Brink y el Dr. Virgin Valiunas de la *Stony Brook University* (Nueva York, EEUU). Mediante la técnica de *dual patch-clamp* se estudió el acoplamiento eléctrico entre condrocitos primarios (**Figura 14A**), obteniendo un patrón de voltaje característico para la Cx43.

El estudio de la transferencia de moléculas entre condrocitos en contacto a través de UCs se realizó utilizando el marcador LY, una molécula fluorescente, impermeable y de bajo peso molecular capaz de transferirse a través de las UCs. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó una micropipeta para inyectar en un condrocito una solución que contenía 2 mM/L de LY (lado derecho). Se tomaron fotografías a los 2, 7 y 12 minutos para estudiar la transferencia de LY entre los condrocitos en contacto, como se muestra en las imágenes, se detectó un incremento de la fluorescencia con el tiempo en la célula receptora (lado izquierdo) (**Figura 14B**).

En algunas de las tinciones con DAPI de explantes de cartílago articular de *Sus scrofa* detectamos fluorescencia en las proyecciones citoplasmáticas (**Figura 14C**). Las imágenes se muestran sobreexpuestas para comprobar que la fluorescencia no está en el citoplasma celular ni en la MEC. A la izquierda se muestra la misma imagen en contraste de fases y fluorescencia. Con el objetivo de estudiar el intercambio de ácidos nucleicos entre condrocitos en contacto se inyectaron con una micropipeta oligonucleótidos marcados (12 monómeros de longitud, 12-mer) en una célula donante (condrocito, lado derecho). Se tomaron fotografías a los 2, 7 y 12 minutos después de la inyección, observándose incrementos en la fluorescencia de la célula receptora (lado izquierdo) (**Figura 14D**).

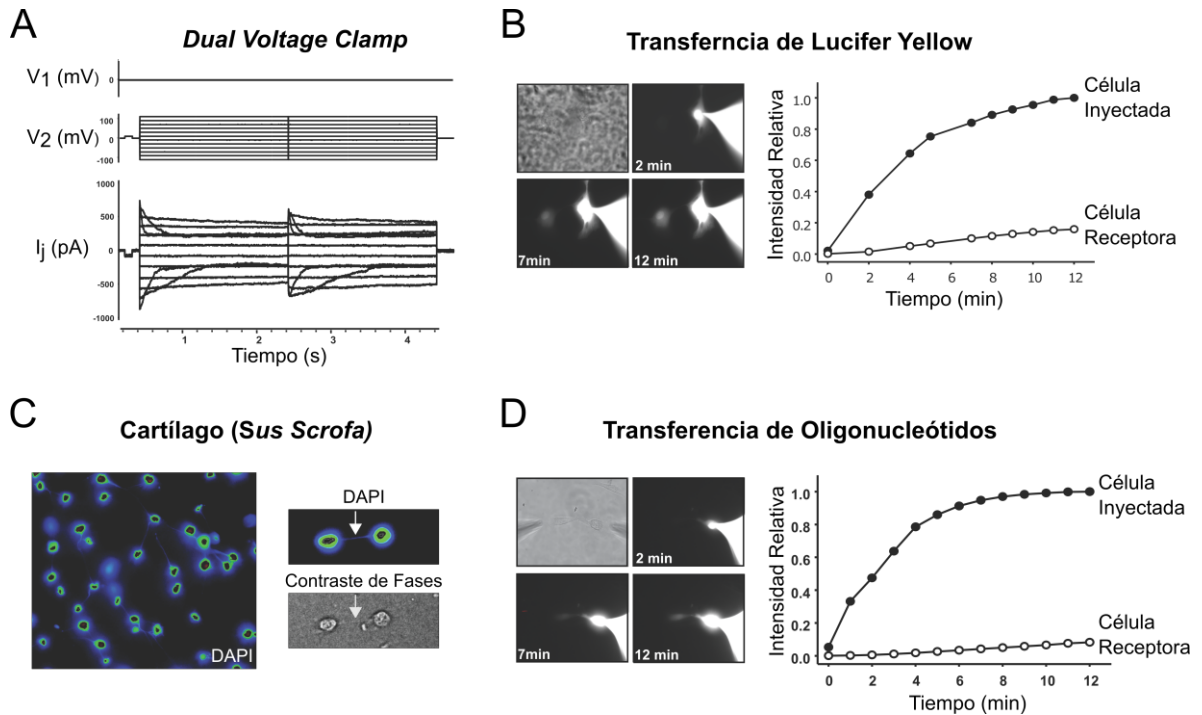


Figura 14. Condrocitos primarios de cartílago articular humano forman UCs funcionales.

(A) Patrón de voltaje obtenido mediante la técnica *dual voltaje clamp* en condrocitos primarios.

(B) Transferencia de LY entre condrocitos en contacto. Una solución que contenía LY (2 mmol/L) se inyectó con una micropipeta en un condrocito (derecha de la imagen). Se tomaron fotografías a 2, 7 y 12 minutos. En la gráfica se representa el tiempo frente a la intensidad relativa del fluoróforo para la célula inyectada (puntos negros) y para la célula receptora (puntos blancos).

(C) La tinción con DAPI de cartílago de *Sus scrofa* reveló fluorescencia en las proyecciones de las células en tejido. Las imágenes se muestran sobreexpuestas. Se muestra una imagen representativa de contraste de fases (luz visible) y DAPI marcando con la flecha blanca la proyección celular.

(D) Intercambio de oligonucleótidos de 12-mer entre condrocitos en contacto. Los oligonucleótidos se inyectaron con una micropipeta en una célula (lado derecho). Se tomaron fotografías a los 2, 7 y 12 minutos. En la gráfica se representa el tiempo frente a la intensidad relativa del fluoróforo para la célula inyectada (puntos negros) y para la célula receptora (puntos blancos). Los datos se muestran como Media \pm S.E.M.

1.4. Estudio de la expresión de la conexina 43 en tejido

Para este estudio se utilizaron explantes de cartílago articular de donantes sanos congelados *in situ* inmediatamente después de la cirugía en *Cryomold Standar* utilizando *Tissue-Teck O.C.T. Coumpound* e iso-pentanol enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80 °C. El análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR en explantes de cartílago articular de donantes sanos reveló altos niveles de ARNm de la Cx43 en comparación con la expresión del gen de referencia HPRT1 (**Figura 13B**).

Los explantes de cartílago articular de donantes sanos y pacientes OA (grado I – grado IV) se tiñeron con SO - FG y otras técnicas de tinción con el objetivo de clasificar las muestras según el grado de la enfermedad. Los pacientes OA han sido clasificados en diferentes grados de la enfermedad (grado I – grado IV) con el método *Mankin score* modificado²⁵⁸. (**Figura 15A**). La intensidad de la coloración naranja - butano de la SO es directamente proporcional al contenido en PGs²⁸⁰. La tinción con FG indica con la coloración verde claro la ausencia de PGs. En los explantes de donantes sanos la coloración naranja - butano es homogénea e intensa, debido a la gran cantidad de PGs que presenta la MEC. En los explantes de cartílago articular de donantes con OA la coloración naranja - butano es menos intensa a medida que avanza el grado de enfermedad, mientras que el color verde claro aumenta desde la superficie hacia el interior del tejido. La pérdida de los componentes de la MEC tales como PGs es una de las primeras características de la OA. En el cartílago articular OA se observó que las lagunas tienen un mayor tamaño y un mayor número de condrocitos. En las muestras analizadas, el daño en el cartílago OA comenzó en la zona superficial en contacto con el líquido sinovial, profundizando en el cartílago a medida que avanza la enfermedad.

La localización de la Cx43 en cartílago articular de donantes sanos y de pacientes OA (grado I – grado III) se estudió mediante IHQ. En explantes de donantes sanos se detectaron puntos positivos para Cx43 (color marrón) en el margen de las lagunas y en todas las zonas del cartílago (**Figura 15C**). La positividad para Cx43 en las zonas superficial e intermedia fue similar a la positividad observada en la zona profunda.

En el caso del cartílago sano no se detectaron grandes niveles de la Cx43, pero toda la positividad se detectó bien localizada en el margen de las lagunas. Por otro lado, en las muestras de pacientes con OA desde el grado I de la enfermedad, se detectaron altos niveles de positividad y la proteína estaba localizada en el citoplasma, el núcleo y en el borde de las lagunas (**Figura 15C**). El análisis de las imágenes, mediante la cuantificación con el programa *AnalySISD* versión 5.0 (*Olympus Biosystems*) (**Figura 15D**), reveló que el cartílago articular de pacientes OA muestra, aproximadamente, 4

veces más Cx43 en la zona superficial y en las zonas dañadas que el cartílago articular de donantes sanos. En las zonas intermedia y profunda, zonas que además presentaron menor daño, solo se detectó positividad en un 20 - 30 % de los condrocitos. En la zona profunda, la Cx43 perdió su localización en la membrana, encontrándose mayoritariamente en el citoplasma y en concreto alrededor del núcleo (**Figura 15C**).

Respecto al número de puntos positivos para la Cx43 en el borde de las lagunas, analizando únicamente las lagunas en las que se detectó dicha positividad, los ensayos de cuantificación demostraron que el número de puntos positivos varía entre aproximadamente 8 y 36, entre los condrocitos de cartílagos sanos y OA, respectivamente (**Figura 15D**).

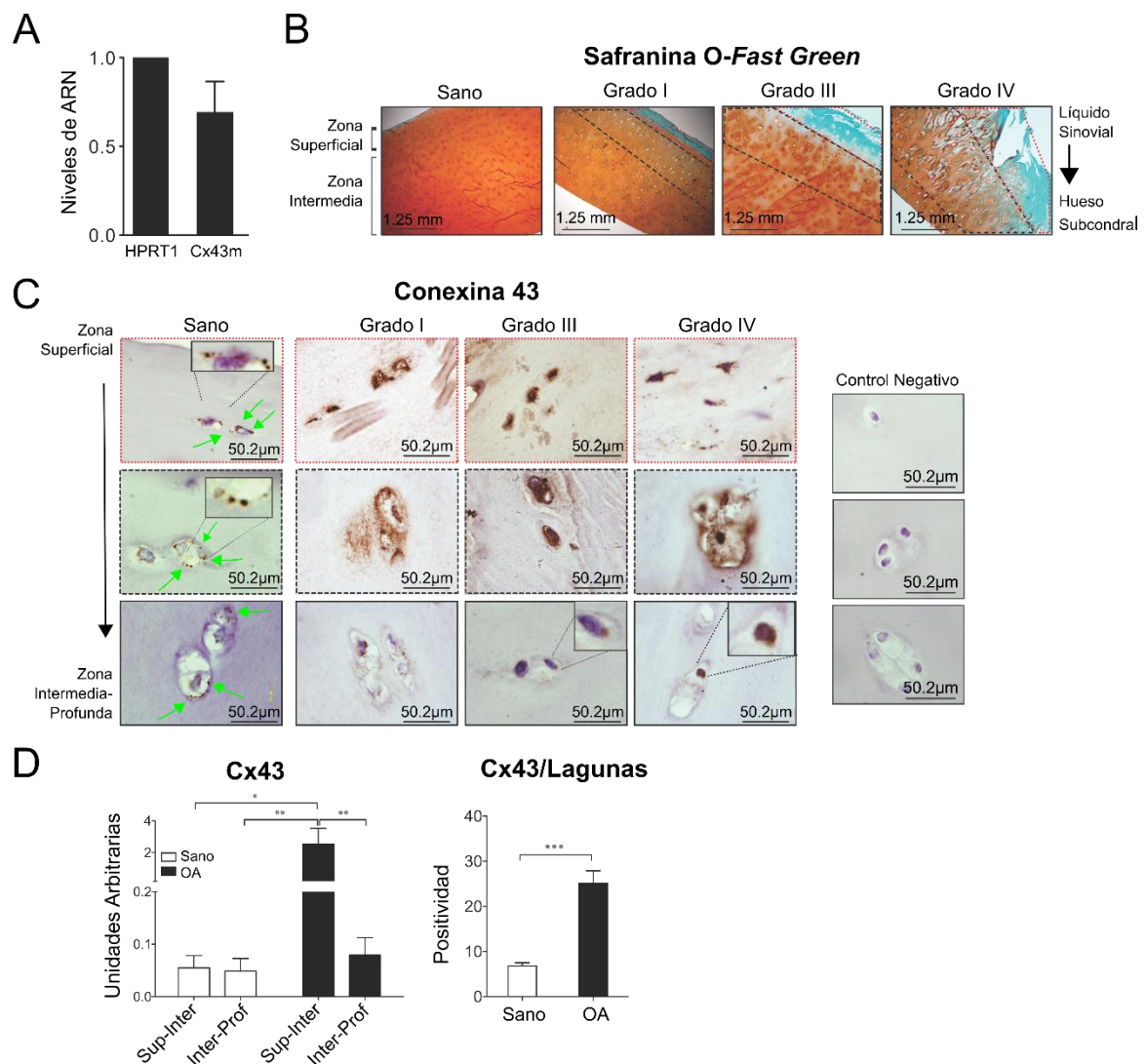


Figura 15. Incremento de los niveles de la Cx43 en cartílago articular de pacientes con OA.

(A) Análisis de la expresión génica de HPRT1 y de Cx43m mediante qRT-PCR en explantes de cartílago articular de donantes sanos. Los datos están normalizados utilizando HPRT1 y se muestran como Media \pm S.E.M., $n = 4$ (HPRT-1 frente a Cx43m). (B) Tinción con SO - FG de explantes de cartílago articular sano y OA (grado I - grado IV). Se empleó el método de *Mankin score* modificado para la clasificación de los pacientes según los grados de la enfermedad. (C) Análisis mediante IHQ de explantes de cartílagos articulares de donantes sanos y de pacientes con OA (grado I – IV) utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y la contratinción con hematoxilina de Gill III. Las flechas de color verde muestran la localización de la Cx43 en el borde de las lagunas en los explantes de donantes sanos. Se muestran magnificaciones de alguna de las imágenes obtenidas. (D) La cuantificación y el análisis de las IHQ para la positividad detectada para la Cx43 demostró que los explantes de cartílago OA presentan mayores niveles de Cx43 en la zona superficial e intermedia que los explantes de donantes sanos. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; análisis de Kruskal-Wallis con un test de Dunn de comparación múltiple ($n = 4$ donantes sanos, $n = 10$ pacientes OA, $n = 4$ pacientes OA de rodilla y $n = 6$ pacientes OA de cadera). A la derecha, se

muestra la cuantificación del análisis de las IHQs para la positividad de la Cx43 en el borde de las lagunas ($n = 17$ donantes sanos y $n = 17$ pacientes OA. $***p < 0.0001$; test t -Student, donantes sanos frente a pacientes con OA).

1.5. Estudio de proliferación celular en cartílago articular

En el cartílago articular de pacientes con OA se observó un mayor número de lagunas y un mayor número de condrocitos que en los explantes de donantes sanos (**Figura 15C**). Para confirmar este aumento de proliferación celular se realizó el análisis IHQ de explantes de cartílago articular de donantes sanos y de pacientes con OA utilizando el anticuerpo anti-PCNA. El PCNA es una proteína nuclear que actúa como cofactor de la polimerasa delta por lo que es necesaria para la replicación del ADN²⁸¹. El análisis IHQ reveló mayor positividad para PCNA en las zonas más superficiales y dañadas del cartílago articular OA (**Figura 16A**). Las zonas menos dañadas y más profundas mostraron un patrón de positividad similar al de donantes sanos. La cuantificación de las imágenes con el programa *AnalySISD* versión 5.0 (*Olympus Biosystems*) mostró que la positividad para PCNA en el cartílago articular OA es mayor en la zona superficial que en la zona intermedia profunda y significativamente mayor que en el cartílago articular sano. Dicho incremento en proliferación celular coincide en las mismas zonas del tejido en las que previamente se habían detectado incrementos de positividad para la Cx43 (**Figura 15C y 15D**).

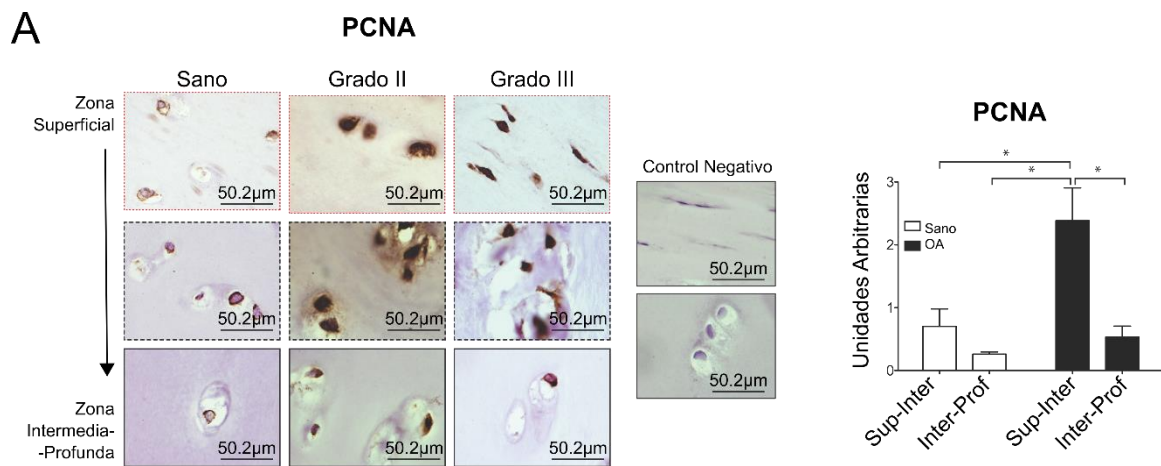


Figura 16. Positividad de PCNA en cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA. Análisis mediante IHQ de explantes de cartílago articular sano y OA (grado II – grado III) utilizando el anticuerpo anti-PCNA y la contratinción con hematoxilina de Gill III. La gráfica representa la cuantificación del análisis IHQ ($n = 4$ donantes sanos y $n = 4$ pacientes OA de rodilla y $n = 6$ pacientes OA de cadera, $*p < 0.05$, $**p < 0.1$; análisis de Kruskal-Wallis con un test de Dunn de comparación múltiple).

1.6. Expresión de conexinas en cartílago articular

El análisis de la Cx45, Cx32 y Cx46 en explantes de cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA se realizó mediante IHQ. El análisis de Cx45 en explantes de cartílago sano reveló su localización alrededor del núcleo y en los bordes del citoplasma como puntos positivos bien definidos y de forma más difusa en el citoplasma (**Figura 17A**). En explantes de cartílago OA la Cx45 mostró el mismo patrón de localización y niveles que la Cx43 y el PCNA (**Figura 15C** y **Figura 16A**, respectivamente). Las Cx32 y Cx46 (**Figura 17B**) se detectaron en bajos niveles en el cartílago de donantes sanos y en algunos casos, mayoritariamente en cartílago de pacientes con OA, se detectó positividad alrededor del citoplasma e incorporadas en la membrana; principalmente en la zona intermedia y superficial. De los explantes analizados para la localización de Cx32 y Cx46, algunos explantes mostraron altos niveles de Cx32 y/o Cx46 mientras que otros fueron negativos para ambas Cxs, estos resultados no permitieron determinar un patrón de positividad o realizar cuantificaciones.

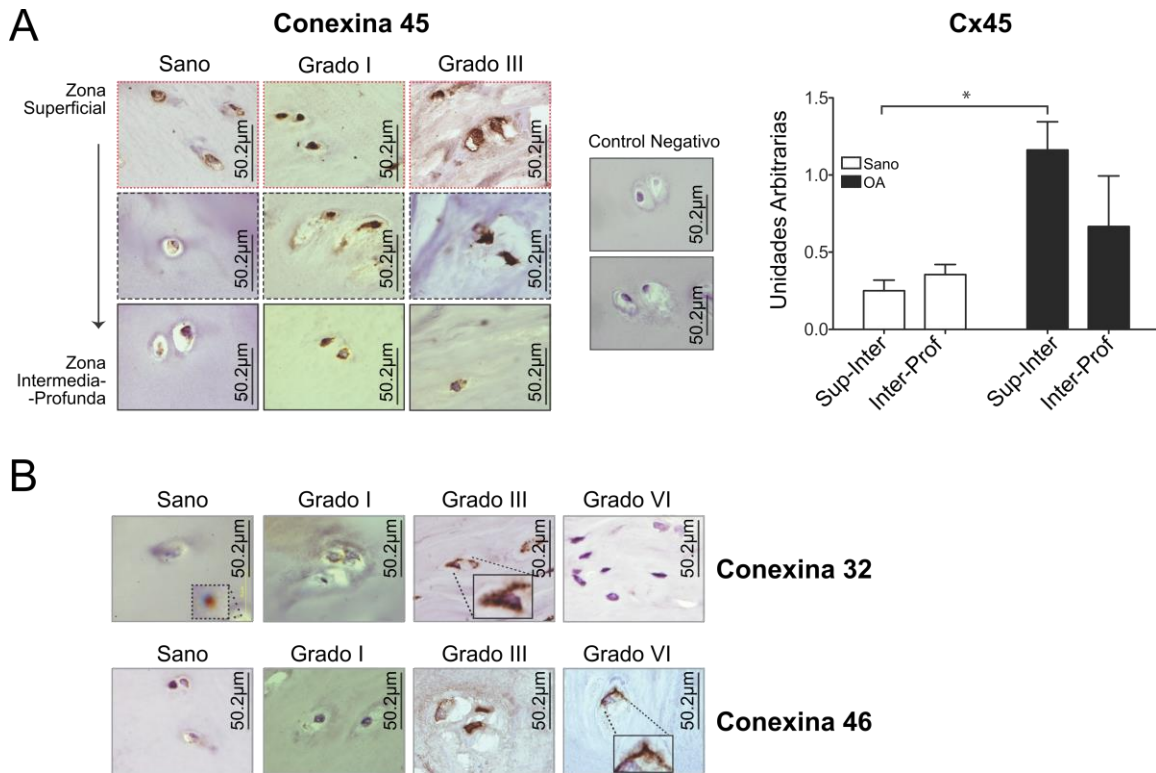


Figura 17. Análisis de la Cx45, Cx32 y Cx46 en cartílago de donantes sanos y OA. (A) IHQ de explantes de cartílago articular sano y OA (grado I y grado II) utilizando el anticuerpo anti-Cx45 y la contratinción con hematoxilina de Gill III. La gráfica representa la cuantificación del análisis IHQ para Cx45 ($n = 3$ donantes sanos, $n = 10$ pacientes OA; $*p < 0.05$; análisis de Kruskal-Wallis y el test de Dunn de comparación múltiple). **(B)** Análisis mediante IHQ de explantes de cartílago articular sano y OA (grado I - grado IV) utilizando los anticuerpo anti-Cx32 y anti-Cx46 y la contratinción con hematoxilina de Gill III ($n = 3$ donantes sanos, $n = 4$ pacientes OA de rodilla, $n = 6$ pacientes OA cadera).

2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS CANALES DE CONEXINAS EN LA LÍNEA CELULAR DE CONDROCITOS T/C-28a2

El uso de condrocitos primarios aislados de cartílago articular humano para el estudio de la función de los condrocitos y de mecanismos implicados en los procesos de degeneración y regeneración del tejido es bastante limitado a día de hoy. Algunas de estas limitaciones incluyen: (i) la dificultad para la obtención de muestras biológicas humanas de cartílago articular, (ii) la edad y variabilidad entre los donantes (historia clínica) y (iii) la limitación en el tiempo de cultivo de condrocitos primarios²⁵⁹. Como solución a estas limitaciones se han establecido líneas celulares a partir de condrocitos inmortalizados²⁸².

Una de las líneas celulares de condrocitos más utilizada a día de hoy es la línea celular T/C-28a2. Esta línea celular proviene de condrocitos primarios de cartílago costal de una mujer de 15 años de edad. Los condrocitos se inmortalizaron utilizando el antígeno T grande del virus 40 de los simios (SV40-LT)²⁶⁰. Actualmente esta línea es una herramienta común en el estudio del cartílago articular, aunque su uso no siempre resulta apropiado^{283, 284}. Se ha publicado que la presencia de SV40-LT puede afectar a la funcionalidad de los canales de Cxs. En este estudio hemos caracterizado la expresión, localización y funcionalidad de la Cx43 en dicha línea celular con el objetivo de valorar su potencial utilidad como herramienta de estudio de las funciones de la Cx43 en condrocitos articulares.

El análisis de la expresión génica de Cx43 mediante qRT-PCR reveló menor expresión de Cx43 (ARNm) en condrocitos T/C-28a2 frente a condrocitos primarios aislados de cartílago articular de donantes sanos (**Figura 18A**). Mediante *western blot* se detectó la presencia de Cx43 en condrocitos T/C-28a2 (**Figura 18B**) y mediante IHQ se observó la localización de la Cx43 en el citoplasma y principalmente en los márgenes celulares entre dos células en contacto (**Figura 18B, derecha**).

Para estudiar la funcionalidad de los hemicanales las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en presencia de 5 mg LY/ml en PBS (**Figura 18C**). Las imágenes tomadas después de la incubación mostraron fluorescencia en el interior celular, confirmando la funcionalidad de los hemicanales. La cuantificación (a la derecha de las imágenes) no reveló diferencias significativas en la absorción de LY entre ambos tipos celulares. La viabilidad celular (98 %) se analizó con azul de tripano. Por otro lado, la

técnica *dual patch clamp* confirmó el acoplamiento eléctrico de los condrocitos T/C-28a2 a través de UCs formadas por Cx43 (**Figura 18D**).

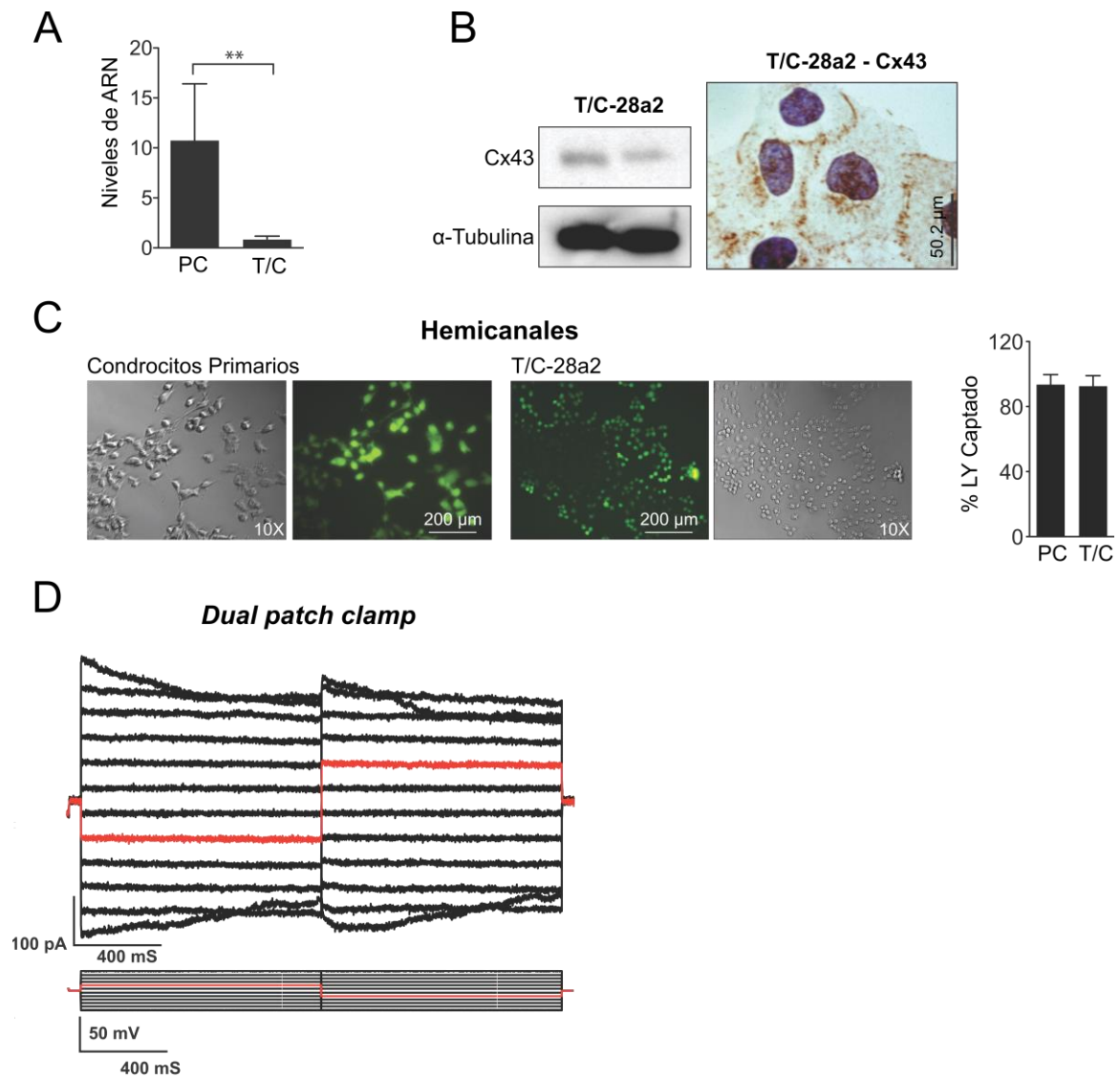


Figura 18. Expresión de la Cx43 y estudio de la funcionalidad de los canales de Cxs en condrocitos T/C-28a2. (A) Análisis de la expresión génica de Cx43m mediante qRT-PCR en condrocitos T/C-28a2 y condrocitos primarios. Los datos se muestran normalizados utilizando HPRT1 y como Media \pm S.E.M., $n = 5$, $**p = 0.0043$; test de Mann-Whitney (condrocitos T/C-28a2 frente condrocitos primarios). (B) Análisis mediante *western blot* de condrocitos T/C-28a2 ($n = 2$) utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y anti- α -tubulina como control de carga. A la derecha, IHQ de condrocitos T/C-28a2 utilizando el anticuerpo anti-Cx43 y la contratinción con hematoxilina de Gill III. (C) Estudio de la funcionalidad de hemicanales en condrocitos T/C-28a2 mediante la absorción de LY (5 mg/ml en PBS, 1 hora, 37°C). En la gráfica se representa el porcentaje de células positivas observadas en 6 fotografías de 2 experimentos independientes (Media \pm S.E.M.). (D) Representación del patrón de voltaje obtenido mediante *dual patch clamp* en condrocitos T/C-28a2.

También se analizó la funcionalidad las UCs mediante el estudio de la transferencia de LY utilizando electroporación *in situ* (Figura 19A) y *scrape loading*²⁸⁵ (Figura 19B). Como control se utilizó el péptido mimético para la Cx43, GAP27, que inhibió de forma

significativa el intercambio de LY a través de UCs entre condrocitos primarios. Los resultados obtenidos utilizando ambas técnicas demostraron que los condrocitos T/C-28a2 presentan menor transferencia de LY que condrocitos primarios (**Figura 19A y 19B**).

La Cx43 es fosforilada por la quinasa *c-Src* en su dominio CTD²⁸⁶. Se ha descrito que dicha fosforilación disminuye la comunicación célula - célula a través de UC. En la línea celular T/C-28a2 los condrocitos fueron inmortalizados mediante la transfección del oncogén SV40-LT el cual activa la proteína *c-Src*, por esta razón se decidió estudiar la actividad de la quinasa *c-Src* en la línea celular mediante IHQ y *western-blot* (**Figura 19C**). El análisis IHQ reveló altos niveles de *c-Src*, localizándose mayoritariamente en los bordes de las células en contacto (**Figura 19D**), mientras que el análisis mediante *western-blot* confirmó la presencia de la forma activa de la *c-Src* (fosforilada en la tirosina 416) en los condrocitos T/C-28a2. En los condrocitos primarios la presencia de la Cx43 es mayor mientras que la de *c-Src* es menor, tanto de la proteína nativa como de la fosforilada. (**Figura 19C**).

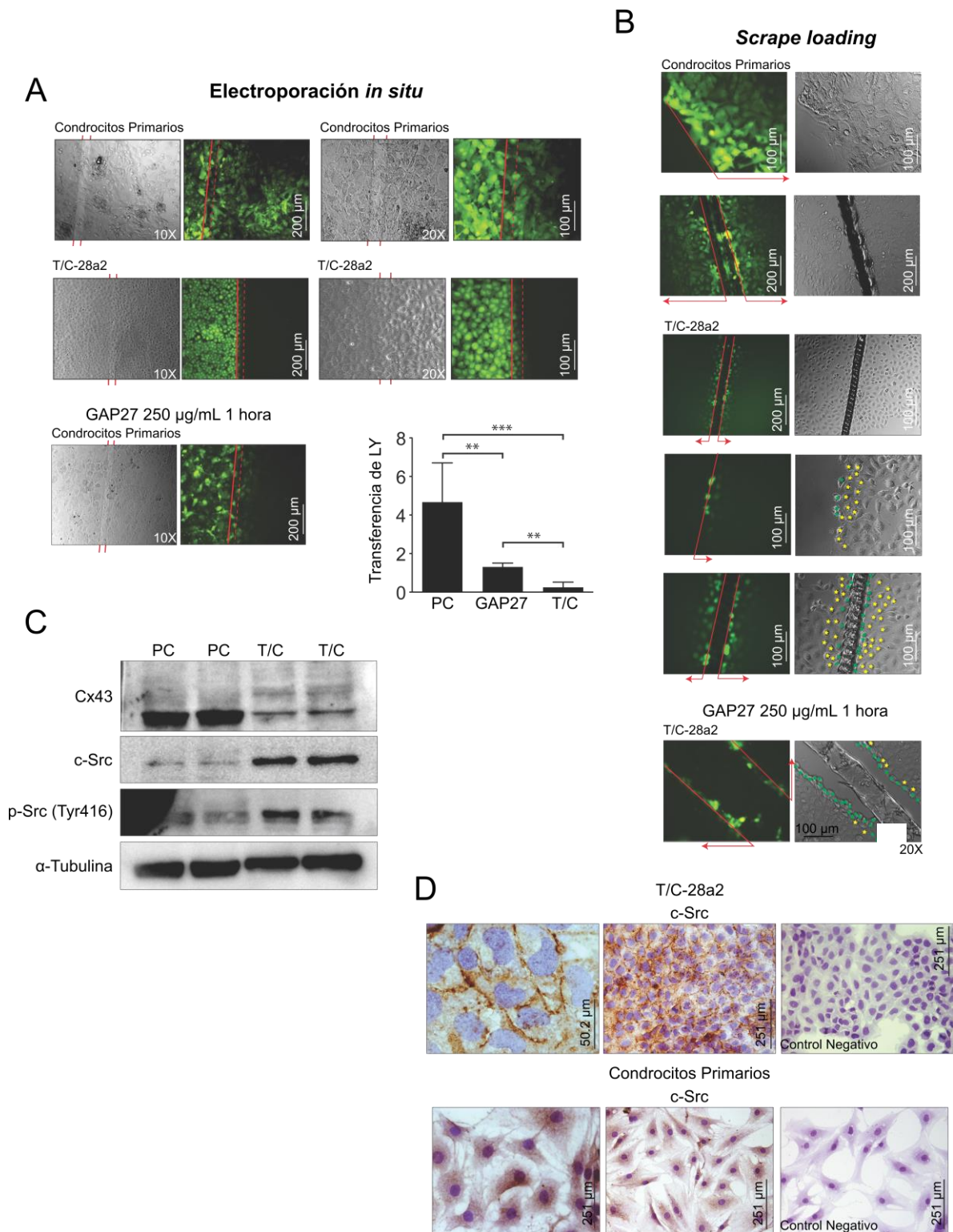


Figura 19. Estudio de la comunicación a través de UCs entre condrocitos T/C-28a2. (A) Ensayo de electroporación *in situ* para la trasferencia de LY. Las células fueron electroporadas en presencia de 5 mg/ml de LY en PBS. La gráfica representa la cuantificación de la transferencia de LY, representando el número de células positivas para LY en la zona no electroporada normalizadas respecto al número de células localizadas en el borde de electroporación (línea roja). Los datos se muestran como Media \pm S.E.M., $n = 6$, $***p < 0.0002$; test de Mann-Whitney. **(B)** Ensayo de *scrape-loading* para la transferencia de LY. Las líneas verticales en color rojo y

las estrellas verdes representan el borde del corte y las líneas horizontales de color rojo y las estrellas amarillas el alcance de la transferencia de LY entre las células en contacto. **(C)** *Western blot* de condrocitos primarios y condrocitos T/C-28a2, utilizando los anticuerpos anti-Cx43, anti-c-*Src*, anti-p-*Src* (Tyr416) y anti- α -tubulina como control de carga. **(D)** Análisis mediante IHQ utilizando el anticuerpo anti-c-*src* y la contratincción con hematoxilina de Gill III.

Los condrocitos T/C2-8a2 presenten niveles de expresión de Cx43 (**Figura 16A**) menores que los condrocitos articulares primarios, así como menor cantidad de proteína por *western blot* (**Figura 19C**) y menor tasa de transferencia de LY vía UCs (**Figura 19A** y **19B**). Aún así, sus hemicanales muestran una absorción de LY similar a condrocitos primarios, por lo que se decidió analizar la expresión génica de las Panxs (**Figura 18A**) en ambos tipos celulares. Sorprendentemente se detectaron altos niveles de expresión de la Panx1, bajos niveles de expresión de Panx2 y no se detectó expresión de la Panx3.

Con el objetivo de estudiar la estructura de los hemicanales tanto en la línea celular como en condrocitos primarios se estableció una colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr. Luc Leybaert, profesor de fisiología en el departamento de *Basic Medical Sciences* de la facultada *Medicine & Health Sciences* de la *Gent University*. Este estudio se realizó durante una estancia predoctoral de tres meses en el último trimestre del año 2015. Los experimentos no pudieron ser realizados en condrocitos primarios debido a la dificultad de la obtención de muestras. En este estudio también se incluyó la línea celular HCS-2/8.

El primer paso fue determinar la localización de la Panx1 mediante inmunofluorescencia. En ambas líneas celulares, HCS-2/8 y T/C-28a2, la Panx1 se localizó principalmente en el citoplasma celular (**Figura 20B**). Sin embargo, cuando se realizó el ensayo de hemicanales en presencia y ausencia de calcio, la presencia de calcio mantiene los hemicanales cerrados⁵³. Además, se utilizaron diferentes inhibidores, Cbx como bloqueante inespecífico de hemicanales y GAP19 como bloqueante específico de hemicanales de Cx43 (**Figura 20C**), los resultados obtenidos sugirieron que los hemicanales presentes en las células T/C-28a2 no estarían formados por Cxs. En los condrocitos T/C-28a2, la absorción de yoduro de propidio disminuyó ante la presencia de Cbx, pero no ante la presencia de GAP19 (**Figura 21A**). En la línea HCS-2/8 la absorción de yoduro de propidio en las tres condiciones, control, Cbx y GAP19 fue similar (**Figura 20**). Se realizó un segundo ensayo de hemicanales empleando las citoquinas IL-1 β y TNF α . En el caso de condrocitos T/C-28a2, la IL-1 β disminuyó la actividad de

Resultados

los hemicanales, mientras que este efecto no se detectó cuando se trataron las células con TNF α (**Figura 20D**).

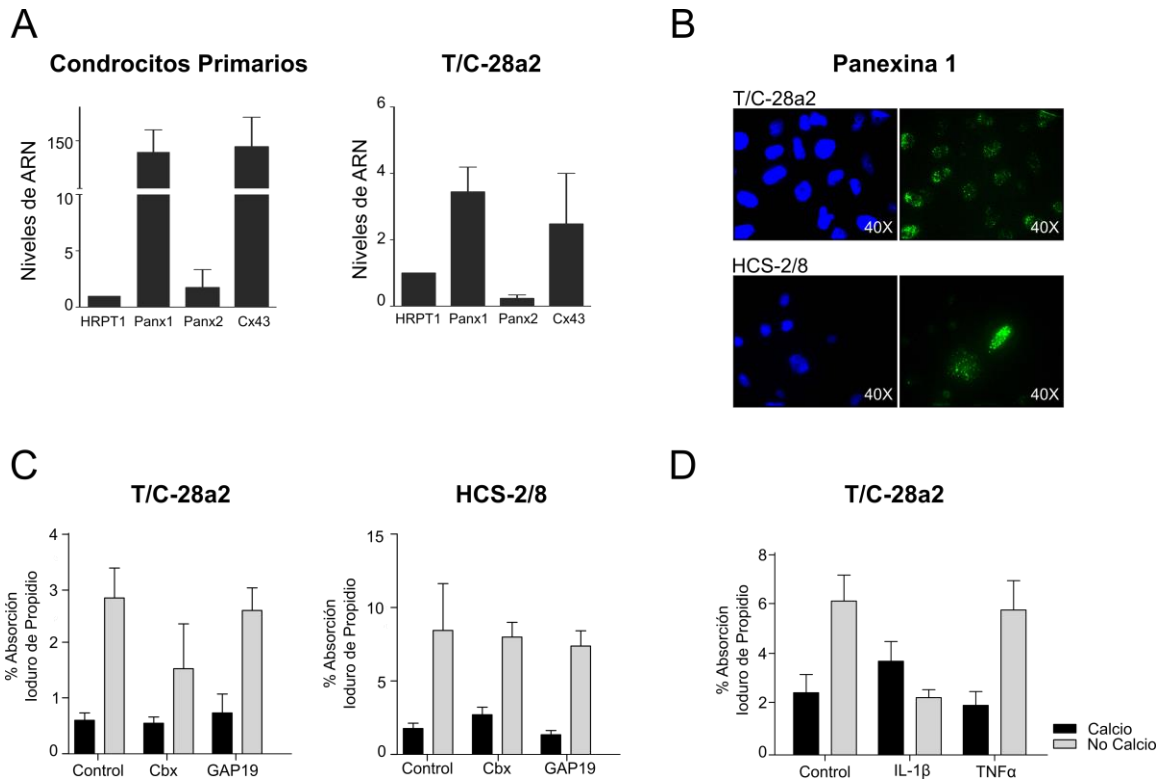


Figura 20. Funcionalidad de los hemicanales en condrocitos T/C-28a2 y HCS-2/8. (A) Análisis de la expresión génica de Panx1, Panx2 y Cx43 **(B)** Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Panx1. **(C)** Ensayo de hemicanales. Ambas líneas celulares fueron tratadas con GAP19 (100 μ M) y Cbx durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C, añadido al medio de cultivo. El ensayo de hemicanales fue realizado con ioduro de propidio 1 mM en HBSS - HEPES con calcio y sin calcio. Los núcleos fueron teñidos con Hoeschst y las imágenes cuantificadas con el programa *ImageJ*. Para la cuantificación de la línea T/C-28a2 se tomaron 17 fotografías mientras que para la línea HCS-2/8 se tomaron 20. **(D)** Efecto de las citoquinas IL-1 β y TNF α sobre la actividad de los hemicanales. Las células fueron tratadas con 10 ng/ml de IL-1 β o TNF α durante 24 horas. Se tomaron 38 fotografías, de cada condición, para la cuantificación.

3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO C-TERMINAL DE LA CONEXINA 43

El CTD de la Cx43 se diferencia del CTD de otras conexinas por su secuencia de aminoácidos y su mayor longitud²⁸⁷. El CTD interacciona con múltiples proteínas citoplasmáticas formando un complejo que se ha denominado *Nexus*²⁸⁸. Dichas interacciones determinan y regulan las funciones dependientes^{289, 73} e independientes de la actividad de los canales que forma esta proteína²⁹⁰.

Con el objetivo de identificar las proteínas que interaccionan con el CTD se realizó la inmunoprecipitación (IP) de lisados de condrocitos primarios aislados de cartílago articular de donantes sanos y de pacientes con OA (grado I y grado III de la enfermedad) utilizando un anticuerpo específico para el CTD de la Cx43. Las células se lisaron en presencia de detergentes no iónicos (Igepal y Triton X-100) y utilizando una concentración de sales fisiológica, 150 mM NaCl. Se analizaron 4 donantes sanos, 4 pacientes con OA de grado I y 4 pacientes con OA de grado III. También se analizaron 3 pacientes con OA en presencia de detergentes iónicos (Sarcosyl). Las proteínas inmunoprecipitadas se identificaron mediante espectrometría de masas.

3.1. Proteínas que interaccionan con la conexina 43 en condrocitos aislados de cartílago articular de donantes sanos

En la **Figura 21A** se muestra el resumen del número de proteínas identificadas que interaccionan con el CTD de la Cx43. Un total de 123 proteínas fueron identificadas en condrocitos aislados de cartílago de donantes sanos, 68 de las cuales se identificaron con dos o más péptidos (ver **Tabla - Anexo 1A**). 118 proteínas se identificaron exclusivamente en las IPs en las que se utilizó el anticuerpo anti-CTD de la Cx43 (IP+) y no se identificaron en la IP control (IP-) donde no se utilizó anticuerpo anti-CTD de la Cx43 (ver **Tabla - Anexo 1B**). Todas las proteínas fueron identificadas con una confianza mayor al 95 % y un *score* mayor a 1,3 (ver *Material y Métodos*). En la **Figura 21A** se muestran un resumen de las proteínas identificadas y en las **Tabla 8** y **9** se destacan algunas de las identificadas en donantes sanos.

Todas las IPs fueron realizadas con el mismo número de células y en las mismas condiciones. De cada IP (IP+ o IP-) se guardó su correspondiente ECT para la realización de dos electroforesis, una de ellas con posterior tinción con plata (**Figura**

21B, a la derecha) y la segunda para la detección de α -tubulina mediante *western blot*. (**Figura 21B**, parte superior derecha). Ambas técnicas se realizaron como control antes de la IP, con el objetivo de visualizar la concentración de proteína de las muestras. Los geles fueron cargados con un 0,5 % ECT que se utilizó para realizar la IP. Los números 1 – 4 hacen referencia a cuatro muestras (pacientes) diferentes.

Los resultados obtenidos en la espectrometría de masas fueron validados por *western blot* (**Figura 21B**, a la izquierda) seleccionando seis proteínas identificadas exclusivamente en la IP+ y utilizando dos lisados IP+ y dos de IP-. Se incluyó en este análisis la Cx43 como control de la técnica.

El análisis en GO reveló que las proteínas identificadas que interaccionan con la Cx43 en condrocitos de donantes sanos, se corresponden principalmente a proteínas que se encuentran en el citosol, citoesqueleto, a nivel ribosomal, en la membrana plasmática, en el núcleo y en las proyecciones celulares.

Respecto al proceso biológico en el que están implicadas las proteínas identificadas (**Figura 21C**), el análisis con GO reveló un importante número de proteínas con función ribosomal y relacionadas con la traducción proteica (ver **Tabla - Anexo 1**). En este análisis se excluyeron las proteínas ribosomales 40S y 60S. Fueron identificadas varias proteínas con actividad nuclear tales como histonas o proteínas nucleolares (ver **Tabla 9** y **Tabla - Anexo 1A**). También se identificaron proteínas relacionadas con rutas metabólicas, como la glicólisis y gluconeogénesis, con el plegamiento y transporte proteico, con adhesión celular, asociadas a motilidad celular o de unión a calmodulina (ver **Tabla 9**).

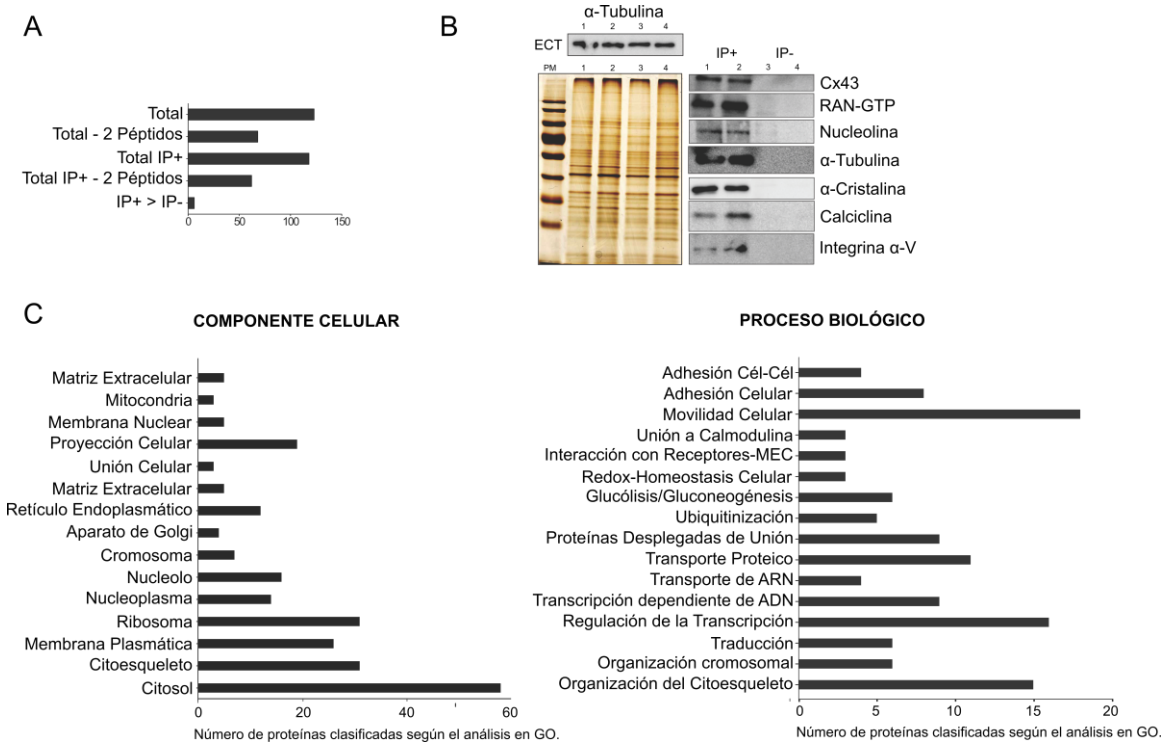


Figura 21. Identificación de las proteínas que interaccionan con la Cx43. Análisis de los resultados de la identificación de proteínas que interaccionan con la Cx43 mediante espectrometría de masas e IP de lisados de condrocitos primarios provenientes de cartílago de 4 donantes sanos. Las proteínas se identificaron con un 95 % de confianza (el valor umbral se estableció en 1.3). **(A)** Resumen del número de proteínas identificadas en la IP+ y en la IP- según el número de péptidos. En las **Tablas – Anexo 1A y 2** se muestran el total de proteínas identificadas en la IP+ y la IP-, respectivamente. **(B)** El contenido proteico de los ECT se analizó previamente por *western blot* utilizando el anticuerpo anti- α -tubulina y con la tinción con plata (izquierda) de las proteínas separadas en un gel del 10 % acrilamida/bisacrilamida. Los carriles representan el 0,5 % del total de la muestra empleada en la IP (1 - 4). A la derecha se muestra el análisis mediante *western blot* con 2 muestras de IP+ y 2 IP-, cada pocillo representa un 25 % del total de la IP. **(C)** Clasificación de las proteínas identificadas según GO respecto a la localización celular y según el proceso biológico.

PROTEÍNA	GEN
α -* y β -tubulina**	TUB1B, TUBB, TUBB2A, TUBB2C
α -actina* y proteínas relacionadas con la actina	ACTB, ACTR3B, ACTN4
Proteína asociada subunidad delta del translocón	SSR4
Proteína motora miosina* (Miosina IC#)	MYL12B, MYH9, MYO1B
Vimentina	VIM
Vinculina**	VCL
Talina-1#	TLN1
Alpha filamina A	FLNA
Proteína relacionada con la dihidropirimidinas 2	DPYSL2
Proteína B homóloga de tráfico vesicular SEC22	SEC22B
Gelsolina	GSN
Profilina-1	PFN1
Erzina**	EZR
Radixina#	RDX
Moesina#	MSN
Anexina A1#/A2#/A5	ANXA1, ANXA2, ANXA5
Caldesmon	CALD1
Endoplasmína	HSP90B1
Tropomiosina α 4	TPM4
Subunidad proteosomal beta tipo-2	PSMB2
Proteína ribosomal S27a 40S-Ubiquitina	RPS27A
Proteína 4 asociada al citoesqueleto	CKAP4
Glicoproteína de membrana Thy-1	THY1
Proteínas S100-A6/-A11/-A10	S100A6, S100A11, S100A10

Tabla 8. Proteínas que interactúan con la Cx43 en donantes sanos relacionadas con el transporte de Cxs y en el ensamblaje - degradación de UC. En la **Tabla - Anexo 1A** aparece el listado total de las proteínas y el valor de los parámetros que permitieron su identificación. *proteínas previamente descritas en la bibliografía que interactúan con el CTD de la Cx43. (#)proteínas que forman parte de la membrana plasmática.

PROCESO/LOCALIZACIÓN	GEN
Nucleosoma. Histonas	HIST1H1T, HIST1H2AC, H2AFJ, HIST2H2BF, H3F3A, HIST1H4A
Factores relacionados con la transcripción	PTRF, NCL, CAND1, SND1, STAT1, RAN
Proteínas que interactúan con ARN	MVP*, HNRPA1*, HNRPA2*, HNRNPA3, HNRNP, NLC, RAN*, PTRF
Transporte de ARN	HNRNPA1, HNRNPA2, HNRNPA3 HNRNPL, SNRPD3
Corte y empalme de ARN	
Ribosoma	RPS16, RPS18, RPS19, RPS24, RPS26 RPS4X, RPS5, RPS7, RPS8 , RPS9, RPLP2, RPL12, RPL15 RPL17, RPL21, RPL24, RPL27A, RPL3, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL4, RPL6, RPL7, RPL7A
Traducción	EEF2, EEF1AL3, EEF1G, EIF5AL1
Transporte al interior celular	KPNB1#, RAN#, LMNA, MVP#
Complejo del poro nuclear (#)	
Mitocondria	SOD2, ATP5J2
Actividad antioxidante	PRDX1, SOD2
Generación de precursores metabólicos y energía	PKM2, ENO1, GAPDH, LDHA, ALDOA, PYGB, PGK1, SOD2
Proteínas implicadas en el plegamiento proteico y otras proteínas relacionadas	CRYAB, HSPA8, HSP90AB1, HSP90B1, PPIB, PPIA, HSPA5, P4HB, PDIA3, HSPB1, SEPINH1

Tabla 9. Ejemplos de proteínas que interactúan con la Cx43 en donantes sanos clasificadas según el proceso celular en el que participan. La **Tabla - Anexo 1A** recoge el total de proteínas identificadas en condrocitos aislados de cartílago de donantes sanos, junto con los parámetros: *score*, *coverage* y número peptídico, que han permitido la identificación de cada una de las proteínas

3.2. Colocalización de la conexina 43 y proteínas identificadas por espectrometría de masas que interaccionan con su dominio C-terminal en condrocitos primarios

Entre las proteínas identificadas por espectrometría de masas se encuentran la vimentina y la HSP90 β . Ambas proteínas se seleccionaron para comprobar su interacción con la Cx43 *in situ*, mediante inmunofluorescencia doble: vimentina/Cx43 y HSP90 β /Cx43 (**Figura 22A** y **22B**, respectivamente). Se muestran individuales de cada proteína y las imágenes de superposición (vimentina/Cx43 y HSP90 β /Cx43). A la derecha de las fotografías se muestran las gráficas que representa la colocalización para cada caso.

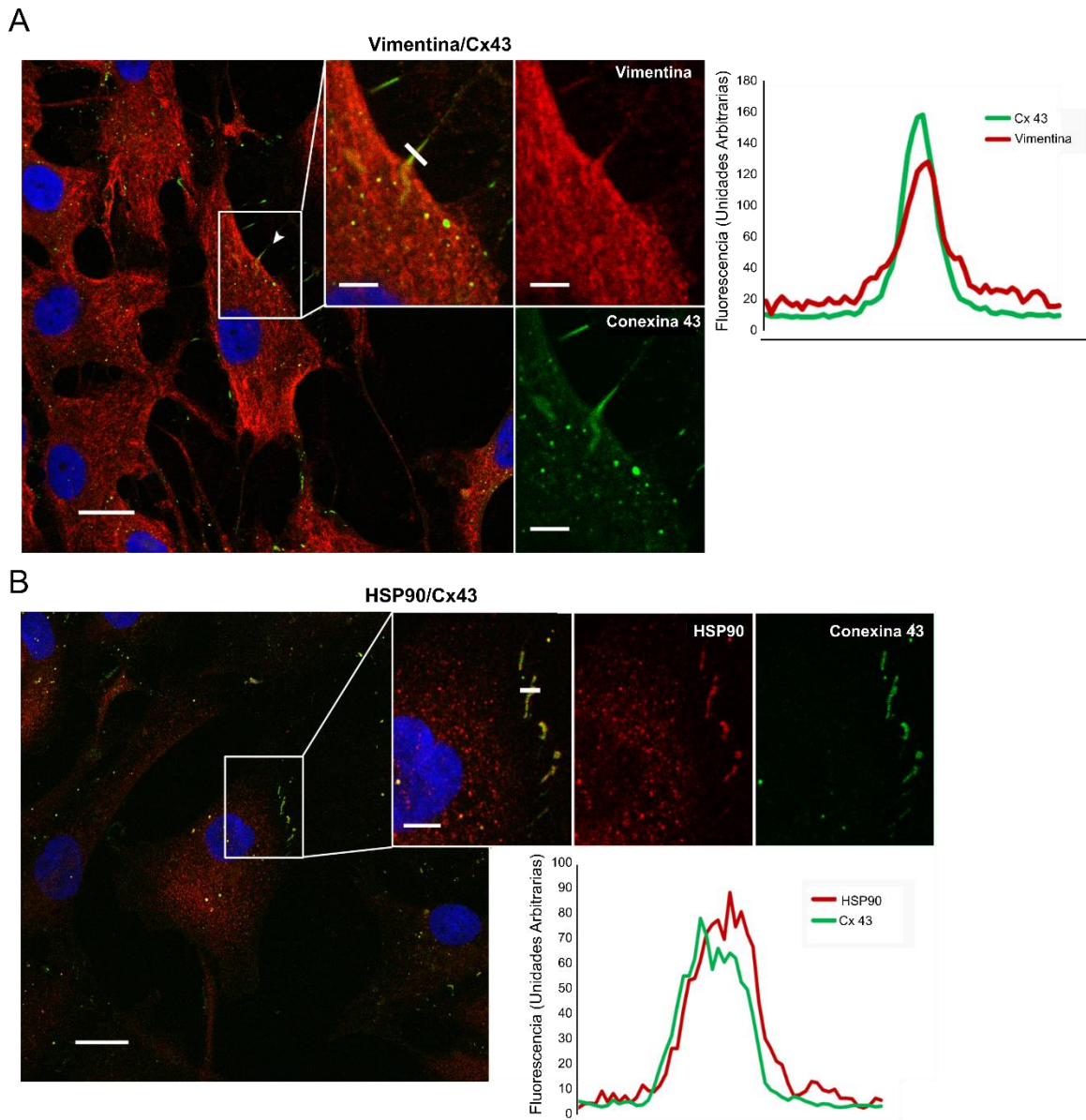


Figura 22. Colocalización mediante inmunofluorescencia de la Cx43 con proteínas identificadas por espectrometría de masas. Mediante la técnica de doble inmunofluorescencia se estudió la colocalización de dos antígenos en una misma célula. **(A)** Colocalización de Cx43 (color verde) y vimentina (color rojo). La gráfica representa la cuantificación de la técnica, **(B)** Colocalización de Cx43 (color verde) y HSP90 β (color rojo). La gráfica representa la cuantificación de la técnica.

3.3. Proteínas con localización nuclear que interactúan con la conexina 43

En la **Figura 23A** se muestra una representación del núcleo celular en el que se incluyen proteínas de localización nuclear identificadas en el presente estudio, tales como diferentes histonas (inglés *histones*), la prelamina A/C (LMNA), el factor de liberación del transcrito de la ARN polimerasa I (PTRF, del inglés *Polymerase I and Transcript Release Factor*), la nucleolina, la señal 1 - alpha/beta de traducción y activación de la transcripción (STAT1, del inglés *signal transducer and activator of transcription 1 – alpha/beta*), proteína 1 disociada de NEDD8 asociada a culina (CAND1, del inglés *cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1*), varias riboproteínas heterogéneas nucleares (hnRPNs, del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) y diferentes proteínas ribosomales. También se esquematiza el complejo de translocación al núcleo formado por las importina α/β – RAN-GTP. Este complejo permite la entrada al núcleo de moléculas que tengan una señal de reconocimiento de unión a la importina α/β denominadas secuencias o sitios de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Sequence*). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la Cx43 con el programa informático *cNLS Mapper* reveló dos posibles secuencias NLS localizadas ambas en el CTD de la Cx43 (**Figura 23B**). La combinación de la contratinción con DAPI y el análisis IHQ utilizando un anticuerpo anti-CTD de la Cx43 sugirió la localización nucleolar de la Cx43 en condrocitos primarios (**Figura 23C**).

