



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN**

**Relación de la conexina-43 con  
la actividad del oncogén c-Src  
en células madre de glioma**



**Ester Gangoso Rodríguez**  
**Tesis Doctoral, Julio de 2013**



VNIVERSIDAD  
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

# Relación de la conexina-43 con la actividad del oncogén c-Src en células madre de glioma

Ester Gangoso Rodríguez

Tesis Doctoral 2013



**D<sup>a</sup> ARÁNZAZU TABERNEIRO URBIETA**, Profesora Titular de Universidad y D. **JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ**, Catedrático de Universidad, adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Relación de la conexina-43 con la actividad del oncogén c-Src en células madre de glioma”, realizada bajo su dirección por la Licenciada en Bioquímica D<sup>a</sup> Ester Gangoso Rodríguez en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firman el siguiente documento en Salamanca a 10 de Junio de 2013.

Fdo. Aránzazu Tabernero Urbieto

Fdo. José María Medina Jiménez



**Parte de los resultados presentados en esta memoria:**

**- Han sido publicados en:**

- Herrero-González S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A. *"Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells"*. **Oncogene** (2010) 29:5712-23
- Gangoso E, Ezan P, Valle-Casuso JC, Herrero-González S, Koulakoff A, Medina JM, Giaume C, Tabernero A. *"Reduced connexin43 expression correlates with c-Src activation, proliferation, and glucose uptake in reactive astrocytes after an excitotoxic insult"*. **Glia** (2012) 60: 2040-9.
- Ester Gangoso, Cécile Thirant, Hervé Chneiweiss, Jose M Medina and Arantxa Tabernero. *"The inhibition of c-Src mediates the reversion of glioma stem-like phenotype promoted by connexin43"*. (en revisión)

**- Han permitido la solicitud de la siguiente patente:**

- Arantxa Tabernero, Ester Gangoso, José María Medina. *Péptido y composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer*. REFERENCIA DE SOLICITUD ES1367.65.



***"Me gusta la gente que arriesga  
lo cierto por lo incierto para ir  
detrás de un sueño"***

*(Mario Benedetti)*





## Agradecimientos

El tiempo pasa rápido y ha llegado el momento de poner punto y final a la etapa Predoctoral. Y que mejor manera que hacerlo, agradeciendo a todas aquellas personas que, de una forma u otra, me han ayudado a hacer este trabajo posible.

En primer lugar, a la Dra. Arantxa Taberero, directora de esta Tesis, por su magnífica supervisión de este trabajo. Ha sido una suerte poder empezar mi carrera científica de la mano de una excelente Investigadora pero aún mejor persona. Me siento muy orgullosa del trabajo que hemos realizado y solamente puedo darle las gracias por su optimismo en los momentos menos buenos, sus consejos y sobre todo por la confianza que siempre ha depositado en mí.

Al Dr. José María Medina, codirector de este trabajo, la primera persona que me abrió la puerta en el mundo de la investigación, siempre le estaré agradecida por esa primera oportunidad. Además, debo agradecerle la sinceridad con la que siempre me habló de la carrera investigadora y también la confianza que depositó en mí durante este trabajo. Admiro en él su sabiduría, no solo en la ciencia, sino en cualquier campo, incluida la coctelería.

A la Dra. Josefa Martín Barrientos, mi madrina desde que salí de la Facultad. No sé si en ese momento sabía la función que iba a desempeñar, pero creo que la ha realizado estupendamente. Sin duda, es una de las personas más generosas que conozco. Gracias por prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado, incluida la redacción de esta Memoria. Y gracias por preocuparse siempre por mí y por meterse en mis iniciativas solidarias. Y por supuesto, gracias por ese sentido del humor, por alegrarnos los cafés y por los “desengrases”.

A la Dra. Ana Velasco, persona generosa y siempre dispuesta a enseñar. Le deseo un gran futuro para su línea de investigación, que ya está dando sus primeros frutos.