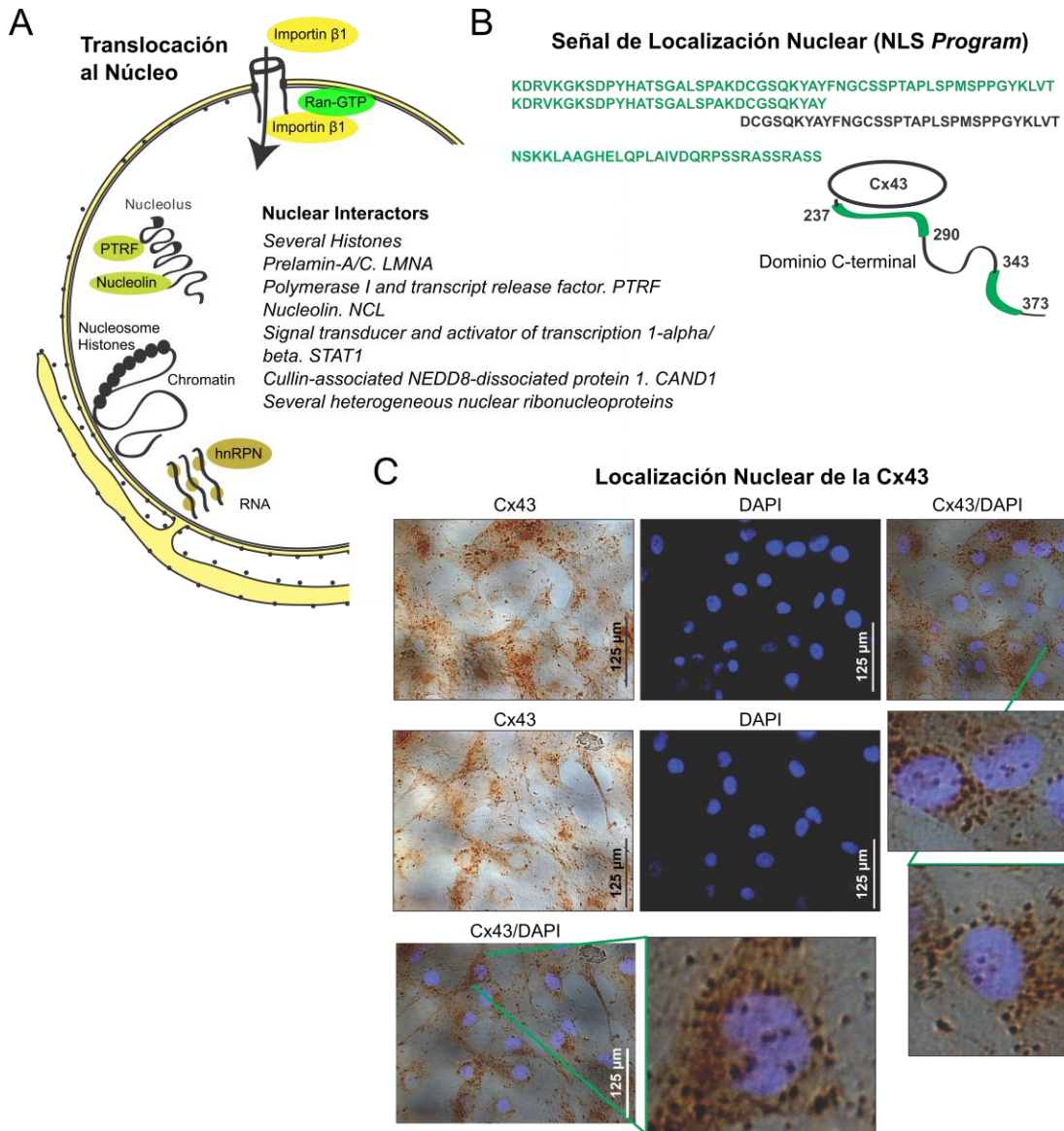


Figura 23. Proteínas identificadas por espectrometría de masas y con localización nuclear y perinuclear. (A) Esquema del núcleo y de la envoltura nuclear, con sus diferentes capas (bicapa lipídica, complejos del poro nuclear y la lámina nuclear), retículo endoplasmático y los ribosomas (puntos negros). **(B)** Representación del CTD de la Cx43 donde se muestran dos posibles secuencias específicas para la translocación al núcleo, NLS (color verde), identificadas con el programa *cNLS Mapper*. **(C)** Análisis mediante IHQ de condrocitos articulares primarios utilizando el anticuerpo anti-CTD de la Cx43 y contratinción con DAPI.

3.4. Proteínas que interactúan con la conexina 43 en condrocitos aislados de cartílago articular de pacientes con artrosis

Se realizaron las IPs con lisados de condrocitos aislados de cartílago articular de pacientes OA de grado I y grado III. En OA de grado I se identificaron un total de 157 proteínas, 153 exclusivas de la IP+ (**Figura 24A**, ver **Tabla 10** y **Tabla - Anexo 3B**). Comparando estas proteínas con las proteínas identificadas en donantes sanos hay 73 proteínas comunes pero identificadas con diferente número de péptidos (ver **Tabla – Anexo 3E**) y 80 proteínas identificadas exclusivamente en el grupo de OA grado I (ver **Tabla 10** y **Tabla – Anexo 3D**).

Las proteínas identificadas en condrocitos OA de grado I se analizaron con GO (**Figura 24B**) y los resultados se compararon con los obtenidos en condrocitos sanos (**Figura 24B**). El análisis reveló que las proteínas que interactúan con el CTD de la Cx43 en pacientes OA grado I participan principalmente en: (i) procesos de adhesión celular, (ii) interacción con la matriz extracelular, (iii) unión a calmodulina y (iv) traducción proteica. Se identificaron muchas proteínas del citoesqueleto, así como proteínas con localización nucleolar. En el caso de las proteínas del citoesqueleto, la identificación en el grupo OA fue mayor, en número, que las identificadas en donantes sanos.

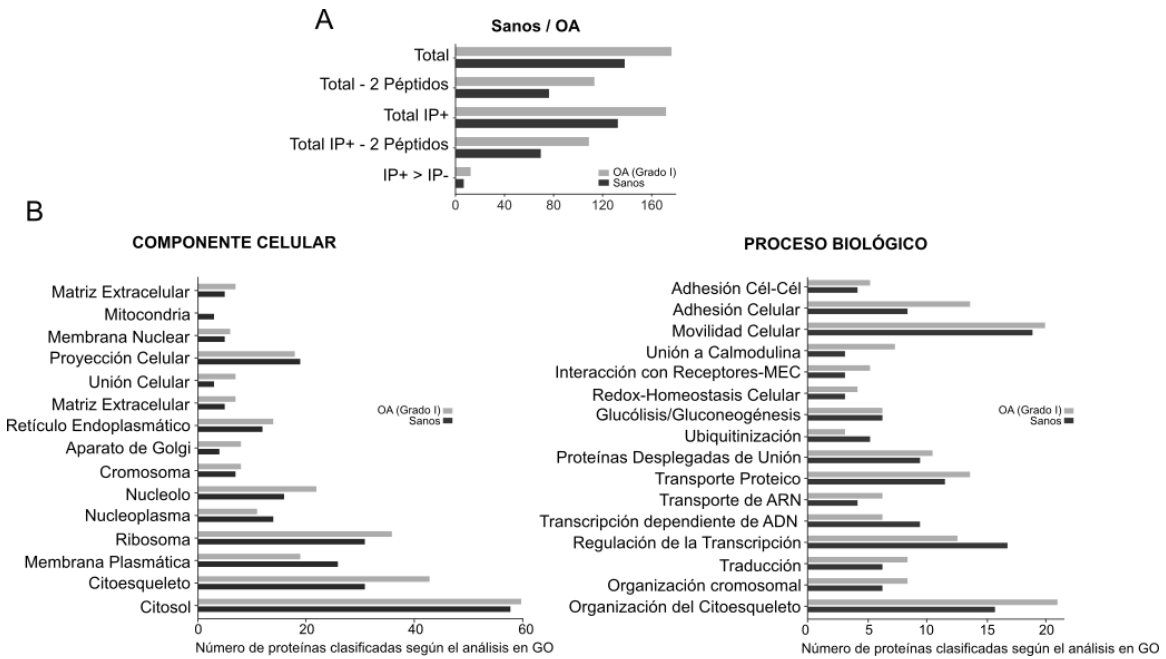


Figura 24. Clasificación de las proteínas identificadas en condrocitos aislados de cartílago de donantes sanos y OAs. Se analizaron las IPs de 4 pacientes con OA **(A)** Las barras grises representan las proteínas identificadas en pacientes OA con grado I de la enfermedad. 153 proteínas fueron identificadas específicamente en la IP+ y no se identificaron en la IP-. También se muestran el número de proteínas identificadas en la IP+ con mayor número de péptidos (≥ 2) que cuando estas se identificaron en la IP- (ver **Tabla – Anexo 3C**). El **Tabla – Anexo 3A** se enumeran el total de las proteínas identificadas en la IP+ e IP-, los parámetros de identificación y el número de péptidos. **(B)** Clasificación de las proteínas identificadas según GO. Todas las proteínas fueron identificadas con una confianza del 95 %.

En los pacientes OA de grado III se identificaron un total de 130 proteínas (ver **Tabla – Anexo 4A**), de las cuales 32 son exclusivamente de este grupo (**Tabla 10 y Tabla – Anexo 4J**). Entre los grupos OA grado I y OA grado III hay 88 proteínas en común, que se reducen a 64 comunes entre los grupos OA grado III y condrocitos sanos (ver **Tabla 10 y ver Tabla - Anexo 4E**). En la **Tabla 10** se enumeran algunas de las proteínas identificadas exclusivamente en cada grupo (sano, OA grado I, OA grado III) con los parámetros que permitieron su identificación (*score*, *coverage* y número de péptidos; ver *Material y Métodos*).

	PROTEÍNA	GEN	SCR	%	Nº
Sano	Subunidad f ATP sintasa mitocondrial	ATP5J2	2	13,8	1
	Erzina	EZR	2	3,9	1
	Proteína S100-A10	S100A10	2	14,4	1
	Proteína S100-A11	S100A11	2	10,5	1
	Proteína S100-A6	S100A6	2	16,7	1
	Rap-1A ligada a Ras	RAP1A	2	7,6	1
	Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial	SOD2	2	15,3	1
	Glicoproteína de membrana Thy-1	THY1	4	24,2	2
	Proteína transformante RhoA	RHOA	2	17,6	1
	Proteína ribosomal S27a ubiquitina-40S	RPS27A	2,3	24,4	1
	Proteína SEC22b de tráfico vesicular	SEC22B	2	18,1	1
OA grado I	Proteína 14-3-3 zelta/delta	YWHAZ	4	28,2	2
	Enzima 1,4-alpha-gluco-ramificada	GBE1	2	13	1
	Miosina-10	MYH10	11,3	46,5	7
	Proteína piccolo	PCLO	1,81	19,2	1
	Subunidad Alpha del complejo proteico citosólico	COPA	2	28,8	1
	Destrina	DSTN	2,14	44,2	1
	Integrina alpha-V	ITGAV	2,03	20,9	1
	Matrina-3	MATR3	2,05	27,4	1
	Septina-2	SEPT2	2	21,3	1
	Factor de crecimiento-beta-ig-h3-inducida	TGFBI	2,32	19,8	1
	Vigilina	HDLBP	3,84	34,6	2
OA grado III	Subunidad 2 no-ATPasa reguladora 26S	PSMD2	2	7,3	1
	Proteína 2 anclada a A-quinasa	AKAP2	2	24,7	1
	Subunidad alpha-1 del complejo AP-2	AP2A1	2,82	16	2
	ATP-citrato sintasa	ACLY	3,96	18,1	2
	Subunidad beta del complejo proteico citosólico	COPB1	2,03	16,8	1
	Subunidad gamma del complejo proteico citosólico	COPG	6,47	24,5	4
	Proteína 3 ligada a proteína 1 de heterocromatina	HP1BP3	2	17,9	2
	Proteína grupo B1 de alta motilidad	HMGB1	1,73	23,7	2
	Dominio LIM y proteína 1 ligada a actina	LIMA1	3,07	28,7	2
	Dominio LIM y proteína 7	LMO7	2,53	25,9	2
	Proteína 70-estrés, mitocondrial	HSPA9	5,26	31,1	3
	Transgelina	TAGLN	1,39	42,3	1
	Zixina	ZYX	2,01	14,3	1

Tabla 10. Proteínas identificadas exclusivamente en cada grupo. En la tabla aparecen algunas de las proteínas identificadas exclusivamente en cada grupo: sano, OA de grado I y OA de grado III, el nombre del gen y los parámetros con los que se identificaron; *score* (scr), *coverage* (%) y número de péptidos (Nº) (ver *Material y Métodos*).

En la identificación de proteínas que interaccionan con el CTD de la Cx43 utilizando condrocitos aislados de donantes sanos y pacientes con OA de grado I y OA de grado III, observamos que algunas proteínas interaccionaban con la Cx43 en los tres grupos (**Tabla – Anexo 3E, 4D, 4G**) mientras que otras se identificaron exclusivamente en uno de ellos (ver **Tabla - Anexo 4H, 4I y 4J**). En la **Tabla 11** se muestran las proteínas que han sido descritas en estudios anteriores como proteínas potencialmente implicadas o alteradas durante el desarrollo y/o progreso de la OA y que han sido identificadas en este estudio. Se muestran los parámetros de la identificación correspondientes a cada grupo.

Localización/Proceso	Proteína	Gen	Sano	SCR	%	Nº
Constituyentes estructurales de la MEC	Colágeno alpha-1(I)	COL1A1	Healthy/OA (g, III)	6/8	24/50	3/4
	Colágeno alpha-2(I)	COL1A2	Healthy/OA (g, III)	4/2	31/41	2/1
	Colágeno alpha-1(VI)*	COL6A1*	OA (g, I/III)	21/10	57/51	12/6
	Colágeno alpha-2(VI)*	COL6A2*	OA (g, I/III)	14/6	56/36	11/4
	Colágeno alpha-3(IV)*	COL6A3*	Healthy/OA (g, I/III)	2,84	7,4	2
	Colágeno alpha-1(XII)*	COL12A1*	OA (g, I/III)	23/14	41/33	11/8
Metabolismo de Carbohidratos	Alpha-enolasa	ENO1	Healthy/OA (g, I/III)	8	21	4
	Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa	GAPDH	Healthy/OA (g, I/III)	10,41	31	5
	Fructosa-bifosfato aldolasa A	ALDOA	Healthy/OA (g, I/III)	2,01	9	1
Proteínas del citoesqueleto	Vimentina	VIM	Healthy/OA (g, I/III)	82	87	48
	Gelsolina	GSN	Healthy/OA (g, I/III)	2	7	1
	Vinculina	VCL	Healthy/OA (g, I/III)	5,29	20	3
	Actina, citoplasmática 1	ACTB	Healthy/OA (g, III)	25	54	16
	Erzina#	EZR1#	Healthy	2	4	1
	Moesina	MSN	Healthy/OA (g, I/III)	10	30	5
Chaperonas y Proteínas implicadas en el plegamiento proteico	Alpha-cristalina B	CRYAB	Healthy/OA (g, I/III)	4	26	2
	HSP similar-71KDa	HSPA8	Healthy/OA (g, I/III)	11	23	5
	HSP 90-beta	HSP90AB1	Healthy/OA (g, I/III)	7	17	4
	Endoplasmína	HSP90B1	Healthy/OA (g, I/III)	6	6	3
	78 kDa glucosa-proteína reguladora	HSPA5	Healthy/OA (g, I/III)	23	30	11
Otros	Anexina A1	ANXA1	Healthy/OA (g, I/III)	10	31	5
	Anexina A2	ANXA2	Healthy/OA (g, I/III)	52	66	30
	Anexina A5	ANXA5	Healthy/OA (g, I/III)	2	20	1
	Superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial#	SOD2#	Healthy	2	15	1
	Prelamina-A/C	LMNA	Healthy/OA (g, I/III)	26	45	15
	Factor eucariótico de inicio de traducción 5A2	EIF5A2	OA (g, I)	2	41	1
	Factor de elongación 2	EEF2	Healthy/OA (g, I)	14,35	21	7
	Dihidropirimidinasas-ligada a proteína 2	DPYSL2	Healthy/OA (g, III)	2/7	19/35	1/4
	Proteína de la Bóveda Mayor (<i>Major vault protein</i>)	MVP	Healthy/OA (g, III)	2/2	3/31	1/1
	GTP ligado a proteína RAN nuclear	RAN	Healthy/OA (g, I)	4/2	12/35	2/1
	Integrina alpha-V*	ITGAV*	OA (g, I)	2	21	1
	Integrina beta-1*	ITGB1*	OA (g, I/III)	2/2	19/8	1/1
	Integrina beta-1*	ITGB1*	OA (g, I/III)	2/2	19/8	1/1

Tabla 11. Proteínas identificadas en este estudio y previamente publicadas como proteínas relacionadas con el desarrollo y/o progreso de la OA. El número de péptidos (Nº) y los valores con los que se identificaron en cada grupo varía. Los valores se muestran en números enteros; score (scr), coverage (%) y Nº de péptidos (ver Material y métodos y **Tablas - Anexo 3E, 4E y 4G**). (*) Proteínas identificadas exclusivamente en pacientes OA. (#) proteínas identificadas exclusivamente en donantes sanos.

3.5. Comparación de las proteínas identificadas en éste y otros estudios

Las proteínas que se han identificado en este estudio se compararon con proteínas ya descritas por otros autores como proteínas que interactúan con la Cx43^{291, 292, 293, 294, 295, 296, 297} mediante un meta-análisis. Estos estudios fueron realizados en diferentes tipos celulares y en diferentes especies de mamíferos, aves y peces, pero ninguno empleó condrocitos aislados de cartílago articular. Hasta el año 2015, se habían descrito 76 proteínas que interactúan con el CTD de la Cx43, estas 76 proteínas se compararon con las 123 proteínas identificadas en condrocitos aislados de donantes sanos en el presente estudio. El resultado obtenido de la comparación fue de 15 comunes en ambos grupos lo que reveló un total de 138 nuevas interacciones no descritas en ningún estudio anterior (**Figura 25A**). De la comparación entre las proteínas ya descritas con proteínas identificadas en OA grado I (**Figura 25A**, letras en azul) se obtuvieron 28 proteínas comunes.

En el año 2015, se realizó un estudio proteómico similar al aquí presente, pero utilizando modelos animales y células aisladas del corazón de ratones con el objetivo de estudiar el efecto de la isquemia en la actividad de la conexina. En este nuevo estudio han identificado 444 proteínas, siendo 209 exclusivas de ese estudio. El resultado de la comparación que los autores llevaron a cabo entre su estudio y el aquí presente fue de 40 proteínas comunes, tales como: la integrina $\alpha 5/\beta 1$, N-cadherina, α y β tubulina, HSP90, vinculina, SOD2 y α - β -cristalina entre otras²⁹⁸.

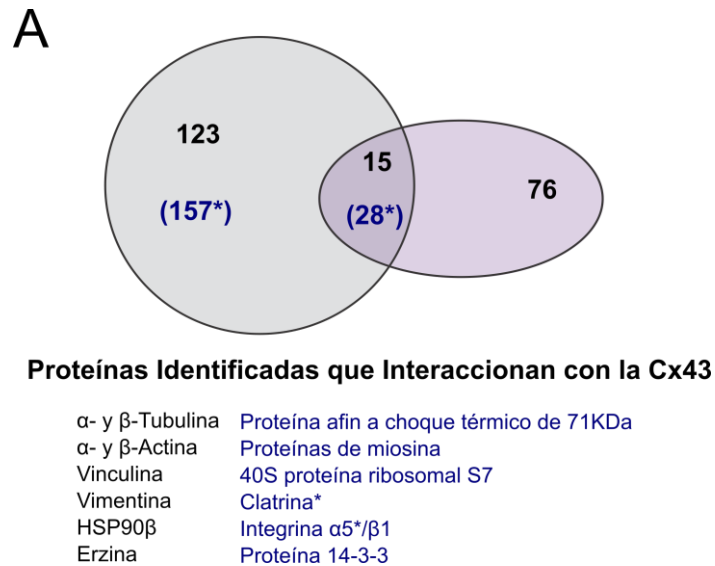


Figura 25. Meta-análisis del total de proteínas que interaccionan con la Cx43. (A) Con el diagrama de Venn se compararon las proteínas identificadas en el presente estudio (círculo de color gris) con proteínas descritas en estudios anteriores (círculo de color morado), la superposición indica las proteínas comunes a ambos grupos. Los números en color azul y con asterisco (*) representan las proteínas identificadas en pacientes OA de grado I. Los estudios que se han utilizado para dicho análisis fueron realizados mediante diferentes técnicas: IP, co-localización o técnicas de afinidad y resonancia magnética nuclear, utilizando células y tejidos de rata, ratón, humano, cerdo, y otros modelos animales y celulares^{291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298}. Ninguno de estos análisis se realizó utilizando cartílago articular o condrocitos articulares.

El hecho de que en este estudio no se hayan identificado proteínas de las que se conoce su interacción con la Cx43 tales como ZO-1^{299, 300} y varias fosfatasa, podría deberse a las limitaciones de las técnicas IP y espectrometría de masas, así como a que las interacciones con la Cx43 pueden ser dependientes de la fase del ciclo celular en el que se encuentren las células^{301, 217}. A esto se suma la complejidad de la identificación de proteínas poco solubles o que se encuentran en menores concentraciones.

La identificación de proteínas de membrana por espectrometría de masas es complicada debido al carácter hidrofóbico de los dominios transmembrana, muy resistentes al lisado. Además los péptidos hidrofóbicos son difíciles de extraer en digestiones en gel y de solubilizar en los tampones compatibles con la espectrometría de masas. Todo esto, sumado a la baja ionización que presentan estos péptidos, hace que la detección de proteínas transmembrana mediante espectrometría de masas sea muy complicada^{302, 303}. Con el objetivo de mejorar la identificación de proteínas transmembrana se

realizaron nuevas IPs utilizando agujas de diámetro 25-G y detergentes iónicos. Sin embargo, con estas nuevas condiciones se identificaron únicamente 32 proteínas (ver **Tabla - Anexo 5**), 29 de las cuales se habían previamente identificado como proteínas que interactúan con la Cx43 en pacientes OA. Únicamente las proteínas cadherina-23, MS4A7 y miosina-14 fueron exclusivas de este grupo.

4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL DOMINIO C-TERMINAL DE LA CONEXINA 43 EN CONDROCITOS Y CARTÍLAGO ARTICULAR

Con el objetivo de ampliar el estudio de la función del CTD de la Cx43 en el cartílago articular se decidió utilizar un modelo animal de ratón que expresa la Cx43 sin los últimos 125 aminoácidos de su CTD (Cx43K258stop). Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Christian Naus del departamento *Cellular & Physiological Sciences* del *Life Science Institute* de la *British Columbia University* en Vancouver (Canadá)

En los ratones *knockout* para la Cx43 (Cx43cKO) el gen de la Cx43 fue eliminado por recombinación del gen de la Cx43 con el gen de la β -galactosidasa (β -Gal)¹⁹⁹, rompiendo así el marco de lectura normal para la traducción de la proteína. Los ratones Cx43K258stop presentan una delección de 125 aminoácidos en el CTD. Del cruce de los dos modelos *knockout* se obtuvieron los genotipos: (i) Cx43cKO/Cx43cKO (-/-), fenotipo letal; (ii) Cx43cKO/Cx43 (-/+), heterocigoto para la Cx43; (iii) Cx43/Cx43 (+/+), fenotipo silvestre. (iv) Cx43K258stop/Cx43K258stop ($\Delta T/\Delta T$), fenotipo letal; (v) Cx43K258stop/Cx43 ($\Delta T/+$), heterocigoto para la delección del CTD y (vi) Cx43K258stop/Cx43cKO ($\Delta T/-$) que expresa una única copia de la Cx43 pero con la delección del CTD.

Para este estudio se emplearon tanto condrocitos primarios en cultivo aislados de cartílago articular como explantes de cartílago articular. Ambos proceden en su totalidad de cartílago articular de rodilla de los ratones obtenidos del cruce de las series Cx43K258stop y Cx43cKO.

El genotipo de los ratones se analizó mediante PCR de ADN aislado de biopsias de oreja, utilizando cebadores específicos para amplificar el gen de la β -galactosidasa, confirmando así la ausencia o presencia de la Cx43. Las diferencias de peso molecular

con los cebadores para el gen de la Cx43 indican qué muestras tienen el gen de la Cx43 completo (mayor tamaño) y cuáles pertenecen a ratones con el CTD deleciónado (menor peso molecular) (**Figura 26A**).

El genotipo de los ratones se confirmó mediante *western blot* utilizando el anticuerpo anti-NTD-Cx43 que reconoce el dominio N-terminal de la Cx43 y anti-GAPDH como control de carga. En las muestras con el dominio CTD deleciónado se detectó la banda de menor peso molecular (25 KDa) (**Figura 26B**).

Los ratones se sacrificaron a los pocos días de nacer. Su tamaño no superaba los 6 cm, lo que complicó la obtención del cartílago articular de la rodilla. Durante la obtención del cartílago éste puede contaminarse con otros tejidos circundantes, tales como el tejido óseo y el tejido conectivo. Para comprobar que durante el aislamiento de condrocitos no se produjeron tales contaminaciones se descartó la presencia de células óseas o conectivas (fibroblastos) y la presencia de condrocitos en los cultivos celulares mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-osteopontina (anti-OPN), anti-fibronectina (anti-FN) y anti-COL2A (**Figura 26C**). El fenotipo de las células en cultivo junto con la positividad para el principal marcador de condrocitos, el COL2A, confirmó que el aislamiento se realizó correctamente y las células mantuvieron su fenotipo en cultivo en monocapa.

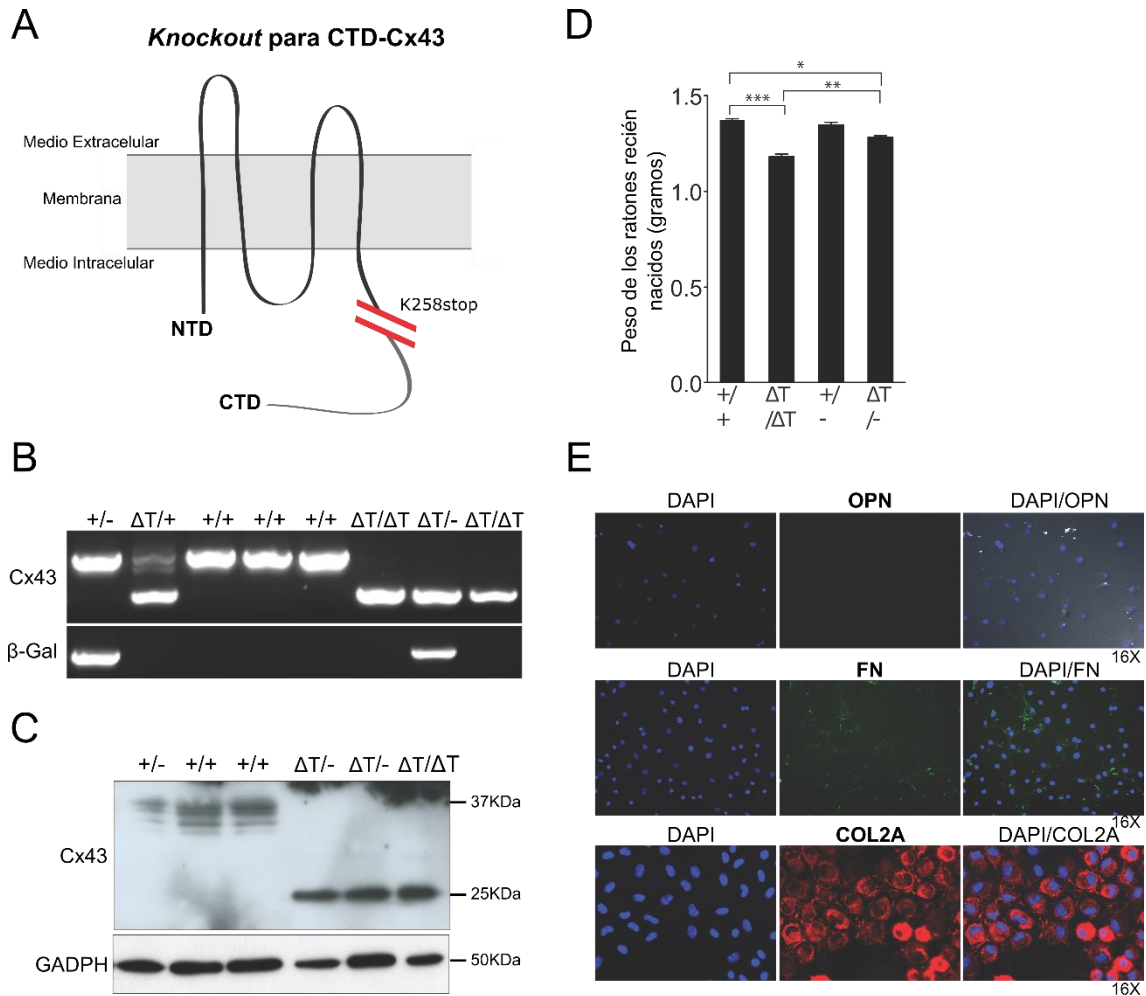


Figura 26. Ratones con el CTD de la Cx43 deleciónado exhiben menor talla que ratones con el fenotipo silvestre. (A) Los ratones con el CTD de la Cx43 deleciónado presentan el CTD incompleto (Cx43K258stop), sin los últimos 125 aminoácidos de la secuencia silvestre. **(B)** Análisis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados mediante PCR de ADN aislado de biopsias de oreja. La amplificación de la β-Gal indica el truncamiento en el gen de la Cx43. El peso molecular del amplicón obtenido con Cx43 indica la deleción del CTD. **(C)** Análisis mediante *western blot* de condrocitos aislados del cartílago articular utilizando los anticuerpos anti-NTD-Cx43 y anti-GAPDH como control de carga. La banda de 25 KDa se corresponde con la Cx43 con su CTD deleciónado. **(D)** Los ratones fueron pesados al nacer, mostrando el fenotipo homocigoto para la deleción del CTD de la Cx43, una menor talla sin afectación visual de grasa corporal (n = 9, análisis de Kruskal-Wallis con un test de Dunn de comparación múltiple, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,000$) **(E)** Análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia de condrocitos primarios utilizando los anticuerpos anti-OPN (color verde), anti-FN (color verde) y anti-COL2A (color rojo) y contratinción con DAPI.

4.1. Estudio de la comunicación celular, fenotipo y proliferación en condrocitos primarios

Se estudió el efecto de la delección del CTD de la Cx43 en la comunicación célula - célula mediante la técnica de *scrape loading* (**Figura 27A**)²⁸⁵. Se utilizó el fluoróforo AD, color rojo, como control. AD es una molécula de alto peso molecular lo que impide que pase a través del poro de las UCs al contrario que la CB que sí es capaz de pasar por los canales. En las imágenes se muestran las células positivas para AD y CB y la cuantificación de la transferencia de CB entre células en contacto. En el fenotipo Cx43K258stop se observó menor transferencia de CB, lo que concuerdan con el cambio en la localización de la Cx43 observada por inmunofluorescencia (**Figura 27B**). En el fenotipo silvestre la Cx43 se localizó en el citoplasma, en los bordes celulares (membrana celular) y en las zonas de contactos celulares, mientras que el fenotipo Cx43K258stop la Cx43 se localizó en el citoplasma, alrededor del núcleo y en puntos positivos, que según la contratinción con DAPI, indican que podrían corresponderse con los nucléolos³⁰⁴.

Para estudiar proliferación en condrocitos en cultivo se realizaron dos técnicas diferentes: el conteo celular con el correspondiente cálculo del factor de crecimiento (**Figura 27C**) e inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Ki67 (**Figura 27D**). En ambos ensayos se observó mayores niveles de proliferación en el fenotipo Cx43K258stop ($\Delta T/\Delta T$ y $\Delta T/-$).

Para estudiar cómo la delección del CTD afecta al fenotipo de los condrocitos y a la síntesis de componentes de la MEC en condrocitos primarios, se realizó un análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-COL2A y condrocitos primarios (**Figura 27D**). En el fenotipo Cx43K258stop se detectaron menores niveles de COL2A, que es el principal marcador de condrocitos articulares.

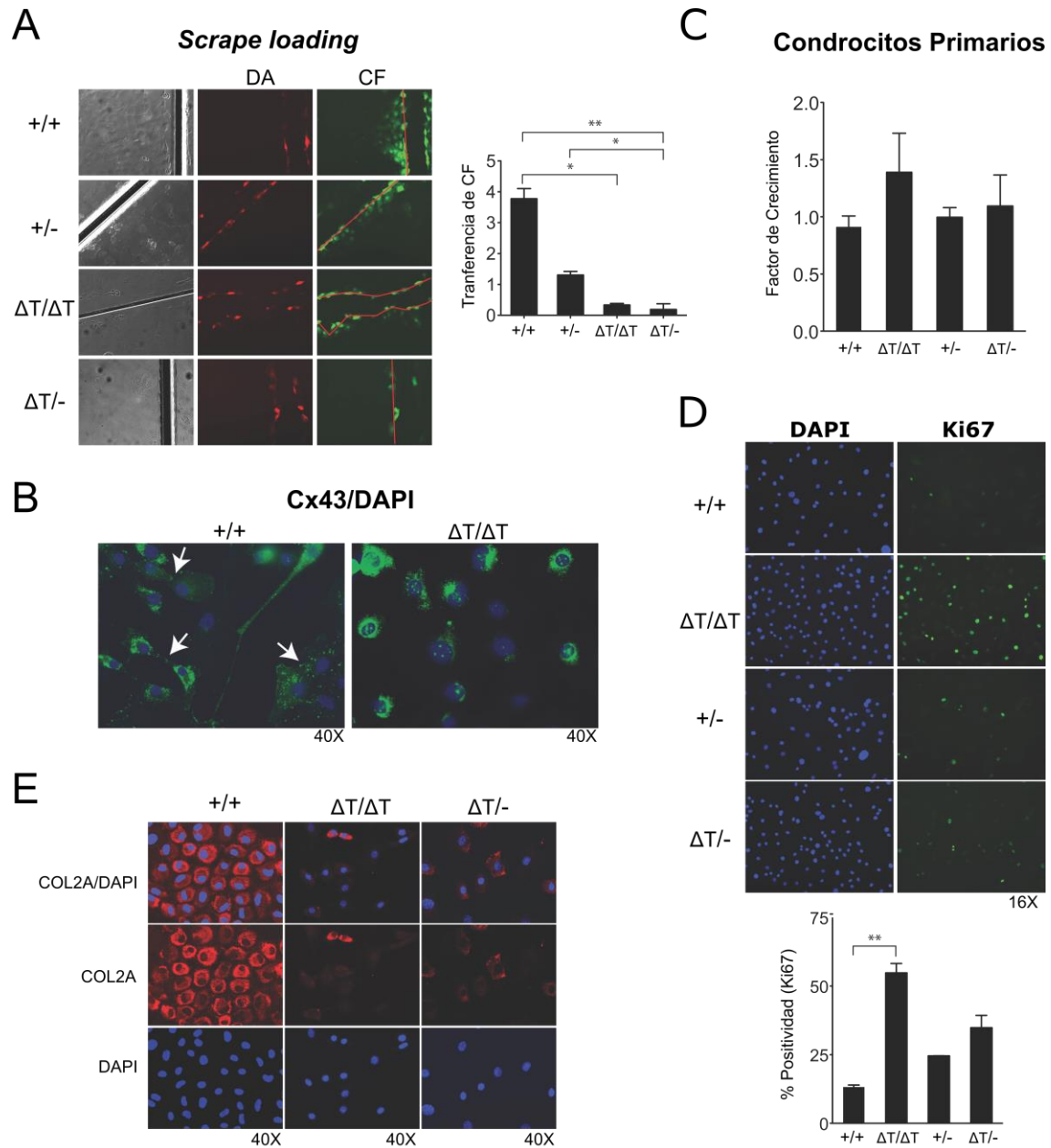


Figura 27. Ratones con el CTD de la Cx43 deletado presentan alteraciones en su comportamiento celular y en su fenotipo. (A) Ensayo de *scrape loading* para el estudio de la transferencia de CB (color verde), utilizando como control el fluoróforo AD (color rojo). La gráfica representa el número de células positivas para CB y normalizadas según el número de células positivas para AD. Media \pm S.E.M. ($n = 4$ para +/+ y $\Delta T/-$, $n = 5$ para +/- y $n = 9$ para $\Delta T/\Delta T$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$. Test de Kruskal-Wallis y test de Dunn de comparación múltiple. **(B)** Análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia de condrocitos con fenotipo silvestre (izquierda) y condrocitos con fenotipo homocigoto para Cx43K258stop (derecha) utilizando el anticuerpo anti-NTD de la Cx43. En los condrocitos con fenotipo silvestre la Cx43 se localiza en los bordes celulares o en los contactos célula - célula (flechas blancas). **(C)** Contaje celular de células en cultivo, utilizando un contador automático, a 24, 48, 72 y 144 horas utilizando un

contador automático (ver *Material y Métodos*). En la gráfica se representa el factor de crecimiento (ver materiales y métodos). **(D)** Análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia en condrocitos primarios utilizando el anticuerpo anti-Ki67 (color verde) y la contratinción con DAPI. La gráfica representa el porcentaje de células positivas para Ki67. Media \pm S.E.M. ($n = 5$). $**p < 0,01$; análisis con el test de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiple de Dunn. **(E)** Análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia de condrocitos primarios utilizando el anticuerpo anti-COL2A y la contratinción con DAPI.

4.2. Estudio del fenotipo de ratones con el dominio C-terminal deletado en cartílago articular

En el caso de explantes de cartílago articular primero se realizó la tinción con HE para observar la morfología del tejido. Esta tinción reveló un mayor número de lagunas y de células en el fenotipo Cx43K258stop ($\Delta T/-$) (**Figura 28A**). El estudio de proliferación celular se llevó a cabo mediante el análisis IHQ utilizando como marcador de proliferación celular el anticuerpo anti-PCNA (**Figura 28B**). En este caso no se utilizó Ki67 por imposibilidad de poner a punto la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo del que disponíamos en el laboratorio y utilizando muestras de tejido. En ambos casos, los resultados obtenidos, confirmaron que el cartílago articular de los ratones Cx43K258stop presentaba mayores niveles de proliferación celular y mayor número de condrocitos (**Figura 28A y 28B**).

Las gráficas de la **Figura 28C** muestran los pesos de los ratones a los cuatro meses de nacer, machos ($n = 10$) y hembra ($n = 10$). Dado la letalidad del fenotipo Cx43K258stop homocigoto, menos del 3 % alcanza la madurez, no pudieron emplearse en este estudio. Entre los fenotipos que alcanzan los 4 meses de vida, se detectó menor peso asociado a un menor tamaño en los ratones que sólo expresaban la Cx43 sin parte de su CTD (heterocigoto para Cx43K258stop y deficiente en Cx43 silvestre)

Se analizó la presencia de proteoglicanos en cartílago articular mediante las tinciones de SO - FG y AT (**Figura 28D**). En la tinción de SO - FG el hueso subcondral aparece teñido de azul turquesa debido al FG. En ambas tinciones, el fenotipo Cx43K258stop presenta una coloración menos intensa indicando menor presencia de PGs, componentes esenciales para la estructura y función del cartílago articular.

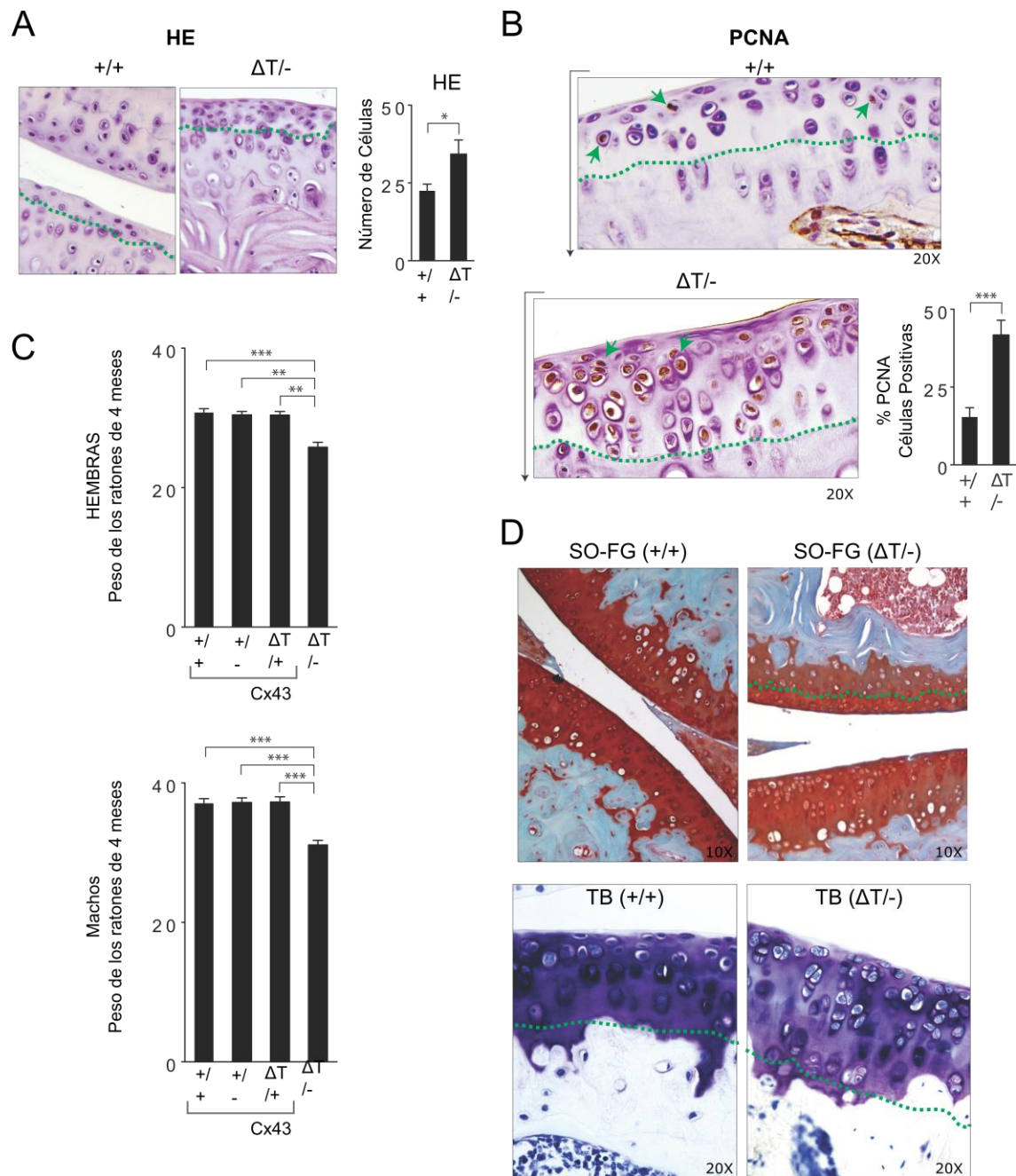


Figura 28. Ratones con el CTD de la Cx43 delecionado presentan alteraciones en la composición de la MEC. (A) La tinción con HE de cartílago articular reveló un mayor número de lagunas y de células en el fenotipo Cx43K258stop. Media \pm S.E.M. ($n = 21$ para +/+ y $n = 8$ para ΔT/-), test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$. **(B)** Análisis mediante IHQ de cartílago articular de fenotipo silvestre y fenotipo Cx43K258stop utilizando el anticuerpo anti-PCNA (color marrón, flechas verdes) y la contratinción con hematoxilina de Gill III. Media \pm S.E.M. ($n = 24$ para +/+ y $n = 17$ for ΔT/-), test de Mann-Whitney *** $p < 0,0001$. **(C)** Las gráficas representan el peso de los ratones a los 4 meses de edad, hembras y machos. Media \pm S.E.M.. Análisis de Kruskal-Wallis y test de Dunn de comparación múltiple, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$. A la izquierda el peso de los ratones. Media \pm S.E.M. ($n = 10$). Los valores p se determinaron con el test de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. **(D)** Tinciones

con SF - OF (arriba) y AT (abajo) de cartílago articular. Ambas tinciones tiñen proteoglicanos (SO - FG) de color naranja - butano y el AT de color azul intenso

Discusión

1. COMUNICACIÓN CELULAR EN CONDROCITOS PRIMARIOS Y CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un tejido especial debido a la composición de la MEC que está formada principalmente por COL2, PGs y numerosas glicoproteínas que le confieren una alta carga negativa. Sus células, encargadas de formar y regenerar el cartílago, se encuentran “insertadas en lagunas” y representan menos del 5 % del volumen total del tejido. Los condrocitos en cartílago de adultos se encuentran principalmente en estado no proliferativo y el incremento en proliferación celular es un signo típico de enfermedades que afectan a la estructura del tejido tales como la OA. A mayores, el cartílago de adultos carece de vasos sanguíneos y linfáticos y no está innervado. Dadas estas características, en la bibliografía estaba ampliamente aceptado el mecanismo de difusión de moléculas a través de la MEC, como único posible sistema de comunicación celular; los nutrientes y diferentes metabolitos llegarían a los condrocitos por su difusión desde el líquido sinovial, en contacto con la zona superficial del cartílago. Sin embargo, no todas las moléculas, y especialmente debido a su carga, son capaces de atravesar este tipo de matriz.

La falta de comunicación directa célula - célula en un tejido impide la rápida respuesta de sus células ante diferentes estímulos, siendo esencial la coordinación celular para mantener la homeostasis del tejido. La comunicación directa célula - célula se establece por canales intercelulares denominados UCs, mientras que la comunicación célula – matriz sucede a través de hemicanales. En el año 2004 se observaron pequeñas extensiones celulares en la zona superficial del cartílago articular de un donante adulto sano y un OA, teniendo mayor presencia en el cartílago articular del paciente con OA³⁰⁵. Dichas proyecciones celulares se habían intuido con anterioridad en la zona intermedia del tejido³⁰⁶. Otros autores observaron estos mismos procesos celulares en la zona superficial de cartílago articular humano y de *Rattus norvegicus* (rata) sugiriendo que podrían estar mediando la interconexión de los condrocitos, relacionando estas estructuras con el desarrollo de la OA y con la señalización célula - célula (especialmente dentro de la misma laguna) y célula – matriz³⁰⁷.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, utilizando diferentes técnicas de microscopía, ponen en evidencia que los condrocitos en cartílago articular están conectados físicamente a través extensiones citoplasmáticas o proyecciones de la membrana plasmática que permiten el contacto físico entre condrocitos de lagunas distantes. Las imágenes de microscopía electrónica de explantes de cartílago articular

revelaron que los condrocitos embebidos en la matriz del cartílago contienen al menos dos brazos citoplasmáticos que se extienden a lo largo de la densa MEC alcanzando células distantes localizadas en lagunas diferentes (**Figura 12C**). Estas finas extensiones del citoplasma que llegan a alcanzar los 200 nm de ancho y has 200 µm de longitud, fueron también observadas en condrocitos en cultivo (**Figura 12A**). Los estudios anteriores sugirieron la presencia de proyecciones citoplasmáticas, canales en la MEC o remanentes de restos celulares en las zonas superficial e intermedia del cartílago articular pero ninguno de estos trabajos demostró las conexiones intercelulares que se describen en este trabajo (**Figura 12**).

Hace dos décadas se describió la presencia de Cx43 en cartílago articular de modelos animales²⁰⁵ y desde entonces se han publicado algunos estudios confirmando tanto la presencia de Cx43 como la de hemicanales y UCs funcionales formadas por Cx43 en condrocitos cultivados en monocapa o constituyendo micromasas^{308, 309, 310, 311, 312, 313, 205}. Más tarde se publicó la presencia de Cx43 en cartílago articular humano^{206, 207}. Sin embargo, ninguno de estos estudios fue capaz de explicar la función de la formación de UCs en los condrocitos, asumiendo que las UCs podrían únicamente formarse entre los condrocitos que integran un mismo condrón. En el presente trabajo se demuestra que los condrocitos en cultivo aislados de cartílago de donantes adultos retienen la capacidad de formar UCs funcionales, cuya apertura y cierre es voltaje dependiente y su patrón de voltaje es el característico de la Cx43 (**Figura 14A**). Los resultados obtenidos en tejido ponen en evidencia la conexión física que permitiría establecer UCs a lo largo de toda la extensión del tejido.

DAPI se utiliza para teñir los núcleos de células fijadas o muertas. Además, DAPI es un compuesto catiónico e impermeable por lo que no es capaz de atravesar las membranas plasmáticas en células vivas, por lo que su utilización en el estudio de la funcionalidad de las UCs resulta de gran utilidad^{314, 315, 64}. La positividad para DAPI observada en las proyecciones citoplasmáticas de condrocitos en cartílago articular (**Figura 14C**) junto con el intercambio LY y oligonucleótidos entre condrocitos en contacto (**Figura 14D**) confirmaron el acoplamiento funcional de condrocitos *in vivo* y la posibilidad o capacidad de intercambiar pequeñas moléculas de ARN tales como podrían ser ARNi o miARN (micro ARN) que podrían modificar la expresión génica de la célula receptora.

El intercambio de pequeñas moléculas de ARN podría estar jugando un papel esencial en los mecanismos de diferenciación celular y en el mantenimiento del fenotipo del condrocito tanto en fase de crecimiento como en el cartílago de adultos. Por ejemplo, Sox9, un factor de transcripción imprescindible en la condrogénesis y regula

positivamente la expresión del gen COL2A1 a través de un mecanismo dependiente del miRNA-675³¹⁶.

El establecimiento de una red tridimensional entre las células a través de UCs es esencial, no sólo para permitir el acoplamiento químico y eléctrico, sino también para el acoplamiento metabólico; muy importante en el caso de tejidos avasculares, permitiendo el intercambio directo de moléculas, iones, nutrientes (como la glucosa) y metabolitos^{317, 318, 267}. Por otro lado, los hemicanales podrían estar jugando una función crucial en la comunicación entre la célula y la matriz y en la respuesta a cargas mecánicas en el cartílago articular, como ya se ha demostrado en diferentes modelos animales^{319, 205, 7}.

En los explantes de cartílago también se ha observado la presencia de Cx45, Cx32 y Cx46 (**Figura 17**) en el citoplasma y en los bordes de las lagunas. La mayoría de las células expresan más de un tipo de Cxs pudiendo combinarse entre ellas para formar hemicanales heteroméricos. El acoplamiento de estos hemicanales en UCs heterotípicas hace variar la permeabilidad de los canales lo que permite una regulación dinámica de las propiedades que modifica la selectividad de los canales y por lo tanto la comunicación intercelular³²⁰. Los ensayos de electrofisiología (**Figura 15A**) realizados utilizando condrocitos en cultivo demostraron el acoplamiento voltaje dependiente mediado por UCs formadas por Cx43. En el caso del tejido, no se pudieron realizar estos ensayos debido a las características de la MEC, que no permite alcanzar a las células viables. A mayores, la membrana de los condrocitos viables localizados en las zonas más superficiales de los explantes *in vitro* respondieron de forma anómala al contacto con la micropipeta. Esto fue lo que observó el grupo del Dr. Christian Steinhäuser, director de *Institutes für Zelluläre Neurowissenschaften* en Alemania cuando intentó inyectar LY en condrocitos utilizando tejido (trabajo realizado en colaboración con su grupo de investigación). Debido a que no se pudieron realizar estas técnicas en tejido, no se puede descartar que otras Cxs formen canales funcionales y participen en los mecanismos de comunicación a través de hemicanales o UCs en el cartílago articular.

El estudio mediante IHQ de explantes de cartílago articular de pacientes con OA, mostró altos niveles proteicos de la Cx43 y la Cx45 (**Figura 15 y 17**). En el caso de la Cx45, la presencia de la proteína no se pudo detectar mediante IHQ en condrocitos en cultivo de cartílago articular sano, pero sí se detectó su expresión génica (**Figura 13E**). Debido a que en el caso de células en cultivo no se detectó la proteína (Cx45), los estudios posteriores se centraron en el estudio de las funciones de la Cx43 en condrocitos aislados de cartílago articular sano y OA.

La sobreexpresión de Cx43 y la Cx45 en cartílagos de pacientes con OA se observó desde las primeras fases de la enfermedad (grado I) y especialmente desde la zona superficial hasta aproximadamente 1000 μm de profundidad en el tejido. Ambas proteínas se localizaron principalmente en el citoplasma y alrededor de los condrocitos en los bordes de las lagunas. Sin embargo, en el caso de las zonas no dañadas del cartílago de pacientes con OA, la Cx43 se localizó principalmente alrededor del núcleo celular perdiendo su localización en el borde de la laguna. Este cambio de localización podría estar relacionado con la pérdida de la capacidad de formar hemicanales o UCs. Sin embargo en estas regiones la Cx45 se localiza en el citoplasma y en la membrana por lo que posiblemente en estas regiones la comunicación célula - célula se podría estar produciendo vía UCs formadas por Cx45.

Estudios anteriores observaron que la IL-1 β incrementa los niveles de la Cx43 y la inhibición de los canales de Cxs reduce la expresión de MMPs inducida por IL-1 β en células sinoviales³²¹. Las MMPs, son bien conocidas por su participación en la degradación del cartílago característica de la OA²⁹, como es el caso de la MMP-13³²². En La **Figura 15C** se demuestra la presencia de altos niveles de Cx43 en cartílago articular de pacientes con OA en las zonas de mayor daño del tejido, pudiendo estar relacionado dicho incremento en la Cx43 con la activación de rutas catabólicas que favorecen la degeneración o degradación del tejido.

La expresión de Cx43 en condrocitos primarios en cultivo es significativamente mayor que en cartílago articular (**Figuras 13C y 15A**). Los condrocitos en cultivo son células proliferativas contrariamente a lo que ocurre en el cartílago articular adulto, aunque en cartílagos articulares OA los condrocitos presentan mayores niveles de proliferación celular. El aumento de la proliferación en el cartílago articular OA podría estar relacionado con los altos niveles proteicos observados de la Cx43, correlacionándose proliferación y altos niveles de Cx43 en las mismas zonas en cartílago articular de donantes con OA. En los explantes utilizados en este estudio, la zona que presentaba mayor daño fueron las zonas superficial e intermedia donde se produce una significativa activación catabólica y un aumento en la proliferación celular³²³ (**Figura 15 y 16**). De hecho, la Cx43 está implicada en la regulación del ciclo celular, aunque su efecto es dependiente del tipo celular^{324, 104}. La Cx43 puede modificar la expresión génica de factores reguladores del ciclo celular tales como p21 o p27^{325, 326}, pero también se ha descrito que su CTD interacciona con algunos de estos factores³²⁷ complicando por tanto su estudio.

2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS CANALES DE CONEXINAS EN LA LÍNEA CELULAR DE CONDROCITOS T/C-28a2 PARA SU POTENCIAL USO COMO MODELO *IN VITRO* EN EL ESTUDIO DE LA ARTROSIS

La obtención de muestras de cartílago articular es una tarea complicada ya que no todos los investigadores tienen acceso a muestras de origen humano lo que dificulta y retrasa el estudio de las enfermedades que afectan a este tejido; por lo que el empleo de condrocitos primarios aislados de cartílago articular humano para el estudio de los mecanismos implicados en la degeneración y destrucción del tejido es limitado.

Los condrocitos primarios en cultivo tienden a desdiferenciarse a células fibroblásticas, por lo que su cultivo celular está limitado en el tiempo a unas pocas semanas²⁵⁹. La obtención de cartílago articular humano y/o de un número adecuado de condrocitos primarios no siempre es posible. Además, los donantes del cartílago articular abarcan un amplio rango de edad, aunque suelen ser pacientes de edades avanzadas, por lo que hay que tener en cuenta procesos asociados al envejecimiento que podrían estar afectando a los resultados obtenidos. A todo esto se suma la variabilidad inherente que presenta cada muestra al tratarse de individuos diferentes y con complejas historias clínicas que suelen incluir pacientes crónicos, multipatológicos y polimedicados. Para suplir estos problemas y otras limitaciones y con el objetivo de tratar de aumentar la reproducibilidad de los resultados se han establecido varias líneas celulares a partir de condrocitos inmortalizados, convirtiéndose en herramientas de uso común en el laboratorio²⁸². Estas líneas celulares no siempre reproducen lo que ocurre en un condrocito humano y en el cartílago articular, de hecho, no todas las líneas que se establecieron se han llegado a utilizar de forma rutinaria. En el caso de la línea de condrocitos T/C-28a2 se ha aceptado su uso como modelo de condrocito articular humano a pesar de las limitaciones y de su alta capacidad proliferativa²⁶⁰.

En este trabajo de tesis se ha caracterizado la expresión y funcionalidad de los canales de Cxs en la línea celular T/C-28a2 con el objetivo de poder valorar su uso para el estudio de las funciones de la Cx43 y su potencial aplicabilidad como modelo *in vitro* de artrosis.

Ensayos de electrofisiología (**Figura 18D**) demuestran que los condrocitos T/C-28a2 forman UCs dependientes de voltaje, cuyo patrón es el esperado para la Cx43. Tanto las UCs como los hemicanales son funcionales en esta línea celular (**Figura 19A y 19B**

y **Figura 18C**, respectivamente). No se observaron diferencias en la absorción de LY a través de los hemicanales entre condrocitos T/C-28a2 y condrocitos primarios. El tratamiento con los péptidos miméticos de la Cx43, GAP27 y GAP19 (**Figura 19A y 20C**, respectivamente) no disminuyó la transferencia del fluoróforo (LY y yoduro de propidio, respectivamente) indicando que los hemicanales podrían no estar formados por conexinas pero si por Panxs.

Los condrocitos T/C-28a2 presentan menores niveles de expresión de Cx43 ARNm, así como menores niveles proteicos en comparación con condrocitos primarios, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la electroporación *in situ* y el *scrape loading* (**Figura 19**). Estos condrocitos tienen la partícula SV40-LT que activa a la quinasa c-Src y disminuye la comunicación célula - célula vía UCs mediante la fosforilación del CTD de la Cx43^{328, 286}. Las **Figuras 19C y 19D** muestran como los condrocitos T/C-28a2 contienen niveles relativamente altos de c-Src activo (Tyr416) y su localización en la membrana plasmática de células adyacentes. La detección de menor cantidad de Cx43 en la línea celular sugiere además la presencia de modificaciones posttraduccionales en la Cx43 en los condrocitos T/C-28a2 que no se producirían en condrocitos primarios y podrían corresponderse con la fosforilación de la proteína (ver bandas superiores detectadas en el *western blot* de la **Figura 19C** para la Cx43).

Los diferentes niveles de expresión de Cx43 y el diferente patrón de comunicación celular vía UCs observado entre ambos tipos celulares sugieren una posible alteración de las células durante el cultivo en monocapa, lo que ya se había observado entre condrocitos primarios en cultivo y cartílago articular. Por ejemplo, cambios en los niveles de miARN1-1 afecta a la expresión de la Cx43³²⁹ y la expresión del miRNA1-1 varía entre condrocitos primarios y condrocitos en tejido, siendo más similar su expresión entre condrocitos en tejido y la línea celular T/C-28a2 (Gago-Fuentes *et al.*³³⁰ ver figura suplementaria 2)

De los resultados obtenidos se puede concluir que los condrocitos T/C-28a2 representan un modelo *in vitro* adecuado para el estudio de la funcionalidad de los canales de Cxs y Panxs tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Son células que expresan marcadores específicos de condrocitos articulares de manera estable²⁶⁰ y capaces de establecer comunicación célula – célula y célula – matriz. Los resultados obtenidos para la Cx43 (niveles de expresión génica, de expresión proteica y localización) son semejantes a los obtenidos en el cartílago articular de donantes sanos³³² (**Figura 15**). Aunque al analizar estos resultados hay que tener en cuenta que los condrocitos T/C-

28a2 son células transfectadas con SV40-T, modificación que puede estar afectando a los datos proporcionados por este modelo *in vitro* de cartílago articular.

3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO C-TERMINAL DE LA CONEXINA 43

La identificación de proteínas que interaccionan con la Cx43 ayudará a conocer la base molecular que regula la formación, degradación, apertura y cierre de los canales, así como otras funciones de la Cx43 independientes de la actividad del canal, lo que en otros estudios, ha contribuido a la identificación de la patogénesis de diferentes enfermedades³³¹. Las proteínas identificadas en el presente estudio sugieren que la Cx43 podría estar ejerciendo diferentes funciones en condrocitos de donantes sanos y condrocitos de pacientes con OA. Este estudio ha sentado las bases para poder ampliar el conocimiento de las múltiples funciones celulares de la Cx43 en condrocitos articulares y posibles alteraciones de su función durante el desarrollo y/o progreso de la OA.

La identificación de proteínas que interaccionan con la Cx43 descritas en la bibliografía se han realizado con diferentes métodos y en el caso de la IPs utilizando vectores de expresión y marcadores para mejorar los procesos de purificación de los complejos proteicos^{332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 82, 234, 288 298, 301}. El estudio aquí presentado es el primero en que la identificación de las proteínas que interaccionan con la Cx43 se ha realizado sin la sobreexpresión de la Cx43 o su marcaje con una molécula tipo HA (del inglés *hematoglutin*). A pesar de las limitaciones que supone trabajar con condrocitos primarios, los resultados obtenidos han permitido identificar diferentes proteínas en las muestras de donantes sanos y pacientes con diferente grado de la enfermedad.

Este estudio no hubiese podido realizarse utilizando directamente cartílago articular debido a la solidez de la MEC, rica en glicoproteínas y colágenos y con un bajo número de células, lo que requeriría el uso de gran cantidad de muestra sólida (tejido) y de agentes caotrópicos, los cuales son incompatibles con la técnica de IP.

Independientemente de la variación de las condiciones en la identificación, la interacción de proteínas con la Cx43 depende de la secuencia de aminoácidos que forman los

dominios de unión y de su estructura topológica. El meta-análisis realizado (**Figura 25**) reveló un total de 108 nuevas proteínas identificadas en donantes sanos no identificadas en estudios anteriores y 129 nuevas proteínas en pacientes con OA. El solapamiento con estudios anteriores fue de 15 proteínas en donantes sanos y 28 en pacientes con OA, estas diferencias probablemente se deban al tipo celular y a la metodología empleada. En este estudio se identificaron proteínas responsables del desarrollo de enfermedades humanas, tales como Serpina H1, HnRNP-A2/B1, 78 kDa proteína regulada por glucosa, colágenos y PPIase B que se relacionan con desórdenes en el tejido conectivo. La α - β -cristalina es responsable del desarrollo de la miopatía miofibrilar y del desarrollo de cataratas. La HspB1 está implicada en el desarrollo del síndrome de CMXT, neuropatías y neurodegeneración. La vinculina se relaciona, entre otras enfermedades, con el desarrollo de cardiomiopatías y la profilina-1 participa en el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica y neurodegeneración. Otras proteínas que interactúan con la Cx43 como SOD2, vimentina, vinculina, gelsolina o alpha-enolasa (**Tabla 11**) identificadas en condrocitos sanos están descritas como proteínas alteradas en OA^{341, 342, 291, 292, 294, 295, 296, 297}, enfermedad en la cual la Cx43 ya muestra altos niveles desde las etapas muy tempranas¹¹⁷ (**Figura 15C**).

Por otra parte, en este estudio se identificaron proteínas relacionadas con la generación de energía y precursores metabólicos tales como ALDOA, GAPDH, PGK1, ENO1 y PKM2 (**Tabla 9**). Estas enzimas están implicadas en los procesos de glicólisis y gluconeogénesis, y participan en las fases de generación de energía sintetizando ATP y NADH, a excepción de la lactato deshidrogenasa A que participa en el último paso de la glicólisis en condiciones anaeróbicas. Estas interacciones podrían estar regulando el metabolismo de la glucosa. Resultados de diferentes grupos de investigación sugieren que la inhibición de la comunicación célula - célula vía UCs modifica la captación de glucosa. Bajos niveles de la Cx43 alteran la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 y de las hexoquinas tipo I y tipo II. Por otra parte, se ha publicado que la inhibición de UCs incrementa los niveles de glucosa y modifica la comunicación célula - célula^{343, 344, 345, 346}. Los resultados aquí presentados junto con las evidencias previamente publicadas ponen de relevancia que existe una conexión entre el metabolismo de la glucosa y la Cx43. Nuevos estudios serán necesarios para poder entender si la tendencia o factor de riesgo que potencialmente presentan los pacientes con diabetes a padecer OA, podría explicarse por alteraciones en las cascadas de señalización que impliquen a la Cx43 y su capacidad de modulación del metabolismo celular¹¹⁷.

Por otra parte, se ha demostrado que la Cx43 se localiza a nivel mitocondrial^{347, 235, 239} ³⁴⁸ donde participa en el proceso de protección de daño tisular previo a un proceso isquémico, lo que conoce como preacondicionamiento^{347, 348, 349, 235}. Ante un proceso de isquemia prolongado los niveles de ATP disminuyen acidificando el pH y acumulando especies reactivas de oxígeno (ROS) cuya acumulación favorece la activación de rutas que activan la muerte celular. La proteína mitocondrial SOD2, la ATP sintasa ATP5J2 localizada en la membrana mitocondrial y la chaperona Hsp90, que podría estar implicada en el transporte de la Cx43 a la mitocondria^{350, 239}, interaccionan con la Cx43. La interacción de la Cx43 con las proteínas SOD2 y ATP5J2 se identificó exclusivamente en condrocitos de donantes sanos (**Tabla 10** y **Tabla - Anexo 4H**). Conocer la relación funcional entre la Cx43 y estas proteínas mitocondriales probablemente ayudará a entender el papel que juega la Cx43 a nivel mitocondrial en los procesos degenerativos y en el papel protector de daño tisular ante un proceso de isquemia.

Varios estudios han sugerido que la Cx43 podría participar en la regulación de la expresión de diferentes genes^{351, 352}. Tanto la Cx43 (secuencia completa de aminoácidos) como su CTD se han sido detectados en el núcleo²⁵³, y varios autores han descrito que la translocación al núcleo de la Cx43 o de su CTD modifica la proliferación celular y la expresión génica²⁵³. A pesar de estas evidencias, a día de hoy se desconoce el mecanismo de translocación de la Cx43 o de su CTD al núcleo, así como el mecanismo de regulación de la expresión génica que ejercen dicha proteína o su CTD. En este estudio se identificaron dos proteínas implicadas en la translocación al núcleo de diferentes moléculas mediante el reconocimiento de señales NLS: RAN-GTP y β -importina (KPNB1)³⁵³. A mayores, utilizando el programa *cNLS Mapper* se predijo dos potenciales secuencias NLSs en el CTD de la Cx43 (**Figura 23B**), aunque no se descartan otras posibles vías de translocación al núcleo, puesto que este programa no puede predecir NLSs independientes de α -importina. De todas formas los resultados sugieren un potencial mecanismo de translocación al núcleo que incluye el sistema RAN-GTP.

En este estudio también se han identificado varias histonas, factores de transcripción y proteínas nucleares (**Figura 23A**), tales como nucleolina y PTRF. Esta identificación sugiere que la Cx43 o su CTD podrían estar afectando a la organización de la cromatina y a la actividad nucleolar. Sin embargo, la identificación de proteínas implicadas en el proceso de transporte de ARN o proteínas (**Figura 23A**) podrían estar indicando la implicación de la Cx43 en el procesamiento, exportación y traducción del ARN.

Otras proteínas que interaccionan con la Cx43 tales como el colágeno tipo VI, colágeno tipo XII, integrina α -V, integrina β -I, vinculina, talina y anexinas indica su actividad en procesos de adhesión, motilidad o comunicación célula - matriz. Los colágenos tipo VI y tipo XII, la integrina α -V y la integrina β -I se identificaron únicamente en pacientes con OA.

Se ha descrito que entre los residuos 136 – 158 del *loop* citoplasmático de la Cx43 se encuentran motivos de unión a calmodulina²³⁴ y en este estudio se han identificado proteínas que interaccionan con la Cx43 en condrocitos de pacientes con OA conocidas por su interacción con la calmodulina tales como caldesmón-1, varios tipos de miosina y varias proteínas de citoesqueleto. Esto sugiere que la Cx43, particularmente en pacientes con OA, podría estar desempeñando un papel disfuncional en la adhesión y migración celular mediados por la caldesmón-1 y/o miosina^{354, 267}.

La Cx43 ha sido descrita como una proteína capaz de formar un complejo proteico con múltiples funciones y localizaciones celulares. La identificación de múltiples proteínas que interaccionan con la Cx43 pone en evidencia la importancia de la Cx43 en la regulación del metabolismo celular, la transcripción y procesos de traducción, organización del citoesqueleto, adhesión y motilidad, interacciones célula - célula e interacciones célula – matriz. Cambios en los niveles de la Cx43 se han asociado con el desarrollo de determinadas patologías como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, cáncer, procesos inflamatorios y OA entre otras^{355, 356, 357, 358, 36, 117, 290}. Se han descrito varias enfermedades que se deben a mutaciones en la secuencia de la Cx43 como es el caso del síndrome ODDD^{359, 360, 361, 57}. El estudio de las funciones de la Cx43 en diferentes procesos y mecanismos celulares es esencial para poder entender la fisiopatología de estas enfermedades y poder desarrollar terapias efectivas. Por último, destacar que la secuencia de la Cx43 está muy bien conservada a lo largo de la evolución especialmente desde primates a humanos, por consiguiente los resultados de este estudio podrán ser extrapolados a otros tipos celulares y patologías.

4. ESTUDIO DE LA FUNCION DEL DOMINIO C-TERMINAL DE LA CONEXINA 43 EN CONDROCITOS ARTICULARES

Hasta hace unos años, se creía que las Cxs participaban en la regulación de la proliferación celular exclusivamente a través de la formación de UCs permitiendo la difusión de potenciales inhibidores o activadores del ciclo celular^{362, 363, 364, 365, 105, 326}. Además se ha demostrado la potencial capacidad supresora de tumores que presentan algunas Cxs como es el caso de la Cx43^{193, 194}. Se ha visto que la expresión del CTD es tan efectiva como la Cx43 en la inhibición de la proliferación celular en el caso de ciertas líneas celulares, algunas de ellas tumorales¹⁹⁵. Debido a la importancia del CTD en la regulación de las actividades y funciones de la Cx43, y en especial en procesos de proliferación celular, se propuso un estudio utilizando un modelo animal que presenta una delección de los últimos 125 aminoácidos del CTD de la Cx43. Los resultados obtenidos indican que en condrocitos primarios y condrocitos en tejido la ausencia del CTD (Cx43K258stop) favorece la proliferación celular, tal y como se muestra en la **Figura 27B, 28A y 28B**.

Los ratones Cx43K258stop homocigotos nacen con la frecuencia esperada y los recién nacidos son viables, indicando que la delección del CTD de la Cx43 no afecta al desarrollo normal del embrión, aunque si afecta al tamaño corporal ya que estos ratones muestran un menor peso aunque sin cambios visibles en los niveles de grasa corporal (**Figura 26D**). Menos de un 3 % de los individuos homocigóticos sobrevive hasta la edad adulta. Esta letalidad homocigótica es causada por defectos en la permeabilidad de la barrera epidérmica esencial para la supervivencia fuera del útero²¹⁸.

La apertura y cierre, localización y número de placas de UCs de Cx43 están regulados por modificaciones posttraduccionales e interacciones proteicas que tienen lugar en su CTD^{366, 367, 368, 369, 82, 221}. Los ensayos de inmunofluorescencia demostraron que en condrocitos primarios que carecen de CTD, la Cx43 se localiza principalmente en el citoplasma y alrededor del núcleo, perdiendo su localización en la membrana plasmática (**Figura 27B**).

Con el fin de solventar la letalidad del genotipo homocigoto de Cx43K258stop los ratones se cruzaron con cepas Cx43cKO heterocigóticas Este modelo animal se empleó para el estudio del efecto del CTD de la Cx43 en ratones de al menos 4 meses de edad en cuanto al tamaño respecto a los ratones de fenotipo silvestre, siendo estos ratones, tanto hembras como machos, de menor tamaño sin mostrar efectos visibles en la grasa

corporal (**Figura 28C**). El resto de los experimentos fueron realizados con ratones recién nacidos para evitar variabilidad en los resultados obtenidos debidos a la edad del ratón.

Recientemente, se ha publicado una revisión en la que se muestran varios sitios de corte del CTD de la Cx43 por diferentes MMPs³⁷⁰. En el caso de la OA así como otras enfermedades degenerativas que afectan a la articulación, se ha detectado un incremento en la actividad de diferentes MMPs. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la escisión o pérdida del CTD de la Cx43 podría estar implicado en la activación de cascadas de señalización o activación de rutas catabólicas.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el CTD de la Cx43 es necesario para mantener el correcto fenotipo del condrocito ya que los condrocitos mutantes muestran pérdida de fenotipo al disminuir la expresión de COL2A (**Figura 27E**) y PGs (**Figura 28D**), aumentando la proliferación celular lo que se corresponde más con una situación patológica, como ocurriría en determinadas fases de la OA, donde se detectan incrementos en proliferación celular. La pérdida o disminución de la síntesis de los principales componentes que forman la MEC, tales como COL2A y PGs, es una característica común en el cartílago de pacientes que sufren OA.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Objetivo 1

1.1. Los condrocitos articulares poseen proyecciones citoplasmáticas capaces de atravesar la MEC y formar una red celular que permite el contacto físico entre condrocitos localizados en lagunas distantes. La comunicación célula – célula ocurre a través de UCs formadas por Cx43, mientras que la comunicación célula – matriz ocurre a través de hemicanales probablemente formados por Panxs.

1.2. La Cx43 y la Cx45 presentan altos niveles de expresión en el cartílago articular de pacientes con OA respecto a los donantes sanos. En el caso de la Cx43 este aumento de expresión probablemente esté asociado al aumento en la proliferación celular. En cartílagos OA, la Cx43 pierde su localización en la membrana celular en las zonas no dañadas del tejido.

1.3. La línea de condrocitos inmortalizados T/C-28a2 forman hemicanales y UCs funcionales. A pesar de ciertas limitaciones podría utilizarse como un buen modelo *in vitro* para el estudio de las propiedades de los hemicanales y UCs en condrocitos articulares.

Objetivo 2

2.1. Se han identificado más de 100 proteínas que interactúan con el CTD de la Cx43 en condrocitos aislados de cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA con diferentes grados de la enfermedad. La identificación de estas proteínas sugiere que la Cx43 está desempeñando diferentes funciones en cartílago de donantes sanos y en cartílago de pacientes con OA.

2.2. La delección del CTD de la Cx43 en condrocitos primarios reduce significativamente la comunicación célula – célula a través de UCs, junto con la pérdida de localización en la membrana plásmática.

2.3. La delección del CTD de la Cx43 en condrocitos articulares da lugar a cambios en el fenotipo del condrocito asociados a un incremento en la proliferación celular y alteraciones en la integridad de la MEC al reducir los niveles de expresión de COL2A y de PGs.

CONCLUSIONS

Objective 1

1.1. Articular chondrocytes have cytoplasmic projections able to cross the extracellular matrix and forming a cellular network that allows the physical contact between cells located in distant lacunes. Cell to cell communication occurs through gap junctions formed by Cx43. Cell to matrix communication occurs through hemichannels formed by pannexins.

1.2. Cx43 and Cx45 are overexpressed in articular cartilage from patients with OA. Changes in the levels and in the cellular localization of the Cx43 protein in osteoarthritic chondrocytes may be associated with an increase in cellular proliferation in the damaged zones and a loss of cellular communication in the non-damaged zones of the tissue.

1.3. T/C-28a2 immortalized cells forms functional hemichannels and gap junctions, providing an appropriate *in vitro* model for the study of the functionality of connexin channels under normal and pathological conditions.

Objective 2

2.1. We have identified more than 100 proteins that interact with the C-terminal domain of Cx43 in healthy donors and chondrocytes from patients with OA and with different grade of the disease. The identified Cx43-interactors suggested that Cx43 plays different roles in health and disease.

2.2. Deletion of the CTD of Cx43 in chondrocytes significantly reduces cell to cell communication through gap junctions channels together with a loss of staining at the cellular membrane.

2.3. Deletion of the CTD lead to changes in the phenotype of the chondrocyte which are associated with an increase in cellular proliferation and alterations in the ECM integrity by reducing the levels of COL2A and PGs.

Bibliografía

1. Quintero, M., Monfort, J. & Mitrovic, D. R. *Osteoartrosis: biología, fisiopatología, clínica y tratamiento*. (Editorial Médica Panamericana, 2009).
2. Sánchez González, D. J. & Trejo Bahena, N. I. *Biología celular y molecular*. (2006).
3. Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* **81**, 646–656 (2003).
4. Bonifacio Álvarez. *Artrosis. Todo lo que se necesita saber. LibrosEnRed 2005; pag 78-85*.
5. Jaime González González. *Biomécanica Articular. El Cuerpo Humano En Movimiento*. (Cultiva Libros S.L., 2014).
6. Rouvière, H., Delmas, A. & Delmas, V. *Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional. 1, 1.*. (Masson, 2006).
7. Kuettner, K. E. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin. Biochem.* **25**, 155–163 (1992).
8. Mow, V. C., Ratcliffe, A. & Poole, A. R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**, 67–97 (1992).
9. Pitsillides, A. A. & Beier, F. Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 654–663 (2011).
10. Lotz, M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **20**, 192–196 (2012).
11. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **54**, 465–480 (2005).
12. Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr. Course Lect.* **47**, 487–504 (1998).
13. Bhosale, A. M. & Richardson, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* **87**, 77–95 (2008).
14. Brittberg M (1996) Cartilage repair: on cartilaginous tissue engineering with the emphasis on chondrocyte transplantation. A doctoral thesis, p. 9.
15. Hunziker E (1992) Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC (eds) *Articular Cartilage Structure and Osteoarthritis*. New York, NY: Raven Press, 183–199.

16. Yuan, X. L. *et al.* Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **22**, 1077–1089 (2014).
17. Lozito, T. P. *et al.* Three-dimensional osteochondral microtissue to model pathogenesis of osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* **4 Suppl 1**, S6 (2013).
18. Findlay, D. M. & Atkins, G. J. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **12**, 127–134 (2014).
19. Sharma, A. R., Jagga, S., Lee, S.-S. & Nam, J.-S. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19805–19830 (2013).
20. Zhen, G. & Cao, X. Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 227–236 (2014).
21. Man, G. S. & Mologhianu, G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J. Med. Life* **7**, 37–41 (2014).
22. Li, G. *et al.* Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 223 (2013).
23. Xu, L., Hayashi, D., Roemer, F. W., Felson, D. T. & Guermazi, A. Magnetic resonance imaging of subchondral bone marrow lesions in association with osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **42**, 105–118 (2012).
24. Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* **47**, 477–486 (1998).
25. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 230–237 (2010).
26. Felson, D. T. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 203 (2009).
27. Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. & Rudolphi, K. A. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 331–344 (2005).
28. Heinegård, D. & Saxne, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 50–56 (2011).
29. Okubo, M. & Okada, Y. [Destruction of the articular cartilage in osteoarthritis]. *Clin. Calcium* **23**, 1705–1713 (2013).

30. Yong, V. W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 931–944 (2005).
31. Chow, A. K., Cena, J. & Schulz, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 189–205 (2007).
32. Cauwe, B. & Opdenakker, G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 351–423 (2010).
33. Nissinen, L. & Kähäri, V.-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2571–2580 (2014).
34. Rentero, C. *et al.* Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells. *Cell. Signal.* **18**, 1006–1016 (2006).
35. Bosco, D., Haefliger, J.-A. & Meda, P. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol. Rev.* **91**, 1393–1445 (2011).
36. Vinken, M. *et al.* Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell. Signal.* **18**, 592–600 (2006).
37. Liu, H., Radisky, D. C. & Bissell, M. J. Proliferation and polarity in breast cancer: untying the Gordian knot. *Cell Cycle Georget. Tex* **4**, 646–649 (2005).
38. Kibschull, M., Magin, T. M., Traub, O. & Winterhager, E. Cx31 and Cx43 double-deficient mice reveal independent functions in murine placental and skin development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **233**, 853–863 (2005).
39. Rackauskas, M., Neverauskas, V. & Skeberdis, V. A. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Med. Kaunas Lith.* **46**, 1–12 (2010).
40. Vinken, M. *et al.* Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 201–222 (2009).
41. Alexander, D. B. & Goldberg, G. S. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2045–2058 (2003).
42. Decrock, E. *et al.* Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death Differ.* **16**, 524–536 (2009).
43. Phelan, P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 225–245 (2005).
44. Panchin, Y. *et al.* A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol. CB* **10**, R473–474 (2000).

45. Dahl, G. & Locovei, S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life* **58**, 409–419 (2006).
46. Dahl, G. & Keane, R. W. Pannexin: from discovery to bedside in 11±4 years? *Brain Res.* **1487**, 150–159 (2012).
47. D'hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Bultynck, G. & Himpens, B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **31**, 953–974 (2009).
48. MacVicar, B. A. & Thompson, R. J. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci.* **33**, 93–102 (2010).
49. Söhl, G. & Willecke, K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* **10**, 173–180 (2003).
50. Goodenough, D. A., Goliger, J. A. & Paul, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 475–502 (1996).
51. Söhl, G. & Willecke, K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **62**, 228–232 (2004).
52. Beyer, E. C., Paul, D. L. & Goodenough, D. A. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* **105**, 2621–2629 (1987).
53. Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D. & Beyer, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* **83**, 1359–1400 (2003).
54. Nielsen, M. S. *et al.* Gap junctions. *Compr. Physiol.* **2**, 1981–2035 (2012).
55. Musil, L. S., Le, A. C., VanSlyke, J. K. & Roberts, L. M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J. Biol. Chem.* **275**, 25207–25215 (2000).
56. VanSlyke, J. K. & Musil, L. S. Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J. Cell Biol.* **157**, 381–394 (2002).
57. Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **394**, 527–543 (2006).
58. Segretain, D. & Falk, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim. Biophys. Acta* **1662**, 3–21 (2004).
59. Ghoshroy, S., Goodenough, D. A. & Sosinsky, G. E. Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J. Membr. Biol.* **146**, 15–28 (1995).

60. John, S. A. & Revel, J. P. Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1312–1318 (1991).
61. Mazet, F., Wittenberg, B. A. & Spray, D. C. Fate of intercellular junctions in isolated adult rat cardiac cells. *Circ. Res.* **56**, 195–204 (1985).
62. Dahl, G., Levine, E., Rabadan-Diehl, C. & Werner, R. Cell/cell channel formation involves disulfide exchange. *Eur. J. Biochem. FEBS* **197**, 141–144 (1991).
63. Dahl, G., Werner, R., Levine, E. & Rabadan-Diehl, C. Mutational analysis of gap junction formation. *Biophys. J.* **62**, 172–180; discussion 180–182 (1992).
64. Elfgang, C. *et al.* Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129**, 805–817 (1995).
65. White, T. W., Paul, D. L., Goodenough, D. A. & Bruzzone, R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell* **6**, 459–470 (1995).
66. White, T. W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D. L. & Goodenough, D. A. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* **125**, 879–892 (1994).
67. Locke, D., Bian, S., Li, H. & Harris, A. L. Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochem. J.* **424**, 385–398 (2009).
68. Retamal, M. A., Cortés, C. J., Reuss, L., Bennett, M. V. L. & Sáez, J. C. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4475–4480 (2006).
69. Shearer, D., Ens, W., Standing, K. & Valdimarsson, G. Posttranslational modifications in lens fiber connexins identified by off-line-HPLC MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 1553–1562 (2008).
70. Thévenin, A. F. *et al.* Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiol. Bethesda Md* **28**, 93–116 (2013).
71. Takeda, A., Hashimoto, E., Yamamura, H. & Shimazu, T. Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C. *FEBS Lett.* **210**, 169–172 (1987).
72. Shestopalov, V. I. & Panchin, Y. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 376–394 (2008).

73. Dbouk, H. A., Mroue, R. M., El-Sabban, M. E. & Talhouk, R. S. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun. Signal. CCS* **7**, 4 (2009).
74. Kelsell, D. P. *et al.* Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* **387**, 80–83 (1997).
75. Carrasquillo, M. M., Zlotogora, J., Barges, S. & Chakravarti, A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2163–2172 (1997).
76. Gerido, D. A. & White, T. W. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1662**, 159–170 (2004).
77. Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A. & Krol, A. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 856–863 (2004).
78. Richard, G. *et al.* Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1341–1348 (2002).
79. Jordan, K. *et al.* Trafficking, assembly, and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2033–2050 (1999).
80. Lauf, U. *et al.* Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10446–10451 (2002).
81. Martin, P. E. M. & Evans, W. H. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc. Res.* **62**, 378–387 (2004).
82. Giepmans, B. N. *et al.* Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol. CB* **11**, 1364–1368 (2001).
83. Angst, B. D. *et al.* Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ. Res.* **80**, 88–94 (1997).
84. Constantin, B., Cronier, L. & Raymond, G. Transient involvement of gap junctional communication before fusion of newborn rat myoblasts. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* **320**, 35–40 (1997).
85. Mok, B. W., Yeung, W. S. & Luk, J. M. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett.* **453**, 243–248 (1999).

86. Proulx, A., Merrifield, P. A. & Naus, C. C. Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression. *Dev. Genet.* **20**, 133–144 (1997).
87. Rosendaal, M., Green, C. R., Rahman, A. & Morgan, D. Up-regulation of the connexin43+ gap junction network in haemopoietic tissue before the growth of stem cells. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 1)**, 29–37 (1994).
88. Robertson, J. D. THE OCCURRENCE OF A SUBUNIT PATTERN IN THE UNIT MEMBRANES OF CLUB ENDINGS IN MAUTHNER CELL SYNAPSES IN GOLDFISH BRAINS. *J. Cell Biol.* **19**, 201–221 (1963).
89. Revel, J. P. & Karnovsky, M. J. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* **33**, C7–C12 (1967).
90. Beardslee, M. A., Laing, J. G., Beyer, E. C. & Saffitz, J. E. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* **83**, 629–635 (1998).
91. Darrow, B. J., Laing, J. G., Lampe, P. D., Saffitz, J. E. & Beyer, E. C. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **76**, 381–387 (1995).
92. Fallon, R. F. & Goodenough, D. A. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J. Cell Biol.* **90**, 521–526 (1981).
93. Laird, D. W., Puranam, K. L. & Revel, J. P. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* **273(Pt 1)**, 67–72 (1991).
94. Cottrell, G. T. & Burt, J. M. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1559–1567 (2001).
95. Gaietta, G. *et al.* Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503–507 (2002).
96. Bjorkman, N. A study of the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary. *Acta Anat. (Basel)* **51**, 125–147 (1962).
97. Nickel, B. M., DeFranco, B. H., Gay, V. L. & Murray, S. A. Clathrin and Cx43 gap junction plaque endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 679–682 (2008).
98. Falk, M. M., Kells, R. M. & Berthoud, V. M. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett.* **588**, 1221–1229 (2014).
99. Musil LS. *Biogenesis and Degradation of Gap Junctions*. In: Harris AL, Locke D, editors. *Connexins. A Guide*. Humana Press; New York: 2009. pp. 225–240.

100. Kjenseth, A., Fykerud, T., Rivedal, E. & Leithe, E. Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system. *Cell. Signal.* **22**, 1267–1273 (2010).
101. Pfeifer, U. Autophagic sequestration of internalized gap junctions in rat liver. *Eur. J. Cell Biol.* **21**, 244–246 (1980).
102. Eiberger, J. *et al.* Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun. Adhes.* **8**, 163–165 (2001).
103. Fishman, G. I., Moreno, A. P., Spray, D. C. & Levinwand, L. A. Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3525–3529 (1991).
104. Jiang, J. X. & Gu, S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 208–214 (2005).
105. Moorby, C. & Patel, M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp. Cell Res.* **271**, 238–248 (2001).
106. Vinken, M. *et al.* Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2002–2008 (2012).
107. Kameritsch, P., Pogoda, K. & Pohl, U. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1993–2001 (2012).
108. Vinken, M. *et al.* Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochim. Biophys. Acta* **1815**, 13–25 (2011).
109. Loewenstein, W. R. & Kanno, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* **209**, 1248–1249 (1966).
110. Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J.-L. & Zaidan-Dagli, M.-L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* **1719**, 125–145 (2005).
111. Naus, C. C. G. Gap junctions and tumour progression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 136–141 (2002).
112. Bargiotas, P., Monyer, H. & Schwaninger, M. Hemichannels in cerebral ischemia. *Curr. Mol. Med.* **9**, 186–194 (2009).
113. Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F. & Sáez, J. C. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* **26**, 610–617 (2003).

114. Pfahnl, A. & Dahl, G. Gating of cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **437**, 345–353 (1999).
115. Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 5374–5388 (1998).
116. Sáez, J. C., Connor, J. A., Spray, D. C. & Bennett, M. V. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2708–2712 (1989).
117. Mayan, M. D. *et al.* Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am. J. Pathol.* **182**, 1337–1346 (2013).
118. White, T. W. Nonredundant gap junction functions. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* **18**, 95–99 (2003).
119. Beblo, D. A. & Veenstra, R. D. Monovalent cation permeation through the connexin40 gap junction channel. Cs, Rb, K, Na, Li, TEA, TMA, TBA, and effects of anions Br, Cl, F, acetate, aspartate, glutamate, and NO₃. *J. Gen. Physiol.* **109**, 509–522 (1997).
120. Veenstra, R. D. *et al.* Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circ. Res.* **77**, 1156–1165 (1995).
121. Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beyer, E. C. & Brink, P. R. Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45. *Circ. Res.* **75**, 483–490 (1994).
122. Wang, H. Z. & Veenstra, R. D. Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J. Gen. Physiol.* **109**, 491–507 (1997).
123. Straub, A. C. *et al.* Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 399–407 (2011).
124. Harris, A. L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 120–143 (2007).
125. Harris, A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q. Rev. Biophys.* **34**, 325–472 (2001).
126. Goldberg, G. S., Lampe, P. D. & Nicholson, B. J. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat. Cell Biol.* **1**, 457–459 (1999).

127. Simon, A. M., Goodenough, D. A. & Paul, D. L. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol. CB* **8**, 295–298 (1998).
128. van Kempen, M. J., Fromaget, C., Gros, D., Moorman, A. F. & Lamers, W. H. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ. Res.* **68**, 1638–1651 (1991).
129. Gourdie, R. G. *et al.* The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J. Cell Sci.* **105 (Pt 4)**, 985–991 (1993).
130. Lin, J. H. *et al.* Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat. Neurosci.* **1**, 494–500 (1998).
131. Vozzi, C. *et al.* Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J. Cell Biol.* **131**, 1561–1572 (1995).
132. Chen, S. C., Pelletier, D. B., Ao, P. & Boynton, A. L. Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 681–690 (1995).
133. Goldberg, G. S., Moreno, A. P. & Lampe, P. D. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* **277**, 36725–36730 (2002).
134. Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Krämer, K. & Willecke, K. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 8)**, 1365–1372 (2000).
135. Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. & De Flora A, null. Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 10–12 (2001).
136. Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G. & Charles, A. C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* **277**, 10482–10488 (2002).
137. Ye, Z.-C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S. & Ransom, B. R. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 3588–3596 (2003).
138. Cherian, P. P. *et al.* Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3100–3106 (2005).

139. Rana, S. & Dringen, R. Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* **415**, 45–48 (2007).
140. Rhett, J. M., Jourdan, J. & Gourdie, R. G. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1516–1528 (2011).
141. Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F. & Bennett, M. V. L. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 215–224 (2005).
142. Evans, W. H., De Vuyst, E. & Leybaert, L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem. J.* **397**, 1–14 (2006).
143. Ramachandran, S., Xie, L.-H., John, S. A., Subramaniam, S. & Lal, R. A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS One* **2**, e712 (2007).
144. Dobrowolski, R. & Willecke, K. Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 283–295 (2009).
145. Pfenniger, A., Wohlwend, A. & Kwak, B. R. Mutations in connexin genes and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**, 103–116 (2011).
146. Kelly, J. J., Simek, J. & Laird, D. W. Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. *Cell Tissue Res.* **360**, 701–721 (2015).
147. Beyer, E. C. & Berthoud, V. M. Gap junction synthesis and degradation as therapeutic targets. *Curr. Drug Targets* **3**, 409–416 (2002).
148. Scherer, S. S. & Kleopa, K. A. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* **17 Suppl 3**, 9–13 (2012).
149. Stancanelli, C. *et al.* Unusual features of central nervous system involvement in CMTX associated with a novel mutation of GJB1 gene. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* **17**, 407–411 (2012).
150. Bicego, M. *et al.* Selective defects in channel permeability associated with Cx32 mutations causing X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol. Dis.* **21**, 607–617 (2006).
151. Uhlenberg, B. *et al.* Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 251–260 (2004).
152. Orthmann-Murphy, J. L., Enriquez, A. D., Abrams, C. K. & Scherer, S. S. Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **34**, 629–641 (2007).

153. Kim, M. S., Gloor, G. B. & Bai, D. The distribution and functional properties of Pelizaeus-Merzbacher-like disease-linked Cx47 mutations on Cx47/Cx47 homotypic and Cx47/Cx43 heterotypic gap junctions. *Biochem. J.* **452**, 249–258 (2013).
154. Tress, O. *et al.* Pathologic and phenotypic alterations in a mouse expressing a connexin47 missense mutation that causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease in humans. *PLoS Genet.* **7**, e1002146 (2011).
155. Sun, Y. *et al.* An atrial-fibrillation-linked connexin40 mutant is retained in the endoplasmic reticulum and impairs the function of atrial gap-junction channels. *Dis. Model. Mech.* **7**, 561–569 (2014).
156. Bennett, T. M., Mackay, D. S., Knopf, H. L. S. & Shiels, A. A novel missense mutation in the gene for gap-junction protein alpha3 (GJA3) associated with autosomal dominant 'nuclear punctate' cataracts linked to chromosome 13q. *Mol. Vis.* **10**, 376–382 (2004).
157. Burdon, K. P. *et al.* A novel mutation in the Connexin 46 gene causes autosomal dominant congenital cataract with incomplete penetrance. *J. Med. Genet.* **41**, e106 (2004).
158. Devi, R. R., Reena, C. & Vijayalakshmi, P. Novel mutations in GJA3 associated with autosomal dominant congenital cataract in the Indian population. *Mol. Vis.* **11**, 846–852 (2005).
159. Jiang, H. *et al.* A novel mutation in GJA3 (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. *Mol. Vis.* **9**, 579–583 (2003).
160. Li, Y., Wang, J., Dong, B. & Man, H. A novel connexin46 (GJA3) mutation in autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. *Mol. Vis.* **10**, 668–671 (2004).
161. Mackay, D. *et al.* Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1357–1364 (1999).
162. Rees, M. I. *et al.* Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11 (CZP3) and a novel mutation in connexin 46 (GJA3). *Hum. Genet.* **106**, 206–209 (2000).
163. Berry, V. *et al.* Connexin 50 mutation in a family with congenital 'zonular nuclear' pulverulent cataract of Pakistani origin. *Hum. Genet.* **105**, 168–170 (1999).
164. Polyakov, A. V., Shagina, I. A., Khlebnikova, O. V. & Evgrafov, O. V. Mutation in the connexin 50 gene (GJA8) in a Russian family with zonular pulverulent cataract. *Clin. Genet.* **60**, 476–478 (2001).
165. Shiels, A. *et al.* A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant 'zonular pulverulent' cataract, on chromosome 1q. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 526–532 (1998).

166. Willoughby, C. E. *et al.* A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract. *J. Med. Genet.* **40**, e124 (2003).
167. Hausmann, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* **41**, 369–378 (2003).
168. Norenberg, M. D., Smith, J. & Marcillo, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J. Neurotrauma* **21**, 429–440 (2004).
169. Cronin, M., Anderson, P. N., Cook, J. E., Green, C. R. & Becker, D. L. Blocking connexin43 expression reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 152–160 (2008).
170. O'Carroll, S. J., Gorrie, C. A., Velamoor, S., Green, C. R. & Nicholson, L. F. B. Connexin43 mimetic peptide is neuroprotective and improves function following spinal cord injury. *Neurosci. Res.* **75**, 256–267 (2013).
171. Mei, X., Ezan, P., Giaume, C. & Koulakoff, A. Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience* **171**, 92–105 (2010).
172. Orellana, J. A. *et al.* Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 4962–4977 (2011).
173. Schalper, K. A., Orellana, J. A., Berthoud, V. M. & Sáez, J. C. Dysfunctions of the diffusional membrane pathways mediated by hemichannels in inherited and acquired human diseases. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**, 486–505 (2009).
174. Guttman, J. A. *et al.* Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease. *Gut* **59**, 218–226 (2010).
175. Retamal, M. A. *et al.* Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 13781–13792 (2007).
176. Tran Van Nhieu, G. *et al.* Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **5**, 720–726 (2003).
177. Velasquez Almonacid, L. A. *et al.* Role of connexin-43 hemichannels in the pathogenesis of *Yersinia enterocolitica*. *Vet. J. Lond. Engl.* **1997** **182**, 452–457 (2009).
178. Yang, C.-H., Schrepfer, T. & Schacht, J. Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 276 (2015).

179. Uchida, Y., Matsuda, K., Sasahara, K., Kawabata, H. & Nishioka, M. Immunohistochemistry of gap junctions in normal and diseased gastric mucosa of humans. *Gastroenterology* **109**, 1492–1496 (1995).
180. Kanczuga-Koda, L., Sulkowski, S., Koda, M. & Sulkowska, M. Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. *Oncology* **68**, 217–222 (2005).
181. Torres, L. N. *et al.* Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. *Vet. Pathol.* **42**, 633–641 (2005).
182. Omori, Y. *et al.* Pathological significance of intracytoplasmic connexin proteins: implication in tumor progression. *J. Membr. Biol.* **218**, 73–77 (2007).
183. Jee, H., Nam, K. T., Kwon, H.-J., Han, S.-U. & Kim, D.-Y. Altered expression and localization of connexin32 in human and murine gastric carcinogenesis. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 1323–1332 (2011).
184. Edwards, G. O., Jondhale, S., Chen, T. & Chipman, J. K. A quantitative inverse relationship between connexin32 expression and cell proliferation in a rat hepatoma cell line. *Toxicology* **253**, 46–52 (2008).
185. Avanzo, J. L. *et al.* Altered expression of connexins in urethane-induced mouse lung adenomas. *Life Sci.* **79**, 2202–2208 (2006).
186. Udaka, N., Miyagi, Y. & Ito, T. Connexin expression in mouse lung tumor. *Cancer Lett.* **246**, 224–229 (2007).
187. Ezumi, K. *et al.* Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 677–684 (2008).
188. Ozawa, H. *et al.* Decreased expression of connexin-30 and aberrant expression of connexin-26 in human head and neck cancer. *Anticancer Res.* **27**, 2189–2195 (2007).
189. Chen, Y. *et al.* Downregulation of connexin 26 in human lung cancer is related to promoter methylation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **113**, 14–21 (2005).
190. Jamieson, S., Going, J. J., D'Arcy, R. & George, W. D. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J. Pathol.* **184**, 37–43 (1998).
191. Grossman, H. B., Liebert, M., Lee, I. W. & Lee, S. W. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. *Cancer Res.* **54**, 3062–3065 (1994).
192. Gee, J., Tanaka, M. & Grossman, H. B. Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer. *J. Urol.* **169**, 1135–1137 (2003).

193. Yamasaki, H. & Naus, C. C. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* **17**, 1199–1213 (1996).
194. Trosko, J. E. & Ruch, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **3**, d208–236 (1998).
195. Zhang, Y.-W., Kaneda, M. & Morita, I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J. Biol. Chem.* **278**, 44852–44856 (2003).
196. Grek, C. L., Rhett, J. M. & Ghatnekar, G. S. Cardiac to cancer: connecting connexins to clinical opportunity. *FEBS Lett.* **588**, 1349–1364 (2014).
197. Gabriel, H. D. *et al.* Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* **140**, 1453–1461 (1998).
198. Krüger, O. *et al.* Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 4179–4193 (2000).
199. Reaume, A. G. *et al.* Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* **267**, 1831–1834 (1995).
200. Nelles, E. *et al.* Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9565–9570 (1996).
201. Temme, A. *et al.* High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol. CB* **7**, 713–716 (1997).
202. Willecke, K., Temme, A., Teubner, B. & Ott, T. Characterization of targeted connexin32-deficient mice: a model for the human Charcot-Marie-Tooth (X-type) inherited disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **883**, 302–309 (1999).
203. Teubner, B. *et al.* Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 13–21 (2003).
204. Singh, J., Deng, Z., Narale, G. & Chuaqui, C. Structural interaction fingerprints: a new approach to organizing, mining, analyzing, and designing protein-small molecule complexes. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 5–12 (2006).
205. Donahue, H. J. *et al.* Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **10**, 1359–1364 (1995).
206. Knight, M. M., McGlashan, S. R., Garcia, M., Jensen, C. G. & Poole, C. A. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors - a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J. Anat.* **214**, 275–283 (2009).

207. Schlegel, W. *et al.* Dedifferentiation of human articular chondrocytes is associated with alterations in expression patterns of GDF-5 and its receptors. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3398–3404 (2009).
208. Schiavi, A., Hudder, A. & Werner, R. Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site. *FEBS Lett.* **464**, 118–122 (1999).
209. Jang, S. K. *et al.* A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **62**, 2636–2643 (1988).
210. Pelletier, J. & Sonenberg, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325 (1988).
211. Kim, J. G., Armstrong, R. C., Berndt, J. A., Kim, N. W. & Hudson, L. D. A secreted DNA-binding protein that is translated through an internal ribosome entry site (IRES) and distributed in a discrete pattern in the central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **12**, 119–140 (1998).
212. Zirbes, T. K. *et al.* Apoptosis and expression of bcl-2 protein are inverse factors influencing tumour cell turnover in primary carcinoid tumours of the lung. *Histopathology* **33**, 123–128 (1998).
213. Morris, J. A., Dorner, A. J., Edwards, C. A., Hendershot, L. M. & Kaufman, R. J. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 4327–4334 (1997).
214. Sachs, A. B. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* **101**, 243–245 (2000).
215. Park, D. J., Freitas, T. A., Wallick, C. J., Guyette, C. V. & Warn-Cramer, B. J. Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43: A new 14-3-3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**, 2344–2355 (2006).
216. Park, D. J. *et al.* Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a 'mode-1' binding site for 14-3-3. *Cell Commun. Adhes.* **14**, 211–226 (2007).
217. Solan, J. L. & Lampe, P. D. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 154–163 (2005).
218. Cartlidge, P. The epidermal barrier. *Semin. Neonatol.* **SN 5**, 273–280 (2000).
219. Chidgey, M. *et al.* Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J. Cell Biol.* **155**, 821–832 (2001).

220. Maass, K., Shibayama, J., Chase, S. E., Willecke, K. & Delmar, M. C-terminal truncation of connexin43 changes number, size, and localization of cardiac gap junction plaques. *Circ. Res.* **101**, 1283–1291 (2007).
221. Maass, K. *et al.* Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4597–4608 (2004).
222. Stone, A. Connexin knockout provides a link to heart defects. *Science* **267**, 1773 (1995).
223. Lampe, P. D., Kurata, W. E., Warn-Cramer, B. J. & Lau, A. F. Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 6)**, 833–841 (1998).
224. Kanemitsu, M. Y., Jiang, W. & Eckhart, W. Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 13–21 (1998).
225. Postma, F. R. *et al.* Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J. Cell Biol.* **140**, 1199–1209 (1998).
226. Revilla, A., Bennett, M. V. & Barrio, L. C. Molecular determinants of membrane potential dependence in vertebrate gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14760–14765 (2000).
227. García-Dorado, D., Rodríguez-Sinovas, A. & Ruiz-Meana, M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **61**, 386–401 (2004).
228. Axelsen, L. N. *et al.* Increasing gap junctional coupling: a tool for dissecting the role of gap junctions. *J. Membr. Biol.* **216**, 23–35 (2007).
229. Ek-Vitorín, J. F. *et al.* PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys. J.* **71**, 1273–1284 (1996).
230. Jiang, J. X. & Goodenough, D. A. Phosphorylation of lens-fiber connexins in lens organ cultures. *Eur. J. Biochem. FEBS* **255**, 37–44 (1998).
231. Moreno, A. P. *et al.* Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ. Res.* **90**, 450–457 (2002).
232. Morley, G. E., Taffet, S. M. & Delmar, M. Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* **70**, 1294–1302 (1996).
233. Peracchia, C. Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1662**, 61–80 (2004).

234. Zhou, Y. *et al.* Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *J. Biol. Chem.* **282**, 35005–35017 (2007).
235. Boengler, K. *et al.* Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **67**, 234–244 (2005).
236. Schwanke, U. *et al.* No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1740–1742 (2002).
237. Garcia-Dorado, D. *et al.* Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**, 3579–3586 (1997).
238. Rodriguez-Sinovas, A., García-Dorado, D., Ruiz-Meana, M. & Soler-Soler, J. Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J. Physiol.* **559**, 245–257 (2004).
239. Rodriguez-Sinovas, A. *et al.* Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ. Res.* **99**, 93–101 (2006).
240. Ackert, C. L., Gittens, J. E., O'Brien, M. J., Eppig, J. J. & Kidder, G. M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* **233**, 258–270 (2001).
241. Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D. & Segretain, D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**, 1607–1620 (2010).
242. Mathias, R. T., Kistler, J. & Donaldson, P. The lens circulation. *J. Membr. Biol.* **216**, 1–16 (2007).
243. Goliger, J. A. & Paul, D. L. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1491–1501 (1995).
244. Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Tamber, K. & Becker, D. Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol. Int.* **27**, 525–541 (2003).
245. Qiu, C. *et al.* Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr. Biol. CB* **13**, 1697–1703 (2003).
246. Kretz, M. *et al.* Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J. Cell Sci.* **116**, 3443–3452 (2003).

247. Brandner, J. M., Houdek, P., Hüsing, B., Kaiser, C. & Moll, I. Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1310–1320 (2004).
248. Wang, C. M., Lincoln, J., Cook, J. E. & Becker, D. L. Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* **56**, 2809–2817 (2007).
249. Plotkin, L. I. & Bellido, T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone* **52**, 157–166 (2013).
250. Behrens, J., Kameritsch, P., Wallner, S., Pohl, U. & Pogoda, K. The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 828–838 (2010).
251. Dang, X., Jeyaraman, M. & Kardami, E. Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Mol. Cell. Biochem.* **289**, 201–207 (2006).
252. Crespin, S., Bechberger, J., Mesnil, M., Naus, C. C. & Sin, W.-C. The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J. Cell. Biochem.* **110**, 589–597 (2010).
253. Dang, X., Doble, B. W. & Kardami, E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* **242**, 35–38 (2003).
254. Sin, W.-C., Crespin, S. & Mesnil, M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2058–2067 (2012).
255. Joshi-Mukherjee, R. *et al.* Evidence for the presence of a free C-terminal fragment of cx43 in cultured cells. *Cell Commun. Adhes.* **14**, 75–84 (2007).
256. Salat-Canela, C., Sesé, M., Peula, C., Ramón y Cajal, S. & Aasen, T. Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 31 (2014).
257. Smyth, J. W. & Shaw, R. M. Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep.* **5**, 611–618 (2013).
258. Pascual Garrido, C. *et al.* Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **17**, 1244–1251 (2009).
259. Stokes, D. G. *et al.* Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum.* **46**, 404–419 (2002).

260. Goldring, M. B. *et al.* Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* **94**, 2307–2316 (1994).
261. Takigawa, M. *et al.* Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. *Cancer Res.* **49**, 3996–4002 (1989).
262. Price, M. T. & Fibiger, H. C. Discriminated escape learning and response to electric shock after 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-neostriatal dopaminergic projection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **3**, 285–290 (1975).
263. Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* **66**, 198–200 (1975).
264. *Molecular biology of the gene.* (Pearson/Benjamin Cummings [u.a.], 2004).
265. Valiunas, V., Gemel, J., Brink, P. R. & Beyer, E. C. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H1675–1689 (2001).
266. Valiunas, V., Beyer, E. C. & Brink, P. R. Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ. Res.* **91**, 104–111 (2002).
267. Mayan, M. D. *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 275–284 (2015).
268. Valiunas, V. *et al.* Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J. Physiol.* **568**, 459–468 (2005).
269. Kanaporis, G. *et al.* Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J. Gen. Physiol.* **131**, 293–305 (2008).
270. Raptis, L. *et al.* Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **423**, 173–189 (2008).
271. Abbaci, M., Barberi-Heyob, M., Blondel, W., Guillemin, F. & Didelon, J. Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *BioTechniques* **45**, 33–62 (2008).
272. Nelson, J. D., Denisenko, O. & Bomsztyk, K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat. Protoc.* **1**, 179–185 (2006).
273. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860 (2006).
274. Pappin, D. J., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol. CB* **3**, 327–332 (1993).

275. James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. & Gonnet, G. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 58–64 (1993).
276. Yates, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R. & Hunkapiller, T. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal. Biochem.* **214**, 397–408 (1993).
277. Sanger, D. J. & Zivkovic, B. Discriminative stimulus properties of chlordiazepoxide and zolpidem. Agonist and antagonist effects of CGS 9896 and ZK 91296. *Neuropharmacology* **26**, 499–505 (1987).
278. Goldring, M. B., Sandell, L. J., Stephenson, M. L. & Krane, S. M. Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 9049–9055 (1986).
279. Goldring, M. B., Birkhead, J., Sandell, L. J., Kimura, T. & Krane, S. M. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* **82**, 2026–2037 (1988).
280. Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B. & Aigner, T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **18 Suppl 3**, S113–116 (2010).
281. Zhang, G., Gibbs, E., Kelman, Z., O'Donnell, M. & Hurwitz, J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1869–1874 (1999).
282. Finger, F. *et al.* Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/12. *Arthritis Rheum.* **48**, 3395–3403 (2003).
283. Loeser, R. F., Sadiev, S., Tan, L. & Goldring, M. B. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **8**, 96–105 (2000).
284. Kokenyesi, R., Tan, L., Robbins, J. R. & Goldring, M. B. Proteoglycan production by immortalized human chondrocyte cell lines cultured under conditions that promote expression of the differentiated phenotype. *Arch. Biochem. Biophys.* **383**, 79–90 (2000).
285. el-Fouly, M. H., Trosko, J. E. & Chang, C. C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.* **168**, 422–430 (1987).
286. Geletu, M., Trotman-Grant, A. & Raptis, L. Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors. *Anticancer Res.* **32**, 4245–4250 (2012).

287. Sosinsky, G. E. & Nicholson, B. J. Structural organization of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 99–125 (2005).
288. Duffy, H. S., Delmar, M. & Spray, D. C. Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J. Physiol. Paris* **96**, 243–249 (2002).
289. Wayakanon, P., Bhattacharjee, R., Nakahama, K. & Morita, I. The role of the Cx43 C-terminus in GJ plaque formation and internalization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 456–461 (2012).
290. Zhou, J. Z. & Jiang, J. X. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update. *FEBS Lett.* **588**, 1186–1192 (2014).
291. Ruiz-Romero, C. *et al.* Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* **8**, 495–507 (2008).
292. Lambrecht, S., Verbruggen, G., Verdonk, P. C. M., Elewaut, D. & Deforce, D. Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **16**, 163–173 (2008).
293. Van Wyk, J. J. *et al.* The use of adrenalectomy as a treatment for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3180–3190 (1996).
294. Ruiz-Romero, C. & Blanco, F. J. The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. *Curr. Drug Targets* **10**, 543–556 (2009).
295. Lambrecht, S. *et al.* Proteome characterization of human articular chondrocytes leads to novel insights in the function of small heat-shock proteins in chondrocyte homeostasis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **18**, 440–446 (2010).
296. Hermansson, M. *et al.* Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 43514–43521 (2004).
297. Wu, J. *et al.* Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 3675–3684 (2007).
298. Martins-Marques, T., Anjo, S. I., Pereira, P., Manadas, B. & Girão, H. Interacting Network of the Gap Junction (GJ) Protein Connexin43 (Cx43) is Modulated by Ischemia and Reperfusion in the Heart. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 3040–3055 (2015).
299. Giepmans, B. N. & Moolenaar, W. H. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol. CB* **8**, 931–934 (1998).
300. Toyofuku, T. *et al.* Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 12725–12731 (1998).

301. Singh, D., Solan, J. L., Taffet, S. M., Javier, R. & Lampe, P. D. Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J. Biol. Chem.* **280**, 30416–30421 (2005).
302. Wu, C. C. & Yates, J. R. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* **21**, 262–267 (2003).
303. Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E. & Yates, J. R. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.* **21**, 532–538 (2003).
304. Gago-Fuentes, R. *et al.* Proteomic Analysis of Connexin 43 Reveals Novel Interactors Related to Osteoarthritis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 1831–1845 (2015).
305. Holloway, I. *et al.* Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **12**, 17–24 (2004).
306. Bush, P. G. & Hall, A. C. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **11**, 242–251 (2003).
307. González, S., Fragoso-Soriano, R. J. & Kouri, J. B. Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage--a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 1072–1078 (2007).
308. Chi, S. S., Rattner, J. B. & Matyas, J. R. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J. Anat.* **205**, 363–370 (2004).
309. Schwab, W., Hofer, A. & Kasper, M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem. J.* **30**, 413–419 (1998).
310. D'Andrea, P. & Vittur, F. Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett.* **400**, 58–64 (1997).
311. Jones, S. J. *et al.* The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat. Embryol. (Berl.)* **187**, 343–352 (1993).
312. Stains, J. P. & Civitelli, R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1719**, 69–81 (2005).
313. Dealy, C. N., Beyer, E. C. & Kosher, R. A. Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **199**, 156–167 (1994).

314. Nicholson, B. J. *et al.* The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1* **33**, 369–378 (2000).
315. Cao, F. *et al.* A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 1)**, 31–43 (1998).
316. Dudek, K. A., Lafont, J. E., Martinez-Sanchez, A. & Murphy, C. L. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 24381–24387 (2010).
317. Mathias, R. T., Rae, J. L. & Baldo, G. J. Physiological properties of the normal lens. *Physiol. Rev.* **77**, 21–50 (1997).
318. Mathias, R. T., White, T. W. & Gong, X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol. Rev.* **90**, 179–206 (2010).
319. D'Andrea, P. *et al.* Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheology* **37**, 75–83 (2000).
320. Ayad, W. A., Locke, D., Koreen, I. V. & Harris, A. L. Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J. Biol. Chem.* **281**, 16727–16739 (2006).
321. Kolomytkin, O. V. *et al.* IL-1 β -induced production of metalloproteinases by synovial cells depends on gap junction conductance. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C1254–1260 (2002).
322. Chen, W.-X. *et al.* [Research on application of determination of MMP-13 in osteoarthritis]. *Zhongguo Gu Shang China J. Orthop. Traumatol.* **27**, 617–620 (2014).
323. Pfander, D., Körtje, D., Weseloh, G. & Swoboda, B. [Cell proliferation in human arthrotic joint cartilage]. *Z. Für Orthop. Ihre Grenzgeb.* **139**, 375–381 (2001).
324. Gramsch, B. *et al.* Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp. Cell Res.* **264**, 397–407 (2001).
325. Herrero-González, S. *et al.* Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* **29**, 5712–5723 (2010).
326. Zhang, Y. W., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K. W. & Murota, S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* **20**, 4138–4149 (2001).

327. Giepmans, B. N. G. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc. Res.* **62**, 233–245 (2004).
328. Arulanandam, R., Geletu, M. & Raptis, L. The simian virus 40 large tumor antigen activates cSrc and requires cSrc for full neoplastic transformation. *Anticancer Res.* **30**, 47–53 (2010).
329. Yang, B. *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* **13**, 486–491 (2007).
330. Gago-Fuentes, R. *et al.* Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **22**, 586–590 (2014).
331. Bruce, A. F., Rothery, S., Dupont, E. & Severs, N. J. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc. Res.* **77**, 757–765 (2008).
332. Butkevich, E. *et al.* Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* **14**, 650–658 (2004).
333. Hervé, J.-C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D., Giepmans, B. N. G. & Bourmeyster, N. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1844–1865 (2012).
334. Hervé, J.-C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D. & Duffy, H. S. Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 29–65 (2007).
335. Olk, S., Zoidl, G. & Dermietzel, R. Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 1000–1016 (2009).
336. Giepmans, B. N. G. Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv. Cardiol.* **42**, 41–56 (2006).
337. Kang, E. Y. *et al.* Identification of binding partners for the cytoplasmic loop of connexin43: a novel interaction with β -tubulin. *Cell Commun. Adhes.* **15**, 397–406 (2009).
338. Singh, D. & Lampe, P. D. Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun. Adhes.* **10**, 215–220 (2003).
339. Hesketh, G. G., Van Eyk, J. E. & Tomaselli, G. F. Mechanisms of gap junction traffic in health and disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**, 263–272 (2009).
340. Hatakeyama, T. *et al.* Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Sci. Rep.* **3**, 2719 (2013).

341. Ruiz-Romero, C. *et al.* Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 172–189 (2009).
342. Rollín, R. *et al.* Differential Proteome of Articular Chondrocytes From Patients with Osteoarthritis. *J. Proteomics Bioinform.* **01**, 267–280 (2008).
343. Giaume, C., Tabernero, A. & Medina, J. M. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* **21**, 114–123 (1997).
344. Inoguchi, T., Ueda, F., Umeda, F., Yamashita, T. & Nawata, H. Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 492–497 (1995).
345. Kuroki, T., Inoguchi, T., Umeda, F., Ueda, F. & Nawata, H. High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes* **47**, 931–936 (1998).
346. Hills, C. E. *et al.* Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**, F1045–1051 (2006).
347. Li, H. *et al.* Paradoxical overexpression and translocation of connexin43 in homocysteine-treated endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H2124–2133 (2002).
348. Halestrap, A. P. Mitochondria and preconditioning: a connexin connection? *Circ. Res.* **99**, 10–12 (2006).
349. Miro-Casas, E. *et al.* Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc. Res.* **83**, 747–756 (2009).
350. Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 519–530 (2004).
351. Iacobas, D. A., Iacobas, S., Urban-Maldonado, M. & Spray, D. C. Sensitivity of the brain transcriptome to connexin ablation. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 183–196 (2005).
352. Iacobas, D. A., Scemes, E. & Spray, D. C. Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem. Int.* **45**, 243–250 (2004).
353. Görlich, D. *et al.* Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**, 383–392 (1995).
354. Morita, T., Mayanagi, T. & Sobue, K. Caldesmon regulates axon extension through interaction with myosin II. *J. Biol. Chem.* **287**, 3349–3356 (2012).

355. Loring, J. F., Wen, X., Lee, J. M., Seilhamer, J. & Somogyi, R. A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* **20**, 683–695 (2001).
356. Fushiki, S. *et al.* Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 304–314 (2003).
357. Gutmann, D. H. *et al.* Comparative gene expression profile analysis of neurofibromatosis 1-associated and sporadic pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* **62**, 2085–2091 (2002).
358. Kielian, T. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J. Neurochem.* **106**, 1000–1016 (2008).
359. Paznekas, W. A. *et al.* Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 408–418 (2003).
360. Laird, D. W. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* **20**, 92–101 (2010).
361. Laird, D. W. Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett.* **588**, 1339–1348 (2014).
362. Mesnil, M. *et al.* Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res.* **55**, 629–639 (1995).
363. Huang, R. P. *et al.* Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* **58**, 5089–5096 (1998).
364. Omori, Y. & Yamasaki, H. Mutated connexin43 proteins inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin43 in a dominant-negative manner. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **78**, 446–453 (1998).
365. Qin, H. *et al.* Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J. Biol. Chem.* **277**, 29132–29138 (2002).
366. Sorgen, P. L. *et al.* Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 54695–54701 (2004).
367. Hunter, A. W., Barker, R. J., Zhu, C. & Gourdie, R. G. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5686–5698 (2005).
368. Shaw, R. M. *et al.* Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* **128**, 547–560 (2007).

369. Lampe, P. D. & Lau, A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1171–1186 (2004).
370. De Bock, M., Wang, N., Decrock, E., Bultynck, G. & Leybaert, L. Intracellular Cleavage of the Cx43 C-Terminal Domain by Matrix-Metalloproteases: A Novel Contributor to Inflammation? *Mediators Inflamm.* **2015**, 257471 (2015).

Anexos

En todas las **Tablas – Anexos** se incluye (i) el número de identificación (ID) según la base de datos *SwissProt*, (ii) el nombre del gen que codifica cada proteína, (iii) el nombre de la proteína, (iv) el total *protscore*, (v) el *unused protscore* (vi) *sequence coverage* (%) y (vii) número de péptidos (95 %).

Tabla - Anexo 1A. Proteínas que interaccionan con la Cx43 identificadas en cartílago articular de donantes sanos utilizando cromatografía HPLC acoplada a espectrometría de masas.