He sido afortunada en poder coincidir con mucha gente en el laboratorio, diferentes son con los que empecé a con los que terminé. Unos me enseñaron las técnicas y a otros se las he enseñado yo, pero de todos he aprendido. Mis inicios fueron de la mano de Vega y Erica, que han estado presente hasta el final, gracias por vuestro apoyo. A Tere, gracias por introducirme en el mundo de las conexas. A Sandra, por todo lo que me enseñó en su día y por los momentos que pasamos juntas, pasé un primer año de lab estupendo a su lado. A José Carlos, por enseñarme que a veces hay que ser práctico. A Tamara, con la que fue un placer trabajar unos meses, su interés por el trabajo que realizó con nosotros resultó gratificante. A Álex, por su compañerismo y por tener esa mente científica curiosa. A Ángel, por estar siempre dispuesto para echar una mano y por ese libro de Mafalda. A Maru, gracias por ser un buen compañero de poyata y tener ese gran sentido del humor para animar las horas en el lab. A Marta, por ser una excelente compañera, admiro su capacidad de trabajo y estoy segura de que le espera un gran futuro científico, pero sobre todo gracias por siempre prestarme su ayuda. A Ana G, creo que nuestra estancia en Sevilla nos ayudó a entendernos mejor y a perdernos juntas por la ciudad, nunca olvidaré las risas de esa noche, suerte con la Tesis. A Myriam, la nueva “conexina” a la que le deseo toda la suerte del mundo ahora que empieza su camino, estoy segura de que va a “conexar” muy bien con este trabajo.

I would like to thank Christian Giaume to give me the opportunity to work in his team for a short term. And also thanks to his collaborators and students. Thanks to Annette for her help. Thanks to Lisa, Anne-Cécile and Jéremi for making my stay in the Collège de France really nice. A Pascal, gracias por valorar mi trabajo y ser mi mentor durante mi estancia en París. Además, una excelente persona con un magnífico sentido del humor, suerte amigo.

A los Investigadores y Profesores del INCYL, que me han abierto las puertas de su laboratorio para lo que necesitaré ya fuera para usar aparatos o para ayudarme con sus consejos. Por todo ello, gracias a; Raquel Rodríguez, Juan Carlos Arévalo, Conchi Lillo, Ángel Porteros y Rosario Arévalo .

No me puedo olvidar de las dos excelentes técnicas que nos han facilitado mucho el trabajo en el laboratorio. A Tomy, por su amabilidad, su trabajo y por haber hecho que el caos se convirtiera en el orden que tanto deseábamos. A Ana “técnico” que tanto nos ha ayudado en el último año. También tengo mi agradecimiento para Javier Escudero, secretario del Departamento, gracias por hacer una gestión excelente.

Al Dr. Fernando Leal, admiro su valores y alabo su trabajo, creo que con personas como él la Universidad iría mucho mejor. Gracias Fernando por siempre estar ahí, por ofrecermé tu ayuda y además ser el mejor compañero de pádel que podría tener. También gracias al Dr. Enrique Villar, mi padrino, por el interés en mi trabajo y los buenos ratos que hemos pasado fuera de las aulas.

A los compañeros del departamental y el INCYL con los que he compartido tanto. A Seila Fernández, gracias por los buenos momentos, y a la que le deseo todo lo mejor. A Patricia Rodríguez, por que hemos vivido a la vez la evolución de la Tesis y sobre todo por esos momentos viajeros. A Saúl Herranz, por sus consejos, su ayuda y por lo vivido fuera del labo. A Elisa Lozano, por las vivencias en el Instituto en Zamora, en la Facultad y ahora en el mundo de la Investigación. A Lyma, por ser una amiga fuera del INCYL y a la que deseo mucha suerte en lo que le queda de Tesis. A Fernando León, por siempre estar dispuesto a ayudarme. A Guille, por las horas compartidas en prácticas.

A mis amigas, algunas en el mundo de la ciencia y otras no. A mis bioguillas, en especial a Naty, Lara, Sarita, siempre pendientes de mí y deseando hacer algún reencuentro para vernos y recordar viejos tiempos. A mis bioquímicas Nagore y Laura, por esos desahogos de Tesis. A Virginia Florido, que en los últimos años se ha convertido en una gran amiga, gracias por estar siempre ahí y dispuesta para esos momentos de desconexión que necesito, ya sea tomándonos unos pinchos o uno copa en el Siglo, eres una gran amiga Vir.