ID	Gen	Proteína	<i>Protscore Total</i>	<i>Protscore Unused</i>	<i>Sequence Coverage (%)</i>	Péptidos (95 %)
P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	22,93	22,93	30,3	11
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	25,29	25,29	53,6	16
Q9P1U1	ACTR3B	Actin-related protein 3B	2	2	7,7	1
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	17,25	17,25	22,5	9
P02511	CRYAB	Alpha-crystallin B chain	4	4	26,3	2
P06733	ENO1	Alpha-enolase	8	8	21	4
P04083	ANXA1	Annexin A1	10	10	30,6	5
P07355	ANXA2	Annexin A2	52,03	52,03	65,8	30
P08758	ANXA5	Annexin A5	2	2	19,7	1
P56134	ATP5J2	ATP synthase subunit f, mitochondrial	2	2	13,8	1
Q05682	CALD1	Caldesmon	2	2	12,5	1
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	6	6	23,9	3
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	4	4	31,3	2
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	2,84	2,84	7,4	2
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2	2	3,2	1
P21291	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1	2	2	7,8	1
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	5,32	5,32	20,9	3
O43175	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2,03	2,03	16,5	1
Q16555	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2,37	2,37	18,9	1
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	6	6	11,4	3
P13639	EEF2	Elongation factor 2	14,35	14,35	21,1	7
P14625	HSP90B1	Endoplasmic	5,64	5,64	5,6	3
P15311	EZR	Erzin	2	2	3,9	1
P21333	FLNA	Filamin-A	63,28	63,28	29,4	32
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,01	2,01	8,8	1
P17931	LGALS3	Galectin-3	2	2	16,4	1
P06396	GSN	Gelsolin	2	2	6,8	1
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	6	6	22,4	4
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10,41	10,41	30,5	5
P11216	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	2	2	8,3	1
P62826	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	4	4	11,6	2
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	10,72	10,72	22,5	5
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	6,02	6,02	26,3	3
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	7,26	7,26	17,4	4
P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	7	1

Anexos

P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2	2	17,5	1
P38159	RBMX PE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	2	20,2	1
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2,02	2,02	16,2	1
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	3,04	3,04	9,1	2
P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	5,46	5,46	18,7	3
P49773	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	2	2	11,1	1
P22492	HIST1H1T	Histone H1t	2	2	12,1	1
Q93077	HIST1H2AC	Histone H2A type 1-C	2	12	54,6	6
Q9BTM1	H2AFJ	Histone H2A.J	12,05	12,05	63,6	6
Q5QNW6	HIST2H2BF	Histone H2B type 2-F	12,9	12,9	57,9	9
P84243	H3F3A	Histone H3.3	3,52	3,52	32,4	3
P62805	HIST1H4A	Histone H4	18	18	57,3	11
P06314	2 SV	Ig kappa chain V-IV region B17	2	2	6,7	1
Q14974	KPNB1	Importin subunit beta-1	2	2	7,2	1
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	6,04	6,04	14,9	4
Q96AG4	LRRCS9	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1,68	1,68	11,4	1
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	3,24	3,24	10,5	2
Q14764	MVP	Major vault protein	2	2	3,9	1
P26038	MSN	Moesin	10,09	10,09	29,5	5
O14950	MYL12B	Myosin regulatory light chain 12B	2	2	13,4	1
P35579	MYH9	Myosin-9	12,16	12,16	17,4	7
O43795	MYO1B	Myosin-Ib	2	2	6,6	1
P19338	NCL	Nucleolin	4,03	4,03	14,2	2
P22392	NME2	Nucleoside diphosphate kinase B	2,77	2,77	27,6	2
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,35	4,35	45,5	2
P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	6	6	26,4	3
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	8	8	33,7	4
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	2	2	12,5	1
Q6NZI2	PTRF	Polymerase I and transcript release factor	4,04	4,04	15,1	2
P02545	LMNA	Prelamin-A/C	26,38	26,38	44,7	15
P07737	PFN1	Profilin-1	2	2	10	1
P49721	PSMB2	Proteasome subunit beta type-2	1,68	1,68	11	1
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	4,31	4,31	17	2
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	7,59	7,59	18,7	4
P60903	S100A10	Protein S100-A10	2	2	14,4	1
P31949	S100A11	Protein S100-A11	2	2	10,5	1
P06703	S100A6	Protein S100-A6	2	2	16,7	1
Q5VTE0	EEF1A3	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	6,2	6,2	17,1	3
P14618	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	18,01	18,01	40,3	10
P35241	RDX	Radixin	2	2	6	1
P62834	RAP1A	Ras-related protein Rap-1A	2	2	7,6	1
Q6NW29	RWDD4A	RWD domain-containing protein 4A	1,64	1,64	13,8	1
P50454	SERPINH1	Serpin H1	6,01	6,01	25,6	3
P02768	ALB	Serum albumin	2,02	2,02	17,7	3
P42224	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	2,6	2,6	7,9	1
P62318	SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	2	2	31,8	1
Q7KZF4	SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	6,42	6,42	18,4	4

P04179	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	2	2	15,3	1
Q9Y490	TLN1	Talin-1	8	8	10,7	4
P04216	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein	4	4	24,2	2
P61586	RHOA	Transforming protein RhoA	2	2	17,6	1
P51571	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta	2	2	11	1
P67936	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	6,75	6,75	31,1	4
P68363	TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	24	24	41,7	14
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	19,68	19,68	46,4	11
Q13885	TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	15,98	15,98	38,4	10
P68371	TUBB2C	Tubulin beta-2C chain	14,89	14,89	42,9	8
P62979	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2,3	2,3	24,4	1
O75396	SEC22B	Vesicle-trafficking protein SEC22b	2	2	18,1	1
P08670	VIM	Vimentin	81,76	81,76	87,1	48
P18206	VCL	Vinculin	5,29	5,29	20,3	3
P62249	RPS16	40S ribosomal protein S16	10	10	47,3	5
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	4	4	15,8	2
P39019	RPS19	40S ribosomal protein S19	2	2	33,1	1
P62847	RPS24	40S ribosomal protein S24	2	2	9	1
P62854	RPS26	40S ribosomal protein S26	2	2	50,4	1
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	7,82	7,82	29,7	4
P46782	RPS5	40S ribosomal protein S5	2	2	28,4	1
P62081	RPS7	40S ribosomal protein S7	8	8	29,9	4
P62241	RPS8	40S ribosomal protein S8	6	6	43,8	3
P46781	RPS9	40S ribosomal protein S9	8	8	13,9	5
P05387	RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	2	2	16,5	1
P62913	RPL11	60S ribosomal protein L11	2	2	7,9	1
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12	4	4	10,9	2
P61313	RPL15	60S ribosomal protein L15	2,03	2,03	21,6	1
P18621	RPL17	60S ribosomal protein L17	2	2	22,3	1
P46778	RPL21	60S ribosomal protein L21	2,04	2,04	23,8	1
P83731	RPL24	60S ribosomal protein L24	3,42	3,42	46,5	2
P61254	RPL26	60S ribosomal protein L26	2	2	7,6	1
P46776	RPL27A	60S ribosomal protein L27a	2	2	8,8	1
P39023	RPL3	60S ribosomal protein L3	2	2	10,2	1
P42766	RPL35	60S ribosomal protein L35	2	2	31,7	1
P18077	RPL35A	60S ribosomal protein L35a	2	2	19,1	1
Q9Y3U8	RPL36	60S ribosomal protein L36	4	4	21,9	2
P36578	RPL4	60S ribosomal protein L4	3,07	3,07	19,9	2
Q02878	RPL6	60S ribosomal protein L6	10,97	10,97	38,9	5
P18124	RPL7	60S ribosomal protein L7	6,02	6,02	29	3
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	4	4	25,6	2

Tabla – Anexo 1B. Proteínas específicamente identificadas en la IP+. Las proteínas marcadas con formato negrita fueron también identificadas en el control negativo.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95 %)
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	22,93	22,93	30,3	11
P60709	Actin, cytoplasmic 1	25,29	25,29	53,6	16
Q9P1U1	Actin-related protein 3B	2	2	7,7	1
O43707	Alpha-actinin-4	17,25	17,25	22,5	9
P02511	Alpha-crystallin B chain	4	4	26,3	2
P06733	Alpha-enolase	8	8	21	4
P04083	Annexin A1	10	10	30,6	5
P07355	Annexin A2	52,03	52,03	65,8	30
P08758	Annexin A5	2	2	19,7	1
P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	2	2	13,8	1
Q05682	Caldesmon	2	2	12,5	1
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	6	6	23,9	3
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	4	4	31,3	2
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2	2	3,2	1
P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	2	2	7,8	1
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	5,32	5,32	20,9	3
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2,03	2,03	16,5	1
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2,37	2,37	18,9	1
P26641	Elongation factor 1-gamma	6	6	11,4	3
P13639	Elongation factor 2	14,35	14,35	21,1	7
P14625	Endoplasmin	5,64	5,64	5,6	3
P15311	Erzin	2	2	3,9	1
P21333	Filamin-A	63,28	63,28	29,4	32
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,01	2,01	8,8	1
P17931	Galectin-3	2	2	16,4	1
P06396	Gelsolin	2	2	6,8	1
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10,41	10,41	30,5	5
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	2	2	8,3	1
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	4	4	11,6	2
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	10,72	10,72	22,5	5
P04792	Heat shock protein beta-1	6,02	6,02	26,3	3
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	7,26	7,26	17,4	4
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	7	1
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2	2	17,5	1
P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	2	20,2	1
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2,02	2,02	16,2	1
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	5,46	5,46	18,7	3
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	2	2	11,1	1
P22492	Histone H1t	2	2	12,1	1
Q93077	Histone H2A type 1-C	2	12	54,6	6
Q9BTM1	Histone H2A.J	12,05	12,05	63,6	6
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	12,9	12,9	57,9	9
P84243	Histone H3.3	3,52	3,52	32,4	3
P62805	Histone H4	18	18	57,3	11
P06314	Ig kappa chain V-IV region B17	2	2	6,7	1
Q14974	Importin subunit beta-1	2	2	7,2	1
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1,68	1,68	11,4	1
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	3,24	3,24	10,5	2
Q14764	Major vault protein	2	2	3,9	1

P26038	Moesin	10,09	10,09	29,5	5
O14950	Myosin regulatory light chain 12B	2	2	13,4	1
P35579	Myosin-9	12,16	12,16	17,4	7
O43795	Myosin-Ib	2	2	6,6	1
P19338	Nucleolin	4,03	4,03	14,2	2
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	2,77	2,77	27,6	2
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,35	4,35	45,5	2
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	6	6	26,4	3
Q06830	Peroxiredoxin-1	8	8	33,7	4
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	2	2	12,5	1
Q6N2I2	Polymerase I and transcript release factor	4,04	4,04	15,1	2
P02545	Prelamin-A/C	26,38	26,38	44,7	15
P07737	Profilin-1	2	2	10	1
P49721	Proteasome subunit beta type-2	1,68	1,68	11	1
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	4,31	4,31	17	2
P07237	Protein disulfide-isomerase	7,59	7,59	18,7	4
P60903	Protein S100-A10	2	2	14,4	1
P31949	Protein S100-A11	2	2	10,5	1
P06703	Protein S100-A6	2	2	16,7	1
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	6,2	6,2	17,1	3
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	18,01	18,01	40,3	10
P35241	Radixin	2	2	6	1
P62834	Ras-related protein Rap-1A	2	2	7,6	1
Q6NW29	RWD domain-containing protein 4A	1,64	1,64	13,8	1
P50454	Serpin H1	6,01	6,01	25,6	3
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	2,6	2,6	7,9	1
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	2	2	31,8	1
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	6,42	6,42	18,4	4
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	2	2	15,3	1
Q9Y490	Talin-1	8	8	10,7	4
P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	4	4	24,2	2
P61586	Transforming protein RhoA	2	2	17,6	1
P51571	Translocon-associated protein subunit delta	2	2	11	1
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	6,75	6,75	31,1	4
P68363	Tubulin alpha-1B chain	24	24	41,7	14
P07437	Tubulin beta chain	19,68	19,68	46,4	11
Q13885	Tubulin beta-2A chain	2,66	15,98	38,4	10
P68371	Tubulin beta-2C chain	1,57	14,89	42,9	8
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2,3	2,3	24,4	1
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	2	2	18,1	1
P08670	Vimentin	81,76	81,76	87,1	48
P18206	Vinculin	5,29	5,29	20,3	3
P62249	40S ribosomal protein S16	10	10	47,3	5
P62269	40S ribosomal protein S18	4	4	15,8	2
P39019	40S ribosomal protein S19	2	2	33,1	1
P62847	40S ribosomal protein S24	2	2	9	1
P62854	40S ribosomal protein S26	2	2	50,4	1
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	7,82	7,82	29,7	4
P46782	40S ribosomal protein S5	2	2	28,4	1
P62081	40S ribosomal protein S7	8	8	29,9	4
P62241	40S ribosomal protein S8	6	6	43,8	3
P46781	40S ribosomal protein S9	8	8	13,9	5
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	2	2	16,5	1

Anexos

P62913	60S ribosomal protein L11	2	2	7,9	1
P30050	60S ribosomal protein L12	4	4	10,9	2
P61313	60S ribosomal protein L15	2,03	2,03	21,6	1
P18621	60S ribosomal protein L17	2	2	22,3	1
P46778	60S ribosomal protein L21	2,04	2,04	23,8	1
P83731	60S ribosomal protein L24	3,42	3,42	46,5	2
P61254	60S ribosomal protein L26	2	2	7,6	1
P46776	60S ribosomal protein L27a	2	2	8,8	1
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	10,2	1
P42766	60S ribosomal protein L35	2	2	31,7	1
P18077	60S ribosomal protein L35a	2	2	19,1	1
Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36	4	4	21,9	2
P36578	60S ribosomal protein L4	3,07	3,07	19,9	2
Q02878	60S ribosomal protein L6	10,97	10,97	38,9	5
P18124	60S ribosomal protein L7	6,02	6,02	29	3
P62424	60S ribosomal protein L7a	4	4	25,6	2

Tabla – Anexo 1C. Proteínas identificadas en la IP+ y IP-, con un mayor número de péptidos en la IP+, en condrocitos aislados de cartílago articular de donantes sanos. A la derecha se muestra la diferencia del número de péptidos entre ambas IPs (IP+ e IP-).

ID	Proteína	<i>Protscore Total</i>	<i>Protscore Unused</i>	<i>Sequence Coverage (%)</i>	Péptidos (95 %)	Diferencia de péptidos
P60709	Actin, cytoplasmic 1	25,29	25,29	53,6	16	12
P07355	Annexin A2	52,03	52,03	65,8	30	29
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	12,9	12,9	57,9	9	6
P62805	Histone H4	18	18	57,3	11	9
P02545	Prelamin-A/C	26,38	26,38	44,7	15	13
P08670	Vimentin	81,76	81,76	87,1	48	23

Tabla – Anexo 2. Lista de proteínas identificadas utilizando cromatografía HPLC acoplada a espectrometría de masas en las IPs realizadas sin anticuerpo, IP- (control negativo). En formato negrita se indican las proteínas que también se han identificado en las IP+.

ID	Gen	Proteína	<i>Protscor e Total</i>	<i>Protscor e Unused</i>	<i>Sequenc e Coverage (%)</i>	<i>Péptido s (95 %)</i>
P08670	VIM	Vimentin	40,69	40,69	59,7	25
P02768	ALB	Serum albumin	12,41	12,41	18,1	12
P09211	GST	Glutathione S-transferase P	16,01	16,01	38,1	10
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	10,37	10,37	5,1	5
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	7,46	7,46	24,3	4
Q16778	HIST2H2BE	Histone H2B type 2-E	5,77	5,77	50,8	3
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	6,97	6,97	25,9	3
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	5,19	5,21	16,7	3
P62805	HIST1H4A	Histone H4	4,21	4,21	44,7	2
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	4,07	4,07	15,2	2
P02545	LMNA	Prelamin-A/C	4,42	4,42	15,7	2
Q9BQE 3	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	4	4	10,5	2
P16112	ACAN	Aggrecan core protein	2,89	2,89	2,9	1
P07355	ANXA2	Annexin A2	2,15	2,15	19,5	1
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	2	2	5,2	1
Q00839	HNRN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2	2	5,2	1
Q6FI13	HIST2H2AA 3	Histone H2A type 2-A	2	2	36,9	1
Q71DI3	HIST2H3A	Histone H3.2	2	2	14,7	1

Tabla – Anexo 3A. Proteínas que interactúan con la Cx43 identificadas en pacientes con OA grado I.

ID	Gen	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	6,14	6,14	53,4	3
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	31,39	31,39	72	26
P59998	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	4,97	4,97	50,6	3
P61158	ACTR3	Actin-related protein 3	1,83	1,83	26,8	1
P16112	ACAN	Aggrecan core protein	4,21	4,21	12	2
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	8,11	8,11	37,9	4
P02511	CRYAB	Alpha-crystallin B chain	13,73	13,73	65,7	7
P06733	ENO1	Alpha-enolase	26,89	26,89	65	13
P04083	ANXA1	Annexin A1	10,87	10,87	47,4	6
P07355	ANXA2	Annexin A2	54,59	54,59	84,4	40
P08758	ANXA5	Annexin A5	2,05	2,05	32,8	1
Q08211	DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	1,63	1,63	28,1	1
Q05682	CALD1	Caldesmon	2,02	2,02	38	1
Q00610	CLTC	Clathrin heavy chain 1	43,3	43,3	44,8	21
P53621	COPA	Coatomer subunit alpha	2	2	28,8	1
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	21,28	21,28	57,1	12
Q99715	COL12A1	Collagen alpha-1(XII) chain	23,48	23,48	41,2	11
P12110	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	14,25	14,25	56,1	11
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	95,44	95,44	53,9	54
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2,91	2,91	21,1	2
P52943	CRIP2	Cysteine-rich protein 2	2,61	2,61	44,7	2
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	8,36	8,36	50,2	4
O43175	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	24	1
P60981	DSTN	Destrin	2,14	2,14	44,2	1
P04843	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	26,4	1
Q9NZN4	EHD2	EH domain-containing protein 2	2,19	2,19	29,7	1
Q05639	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	4	4	31,8	3
P29692	EEF1D	Elongation factor 1-delta	2	2	30,6	1
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	4,05	4,05	27,2	2
P13639	EEF2	Elongation factor 2	9,2	9,2	35,9	5
P14625	HSP90B1	Endoplasmic	3,82	3,82	31,1	2
Q9GZV4	EIF5A2	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	2	2	40,5	1
Q9BSJ8	ESYT1	Extended synaptotagmin-1	4	4	21,1	2
P49327	FASN	Fatty acid synthase	4,14	4,14	27,2	2
P21333	FLNA	Filamin-A	45,09	45,09	49,3	23
P51114	FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	2	2	23,4	1
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,1	2,1	43,7	1
P06396	GSN	Gelsolin	2	2	17,4	1
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	17,18	17,18	59,5	13
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,04	4,04	42,4	2
P11216	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	2,95	2,95	31	2
P62826	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	2,01	2,01	34,7	1
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	3,04	3,04	35,8	2
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	4,05	4,05	60	4
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	2,81	2,81	28	2

P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2,46	2,46	25	2
P38159	RBMX	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	2	52,9	1
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	4	45,1	2
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	4,39	4,39	40,5	2
P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2	2	56,7	1
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	3,91	3,91	34,3	2
P22492	HIST1H1T	Histone H1t	2	2	50,7	1
Q93077	HIST1H2AC	Histone H2A type 1-C	2,58	18,12	76,9	13
Q6F113	HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-A	20,17	20,17	86,9	14
P33778	HIST1H2BB	Histone H2B type 1-B	2,24	18,63	86,5	14
Q99879	HIST1H2BM	Histone H2B type 1-M	22,53	22,53	98,4	16
P84243	H3F3A	Histone H3.3	9,61	9,61	79,4	8
P62805	HIST1H4A	Histone H4	22,4	22,4	78,6	18
P01834	IGKC	Ig kappa chain C region	2,65	2,65	32,1	2
P06756	ITGAV	Integrin alpha-V	2,03	2,03	20,9	1
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	2	2	18,9	1
P41252	IARS	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	3,41	3,41	20,2	2
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	18,09	18,09	42,1	12
P35527	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	2,03	2,03	33,4	1
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	46,42	46,42	73,8	29
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	14,65	21,16	46,6	12
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	10	10	41	5
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	2	2	23,5	1
P43243	MATR3	Matrin-3	2,05	2,05	27,4	1
P26038	MSN	Moesin	10,02	10,02	59,1	6
Q9NZM1	MYOF	Myoferlin	4,03	4,03	24,3	2
P60660	MYL6	Myosin light polypeptide 6	6,02	6,02	61,6	5
P19105	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	4	4	17,5	2
P35580	MYH10	Myosin-10	2,15	11,36	46,5	7
P35579	MYH9	Myosin-9	53,4	53,4	61,8	31
O43795	MYO1B	Myosin-Ib	2	2,01	31,7	1
O00159	MYO1C	Myosin-Ic	4,47	4,47	45,3	2
O94832	MYO1D	Myosin-I d	1,51	1,51	29,6	1
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2,12	2,12	41,6	1
P19338	NCL	Nucleolin	2,84	2,84	25,2	2
P06748	NPM1	Nucleophosmin	1,87	1,87	36,7	1
P22392	NME2	Nucleoside diphosphate kinase B	3,27	3,27	63,2	2
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,13	4,13	69,1	3
P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	4	4	37,5	2
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	8	8	47,7	5
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	4,18	6,21	38,9	3
Q13162	PRDX4	Peroxiredoxin-4	2	4	18,5	4
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	5,39	5,39	53	3
Q15149	PLEC	Plectin	12,72	12,72	49,6	8
Q6NZI2	PTRF	Polymerase I and transcript release factor	4	4	32,3	2
P26599	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	4,03	4,03	31,8	2
P02545	LMNA	Prelamin-A/C	39,97	39,97	82,7	21
P07737	PFN1	Profilin-1	2	2	22,9	1
P13674	P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	2	2	17,4	1

P49721	PSMB2	Proteasome subunit beta type-2	1,74	1,74	21,9	1
Q13015	MLLT11	Protein AF1q	2	2	38,9	1
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	3,84	3,84	39	3
Q9Y6V0	PCLO	Protein piccolo	1,81	1,81	19,2	1
O94979	SEC31A	Protein transport protein Sec31A	2,01	2,01	16,7	1
P14618	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	18,87	18,87	64	11
P35241	RDX	Radixin	3,07	3,07	11,2	2
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6,45	6,45	28,2	3
A6NIZ1		Ras-related protein Rap-1b-like protein	3,89	3,89	29,4	2
Q9P2E9	RRBP1	Ribosome-binding protein 1	12,11	12,11	46,9	7
Q15019	SEPT2	Septin-2	2	2	21,3	1
P84103	SRSF3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	1,77	1,77	63,4	1
P50454	SERPINH1	Serpin H1	6	6	40,7	3
P02768	ALB	Serum albumin	16,07	16,07	44	17
Q13435	SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	1,52	1,52	34,3	1
Q7KZF4	SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	1,48	1,48	32,9	1
Q9Y490	TLN1	Talin-1	15,6	15,6	44	8
Q15582	TGFBI	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	2,32	2,32	19,8	1
P51571	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta	1,36	1,36	30,6	1
P67936	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	5,82	5,82	54	3
Q9BQE3	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	22,06	22,06	68,6	14
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	23,03	23,03	60,6	16
Q13885	TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	5	22,7	51,2	15
P62987	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	8,11	8,11	71,1	4
P26640	VARS	Valyl-tRNA synthetase	2,75	2,75	21,3	2
Q00341	HDLBP	Vigilin	3,84	3,84	34,6	2
P08670	VIM	Vimentin	124,3	124,3	100	158
P18206	VCL	Vinculin	4,32	4,32	40,5	2
Q04446	GBE1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	2	2	13	1
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	4	4	28,2	2
P62280	RPS11	40S ribosomal protein S11	8,01	8,01	74,7	4
P62277	RPS13	40S ribosomal protein S13	9,38	9,38	64,2	6
P62249	RPS16	40S ribosomal protein S16	10,47	10,47	83,6	5
P08708	RPS17	40S ribosomal protein S17	2	2	20	1
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	4,01	4,01	61,8	2
P62847	RPS24	40S ribosomal protein S24	2	2	27,8	1
P62851	RPS25	40S ribosomal protein S25	2	2	40,8	1
P61247	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	2,25	2,25	43,9	1
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	8,01	8,01	59,3	4
P46782	RPS5	40S ribosomal protein S5	2,2	2,2	41,7	1
P62081	RPS7	40S ribosomal protein S7	4,28	4,28	54,1	2
P62241	RPS8	40S ribosomal protein S8	8	8	69,2	5
P46781	RPS9	40S ribosomal protein S9	9,68	9,68	56,2	6
P62906	RPL10A	60S ribosomal protein L10a	2	2	24,4	1
Q96L21	RPL10L	60S ribosomal protein L10-like	4	4	59,8	2
P62913	RPL11	60S ribosomal protein L11	2	2	26,4	1
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12	2,01	2,01	35,2	1
P26373	RPL13	60S ribosomal protein L13	6,7	6,7	71,6	3
P50914	RPL14	60S ribosomal protein L14	2,01	2,01	30,2	1
Q02543	RPL18A	60S ribosomal protein L18a	6,66	6,66	53,4	3
P35268	RPL22	60S ribosomal protein L22	1,42	1,42	46,1	1
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	2	2	46,8	1

Anexos

P83731	RPL24	60S ribosomal protein L24	4,01	4,01	68,8	3
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	2	2	41,9	1
P39023	RPL3	60S ribosomal protein L3	2	2	23,1	1
P62888	RPL30	60S ribosomal protein L30	3,77	3,77	53,9	2
P42766	RPL35	60S ribosomal protein L35	4	4	52	3
P63173	RPL38	60S ribosomal protein L38	2	2	21,4	1
P36578	RPL4	60S ribosomal protein L4	4,01	4,01	70,5	2
Q02878	RPL6	60S ribosomal protein L6	8,02	8,02	57,6	4
P18124	RPL7	60S ribosomal protein L7	14,18	14,18	79,8	9
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	2,55	2,55	39,1	1
P32969	RPL9	60S ribosomal protein L9	2	2	30,2	1

Tabla – Anexo 3B. Proteínas específicamente identificadas en la IP+ en condrocitos aislados de cartílago articular de pacientes con OA grado I. Las proteínas marcadas con formato negrita también se identificaron en el control negativo.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95 %)
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	6,14	6,14	53,4	3
P63261	Actin, cytoplasmic 2	31,39	31,39	72	26
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	4,97	4,97	50,6	3
P61158	Actin-related protein 3	1,83	1,83	26,8	1
P12814	Alpha-actinin-1	8,11	8,11	37,9	4
P02511	Alpha-crystallin B chain	13,73	13,73	65,7	7
P06733	Alpha-enolase	26,89	26,89	65	13
P04083	Annexin A1	10,87	10,87	47,4	6
P07355	Annexin A2	54,59	54,59	84,4	40
P08758	Annexin A5	2,05	2,05	32,8	1
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1,63	1,63	28,1	1
Q05682	Caldesmon	2,02	2,02	38	1
Q00610	Clathrin heavy chain 1	43,3	43,3	44,8	21
P53621	Coatomer subunit alpha	2	2	28,8	1
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	21,28	21,28	57,1	12
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	23,48	23,48	41,2	11
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	14,25	14,25	56,1	11
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	95,44	95,44	53,9	54
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2,91	2,91	21,1	2
P52943	Cysteine-rich protein 2	2,61	2,61	44,7	2
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	8,36	8,36	50,2	4
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	24	1
P60981	Destrin	2,14	2,14	44,2	1
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	26,4	1
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	2,19	2,19	29,7	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	4	4	31,8	3
P29692	Elongation factor 1-delta	2	2	30,6	1
P26641	Elongation factor 1-gamma	4,05	4,05	27,2	2
P13639	Elongation factor 2	9,2	9,2	35,9	5
P14625	Endoplasmic	3,82	3,82	31,1	2
Q9GZV4	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	2	2	40,5	1
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	4	4	21,1	2
P49327	Fatty acid synthase	4,14	4,14	27,2	2
P21333	Filamin-A	45,09	45,09	49,3	23
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	2	2	23,4	1
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,1	2,1	43,7	1
P06396	Gelsolin	2	2	17,4	1
P09211	Glutathione S-transferase P	17,18	17,18	59,5	13
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,04	4,04	42,4	2
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	2,95	2,95	31	2
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	2,01	2,01	34,7	1
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	3,04	3,04	35,8	2
P04792	Heat shock protein beta-1	4,05	4,05	60	4
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	2,79	2,81	28	2
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2,46	2,46	25	2
P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	2	52,9	1

P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	4	45,1	2
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2	2	56,7	1
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	3,91	3,91	34,3	2
P22492	Histone H1t	2	2	50,7	1
Q93077	Histone H2A type 1-C	2,58	18,12	76,9	13
Q6FI13	Histone H2A type 2-A	20,17	20,17	86,9	14
P33778	Histone H2B type 1-B	2,24	18,63	86,5	14
Q99879	Histone H2B type 1-M	22,53	22,53	98,4	16
P84243	Histone H3.3	9,61	9,61	79,4	8
P62805	Histone H4	22,4	22,4	78,6	18
P01834	Ig kappa chain C region	2,65	2,65	32,1	2
P06756	Integrin alpha-V	2,03	2,03	20,9	1
P05556	Integrin beta-1	2	2	18,9	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	3,41	3,41	20,2	2
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	2,03	2,03	33,4	1
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	46,42	46,42	73,8	29
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	14,65	21,16	46,6	12
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	10	10	41	5
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2	2	23,5	1
P43243	Matrin-3	2,05	2,05	27,4	1
P26038	Moesin	10,02	10,02	59,1	6
Q9NZM1	Myoferlin	4,03	4,03	24,3	2
P60660	Myosin light polypeptide 6	6,02	6,02	61,6	5
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	4	4	17,5	2
P35580	Myosin-10	2,15	11,36	46,5	7
P35579	Myosin-9	53,4	53,4	61,8	31
O43795	Myosin-Ib	2	2,01	31,7	1
O00159	Myosin-Ic	4,47	4,47	45,3	2
O94832	Myosin-IId	1,51	1,51	29,6	1
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2,12	2,12	41,6	1
P19338	Nucleolin	2,84	2,84	25,2	2
P06748	Nucleophosmin	1,87	1,87	36,7	1
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	3,27	3,27	63,2	2
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,13	4,13	69,1	3
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	4	4	37,5	2
Q06830	Peroxiredoxin-1	8	8	47,7	5
P32119	Peroxiredoxin-2	4,18	6,21	38,9	3
Q13162	Peroxiredoxin-4	2	4	18,5	4
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	5,39	5,39	53	3
Q15149	Plectin	12,72	12,72	49,6	8
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	4	4	32,3	2
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	4,03	4,03	31,8	2
P02545	Prelamin-A/C	39,97	39,97	82,7	21
P07737	Profilin-1	2	2	22,9	1
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	2	2	17,4	1
P49721	Proteasome subunit beta type-2	1,74	1,74	21,9	1
Q13015	Protein AF1q	2	2	38,9	1
P07237	Protein disulfide-isomerase	3,84	3,84	39	3
Q9Y6V0	Protein piccolo	1,81	1,81	19,2	1
O94979	Protein transport protein Sec31A	2,01	2,01	16,7	1
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	18,87	18,87	64	11
P35241	Radixin	3,07	3,07	11,2	2
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6,45	6,45	28,2	3
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	3,89	3,89	29,4	2

Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	12,11	12,11	46,9	7
Q15019	Septin-2	2	2	21,3	1
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	1,77	1,77	63,4	1
P50454	Serpin H1	6	6	40,7	3
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	1,52	1,52	34,3	1
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	1,48	1,48	32,9	1
Q9Y490	Talin-1	15,6	15,6	44	8
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	2,32	2,32	19,8	1
P51571	Translocon-associated protein subunit delta	1,36	1,36	30,6	1
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	5,82	5,82	54	3
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	22,06	22,06	68,6	14
P07437	Tubulin beta chain	23,03	23,03	60,6	16
Q13885	Tubulin beta-2A chain	5	22,7	51,2	15
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	8,11	8,11	71,1	4
P26640	Valyl-tRNA synthetase	2,75	2,75	21,3	2
Q00341	Vigilin	3,84	3,84	34,6	2
P08670	Vimentin	124,3	124,3	100	158
P18206	Vinculin	4,32	4,32	40,5	2
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	2	2	13	1
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	4	4	28,2	2
P62280	40S ribosomal protein S11	8,01	8,01	74,7	4
P62277	40S ribosomal protein S13	9,38	9,38	64,2	6
P62249	40S ribosomal protein S16	10,47	10,47	83,6	5
P08708	40S ribosomal protein S17	2	2	20	1
P62269	40S ribosomal protein S18	4,01	4,01	61,8	2
P62847	40S ribosomal protein S24	2	2	27,8	1
P62851	40S ribosomal protein S25	2	2	40,8	1
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,25	2,25	43,9	1
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	8,01	8,01	59,3	4
P46782	40S ribosomal protein S5	2,2	2,2	41,7	1
P62081	40S ribosomal protein S7	4,28	4,28	54,1	2
P62241	40S ribosomal protein S8	8	8	69,2	5
P46781	40S ribosomal protein S9	9,68	9,68	56,2	6
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	24,4	1
Q96L21	60S ribosomal protein L10-like	4	4	59,8	2
P62913	60S ribosomal protein L11	2	2	26,4	1
P30050	60S ribosomal protein L12	2,01	2,01	35,2	1
P26373	60S ribosomal protein L13	6,7	6,7	71,6	3
P50914	60S ribosomal protein L14	2,01	2,01	30,2	1
Q02543	60S ribosomal protein L18a	6,66	6,66	53,4	3
P35268	60S ribosomal protein L22	1,42	1,42	46,1	1
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	46,8	1
P83731	60S ribosomal protein L24	4,01	4,01	68,8	3
P61353	60S ribosomal protein L27	2	2	41,9	1
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	23,1	1
P62888	60S ribosomal protein L30	3,77	3,77	53,9	2
P42766	60S ribosomal protein L35	4	4	52	3
P63173	60S ribosomal protein L38	2	2	21,4	1
P36578	60S ribosomal protein L4	4,01	4,01	70,5	2
Q02878	60S ribosomal protein L6	8,02	8,02	57,6	4
P18124	60S ribosomal protein L7	14,18	14,18	79,8	9
P62424	60S ribosomal protein L7a	2,55	2,55	39,1	1
P32969	60S ribosomal protein L9	2	2	30,2	1

Tabla – Anexo 3C. Proteínas identificadas en la IP+ y IP-, con un mayor número de péptidos en la IP+, en condrocitos aislados de cartílago articular OA grado I. A la derecha se muestra la diferencia del número de péptidos entre las IPs (IP+ e IP-).

ID	Proteína	<i>Protscore</i> Total	<i>Protscore</i> <i>Unused</i>	<i>Sequence</i> <i>Coverage</i> (%)	Péptidos (95 %)	Diferencia de péptidos
P08670	Vimentin	124,3	124,3	100	158	133
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	22,06	22,06	68,6	14	12
P02545	Prelamin-A/C	39,97	39,97	82,7	21	19
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	46,42	46,42	73,8	29	26
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	14,65	21,16	46,6	12	9
P62805	Histone H4	22,4	22,4	78,6	18	16
Q6F113	Histone H2A type 2-A	20,17	20,17	86,9	14	13
P09211	Glutathione S-transferase P	17,18	17,18	59,5	13	3
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	95,44	95,44	53,9	54	49
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	21,28	21,28	57,1	12	11
P07355	Annexin A2	54,59	54,59	84,4	40	39

Tabla – Anexo 3D. Lista de proteínas identificadas exclusivamente en pacientes OA grado I (**Tabla – Anexo 3A**) frente a las proteínas identificadas en donantes sanos (**Tabla – Anexo 1A**). El formato negrita indica aquellas proteínas que también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95 %)
P63261	Actin, cytoplasmic 2	31,39	31,39	72	26
P12814	Alpha-actinin-1	8,11	8,11	37,9	4
P61158	Actin-related protein 3	1,83	1,83	26,8	1
Q13015	Protein AF1q	2	2	38,9	1
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2,12	2,12	41,6	1
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	4,97	4,97	50,6	3
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	2,32	2,32	19,8	1
Q00610	Clathrin heavy chain 1	43,3	43,3	44,8	21
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	23,48	23,48	41,2	11
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	21,28	21,28	57,1	12
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	14,25	14,25	56,1	11
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	95,44	95,44	53,9	54
P53621	Coatomer subunit alpha	2	2	28,8	1
P52943	Cysteine-rich protein 2	2,61	2,61	44,7	2
P60981	Destrin	2,14	2,14	44,2	1
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1,63	1,63	28,1	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	4	4	31,8	3
P29692	Elongation factor 1-delta	2	2	30,6	1
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	2,19	2,19	29,7	1
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	4	4	21,1	2
P49327	Fatty acid synthase	4,14	4,14	27,2	2
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	2	2	23,4	1
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	2	2	13	1
P09211	Glutathione S-transferase P	17,18	17,18	59,5	13
Q6FI13	Histone H2A type 2-A	20,17	20,17	86,9	14
P33778	Histone H2B type 1-B	2,24	18,63	86,5	14
Q99879	Histone H2B type 1-M	22,53	22,53	98,4	16
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	3,91	3,91	34,3	2
Q9GZV4	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	2	2	40,5	1
P01834	Ig kappa chain C region	2,65	2,65	32,1	2
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6,45	6,45	28,2	3
P06756	Integrin alpha-V	2,03	2,03	20,9	1
P05556	Integrin beta-1	2	2	18,9	1
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	2,03	2,03	33,4	1
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	14,65	21,16	46,6	12
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	46,42	46,42	73,8	29
P43243	Matrin-3	2,05	2,05	27,4	1
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2	2	23,5	1
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	4	4	17,5	2
P35580	Myosin-10	2,15	11,36	46,5	7
P60660	Myosin light polypeptide 6	6,02	6,02	61,6	5

O00159	Myosin-Ic	4,47	4,47	45,3	2
O94832	Myosin-IId	1,51	1,51	29,6	1
Q9NZM1	Myoferlin	4,03	4,03	24,3	2
P06748	Nucleophosmin	1,87	1,87	36,7	1
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	2	2	17,4	1
Q9Y6V0	Protein piccolo	1,81	1,81	19,2	1
Q15149	Plectin	12,72	12,72	49,6	8
P32119	Peroxiredoxin-2	4,18	6,21	38,9	3
Q13162	Peroxiredoxin-4	2	4	18,5	4
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	4,03	4,03	31,8	2
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	24,4	1
Q96L21	60S ribosomal protein L10-like	4	4	59,8	2
P26373	60S ribosomal protein L13	6,7	6,7	71,6	3
P50914	60S ribosomal protein L14	2,01	2,01	30,2	1
Q02543	60S ribosomal protein L18a	6,66	6,66	53,4	3
P35268	60S ribosomal protein L22	1,42	1,42	46,1	1
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	46,8	1
P61353	60S ribosomal protein L27	2	2	41,9	1
P62888	60S ribosomal protein L30	3,77	3,77	53,9	2
P63173	60S ribosomal protein L38	2	2	21,4	1
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	8,11	8,11	71,1	4
P32969	60S ribosomal protein L9	2	2	30,2	1
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	3,89	3,89	29,4	2
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	26,4	1
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	12,11	12,11	46,9	7
P62280	40S ribosomal protein S11	8,01	8,01	74,7	4
P62277	40S ribosomal protein S13	9,38	9,38	64,2	6
P08708	40S ribosomal protein S17	2	2	20	1
P62851	40S ribosomal protein S25	2	2	40,8	1
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,25	2,25	43,9	1
O94979	Protein transport protein Sec31A	2,01	2,01	16,7	1
Q15019	Septin-2	2	2	21,3	1
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	1,52	1,52	34,3	1
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	1,77	1,77	63,4	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	3,41	3,41	20,2	2
P26640	Valyl-tRNA synthetase	2,75	2,75	21,3	2
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	22,06	22,06	68,6	14
Q00341	Vigilin	3,84	3,84	34,6	2
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	4	4	28,2	2

Tabla – Anexo 3E. Lista de proteínas identificadas en pacientes con OA grado I (**Tabla – Anexo 3A**) y donantes sanos (**Tabla – Anexo 1A**). A la derecha se muestra la diferencia en el número de péptidos.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95 %)	Diferencia de péptidos
P21333	Filamin-A	45,09	45,09	49,3	23	-9
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	6,14	6,14	53,4	3	-8
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,04	4,04	42,4	2	-3
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	3,04	3,04	35,8	2	-3
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	1,48	1,48	32,9	1	-3
P13639	Elongation factor 2	9,2	9,2	35,9	5	-2
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	5,39	5,39	53	3	-2
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2	2	56,7	1	-2
P62081	40S ribosomal protein S7	4,28	4,28	54,1	2	-2
P62241	40S ribosomal protein S8	8	8	69,2	5	-2
P14625	Endoplasmic	3,82	3,82	31,1	2	-1
P07237	Protein disulfide-isomerase	3,84	3,84	39	3	-1
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,13	4,13	69,1	3	-1
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	4	4	37,5	2	-1
Q06830	Peroxiredoxin-1	8	8	47,7	5	-1
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	2,95	2,95	31	2	-1
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	2,01	2,01	34,7	1	-1
P30050	60S ribosomal protein L12	2,01	2,01	35,2	1	-1
P83731	60S ribosomal protein L24	4,01	4,01	68,8	3	-1
Q02878	60S ribosomal protein L6	8,02	8,02	57,6	4	-1
P62424	60S ribosomal protein L7a	2,55	2,55	39,1	1	-1
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	5,82	5,82	54	3	-1
P18206	Vinculin	4,32	4,32	40,5	2	-1
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,1	2,1	43,7	1	0
P08758	Annexin A5	2,05	2,05	32,8	1	0
Q05682	Caldesmon	2,02	2,02	38	1	0
P06396	Gelsolin	2	2	17,4	1	0
P22492	Histone H1t	2	2	50,7	1	0
P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	2	52,9	1	0
O43795	Myosin-Ib	2	2,01	31,7	1	0
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	3,27	3,27	63,2	2	0
P19338	Nucleolin	2,84	2,84	25,2	2	0
P07737	Profilin-1	2	2	22,9	1	0
P49721	Proteasome subunit beta type-2	1,74	1,74	21,9	1	0
Q6NZ12	Polymerase I and transcript release factor	4	4	32,3	2	0
P62913	60S ribosomal protein L11	2	2	26,4	1	0
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	23,1	1	0
P36578	60S ribosomal protein L4	4,01	4,01	70,5	2	0
P62249	40S ribosomal protein S16	10,47	10,47	83,6	5	0
P62269	40S ribosomal protein S18	4,01	4,01	61,8	2	0
P62847	40S ribosomal protein S24	2	2	27,8	1	0
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	8,01	8,01	59,3	4	0

Anexos

P46782	40S ribosomal protein S5	2,2	2,2	41,7	1	0
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	24	1	0
P50454	Serpin H1	6	6	40,7	3	0
P51571	Translocon-associated protein subunit delta	1,36	1,36	30,6	1	0
P04083	Annexin A1	10,87	10,87	47,4	6	1
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2,91	2,91	21,1	2	1
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	8,36	8,36	50,2	4	1
P26641	Elongation factor 1-gamma	4,05	4,05	27,2	2	1
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	4	45,1	2	1
P04792	Heat shock protein beta-1	4,05	4,05	60	4	1
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	18,87	18,87	64	11	1
P26038	Moesin	10,02	10,02	59,1	6	1
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2,46	2,46	25	2	1
P46781	40S ribosomal protein S9	9,68	9,68	56,2	6	1
P35241	Radixin	3,07	3,07	11,2	2	1
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	2,79	2,81	28	2	2
P42766	60S ribosomal protein L35	4	4	52	3	2
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	10	10	41	5	3
Q9Y490	Talin-1	15,6	15,6	44	8	4
P02511	Alpha-crystallin B chain	13,73	13,73	65,7	7	5
P84243	Histone H3.3	9,61	9,61	79,4	8	5
Q13885	Tubulin beta-2A chain	5	22,7	51,2	15	5
P02545	Prelamin-A/C	39,97	39,97	82,7	21	6
P18124	60S ribosomal protein L7	14,18	14,18	79,8	9	6
P07437	Tubulin beta chain	23,03	23,03	60,6	16	6
Q93077	Histone H2A type 1-C	2,58	18,12	76,9	13	7
P62805	Histone H4	22,4	22,4	78,6	18	7
P06733	Alpha-enolase	26,89	26,89	65	13	9
P07355	Annexin A2	54,59	54,59	84,4	40	10
P35579	Myosin-9	53,4	53,4	61,8	31	24
P08670	Vimentin	124,3	124,3	100	158	110

Tabla – Anexo 4A. Proteínas que interaccionan con la Cx43 identificadas en pacientes con OA grado III.

ID	Gen	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95 %)
P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	32,82	32,82	60,6	17
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	29,04	29,04	62,9	21
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	29,04	29,04	62,9	22
P16112	ACAN	Aggrecan core protein	4,01	4,01	5,5	2
Q9Y2D5	AKAP2	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	5,51	37,2	69,3	22
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	42,71	42,71	60,9	24
P02511	CRYAB	Alpha-crystallin B chain	4,18	4,18	47,4	2
P06733	ENO1	Alpha-enolase	26,98	26,98	58,1	14
P04083	ANXA1	Annexin A1	6,15	6,15	27,2	3
P07355	ANXA2	Annexin A2	48,92	48,92	86,1	30
P08758	ANXA5	Annexin A5	2	2	20,6	1
O95782	AP2A1	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ACLY	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
P07814	EPRS	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
Q05682	CALD1	Caldesmon	9,33	9,33	44	5
Q00610	CLTC PE	Clathrin heavy chain 1	37,13	37,13	43,7	20
P53618	COPB1	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	COPG	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	8,24	8,24	50	4
P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	6
Q99715	COL12A1	Collagen alpha-1(XII) chain	14,16	14,16	32,6	8
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	2	2	40,7	1
P12110	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	6	6	36,3	4
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	34
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	4	18,9	2
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	2,36	2,36	26,4	1
O43175	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	27	1
P54886	ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
Q16555	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	7,31	7,31	35,1	4
P04843	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	20,9	1
Q05639	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	8,94	8,94	29,2	6
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	5,08	5,08	26,5	3
P13639	EEF2	Elongation factor 2	19,24	19,24	34,4	9
P14625	HSP90B1	Endoplasmic	22,57	22,57	38,5	11
Q14152	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
P21333	FLNA	Filamin-A	73,44	73,44	44,6	36
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,56	7,56	38,5	4
P17931	LGALS3	Galectin-3	1,8	1,8	17,2	1
P06396	GSN	Gelsolin	9,81	9,81	39,1	5
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9,96	9,96	31,6	5

P11216	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	8,48	8,48	40,7	5
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	13,06	13,07	42,9	8
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	6	6	35,1	3
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	16,29	16,29	34,7	8
Q5SSJ5	HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2
P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	16,1	1
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	HNRNPUL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P09429	HMGB1	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	HIST1H1C	Histone H1.2	4	4	34,3	2
Q93077	HIST1H2AC	Histone H2A type 1-C	2	16,01	68,5	10
Q16777	HIST2H2AC	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
Q99879	HIST1H2BM	Histone H2B type 1-M	24,12	24,12	70,6	14
P84243	H3F3A	Histone H3.3	3,89	3,89	63,2	2
P62805	HIST1H4A	Histone H4	16,76	16,76	69,9	9
Q14974	KPNB1	Importin subunit beta-1	2	2	16,3	1
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	2	2	8,4	1
P41252	IARS	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	2	13,4	1
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	7,82	7,82	24,8	4
Q9UHB6	LIMA1	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LMO7	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	4,01	4,01	25,9	3
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	2,24	2,24	40,9	1
Q14764	MVP	Major vault protein	2,3	2,3	31	1
P26038	MSN	Moesin	12,35	12,35	53	7
Q9NZM1	MYOF	Myoferlin	12,16	12,16	31,3	6
P60660	MYL6	Myosin light polypeptide 6	4,99	4,99	43,1	5
P19105	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	2,02	2,02	18,1	1
P35579	MYH9	Myosin-9	64,62	64,62	52	36
O43795	MYO1B	Myosin-1b	2,01	4,01	20,4	2
O00159	MYO1C	Myosin-1c	8,74	8,74	40,4	5
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	4,14	4,14	41,9	4
P19338	NCL	Nucleolin	8,07	8,07	37,5	4
P06748	NPM1	Nucleophosmin	6,24	6,24	33	3
P15531	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	2	2	40,8	1
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,02	4,02	45,5	2
P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2,07	2,07	43,1	1
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	6,21	6,21	44,7	3
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	3,04	3,2	29,8	2
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	10,13	10,13	49,9	5
Q15149	PLEC	Plectin	4,31	4,31	35,6	2
Q6NZI2	PTRF	Polymerase I and transcript release factor	4,02	4,02	35,4	2
P02545	LMNA	Prelamin-A/C	16,48	16,48	55,1	8
P13674	P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3,09	3,09	22,7	2
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	2	2	12,9	1
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	7,58	7,58	28,4	4
Q8N350	DOS	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	ENAH	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1

Q15436	SEC23A	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1
O94979	SEC31A	Protein transport protein Sec31A	4,01	4,01	14,4	2
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P14618	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	21,26	21,26	63,7	11
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	10,64	10,64	29,8	5
A6NIZ1		Ras-related protein Rap-1b-like protein	2	2	14,1	1
P08134	RHOC	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
Q9P2E9	RRBP1	Ribosome-binding protein 1	1,57	1,57	23,8	1
P50454	SERPINH1	Serpin H1	4,92	4,92	24,4	3
P02768	ALB	Serum albumin	6,32	6,32	36,8	11
P42224	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	13,63	13,63	30	7
Q13435	SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	2	2	23,1	1
Q7KZF4	SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	10,13	10,13	44	6
P38646	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q9Y490	TLN1	Talin-1	14,73	14,73	35,9	7
Q8NBS9	TXNDC5	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q01995	TAGLN	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
P67936	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	6,57	6,57	48,8	4
P68363	TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	27,96	27,96	53,9	16
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	28,18	28,18	56,5	20
Q13885	TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	3,88	24,26	56	17
Q13509	TUBB3	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
Q00341	HDLBP	Vigilin	2,02	2,02	24,3	1
P08670	VIM	Vimentin	78,96	78,96	94,2	53
P18206	VCL	Vinculin	13,21	13,21	45,3	7
Q15942	ZYX	Zyxin	2	2,01	14,3	1
Q13200	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P61247	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	2,98	2,98	36	2
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	5,95	5,95	27,8	3
P46782	RPS5	40S ribosomal protein S5	2	2	27	1
P62241	RPS8	40S ribosomal protein S8	3,65	3,65	56,7	2
P08865	RPSA	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
P62906	RPL10A	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1
P26373	RPL13	60S ribosomal protein L13	6,16	6,16	61,6	3
Q02543	RPL18A	60S ribosomal protein L18a	3,12	3,12	39,8	2
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	2	2	42,3	1
P39023	RPL3	60S ribosomal protein L3	2	2	31,3	1
P36578	RPL4	60S ribosomal protein L4	7,32	7,32	61,1	4
Q02878	RPL6	60S ribosomal protein L6	9,15	9,15	69,8	5
P18124	RPL7	60S ribosomal protein L7	4,01	4,01	68,2	2
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	2,42	2,42	33,5	1

Tabla – Anexo 4B. Proteínas específicamente identificadas en la IP+ en condrocitos aislados de pacientes con OA grado III. Las proteínas marcadas con formato negrita también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	32,82	32,82	60,6	17
P60709	Actin, cytoplasmic 1	29,04	29,04	62,9	21
P63261	Actin, cytoplasmic 2	29,04	29,04	62,9	22
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
P12814	Alpha-actinin-1	5,51	37,2	69,3	22
O43707	Alpha-actinin-4	42,71	42,71	60,9	24
P02511	Alpha-crystallin B chain	4,18	4,18	47,4	2
P06733	Alpha-enolase	26,98	26,98	58,1	14
P04083	Annexin A1	6,15	6,15	27,2	3
P07355	Annexin A2	48,92	48,92	86,1	30
P08758	Annexin A5	2	2	20,6	1
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
Q05682	Caldesmon	9,33	9,33	44	5
Q00610	Clathrin heavy chain 1	37,13	37,13	43,7	20
P53618	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	8,24	8,24	50	4
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	6
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	14,16	14,16	32,6	8
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	2	2	40,7	1
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	6	6	36,3	4
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	34
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	4	18,9	2
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	2,36	2,36	26,4	1
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	27	1
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	7,31	7,31	35,1	4
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	20,9	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	8,94	8,94	29,2	6
P26641	Elongation factor 1-gamma	5,08	5,08	26,5	3
P13639	Elongation factor 2	19,24	19,24	34,4	9
P14625	Endoplasmin	22,57	22,57	38,5	11
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
P21333	Filamin-A	73,44	73,44	44,6	36
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,56	7,56	38,5	4
P17931	Galectin-3	1,8	1,8	17,2	1
P06396	Gelsolin	9,81	9,81	39,1	5
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9,96	9,96	31,6	5
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	8,48	8,48	40,7	5
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	13,06	13,07	42,9	8
P04792	Heat shock protein beta-1	6	6	35,1	3
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	16,29	16,29	34,7	8
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2

P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	16,1	1
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P09429	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	Histone H1.2	4	4	34,3	2
Q93077	Histone H2A type 1-C	2	16,01	68,5	10
Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
Q99879	Histone H2B type 1-M	24,12	24,12	70,6	14
P84243	Histone H3.3	3,89	3,89	63,2	2
P62805	Histone H4	16,76	16,76	69,9	9
Q14974	Importin subunit beta-1	2	2	16,3	1
P05556	Integrin beta-1	2	2	8,4	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	2	13,4	1
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	4,01	4,01	25,9	3
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2,24	2,24	40,9	1
Q14764	Major vault protein	2,3	2,3	31	1
P26038	Moesin	12,35	12,35	53	7
Q9NZM1	Myoferlin	12,16	12,16	31,3	6
P60660	Myosin light polypeptide 6	4,99	4,99	43,1	5
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	2,02	2,02	18,1	1
P35579	Myosin-9	64,62	64,62	52	36
O43795	Myosin-Ib	2,01	4,01	20,4	2
O00159	Myosin-Ic	8,74	8,74	40,4	5
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	4,14	4,14	41,9	4
P19338	Nucleolin	8,07	8,07	37,5	4
P06748	Nucleophosmin	6,24	6,24	33	3
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	2	2	40,8	1
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,02	4,02	45,5	2
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2,07	2,07	43,1	1
Q06830	Peroxiredoxin-1	6,21	6,21	44,7	3
P32119	Peroxiredoxin-2	3,04	3,2	29,8	2
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	10,13	10,13	49,9	5
Q15149	Plectin	4,31	4,31	35,6	2
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	4,02	4,02	35,4	2
P02545	Prelamin-A/C	16,48	16,48	55,1	8
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3,09	3,09	22,7	2
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	2	2	12,9	1
P07237	Protein disulfide-isomerase	7,58	7,58	28,4	4
Q8N350	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1
Q15436	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1
O94979	Protein transport protein Sec31A	4,01	4,01	14,4	2
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	21,26	21,26	63,7	11
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	10,64	10,64	29,8	5
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	2	2	14,1	1
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1,57	1,57	23,8	1
P50454	Serpin H1	4,92	4,92	24,4	3
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	13,63	13,63	30	7
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	2	2	23,1	1

Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	10,13	10,13	44	6
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q9Y490	Talin-1	14,73	14,73	35,9	7
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q01995	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	6,57	6,57	48,8	4
P68363	Tubulin alpha-1B chain	27,96	27,96	53,9	16
P07437	Tubulin beta chain	28,18	28,18	56,5	20
Q13885	Tubulin beta-2A chain	3,88	24,26	56	17
Q13509	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
Q00341	Vigilin	2,02	2,02	24,3	1
P08670	Vimentin	78,96	78,96	94,2	53
P18206	Vinculin	13,21	13,21	45,3	7
Q15942	Zyxin	2	2,01	14,3	1
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,98	2,98	36	2
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	5,95	5,95	27,8	3
P46782	40S ribosomal protein S5	2	2	27	1
P62241	40S ribosomal protein S8	3,65	3,65	56,7	2
P08865	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1
P26373	60S ribosomal protein L13	6,16	6,16	61,6	3
Q02543	60S ribosomal protein L18a	3,12	3,12	39,8	2
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	42,3	1
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	31,3	1
P36578	60S ribosomal protein L4	7,32	7,32	61,1	4
Q02878	60S ribosomal protein L6	9,15	9,15	69,8	5
P18124	60S ribosomal protein L7	4,01	4,01	68,2	2
P62424	60S ribosomal protein L7a	2,42	2,42	33,5	1

Tabla – Anexo 4C. Proteínas identificadas en la IP+ y IP-, con un mayor número de péptidos en la IP+, en condrocitos aislados de cartílago articular de pacientes OA con grado III de la enfermedad. A la derecha se muestra la diferencia del número de péptidos entre las IPs (IP+ e IP-).

ID	Proteína	<i>Protscore Total</i>	<i>Unused Protscore</i>	<i>Sequence Coverage (%)</i>	Diferencia de péptidos
P60709	Actin, cytoplasmic 1	29,04	29,04	62,9	4
P07355	Annexin A2	48,92	48,92	86,1	29
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	5
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	29
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	4
P62805	Histone H4	16,76	16,76	69,9	7
P02545	Prelamin-A/C	16,48	16,48	55,1	6

Tabla – Anexo 4D. Lista de proteínas identificadas exclusivamente en pacientes OA grado III (**Tabla – Anexo 4A**) frente a las proteínas identificadas en donantes sanos (**Tabla - Anexo 1A**). En formato negrita se indican aquellas proteínas que también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	<i>Protscore Total</i>	<i>Protscore Unused</i>	<i>Sequence Coverage (%)</i>	Péptidos (95%)
P63261	Actin, cytoplasmic 2	29,04	29,04	62,9	22
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
P12814	Alpha-actinin-1	5,51	37,2	69,3	22
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
Q00610	Clathrin heavy chain 1	37,13	37,13	43,7	20
P53618	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	6
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	14,16	14,16	32,6	8
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	6	6	36,3	4
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	34
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	20,9	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	8,94	8,94	29,2	6
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P09429	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	Histone H1.2	4	4	34,3	2
Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
Q99879	Histone H2B type 1-M	24,12	24,12	70,6	14
P05556	Integrin beta-1	2	2	8,4	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	2	13,4	1
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2,24	2,24	40,9	1
Q9NZM1	Myoferlin	12,16	12,16	31,3	6
P60660	Myosin light polypeptide 6	4,99	4,99	43,1	5
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	2,02	2,02	18,1	1
O00159	Myosin-Ic	8,74	8,74	40,4	5
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	4,14	4,14	41,9	4
P06748	Nucleophosmin	6,24	6,24	33	3
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	2	2	40,8	1
P32119	Peroxiredoxin-2	3,04	3,2	29,8	2
Q15149	Plectin	4,31	4,31	35,6	2
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3,09	3,09	22,7	2
Q8N350	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1
Q15436	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1

O94979	Protein transport protein Sec31A	4,01	4,01	14,4	2
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	10,64	10,64	29,8	5
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	2	2	14,1	1
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1,57	1,57	23,8	1
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	2	2	23,1	1
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q01995	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
Q13509	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
Q00341	Vigilin	2,02	2,02	24,3	1
Q15942	Zyxin	2	2,01	14,3	1
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,98	2,98	36	2
P08865	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1
P26373	60S ribosomal protein L13	6,16	6,16	61,6	3
Q02543	60S ribosomal protein L18a	3,12	3,12	39,8	2
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	42,3	1

Tabla – Anexo 4E. Lista de proteínas identificadas en pacientes OA grado III (**Tabla – Anexo 4A**) y donantes sanos (**Tabla – Anexo 1A**). A la derecha se muestra la diferencia en el número de péptidos.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)	Diferencia de péptidos
P02545	Prelamin-A/C	16,48	16,48	55,1	8	-7
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	2,36	2,36	26,4	1	-2
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2,07	2,07	43,1	1	-2
P62805	Histone H4	16,76	16,76	69,9	9	-2
P62424	60S ribosomal protein L7a	2,42	2,42	33,5	1	-1
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	2	2	40,7	1	-1
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	2	2	12,9	1	-1
P62241	40S ribosomal protein S8	3,65	3,65	56,7	2	-1
P18124	60S ribosomal protein L7	4,01	4,01	68,2	2	-1
P84243	Histone H3.3	3,89	3,89	63,2	2	-1
O43795	Myosin-Ib	2,01	4,01	20,4	2	-1
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	5,95	5,95	27,8	3	-1
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	4,01	4,01	25,9	3	-1
Q06830	Peroxiredoxin-1	6,21	6,21	44,7	3	-1
P46782	40S ribosomal protein S5	2	2	27	1	0
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	31,3	1	0
P08758	Annexin A5	2	2	20,6	1	0
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	27	1	0
P17931	Galectin-3	1,8	1,8	17,2	1	0
Q14974	Importin subunit beta-1	2	2	16,3	1	0
Q14764	Major vault protein	2,3	2,3	31	1	0
P02511	Alpha-crystallin B chain	4,18	4,18	47,4	2	0
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,02	4,02	45,5	2	0
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	4,02	4,02	35,4	2	0
P26641	Elongation factor 1-gamma	5,08	5,08	26,5	3	0
P04792	Heat shock protein beta-1	6	6	35,1	3	0
P50454	Serpin H1	4,92	4,92	24,4	3	0
P07237	Protein disulfide-isomerase	7,58	7,58	28,4	4	0
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	6,57	6,57	48,8	4	0
Q02878	60S ribosomal protein L6	9,15	9,15	69,8	5	0
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9,96	9,96	31,6	5	0
P07355	Annexin A2	48,92	48,92	86,1	30	0
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	16,1	1	1
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	4	18,9	2	1
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	8,24	8,24	50	4	1
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	21,26	21,26	63,7	11	1
P04083	Annexin A1	6,15	6,15	27,2	3	2
P36578	60S ribosomal protein L4	7,32	7,32	61,1	4	2
P19338	Nucleolin	8,07	8,07	37,5	4	2
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	10,13	10,13	44	6	2
P26038	Moesin	12,35	12,35	53	7	2
P13639	Elongation factor 2	19,24	19,24	34,4	9	2

Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12	2
P68363	Tubulin alpha-1B chain	27,96	27,96	53,9	16	2
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	7,31	7,31	35,1	4	3
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,56	7,56	38,5	4	3
Q9Y490	Talin-1	14,73	14,73	35,9	7	3
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	13,06	13,07	42,9	8	3
Q05682	Caldesmon	9,33	9,33	44	5	4
P06396	Gelsolin	9,81	9,81	39,1	5	4
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	8,48	8,48	40,7	5	4
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	10,13	10,13	49,9	5	4
P18206	Vinculin	13,21	13,21	45,3	7	4
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	16,29	16,29	34,7	8	4
P21333	Filamin-A	73,44	73,44	44,6	36	4
P60709	Actin, cytoplasmic 1	29,04	29,04	62,9	21	5
P08670	Vimentin	78,96	78,96	94,2	53	5
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	13,63	13,63	30	7	6
Q13885	Tubulin beta-2A chain	3,88	24,26	56	17	7
P14625	Endoplasmic	22,57	22,57	38,5	11	8
P07437	Tubulin beta chain	28,18	28,18	56,5	20	9
P06733	Alpha-enolase	26,98	26,98	58,1	14	10
O43707	Alpha-actinin-4	42,71	42,71	60,9	24	15
P35579	Myosin-9	64,62	64,62	52	36	29

Tabla – Anexo 4F. Lista de proteínas identificadas exclusivamente en pacientes OA grado III (**Tabla - Anexo 4A**) frente a proteínas identificadas en pacientes OA grado I (**Tabla - Anexo 3A**). En formato negrita se indican aquellas proteínas que también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P08865	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
P60709	Actin, cytoplasmic 1	29,04	29,04	62,9	21
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
O43707	Alpha-actinin-4	42,71	42,71	60,9	24
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
P53618	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	8,24	8,24	50	4
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	2	2	40,7	1
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	7,31	7,31	35,1	4
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P09429	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	Histone H1.2	4	4	34,3	2
Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
Q14974	Importin subunit beta-1	2	2	16,3	1
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
Q14764	Major vault protein	2,3	2,3	31	1
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	2	2	40,8	1
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	2	2	12,9	1
Q8N350	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1
Q15436	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	13,63	13,63	30	7
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q01995	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
P68363	Tubulin alpha-1B chain	27,96	27,96	53,9	16
Q13509	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
Q15942	Zyxin	2	2,01	14,3	1

Tabla – Anexo 4G. Lista de proteínas identificadas en pacientes OA grado III (**Tabla - Anexo 4A**) y OA grado I (**Tabla - Anexo 3A**). A la derecha se muestra la diferencia en el número de péptidos.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)	Diferencia de péptidos
P08670	Vimentin	78,96	78,96	94,2	53	-105
Q00610	Clathrin heavy chain 1	37,13	37,13	43,7	20	-21
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	34	-20
P02545	Prelamin-A/C	16,48	16,48	55,1	8	-13
P07355	Annexin A2	48,92	48,92	86,1	30	-10
P62805	Histone H4	16,76	16,76	69,9	9	-9
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	6	6	36,3	4	-7
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	6	-6
P84243	Histone H3.3	3,89	3,89	63,2	2	-6
Q15149	Plectin	4,31	4,31	35,6	2	-6
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1,57	1,57	23,8	1	-6
P02511	Alpha-crystallin B chain	4,18	4,18	47,4	2	-5
P62241	40S ribosomal protein S8	3,65	3,65	56,7	2	-3
P04083	Annexin A1	6,15	6,15	27,2	3	-3
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	14,16	14,16	32,6	8	-3
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	2,36	2,36	26,4	1	-3
Q93077	Histone H2A type 1-C	2	16,01	68,5	10	-3
Q99879	Histone H2B type 1-M	24,12	24,12	70,6	14	-2
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	4,01	4,01	25,9	3	-2
Q06830	Peroxiredoxin-1	6,21	6,21	44,7	3	-2
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	5,95	5,95	27,8	3	-1
Q02543	60S ribosomal protein L18a	3,12	3,12	39,8	2	-1
P26641	Elongation factor 1-gamma	5,08	5,08	26,5	3	-1
P04792	Heat shock protein beta-1	6	6	35,1	3	-1
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2	2	16,1	1	-1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	2	13,4	1	-1
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	2,02	2,02	18,1	1	-1
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,02	4,02	45,5	2	-1
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2,07	2,07	43,1	1	-1
P32119	Peroxiredoxin-2	3,04	3,2	29,8	2	-1
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	2	2	14,1	1	-1
Q9Y490	Talin-1	14,73	14,73	35,9	7	-1
Q00341	Vigilin	2,02	2,02	24,3	1	-1
P46782	40S ribosomal protein S5	2	2	27	1	0
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1	0
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1	0
P26373	60S ribosomal protein L13	6,16	6,16	61,6	3	0
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	42,3	1	0
P39023	60S ribosomal protein L3	2	2	31,3	1	0
P62424	60S ribosomal protein L7a	2,42	2,42	33,5	1	0
P08758	Annexin A5	2	2	20,6	1	0
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	4	18,9	2	0
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	27	1	0
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	20,9	1	0

P05556	Integrin beta-1	2	2	8,4	1	0
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2,24	2,24	40,9	1	0
P60660	Myosin light polypeptide 6	4,99	4,99	43,1	5	0
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	4,02	4,02	35,4	2	0
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	21,26	21,26	63,7	11	0
P50454	Serpin H1	4,92	4,92	24,4	3	0
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	2	2	23,1	1	0
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,98	2,98	36	2	1
Q02878	60S ribosomal protein L6	9,15	9,15	69,8	5	1
P06733	Alpha-enolase	26,98	26,98	58,1	14	1
P26038	Moesin	12,35	12,35	53	7	1
O43795	Myosin-Ib	2,01	4,01	20,4	2	1
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3,09	3,09	22,7	2	1
P07237	Protein disulfide-isomerase	7,58	7,58	28,4	4	1
O94979	Protein transport protein Sec31A	4,01	4,01	14,4	2	1
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	6,57	6,57	48,8	4	1
P36578	60S ribosomal protein L4	7,32	7,32	61,1	4	2
P18124	60S ribosomal protein L7	4,01	4,01	68,2	2	2
P19338	Nucleolin	8,07	8,07	37,5	4	2
P06748	Nucleophosmin	6,24	6,24	33	3	2
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	10,13	10,13	49,9	5	2
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	10,64	10,64	29,8	5	2
Q13885	Tubulin beta-2A chain	3,88	24,26	56	17	2
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	8,94	8,94	29,2	6	3
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	7,56	7,56	38,5	4	3
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9,96	9,96	31,6	5	3
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	8,48	8,48	40,7	5	3
O00159	Myosin-Ic	8,74	8,74	40,4	5	3
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	4,14	4,14	41,9	4	3
P63261	Actin, cytoplasmic 2	4	29,04	62,9	22	4
Q05682	Caldesmon	9,33	9,33	44	5	4
P06396	Gelsolin	9,81	9,81	39,1	5	4
Q9NZM1	Myoferlin	12,16	12,16	31,3	6	4
P07437	Tubulin beta chain	28,18	28,18	56,5	20	4
P13639	Elongation factor 2	19,24	19,24	34,4	9	5
P35579	Myosin-9	64,62	64,62	52	36	5
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	10,13	10,13	44	6	5
P18206	Vinculin	13,21	13,21	45,3	7	5
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	13,06	13,07	42,9	8	6
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	16,29	16,29	34,7	8	6
P14625	Endoplasmic	22,57	22,57	38,5	11	9
P21333	Filamin-A	73,44	73,44	44,6	36	13
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	32,82	32,82	60,6	17	14
P12814	Alpha-actinin-1	5,51	37,2	69,3	22	18

Tabla – Anexo 4H. Lista de proteínas identificadas exclusivamente en donantes sanos. En formato **negrita** se indican aquellas proteínas que también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	<i>Protscore Total</i>	<i>Protscore Unused</i>	<i>Sequence Coverage (%)</i>	Péptidos (95%)
P39019	40S ribosomal protein S19	2	2	33,1	1
P62854	40S ribosomal protein S26	2	2	50,4	1
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	2	2	16,5	1
P61313	60S ribosomal protein L15	2,03	2,03	21,6	1
P18621	60S ribosomal protein L17	2	2	22,3	1
P46778	60S ribosomal protein L21	2,04	2,04	23,8	1
P61254	60S ribosomal protein L26	2	2	7,6	1
P46776	60S ribosomal protein L27a	2	2	8,8	1
P18077	60S ribosomal protein L35a	2	2	19,1	1
Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36	4	4	21,9	2
Q9P1U1	Actin-related protein 3B	2	2	7,7	1
P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	2	2	13,8	1
P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	2	2	7,8	1
P15311	Erzin	2	2	3,9	1
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2	2	17,5	1
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	2	2	11,1	1
Q9BTM1	Histone H2A.J	12,05	12,05	63,6	6
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	12,9	12,9	57,9	9
P06314	Ig kappa chain V-IV region B17	2	2	6,7	1
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1,68	1,68	11,4	1
P60903	Protein S100-A10	2	2	14,4	1
P31949	Protein S100-A11	2	2	10,5	1
P06703	Protein S100-A6	2	2	16,7	1
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	6,2	6,2	17,1	3
P62834	Ras-related protein Rap-1A	2	2	7,6	1
Q6NW29	RWD domain-containing protein 4A	1,64	1,64	13,8	1
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	2	2	31,8	1
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	2	2	15,3	1
P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	4	4	24,2	2
P61586	Transforming protein RhoA	2	2	17,6	1
P68371	Tubulin beta-2C chain	14,89	14,89	42,9	8
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2,3	2,3	24,4	1
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	2	2	18,1	1

Tabla – Anexo 4I. Lista de proteínas identificadas exclusivamente en pacientes OA grado III (**Tabla - Anexo 4A**) y grado I (**Tabla - Anexo 3A**). El color azul indica las proteínas identificadas en pacientes OA grado I, el color negro indica las proteínas identificadas en donantes OA grado III. En formato negrita se indican aquellas proteínas que también se identificaron en la IP-.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	2	2	13	1
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	4	4	28,2	2
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P62280	40S ribosomal protein S11	8,01	8,01	74,7	4
P62277	40S ribosomal protein S13	9,38	9,38	64,2	6
P08708	40S ribosomal protein S17	2	2	20	1
P62851	40S ribosomal protein S25	2	2	40,8	1
P61247	40S ribosomal protein S3a	2,25	2,25	43,9	1
P08865	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	28,1	1
P62906	60S ribosomal protein L10a	2	2	24,4	1
Q96L21	60S ribosomal protein L10-like	4	4	59,8	2
P26373	60S ribosomal protein L13	6,16	6,16	61,6	3
P26373	60S ribosomal protein L13	6,7	6,7	71,6	3
P50914	60S ribosomal protein L14	2,01	2,01	30,2	1
Q02543	60S ribosomal protein L18a	3,12	3,12	39,8	2
Q02543	60S ribosomal protein L18a	6,66	6,66	53,4	3
P35268	60S ribosomal protein L22	1,42	1,42	46,1	1
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	46,8	1
P62750	60S ribosomal protein L23a	2	2	42,3	1
P61353	60S ribosomal protein L27	2	2	41,9	1
P62888	60S ribosomal protein L30	3,77	3,77	53,9	2
P63173	60S ribosomal protein L38	2	2	21,4	1
P32969	60S ribosomal protein L9	2	2	30,2	1
P63261	Actin, cytoplasmic 2	4	29,04	62,9	22
P63261	Actin, cytoplasmic 2	31,39	31,39	72	26
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	4,97	4,97	50,6	3
P61158	Actin-related protein 3	1,83	1,83	26,8	1
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
P12814	Alpha-actinin-1	5,51	37,2	69,3	22
P12814	Alpha-actinin-1	8,11	8,11	37,9	4
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1,63	1,63	28,1	1
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
Q00610	Clathrin heavy chain 1	37,13	37,13	43,7	20
Q00610	Clathrin heavy chain 1	43,3	43,3	44,8	21
P53621	Coatomer subunit alpha	2	2	28,8	1
P53618	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	10,29	10,29	51,3	6
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	21,28	21,28	57,1	12
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	14,16	14,16	32,6	8

Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	23,48	23,48	41,2	11
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	6	6	36,3	4
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	14,25	14,25	56,1	11
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	61,62	61,62	47,5	34
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	95,44	95,44	53,9	54
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	4	18,9	2
P52943	Cysteine-rich protein 2	2,61	2,61	44,7	2
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	2,36	2,36	26,4	1
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2	2	27	1
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
P60981	Dextrin	2,14	2,14	44,2	1
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	20,9	1
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	2	2	26,4	1
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	2,19	2,19	29,7	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	8,94	8,94	29,2	6
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	4	4	31,8	3
P29692	Elongation factor 1-delta	2	2	30,6	1
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
Q9GZV4	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	2	2	40,5	1
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	4	4	21,1	2
P49327	Fatty acid synthase	4,14	4,14	27,2	2
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	2	2	23,4	1
P09211	Glutathione S-transferase P	17,18	17,18	59,5	13
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	3,91	3,91	34,3	2
P09429	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	Histone H1.2 OS	4	4	34,3	2
Q6FI13	Histone H2A type 2-A	20,17	20,17	86,9	14
Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
P33778	Histone H2B type 1-B	2,24	18,63	86,5	14
Q99879	Histone H2B type 1-M	24,12	24,12	70,6	14
Q99879	Histone H2B type 1-M	22,53	22,53	98,4	16
P01834	Ig kappa chain C region	2,65	2,65	32,1	2
P06756	Integrin alpha-V	2,03	2,03	20,9	1
P05556	Integrin beta-1	2	2	8,4	1
P05556	Integrin beta-1	2	2	18,9	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	2	13,4	1
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	3,41	3,41	20,2	2
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	2,03	2,03	33,4	1
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	46,42	46,42	73,8	29
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	21,16	21,16	46,6	12
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2,24	2,24	40,9	1
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2	2	23,5	1
P43243	Matrin-3	2,05	2,05	27,4	1
Q9NZM1	Myoferlin	12,16	12,16	31,3	6
Q9NZM1	Myoferlin	4,03	4,03	24,3	2
P60660	Myosin light polypeptide 6	4,99	4,99	43,1	5

P60660	Myosin light polypeptide 6	6,02	6,02	61,6	5
P35580	Myosin-10	2,15	11,36	46,5	7
O00159	Myosin-Ic	8,74	8,74	40,4	5
O00159	Myosin-Ic	4,47	4,47	45,3	2
O94832	Myosin-IId	1,51	1,51	29,6	1
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	4,14	4,14	41,9	4
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2,12	2,12	41,6	1
P06748	Nucleophosmin	6,24	6,24	33	3
P06748	Nucleophosmin	1,87	1,87	36,7	1
P32119	Peroxioredoxin-2	3,04	3,2	29,8	2
P32119	Peroxioredoxin-2	6,21	6,21	38,9	3
Q13162	Peroxioredoxin-4	2	4	18,5	4
Q15149	Plectin	4,31	4,31	35,6	2
Q15149	Plectin	12,72	12,72	49,6	8
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	4,03	4,03	31,8	2
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	3,09	3,09	22,7	2
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	2	2	17,4	1
Q13015	Protein AF1q	2	2	38,9	1
Q8N350	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1
Q9Y6V0	Protein piccolo	1,81	1,81	19,2	1
Q15436	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1
O94979	Protein transport protein Sec31A	4,01	4,01	14,4	2
O94979	Protein transport protein Sec31A	2,01	2,01	16,7	1
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	10,64	10,64	29,8	5
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	6,45	6,45	28,2	3
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	2	2	14,1	1
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	3,89	3,89	29,4	2
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1,57	1,57	23,8	1
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	12,11	12,11	46,9	7
Q15019	Septin-2	2	2	21,3	1
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	1,77	1,77	63,4	1
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	2	2	23,1	1
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	1,52	1,52	34,3	1
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	2,32	2,32	19,8	1
Q01995	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	22,06	22,06	68,6	14
P07437	Tubulin beta chain	28,18	28,18	56,5	20
Q13509	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	8,11	8,11	71,1	4
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
P26640	Valyl-tRNA synthetase	2,75	2,75	21,3	2
Q00341	Vigilin	2,02	2,02	24,3	1
Q00341	Vigilin	3,84	3,84	34,6	2
Q15942	Zyxin	2	2,01	14,3	1

Tabla – Anexo 4J. Lista de proteínas exclusivamente identificadas en pacientes OA grado III.

ID	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2	2	7,3	1
P08865	40S ribosomal protein SA	2,61	2,61	29,2	2
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	2	2	24,7	1
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	2,82	2,82	16	2
P53396	ATP-citrate synthase	3,96	3,96	18,1	2
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	1,34	1,34	23,4	1
P53618	Coatomer subunit beta	2,03	2,03	16,8	1
Q9Y678	Coatomer subunit gamma	6,47	6,47	24,5	4
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	2,28	2,28	34,5	1
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2	2	12,5	1
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2,01	2,01	31	1
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	17,9	2
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	9,76	9,76	32	5
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	2	2	18,9	1
P09429	High mobility group protein B1	1,73	1,73	23,7	2
P16403	Histone H1.2 OS	4	4	34,3	2
Q16777	Histone H2A type 2-C	19,28	19,28	84,5	12
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	3,07	3,07	28,7	2
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	2,53	2,53	25,9	2
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	2	2	40,8	1
Q8N350	Protein Dos	2,01	2,01	24,6	1
Q8N8S7	Protein enabled homolog	2	2	27,8	1
Q15436	Protein transport protein Sec23A	2	2	21,8	1
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	9,71	9,71	33,5	6
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,54	1,54	22,3	1
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	5,26	5,26	31,1	3
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	2	2	21,8	1
Q01995	Transgelin	1,39	1,39	42,3	1
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2	2	22,2	1
Q13509	Tubulin beta-3 chain	1,44	16,15	42	12
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2	2	18,1	1
Q15942	Zyxin	2	2,01	14,3	1

Tabla – Anexo 5. Proteínas que interactúan con la Cx43 identificadas en pacientes con OA grado III utilizando el tampón de lisis – IP conteniendo detergentes iónicos y cromatografía HPLC acoplada a espectrometría de masas. El color negro indica las proteínas ya identificadas en pacientes OA grado I y grado III (**Tabla - Anexo 3A** y **Tabla - Anexo 4A**, respectivamente). El color azul indica las proteínas identificadas exclusivamente bajo las nuevas condiciones experimentales, tampón de lisis - IP con detergentes iónicos. En la realización de este estudio se han utilizado una $n = 3$ correspondiente a tres IPs de 3 pacientes con OA de grado III.

ID	Gen	Proteína	Protscore Total	Protscore Unused	Sequence Coverage (%)	Péptidos (95%)
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	6,68	6,68	54,1	4
P06733	ENO1	Alpha-enolase	9,07	9,07	55,5	5
P04083	ANXA1	Annexin A1	2,31	2,31	30,4	1
P07355	ANXA2	Annexin A2	18,29	18,29	58,7	9
P08758	ANXA5	Annexin A5	2	2	22,2	1
Q9H251	CDH23	Cadherin-23	1,82	1,82	7,2	1
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	6,63	6,63	20,1	3
P21333	FLNA	Filamin-A	4,01	4,01	22,5	2
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	4	4	27,1	2
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4	4	44,8	3
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,5	1,5	24,2	1
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	2,16	2,16	36,6	1
Q6F113	HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-A	2,06	2,06	64,6	1
P01834	IGKC	Ig kappa chain C region	2	2	32,1	1
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	2,01	2,01	17,1	1
P35527	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	10,7	10,7	41,4	7
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	22,14	22,14	34,3	11
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	9,16	4,26	41,6	6
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	4	4	22,9	2
Q9GZW8	MS4A7	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 7	2	2	7,1	1
P26038	MSN	Moesin	6	6	36,2	3
Q7Z406	MYH14	Myosin-14	2,01	2,01	23,6	1
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	2	2	30,9	1
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	2,44	2,44	47,7	1
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	2,02	2,02	14,7	1
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	4,04	4,04	33,8	2
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	2,19	2,19	24,6	1
P14618	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	12,84	12,84	48,6	7
P02768	ALB	Serum albumin	13,06	13,06	27,1	13
Q9BQE3	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	13,96	13,96	50,1	8
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	10,13	10,13	36,9	6
P08670	VIM	Vimentin	29,93	29,93	68	19

Artículos

Proteomic Analysis of Connexin 43 Reveals Novel Interactors Related to Osteoarthritis*[§]

Raquel Gago-Fuentes‡, Patricia Fernández-Puente§¶, Diego Megias||, Paula Carpintero-Fernández‡, Jesus Mateos§¶, Benigno Acea‡, Eduardo Fonseca‡, Francisco Javier Blanco§¶, and Maria Dolores Mayan‡**

We have previously reported that articular chondrocytes in tissue contain long cytoplasmic arms that physically connect two distant cells. Cell-to-cell communication occurs through connexin channels termed Gap Junction (GJ) channels, which achieve direct cellular communication by allowing the intercellular exchange of ions, small RNAs, nutrients, and second messengers. The Cx43 protein is overexpressed in several human diseases and inflammation processes and in articular cartilage from patients with osteoarthritis (OA). An increase in the level of Cx43 is known to alter gene expression, cell signaling, growth, and cell proliferation. The interaction of proteins with the C-terminal tail of connexin 43 (Cx43) directly modulates GJ-dependent and -independent functions. Here, we describe the isolation of Cx43 complexes using mild extraction conditions and immunoaffinity purification. Cx43 complexes were extracted from human primary articular chondrocytes isolated from healthy donors and patients with OA. The proteomic content of the native complexes was determined using LC-MS/MS, and protein associations with Cx43 were validated using Western blot and immunolocalization experiments. We identified >100 Cx43-associated proteins including previously uncharacterized proteins related to nucleolar functions, RNA transport, and translation. We also identified several proteins

involved in human diseases, cartilage structure, and OA as novel functional Cx43 interactors, which emphasized the importance of Cx43 in the normal physiology and structural and functional integrity of chondrocytes and articular cartilage. Gene Ontology (GO) terms of the proteins identified in the OA samples showed an enrichment of Cx43-interactors related to cell adhesion, calmodulin binding, the nucleolus, and the cytoskeleton in OA samples compared with healthy samples. However, the mitochondrial proteins SOD2 and ATP5J2 were identified only in samples from healthy donors. The identification of Cx43 interactors will provide clues to the functions of Cx43 in human cells and its roles in the development of several diseases, including OA. *Molecular & Cellular Proteomics* 14: 10.1074/mcp.M115.050211, 1831–1845, 2015.

Direct intercellular communication is accomplished in nearly all tissues and organs by aqueous, low-resistance pores located in the lipid bilayer of the contacted cells. These pores, named gap junctions (GJ)¹, are composed of connexins (Cxs) and play critical developmental and functional roles (1, 2). Numerous processes, such as the diffusion of metabolites, nutrients, small RNAs and second messengers, and the rapid transmission of action potentials in heart or neuronal tissue via so-called electrical synapses, are driven by GJ communication (3–7). The junctional channel is composed of two end-to-end hemichannels, each of which is a hexamer of six subunits of Cxs that dock with each other to form a contiguous gap junctional channel. Cxs proteins have a common topology that includes four α -helical transmembrane domains, two extracellular loops, a cytoplasmic loop, and N- and C termini located on the cytoplasmic membrane face. Cx43 (the 43-kDa isoform) is the most widely expressed GJ protein in different cell types (8). Yet, as many

From the ‡CellCOM Research Group. Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), XXIAC, University of A Coruña. Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain; §Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII, Proteomics Group, Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), XXIAC, University of A Coruña. Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain; ¶Rheumatology Division, CIBERBBN/ISCIII, Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), XXIAC, University of A Coruña. Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain; ||Confocal Microscopy Core Unit. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029, Madrid, Spain

Received April 2, 2015, and in revised form, April 2, 2015

Published, MCP Papers in Press, April 22, 2015, DOI 10.1074/mcp.M115.050211

Author contributions: RG-F designed and performed the experiments and performed data analyses. PC-F performed the experiments. PF-P and JM performed the mass-spec runs and processed the data. DM performed immunofluorescence analysis. BA and EF provided critical input. FJB participated in design of experiments. MDM conceived the study, designed and performed the experiments (IHC analysis), designed and performed the data and bioinformatic analyses (GO, comparisons with other studies) and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

¹ The abbreviations used are: GJ, gap junction; ACN, acetonitrile; Co-IP, co-immunoprecipitation; CTD, carboxy-terminal domain; Cx43, connexin 43; DTT, dithiothreitol; ECM, extracellular Matrix; GJIC, gap junctional intercellular communication; GO, Gene Ontology; IAA, iodoacetamide; IHC, immunohistochemistry; IP, immunoprecipitation; OA, osteoarthritis; TFA, trifluoroacetic acid.

as 20 murine and 21 human Cx isoforms have been identified (9).

Cx43 has a relatively large carboxy-terminal domain (CTD) that takes part in multiple proteomic interactions. Increasing evidence indicates that gap-junctional Cx43 is part of a multiprotein complex and that Cx43-interacting proteins are thought to form a dynamic scaffolding protein complex, termed the Nexus, that may function as a platform to localize signaling, structural, and cytoskeletal proteins (10, 11). Indeed many aspects of Cx43 function, for example cellular transport, plaque assembly and stability, and channel conductivity are most likely governed by interactions with regulatory and structural proteins that bind to the cytoplasmic domains of Cx43. These proteins include the tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) (12–14), 14–3-3 (15), Drebrin (16), β -tubulin (17), c-Src, v-Src (10), and other potential Cx43-interacting proteins that target Cx43 to points of cell-cell contact and regulate gap junctional intercellular communication (GJIC) (10).

Initially, the cellular functions of Cxs were attributed exclusively to direct cell-to-cell diffusion; however, some Cx functions seem to be independent of channel function (18). In fact, several reports have suggested that the Cx43 complex might fulfil functions that are not necessarily related to the control of GJIC. For instance, Cx43 mutants lacking the C-terminal tail that were expressed in transformed cells restored the GJIC but inhibited proliferation (19). Moreover, a Cx43 mutant that does not form GJ has been shown to suppress cell growth (20), and the expression of the C-terminal tail alone was sufficient to reduce proliferation (19, 21). On the other hand, the overexpressed C-terminal tail of Cx43 localized to the nucleus and inhibited cell growth (21, 22). These and other studies raise the possibility that the C-terminal tail of Cx43 can control cell-cycle, gene expression, or different signaling pathways via binding proteins independently of its channel function (18).

The channel-independent effects of Cxs might be explained by the (dys)function of Cx-tail interaction proteins. Our group is interested in investigating the physiopathological mechanism that is associated with osteoarthritis (OA). Recent results suggest a direct role of Cx43 in the development of OA that is not necessarily related to its channel function (7, 23, 24). For instance, only a few connexin-interacting proteins have been described to date, and previous studies have used artificial systems, such as yeast two-hybrid screens or Cx43-domain fusion proteins. The aim of this study was to identify Cx43-interacting proteins in primary articular chondrocytes from human adults. In this report, lysates of primary articular chondrocytes were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody directed against the C-terminal tail of Cx43. Cx43 interactors were identified using liquid chromatography and mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). We have identified >100 Cx43 associated proteins. Among these, we have found out novel functional Cx43 interactors involved in human dis-

ease and OA development, which emphasizes the potential importance of Cx43-interactions in normal development and physiology.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cartilage Collection, Processing, and Primary Culture of Chondrocytes—Human knee and femoral head articular cartilage samples were generously obtained from adult donors undergoing joint surgery. All donors signed an informed consent form, and the institutional Ethics Committee approved the study (Registration Code Galicia CAEIG: 2012/094 - PI13/00591). *In situ* cartilage samples were frozen immediately in Cryomold® Standard using Tissue-Tek® O.C.T.™ compound and isopentane in liquid nitrogen and stored at -80°C . Cartilage from healthy persons was obtained *in situ* from individuals who suffered a knee or hip fracture with no history of joint disease. Healthy samples were assigned on based on their medical record data and histological study. Histological samples (healthy and OA with radiologic diagnosis) were graded using the modified Mankin score (23) (mean age: 71.38 years, range: 63 to 89 years; Mankin score: 0–13 points). The samples (OA patients and age-matched healthy subjects) were divided into four groups: normal/healthy (score = 0–1); early OA (score = 2–3), named grade I; mild OA (score = 4–5), named grade II; moderate OA (score = 6–7), named grade III; and severe OA, named grade IV (score = 8–13). To perform this study, we selected samples from the normal/healthy, early OA and moderate grade III groups. For the isolation and culture of primary chondrocytes, a fresh cartilage was rinsed with saline, and cells were isolated as previously reported (23). The cells (2.5 million) were then seeded into 162-cm² flasks and incubated at 37 °C in 5% CO₂ and air in DMEM supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Primocin (*In vivo* Gen Primocin™) and 15% FCS until ~ 80 –90% confluence was reached. The chondrocytes were used in experiments during the third or fourth weeks of primary culture.

Co-Immunoprecipitation—Co-immunoprecipitation (Co-IP) was performed using primary chondrocytes from human adults as described previously with minor modifications (7). Cells were resuspended in 1000 μl of IP-lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8, 0.5% v/v Nonidet P-40, 1.0% v/v Triton-X, 150 mM NaCl) or in IP-lysis buffer containing Sarkosyl and SDS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8, 0.5% v/v Nonidet P-40, 0.5% v/v Sarkosyl, 0.1% SDS v/v, 150 mM NaCl). Both IP buffers contained protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and 1 mM PMSF. Lysates were precleared by incubating with 50 μl of Protein G Sepharose (50% slurry). Four micrograms of antiCTD-Cx43 antibody (SC-20, sc-6560 from Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) followed by Protein G Sepharose beads (50 μl of 50% slurry) were added to the precleared lysates and incubated overnight at 4 °C. A control IP was performed without antibody. The beads were washed four times with the corresponding IP buffer, and the bead pellets were suspended in loading buffer (10% SDS, 0.2 M Tris pH 6.8, 50% glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue (5x) containing 1.42 M 2-mercaptoethanol) and incubated for 30 min at 37 °C before being boiled for 10 min. Supernatants were stored at -80°C . Silver stain analysis of immunoprecipitations and Western blotting were used to determine the specificity of the interactions. Silver staining was performed after the electrophoretic separation on polyacrylamide gels. The gels were fixed for 30 min in fixed solution (40% ethanol, 10% acid acetic) and rinsed twice for 10 min in water. After incubating with 0.02% thiosulfate sodium for 1 min, gels were immediately rinsing in water for another min, incubated with silver solution for 30 min (0.2% silver nitrate, 0.075% formalin) and washed for 10–15 s with water. The develop solution contained 3% carbonate potassium, 12.5 mg/ml thiosulfate sodium and 0.025% formalin. The development was stopped by dipping the gel in the stop solution (3% Tris-Buffer, 10%

acid acetic) for 15 min. The stained gels were scanned after thoroughly rinsing in water.

For Western blot assays, anti- α -tubulin antibody (T9026) was supplied from Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany antinucleolin antibody (PAB12541) was from Abnova, Heidelberg, Germany GmbH, the antiranGTP (sc-1156), antiCx43 (sc-6560), antiCalcyclin (sc-271396), and anti-Integrin α V (sc-376156) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, antiAlpha B Crystallin (ab13496) from Abcam. For SDS-PAGE gel electrophoresis, 5 μ l of the denatured, immunoprecipitated proteins were loaded and separated on 10% polyacrylamide gels, which were then electro blotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Co., Bedford, MA). The membranes were blocked with 5% milk in PBS and 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) and, after probing with antibody, developed using ECL Western blotting Detection reagent from GE Healthcare.

Identification of Proteins Using SDS-PAGE and nanoLC-MALDI-TOF/TOF—Immunoproteins were loaded and separated by SDS-PAGE in 10% acrylamide in-house gels in a Protean® mini-gel system (Bio-Rad, Hercules, CA). Gels were stained and visualized with Coomassie Brilliant blue G250 and the resulting lane was size-fractionated into three sections that were subsequently processed independently. Each section was destained with methanol, diced into small pieces and in-gel digested following a standard procedure (25). Briefly, the samples were desiccated with acetonitrile (26) reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 56 °C, alkylated with iodoacetamide (50 mM IAA), dehydrated in 100% ACN and trypsin-digested (6.6 ng/ μ l, Roche Mannheim, Germany) for 16 h at 37 °C. Peptides were then extracted from the gel pieces with 50% ACN/0.1% trifluoroacetic acid (TFA), dried in a speed-vacuum, reconstituted in 0.1% TFA and desalted using homemade stage tips (Empore disk-C18, 47 mm, 3 M O Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The peptide fractions were separated using reversed phase chromatography in a Tempo nanoLC system (ABSciex, Madrid, Spain). After precolumn desalting on a trapping column (0.5 \times 2 mm, Michrom Bioresources, Auburn, CA) at a flow rate of 15 μ l/min for 15 min, tryptic digests were separated on a C18 nanocolumn (Integratit C18, Proteoep II, 75 μ m id, 15 cm, 5 μ m, 300 Å; New Objective, Woburn, MA) at a flow rate 350 nl/min, with a 30 min linear gradient of 5 to 50% of buffer B (80% ACN containing 0.1% TFA). The column was washed and regenerated for 5 min using 80% of buffer B. After all nonpolar and nonpeptide materials were removed, the column was re-equilibrated under the initial starting conditions for 15 min. The separated peptides were spotted onto a MALDI plate each 15 s and mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic matrix (3 mg/ml in 0.1% TFA, 70% ACN) at a flow rate of 1.2 μ l/min using a Sun Collect MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Germany). The MS runs for each chromatogram were acquired and analyzed in a MALDI-TOF/TOF instrument (4800 ABSciex, Framingham, MA). MS spectra from m/z 800–4000 were acquired for each fraction and processed with internal calibration. Angiotensin peptide diluted in the matrix (3 fmol/spot) was used for the internal standard calibration at an m/z of 1046.5. After screening of all LC-MALDI sample positions in MS positive reflector mode, the fragmentation of automatically selected precursors was performed at collision energy of 1 kV with CID gas (air). Up to 12 of the most intense ion signals per spot position with signal/noise (S/N) above 80 were selected as precursors for MS/MS acquisition, excluding common trypsin autolysis peaks and matrix ion signals. A second MS/MS was acquired excluding the precursors selected in the previous MS/MS run. Precursors with a S/N above 25–40 were selected to identify proteins that were not identified in the previous run. For protein identification, MS/MS spectra acquired by 4000 Series Explorer software v.3.5.1 were searched with ProteinPilot v.3.0 (ABSciex) against the Uniprot-SwissProt protein database (release version 2012_05; 536,029 entries), using the

Paragon Algorithm. The Paragon Algorithm in ProteinPilot software served as the default search program with trypsin as the digestion agent with one missed cleavage allowed, iodoacetamide as a fixed modification of cysteine and biological modifications. Only proteins with a threshold >95% confidence (>1.3 Unused Score) were considered for protein identification. False positive identification rate is around 5%.

Gene Ontology (GO) Analysis—To analyze the MS data and for the representation (protein enrichment) of GO terms, MS data were analyzed using the Protein Information and Knowledge Extractor (PIKE, <http://proteo.cnb.csic.es/pike/>), which links to the DAVID web system to provide a quality measure of the protein relationships regarding GO (27, 28).

Immunohistochemistry Assays—For immunohistochemistry (IHC), cultured cells on chamber slides were fixed with 4% formaldehyde for 10 min at room temperature as previously described with minor modifications (23). Cells on chamber slides were counterstained with hematoxylin/eosin or counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The antiCx43 antibody (610062) was supplied from BD Transduction Laboratories, antiHSP90 β antibody (sc-1057) was from Santa Cruz Biotechnology, and the antivimentin antibody (ab8069) was from Abcam. Negative controls (omitting the primary antibody) were performed to test the specificity of each antibody. For immunofluorescence, cultured cells on chamber slides were fixed with cold methanol for 5 min at -20 °C and permeabilized with 1% Triton-X-100 (v/v) for 5 min at room temperature using the fluorescent-tagged secondary antibodies Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins/FITC (F0313, Dako Cytomation), Polyclonal Goat anti-Mouse Immunoglobulins/RPE (R-0480, Dako), and Polyclonal rabbit anti-Goat Immunoglobulins/PE (SC-3755, Santa Cruz Biotechnology). The cells were counterstained with DAPI and mounted in glycerol mounting medium (C0563, DAKO). For IHC, samples were analyzed on an Olympus BX61 microscope using a DP71 digital camera (Olympus, Hamburg, Germany), and calibration and quantification of the images was performed using the AnalySIS^D 5.0 software (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany). Immunofluorescence assays were acquired in a Leica TCS-Sp5 (AOBS) Laser scanning confocal (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a 63X HCX PLAPO 1.4 N.A. oil immersion objective and the acquisition software LAS AF 2.6 (Leica Microsystems). Intensity line profile for each channel was performed by using Image J 1.47s (NIH).

RESULTS

Mass Spectrometric Identification of Cx43-Associated Proteins—When Cx43-interacting proteins from chondrocytes of healthy donors were analyzed, 123 proteins were identified, of which 68 proteins were represented by at least two unique peptides (Fig. 1A). One hundred and eighteen proteins were specific to the Cx43 immunoprecipitation (IP) and not identified in the control IP, which was performed without antibody (See [supplemental Tables S1 and S2](#)). Among these, 62 proteins were represented by at least two unique peptides. We considered a second category called “more abundant proteins” ($n = 6$) that included proteins such as annexin A2, prelamin-A/C and vimentin. The “more abundant proteins” corresponded to the proteins identified in both, the control IP and Cx43 IP but with more peptides at 95% confidence and with higher coverage and score in the Cx43 IP than in the control IP ([supplemental Tables S1 and S2](#)). In all cases, only proteins with >95% confidence and score >1.3 were considered significant.

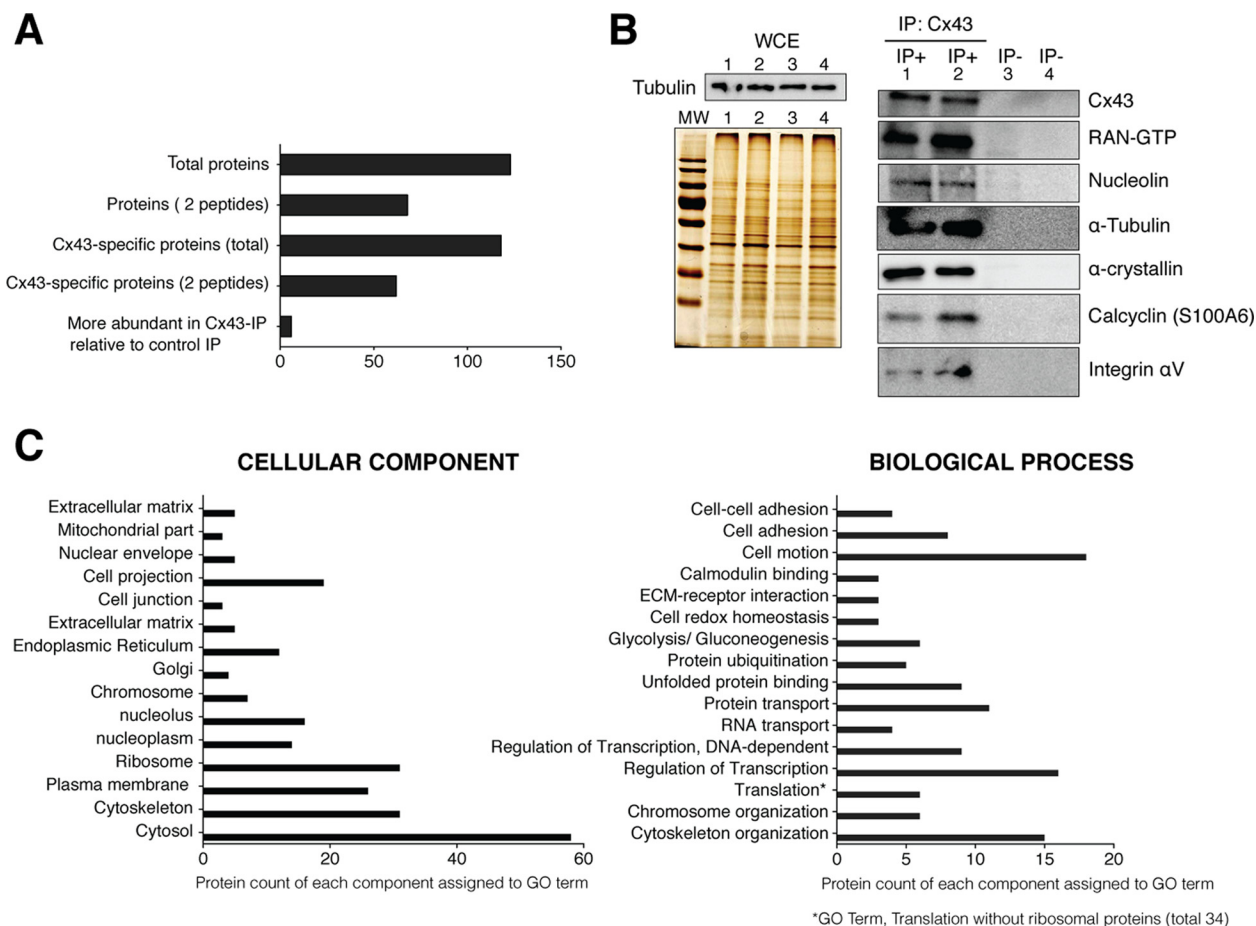


FIG. 1. Analysis of Cx43-associated proteins identified using mass-spectrometry. Primary chondrocytes in culture were lysed in the presence of the nonionic surfactants Igepal and Triton X-100 using a near-physiological-salt concentration of 150 mM NaCl to pull-down the Cx43 (nonjunctional and junctional Cx43). Immunoprecipitated proteins using an antibody that specifically recognized the C-terminal tail of Cx43 were identified using MS. Four different samples of chondrocytes from four healthy donors were analyzed. Overall, proteins were identified with 95% peptide confidence (minimum value 1.3 of unused cutoff) **A**, Summary of the number of identified proteins. Proteins identified as specific to the Cx43-IP but absent from the control IP (no antibody). The “more abundant proteins” in Cx43-IP relative to control IP correspond to the number of proteins identified as most likely more abundant in the Cx43-IP than in the control-IP (peptide difference ≥ 2). See [supplemental Tables S1 and S2](#) for a complete list of proteins identified in the Cx43-IP and control IP. **B**, Whole-cell extracts (WCE) and proteins immunoprecipitated with (IP+) or without (IP-) an antiCTD-Cx43 antibody were analyzed by silver staining and Western blotting. The protein content of the WCE (input, without antibody) (images shown on the left) for each experiment (IP) (images shown on the right) was previously analyzed by silver staining and Western blotting (Tubulin) (image shown on the top-left). Lanes represent 0.5% of the total WCE used for each IP. The numbers (1–4) represent the WCE utilized for the corresponding experiment (IP). For the images shown on the right, lanes represent the 25% of each IP **C**, Gene Ontology clustering of the protein set. GO analysis (27, 28) for identified proteins reveals a strong enrichment for GO terms associated with cytoskeleton, nuclear localization, translation processes, cell adhesion, and motion and carbohydrate metabolism. See [supplemental Tables S1 and S2](#) for a complete list of the identified proteins.

The Co-IP methodology is the referenced method to investigate interacting proteins or protein complexes. However, this technique has limitations and does not necessarily indicate whether interactions are direct. Besides, many protein–protein interactions are temporary and proteins can be found in different cellular compartment. Other limitations include the nonspecific binding to protein A/G and other contaminants. Despite this, the purification strategies used in this report resulted in a low number of proteins identified in the control IP ([supplemental Table S2](#)). Nevertheless, a selection of possible Cx43-interacting proteins identified in the MS

analysis was further validated by a combination of IP and Western blotting (**Fig. 1B**). Two IP samples using the Cx43 antibody (IP+) and two IP samples performed without antibody (IP-) confirmed the presence of previously identified proteins in the Cx43 IP. Cx43, nucleolin and the GTP-binding nuclear protein Ran among other interactors were detected in Cx43 IP samples, but not in control IPs performed without antibody. The same number of cells was used for each IP, and the whole-cell extracts that were used for IPs were previously resolved by SDS-PAGE and visualized using silver staining (**Fig. 1B**).

TABLE I

Example of Cx43-interacting proteins likely related to Cx trafficking, GJ assembly, GJIC, and turnover (chondrocytes from healthy donors). The cytoskeletal proteins that interact or colocalize with Cxs have a critical functional importance in Cx trafficking and assembly of Cx into GJs. Microfilaments and microtubules are involved in turnover mechanisms that compromise the control of GJIC. The values of peptide probability or score, sequence coverage and number of peptides found are shown in [supplementary Fig. S1](#). Only proteins that show >95% confidence and score >1.3 were considered for this study

Protein Group\Name	Gene name
α - ^a and β -tubulin ^{ab}	TUBA1B\TUBB1\TUBB2A\ TUBB2C
α -actin ^a and actin related proteins	ACTB\ACTR3B\ACTN4
Translocon-associated protein subunit delta	SSR4
Myosin motor proteins ^a (Myosin IC ^b)	MYL12B\MYH9\MYO1B
Vimentin ^a	VIM
Vinculin ^{ab}	VCL
Talin-1 ^b	TLN1
Filamin A, alpha	FLNA
Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2
SEC22 vesicle trafficking protein homolog B	SEC22B
Gelsolin	GSN
Profilin-1	PFN1
Erzin ^{ab}	EZR
Radixin ^b	RDX
Moesin ^b	MSN
Annexin A1 ^b \A2 ^b \A5	ANXA1\ANXA2\ANXA5
Caldesmon	CALD1
Endoplasmic	HSP90B1
Tropomyosin α 4	TPM4
Proteasome subunit beta type-2	PSMB2
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A
Cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4
Thy-1 membrane glycoprotein ^b	THY1
Protein S100-A6\A11\A10	S100A6\S100A11\S100A10

^a Previously reported interactions of Cx43.

^b Constituent part of the plasma membrane.

To explore the functions of the proteins associated with Cx43, we analyzed the GO terms of the specific and more-abundant identified proteins (Fig. 1C). We found significant enrichment for GO processes directly linked with cytoskeleton, ribosome, plasma membrane, nucleus, and cell projection. Cytoskeletal proteins are an important class of contaminant proteins that was identified in a study to bind directly to commonly used immunoprecipitated matrices (30). However, the identified cytoskeletal proteins were enriched in our specific IP, but not in our control IP ([supplemental Table S1](#)). Among the 31 identified cytoskeletal-related proteins, 15 were implicated in cytoskeleton organization (Fig. 1C, Table I and [supplemental Table S1](#)), and some of the identified cytoskeletal proteins are known to interact with Cx43 (α -/ β -tubulin, α -actin, Ezrin, Myosin, Vimentin, or Vinculin).

The GO term translation (for Biological Process) is caused by the presence of ribosomal proteins and other translation-

related proteins in the Cx43 IP (six proteins) compared with the control IP ([supplemental Table S1](#)). Note that in this case, the 40S and 60S ribosomal proteins have not been counted in the GO term translation (Fig. 1C). MS results revealed several interactors directly linked to nuclear activity, including several histones and nucleolar-related proteins (Table II and [supplemental Table S1](#)). Interestingly, a number of proteins related to metabolic pathways (glycolysis/gluconeogenesis), protein folding and transport, cell adhesion, cell motion, calmodulin binding, and cell-redox homeostasis was also identified to interact with Cx43 (Fig. 1C and Table II).

Cx43 Nuclear and Perinuclear-Related Interactors—The MS results suggest that Cx43 interacts with two components of the nuclear translocation system: the GTP-binding nuclear protein Ran (RAN) and importin β (KPNB1) (Table II and Fig. 2A). Additionally, using cNLS Mapper to predict nuclear localization signals (NLSs) specific to the importin pathway, we identified two NLSs sites located on the C-Terminal tail of the Cx43 sequence (Fig. 2B). In fact, the images obtained from immunohistochemistry (IHC) experiments using an antibody that specifically recognizes the C-terminal tail of Cx43 and DAPI nuclear staining showed multiple positive spots for Cx43 in the nucleus (Fig. 2C). Cx43 was localized across the nuclear margin and in nuclear foci (one to six per cell).

The identified nuclear-related proteins with a score < 1.3 are listed in [supplemental Table S1](#) and summarized in Fig. 2A and Table II. Among the transcription-related interactors, such as the TBP-interacting protein CAND1, several nucleolus-related proteins were identified. The MS results suggest that Cx43 interacts with the major nucleolar protein nucleolin and with the transcription release factor PTRF, which is required for rRNA transcription and termination.

Cx43 Interactors Colocalize with Cx43—To determine whether the Cx43-associated proteins that were identified using MS also associate with Cx43 *in situ*, we achieved immunofluorescence techniques using antivimentin, antiHSP90B, and monoclonal antiCx43 antibodies to determine if these two candidate proteins colocalize with Cx43 (Fig. 3). Articular chondrocytes in monolayer culture contain high levels of vimentin that is mainly localized in the cytoplasm. Multiple positive spots for Cx43 (green) were found to colocalize with positive staining for vimentin (red) in the cytoplasm, at cell margin (membrane), and in the cellular projections (Fig. 3A). The chaperone HSP90 β was also identified by mass spectrometry as a Cx43 interactor, and immunofluorescence assays suggested that this protein colocalized with Cx43 in the cytoplasm and in the plasma membrane (margin of the cells) (Fig. 3B).

Cx43-Associated Proteins Related to OA—Analysis of the Cx43-associated proteins that were isolated from chondrocyte samples from early phase OA patients (grade 1, following Mankin score, see material and methods) identified 157 proteins, of which 153 were specific to the Cx43 IP and not identified in the control IP performed without antibody (Fig. 4A, [supplemental Tables S2 and S3](#)). Eleven proteins, which in-

TABLE II

Cx43-interacting proteins (represented as gene name) from chondrocytes of healthy donors using the Cx43 IP-based proteomic approach. The values of peptide probability score, sequence coverage and number of peptides found are shown in [supplementary Fig. S1](#). Only proteins that show >95% confidence and score >1.3 were considered for this study

Group\Complex	Gene name
Nucleosome. Histones	HIST1H1T, HIST1H2AC, H2AFJ, HIST2H2BF, H3F3A, HIST1H4A
Transcription related factors	PTRF, NCL, CAND1, SND1, STAT1, RAN
RNA-binding proteins	MVP*, HNRNPA1*, HNRNPA2*, HNRNPA3, HNRNPK, NLC, RAN*, PTRF
RNA transport*	
RNA splicing	HNRNPA1, HNRNPA2, HNRNPA3, HNRNPK, SNRPD3
Ribosome	RPS16, RPS18, RPS19, RPS24, RPS26, RPS4X, RPS5, RPS7, RPS8, RPS9, RPLP2, RPL11, RPL12, RPL15, RPL17, RPL21, RPL24, RPL26, RPL27A, RPL3, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL4, RPL6, RPL7, RPL7A
Translation	EEF2, EEF1AL3, EEF1G, EIF5AL1
Endomembrane system (transport within the cell)	KPNB1#, RAN#, LMNA, MVP#
Nuclear Pore Complex#	
Mitochondrial	SOD2, ATP5J2
Antioxidant activity	PRDX1, SOD2
Generation of precursor metabolites and energy	PKM2, ENO1, GAPDH, LDHA, ALDOA, PYGB, PGK1, SOD2
Protein folding and other-related proteins	CRYAB, HSPA8, HSP90AB1, HSP90B1, PPIB, PPIA, HSPA5, P4HB, PDIA3, HSPB1, SERPINH1

cluded annexin A2, glutathione S-transferase and vimentin, were more highly represented in the Cx43 IP than in the control IP ([supplemental Table S3](#)); 73 proteins were identified as Cx43-interactors in healthy and OA chondrocyte groups ([supplemental Table S3](#), see peptide difference); and 80 interactors, including the 14-3-3 protein, integrin α -5 and integrin β -1 were exclusively identified in chondrocytes from OA patients ([supplemental Table S3](#), see specific to OA versus healthy).

We next analyzed the GO terms of interactors identified in OA samples and compared them to the results of the proteins identified in healthy samples (Fig. 4B, gray bars). The results showed an enrichment of Cx43 interactors related to cell adhesion, extracellular matrix interaction, calmodulin binding, nucleolus, translation and cytoskeleton-related proteins in OA compared with healthy samples. Critical components for cartilage structure and function, such as collagen XII or collagen VI, which exclusively localize to and delimit the pericellular matrix, were only identified in OA samples (Table III and [supplemental Table S3](#)). However, the mitochondrial proteins SOD2 or ATP5J2 were only identified in samples from healthy donors ([supplemental Table S1](#)).

The analysis of four different samples from patients with moderate-stage disease (grade 3), revealed a set of 130 Cx43-interactors that were specific to the Cx43 IP ([supplemental Table S4](#)). Eighty-eight proteins were identified as Cx43-interactors in both groups in the early and moderate stages of the disease; 64 proteins were identified as interactors in the healthy and moderate stage groups; and 32 interactors, including HMG-1 and Zyxin, were exclusively identified in chondrocytes from patients with moderate-phase disease ([supplemental Table 4](#)). The Cx43 interactors that were exclusively found in healthy and OA samples and the common interactors arranged by peptide difference are shown in [supplemental Tables S3 and S4](#) and summarized in

Table IV. The proteins were organized into different groups: exclusive to moderate OA, exclusive to early OA, exclusive to healthy, exclusive to OAs (both groups), specific to moderate OA versus early OA and peptide differences between common interactors found in each group.

The IP and MS methodologies have limitations, and several Cx43-interactors, such as the scaffolding protein zonula occidens-1 (ZO-1) (13, 14) and several phosphatases that are known to interact with Cx43, were not detected in this study. Some of these interactions might depend on the cell cycle stage in which the cells were taken for the IP experiments and the methodology that was used (31, 32). The low expression of tyrosine phosphorylated proteins and other signaling proteins makes these proteins difficult to detect using this methodology. On the other hand, a key factor in maintaining complex formation throughout the steps required for co-IP technique is the lysis (IP) and wash buffers. We used a buffer with low ionic strength and nonionic detergents (Nonidet P-40 and Triton X-100) to maintain the protein-protein interactions during the IP incubations. Using these conditions, we identified more than 100 Cx43-bound proteins ([supplemental Tables S2-S4](#)), several of which are a constituent part of the plasma membrane. However, the release of proteins from membranes presents significant challenges. To increase the chance that a particular membrane protein that interacts with Cx43 being detected by MS, we mechanically disrupted the cells using a 25-G needle in the presence of SDS and Sarkosyl. The presence of these ionic detergents favors the solubilization of membrane proteins but affects protein-protein interactions during the IP incubations. Using these conditions, we were only able to identify 32 Cx43-interactors ([supplemental Table S5](#)), and 29 were already identified as Cx43 interactors in samples from OA patients. Only Cadherin-23, the four-span transmembrane protein 2 (MS4A7) and Myosin-14 were exclusively identified as Cx43 interactors

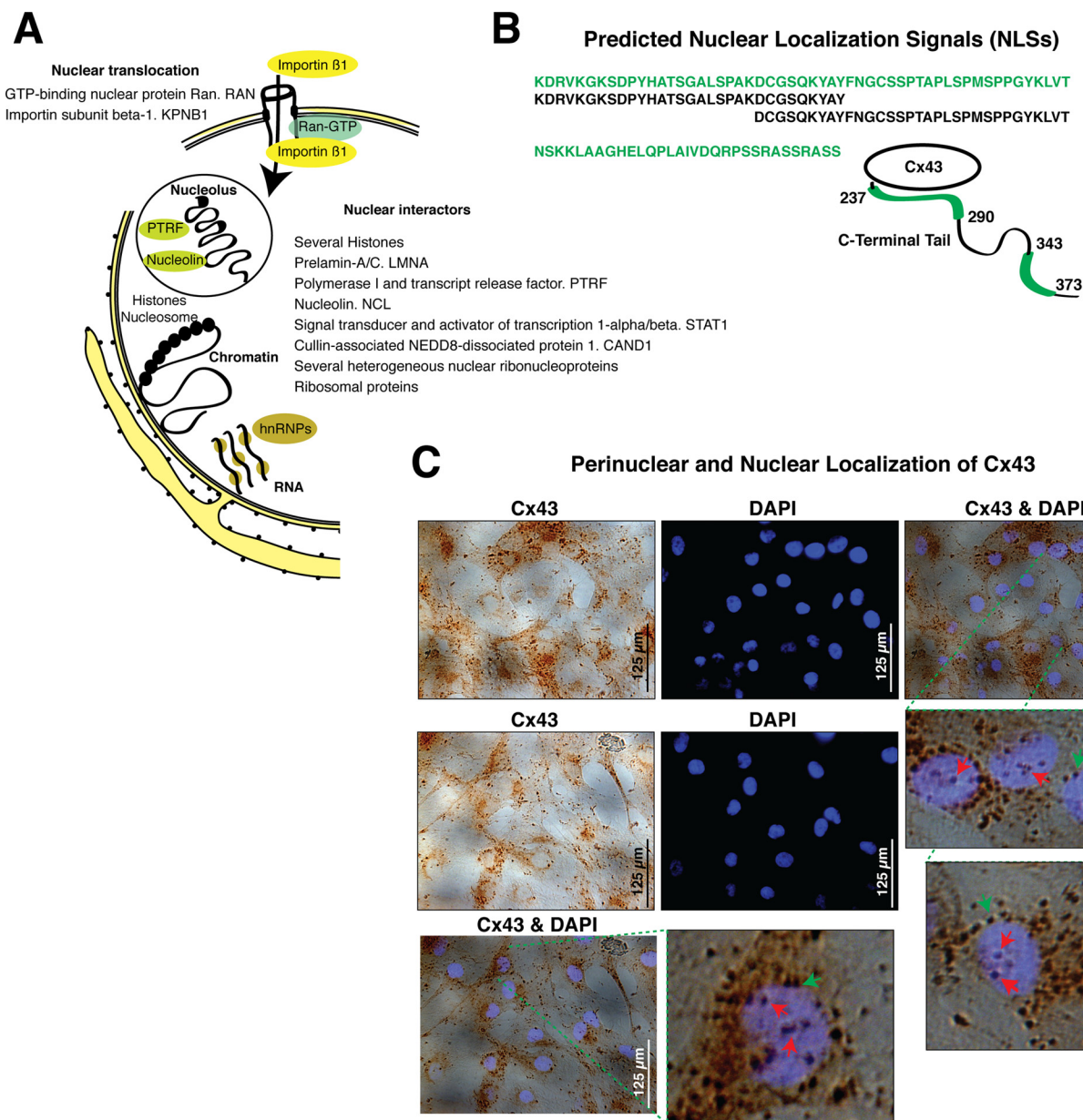


FIG. 2. Cx43-nuclear and perinuclear interactors. **A**, Cx43-associated proteins related to nuclear import and nuclear and perinuclear localization. Schematic view of the nucleus and endoplasmic reticulum; black spots represent ribosomes. The nuclear envelopment is composed of two lipid bilayer membranes, nuclear pore complexes, and the nuclear lamina. The outer nuclear membrane is continuous with the endoplasmic reticulum. Some of the Cx43 nuclear-related interactors specific to Cx43-IP are represented and listed in the schematic representation (unique peptides, 95% confidence). The complete list of identified proteins, number of identified peptides, sequence coverage, and score is found in [supplemental Table S1](#). **B**, Schematic representation of the C-terminal tail of the Cx43 protein showing the position of the two candidate NLSs that are specific to the importin α/β pathway and identified using cNLS Mapper (93). The amino acid sequence and positions of each NLS are indicated in green. **C**, DAPI staining and IHC using an antiCx43 antibody on primary human articular chondrocytes in monolayer culture. Merged images and magnifications are shown. Red arrows indicate nuclear staining for Cx43; and green arrows indicate perinuclear Cx43-positive spots.

under these experimental conditions ([supplemental Table S5](#)). In addition, the analysis of membrane proteins by MS remains challenging because of the hydrophobicity of transmembrane domains, which are resistant to proteolysis. The resulting hydrophobic peptides are difficult to extract from in-gel digestions and are difficult to solubilize in buffers compatible with MS. These characteristics, together with the poor ionization of hy-

drophobic peptides, results in the loss of peptides during the process and makes the detection of low-abundance peptides in a complex spectra by MS difficult (33, 34).