Gracias a mi Familia: a mis abuelos, tíos y primos, por el interés en mi trabajo y por tratar de entender lo que hago. A mi hermano Beni, eres un ejemplo constante para mí, no solo de trabajo sino de solidaridad, gracias por demostrarme los valores importantes de la vida. A Doris, gracias porque en los últimos meses ha sido un apoyo personal fuerte. Y por último a mis padres, gracias por dejarme ser lo que quise, por enseñarme a luchar por lo que quiero y ayudarme a hacerlo posible.

## Abreviaturas

AMPS-----	Persulfato amónico
BSA-----	Albúmina sérica bovina
CDK-----	Kinasa dependiente de ciclinas
Cx-----	Conexina
DAPI-----	4'6-diamino-2-fenilindol
DNA-----	Ácido dexosirribonucléico
DEPC-----	Dietilpirocarbonato
DMEM-----	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO-----	Dimetilsulfóxido
DTT-----	Ditiotreitol
EDTA-----	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF-----	Factor de crecimiento epidérmico
b-FGF-----	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
EGFR-----	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FCS-----	Suero fetal bovino
GAPDH-----	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GBM-----	Glioblastoma multiforme
GFAP-----	Proteína ácida fibrilar de la glia
GSC-----	Células madre de glioma (glioma stem cells)
IRES-----	Internal Ribosome Entry Site
kDa-----	kilodaltons
LB-----	Medio Luria Bertani
MCS-----	Sitio de Multiclación
MTT-----	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil tetrazolio
mRN-----	Ácido ribonucleico mensajero
NT-siRNA-----	<i>non-target</i> siRNA
NCBI-----	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS-----	<i>Organización mundial de la salud</i>
Pb-----	Par de bases
PBS-----	Tampón sulfato salino
PCR-----	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA-----	Proteína kinasa A
PKC-----	Proteína kinasa C
PMSF-----	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PP2-----	4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-(tbutil) pirazolo[3,4-d]pirimidina

PTEN-----	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF-----	Membrana de Polivinilidenofluoruro
RNA-----	Ácido ribonucleico
RT-----	Transcripción reversa
SDS-----	Dodecil sulfato sódico
siRNA-----	RNA de interferencia ( <i>Small interfering RNA</i> )
Skp2-----	Proteína asociada a kinasas de la fase S
SNC-----	Sistema Nervioso Central
TAE-----	Tampón Tris Acetato-EDTA
TBS-----	Tampón Tris Salino
TP53-----	Gen que codifica la proteína p53
TEMED-----	N,N,N',N'-tetrametilendiamino
ZO-1-----	Proteína zonula occludens-1

<b>1.Introducción</b>	1
<b>1.1. Características generales de los gliomas</b>	3
1.1.1. Clasificación de los gliomas	3
1.1.2. Alteraciones moleculares en los gliomas	6
1.1.3. Células madre de gliomas	7
1.1.3.1. Marcadores de células madre de gliomas	9
1.1.3.1.1. CD133	9
1.1.3.1.2. Sox2	9
1.1.3.1.3. Id1	10
1.1.3.1.4. Marcadores asociados con la transición epitelio-mesénquima	11
1.1.3.2. Células madre como diana terapéutica	11
<b>1.2. Comunicación intercelular y proliferación en células gliales</b>	13
1.2.1. Estructura de las uniones comunicantes. La conexina-43	16
1.2.1.2. La conexina y la formación de hemicanales	17
1.2.2. Síntesis y degradación de las conexinas	17
1.2.3. Fosforilación de la conexina-43	19
1.2.4. La conexina-43 en los gliomas	20
1.2.4.1. La conexina-43 como proteína supresora de tumores	21
1.2.4.2. Implicación de la conexina-43 en la migración, adhesión e invasión de los gliomas	23
<b>1.3. Actividad oncogénica de c-Src</b>	24
1.3.1. Inhibidores de la actividad de c-Src en el cáncer	27
1.3.2. Relación entre conexina-43 y c-Src	27
<b>2. Plan de Trabajo</b>	29
<b>3.Material y Métodos</b>	33
<b>3.1. Material</b>	35
3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario y líneas celulares utilizadas	35
3.1.2. Medios instrumentales	36
3.1.3. Productos	38
3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares de las líneas celulares C6, HTB12, HTB138, U373 y T98-G	38
3.1.3.2. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares de las líneas celulares GliNS2, G179, G144 y G166	38
3.1.3.3. Productos utilizados para el análisis del mRNA	39
3.1.3.4. Productos utilizados en la construcción del plásmido pIres-Cx43	39
3.1.3.5. Productos empleados para el silenciamiento génico	41