DISCUSSION

The mapping of protein interactions with Cx43 have aided in understanding the formation and regulation of gating Cx43-

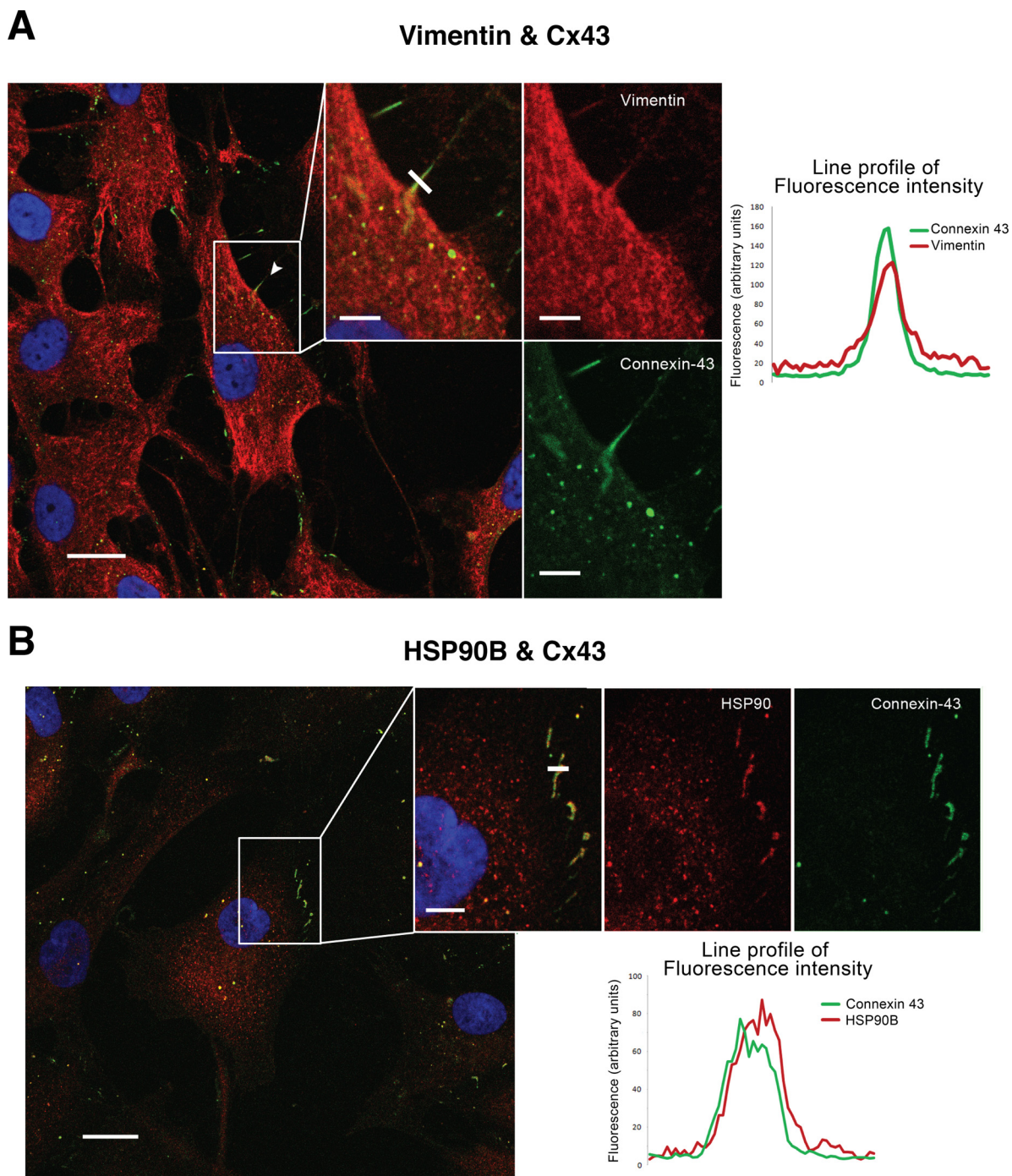


FIG. 3. Colocalization of Cx43 with vimentin and HSP90 β in articular chondrocytes. Immunofluorescence confocal microscopy was used to study colocalization of two antigens in one cell. *A*, Images represent the double staining and DAPI in chondrocytes in monolayer culture that were obtained from healthy human donors. Cx43 is detected in green, and vimentin is in red. *B*, Colocalization between HSP90 β and Cx43 was also studied in human chondrocytes in monolayer culture. Cx43 is shown in green, and HSP90 β is in red color. Right panels; colocalization graphs show the fluorescence intensity profile from a line crossing through the cell protrusions, the coincidence of fluorescence intensity peaks, for both red and green, marks the colocalization of both proteins.

based junctions in molecular detail and contributed to understanding the pathogenesis of diseases such as cardiac disease (35). Biochemical and molecular biology methods, such as GST tag pull-down assays, yeast two-hybrid approaches,

in vitro studies, colocalization and co-IP, have been utilized to identify Cx43-interactors (16, 17, 32, 36–45). However, to our knowledge this study is the first, to combine the isolation of human native Cx43 by IP and LC-MS/MS identification. The

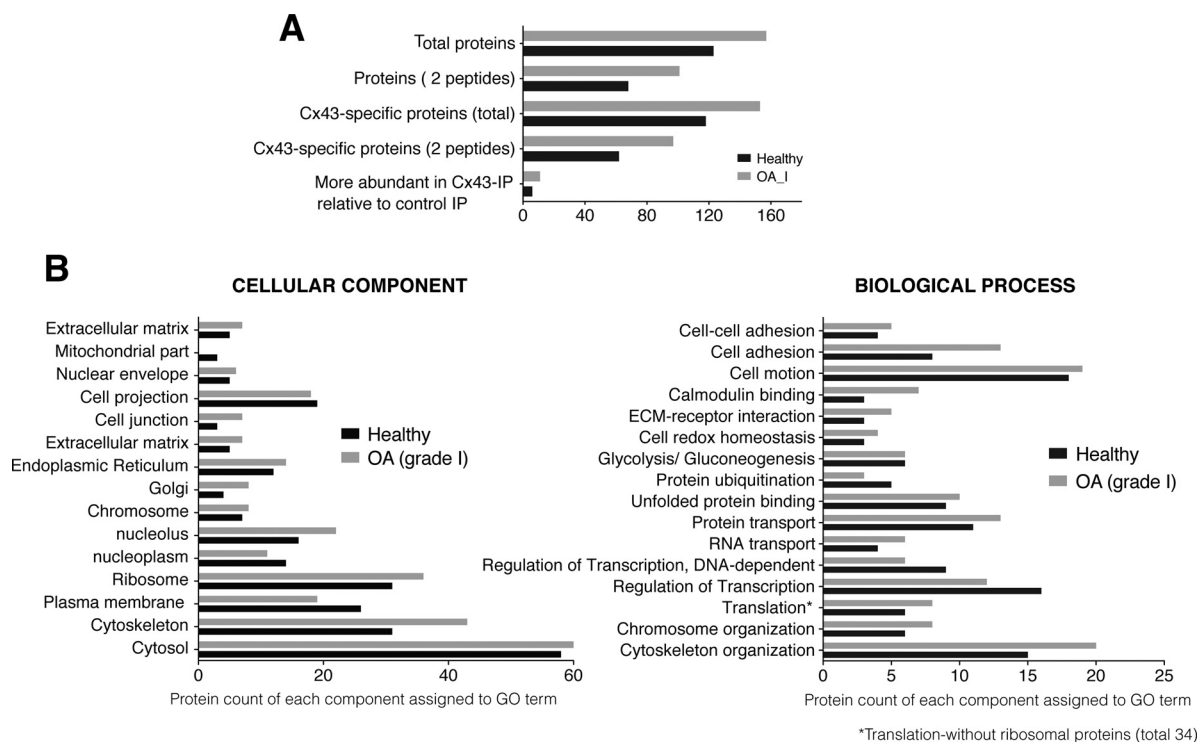


FIG. 4. Analysis of Cx43-associated proteins identified in the OA samples. Four different samples of chondrocytes from four OA patients were analyzed. **A**, A summary of the number of the identified proteins. Gray represents the Cx43 interactors identified in samples from OA grade I. Proteins identified as specific to the Cx43-IP but absent from the control IP (no antibody). The number of proteins identified as most likely more abundant in the Cx43-IP than in the control-IP (peptide difference ≥ 2). See [supplemental Table S3](#) for a complete list of the proteins identified in the Cx43-IP and control IP. **B**, GO analysis for the identified proteins. Overall, the proteins were identified with 95% peptide confidence (minimum value 1.3 of unused cutoff). See [supplemental Tables S1–S3](#) for a complete list of the identified proteins. Gray represents the Cx43 interactors that were identified in samples from OA grade I patients.

meta-analysis to determine the degree of overlap between the identified interactors in this study and the identified proteins in previous studies revealed a set of proteins ($n = 108$ for healthy and $n = 129$ for chondrocytes from OA patients) that were exclusive to the present study (see Fig. 5) and 15 (for healthy) and 28 (for chondrocytes from OA patients) common interactors. The differences in protein detection between the present and previous studies are most likely because of differences in the cell type, methodology, detection sensitivity, and purification strategies used.

Following our methodology, we have identified a large number of known and novel Cx43 interactors, some of which are responsible for the development of human diseases. These include proteins, such as Serpin H1, HnRNP-A2/B1, 78 kDa glucose-regulated protein, collagens, and PPLase B, that are related to connective tissue disorders and others, such as alpha(B)-crystallin, which is responsible for the development of myofibrillar myopathy and cataracts. HspB1 is related to Charcot-Marie-Tooth disease, neuropathy and neurodegeneration; vinculin is related to cardiomyopathy; and Profilin-1 is related to the development of amyotrophic lateral sclerosis and neurodegeneration. Moreover, several interactors that were identified in samples from healthy chondrocytes, such as SOD2, vimentin, vinculin, gelsolin, or alpha-enolase, have

been previously reported to be altered in chondrocytes from OA patients (46–53) (Table III) and early to severe stages of the disease contain very high levels of Cx43 (23).

IP experiments were performed *in vitro* using cultured chondrocytes. Chondrocytes were actively proliferating in an asynchronous culture where cells are in different stages of the cell cycle, whereas they were mainly in a resting stage in normal tissue. This difference, together with physiological conditions and the type of ECM molecules that interact with chondrocytes in tissue, may affect the number of the Cx43-associated proteins identified in this study and in particular identification of Cx43 interactors related with cytoskeletal proteins and proteins involved in cell-matrix adhesion and cell-to-cell communication. Cartilage is very challenging tissue because it is solid and mainly composed of collagen-rich ECM with low cellularity. Extraction of proteins will require the use of chaotropic agents incompatible with protein interactions and IP experiments. These limitations make it impossible to perform IP experiments using tissue as the starting material. Still, the Cx43-associated proteins identified in this and other studies finally depend on the Cx43 amino acid sequence and domains. We have identified a number of multiple Cx43 interacting proteins that might help in understanding the different cellular functions of Cx43. Further studies will be

TABLE III

Example of Cx43-interacting proteins identified in this study that were previously reported to be altered in chondrocytes from OA patients (46–53). # Interactors exclusively identified in samples from healthy donors. * Interactors that were only identified in samples from OA patients. The remaining interactors were identified in both samples (healthy and early/moderate OA). Protein Pilot Score, Amino acids sequence coverage for the identified proteins (Cov.) and number of peptides (No. pept.) masses matching/not matching the top hit from MS-Fit PMF. Only proteins that show >95% confidence and score >1.3 were considered for this study

Group/Complex	Protein name	Gene name	Healthy OA (g. III)	Score	Cov.	No. pept.
Extracellular matrix structural constituent	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	Healthy OA (g. III)	6 8.24	23.9 50	3 4
	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	Healthy OA (g. III)	4 2	31.3 40.7	2 1
	Collagen alpha-1(VI) chain*	COL6A1*	OA (g. III)	21.28\10.29	57.1\51.3	12\6
	Collagen alpha-2(VI) chain*	COL6A2*	OA (g. III)	14.25\6	56.1\36.3	11\4
	Collagen alpha-3(IV) chain*	COL6A3*	Healthy OA (g. III)	2.84 95.44\61.62	7.4 53.9\47.5	2 54\34
	Collagen alpha-1(XII) chain*	COL12A1*	OA (g. III)	23.48\14.16	41.2\32.6	11\8
Carbohydrate metabolic processes	Alpha-enolase	ENO1	Healthy OA (g. III)	8 26.89\26.98	21 65\58.1	4 13\14
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Healthy OA (g. III)	10.41 4.04\9.96	30.5 42.4\31.6	5 2\5
	Fructose-biphosphate aldolase A	ALDOA	Healthy OA (g. III)	2.01 2.1\7.56	8.8 43.7\38.5	1 1\4
	Vimentin	VIM	Healthy OA (g. III)	81.76 124.3\78.96	87.1 100\94.2	48 158\53
Cytoskeleton related-proteins	Gelsolin	GSN	Healthy OA (g. III)	2 2\ 9.81	6.8 17.4\39.1	1 1\5
	Vinculin	VCL	Healthy OA (g. III)	5.29 4.32\13.21	20.3 40.5\45.3	3 2\7
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	Healthy OA (g. III)	25.29 29.04	53.6 62.9	16 21
	Erzin	EZR1#	Healthy	2	3.9	1
	Moesin	MSN	Healthy OA (g. III)	10.09 10.02\12.35	29.5 59.1\53	5 6\7
	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Healthy OA (g. III)	4 13.73\4.18	26.3 65.7\47.4	2 7\2
	Heat shock cognate 71 KDa protein	HSPA8	Healthy OA (g. III)	10.72 3.04\13.06	22.5 35.8\42.9	5 2\8
Chaperone and Protein folding-related proteins	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Healthy OA (g. III)	7.26 2.81\16.29	17.4 28\34.7	4 2\8
	Endoplasmic	HSP90B1	Healthy OA (g. III)	5.64 3.82\22.57	5.6 31.1\38.5	3 2\11
	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	Healthy OA (g. III)	22.93 6.14\32.82	30.3 53.4\60.6	11 3\17
	Annexin A1	ANXA1	Healthy OA (g. III)	10 10.87\ 6.15	30.6 47.4\27.2	5 6\3
	Annexin A2	ANXA2	Healthy OA (g. III)	52.03 54.59\48.92	65.8 84.4\86.1	30 40\30
	Annexin A5	ANXA5	Healthy OA (g. III)	2 2.05\2	19.7 32.8\20.6	1 1\1
Others	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2#	Healthy	2	15.3	1
	Prelamin-A\C	LMNA	Healthy OA (g. III)	26.38 39.97\16.48	44.7 82.7\55.1	15 21\8
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	EIF5A2	OA (g. I)	2	40.5	1
	Elongation factor 2	EEF2	Healthy OA (g. I)	14.35 9.2\19.24	21.1 35.9\34.4	7 5\9
	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	Healthy OA (g. III)	2.37 7.31	18.9 35.1	1 4
	Major vault protein	MVP	Healthy OA (g. III)	2 2.3	3.9 31	1 1
	GTP-binding nuclear protein RAN	RAN	Healthy OA (g. I)	4 2.01	11.6 34.7	2 1
	Integrin alpha-V	ITGAV*	OA (g. I)	2.03	20.9	1
	Integrin beta-1	ITGB1*	OA (g. III)	2\2	18.9\8.4	1\1

TABLE IV

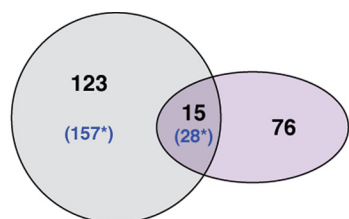
Cx43-interacting proteins exclusively identified in samples from healthy, early OA and moderate OA patients. The table represents some of the Cx43-interacting proteins that were exclusively identified for each group. For the complete list of interactors, see [supplementary Table S4](#). The values of peptide probability score, sequence coverage and number of peptides found are shown in supplementary figures. Only proteins that show >95% confidence and score >1.3 were considered for this study

	Protein name	Gene name	Score	Cov.	No. pept.	
Healthy	ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5J2	2	13.8	1	
	Erzin	EZR	2	3.9	1	
	Protein S100-A10	S100A10	2	14.4	1	
	Protein S100-A11	S100A11	2	10.5	1	
	Protein S100-A6	S100A6	2	16.7	1	
	Ras-related protein Rap-1A	RAP1A	2	7.6	1	
	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	2	15.3	1	
	Thy-1 membrane glycoprotein	THY1	4	24.2	2	
	Transforming protein RhoA	RHOA	2	17.6	1	
	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	2.3	24.4	1	
	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	2	18.1	1	
	Early OA (grade I)	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	4	28.2	2
		1,4-alpha-glucan-branching enzyme	GBE1	2	13	1
Myosin-10		MYH10	11.36	46.5	7	
Protein piccolo		PCLO	1.81	19.2	1	
Coatomer subunit alpha		COPA	2	28.8	1	
Dextrin		DSTN	2.14	44.2	1	
Integrin alpha-V		ITGAV	2.03	20.9	1	
Matrin-3		MATR3	2.05	27.4	1	
Septin-2		SEPT2	2	21.3	1	
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3		TGFBI	2.32	19.8	1	
Vigilin		HDLBP	3.84	34.6	2	
Moderate OA (grade III)		26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2	2	7.3	1
		A-Kinase anchor protein 2	AKAP2	2	24.7	1
	AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	2.82	16	2	
	ATP-citrate synthase	ACLY	3.96	18.1	2	
	Coatomer subunit beta and gamma	COPB1	2.03	16.8	1	
		COPG	6.47	24.5	4	
	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3	2	17.9	2	
	High mobility group protein B1	HMGB1	1.73	23.7	2	
	LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1	3.07	28.7	2	
	LIM domain only protein 7	LMO7	2.53	25.9	2	
	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	5.26	31.1	3	
	Transgelin	TAGLN	1.39	42.3	1	
	Zyxin	ZYX	2.01	14.3	1	

necessary to fully understand the molecular roles of these interactions under physiological conditions and in healthy and disease states.

Especially noteworthy is the identification of several Cx43-interactors related to the generation of precursor metabolites and energy (Table II). Some of the Cx43-interactors identified in this study are enzymes responsible for glycolysis and gluconeogenesis (ALDOA, GAPDH, PGK1, ENO1, and PKM2). Notably, the glycolytic enzymes that were identified as Cx43-binding proteins, except Lactate Dehydrogenase A, which is implicated in the final step of anaerobic glycolysis, are involved in the energy-generation phase of glycolysis, which results in the net synthesis of ATP and NADH molecules. The interactions between Cx43 and these enzymes most likely play an important role in the cellular use of glucose. In fact, the eye lens and articular cartilage of adults are avascular organs, and because no blood supply reaches these tissues, it has

been reported that cells in these tissues are maintained by the movement of fluids, ions, nutrients (e.g. glucose), and metabolites through a network of GJs (7, 54, 55). In addition, results from different reports strongly suggest that inhibition of GJIC modifies glucose uptake and that glucose levels modify Cx43 gene expression (56). Reduced levels of Cx43 alters the expression of the glucose transporters GLUT-1 and GLUT-3 and type I and II hexokinases, which are enzymes responsible for the phosphorylation of intracellular glucose to obtain a charged molecule that cannot be transported through the plasma membrane (57, 58). On the other hand, high-glucose conditions have been shown to reduce Cx43 expression and GJIC in normal conditions (59–61). However, increased levels of Cx43 have been detected in pathological conditions, e.g. during wound healing in diabetic rats and humans (62–64). Consequently, cell metabolism and Cx43 appear to be interconnected. It would be interesting to study the role of Cx43 in


Identified and previously reported interactions

α - and β -tubulin	Heat shock cognate 71 KDa protein
α - and β -actin	Myosin motor proteins
Vinculin	40S ribosomal protein S7
Vimentin	Clathrin*
Hsp90 β	Integrin α 5*/ β 1*
Erzin	14-3-3 protein*

FIG. 5. Meta-analysis of Cx43 mass-spectrometric data. Proportional Venn diagram comparing the Cx43-associated proteins that were identified in the present study (dark gray circle) to those from previous reports (purple circle). Overlap (green) includes proteins present in both groups. Blue letters and asterisk (*) represent Cx43 interactors identified in samples from OA grade I. Some of these previous studies used co-IP, colocalization or affinity techniques and nuclear magnetic resonance using different types of cells and tissues from rat, mouse, human, porcine, goldfish, rabbit, or chick. See the reference list of some of the selected reports and reviews for meta-analysis (16, 17, 32, 36–45). None of the previous studies were performed using cartilage or articular chondrocytes.

glucose metabolism in particular chondrocytes because diabetes has been suggested as a possible risk factor for developing OA and OA chondrocytes showed significantly elevated Cx43 protein levels (23).

Recent studies have shown that Cx43 localizes to mitochondria (65–68), forms functional hemichannels, and plays an important role during ischemic preconditioning (65, 66, 68, 69). During prolonged ischemia, ATP levels decrease, leading to lowering of the pH and accumulation of reactive oxygen species (ROS), which ultimately result in cell death. Several studies have shown that mitochondrial Cx43 creates a protective, preconditioning effect during the early stages of cardiac ischemia by most likely favoring ATP and/or glutathione release to generate preconditioning and cell-protective functions. In this report, the MS data revealed that Cx43 might interact with the mitochondrial protein SOD2 and the mitochondrial membrane ATP synthase (ATP5J2). In addition, the Hsp90 chaperone, which has been reported to be involved in the translocation of Cx43 to the mitochondria (67, 70), has been identified in this study and by other authors (67) as a Cx43 binding protein. Importantly, SOD2 and ATP5J2 were only identified as Cx43-interactors in samples from healthy donors, and not in OA chondrocytes (supplemental Table S4). The functional relation between Cx43 and the identified mitochondrial interactors will most likely help in understanding the importance of normal mitochondrial function in degenerative disorders or preconditioning.

Gene array analyses have indicated that Cx43 might represent a central node in the regulation of genome-wide expression (71–73). Full-length Cx43 and its C-terminal tail have

been localized to the nucleus, and translocation of the Cx43-CTD into the nucleus modified cell growth, proliferation and gene expression (22). It has been suggested that Cx43 might regulate gene expression through the recruitment of transcription factors to the proximal promoter element termed the connexin response element (CxRE) (74, 75). Yet, how Cx43 can translocate into the nucleus and modify gene expression has not been described. IP and MS analysis has identified two possible Cx43-interactors involved in the RAN-GTP nuclear transport cycle that could be involved in the translocation of Cx43 to the nucleus, the GTP-binding nuclear protein Ran (RAN) and importin β (KPNB1) (Fig. 3A). Additionally, the C-terminal tail of Cx43 contains two potential NLSs that are recognized by the importin α/β complex, which imports proteins to the nucleus through the RAN-GTP cycle (Fig. 3B). However, cNLS Mapper does not predict an importin α -independent NLS. Thus, we cannot rule out that additional sites in the Cx43 sequence might be implicated in the translocation of the protein to the nucleus. The identified Cx43-nuclear interactors include several histones, transcription factors and nucleolar proteins, such as nucleolin or the polymerase I and transcript release factor (PTRF), which suggests that Cx43 or its C-terminal tail might affect chromatin organization and nucleolar activity.

The presence of possible interactors with known functions directly linked to downstream transcription processes, such as RNA splicing, processing, export and translation (Table II), together with the perinuclear localization of Cx43 (Fig. 2C) suggest a potential role of Cx43 in these processes. We have identified several Cx43-interactors involved in post-transcriptional regulation and mRNA processing. Some of these interactors are integrated into the nuclear or endoplasmic reticulum membranes. Together with the identification of several Cx43-binding proteins involved in RNA transport, such as hnRNPs, and translation, which include several ribosomal proteins (Table II), these results suggest a possible role of Cx43 in translation and protein biosynthesis that might be related to RNA species transport across the nuclear and endoplasmic reticulum system. On the other hand, the interaction of Cx43 with the Major Vault Protein (MVP) might be related with the transport of different types of RNA, including mRNA (76, 77), along cytoskeletal elements into dendritic microtubules or the axonal compartment (78–81).

Components of the cell junction and cell projections and proteins related to cell adhesion, motility, and extracellular matrix interactions have been identified using MS as Cx43-associated proteins, and these include several collagens, vinculin, talin, and annexins. The cell adhesion and ECM-receptor interaction proteins collagen VI and XII and integrin α -V and β -I were only detected in samples from OA patients. Moreover, it has been reported that residues 136–158 of the cytoplasmic loop region of Cx43 contains a calmodulin-binding motif (42), and the MS data in this report revealed that calmodulin-interacting proteins, such as calde-

smon 1, several types of myosin and a diversity of cytoskeletal proteins, also associate with Cx43 in OA samples. These results suggest that Cx43, particularly in OA chondrocytes, might play a (dys)functional role in cell adhesion and migration. In addition, caldesmon plays important roles in the migration of nonmuscle cells via regulating the actin-myosin system (82), and caldesmon binding to myosin has been reported to result in the enhancement of axon extension (83). Interestingly, we have found that chondrocytes from OA patients contain longer cellular extensions (more than 200 μm in length) when compared with chondrocytes in healthy cartilage (7). Further studies will be necessary to reveal the role of Cx43 in these processes and to discern its function in OA chondrocytes.

Cx43 is a complex protein with multiple functions and cellular localizations. The results reported here suggest that the complex proteomic interactions with Cx43 may play important functions in cell metabolism, gene transcription and translation, cytoskeleton organization, motility, and cell–cell and cell–matrix interactions. It is well documented that Cx43 is up- or down-regulated in a number of diseases such as cancers, inflammation, and disorders such as Alzheimer's disease, Huntington's disease, or OA (18, 23, 84–88). The literature also indicates that mutations in the Cx43 sequence, including single mutations in its C-terminal tail, are responsible for the development of diseases such as oculodentodigital dysplasia (ODDD) (89–92). Many of these observations lack the mechanistic understanding that is required for the development of an effective therapy. The Cx43-interactors identified in this report will serve to gain a better understanding of the cellular functions of Cx43 in health and disease. Although the Cx43 sequence is well conserved from humans to fish, several domains are only highly conserved among primates; therefore, the results presented here can be extended as a guide for further studies of Cx43 interactions in different human cell types.

Acknowledgments—We thank Lourdes Sanjurjo and Dolores Salinas Bujan for generously obtaining cartilage samples after surgery; Maria Jose Sanchez Dopico for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture; Purificación Filgueira-Fernández and Noa Goyanes for collecting and storing cartilage samples, preparing samples and immunohistochemistry and immunofluorescence experiments; members of the Proteomics group (INIBIC) for helpful technical suggestions; Estefania Cives for administrative assistance; thanks to Ada Castro, Purificación Filgueira and Julian Yañez for critical technical input. Marta Varela Eirin for her help in the writing and design of tables. A very special thanks to David Santamaria for his help and critical suggestions.

* This work was supported in part through funding from Spanish Society for Rheumatology, SER (FER 2013) (to M.D.M.) and by the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2013–2016 and funded by the ISCIII-General Subdirection of Assessment and Promotion of the Research - European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe": PI13/00591 to M.D.M. The Fondo Investigación Sanitaria, Madrid,

Spain (CIBER-CB06/01/0040; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; Proteo-Red/ISCIII) (to F.J.B.); and a Predoctoral fellowship from Xunta de Galicia to Raquel Gago-Fuentes. María D. Mayán was an Isidro Parga Pondal researcher (Xunta de Galicia). The study sponsors had no role in the study design, data collection, data analysis or writing of the manuscript and did not affect the decision to submit the manuscript for publication.

§ This article contains supplemental Tables S1 to S5.

** To whom correspondence should be addressed: CellCOM Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, University of A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel.: 34-981-176399; Fax: 34-981-176398; E-mail: Ma.Dolores.Mayan.Santos@sergas.es, and fblagar@sergas.es.

Ethics approval: The study was conducted with the approval of the local ethics committee in Galicia, Spain.

REFERENCES

- Kar, R., Batra, N., Riquelme, M. A., and Jiang, J. X. (2012) Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch. Biochem. Biophys.* **524**, 2–15
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* **83**, 1359–1400
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (1998) Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol.* **8**, 295–298
- Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagedorff, A., Kruger, O., Traub, O., and Willecke, K. (1998) Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol.* **8**, 299–302
- Alexander, D. B., and Goldberg, G. S. (2003) Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2045–2058
- Goldberg, G. S., Lampe, P. D., and Nicholson, B. J. (1999) Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat. Cell. Biol.* **1**, 457–459
- Mayan, M. D., Gago-Fuentes, R., Carpintero-Fernandez, P., Fernandez-Puente, P., Filgueira-Fernandez, P., Goyanes, N., Valiunas, V., Brink, P. R., Goldberg, G. S., and Blanco, F. J. (2013) Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**(1), 275–284
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* **383**, 725–737
- Sohl, G., and Willecke, K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **62**, 228–232
- Giepmans, B. N. (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc. Res.* **62**, 233–245
- Duffy, H. S., Fort, A. G., and Spray, D. C. (2006) Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv. Cardiol.* **42**, 1–17
- Chen, J., Pan, L., Wei, Z., Zhao, Y., and Zhang, M. (2008) Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J.* **27**, 2113–2123
- Giepmans, B. N., and Moolenaar, W. H. (1998) The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* **8**, 931–934
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 12725–12731
- Park, D. J., Freitas, T. A., Wallick, C. J., Guyette, C. V., and Warn-Cramer, B. J. (2006) Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43: A new 14–3–3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci.* **15**, 2344–2355
- Butkevich, E., Hulsman, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., and Majoul, I. (2004) Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 650–658
- Giepmans, B. N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M., and Moolenaar, W. H. (2001) Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* **11**, 1364–1368
- Zhou, J. Z., and Jiang, J. X. (2014) Gap junction and hemichannel-inde-

- pendent actions of connexins on cell and tissue functions – An update. *FEBS Lett.* **17**; **588(8)**, 1186–1192
19. Omori, Y., and Yamasaki, H. (1999) Gap junction proteins connexin32 and connexin43 partially acquire growth-suppressive function in HeLa cells by deletion of their C-terminal tails. *Carcinogenesis* **20**, 1913–1918
 20. Olbina, G., and Eckhart, W. (2003) Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol. Cancer Res.* **1**, 690–700
 21. Moorby, C., and Patel, M. (2001) Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp. Cell Res.* **271**, 238–248
 22. Dang, X., Doble, B. W., and Kardami, E. (2003) The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* **242**, 35–38
 23. Mayan, M. D., Carpintero-Fernandez, P., Gago-Fuentes, R., Martinez-de-Illarduya, O., Wang, H. Z., Valiunas, V., Brink, P., and Blanco, F. J. (2013) Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am. J. Pathol.* **182**, 1337–1346
 24. Tsuchida, S., Arai, Y., Kishida, T., Takahashi, K. A., Honjo, K., Terauchi, R., Inoue, H., Oda, R., Mazda, O., and Kubo, T. (2013) Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *J. Orthop. Res.* **31**, 525–530
 25. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860
 26. Bush, P. G., Hall, A. C., and Macnicol, M. F. (2008) New insights into function of the growth plate: clinical observations, chondrocyte enlargement, and a possible role for membrane transporters. *J. Bone Joint Surg. Br.* **90**, 1541–1547
 27. Medina-Aunon, J. A., Paradelo, A., Macht, M., Thiele, H., Corthals, G., and Albar, J. P. (2010) Protein Information and Knowledge Extractor: discovering biological information from proteomics data. *Proteomics* **10**, 3262–3271
 28. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57
 29. van der Loos, C. M. (2010) Chromogens in multiple immunohistochemical staining used for visual assessment and spectral imaging: the colorful future. *J. Histotechnol.* **33**, 1
 30. Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., and Lamond, A. (2008) Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol.* **183**, 223–239
 31. Solan, J. L., and Lampe, P. D. (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 154–163
 32. Singh, D., Solan, J. L., Taffet, S. M., Javier, R., and Lampe, P. D. (2005) Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J. Biol. Chem.* **280**, 30416–30421
 33. Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., and Yates, J. R., 3rd (2003) A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.* **21**, 532–538
 34. Wu, C. C., and Yates, J. R., 3rd (2003) The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* **21**, 262–267
 35. Bruce, A. F., Rothery, S., Dupont, E., and Severs, N. J. (2008) Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc. Res.* **77**, 757–765
 36. Herve, J. C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D., Giepmans, B. N., and Bourmeyster, N. (2012) Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1844–1865
 37. Duffy, H. S., Delmar, M., and Spray, D. C. (2002) Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J. Physiol. Paris* **96**, 243–249
 38. Herve, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., and Duffy, H. S. (2007) Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 29–65
 39. Olk, S., Zoidl, G., and Dermietzel, R. (2009) Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 1000–1016
 40. Giepmans, B. N. (2006) Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv. Cardiol.* **42**, 41–56
 41. Kang, E. Y., Ponzio, M., Gupta, P. P., Liu, F., Butensky, A., and Gutstein, D. E. (2009) Identification of binding partners for the cytoplasmic loop of connexin43: a novel interaction with beta-tubulin. *Cell Commun. Adhes.* **15**, 397–406
 42. Zhou, Y., Yang, W., Lurtz, M. M., Ye, Y., Huang, Y., Lee, H. W., Chen, Y., Louis, C. F., and Yang, J. J. (2007) Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *J. Biol. Chem.* **282**, 35005–35017
 43. Singh, D., and Lampe, P. D. (2003) Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun. Adhes.* **10**, 215–220
 44. Hesketh, G. G., Van Eyk, J. E., and Tomaselli, G. F. (2009) Mechanisms of gap junction traffic in health and disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**, 263–272
 45. Hatakeyama, T., Dai, P., Harada, Y., Hino, H., Tsukahara, F., Maru, Y., Otsuji, E., and Takamatsu, T. (2013) Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Sci. Rep.* **3**, 2719
 46. Ruiz-Romero, C., Carreira, V., Rego, I., Remeseiro, S., Lopez-Armada, M. J., and Blanco, F. J. (2008) Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* **8**, 495–507
 47. Lambrecht, S., Verbruggen, G., Verdonk, P. C., Elewaut, D., and Deforce, D. (2008) Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **16**, 163–173
 48. Ruiz-Romero, C., Calamia, V., Mateos, J., Carreira, V., Martinez-Gomariz, M., Fernandez, M., and Blanco, F. J. (2009) Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 172–189
 49. Ruiz-Romero, C., and Blanco, F. J. (2009) The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. *Curr. Drug Targets* **10**, 543–556
 50. Lambrecht, S., Dhaenens, M., Almqvist, F., Verdonk, P., Verbruggen, G., Deforce, D., and Elewaut, D. (2010) Proteome characterization of human articular chondrocytes leads to novel insights in the function of small heat-shock proteins in chondrocyte homeostasis. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 440–446
 51. Rollin, R., Tornero, P., Marco, F., Camafeita, E., Calvo, E., López-Durán, L., Jover, J. A., López, J. A., Ramón Lamas, J., and Fernández-Gutiérrez, B. (2008) Differential proteome of articular chondrocytes from patients with osteoarthritis. *J. Proteomics Bioinform.* **1**, 267–280
 52. Hermansson, M., Sawaji, Y., Bolton, M., Alexander, S., Wallace, A., Begum, S., Wait, R., and Saklatvala, J. (2004) Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 43514–43521
 53. Wu, J., Liu, W., Bemis, A., Wang, E., Qiu, Y., Morris, E. A., Flannery, C. R., and Yang, Z. (2007) Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis. Rheum.* **56**, 3675–3684
 54. Mathias, R. T., Rae, J. L., and Baldo, G. J. (1997) Physiological properties of the normal lens. *Physiol. Rev.* **77**, 21–50
 55. Mathias, R. T., White, T. W., and Gong, X. (2010) Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol. Rev.* **90**, 179–206
 56. Tabertero, A., Medina, J. M., and Giaume, C. (2006) Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J. Neurochem.* **99**, 1049–1061
 57. Valle-Casuso, J. C., Gonzalez-Sanchez, A., Medina, J. M., and Tabertero, A. (2012) HIF-1 and c-Src mediate increased glucose uptake induced by endothelin-1 and connexin43 in astrocytes. *PLoS One* **7**, e32448
 58. Herrero-Gonzalez, S., Valle-Casuso, J. C., Sanchez-Alvarez, R., Giaume, C., Medina, J. M., and Tabertero, A. (2009) Connexin43 is involved in the effect of endothelin-1 on astrocyte proliferation and glucose uptake. *Glia* **57**, 222–233
 59. Inoguchi, T., Ueda, F., Umeda, F., Yamashita, T., and Nawata, H. (1995) Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 492–497
 60. Kuroki, T., Inoguchi, T., Umeda, F., Ueda, F., and Nawata, H. (1998) High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes*

- 47, 931–936
61. Hills, C. E., Bland, R., Wheelans, D. C., Bennett, J., Ronco, P. M., and Squires, P. E. (2006) Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **291**, F1045–F1051
 62. Mendoza-Naranjo, A., Cormie, P., Serrano, A. E., Wang, C. M., Thrasivoulou, C., Sutcliffe, J. E., Gilmartin, D. J., Tsui, J., Serena, T. E., Phillips, A. R., and Becker, D. L. (2012) Overexpression of the gap junction protein Cx43 as found in diabetic foot ulcers can retard fibroblast migration. *Cell Biol. Int.* **36**, 661–667
 63. Becker, D. L., Thrasivoulou, C., and Phillips, A. R. (2012) Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2068–2075
 64. Wang, C. M., Lincoln, J., Cook, J. E., and Becker, D. L. (2007) Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* **56**, 2809–2817
 65. Li, H., Brodsky, S., Kumari, S., Valiunas, V., Brink, P., Kaide, J., Nasjletti, A., and Goligorsky, M. S. (2002) Paradoxical overexpression and translocation of connexin43 in homocysteine-treated endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H2124–H2133
 66. Boengler, K., Dodoni, G., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Ruiz-Meana, M., Gres, P., Konietzka, I., Lopez-Iglesias, C., Garcia-Dorado, D., Di Lisa, F., Heusch, G., and Schulz, R. (2005) Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **67**, 234–244
 67. Rodriguez-Sinovas, A., Boengler, K., Cabestrero, A., Gres, P., Morente, M., Ruiz-Meana, M., Konietzka, I., Miro, E., Totzeck, A., Heusch, G., Schulz, R., and Garcia-Dorado, D. (2006) Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ. Res.* **99**, 93–101
 68. Halestrap, A. P. (2006) Mitochondria and preconditioning: a connexin connection? *Circ. Res.* **99**, 10–12
 69. Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Agullo, E., Stahlhofen, S., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Jorge, I., Torre, I., Vazquez, J., Boengler, K., Schulz, R., Heusch, G., and Garcia-Dorado, D. (2009) Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc. Res.* **83**, 747–756
 70. Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 519–530
 71. Iacobas, D. A., Urban-Maldonado, M., Iacobas, S., Scemes, E., and Spray, D. C. (2003) Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol. Genomics* **15**, 177–190
 72. Iacobas, D. A., Iacobas, S., Urban-Maldonado, M., and Spray, D. C. (2005) Sensitivity of the brain transcriptome to connexin ablation. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 183–196
 73. Iacobas, D. A., Scemes, E., and Spray, D. C. (2004) Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem. Int.* **45**, 243–250
 74. Stains, J. P., Lecanda, F., Screen, J., Towler, D. A., and Civitelli, R. (2003) Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. *J. Biol. Chem.* **278**, 24377–24387
 75. Stains, J. P., and Civitelli, R. (2005) Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. *Mol. Biol. Cell* **16**, 64–72
 76. Li, J. Y., Volkmandt, W., Dahlstrom, A., Herrmann, C., Blasi, J., Das, B., and Zimmermann, H. (1999) Axonal transport of ribonucleoprotein particles (vaults). *Neuroscience* **91**, 1055–1065
 77. Herrmann, C., Golkaramnay, E., Inman, E., Rome, L., and Volkmandt, W. (1999) Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J. Cell Biol.* **144**, 1163–1172
 78. Taneja, K. L., Lifshitz, L. M., Fay, F. S., and Singer, R. H. (1992) Poly(A) RNA codistribution with microfilaments: evaluation by in situ hybridization and quantitative digital imaging microscopy. *J. Cell Biol.* **119**, 1245–1260
 79. Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994) Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221–1232
 80. Carson, J. H., Worboys, K., Ainger, K., and Barbarese, E. (1997) Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**, 318–328
 81. Steward, O. (1997) mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* **18**, 9–12
 82. Mayanagi, T., and Sobue, K. (2011) Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh. Migr.* **5**, 150–159
 83. Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2012) Caldesmon regulates axon extension through interaction with myosin II. *J. Biol. Chem.* **287**, 3349–3356
 84. Loring, J. F., Wen, X., Lee, J. M., Seilhamer, J., and Somogyi, R. (2001) A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* **20**, 683–695
 85. Fushiki, S., Perez Velazquez, J. L., Zhang, L., Bechberger, J. F., Carlen, P. L., and Naus, C. C. (2003) Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 304–314
 86. Gutmann, D. H., Hedrick, N. M., Li, J., Nagarajan, R., Perry, A., and Watson, M. A. (2002) Comparative gene expression profile analysis of neurofibromatosis 1-associated and sporadic pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* **62**, 2085–2091
 87. Vinken, M., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Snykers, S., Henkens, T., and Rogiers, V. (2006) Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal.* **18**, 592–600
 88. Kielian, T. (2008) Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J. Neurochem.* **106**, 1000–1016
 89. Paznekas, W. A., Boyadjiev, S. A., Shapiro, R. E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C. E., Innis, J. W., Dinulos, M. B., Christian, C., Hannibal, M. C., and Jabs, E. W. (2003) Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 408–418
 90. Laird, D. W. (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **394**, 527–543
 91. Laird, D. W. (2010) The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* **20**, 92–101
 92. Laird, D. W. (2014) Syndromic and nonsyndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett.* **588**(8), 1339–48
 93. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 10171–10176

Osteoarthritis and Cartilage



Brief Report

Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes



R. Gago-Fuentes ^{†a}, P. Carpintero-Fernandez ^{†a}, M.B. Goldring [‡], P.R. Brink [§],
M.D. Mayan ^{†**}, F.J. Blanco ^{†||¶*}

[†] Cartilage Biology Research Group, Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

[‡] Tissue Engineering Repair and Regeneration Program, The Hospital for Special Surgery, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

[§] Department of Physiology and Biophysics, State University of New York, Stony Brook, NY, USA

^{||} Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII, Proteomics Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

[¶] Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2013

Accepted 6 February 2014

Keywords:

Hemichannels

Gap junction

Cx43

Articular chondrocyte

Cartilage

T/C-28a2

SUMMARY

Objective: The development of chondrocytic cell lines has enabled the investigation of the role of cellular phenotype and mechanisms in articular cartilage biology and physiopathology of several rheumatic diseases. Among them, the T/C-28a2 cell line has become a common tool in cartilage research. Recent results from our group have revealed that primary human chondrocytes in tissue and in monolayer culture contain high levels of connexin 43 (Cx43) and are able to directly communicate through gap junction (GJ) channels. These results challenge the existing thesis of cartilage physiology, that chondrocytes do not have the capacity to physically communicate with each other. Established cell lines offer the advantage of convenience and uniformity; however, the establishment process may cause a disruption of GJ. This study was performed to investigate if T/C-28a2 cells contain Cx43 protein and form functional channels.

Methods: Cx43 was characterized by RT-qPCR, Western blotting, and immunohistochemistry (IHC). Electrophysiology experiments, Lucifer Yellow (LY) uptake, electroporation *in situ* and scrape loading assay were performed to test the functionality of GJs.

Results: T/C-28a2 cells express Cx43. Electrophysiology experiments and LY uptake confirmed the capacity of these cells to communicate through GJ channels, although these cells contain significant levels of active c-Src kinase, presumably due to their immortalization with the Simian Virus 40 large T antigen. The results were validated using primary chondrocytes (PC).

Conclusions: These results reveal that the T/C-28a2 line may provide a useful *in vitro* model for the study of Cx43 function and cell communication to understand the physiology of chondrocytes and cartilage.

© 2014 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue with special mechanical properties that provides a smooth and frictionless surface essential for the pain-free function of joints. Adult cartilage is avascular and mainly composed of a dense extracellular matrix (ECM). Articular chondrocytes survive in this challenging environment embedded in small cavities called lacunae. Chondrocytes respond to mechanical stimuli, growth factors and cytokines and are responsible for the formation and maintenance of the integrity of the ECM. Recent results from our group revealed for the first time that chondrocytes embedded in the cartilage matrix contain at least two long cytoplasmic arms that spread along the

* Address correspondence and reprint requests to: F.J. Blanco, Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel: 34-981-176399; Fax: 34-981-176398.

** Address correspondence and reprint requests to: M.D. Mayan, Cartilage Biology Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel: 34-981-176399; Fax: 34-981-176398.

E-mail addresses: Ma.Dolores.Mayan.Santos@sergas.es (M.D. Mayan), fblagar@sergas.es (F.J. Blanco).

^a These authors contributed equally to this work.

matrix and reach a distant cell located in a different lacuna¹. Although some authors had already suggested the presence of cytoplasmic projections, no previous studies have directly observed intercellular connections between distant chondrocytes in the cartilage matrix². The intercellular communication occurs through channels formed by connexin 43 (Cx43), called Gap Junctions (GJ)^{1,3}. The results revealed that the three-dimensional cellular network mediated by GJ is involved in the synchronised regulation of the metabolic and physiologic cartilage homeostasis¹.

Connexins constitute a large family of trans-membrane proteins that allow (a) intercellular communication through GJ channels *via* direct transfer of ions, nutrients and small signalling molecules, (b) ECM–cell communication through single membrane spanning channels, so-called hemichannels, and (c) channel-independent functions upon cell proliferation and growth. Connexins are critical for cell metabolism, differentiation, and development and they play a major role in malignant transformation. Articular chondrocytes express Cx43 and form functional GJ and hemichannels⁴. In addition, previously reported results have implicated Cx43 hemichannels in the responses of rabbit and bovine articular chondrocytes to mechanical loading^{5,6}.

Connexin mutations, altered expression, or impaired GJ function are characteristic of several diseases. Besides, upregulation of Cx43 has been observed in inflammatory conditions in several tissues and on proliferative cells in damaged zones of cartilage from patients with osteoarthritis (OA)⁴. Because of the potential role of Cx43 in inflammation, tissue degeneration, and in OA disease processes, the development of appropriate *in vitro* models is pivotal for the understanding of the roles of Cx43 in chondrocyte physiology and pathology. Several cell lines have been used as convenient *in vitro* models to investigate chondrocyte functions and alterations related with disease⁷. However, given the existence of GJ intercellular communication (GJIC) in adult cartilage, it is important to use an *in vitro* model capable of reproducing the function of these channels. The results presented here demonstrate that the T/C-28a2 human cell line contains functional connexin channels, indicating that these cells may offer a useful model to study chondrocyte and cartilage physiology.

Methods

Cartilage collection and processing, primary culture of chondrocytes, RNA isolation, and real-time PCR assays, immunohistochemistry (IHC) and Western blotting were performed as previously described^{1,4}. Cells were pelleted to obtain micromass and cultured in 15-ml conical tubes for 7 days using DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Cx43 antibody and total c-Src antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-6560 and sc-19, Santa Cruz, CA). α -tubulin antibody from Sigma (T9026, St. Louis, MO) and Phospho-Src (Tyr416) antibody from Cell Signaling Technology (2101, Danvers, MA). Cx43 antibody used for IHC was purchased from BD Transduction Laboratories (610062, MA, USA). Primers used were specific for Cx43 (5'-CAATC ACTTGGCGTGACTTC-3' and 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3') and for miRNA1-1 (5'-GGCGTCCC GG GTC-3' and 5'-TGTGGAGTGCC CCTCAGT-3'). T/C-28a2 cells were cultured in DMEM supplemented with 100 μ g/ml Primocin (InvivoGen Primocin™, California, USA) and 15% FCS (Life Technologies Ltd, Madrid, Spain). The presence of functional hemichannels was evaluated by uptake of Lucifer Yellow (LY) (Cell Projects Ltd[®] Kent, UK). LY (*Mr* of 547 Da) does not enter in living cells except through hemichannels or GJ. Briefly, cells were washed with PBS containing 2 mM EGTA and immediately incubated with PBS containing 0.4% LY for 30 min at 37°C. Cells were then washed with PBS supplemented with 10% dialysed FBS (Silantes, Munich, Germany) and 3.2 mM CaCl₂ and viewed under a fluorescent microscope (Nikon Eclipse Ti and NIS-Elements

software) to determine the number of fluorescent cells as a measure of dye uptake. Cell viability was measured using trypan blue excision method. Viability was always greater than 98%. LY dye coupling assay to test the functionality of GJs was performed using different techniques. Electrophysiological measurements and dye injections were performed as previously reported⁴. Electroporation *in situ* (InSitu Porator, Cell Projects Ltd[®] Kent, UK) was carried out as before described^{1,8}. For scrape loading assay, cells were seeded on 12-well plates and cultured until the confluence reached 70–100%. Cells were rinsed two times with PBS and then three scrapes were made using a needle, a tip, and a scalpel in the presence of 0.4% LY in PBS. Cells were incubated for 3 min at 37°C. After washing with a PBS containing 10% dialysed FBS, dye transfer was captured using Nikon Eclipse Ti fluorescent microscope and NIS-Elements software. The distance of dye transfer from cutting site to the farthest visual uptake of dye indicates the GJ connectivity in cells. Cells were treated with the Cx43 mimetic peptide blocker GAP27 as previously reported¹. Data were analysed using GraphPad Prism software (version 5.00). Significant differences between sample groups were assessed using Student's *t* test and the Mann–Whitney test. Significant differences are represented as **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. Data are presented as the mean \pm S.D. *n* represents the number of independent experiments. In case of primary chondrocytes (PC) *n* is the number of independent experiments using chondrocytes from different donors.

Results

Quantitative gene expression analysis using real-time RT-PCR revealed that the T/C-28a2 cell line expresses low levels of Cx43 mRNA in comparison with human PC isolated from articular cartilage from adult donors [Fig. 1(A)]. Western blot experiments showed the presence of Cx43 protein in T/C-28a2 cells [Fig. 1(B)]. To examine the localization of Cx43, we conducted IHC experiments coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using a monoclonal anti-Cx43 antibody and cells in monolayer and 3D cultures [Fig. 1(B)]. Cx43 was mainly localized in the cytoplasm and in at the cell-margins between two adjacent cells.

The existence of functional non-junctional channels was tested by cellular uptake of LY [Fig. 1(C)]. Dye uptake occurred in ~92% of PC as well as T/C-28a2 cells in monolayer culture, as quantified by LY incorporation over a 30-min period. No significant difference in LY uptake was observed.

To test if T/C-28a2 cells are electrically coupled to each other by voltage-dependent GJ, we conducted a dual voltage-clamp method and whole-cell/perforated patch recording to control the membrane potential of both cell pairs and to measure currents. The junctional current recordings showed the basic type of coupling for voltage-dependent behaviour pattern described for GJ [Fig. 1(D)]. Dye injection (fluorescent glucose, NBDG) in a single cell confirmed the functionality of GJ in T/C-28a2 cells. Dye transfer between cells in membrane contact was monitored for 12 min [Fig. 1(E)].

The GJ connectivity was further assessed through *in situ* electroporation and scrape loading assays [Fig. 2(A) and (B)]. Quantification of GJIC revealed extensive transfer (4–12 cells deep, score 4.66) of LY between PC [Fig. 2(A)]. In addition, inhibition of GJIC using 250 μ M of GAP27 for 1 h significantly reduced the transfer of LY between cells (1–3 cells deep, score 1.30). Lower levels of transference were detected when LY was electroporated into T/C-28a2 cells (0–2 cell deep, score 0.24) [Fig. 2(A)]. Scrape-loading LY transfer technique confirmed coupling in cultures of the T/C-28a2 cells. 250 μ M of GAP27 for 1 h significantly reduced GJIC between adjacent cells [Fig. 2(B)]. PC highly transferred LY to adjacent cells (7–12 cells deep). T/C-28a2 cells showed less coupling (1–4 cells deep) than PC [Fig. 2(B)].

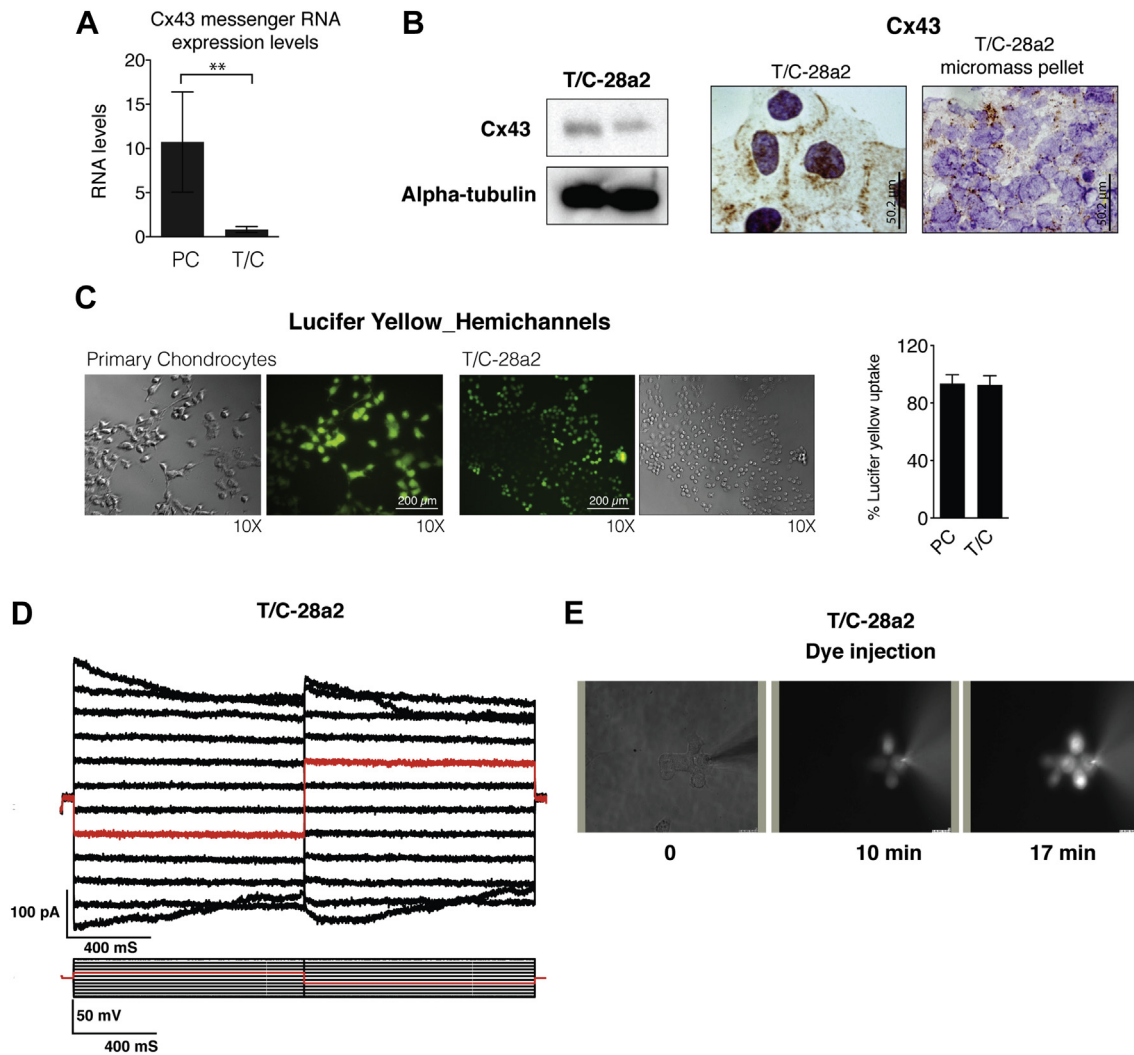


Fig. 1. T/C-28a2 cells contain functional Cx43 channels. (A) Expression analyses of Cx43 mRNA by real-time RT-PCR in PC isolated from the cartilage (PC) of adult donors and T/C-28a2 (T/C) cells. Data were normalized to HPRT1 levels. Data are represented as the mean \pm S.D. with $n = 5$. $**P = 0.0043$; Mann–Whitney test. (B) Western blots of T/C-28a2 cells from two confluent monolayer cultures. α -tubulin was used as loading control. IHC using the monoclonal anti-Cx43 antibody and cells on monolayer (left) and pellet (right) cultures after 7 days of culture in micromass. (C) Both cell types showed LY uptake consistent with hemichannels behaviour. The percentage of LY positive cells was calculated from six fields of view from two independent experiments (mean \pm S.D.). (D) Voltage-gating properties of T/C-28a2 cells. (E) Dye (NBEG) flux in T/C-28a2 cell pairs. A pipette containing the dye was attached to the cell on the right in the whole cell configuration. Epifluorescent micrographs were taken at 0, 10, and 17 min after dye injection into the right-sided cell.

Western blotting of protein extracts from confluent cultures confirmed that T/C-28a2 cells produce significantly less Cx43 protein than PC [Fig. 2(C)]. In addition, higher levels of total c-Src kinase and active Tyr 416-phosphorylated c-Src were detected in T/C-28a2 cells. IHC assays using antibodies against total c-Src showed localization in the cytoplasm and in the membrane between adjacent cells [Fig. 2(D)]. However PC only showed cytoplasmic c-Src expression [Fig. 2(D)].

Discussion

There is strong evidence that chondrocyte cell–cell interactions play a critical role in chondrogenesis and in cartilage physiology. This cross-talk between articular chondrocytes includes direct contact-dependent gap junctional pathways^{1,4,9,10}. Although the cell communication involving GJ has been less studied, this system seems to play a pivotal role in chondrocyte metabolism and physiology in adult cartilage^{1,9} and alteration in Cx43 function may be associated with the development of OA⁴.

Only a few researchers have access to cartilage samples from human origin. It is also difficult to obtain a large number of cells

from cartilage derived from a single patient to perform cell culture experiments. Also, in PC from humans or animals, loss of chondrocyte phenotype occurs upon expansion in serial monolayer culture. The lack of a reproducible source of chondrocytes lead to the establishment of several chondrocyte lines derived from humans and animals. However some lines have limitations in the expression of type-II collagen. T/C-28a2, which was derived from primary cultures isolated from costal cartilage from 15-years-old female using the SV40 large T antigen, express genes encoding the chondrocyte-specific matrix molecules, including type-II collagen and proteoglycans¹¹. The present study shows that T/C-28a2 cells form functional connexin channels as demonstrated by dye uptake and electrophysiology experiments [Fig. 1(C) and (D)–(F)]. LY uptake by single cells is equal in both cell types [Fig. 1(C)]. Interestingly, the treatment of cells with the Cx43 mimetic peptide, GAP27, did not decrease LY uptake from extracellular medium by single cells [Fig. S1(A)]. It has been reported that chondrocytes express pannexins which form non-junctional channels that share similar membrane topology and similar electrical and chemical properties with hemichannels formed by connexins. Actually, PC and T/C-28a2 cells express high levels of pannexin 1 in comparison with the

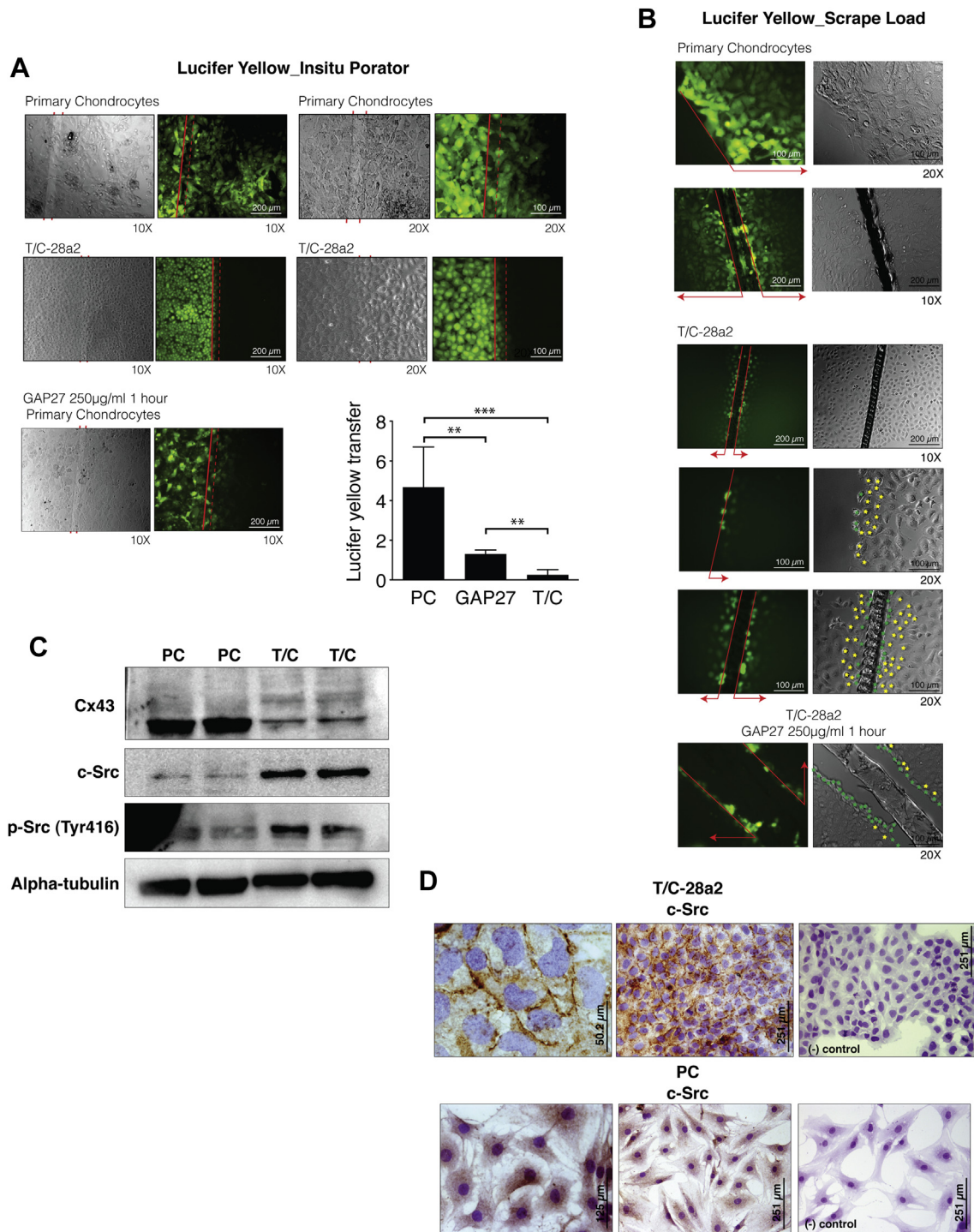


Fig. 2. GJIC between cells. (A) *In situ* electroporation on a partly conductive slide for the measurement of the intercellular junction transfer of LY. Cells were electroporated in the presence of 5 mg/ml of LY. After washing off the unincorporated LY, the cells were photographed under phase contrast or fluorescence illumination. The solid red lines define the conductive (on the left) and nonconductive side points (on the right). Original magnifications $\times 10$ and $\times 20$. The graph represents the number of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell (means \pm S.D.). $n = 6$ $^{**}P < 0.01$, $^{***}P = 0.0002$; Mann–Whitney test, untreated (PC) vs GAP27 and PC vs T/C-28a2. (B) Scrape load/dye transfer assay was performed to examine GJ activity. The distance of dye transfer from cutting edge (solid vertical red line and green stars) to the farthest cells with the dye uptake is represented by horizontal red arrows or yellow stars. (C) Western blot assays to detect the amount of Cx43 and c-Src present in PC and T/C cells. α -tubulin was used as loading control. (D) IHC of T/C-28a2 cells and PC using anti-c-Src antibody. The negative controls are shown on the right.

housekeeping gene HPRT1 [Fig. S1(B)]. Future studies will elucidate the different activities and functions of non-junctional channels formed by connexins and pannexins in articular chondrocytes.

Our results show that T/C-28a2 cells express lower levels of Cx43 mRNA and Cx43 protein than PC [Fig. 1(A) and Fig. 2(C)]. In accordance with these data, dye uptake and electrophysiology

experiments show lower level of GJIC in this cell line [Fig. 1(D) and Fig. 2(A), (B)]. Several potential regulators can affect to GJIC in T/C-28a2 cells. Among them, SV40-LT activates c-Src¹² and phosphorylation of Cx43-C-terminal tail by the c-Src tyrosine kinase are known to negatively regulate GJIC¹³. Western blotting and IHC show that T/C-28a2 cells contain relatively high levels of the active

form of c-Src that localizes in the membrane between adjacent cells [Fig. 2(C), (D)]. The detection of diffuse upper Cx43 immunoreactive bands by Western blot analysis [Fig. 2(C)] suggests post-transcriptional modifications of Cx43 in T/C-28a2 cells that are not present in the Cx43 from PC. In addition, the basic type of coupling between T/C-28a2 cells [Fig. 1(D)] could also suggest heteromeric coupling¹⁴. The changes in Cx43 expression or GJIC in PC and T/C-28a2 cells may be also a consequence of some alteration during primary culture. Chondrocytes in articular cartilage express lower levels of Cx43 and contain less Cx43 protein than chondrocytes in monolayer culture [Fig. S2(A, B)]. Furthermore, T/C-28a2 cells and chondrocytes in tissue contain higher levels of miRNA1-1 [Fig. S2(C)], which may down-regulate Cx43 expression¹⁵, but this may not occur in isolated PC in culture.

In conclusion, the T/C-28a2 cells, in addition to expressing specific markers of articular chondrocytes¹¹, appear to have the ability to form functional non-junctional and GJ channels between cells. The *in vitro* system described here may provide a useful model for the study of chondrocyte metabolism, physiology and mechanical properties and for the identification of the physiological and pharmacological agents capable of interfering with chondrocyte cell–cell or cell–matrix communication in articular cartilage.

Ethics approval

The study was conducted with the approval of the local ethics committee in Galicia, Spain.

Author contributions

MDM and FJB have full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity and the accuracy of the data presented.

Study conception and responsibility for the project planning: MDM and FJB.

Data acquisition/assembly/analysis/interpretation: RG-F, P C-F, PRB, MDM.

Writing of article: MDM.

Critical revision and approval of final submitted version of article: RG-F, P C-F, MBG, PRB, MDM and FBG.

Role of the funding source

This work was supported in part through funding from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER – CB06/01/0040; PI12/00329; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; Proteo-Red/ISCIII) (to FJB); Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, FEDER (European Community) (to FJB); Sociedad Española de Reumatología (FER 2013) (to MDM) and ISCIII (PI13/00591) (to MDM); National Institutes of Health grants RO1 GM088180 (to PRB) and RO1-AG022021 (to MBG); a pre-doctoral fellowship from Xunta de Galicia to Raquel Gago-Fuentes. María D Mayán is an Isidro Parga Pondal researcher (Xunta de Galicia). The study sponsors had no role in the study design, data collection, data analysis, or writing of the manuscript and did not affect the decision to submit the manuscript for publication.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Lourdes Sanjurjo and Dolores Salinas Bujan for generously obtaining cartilage samples after surgery. Maria Jose Sanchez Dopico for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture. Purificación Filgueira-Fernández and

Noa Goyanes for preparation of samples and IHC experiments. Dr Leda Raptis for helpful discussions and suggestions. Estefania Cives for administrative assistance. The authors would also like to thank Dr HZ Wang for the collection of electrophysiological data pertinent to this study.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.002>.

References

- Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis* 2013 Nov 13, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204244>.
- Murray DH, Bush PG, Brenkel IJ, Hall AC. Abnormal human chondrocyte morphology is related to increased levels of cell-associated IL-1beta and disruption to pericellular collagen type VI. *J Orthop Res* 2010;28:1507–14.
- Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004;205:363–70.
- Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Martinez-de-Illarduya O, Wang HZ, Valiunas V, et al. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2013;182:1337–46.
- Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors – a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009;214:275–83.
- Garcia M, Knight MM. Cyclic loading opens hemichannels to release ATP as part of a chondrocyte mechanotransduction pathway. *J Orthop Res* 2010;28:510–5.
- Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 2006;12:1971–84.
- Raptis L, Vultur A, Brownell HL, Tomai E, Anagnostopoulou A, Arulanandam R, et al. Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol Biol* 2008;423:173–89.
- Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:69–81.
- Zhang W, Green C, Stott NS. Bone morphogenetic protein-2 modulation of chondrogenic differentiation in vitro involves gap junction-mediated intercellular communication. *J Cell Physiol* 2002;193:233–43.
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 1994;94:2307–16.
- Arulanandam R, Geletu M, Raptis L. The simian virus 40 large tumor antigen activates cSrc and requires cSrc for full neoplastic transformation. *Anticancer Res* 2010;30:47–53.
- Geletu M, Trotman-Grant A, Raptis L. Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors. *Anticancer Res* 2012;32:4245–50.
- Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, et al. Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* 1997;273:C1386–96.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486–91.

Correction

Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:275–84. There are two corresponding authors of this paper:

Dr Maria D Mayan, Rheumatology Division, Cartilage Biology Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; Ma.Dolores.Mayan.Santos@sergas.es and Dr Francisco J Blanco, Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, A Coruña 15006, Spain; fblagar@sergas.es

Maria D Mayan is first author; Francisco J Blanco is last author.



CrossMark

Ann Rheum Dis 2015;74:792. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204244corr1



Correction

Ann Rheum Dis 2015 74: 792
doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244corr1

Updated information and services can be found at:
<http://ard.bmj.com/content/74/4/792>

These include:

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

EXTENDED REPORT

Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis

Maria D Mayan,¹ Raquel Gago-Fuentes,¹ Paula Carpintero-Fernandez,¹ Patricia Fernandez-Puente,² Purificacion Filgueira-Fernandez,³ Noa Goyanes,³ Virginijus Valiunas,⁴ Peter R Brink,⁴ Gary S Goldberg,⁵ Francisco J Blanco^{1,2,3}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204244>).

¹Rheumatology Division, Cartilage Biology Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

²Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII, Proteomics Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

³Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

⁴Department of Physiology and Biophysics, State University of New York, Stony Brook, New York, USA

⁵Department of Molecular Biology, Medical Center Drive, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Stratford, New Jersey, USA

Correspondence to

Dr Francisco J Blanco, Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, A Coruña 15006, Spain; fblagar@sergas.es

MDM, RG-F and PC-F contributed equally.

Received 6 July 2013

Revised 12 September 2013

Accepted 26 October 2013

ABSTRACT

Objective This study investigated whether chondrocytes within the cartilage matrix have the capacity to communicate through intercellular connections mediated by voltage-gated gap junction (GJ) channels.

Methods Frozen cartilage samples were used for immunofluorescence and immunohistochemistry assays. Samples were embedded in cacodylate buffer before dehydration for scanning electron microscopy. Co-immunoprecipitation experiments and mass spectrometry (MS) were performed to identify proteins that interact with the C-terminal end of Cx43. GJ communication was studied through in situ electroporation, electrophysiology and dye injection experiments. A transwell layered culture system and MS were used to identify and quantify transferred amino acids.

Results Microscopic images revealed the presence of multiple cellular projections connecting chondrocytes within the matrix. These projections were between 5 and 150 μm in length. MS data analysis indicated that the C-terminus of Cx43 interacts with several cytoskeletal proteins implicated in Cx trafficking and GJ assembly, including α -tubulin and β -tubulin, actin, and vinculin. Electrophysiology experiments demonstrated that 12-mer oligonucleotides could be transferred between chondrocytes within 12 min after injection. Glucose was homogeneously distributed within 22 and 35 min. No transfer was detected when glucose was electroporated into A549 cells, which have no GJs. Transwell layered culture systems coupled with MS analysis revealed connexins can mediate the transfer of L-lysine and L-arginine between chondrocytes.

Conclusions This study reveals that intercellular connections between chondrocytes contain GJs that play a key role in cell–cell communication and a metabolic function by exchange of nutrients including glucose and essential amino acids. A three-dimensional cellular network mediated through GJs might mediate metabolic and physiological homeostasis to maintain cartilage tissue.

INTRODUCTION

Articular cartilage covers the ends of bones to facilitate the painless, low-friction movement of synovial joints. This tissue contains extracellular matrix (ECM) that is primarily composed of type II collagen and proteoglycans. Chondrocytes are highly specialised cells embedded in the ECM that provide cartilage with its remarkable mechanical properties. The cells occupy less than 10% of the total volume of articular cartilage but are responsible for the formation, maintenance and repair of

the tissue throughout adult life.¹ Unlike bone and other connective tissues, adult cartilage is an avascular, alymphatic tissue that is not innervated.^{2,3}

Chondrocytes are isolated in small cavities known as lacunae. This characteristic has given rise to the notion that chondrocytes are not directly connected with each other and that they communicate with other chondrocytes primarily through the diffusion of substances in the matrix. However, proper cell-to-cell communication is essential for the organisation of a timely and uniform response to physical or biological stimuli or cell damage or simply to maintain tissue homeostasis. The lack of blood vessels and lymphatics and the relative isolation of the cells have been proposed to underlie the poor regenerative capacity of cartilage. This, however, is most likely not the case for articular cartilage, as ageing reduces the cell density and cartilage thickness, which allows the tissue to maintain its structure and function.^{4,5} However, the progressive degeneration of the articular cartilage matrix leads to osteoarthritis (OA), which is one of the most common causes of pain and disability in the Western world. OA is a degenerative joint disease characterised by the degeneration and subsequent loss of articular cartilage structure and function.^{6–9}

We have recently shown that human articular chondrocytes express integral membrane proteins known as connexins (Cx).¹⁰ Cxs form hemichannels that in turn form gap junctions (GJs) to directly connect the cytoplasm of two adjacent cells. GJs are responsible for the chemical and electrical coupling that occurs in neuronal synapses and the coordinated depolarisation of cardiac muscle.¹¹ These channels enable the exchange of small hydrophilic molecules, including second messengers such as inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), cAMP, glutamate and ATP,^{12–17} which serve a variety of functions. We have demonstrated that primary chondrocytes from human adults retain the capacity to communicate through voltage-gated GJ channels.¹⁰ The presence of functional GJs, together with other previously unpublished results obtained by our group using optical microscopy, led us to further investigate the morphology of articular chondrocytes in tissue.

MATERIALS AND METHODS

Cartilage collection and processing

Human knee and femoral head articular cartilage samples were obtained from adult donors after joint surgery after informed consent and Institutional

To cite: Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2013-204244

Ethics Committee approval. Fresh cartilage explants from *Sus scrofa* were generously donated by the veterinary area of the INIBIC-Hospital Universitario A Coruña. In situ cartilage samples were frozen immediately in Cryomold Standard using Tissue-Tek O.C.T. compound and isopentane in liquid nitrogen and stored at -80°C . For the isolation and culture of primary chondrocytes, the fresh cartilage surface was rinsed with saline. A scalpel was used to cut parallel vertical sections, which were subsequently incubated with trypsin-EDTA solution (0.5 mg/mL) for 10 min at 37°C . After removing the trypsin solution, the cartilage slides were treated for 16–18 h with 2 mg/mL clostridial collagenase type IV (Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), supplemented with 5% foetal calf serum (FCS; Gibco, Invitrogen) to release the cartilage cells. The cells were then seeded onto 25 cm² (250 000 cells), 75 cm² (2 million cells) or 162 cm² (3 million cells) flasks and incubated at 37°C in 5% CO₂ and air in DMEM supplemented with 100 µg/mL Primocin (Invivo Gen Primocin) and 15% FCS.¹⁰ The cells were grown to ~80–90% confluence. Chondrocytes were used for experiments during the third or fourth week of primary culture (see online supplementary figure S1).

Tissue processing and immunohistochemistry (IHC) assays

Cartilage sections were serially sectioned (4 µm) at -20°C in a Cryostat (Leica CM1510). The tissue sections were fixed with acetone for 10 min at 4°C , dried at room temperature (RT) and washed for 10 min with PBST (PBS with 0.1% Tween 20, pH 7.6). Before staining, endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation with H₂O₂ and methanol for 10 min. The cells were then washed once with PBST, and the primary antibody was applied for 1 h at RT. After three washes with PBST for 10 min each, the sections were incubated with a peroxidase-labelled polymer conjugated to goat anti-mouse/rabbit Ig (Dako, Denmark) for 1 h. After three washes with PBST, peroxidase activity was developed using a freshly prepared substrate chromogen solution containing 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂ (Dako, Denmark). The sections were washed in distilled water, counterstained with Gill's haematoxylin, gradually dehydrated with graded alcohol and mounted in xylene with Depex (Serva, Germany). The cultured cells were seeded (25 000 or 250 000 cells) onto chamber slides and fixed with acetone for 10 min at 4°C , dried at RT and washed for 10 min with PBST before following the procedure described above. Negative controls (omitting the primary antibody) were performed to test the specificity of each antibody. Anti-Cx43 (610062) was supplied from BD Transduction Laboratories. Anti-Collagen II (MAB1330) was obtained from Millipore. Anti-Sox9 (ab76997) was purchased from Abcam and anti-CD31 (M0823) from Dako. Tissue sections were also counterstained with Gill's haematoxylin or with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The slides were imaged using an Olympus BX61 microscope and a DP71 digital camera (Olympus). Image calibration was performed with AnalySIS^D V.5.0 software (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany).

Scanning electron microscopy

Tissues frozen in the Tissue-Tek O.C.T. compound and stored at -80°C were cut into pieces with a scalpel, defrosted at RT by immersion in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4, dehydrated in a graded series of ethanol, dried using the critical point method and coated with gold using a sputter procedure. Images were obtained at RT using a Jeol JEM 6400 Scanning Electron Microscope at 20 kV and Inca Energy V.200 software.

Co-immunoprecipitation

Immunoprecipitation (IP) experiments were performed with primary chondrocytes from human adults. Because lysis and solubilisation can disrupt protein–protein or protein–membrane interactions, to identify Cx43-interacting partners, the cells were cross-linked using a low concentration of formaldehyde (1%) for 15 min at RT.¹⁸ The cross-linking reaction was quenched for 10 min by adding 1 M glycine to a final concentration of 0.125 M. After cross-linking, the cells were collected, washed with PBS and frozen at -80°C . The cells were then resuspended in 1000 µL of IP lysis buffer containing protease inhibitors (Sigma) and 1 mM PMSF (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8, NP-40 0.5% vol/vol, 1.0% vol/vol Triton-X and 150 mM NaCl). The lysates were precleared by incubation with 50 µL of protein G sepharose (50% slurry). The anti-CTD-Cx43 antibody (SC-20; Santa Cruz Biotechnology) was then added to the precleared lysates, followed by protein G sepharose beads (50 µL of 50% slurry), and the samples were incubated overnight at 4°C . To discard non-specific-binding proteins, Co-IP experiments were also performed in parallel without antibodies. The beads were washed four times with IP buffer. The bead pellets were suspended in loading buffer (10% SDS, 0.2 M Tris, pH 6.8, 50% glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue (5×) containing 1.42 M 2-mercaptoethanol) and boiled for 10 min. The supernatants were collected and stored at -80°C . Silver stain analysis of the IPs and western blots was used to determine the specificity of the interactions. For SDS-PAGE gel electrophoresis, 5 µL of the denatured immunoprecipitated proteins were loaded and separated on 10% polyacrylamide gels. The gels were electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes (Millipore Co, Bedford, Massachusetts, USA). The membranes were blocked with 5% milk in PBS containing 0.1% Tween-20 (Sigma). After probing with antibodies, the membranes were developed using an ECL Western Blotting Detection reagent from GE Healthcare.

Identification of proteins using SDS-PAGE and nanoLC MALDI-TOF/TOF

Immunoprecipitated proteins were loaded and separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels in a Protean mini-gel system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G25, and the resulting lanes were size-fractionated into three sections that were subsequently processed independently and subjected to in-gel digestion following a standard procedure.¹⁹ The peptide fractions were separated using reverse-phase chromatography in a nanoLC system (Tempo, Eksigent, Dublin, California, USA) and deposited onto a MALDI plate using an automatic spotter (SunCollect, Sunchrome, Friedrichsdorf, Germany). The mass spectrometry (MS) runs for each chromatogram were acquired and analysed in a MALDI-TOF/TOF instrument (4800 ABSciex, Framingham, Massachusetts, USA). The identification of peptides and proteins and the relative quantification of their abundances were performed using the Protein Pilot software V.3.0 (Applied Biosystems) with a Paragon Algorithm. The MS/MS data were searched against the UniProt/Swiss-Prot database of protein sequences (UniProt Swiss-Prot 2010_2012) using the following parameters: cysteine alkylation with IAA, urea denaturation, one missed cleavage allowed in trypsin digestion and focus on biological modifications. Only proteins with a threshold >95% confidence (>1.3 Unused Score) were considered for protein identification.

Image recording and data analysis

To determine the intercellular permeability of glucose and oligonucleotides, we employed previously published methods.^{20–21}

Primary human chondrocytes were placed on an inverted microscope for probe injection. Micropipettes were pulled from capillary glass with a vertical pipette puller and backfilled with either 1 mM glucose or 0.5 mM of oligonucleotide in pipette solution as described previously.¹⁵ A 12-mer morpholino was used as previously reported.¹⁵ Both probes were injected into one cell of a monolayer of primary chondrocytes obtained from human adults, as previously reported.²⁰ The data recording and analysis were performed as previously described.^{17 20}

Electroporation in situ

The quantification of GJ intercellular transference was performed as previously described.^{22 23} Briefly, the system (InSitu Porator, Cell Projects Ltd) was used to introduce tracer dyes and other molecules into cells growing on a transparent electrode in a non-traumatic manner (cells located to the right of the electrode; see figure 5B), and GJ-based transfers are detected by diffusion of the dye to adjacent, non-electroporated cells (cells located to the left of the electrode). The cells were grown on glass slides, half of which was coated with electrically conductive, optically transparent, indium-tin oxide. A total of 400 μ L of the fluorescent glucose tracer, 2-NBDG (1 mg/mL in HBSS without calcium), was applied to the cells and introduced through an electrical pulse (mild setting, 20 V). The electroporation solution was then aspirated, and the cells were incubated at 37°C for 4 min in DMEM supplemented with 10% dialysed FBS. The cells were then fixed with 4% formaldehyde in PBS for 2 min at RT. The migration of the dye through GJs to non-electroporated cells growing on the non-conductive area of the slide was observed under fluorescence illumination using an inverted fluorescence microscope (Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon) with imaging software (NIS-Element AR, V3.0).

Metabolic capture assay

A layer culture system was used to study the transference of amino acids as previously described^{14 24–27} with some modifications. Briefly, ‘donor’ primary human chondrocytes were cultured in SILAC DMEM containing 10% dialysed FBS and supplemented with 73 mg/mL of [¹³C₆]-L-lysine, 28 mg/mL of [¹³C₆, ¹⁵N₄]-L-arginine and 10 \times L-glutamine, designated ‘labelled’ medium. The same number of primary chondrocyte ‘receiver’ cells was cultured in non-labelled SILAC DMEM containing 73 mg/mL L-lysine and 28 mg/mL L-arginine, L-glutamine and 10% dialysed FBS. The cells were expanded in labelled or non-labelled medium for six doublings. The receivers were plated onto inverted inserts containing porous membranes suitable for cell culture (12 mm Transwell with a 3.0 μ m Pore, Corning) or into each well of a six-well cluster plate as ‘control receivers’. After adhering to the membranes, the inserts containing receiver cells were turned right-side-up and plated into six-well plates. The donors and receivers are able to make contacts through cellular projections and to form GJs through the pores in the membrane, which measure 3 μ m in diameter and are small enough to block cells greater than 10 μ m in diameter from migrating to the other side of the membrane (cells incubated on the top of the membrane overnight did not migrate through the membrane) within the time frame of the assay (4 h after the donors were plated above the receivers). The cells were scraped with a sterile rubber policeman (Sigma-Aldrich), collected in PBS in 1.5 mL tubes (Eppendorf) and stored at –80°C. Each cell pellet was lysed in 112.5 μ L of lysis buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1% NP-40, 1 mM PMSF) for 20 min at 4°C, diluted with 634.5 μ L of dilution buffer (10 mM Tris, pH 8.0, and 10 mM EDTA, pH 8.0), sequentially

filtered through 50 and 3 kDa Centricon filters (KDa, Amicon) and frozen at –80°C. The fractions corresponding to molecules less than 3 kDa were dried in a SpeedVac (Savant SPD 121p, Thermo). Identification and quantification of free amino acids were performed using ESI*/LC/MS-Orbitrap. Prior to the LC analysis, the amino acids were derivatised using the EZ:faast™ kit according to the manufacturer’s protocol (EZ:faast LC-MS for the free physiological amino acid kit; Phenomenex, USA). Calculations were performed using the data analysis portion of the software that controls the analytical system (Xcalibur V2.0.7, Thermo Scientific, USA).

Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism software (V5.00). Significant differences between sample groups were assessed using Student t test and Mann–Whitney test. Significant differences are represented as *p<0.05 and **p<0.01. Data are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Articular chondrocytes have long, thin cytoplasmic arms extending from the cell body to connect with distant lacunae

Gill’s haematoxylin-stained histological sections of cartilage from *S scrofa* revealed the presence of multiple projections that cross the matrix and specifically join cells located in different lacunae (see figure 1A and online supplementary figure S2). While these projections were primarily located in the superficial to middle zones, they were also observed in the deepest zones of the cartilage. IHC analysis of cartilage from human adults, performed with anti-Col2A and anti-Sox9 antibodies, suggested the presence of long cellular projections (figure 1B), ranging from 5 to 150 μ m in length, between distant lacunae (see online supplementary figure S3). Cells with projections showed positive signals for both antibodies (figure 1B). A more detailed examination by confocal microscopy showed further evidence for the presence of long cytoplasmic extensions that project from the cell body and span several cell micrometres within the matrix to reach a distant lacuna (figure 1C).

The structure of the cartilage does not favour the identification of cell elements, projections or other cellular details that cross the dense ECM by microscopy techniques. Cellular extensions between cells in the same plane of sectioning were only detected in less than 1% of the analysed samples. The results obtained in figure 1A were obtained using young cartilage from *S scrofa*, which contains higher number of chondrocytes than cartilage from human adults.

Scanning electron microscopy (SEM) of *S scrofa* and human cartilage samples confirmed that the projections observed by optical microscopy (figure 1) are indeed cytoplasmic extensions of the cell (figure 2). Chondrocytes within cartilage contain at least two long cytoplasmic extensions per chondrocyte that spread thinly (~200 nm in width) along the ECM and were found to physically connect cells located in different lacunae (figure 2).

Cx43 is located along chondrocyte membranes, including cellular projections

As predicted, IHC analysis of primary human chondrocytes revealed high levels of Cx43 between the cytoplasm of two adjacent cells, confirming the presence of GJ channels between the contacting cells (figure 3A, blue arrows). Interestingly, Cx43 was also detected along the thinner extensions of cultured human chondrocytes (figure 3B, red arrows). In tissue samples,

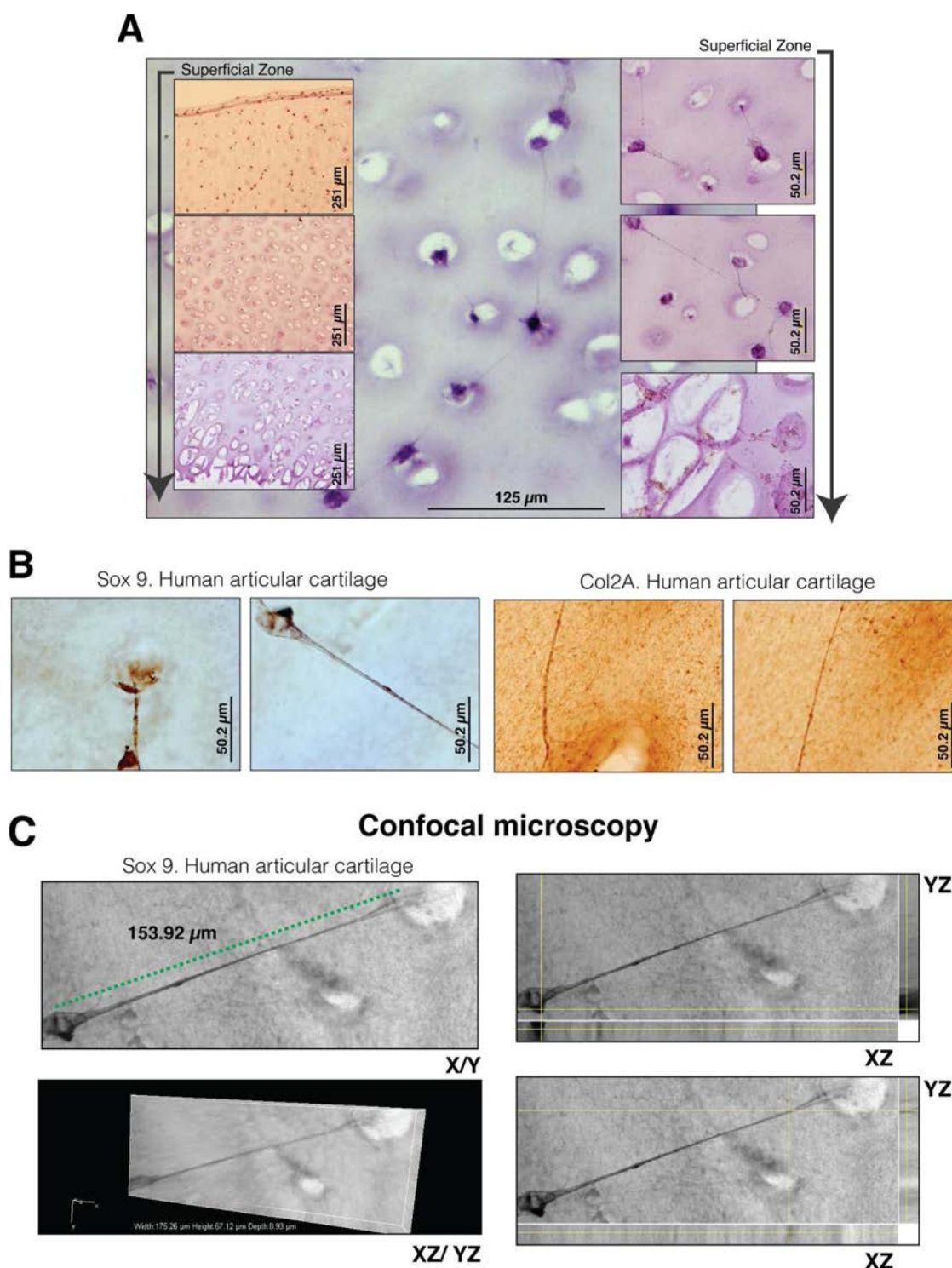


Figure 1 Optical images demonstrate the presence of cellular connections between chondrocytes in articular cartilage. (A) Immunohistochemistry (IHC) coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using articular cartilage from *Sus scrofa* (3 months old) and an antibody for the endothelial/haematopoietic marker CD31 confirmed that the cells found in individual lacunae and containing cellular connections correspond to chondrocytes (see online supplementary figure S2). Cartilage sections were analysed from the superficial zone, located next to the synovial fluid, to the deepest region next to the subchondral bone. (B) IHC analysis of cryosections of cartilage obtained from human adults stained with a monoclonal anti-Col2A antibody or an anti-Sox9 antibody. Note that no Gill's haematoxylin counterstaining was performed before IHC experiments. (C) Confocal microscopy confirmed that cell projections and cell bodies are embedded in the extracellular matrix and that cell projections and cell bodies coincide in the same point of plane. Transmitted light images were obtained using a Nikon Ti Eclipse Confocal Microscope and the Confocal A1R Nikon imaging system. The analysis was performed using NIS Elements AR V.3.2 imaging software. For 3D imaging, sequence of Z-stack images (each 0.53 μm of depth) were captured in different Z-axis (depth of focus). The images are shown in X/Y axis and XZ/YZ (Z-stack images) axis. The green dashed line shows the cell body and cell projection detected in the same plane of section.

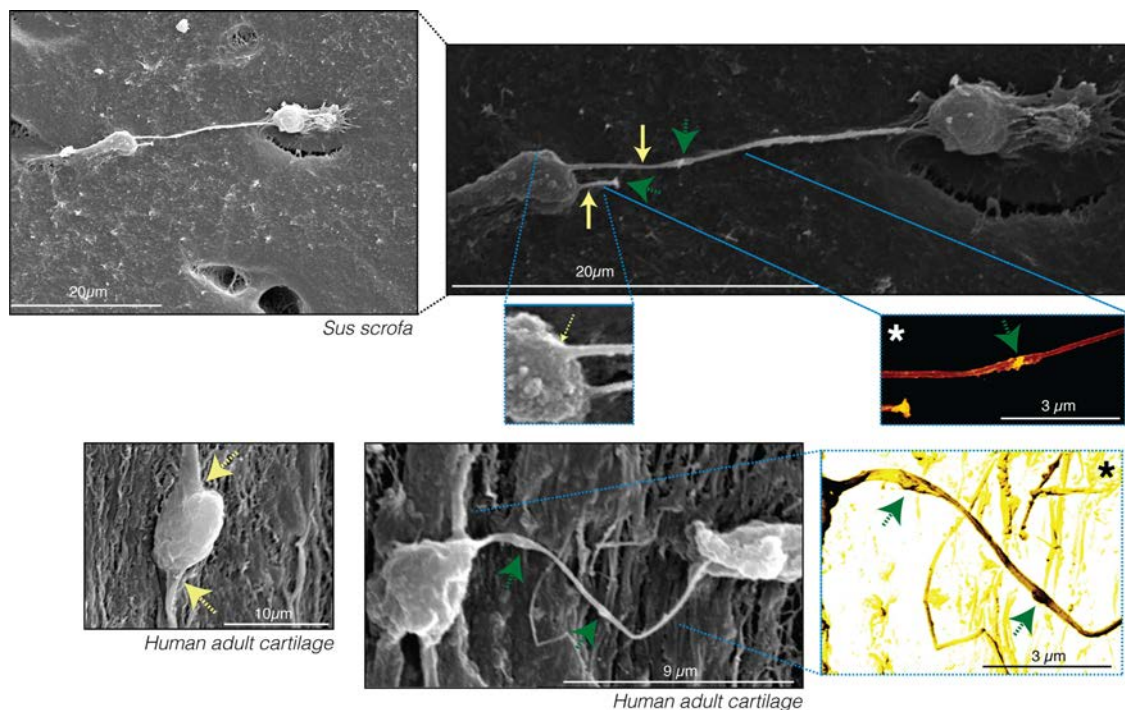


Figure 2 Scanning electron microscopy images validate the presence of long, thin cytoplasmic arms extending from the cell body. Long cytoplasmic arms were observed in chondrocytes from *Sus scrofa* and human adults. The yellow arrows indicate cytoplasmic projections. Original images show different characteristic intensities or grey levels. The cells appear bright grey, whereas the matrix components are darker grey. The asterisk indicates images that were processed to improve the contrast and provide colour to the original greyscale image. Homogeneous colourisation was performed for the entire image without selecting any areas to ensure that colours fairly represent the differences in the intensity of the original images. The green arrows indicate the presence of vesicles or other components within the projection.

Cx43-positive spots were distributed throughout the cell, particularly at the edges of the lacuna (figure 3C). We also detected positive staining within the matrix outside the lacuna (figure 3C, red arrows), suggesting the presence of GJs in the cellular projections.

Interactions between Cx43 and cytoskeletal proteins implicated in Cx trafficking were investigated through co-immunoprecipitation using cultured human chondrocytes and an antibody that specifically recognises the C-terminal end of Cx43, followed by nano-LC-MS/MS analysis. The MS data analysis indicated that the C-terminal tail of Cx43 interacts with several cytoskeletal proteins, including α -tubulin and β -tubulin, actin, vimentin and vinculin (figure 3D and table 1). These results are consistent with chondrocytes forming GJs and communicating through cellular extensions.

Neighbouring chondrocytes exchange solutes, including oligonucleotides

An analysis of fluorescent DAPI counterstaining of cartilage sections from *S scrofa* revealed positive fluorescence in cellular projections (figure 4A), suggesting functional coupling among tissue chondrocytes. The images shown in figure 4A were overexposed; however, DAPI fluorescence was specifically observed in cellular projections, not in the matrix, indicating that these fluorescent signals were not due to overexposure of the image.

To confirm whether adult human chondrocytes can transfer siRNA-sized oligonucleotides through GJs, as suggested by the images obtained in figure 4A, fluorescently labelled oligonucleotides (morpholinos), 12 nucleotides in length (12-mer oligo), were synthesised and introduced into one cell of a pair using a patch pipette (figure 4B). The results demonstrated that the

12-mer oligo was transferred between primary chondrocytes within 12 min after injection (figure 4B).

Direct transfer of glucose and amino acids between neighbouring chondrocytes

The capacity of chondrocytes to transfer glucose through GJs was studied by loading glucose into individual human chondrocytes and subsequently confirmed through in situ electroporation (figure 5). A solution containing a fluorescent glucose tracer (2-NBDG) was introduced into one cell of a pair (donor cell) through a patch pipette (figure 5A). Intercellular transfer of glucose was observed between adjacent chondrocytes, resulting in homogeneous distribution of the label within 22–35 min (figure 5A).

In situ electroporation on a partly conductive slide confirmed that the direct transfer of glucose between contacting cells occurred through GJs (figure 5B). Primary chondrocytes displayed a gradient of fluorescently labelled glucose following electroporation in the in situ chamber (figure 5B). Quantification of intercellular communication revealed extensive transfer (8–20 cells deep, score 7.39) of glucose between cells (figure 5C). The graph shows the number (score) of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell. No transference was detected when glucose was electroporated into A549 cells, which have no GJs (0–1 cell deep, score 0.16). In addition, inhibition of GJ intercellular communication using the Cx43 mimetic peptide blocker GAP27 (250 μ M for 1 h) significantly reduced the transfer of glucose between chondrocytes (1–4 cells deep, score 1.61) (figure 5B, C).

To study the transfer of endogenous amino acids through GJs, we employed stable isotope labelling of amino acids in cell culture

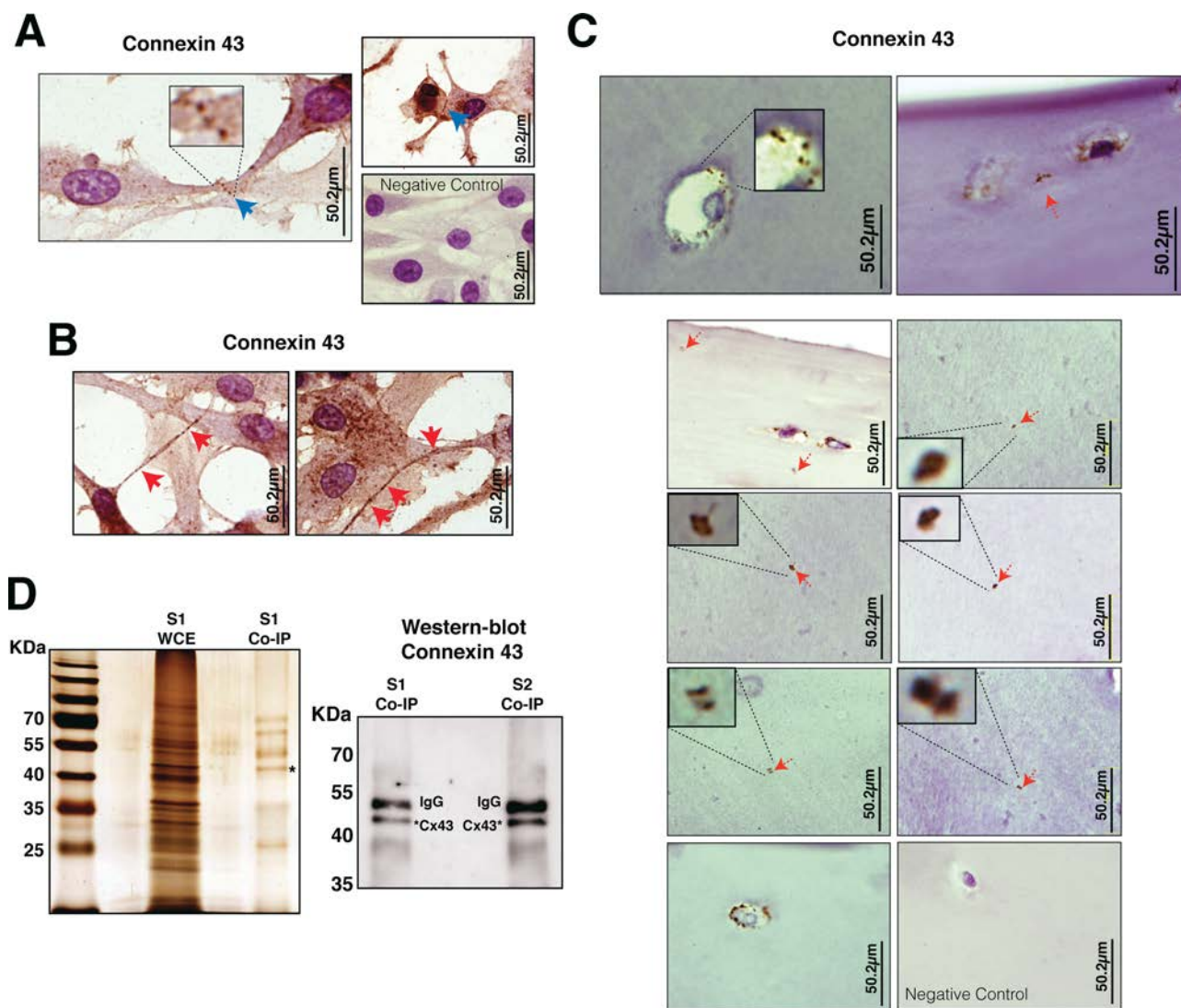


Figure 3 Interaction of Cx43 with microtubules and actin filaments. (A) Immunohistochemistry (IHC) with an anti-Cx43 antibody coupled with Gill's haematoxylin counterstaining on primary human chondrocytes. Negative control is shown on the right. The nucleus (dark purple) can be differentiated from the cytoplasm (clear purple). Cx43 was primarily localised in the cytoplasm, at the edge of the cytoplasm (membrane localisation), between the cytoplasm of two adjacent cells (blue arrows) and (B) in the thin extensions (red arrows). (C) IHC with anti-Cx43 on articular cartilage from adult humans. Positive signals for Cx43 were enriched on the cell edges (first and last image) and in the middle of the matrix (red arrows), suggesting the presence of thin extensions in the latter. (D) Immunoprecipitation (IP) experiments combined with the identification of interacting proteins through mass spectrometry analysis. Whole cell extract (WCE) and proteins immunoprecipitated with an anti-CTD-Cx43 antibody were analysed by silver staining and western blotting. Remnants of the IgG-heavy chain (53 kDa) from the antibody used for IP are visible but distinguishable from the Cx43 signal (43 kDa). The proteins listed in table 1 were identified from ten IP experiments using primary chondrocytes from ten different donors.

(SILAC) in a layered culture system containing a porous membrane (figure 5D). IHC analysis of transwell membranes containing human articular chondrocytes stained with an anti-Cx43 antibody revealed the presence of cellular projections through the pores 4 h after the cells were plated (figure 5D). We included a layer of 'control receiver' cells plated 1 mm below the membrane to prevent direct cell contact or GJ formation with donors (figure 5D). MS analysis revealed the presence of L-lysine ($^{13}\text{C}_6$) and L-arginine ($^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$) in the receivers but not the controls, confirming the intercellular transfer of these amino acids (figure 5D).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate for the first time that chondrocytes in articular cartilage are physically connected through a cellular network capable of mediating metabolic coupling and

the transfer of small siRNA-sized or miRNA-sized RNA molecules, as well as glucose and essential amino acids. SEM analysis revealed that chondrocytes embedded in the cartilage matrix contain at least two long cytoplasmic arms that spread along the matrix to reach a distant cell located in a different lacuna (figure 2). Long thin extensions of the cytoplasm were also observed in cultured chondrocytes (figure 3A,B).

A number of studies have elucidated structural characteristics of articular chondrocytes. The presence of small cellular extensions was observed in the superficial layer of cartilage from one patient with OA.²⁸ In addition, cell processes 8 μm in length were observed in the middle zone²⁹ and identified by others as potential interconnecting tracks running through the ECM.³⁰ Although some reports suggested the presence of cytoplasmic projections or cell remnants in the superficial and middle zones,

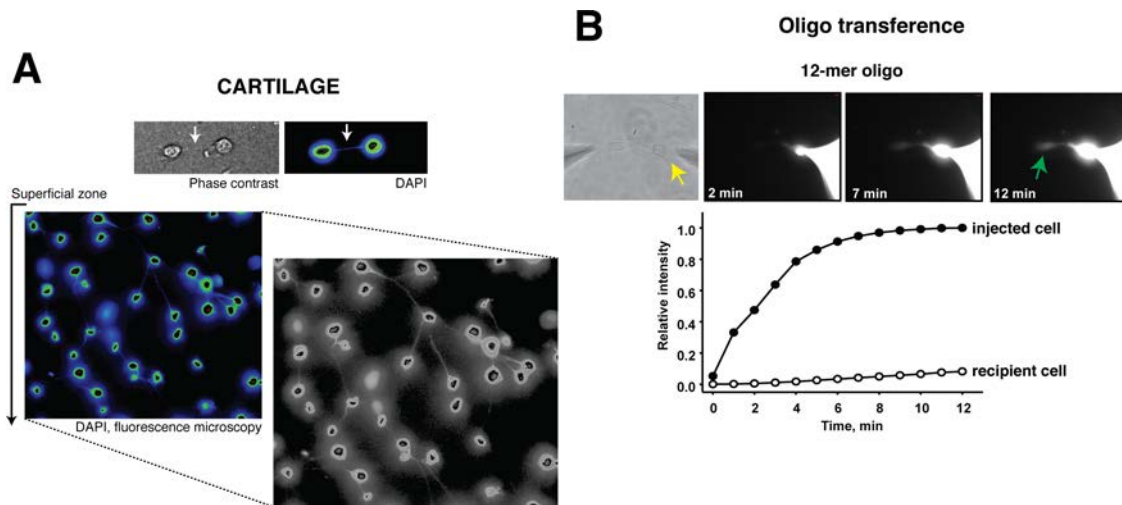


Figure 4 Direct exchange of small oligonucleotides. (A) 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of cartilage from *Sus scrofa*. Optical and fluorescent images reveal fluorescent cellular projections. The images were overexposed. Original and processed images are shown as indicated. (B) Flux of a 12-mer oligo in human chondrocyte cell pairs. Upper panel: a pipette containing the oligo was attached to the cell on the right in a whole-cell configuration. Epifluorescence micrographs were captured at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min after dye injection into the cell on the right. The results show progressively increased fluorescence intensity in the recipient cell. Lower panel: plots of fluorescence intensity versus time for the injected cell (filled circles) and the recipient cell (empty circles). The data are presented as mean \pm SEM.

no previous studies have directly observed intercellular connections between chondrocytes in the cartilage matrix.

The existence of intercellular connections relies on the establishment of cell–cell contacts. Recently reported results from our group revealed that cell-to-cell communication between adult human chondrocytes can occur through GJ channels.¹⁰ In fact, it was previously shown that animal chondrocytes express the GJ protein Cx43 and form functional GJ channels in dense monolayer and micromass culture.^{31–38} However, these reports fail to explain how highly specialised cells such as articular chondrocytes that exist as individual cells that are not in physical contact with one another express Cx43 and form GJ channels. It has been assumed that GJs only occur in clusters of chondrocytes. Results presented herein demonstrate that distant chondrocytes in mature articular cartilage are in physical contact with one another and that cell-to-cell communication through GJ channels allows for the exchange of various different molecules.

DAPI is a cationic compound that is nearly impermeable to the plasma membranes of live cells; therefore, it is typically used for staining nuclei of fixed and dead cells. However, the transfer of DAPI through GJ channels can be used to study functional coupling between living cells.^{39–41} The positive fluorescence observed in the cellular projections (figure 4A) of chondrocytes in situ cartilage suggests that chondrocytes in vivo within cartilage are functionally coupled. The results presented in figure 4B further indicate that these cells are capable of transferring small molecules of RNA. Endogenous and exogenous siRNA or mature miRNA can directly alter gene expression. Several reports have revealed the potential importance of miRNA in maintaining cartilage integrity and homeostasis.^{42–44} In fact, the major chondrogenic transcription factor Sox9 positively regulates the *COL2A1* gene in human chondrocytes by a miR-675-dependent mechanism.⁴⁵ Through the transfer of small RNAs, a small group of cells or a single chondrocyte has the potential to affect gene expression in a larger group of cells or throughout the cartilage.

GJ communication is required for physiological processes such as growth and metabolic coordination.⁴⁶ Metabolic coupling has special relevance in the case of avascular tissues such as the cornea

or lens. In these tissues, three-dimensional cellular networks and GJs are essential for the maintenance of metabolic and physiological homeostasis of the tissue, which are in turn essential for the maintenance of corneal transparency. Several congenital mutations of lens fibre cell Cxs cause various types of cataracts by affecting the conductance and/or gating of GJ channels or altering protein trafficking or channel assembly.⁴⁷ We recently reported that altered Cx protein levels and subcellular localisation are most likely associated with the development of OA.¹⁰

Cxs assemble into functional hexameric connexons in the endoplasmic reticulum membrane and pass through the Golgi apparatus to reach the plasma membrane by interacting with tubulin and actin filaments.^{48–49} The results shown in figure 3 and table 1 confirm that Cx43 interacts with the microtubules and actin filaments implicated in the shuttling of connexins throughout the cytoplasm of articular chondrocytes, to be later inserted into any site on the membrane, including cellular projections. We also detected other Cx43-interacting proteins, including ezrin and vinculin, which can affect GJ assembly.⁴⁹

Sinovial and bone cells express Cx proteins and form functional GJ channels.³⁷ Osteocytes contain multiple cellular projections and processes that, together with GJs, comprise a complex intercellular communication network implicated in matrix deposition, mechanotransduction and architecture in bone.³⁷ Cx43-expressing cells transfer molecules to other Cx43-expressing cells,¹⁵ and the deepest zone of cartilage is contiguous with the subchondral bone. Future studies should be performed to determine if the cells that form the three main tissues of the joint are capable of intercellular communication.

The establishment of cell–cell contacts that allow GJ intercellular communication is essential for the normal function of vascular and avascular tissues. Cartilage health is critical for the maintenance of mobility and quality of life in humans. The results presented herein represent a crucial contribution to our understanding of normal cartilage function and might lead to the identification of biological mechanisms underlying cartilage diseases, including the eventual degeneration of the matrix, which occurs in patients with OA.

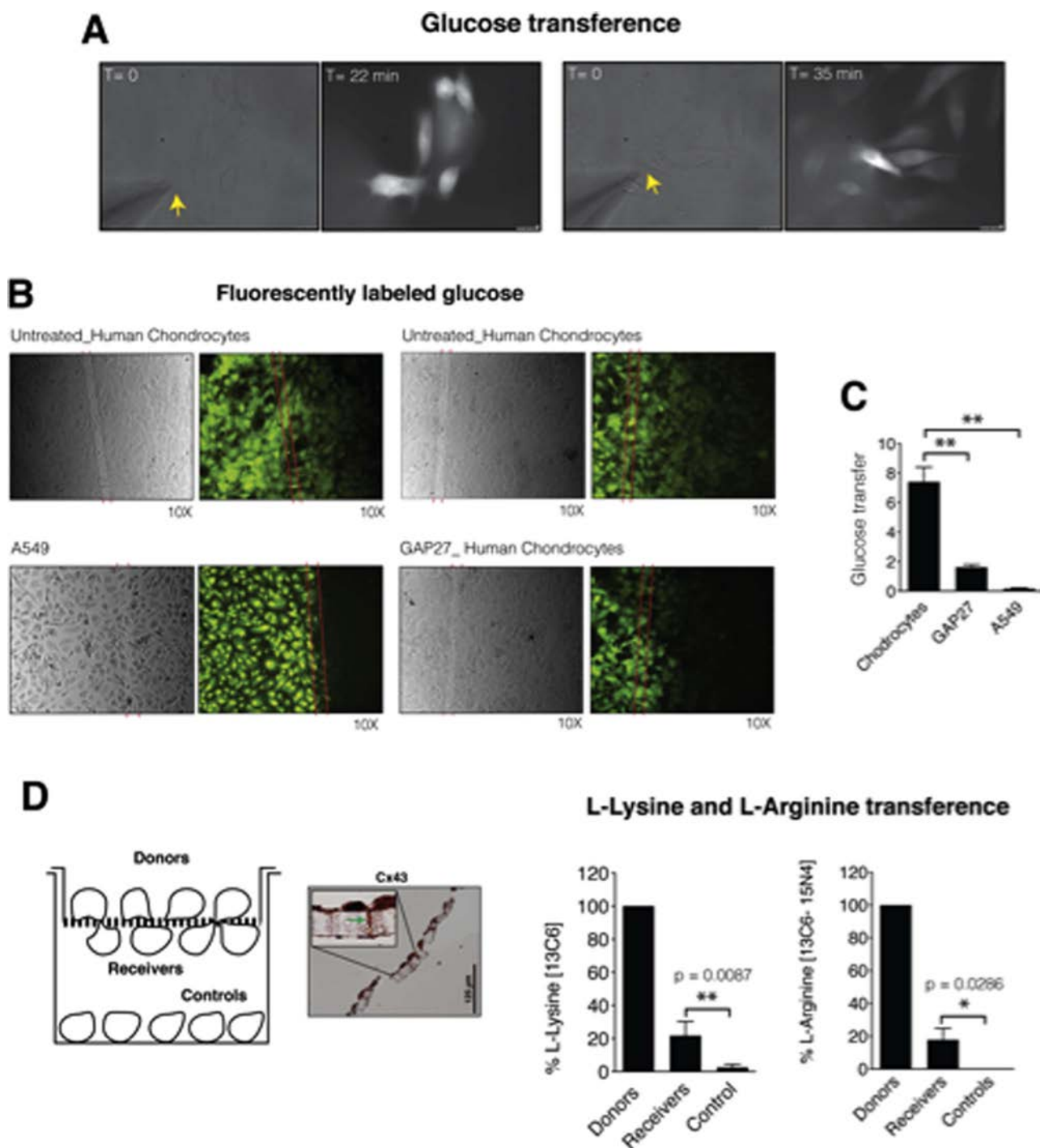


Figure 5 Direct transfer of nutrients between chondrocytes. (A) Glucose flux in contacting human chondrocytes. A pipette containing fluorescently labelled glucose was attached to a cell (yellow arrow). Glucose transference was monitored, and images were captured at 22 and 35 min after dye injection. (B) In situ electroporation on a partly conductive slide for the measurement of intercellular junctional transfer of glucose. Primary human chondrocytes or human lung carcinoma cells (line A549) were electroporated in the presence of 1 mg/mL fluorescently labelled glucose. After washing the unincorporated glucose, the cells were photographed under phase contrast or fluorescence illumination. The red lines define the conductive (left) and non-conductive sides (right). Gap junction (GJ) intercellular communication was severely reduced when cells were pretreated with 250 μ M of GAP27 for 1 h. Original magnification $\times 10$. (C) Quantification of glucose transfer through GJs. The graph represents the number of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell (score). The data are presented as mean \pm SEM. n=6; **p<0.01; Mann-Whitney test: untreated versus GAP27, and chondrocytes versus A549. (D) Transwell-layered culture system used to study the transfer of amino acids through cellular projections and GJ channels. IHC with an anti-Cx43 antibody on transwell membranes containing articular chondrocytes from adult humans. The green arrow indicates a cellular projection within the pore. The donor cells were previously cultured in labelled medium containing 73 mg/mL [$^{13}\text{C}_6$]-L-lysine and 28 mg/mL of [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]-L-arginine and plated on top of membranes that separated the cells from the receiver cells cultured in non-labelled medium. The data are presented as mean \pm SEM. n=4 for L-arginine, and n=4 for L-lysine. **p=0.0087, *p=0.0286; Mann-Whitney test: receivers versus controls.

Table 1 Cx43-interacting proteins identified by nanoLC-MS/MS

Protein name	Accession no.	Score	Pep (95%)	% Cov
Microtubule				
Tubulin α -1A chain	Q71U36	25.68	16	55.9
Tubulin α -1B chain	P68363	27.75	17	58.8
Tubulin α -1C chain	Q98QE3	23.28	13	41.4
Tubulin β chain	P07437	27.04	19	53.8
Tubulin β 2B chain	Q9BVA1	19.92	14	28.1
Tubulin β 2A chain	Q13885	24.92	17	43.4
Tubulin β 2C chain	P68371	21.86	15	47.4
Actin filaments				
α -actinin-1	P12814	12.9	9	30.5
α -actinin-4	O43707	17.34	11	27.9
Actin, cytoplasmic-1	P60709	36.68	28	70.1
Actin, cytoplasmic-2	P63261	9.88	16	57.3
Others				
Vimentin	P08670	127.22	130	99.4
Filamin-A	P21333	76.18	36	43.4
Talin-1	Q9Y490	14.17	8	29.8
Vinculin	P18206	6.16	3	24.4
Plectin	Q15149	6.68	4	25.2
Erzin	P15311	2	1	5
Myosin-9	P35579	49.81	31	55

Identification parameters used with the ProteinPilot software are provided, including the protein name and accession number according to SwissProt databases, the score, the number of peptides at 95% confidence and the percentage of protein coverage (% Cov). MS, mass spectrometry.

In summary, the data reported here demonstrate that chondrocytes in articular cartilage form a three-dimensional cellular network mediated by GJs and provide strong evidence that such intercellular connections may be involved in the synchronised regulation of the metabolic and physiological cartilage homeostasis.

Acknowledgements The authors would like to thank Lourdes Sanjurjo and Dolores Salinas Bujan for generously providing cartilage samples after surgery; Maria Jose Sanchez Dopico and Dr Tamara Hermida for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture; Dr Catalina Sueiro Lopez and Dr Ada Castro-Couceiro (SAI, UDC) for helpful suggestions and sample preparation for SEM; Dr Veronica Fernandez-Villarenaga Martin and Dr Gerardo Fernandez Martinez (SAI, UDC) for suggestions, sample preparation and data analysis (LTQ-Orbitrap); Dr Moises Blanco for the statistical advise; Dr Leda Raptis for helpful discussions and suggestions; the Translational Cancer Research Group of INIBIC for the A549 cell line; members of the proteomics group (INIBIC) for helpful technical suggestions; Christian Steinhäuser research group for advise and electrophysiology experiments on tissue; and Estefania Cives for administrative assistance.

Contributors All authors were involved in drafting or critically revising the manuscript for important intellectual content, and all authors approved the final version for publication. FJB and MDM have full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity and accuracy of the data presented. MDM and FJB are responsible for study conception and project planning. MDM, PC-F, RG-F, PF-P, PF-F, NG, VV, PRB, GSG and FJB are responsible for acquisition of data. MDM, VV, PRB, GSG and FJB are responsible for data analysis and interpretation.

Funding This work was supported in part through funding from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER-CB06/01/0040; P112/00329; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; and Proteo-Red/ISCIII) (to FJB); Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, FEDER (European Community) (to FJB); and the National Institutes of Health grants R01 GM088181 (to VV) and PRB-NIH R01 GM088180 (to PRB). This work was also supported through funding from a CIBBER-BNN fellowship, a predoctoral fellowship from Xunta de Galicia to RG-F and a grant from Fondo Investigación Sanitaria-Spain (CA09/00458) to PF-P. MDM is an Isidro Parga Pondal researcher (Xunta de Galicia).

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The study was conducted with the approval of the local ethics committee in Galicia, Spain.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008;87:77–95.
- Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992;25:155–63.
- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992;13:67–97.
- Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 2012;51:241–8.
- Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:379–81.
- Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:654–63.
- Lotz M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:192–6.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2005;54:465–80.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998;47:487–504.
- Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, et al. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2013;182:1337–46.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359–400.
- Saez JC, Connor JA, Spray DC, et al. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2708–12.
- Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, et al. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem* 1998;273:2808–16.
- Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* 2003;10:2045–58.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 2005;568(Pt 2):459–68.
- Thomas BC, Minogue PJ, Valiunas V, et al. Cataracts are caused by alterations of a critical N-terminal positive charge in connexin50. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2549–56.
- Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, et al. Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J Gen Physiol* 2008;131:293–305.
- Gutierrez-Berzal J, Castellano E, Martin-Encabo S, et al. Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukaemia and interacts with Bcr-Abl. *Exp Cell Res* 2006;312:938–48.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856–60.
- Valiunas V, Beyer EC, Brink PR. Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res* 2002;91:104–11.
- Valiunas V, Bechberger JF, Naus CC, et al. Nontransformed cells can normalize gap junctional communication with transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:174–9.
- Raptis LH, Brownell HL, Firth KL, et al. A novel technique for the study of intercellular, junctional communication: electroporation of adherent cells on a partly conductive slide. *DNA Cell Biol* 1994;13:963–75.
- Raptis L, Vultur A, Brownell HL, et al. Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol Biol* 2008;423:173–89.
- Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 2002;277:36725–30.
- Alexander DB, Ichikawa H, Bechberger JF, et al. Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and SRC activity. *Cancer Res* 2004;64:1347–58.
- Shen Y, Khushal PR, Li X, et al. SRC utilizes Cas to block gap junctional communication mediated by connexin43. *J Biol Chem* 2007;282:18914–21.
- Shen Y, Chen CS, Ichikawa H, et al. SRC induces podoplanin expression to promote cell migration. *J Biol Chem* 2010;285:9649–56.
- Holloway I, Kayser M, Lee DA, et al. Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:17–24.
- Bush PG, Hall AC. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:242–51.

Basic and translational research

- 30 Gonzalez S, Frago-Soriano RJ, Kouri JB. Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage—a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* 2007;70:1072–8.
- 31 Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004;205:363–70.
- 32 Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, et al. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* 1995;10:1359–64.
- 33 Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, et al. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors—a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009;214:275–83.
- 34 Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* 1998;30:413–19.
- 35 D'Andrea P, Vittur F. Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1997;400:58–64.
- 36 Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, et al. The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl)* 1993;187:343–52.
- 37 Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:69–81.
- 38 Dealy CN, Beyer EC, Kosher RA. Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev Dyn* 1994;199:156–67.
- 39 Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:805–17.
- 40 Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, et al. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:369–78.
- 41 Cao F, Eckert R, Elfgang C, et al. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 1):31–43.
- 42 Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:543–52.
- 43 Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012;18:109–18.
- 44 Swingler TE, Wheeler G, Carmont V, et al. The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1909–19.
- 45 Dudek KA, Lafont JE, Martinez-Sanchez A, et al. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2010;285:24381–7.
- 46 Kar R, Batra N, Riquelme MA, et al. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 2012;524:2–15.
- 47 Mathias RT, White TW, Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol Rev* 2010;90:179–206.
- 48 Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 2010;20:92–101.
- 49 Giepmans BN. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 2004;62:233–45.



Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis

Maria D Mayan, Raquel Gago-Fuentes, Paula Carpintero-Fernandez, et al.

Ann Rheum Dis published online November 13, 2013
doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244

Updated information and services can be found at:
<http://ard.bmj.com/content/early/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.full.html>

	<i>These include:</i>
Data Supplement	"Supplementary Data" http://ard.bmj.com/content/suppl/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.DC1.html
References	This article cites 49 articles, 17 of which can be accessed free at: http://ard.bmj.com/content/early/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.full.html#ref-list-1
P<P	Published online November 13, 2013 in advance of the print journal.
Email alerting service	Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections	Articles on similar topics can be found in the following collections Clinical diagnostic tests (1012 articles) Immunology (including allergy) (3872 articles)
--------------------------	---

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Notes

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>



MUSCULOSKELETAL PATHOLOGY

Human Articular Chondrocytes Express Multiple Gap Junction Proteins

Differential Expression of Connexins in Normal and Osteoarthritic Cartilage

Maria D. Mayan,^{*†} Paula Carpintero-Fernandez,^{*†} Raquel Gago-Fuentes,^{*†} Oskar Martinez-de-Ilduaya,^{*‡} Hong-Zhang Wang,[§] Virginijus Valiunas,[§] Peter Brink,[§] and Francisco J. Blanco^{*†‡¶}

From the Osteoarticular and Aging Research Group* and the Cartilage Biology Group[†] Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; the CIBER-BBN/ISCIII (Biomedical Research Networking center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine/Carlos III Health Institut)[‡] and the ProteoRed/ISCIII (Carlos III Health Institut),[¶] Proteomics Group, Madrid, Spain; the Department of Physiology and Biophysics,[§] State University of New York, Stony Brook, New York

Accepted for publication
December 17, 2012.

Address correspondence to
Francisco J. Blanco, M.D., or
Maria D. Mayan, Ph.D.,
Rheumatology Division,
INIBIC-Hospital Universitario
A Coruña, Xubias de Arriba 84,
A Coruña, 15006 Spain.
E-mail: fblagar@sergas.es or
Ma.Dolores.Mayan.Santos@
sergas.es.

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and involves progressive degeneration of articular cartilage. The aim of this study was to investigate if chondrocytes from human articular cartilage express gap junction proteins called connexins (Cx). We show that human chondrocytes in tissue express Cx43, Cx45, Cx32, and Cx46. We also find that primary chondrocytes from adults retain the capacity to form functional voltage-dependent gap junctions. Immunohistochemistry experiments in cartilage from OA patients revealed significantly elevated levels of Cx43 and Cx45 in the superficial zone and down through the next approximately 1000 μm of tissue. These zones corresponded with regions damaged in OA that also had high levels of proliferative cell nuclear antigen. An increased number of Cxs may help explain the increased proliferation of cells in clusters that finally lead to tissue homeostasis loss. Conversely, high levels of Cxs in OA cartilage reflect the increased number of adjacent cells in clusters that are able to interact directly by gap junctions as compared with hemichannels on single cells in normal cartilage. Our data provide strong evidence that OA patients have a loss of the usual ordered distribution of Cxs in the damaged zones and that the reductions in Cx43 levels are accompanied by the loss of correct Cx localization in the nondamaged areas. (*Am J Pathol* 2013, 182: 1337–1346; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.018>)

The surfaces of articulating bones are covered by articular cartilage, which is required for the smooth and painless movement of the skeleton. Osteoarthritis (OA) is a condition that is characterized by the progressive degradation of matrix components that leads to a loss of joint mobility and function accompanied by chronic pain. OA is the most common joint disorder in Western populations, and its incidence increases with age. The molecular mechanisms regulating the pathogenesis and progression of OA, however, are poorly understood, and no proven disease-modifying therapy is currently available.

In adult cartilage, the chondrocytes remain resting in a nonproliferating state, but display moderate metabolic activity and the ability to maintain the surrounding matrix.

Chondrocytes are isolated inside their lacunae and the communication between chondrocytes in the superficial zone and chondrocytes in the middle and deeper layers occurs through diffusion, although it has been reported that cultured animal primary chondrocytes and the chondrocytes

Supported in part by the Fondo Investigación Sanitaria (CIBER- CB06/01/0040 and PI 08/2028 to F.J.B.) Ministerio Ciencia e Innovación (PLE2009-0144 to F.J.B.), with additional funds from the European Regional Development Fund (European Community, to F.J.B.), the NIH (grants R01 GM088181 to V.V. and PRB-NIH RO1 GM088180 to P.R.B.), R.G.-F. received a CIBBER-BNN fellowship.