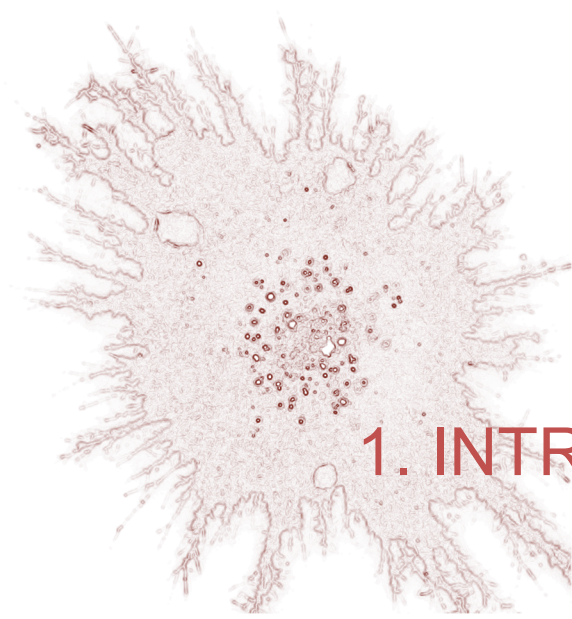
3.1.3.6. Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas.....	41
3.1.3.7. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular.....	43
3.1.3.8. Otros productos .....	43
3.2. Métodos .....	44
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares .....	44
3.2.1.1. Composición de las disoluciones .....	44
3.2.1.2. Preparación del cultivo de células de glioma .....	44
3.2.1.3. Preparación de cultivos de células madre de glioma.....	45
3.2.2. Tratamientos celulares .....	45
3.2.3. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante RetroTranscripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	46
3.2.3.1. Extracción del RNA total de los cultivos .....	46
3.2.3.2. Cuantificación del RNA .....	46
3.2.3.3. Retrotranscripción (RT).....	47
3.2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	47
3.2.3.5. Electroforesis de DNA .....	48
3.2.4. Construcción del plásmido pIres-Cx43.....	48
3.2.4.1 Transformación bacteriana y extracción del DNA plasmídico .....	48
3.2.4.2 Construcción del plásmido pGEM- T-Cx43 .....	49
3.2.4.3 Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción .....	50
3.2.4.4. Ligación del cDNA de la Cx43 con el vector pIRESpuro2.....	50
3.2.4.5 Secuenciación .....	50
3.2.5. Transfección de las células madre de gliomas.....	51
3.2.6. Transfección de las células C6 de glioma de rata .....	52
3.2.7. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA (small interfering RNA).....	52
3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western .....	53
3.2.8.1. Extracción de proteínas .....	54
3.2.8.2. Cuantificación de proteínas .....	54
3.2.8.2.1 Análisis en el fluorímetro Qubit con el kit de análisis de proteínas. ....	54
3.2.8.2.2. Cuantificación de proteínas de tejido por el método BCA.....	54
3.2.8.3. Preparación de los geles .....	54
3.2.8.4. Preparación de las muestras para la electroforesis .....	55
3.2.8.5. Electroforesis de proteínas .....	55
3.2.8.6. Electrotransferencia .....	55
3.2.8.7. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana.....	56
3.2.8.8. Inmunodetección .....	56