M.D.M., P.C.-F., and R.G.-F. contributed equally to this work.

Disclosure: M.D.M. is an Isidro Parga Pondal researcher for Xunta de Galicia.

located in the superficial zone of adult cartilage both express Cx43,^{1–6} a protein that forms gap junction (GJ) channels and is implicated in cell-to-cell communication.

Maintenance of the homeostatic tissue balance is controlled by communication between the extracellular and intercellular networks. GJs are membrane channels that often assemble as large membrane rafts and are identified as plaques at the membrane surface. Vertebrate GJ channels are composed of proteins encoded by the connexin (Cx) gene family and consist of intercellular channels that directly connect the cytoplasm of adjacent cells.⁷ In addition to their role in providing a pathway for direct intercellular communication, hemichannels are also involved in the release and exchange of small molecules between cells and the surrounding matrix.⁸ Cells can interchange small molecules, such as metabolites (eg, ATP), nutrients (eg, glucose), second messengers (eg, IP₃, Ca²⁺, or AMPc), and even synthetic oligonucleotides with a molecular weight of approximately 2 to 4 kDa. These small molecules can ultimately regulate transcription in the cell. Historically speaking, GJs were first described as those responsible for the electrical synapses in the central nervous system, however, they were subsequently found in most tissues. Actually, GJ intercellular communication is required for normal cellular functioning and for tissue development and differentiation.⁹ There are 21 expressed Cxs in humans, and each connexin may play unique roles that are not interchangeable.¹⁰ For example, in the liver, GJs serve metabolic functions and in the heart they conduct electrical signals. Cxs have been implicated in multiple cellular functions and the impairment or loss of Cx expression has been implicated in the pathogenesis of several diseases.⁹

OA is characterized by multiple molecular alterations, and most changes that occur in OA cartilage are directly related to functions controlled by Cx channels. Correct cell-matrix and cell-cell communication is essential to maintain the structural integrity and function of any tissue. In addition, GJ proteins interact with many other types of proteins in the cell, including catenins and claudins, and activate multiple molecular pathways. Actually, changes in Cx protein levels, assembly state, or localization are characteristic of a variety of Cx-dysregulated diseases.^{11–16} The aim of this work was to investigate if adult human chondrocytes express Cx proteins and contain functional gap junctions. The results presented here demonstrate that normal human adult articular chondrocytes express Cx43, Cx45, Cx46, and Cx32 in all zones of adult cartilage. Primary chondrocytes retain the capacity to form functional Cx43 gap junctions. Remarkably, we have found that cartilage from OA patients has higher levels of Cx43 and Cx45 protein in the damaged proliferative zones and that Cx43 localization is lost in the mid and deep nondamaged zones.

Materials and Methods

Cartilage Collection and Processing

Human knee and femoral head articular cartilage from adult donors was obtained after joint surgery. All patients signed

the informed consent form and the Institutional Ethics Committee (Galicia, Spain) approved the study. Cartilage from healthy persons who suffered a knee or hip fracture was obtained following the same procedure. Histological samples (from healthy and OA subjects with radiological diagnoses) were graded using a modified Mankin score¹⁷ (mean age, 70.6 years; range, 60 to 89 years; Mankin score, 0 to 13 points). A higher Mankin score corresponds to a lower structural integrity of the tissue. The samples (patients and age-matched healthy subjects) were divided into 4 groups: i) 0 to 1 indicates normal/healthy, ii) 2 to 3 indicates grade 1 early OA, iii) 4 to 5 indicates grade 2 mild OA, and iv) 6 to 13 indicated grades 3 (6 to 7) and 4 (8 to 13) severe OA. Samples for RNA isolation were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Primary chondrocytes were isolated as previously described.¹⁸

Primary Culture of Chondrocytes

Cells were seeded onto 100 or 162 cm² flasks for gene expression assays. Chondrocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies Ltd, Madrid, Spain) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Primocin (Nucliber, Madrid, Spain) and 15% fetal calf serum (Life Technologies Ltd). Cells were grown to approximately 90% confluence.

RNA Isolation and Real-Time PCR Assays

Cultured primary chondrocytes were recovered by trypsinization and stored at -80°C . Frozen articular cartilage samples were digested in digestion buffer (200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 5% SDS, and 100 mmol/L sodium citrate) containing proteinase K. TRIzol Reagent (Invitrogen, Paisley, UK) was added to the sample according to the manufacturer's instructions. Whole RNA was treated with DNase (RNase-free DNase; Invitrogen, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions to ensure total degradation of the DNA in the sample.

IHC Assays

In situ cartilage was frozen immediately in a Cryomold Standard using Tissue-Tek OCT Compound (Sakura, Japan) and isopentanol (BDH, Poole, UK) in liquid nitrogen and stored at -80°C . Cartilage sections were serially sectioned (4 μm) at -20°C in a Cryostat (Leica CM1510). Tissue sections were fixed with acetone (BDH) for 10 minutes at 4°C , dried at room temperature, and washed for 10 minutes with PBS with 0.1% Tween 20, pH7.6 (PBST). Before staining, endogenous peroxidase was inhibited by H₂O₂ and methanol for 10 minutes and was washed one time with PBST. Primary antibody was applied 1 hour at room temperature. After three washes of 10 minutes with PBST, sections were incubated with a peroxidase-labeled polymer conjugated to goat anti-mouse/rabbit Ig (Dako, Glostrup, Denmark) for 1 hour. After three washes with PBST,

peroxidase activity was developed using a substrate chromogen solution prepared freshly and containing 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂, (Dako). Sections were then washed in distilled water and counterstained with Gill's hematoxylin, gradually dehydrated with graded alcohols, and mounted in xylene with DePeX (SERVA, Heidelberg, Germany).

Cultured cells were seeded onto chamber slides and fixed with acetone for 10 minutes at 4°C, dried at room temperature, and washed for 10 minutes with PBST before performing the procedure previously described. Negative controls (omitting primary antibody) were performed to test the specificity of the antibody. To study cartilage morphology and verify the grade of the disease, cartilage sections were stained with H&E, Safranin O, Fast Green, Masson's trichrome, Alcian Blue-PAS, Sirius red polarization method, and toluidine blue. The slides were imaged using an Olympus BX61 microscope and a DP71 digital camera (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany). The antibodies were procured as followed: Cx32 antibody (ab66020) from Abcam (Cambridge, UK), anti-Cx46 (sc-365394) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Cx45 (MAB3101), and anti-collagen-II (MAB1330) from Millipore Iberica (Madrid, Spain), anti-Cx43 (610062) from BD Transduction Laboratories (Madrid, Spain), and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (NA03) from Calbiochem (Madrid, Spain). Calibration and quantification of the images was performed with AnalySISD software version 5.0 (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany).

E-Northern

Expression of different genes related to cell cycle and ion transport in cartilage was analyzed by electronic Northern (E-Northern). E-Northern retrieved expression data from DNA sequences stored in the dbEST (Database of Expressed Sequence Tags) division of GenBank through identification using the BLAST software (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). To search for genes expressed in normal or OA cartilage, BLAST analyses were performed using reference sequences of query genes in the GenBank dbEST database, limiting the results to matches unequivocally identified as either normal or OA cartilage. The best-characterized libraries were obtained from pools of RNA with approximately 5000 sequence clones from normal and OA cartilage.¹⁹ Putative differences in gene expression between normal and osteoarthritic cartilage were detected for several genes related to cell cycle and ion transport. The number of transcripts corresponding to *p21* and *p27* were significantly elevated in normal cartilage compared to OA. In regard to ion and transmembrane transport, overexpression of *GRID2* (glutamate receptor) was detected in normal cartilage. *GRIA2* was also detected in normal cartilage, albeit at relatively low levels. *DPP10* (a known regulator of Kv4 channels) was detected in normal cartilage but not in OA. Several cell cycle and ion channel

genes are expressed in normal and OA. The most representative differences found between normal and OA cartilage corresponded to *CDKN1A* (*p21*), *CDKN1B* (*p27*), *DPP10*, *GRIA4*, *GRID2*, *GABARAP*, *GABARAPL2*, and *GABRG2*.

Western Blot

Cell lysates were prepared from confluent monolayer cells. Equal amounts of cellular protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad, Madrid, Spain) membranes.¹⁸

Electrophysiological Measurements and Dye Injections

Experiments were performed on cell pairs. A dual voltage-clamp method and whole-cell and/or perforated patch recording were used to control the membrane potential of both cells and to measure currents as previously described.^{20,21} Dye transfer through gap junctions was investigated using cell pairs and Lucifer yellow (Molecular Probes; Life Technologies Ltd).²¹

Statistical Analysis

The data were analyzed using the GraphPad Prism software version 5 (La Jolla, CA). Statistical differences between sample groups were assessed using the Student's *t*-test and Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test. Significant differences are represented as $P < 0.05$ and $P < 0.01$. Data are represented as the means \pm SEM.

Results

Adult Human Primary Chondrocytes Express High Levels of Cx43 and Form Functional GJs

Despite the limitations of monolayer chondrocyte cultures, these cells have served as a useful model for the study of cartilage. Chondrocytes synthesize high levels of collagen type 2. With time, cultured chondrocytes become more fibroblastic and down-regulate type 2 collagen synthesis. To test the hypothesis that these cells maintained their original phenotype in culture at the time of our assays, collagen type 2 levels and overall cellular structure were assayed by immunohistochemistry (IHC) (Figure 1A). Quantitative gene expression analysis using real-time RT-PCR revealed that human primary chondrocytes express very high levels of Cx43 mRNA (Figure 1B). We analyzed both primary transcription (intron-exon junctions; primary transcripts; Cx43p) and the processed RNA (exon-exon; mRNA; Cx43m) (Figure 1B). Western blot analysis also showed high levels of Cx43 protein in comparison with a cell line expressing Cx43 (Figure 1C).

To test if Cx43 is found in the membrane, we used IHC coupled with Gill's hematoxylin counterstaining using a monoclonal anti-Cx43 antibody (Figure 1D). Cx43 was

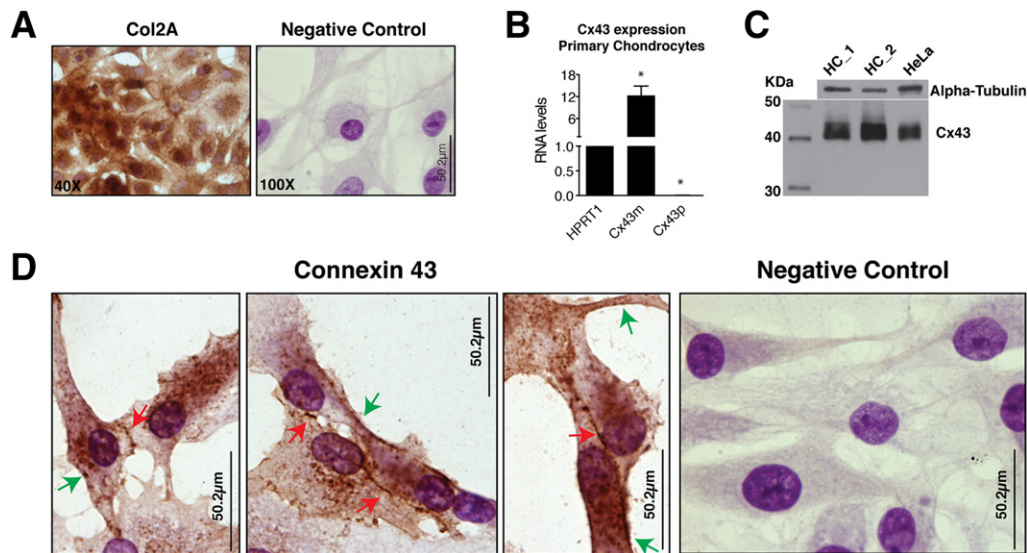


Figure 1 Human primary chondrocytes express high levels of Cx43. **A:** Primary chondrocytes cultured for 3 weeks keep their original phenotype and express high levels of collagen type 2, as detected by IHC analysis using a monoclonal anti-human type II collagen antibody. Cells were seeded onto 100 cm² flasks until confluence before being seeded onto chamber slides for 2 days and fixed with acetone. **B:** Expression analyses of hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) and Cx43 genes by real-time RT-PCR in primary chondrocytes isolated from the cartilage of healthy individuals. Data were normalized to HPRT1 levels. Note that cells accumulate high levels of Cx43 mRNA. Very low levels were detected (0.005 times relative to HPRT1), however, of primary transcription. Data are represented as means \pm SEM with $n = 4$. * $P < 0.05$; U -test, HPRT1 versus Cx43m, and HPRT1 versus Cx43p. **C:** Western blot analysis of primary chondrocytes from two healthy individuals (ie, HC-1 and HC-2). A control cell line (HeLa Cx43H10) expressing Cx43 was used. **D:** IHC analysis using the monoclonal anti-Cx43 antibody. As is shown in the negative control, this technique can differentiate the nucleus (dark purple) from the cytoplasm (clear purple). Cx43 spots in the edges of the cell surface (**green arrows**) and at the plasma membrane in cell-to-cell contact areas (**red arrows**).

mainly localized in the cytoplasm, but we could detect Cx43 between the cytoplasms of 2 adjacent cells. We also detected multiple positive spots at the edge of the cytoplasm.

To test if human primary chondrocytes are electrically coupled to each other by voltage-dependent GJ channels, we conducted a dual voltage-clamp method and whole-cell/perforated patch recording to control the membrane potential of both cell pairs and to measure currents. The results displayed in **Figure 2A** show the junctional current recordings corresponding to the typical voltage-dependent behavior pattern described for GJ channels containing Cx43. When we investigated the expression of different Cxs using primary chondrocytes from healthy joints, we only detected the expression of Cx43 and Cx45 (**Figure 2B**). We could detect low levels of Cx45 mRNA, although we did not observe any corresponding Cx45 protein signal in our IHC experiments. Analysis of the typical gap-junction-permeable dye Lucifer yellow revealed that primary chondrocytes communicate and transfer molecules through Cx channels (**Figure 2C**).

Cx43 Protein Is Overexpressed in OA Cartilage

RNA was isolated from frozen sections of cartilage tissue. Quantification using real-time PCR demonstrated that chondrocytes within cartilage expresses Cx43 mRNA (both mRNA and primary transcript) (**Figure 3A**). The pattern of expression differs from cultured chondrocytes

(**Figure 1B**), however, as in the case of tissue, we could detect both mRNA and primary transcript (Cx43p). To rule out alternative splicing, the primer sequences (**Table 1**) were compared against the GenBank Expressed Sequence Tag database. When we examined protein localization by IHC using an anti-Cx43 antibody, we observed multiple positive Cx43 spots in all layers of the healthy cartilage, including the deep zone (**Figure 3, B and C**). The population of immunopositive chondrocytes in the superficial and mid-layers of healthy cartilage was similar to that of the deeper layers (at 90% to 100% and 80% to 90% of the cell population, respectively). We found that Cx43 is localized at the margin of cells. We also detected positive spots that might correspond to connections between chondrocytes located in the same lacunae. In case of healthy cartilage, the number of positive spots per cell that were located in the edges of the lacunae varied between 4 and 10 (mean, 6.8).

In the case of cartilage from OA patients, Cx43 was found in both the nucleus and the cytoplasm, with positive spots around the edges of the lacunae (**Figure 3D**). Analysis of Cx43 using IHC followed by quantification of positive signals using the ANALYSIS software version 5.0 (Olympus Biosystems) (**Figure 3E**) revealed that cartilage from OA donors showed very high levels of Cx43 positive staining (approximately 40 times more than healthy) in the 80% to 90% of cells in the superficial layer as well as in 100% of the cells in the mid-region down through 1000 μ m.

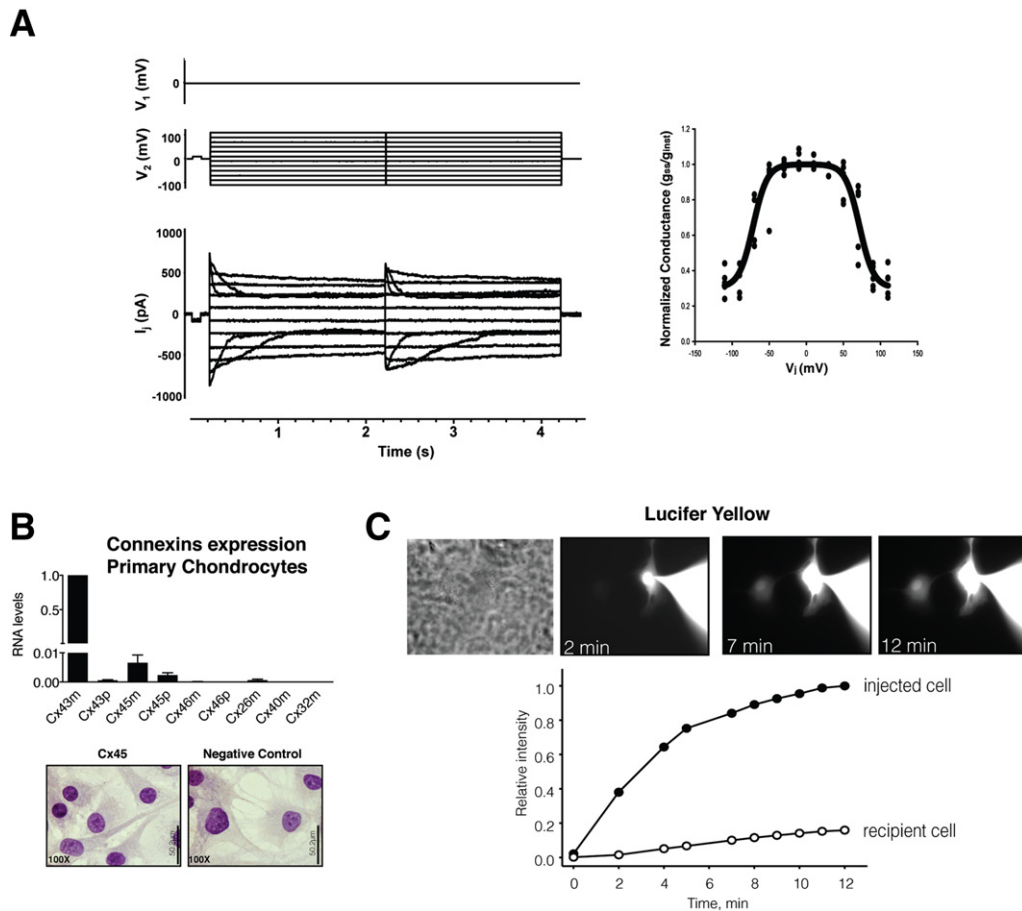


Figure 2 Human primary adult chondrocytes form functional GJs. **A:** Voltage-gating properties of human chondrocytes. Junctional currents (**bottom panel**) recorded from primary chondrocyte pairs excised from adult cartilage in response to a voltage step protocol (V_j) (**upper panel**). Cell 2 was stepped, whereas cell 1 was held at 0 mV. Summary plot of normalized junctional conductance (g_{ss}/g_{inst}) versus transjunctional voltage (V_j) obtained from five cell pairs (**right panel**). The measures g_{ss} and g_{inst} are the conductance measured at the end and at the beginning of the voltage pulse, respectively. The smoothed curve indicates the best fit of data to the Boltzmann equation using the following values: $V_{j,0} = 71\text{mV}$, $g_{j,min} = 0.3$, and $z = 2.8$. The recording and data analysis showed typical voltage-dependent behavior for GJ channels containing Cx43 (means \pm SEM). **B:** The expression analysis of several Cxs by real-time RT-PCR in primary chondrocytes isolated from the cartilage of healthy individuals ($n = 6$). Data were normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 and then to Cx43m (means \pm SEM; $n = 6$). Primer sequences are shown in Table 1. **C:** Lucifer yellow flux in human chondrocyte cell pairs. A pipette containing 2 mmol/L Lucifer yellow was attached to the cell on the right in the whole cell configuration (**upper panel**). Epifluorescent micrographs were taken at 2, 7, and 12 minutes after dye injection into the right-sided cell. The micrographs showed a progressive fluorescence intensity increase in the recipient cell. Fluorescence intensity plots versus time for the injected cell (**black circles**) and the recipient cell (**white circles**) (**lower panel**). Data are represented as means \pm SEM.

The protein localization was the same in both the superficial and damaged zones, however, in the intermediate and deeper zones (where the tissue was less damaged), we detected positive spots in the edges of the lacuna in only 20% to 30% of the cell population. In the deeper zones, when the cells did show positive signals, the Cx43 was mainly localized in the cytoplasm instead of the membrane (**Figure 3D**).

Cartilage from OA donors showed a different grade of injury (**Figure 3, B and D**). Cartilage damage severity was rated (see *Materials and Methods*). The area around the articular surface and down to 100 to 1000 μm is predisposed to be damaged in early and later grades of the disease (**Figure 3B**). These zones either showed severe damage or, in the case of patients with grade 1 disease, bigger lacunae. High levels of positive staining were already detected in the

first stage of OA disease (grade 1) (**Figure 3D**). Overall, in case of OA cartilage, the number of positive spots per cell that were located in the edges of the lacunae varied between 8 and 36 (mean, 25.1) (**Figure 3F**).

Increased Levels of Cx43 Correlate with Nuclear PCNA

It is important to note that we observed low levels of cytoplasmic PCNA in cartilage from healthy donors (**Figure 4A**). In contrast, cartilage from OA patients showed high levels of nuclear PCNA in the damaged areas, covering the superficial layer and down through $\sim 1000 \mu\text{m}$ (**Figure 4A**). Compared to tissue from healthy donors, the levels of Cx43 and PCNA in OA tissue were 30-fold and 4-fold higher, respectively (**Figure 3E and 4B**). In contrast, the less damaged intermediate-deep zone cartilage showed

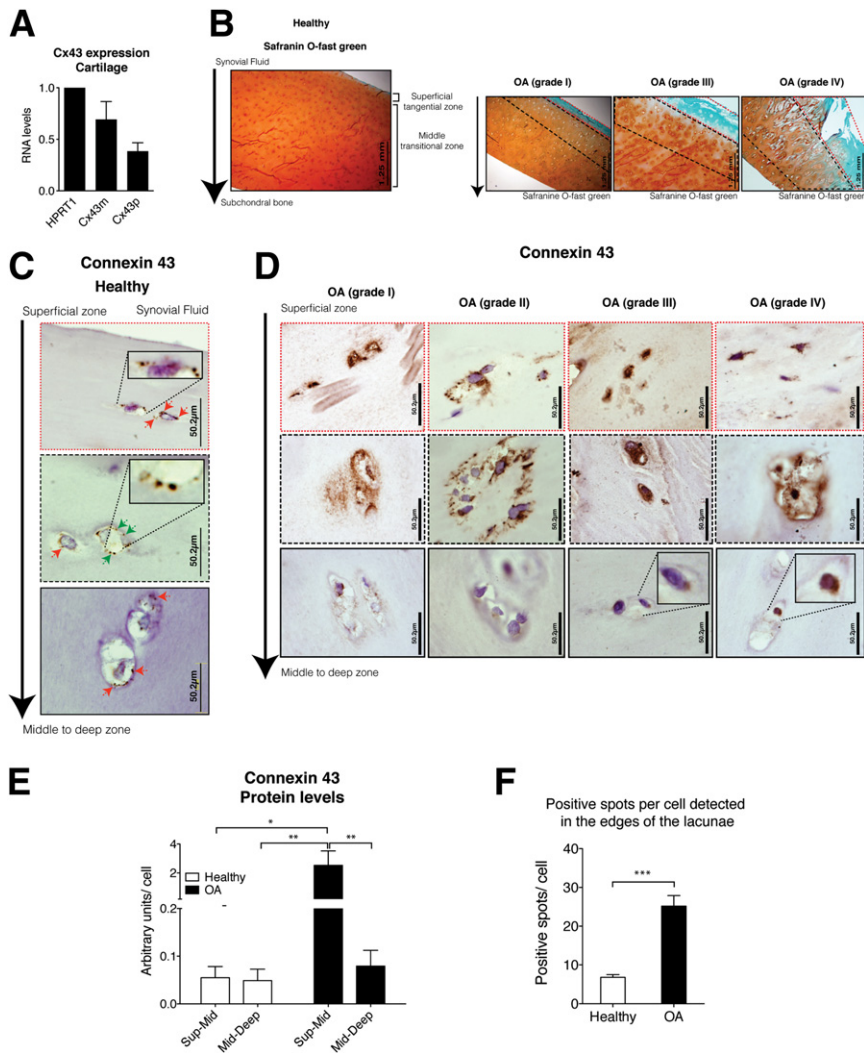


Figure 3 OA cartilage has high levels of Cx43 protein. **A:** RNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (means \pm SEM $n = 4$). **B:** Healthy cartilage showed homogeneous uptake of the Safranin O—fast green. The superficial zone (dashed red line). The red-orange zone (dashed black line) down to approximately 1000 μm . In contrast, reduction of the staining and ulceration was observed in the most severe OA cartilage sections. Mankin score analyses were conducted to verify the morphology and grade of the disease. Samples were divided into 4 groups (see *Materials and Methods*). Cartilage explants were cut in the operating room immediately after surgery, and therefore all did not have identical depth. **C:** IHC analysis using an anti-Cx43 antibody. The cartilage showed here corresponds to a healthy donor. Magnifications ($\times 10$) of positive spots are shown. **D:** IHC analysis using an anti-Cx43 antibody. The cartilage showed corresponds to OA patients with different grades. Negative control (top row). **E:** Quantitative image analysis of IHC staining revealed that OA cartilage showed significantly more intense Cx43 staining in the superficial layer and down through the top 1000 μm (Sup-mid). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test ($n = 4$ for healthy; $n = 10$ for OA; $n = 4$ for knee OA; and $n = 6$ for hip OA). **F:** Representation of the number of positive spots per cell ($n = 17$ for healthy; $n = 17$ for OA). $***P < 0.0001$; Student's *t*-test, healthy versus OA (means \pm SEM).

a PCNA staining pattern similar to healthy cartilage (ie, lower levels and a more cytoplasmic PCNA distribution) (Figure 4A). Very high levels of Cx43 were detected in proliferating cells that are exclusively found in the superficial layer of OA cartilage²² (Figure 4C).²²

Cx45, Cx32, and Cx46 Show Altered Levels in Cartilage from OA Patients

In cultured chondrocytes, we detected Cx45 mRNA, but no corresponding protein (Figure 2B). IHC of cartilage from healthy joints, however, showed positive signals for Cx45, Cx32, and Cx46 in all zones (Figure 5). Cx45 protein was detected in all healthy cartilage zones, especially in the superficial layer through the top 1000 μm (Figure 5A). Cx45 formed petite positive spots around the margin of the cells, but it was diffuse in the cytoplasm (Figure 5A). In contrast, Cx45 in OA cartilage showed significantly more positive staining in the superficial and damaged areas (Figure 5, A and B), similar to what was previously observed for Cx43 and PCNA (Figure 3E and 4B). In case of OA joints, Cx45

localized in positive spots around the margin of the cells and in the nucleus but was diffuse in the cytoplasm (Figure 5A).

In the case of Cx32 and Cx46, these proteins localized around the edges of the cell and were possibly incorporated into the membrane (Figure 5C). In cartilage from patients, Cx32 was mainly found in the damaged zones and in the intermediate cartilage (Figure 5D). Cx46, however, was mainly detected in the superficial zone and in the 1000 μm of tissue immediately beneath. Nevertheless, some OA patients showed higher levels of Cx32 and/or Cx46, whereas others were negative for both Cxs (Figure 5D). Unlike Cx43 and Cx45, we could not find distinctive patterns for either Cx32 or Cx46.

Discussion

This study demonstrates for the first time that normal human adult articular chondrocytes express several GJ proteins that are altered in OA. We have also demonstrated that human articular chondrocytes from adults retain the capacity to form functional GJs with voltage-dependent gating. The

Table 1 Sequences of the Primers Used for Quantitative Gene Expression Analysis

Gene	Target	Primer sequence
GJA1	Cx43m	5'-CAATCACCTTGCGTGACTTC-3' 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3'
	Cx43p	5'-TTGCAATCTGTGATCCTTGAA-3' 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3'
GJC1	Cx45m	5'-ATCTGGAAAAATTGCAATCAAAA-3' 5'-CTGTAAGGACGATCCGGAAG-3'
	Cx45p	5'-TGGGTAACCGAAGTTCTGGA-3' 5'-TCCAGGATCCAGGTAAAAACC-3'
GJA3	Cx46m	5'-GCCGGCCAGTACTTTCTGTA-3' 5'-CCTGCTTGAGCTTCTCCAG-3'
	Cx46p	5'-ATGCCTGTCTGTGGAGAAG-3' 5'-GAAGATGAACAGCACGGTCA-3'
GJB2	Cx26m	5'-CTTCCTCCCGACGCAGAG-3' 5'-GCTCATCTCCCCACACCTC-3'
GJA5	Cx40m	5'-AAGTCCAGGGAGGAGAAAA-3' 5'-TCGTATCACACCGGAAATCA-3'
GJB1	Cx32m	5'-TGCAGACATTCCTCTGGGAAA-3' 5'-TCTCATCACCCACACACTC-3'
		5'-TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG-3' 5'-GCCCAAAGGGAAGTATAGTC-3'

The PCR products size is approximately 200 bp.
m, mRNA; p, primary transcript.

characteristic junctional current pattern obtained using electrophysiological techniques demonstrate that adult chondrocytes form functional GJs composed by Cx43. Studies conducted in tissue demonstrate that Cxs are well localized around the cell and form structures that look like pearl necklaces around the edge of the lacunae. Within tissue, chondrocytes are immersed in lacunae and because there is usually one cell per lacuna, most of these positive spots could therefore correspond to hemichannels. The

potential presence of tubular canals (termed canaculi tracks) in the tissue,²³ however, together with unpublished results from our group suggests that it is also possible that GJs are being formed. Direct cell–cell communication between paired chondrocytes have already been suggested.²⁴

Single hemichannels allow cells to interchange components with the matrix, and Cx43 has been reported to form functional hemichannels in a wide variety of mammalian cell lines.²⁵ Cx43 hemichannels were involved in the release of ATP, glutamate, or NAD⁺ in the extracellular space,^{26,27} and they have actually been implicated in the response of rabbit and bovine articular chondrocytes to mechanical loading.^{1,2,28} Hemichannels and GJs formed by Cx43 are very permissive and are therefore less selective than channels formed by Cx45 or Cx32.²⁹ Conversely, while chondrocytes found in healthy cartilage also contain Cx45, Cx32, and Cx46 in the cytoplasm, these proteins also form multiple positive spots localized around the edges of the lacunae. When cells express multiple Cxs, the Cxs can co-oligomerize into homomeric or heteromeric Cxs, although only certain combinations of the 21-member family are permitted.³⁰ Most cells express more than one Cx, and heteromeric connexons are common *in vivo*. This heterogeneity produces variations in the permeability and conductance of GJs that may allow cells to dynamically regulate their intercellular communication properties and molecular selectivity.³¹ The functional data strongly demonstrated a Cx43-dominated coupling (Figure 2), although it is possible that other functional forms are present in the tissue and provide additional methods for regulating cell–cell and cell-matrix communication.

Examining cartilage from OA donors, we found that OA patients have alterations in all studied proteins. The alterations of Cx43 and Cx45 protein levels, however, appeared to occur post-transcriptionally, as Cx transcript levels were

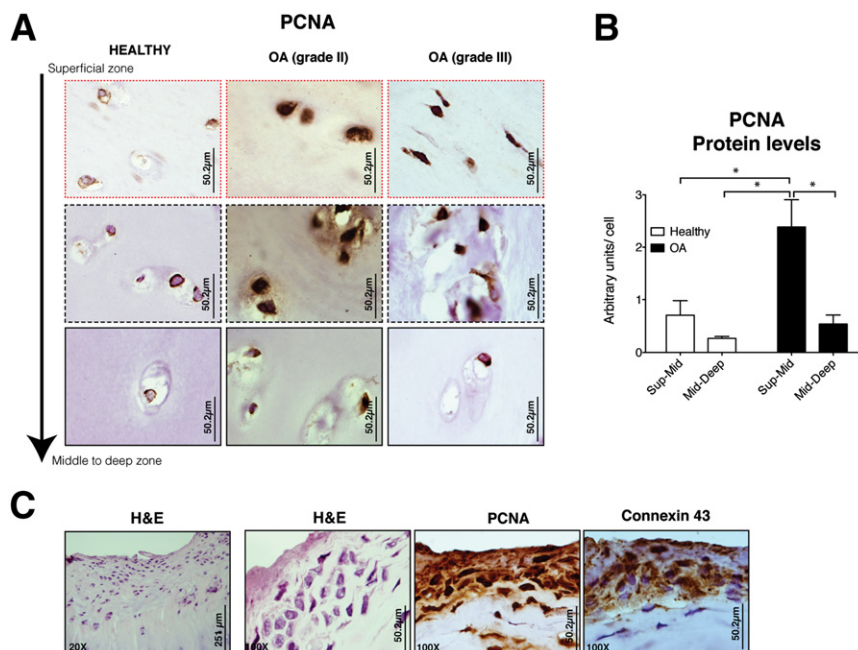


Figure 4 High levels of Cx43 protein and PCNA are observed in OA cartilage since early stage to late grades of the disease. **A:** Representative patterns of staining with PCNA. Cartilage sections from healthy joints ($n = 4$) and cartilage from OA patients ($n = 4$ for knee OA; $n = 6$ for hip OA). Negative control. **B:** Quantitative image analysis of IHC staining with PCNA is shown. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by a Kruskal-Wallis test with a Dunn's multiple comparison test. **C:** IHC coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using anti-Cx43 and PCNA antibody. Superficial layer grouped cells found in some of the cartilage sections from OA patients were highly positive for PCNA and Cx43 (H&E; original magnification, $\times 20$ and $\times 100$, respectively).

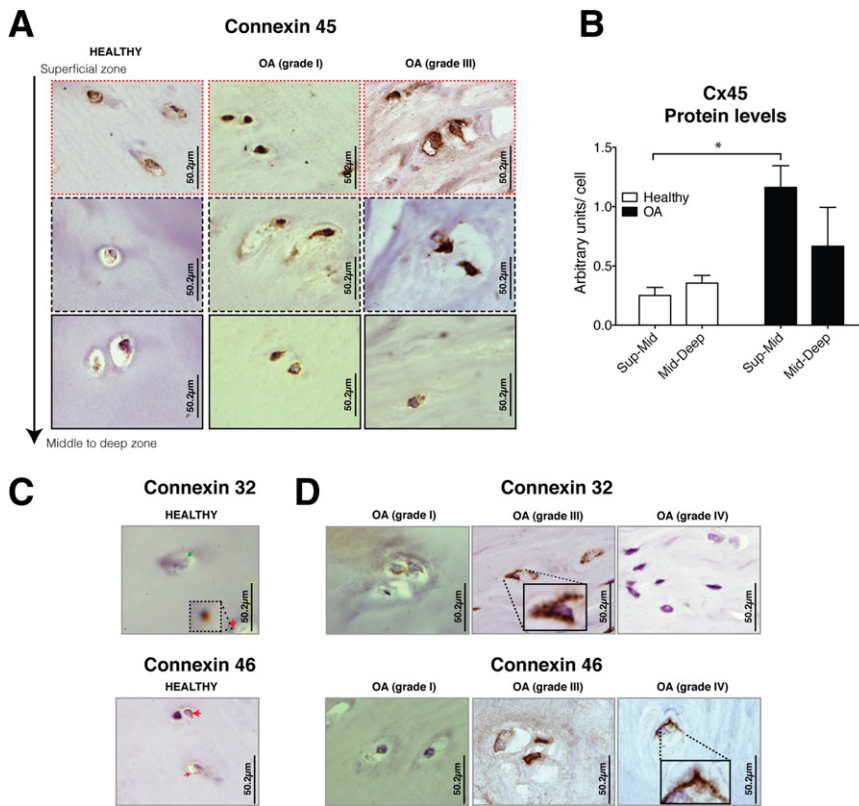


Figure 5 Human cartilage expresses Cx32, Cx46, and Cx45, all of which have altered levels in cartilage from OA joints. **A:** IHC coupled with Gill’s hematoxylin counterstaining using anti-Cx45 antibody. We have observed positive signals for Cx45 in healthy cartilage and OA. **B:** Quantitative image analysis ($n = 3$ for healthy; $n = 10$ for OA) $*P < 0.05$. Kruskal-Wallis test with a Dunn’s multiple comparison test. **C:** IHC using anti-Cx32 and anti-Cx46 antibodies (normal cartilage, $n = 3$). **D:** Cx32 and Cx46 were detected in cartilage from patients ($n = 4$ for knee OA; $n = 6$ for hip OA).

unaffected in OA. Increases of the Cx43 protein without corresponding increases in the transcript levels has been previously observed in synovial cells treated with IL-1.³² In the case of human articular chondrocytes, we found that the Cx43 and Cx45 proteins were already overrepresented in cartilage from patients at the very early disease stage, especially in the superficial zone and down through the top approximately 1000 μm of tissue. Both Cxs were found in the cytoplasm and formed small spots around the cells on the edges of the lacunae. In the mid-deep zones, the cells were positive for Cx43, but the localization was mainly cytoplasmic around the nucleus. These results suggest that mid-deep OA chondrocytes found in nondamaged zones express these proteins but may lack hemichannels and/or GJs composed of Cx43. Deeper cells probably communicate through Cx45 channels, as shown by our detection of Cx45 in both the cytoplasm and cell membrane. The functional deletion of a Cx isoform produces a distinct pathology and the genetic replacement of one Cx by another fails to fully compensate.^{10,33} Previous results have shown that pharmacological inhibition of connection channels reduces IL-1 β -induced metalloprotease production by synovial cells, implying that the expression of catabolic factors destroying the matrix, such as metalloproteases, are dependent on the presence of Cx43 channels.³⁴ The results here demonstrate that high levels of Cxs coincide with cartilage damage in OA.

Our results suggest a close relationship between Cx43 and proliferation. Cx expression is differently regulated between healthy proliferative primary chondrocytes and resting healthy

chondrocytes in cartilage (cultured chondrocytes showed approximately 12 times more Cx43 expression than chondrocytes in tissue) (Figures 1B and 3A). Similarly, more proliferative chondrocytes and higher levels of Cxs are both found in OA cartilage. Cartilage from OA patients showed the most radical changes in Cx protein expression in the superficial zone and down through the top approximately 1000 μm of tissue, areas in which OA changes are associated with a significant catabolic activation and upregulation of chondrocytes proliferation.³⁵ This is evidenced by increased PCNA staining in mid-region and superficial zones (Figure 4). Furthermore, although Cx43 can regulate cell cycle progression, this ability differs between cell types.^{36,37} Cx43 also regulates gene expression, and this includes the regulation of p21 and p27.^{38,39} Interestingly, the over-representation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in normal cartilage (see *Materials and Methods*), suggests that healthy chondrocytes in tissue might be found mostly in the G0/G1 stage, paused likely through active inhibition of the cell cycle via p21 (WAF1/CIP1/p21) and/or p27 (Kip1). The close connection between p21/p27 and Cx43 might help to elucidate the role of Cx43 in articular chondrocyte proliferation and dedifferentiation. Conversely, the C-terminal domain of Cx43 interacts with different cell-cycle proteins,⁴⁰ making the study of the effect of Cx43 on proliferation more difficult. More studies will be necessary to fully understand the role of Cx43 in chondrocytes.

Voltage-dependent GJs are acutely regulated in response to various stimuli. Hemichannels are normally closed, but they open in response to decreases in extracellular calcium,

strong membrane depolarization, mechanical stimulation, and metabolic inhibition. All of these conditions are altered in OA cartilage.^{41–46} Moreover, articular chondrocytes express several types of potassium, calcium, sodium, and N-methyl-D-aspartate channels⁴⁷ that regulate the potential membrane and/or the ratio of intracellular and extracellular ion concentrations. The functions of these channels, however, have not been extensively studied in either normal or OA cartilage. For example, transcripts coding for different GABA receptor-related proteins were found in the cartilage (see *Materials and Methods*), and an altered response to mechanical stimulation with increased levels of glutamate has been previously reported to occur in OA.^{46,48–50} Hyperpolarization and depolarization processes affect the activity of voltage-dependent Cx gating channels. Some of these effects might be related to upstream mechanisms that lead to the alteration of the Cxs observed in OA. Others might be related to the distant downstream responses of early or late events involved in cell transformation.

This study demonstrates that adult chondrocytes from humans are able to communicate with each other through GJ channels specifically formed by Cx43. Normal human adult articular chondrocytes within tissue express Cx43, Cx45, Cx46, and Cx32 in all zones of adult cartilage. Our results show a pathological increase of Cx43 and PCNA in superficial and damaged cartilage from OA donors, and it is tempting to speculate that cell proliferation may be regulated via p21/p27. The important finding of this study, however, was that Cxs are altered in OA cartilage, with Cx43 and Cx45 overrepresented in the damaged zones and Cx43 delocalized from the membrane in the nondamaged zones. The overexpression and/or loss of localization of these proteins would affect the structural and functional integrity of chondrocytes and may help explain the degeneration of the matrix that is observed in OA patients.¹¹

Acknowledgments

We thank Purificación Filgueira-Fernández and Noa Goyanes for collecting and storing cartilage samples, preparing the samples, and for IHC experiments, Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Salinas Bujan for generously taking cartilage samples after surgery, Maria Jose Sanchez Dopico and Tamara Hermida for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture, Mar Haz Conde and Maria Vazquez for technical advice regarding RNA isolation from tissue, Emma Rodriguez and Estefania Cives for administrative help during the whole process, and Isacc Fuentes and Moises Blanco for helpful discussions.

All authors were involved in drafting the article and revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version for publication. F.J.B. and M.D.M. have full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity and the accuracy of the data presented. Study conception and project planning

by M.D.M. and F.J.B. Acquisition of data by M.D.M., P.C.-F., R.G.-F., O.M.-d.-I., H.-Z.W., V.V., P.B., and F.J.B. Analysis and interpretation of data by M.D.M., V.V., P.B., and F.J.B. Manuscript writing by M.D.M. and F.J.B.

References

- Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, McLeod KJ, Rubin CT, Grande DA, Brink PR: Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* 1995, 10:1359–1364
- Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA: Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors — a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009, 214:275–283
- Schwab W, Hofer A, Kasper M: Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* 1998, 30: 413–419
- D'Andrea P, Vittur F: Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1997, 400: 58–64
- Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, Arora M, Boyde A, Gourdie R, Green C: The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl)* 1993, 187:343–352
- Stains JP, Civitelli R: Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1719:69–81
- Sohl G, Willecke K: Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004, 62:228–232
- Burra S, Jiang JX: Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *Int J Biochem Mol Biol* 2011, 2:119–128
- Laird DW: Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006, 394:527–543
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K: Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 2000, 10:1083–1091
- Talhok RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME: Gap junctional intercellular communication in hypoxia-ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol* 2008, 84:57–76
- Wang CM, Lincoln J, Cook JE, Becker DL: Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* 2007, 56:2809–2817
- Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, De Maio A: Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide. *Shock* 1998, 10:97–102
- Toubas J, Beck S, Pageaud AL, Huby AC, Mael-Ainin M, Dussaule JC, Chatziantoniou C, Chadjiachristos CE: Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:F24–F32
- De Vuyst E, Boengler K, Antoons G, Sipido KR, Schulz R, Leybaert L: Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology. *Br J Pharmacol* 163:469–483
- Green CR, Nicholson LF: Interrupting the inflammatory cycle in chronic diseases — do gap junctions provide the answer? *Cell Biol Int* 2008, 32:1578–1583
- Pascual Garrido C, Hakimiyan AA, Rappoport L, Oegema TR, Wimmer MA, Chubinskaya S: Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17:1244–1251
- Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ: Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 2008, 8:495–507
- Kumar S, Connor JR, Dodds RA, Halsey W, Van Horn M, Mao J, Sathe G, Mui P, Agarwal P, Badger AM, Lee JC, Gowen M, Lark MW: Identification and initial characterization of 5000 expressed sequenced

- tags (ESTs) each from adult human normal and osteoarthritic cartilage cDNA libraries. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9:641–653
20. Valiunas V, Gemel J, Brink PR, Beyer EC: Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281:H1675–1689
 21. Valiunas V, Beyer EC, Brink PR: Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res* 2002, 91:104–111
 22. Holloway I, Kayser M, Lee DA, Bader DL, Bentley G, Knight MM: Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12:17–24
 23. Gonzalez S, Fragoso-Soriano RJ, Kouri JB: Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage – a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* 2007, 70:1072–1078
 24. Chi SS, Rattner JB, Matyas JR: Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004, 205:363–370
 25. Saez JC, Schalper KA, Retamal MA, Orellana JA, Shoji KF, Bennett MV: Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp Cell Res* 316:2377–2389
 26. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC: Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 2002, 277:10482–10488
 27. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A: Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 2001, 15:10–12
 28. D'Andrea P, Calabrese A, Capozzi I, Grandolfo M, Tonon R, Vittor F: Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheology* 2000, 37:75–83
 29. Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR: Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1662:96–101
 30. White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA: Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol* 1994, 125:879–892
 31. Ayad WA, Locke D, Koreen IV, Harris AL: Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J Biol Chem* 2006, 281:16727–16739
 32. Niger C, Howell FD, Stains JP: Interleukin-1beta increases gap junctional communication among synovial fibroblasts via the extracellular-signal-regulated kinase pathway. *Biol Cell* 102:37–49
 33. White TW: Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science* 2002, 295:319–320
 34. Kolomytkin OV, Marino AA, Waddell DD, Mathis JM, Wolf RE, Sadasivan KK, Albright JA: IL-1beta-induced production of metalloproteinases by synovial cells depends on gap junction conductance. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282:C1254–C1260
 35. Pfander D, Kortje D, Weseloh G, Swoboda B: [Cell proliferation in human arthrotic joint cartilage]. *German. Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2001, 139:375–381
 36. Jiang JX, Gu S: Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1711:208–214
 37. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, Schirmacher K: Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 2001, 264:397–407
 38. Herrero-Gonzalez S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A: Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* 29:5712–5723
 39. Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S: Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 2001, 20:4138–4149
 40. Giepmans BN: Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 2004, 62:233–245
 41. Chowdhury TT, Appleby RN, Salter DM, Bader DA, Lee DA: Integrin-mediated mechanotransduction in IL-1 beta stimulated chondrocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2006, 5:192–201
 42. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K: Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003, 31:619–624
 43. Konttinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Liljestrom M, Hukkanen M, Takagi M, Virtanen I, Santavirta S: Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46:953–960
 44. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Flatman PW, Salter DM: ATP in the mechanotransduction pathway of normal human chondrocytes. *Biorheology* 2004, 41:567–575
 45. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Caldwell H, Nuki G, Salter DM: Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8:272–278
 46. Ramage L, Martel MA, Hardingham GE, Salter DM: NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16:1576–1584
 47. Barrett-Jolley R, Lewis R, Fallman R, Mobasher A: The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol* 2010, 1:135
 48. McNearney T, Speegle D, Lawand N, Lisse J, Westlund KN: Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis. *J Rheumatol* 2000, 27:739–745
 49. Salter DM, Wright MO, Millward-Sadler SJ: NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* 2004, 41:273–281
 50. Shimazaki A, Wright MO, Elliot K, Salter DM, Millward-Sadler SJ: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology* 2006, 43:223–233

Curriculum vitae

Raquel Gago Fuentes

Fecha de nacimiento: 24/06/1988

Nacionalidad: Española

DNI: 53307736-S

Dirección: Avenida de Bergantiños,

56, 1ºA, Carballo, 15100, A Coruña

E-mail: raquel.gago.fuentes@gmail.com

Tfno: +34 690225844

FORMACIÓN POSTGRADUADA

Estudiante de doctorado. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Universidade de A Coruña. Desde Junio de 2011

Máster en Asistencia e Investigación Sanitaria. Universidad de A Coruña (INIBIC). Curso 2011-2012

Licenciada en Biología. Universidad de A Coruña. Junio 2011

EXPERIENCIA Y ESTANCIAS EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN NACIONALES O INTERNACIONALES

AÑO	CENTRO	PERÍODO
2015	<i>Life Sciences Center, Brithis Columbia University, Vancouver, Canadá</i>	3 meses
2013	<i>Departament of Basic Medical Sciences en Gent University, Gante, Bélgica</i>	3 meses
2011-actualidad	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)	Desde Junio de 2011
2010-2011	Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad da Coruña	9 meses

PUBLICACIONES INDEXADAS

Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Varela-Eirin M, Varela-Vazquez A, Acea B, Fonseca E, Naus CC and Mayan MD*. The C-terminal domain of connexin 43 is essential for normal cartilage structure and chondrocyte behaviour. **2016**. Submitted. *Corresponding author

Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, Megias D, Carpintero-Fernandez P, Mateos J, Acea B, Fonseca E, Blanco FJ* and Mayan MD*. Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors related to osteoarthritis. **Molecular & Cellular Proteomics**, **2015** (PDMI: 25903580). **Factor de Impacto: 7.398**. * Corresponding author

Gago-Fuentes R[#], Carpintero-Fernandez P[#], Goldring MB, Brink PR, Mayan MD*, Blanco FJ*. Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, **2014** (PDMI: 24530659). **Factor de impacto: 4.262**. # These authors contributed equally to this work *Corresponding authors

Mayan MD[#], **Gago-Fuentes R[#]**, Carpintero-Fernandez P[#], Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Valiunas V, Brink PR, Golberg GS, Blanco FJ*. Articular chondrocyte network mediated by Gap Junctions: Role in metabolic cartilage homeostasis.. **Annals Rheumatic Disease, 2015** (PDMI: 24225059 / Correction: 25745019). **Factor de impacto: 10.377**. #These authors contributed equally to this work *Corresponding authors

Mayan MD[#], Carpintero-Fernandez P[#], **Gago-Fuentes R[#]**, Martinez-de-Ilarduya O, Wang HZ, Valiunas V, Brink PR, Blanco FJ*. Human Articular Chondrocytes Express Multiple Gap Junction Proteins: Differential Expression of Connexins in Normal and Osteoarthritic Cartilage. **American Journal Pathology, 2013** (PDMI: 23416160). **Factor de impacto: 5.327**. #These authors contributed equally to this work *Corresponding authors

Garcia T, Gutierrez J, Veloso J, **Gago-Fuentes R**, Diaz J*. Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. **Journal Plant Physiology, 2013** (PDMI: 25662842). **Factor de impacto: 2.77**. *Corresponding authors

PATENTES

2 patentes, una en proceso de registro y otra en pendiente de preparación.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Mayan MD, Filgueira-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernandez P, Landeira-Ameijeiras V, Goyanes N, Brink PR, Blanco FJ. *Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell signaling within hyaline cartilage*. **Póster. Osteoarthritis Research Society International (OARSI). San Diego, California, EEUU. Septiembre, 2011**

Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Filgueira-Fernandez P, Valiunas V, Brink PR, Blanco FJ. *Los condrocitos articulares humanos se comunican a través de gap junctions: distribución anormal de conexinas en artrosis*. **Conferencia invitada. Cell-to-Cell Communication. A Coruña, España. Octubre, 2011**

Mayan MD, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernandez P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, Valiunas V, Brink PR, Blanco FJ. *Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell communication within hyaline cartilage*. **Presentación oral. Osteoarthritis Research Society International (OARSI). Barcelona, España. Abril 2012**

Mayan MD, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernandez P, Filgueira-Fernandez P, Hong-Zhang W, Goyanes N, Valiunas V, Brink PR and Blanco FJ. *Adult human articular chondrocytes communicate through gap junction channels: abnormal connexins distribution in osteoarthritis*. **Póster. II Xornada de Investigación Biosanitaria IDIS. Santiago de Compostela, España. Abril, 2012**

Mayan MD, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernandez P, Filgueira-Fernandez P, Hong-Zhang W, Goyanes N, Valiunas V, Brink PR, Blanco FJ. *Los condrocitos articulares humanos se comunican a través de gap junctions: distribución anormal de conexinas en artrosis*. **Póster. Sociedad Española de Reumatología (SER). Zaragoza, España. Abril, 2012**

Mayan MD, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernandez P, Filgueira-Fernandez P, Valiunas V, Brink PR, Goldberg GS, Blanco FJ. *Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell signaling within hyaline cartilage*. **Póster. American College of Rheumatology (ACR). Washington D.C., EEUU. Noviembre, 2012**

Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, Valiunas V, Brink PR, Goldberg GS, Blanco FJ. *Articular chondrocytes are physically connected through a cellular network that is responsible of the metabolic coupling between chondrocytes located in different layers of the tissue.* **Presentación oral. Osteoarthritis Research Society International (OARSI). Philadelphia, Pensilvania, EEUU. Abril, 2013**

Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Mateos J, Mayan MD, Blanco FJ. *Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors, nuclear translocation and association with proteins dysfunctional related with osteoarthritis.* **Presentación oral. Osteoarthritis Research Society International (OARSI). Philadelphia, Pensilvania, EEUU. Abril, 2013**

Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, Valiunas V, Brink PR, Blanco FJ. *Interconnected cellular projections and gap junctions mediate metabolic coupling between chondrocytes located in different layers of the tissue: Cell-to-cell communication in normal and osteoarthritic cartilage.* **Póster. American College of Rheumatology (ACR). San Diego, California, EEUU. Noviembre, 2013**

Fernandez-Puente P, **Gago-Fuentes R**, Carpintero-Fernández P, Mateos J, Mayan MD, Blanco FJ. *Proteomic analysis of connexin 43 reveals association with proteins dysfunctional related with osteoarthritis.* **Póster. American College of Rheumatology (ACR). San Diego, California, EEUU. Noviembre, 2013**

Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan MD, Blanco FJ. *Ancient chinese medicine based on a lectin (MASL) that targets glycoproteins containing alpha-2-3-sialic acid residues, decreases proinflammatory mediators production and extracellular matrix degradation response in articular cartilage.* **Póster. Osteoarthritis Research Society International (OARSI). Paris, Francia. Abril, 2014**

Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Blanco FJ, Mayan MD. *Therapeutic potential of targeting sialic acid modified receptors in osteoarthritis.* **Presentación oral. EMBO workshop: glycobiology and glycochemistry: applications to human health and disease. Lisboa, Portugal. Mayo, 2014**

Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, Carpintero-Fernandez P, Mateos J, Mayan M.D, Blanco FJ. *Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors related to osteoarthritis.* **Póster. Jornadas investigación biointegra saúde 2014. A Coruña, España. Junio, 2014**

Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan MD, Blanco FJ. *Lectins that target sialic acid modified receptors may hold therapeutic potential for degenerative arthritis.* **Póster. Jornadas de investigación biointegra saúde 2014. A Coruña, España. Junio, 2014**

Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan MD, Blanco FJ. *Lectins that target sialic acid modified receptors may hold therapeutic potential for degenerative arthritis.* **Póster. Annual European Congress of Rheumatology European League Against Rheumatism (EULAR) 2014. Paris, Francia, Junio, 2014**

Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, Carpintero-Fernandez P, Mateos J, Mayan MD, Blanco FJ. *Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors related to Osteoarthritis.* **Póster. American College of Rheumatology (ACR). Boston, Massachusetts, EEUU. Noviembre, 2014**

Carpintero-Fernandez P, **Gago-Fuentes R**, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan MD, Blanco FJ. *Therapeutic potential of targeting sialic acid modified receptors in osteoarthritis.* **Póster. American College of Rheumatology (ACR). Boston, Massachusetts, EEUU. Noviembre, 2014**

Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Blanco FJ, Naus CC, Mayan MD. *The regulatory role of the C-Terminal domain of connexin 43 in articular cartilage*. Presentación oral. **Annual European Congress of Rheumatology European League Against Rheumatism (EULAR) 2015**. Roma, Italia. Junio, 2015

Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Blanco FJ, Naus CC, Mayan MD. *Función del dominio C-terminal de la conexina 43 en cartílago articular y su implicación en el desarrollo de la artrosis*. Presentación oral. **Xornadas investigación biointegrada saúde 2015**. Vigo, España. Junio, 2015

Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Varela-Eirin M, Varela-Vazquez M, Blanco FJ, Acea B, Fonseca E, Naus CC and Mayan MD. *Deletion of the C-terminal domain of connexin 43 results in alterations in normal chondrocyte phenotype and cartilage formation*. Póster. **Osteoarthritis Research Society International (OARSI)**. Amsterdam, Holanda. Junio 2016

Gago-Fuentes R, Bechberger JF, Varela-Eirin M, Varela-Vazquez M, Blanco FJ, Acea B, Fonseca E, Naus CC and Mayan MD. *Deletion of the C-terminal domain of connexin 43 results in alterations in normal chondrocyte phenotype and cartilage formation*. Póster. **World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (WCO-IOF-ESCEO)**. Málaga, España. Abril 2016

CURSOS

Curso de competencias para la investigación GRADschool. Fundación Barrié. Santiago de Compostela. Octubre 2014
Science Xpression Workshop. Fundación Barrié. A Coruña. Septiembre, 2014

ACTIVIDADES RELACIONADAS CON I+D+i

Asistencia a ProteoRed Tissue Imaging Workshop. A Coruña. Noviembre, 2011
Asistencia a II Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2011
Asistencia a IV Jornadas de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. A Coruña. Octubre, 2012
Asistencia a III Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2012
Asistencia a IV Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2013
Asistencia a BioSpain. Santiago de Compostela. Mayo, 2014
Asistencia a V Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2014
Asistencia a Cell Signaling: Recent Trends in Biomedical Research. Abril, 2015
Asistencia a VI Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2015
Participación en el comité organizador de la VI Jornadas de jóvenes investigadores. A Coruña. Diciembre, 2015

BECAS Y AYUDAS de I+D+i

Beca **Asistencia a Congresos (WCO-IOF-ESCEO 2016)**
ESCEO-Eli Lilly Scholarships
Duración: 14 – 17 Abril, 2016

Beca Estadías no Extranxeiro UDC-INDITEX

Universidad de la Coruña e INDITEX

Duración: Septiembre – Diciembre, 2015

Estancia predoctoral en *Department of Basic Medical Sciences, Gent University, Gante, Bélgica*

Beca Asistencia a Congresos (EULAR-2015)

Sociedad Española de Reumatología (SER)

Duración: 10 – 13 Junio, 2015

Beca Asistencia a Congresos (ACR-2014)

Sociedad Española de Reumatología (SER)

Duración: 14 – 19 Noviembre, 2014

Beca Estadías no Extranxeiro UDC-INDITEX

Universidad de la Coruña e INDITEX

Duración: Septiembre – Diciembre, 2013

Estancia predoctoral en *Life Sciences Center, Brithis Columbia University, Vancouver, Canada*

Beca Estadías no Extranxeiro UDC. Renunciada a favor de la beca UDC-INDITEX

Universidad de la Coruña

Duración: Septiembre – Diciembre, 2013

Estancia predoctoral en *Life Sciences Center, Brithis Columbia University, Vancouver, Canada*

Beca Predouctoral de la Xunta de Galicia

Xunta de Galica

Duración: Diciembre, 2012 – Diciembre, 2015

Beca Inicio a la investigación de la Deputación de A Coruña

Deputación de la Coruña

Duración: Septiembre, 2012 – Septiembre, 2013. Renunciada a favor de la beca Predoutoral de la Xunta de Galicia

Beca Lanzadera CIBER-BBN de iniciación a la investigación

CIBER-BBN

Duración: Junio, 2011 – Mayo, 2012

Beca **Colaboración** en el Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña.

Ministerio de educación, cultura y deporte

Duración: Diciembre, 2010 – Junio, 2011

PARTICIPACIÓN EN CONTRATOS Y PROYECTOS DE I+D+i

Título: *Donación*

Entidad Financiadora: Organizaciones sin ánimo de lucro en apoyo a la investigación del cáncer

Calidad de participación: **Investigadora Predoctoral**

Investigadores Principales: Dra. María D. Mayán

Título: *Agrupación estratégica CICA-INIBIC (AGRUP2015/05)*

Entidad Financiadora: Xunta de Galicia

Duración: 2015, 2 años

Calidad de participación: **Investigadora Predoctoral**

Coordinador: Dr. Jaime Rodríguez González

Co-IP: Dra. María D. Mayán

Título: *Ayúdanos a entender el lenguaje de las células y su implicación en enfermedades*

Entidad Financiadora: Ministerio de economía y competitividad y FEYCT

Duración: 2015, 2 años

Calidad de participación: **Investigadora Predoctoral**

Investigadora Principal: Dra. María D. Mayán

Título: *Estudio de la función de los canales de conexinas en condrocitos articulares humanos: posible implicación en el desarrollo de la artrosis y búsqueda de una diana terapéutica*

Entidad Financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad y Ministerio de Salud, Servicios Sociales e Igualdad, Instituto de Salud Carlos III (ISIII).

Duración: 2013, 3 años

Calidad de participación: **Investigadora Predoctoral**

Investigadora Principal: Dra. María D. Mayán

Título: *Estudio de la Función de la conexina 43 en condrocitos articulares humanos: Posible implicación en el desarrollo de la artrosis y búsqueda de una diana terapéutica*

Entidad Financiadora: Sociedad Española de Reumatología (SER)

Duración: 2013, 2 años

Calidad de participación: **Investigadora Predoctoral**

Investigadora Principal: Dra. María D. Mayán.

MIEMBRO DE SOCIEDADES

Socio ordinario de la Sociedad Española de Reumatología (**SER**)

Socio ordinario de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (**SEBBM**)

IDIOMAS

Idioma	Habla	Lee	Escribe
Español	C	C	C
Gallego	C	C	C
Inglés	R	B	R

[R = regular; B = bien; C = correctamente]