3.2.9. Determinación de la expresión y localización de proteínas mediante inmunocitoquímica .....	56
3.2.10. Determinación de viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT. ....	57
3.2.11. Experimentos realizados “in vivo” en ratones C57BL6 .....	58
3.2.11.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6 .....	58
3.2.11.2. Extracción de las proteínas del tejido.....	58
3.2.12. Análisis estadístico .....	59
<b>4. Resultados .....</b>	<b>61</b>
4.1. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en astrocitos reactivos y células de glioma, incluidas las células madre de glioma humano.....	63
4.1.1. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en los astrocitos de la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.....	63
4.1.2. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en células C6 de glioma de rata. ....	68
4.1.3. Estudio de la relación de la Cx43 con c-Src en células madre de glioma humano.....	70
4.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de la conexina-43 en células madre de glioma humano. ....	74
4.2.1 Efecto del silenciamiento de la conexina-43 en células madre de glioma humano.....	74
4.2.1.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina-43 en las células madre de glioma G166.....	74
4.2.1.2. Efecto del silenciamiento de la conexina-43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células madre de glioma G166. ....	75
4.2.2. Efecto de la restauración de la conexina-43 en células madre de glioma humano .....	79
4.2.2.1. Construcción del plásmido pIres-Cx43.....	79
4.2.2.2. Puesta a punto de la transfección de la construcción pIres-Cx43 en células madre de glioma humano GliNS2.....	83
4.2.2.3. Efecto de la restauración de la conexina-43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células madre de glioma GliNS2. ....	86
4.3. Efecto de la restauración de la conexina-43 sobre el fenotipo característico de células madre de glioma. ....	90
4.3.1. Efecto de la conexina-43 en el fenotipo de las células madre de glioma, en presencia o ausencia de suero.....	90
4.3.2. Estudio de la vía de señalización de la conexina-43 en las células madre de glioma. ....	96



<b>4.3.3. Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina-43 sobre el fenotipo de célula madre.....</b>	<b>99</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1. Relación de la Cx43 y c-Src en astrocitos reactivos. ....</b>	<b>106</b>
<b>5.2 Niveles de Cx43 y actividad de c-Src en células glioma. ....</b>	<b>106</b>
<b>5.3. Efecto de la modulación de la Cx43 en la actividad de c-Src en las célula madre de glioma .....</b>	<b>107</b>
<b>5.4. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre el fenotipo característico de las células madre de glioma.....</b>	<b>108</b>
<b>5.5. Participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de las célula madre de glioma .....</b>	<b>109</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>113</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>119</b>





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. Características generales de los gliomas

Los tumores cerebrales constituyen, aproximadamente, un 2% de todas las neoplasias malignas (Furnari et al. 2007). En general, presentan un amplio espectro de efectos adversos y un mal pronóstico. Los gliomas son los tumores cerebrales más frecuentes y afectan tanto a niños como a adultos. Son tumores de origen glial y mayoritariamente astrocítico; además, son extremadamente diversos con respecto a su localización, morfología, diferenciación y respuesta a la terapia (para revisión, véase: (Caskey et al. 2000))

Los gliomas pueden derivar de tres tipos celulares: los astrocitos (astrocitomas, incluyendo los glioblastomas), los oligodendrocitos (oligodendrogliomas) y las células endimarias (ependimomas). De todos ellos, el glioblastoma multiforme (GBM) es el que presenta mayor malignidad, representando el 29% de todos los tumores cerebrales primarios y el 50% de los gliomas (Stark et al. 2005). Los pacientes diagnosticados con GBM tienen una vida media de uno a dos años (Zhu and Parada 2002); el hecho de ser un tumor altamente infiltrativo hace que sea más fácil la recurrencia del tumor después de la cirugía y las terapias actuales. Estos tumores se componen de una población de células heterogéneas, que incluye células con propiedades de células madre, denominadas células madre de glioma (GSC), a las cuales se les atribuye la recurrencia del tumor y las cuales se describirán más adelante. A pesar de los avances en el estudio de esta patología, su tratamiento no ha conseguido incrementar la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con un glioma maligno en los últimos años.

### 1.1.1. Clasificación de los gliomas

La clasificación de los tumores cerebrales ha estado clásicamente basada en criterios histopatológicos. De esta forma, los signos histológicos principales en los que se basan los diferentes sistemas de clasificación, incluido el de la Organización Mundial de la Salud (OMS), son los siguientes (Gudinaviciene et al. 2004): atipia nuclear, actividad mitótica, proliferación vascular y necrosis.

Estas características se hacen más evidentes cuanto mayor es el grado de malignidad del tumor aunque, debido a la presencia heterogénea de las mismas en los gliomas, se hace necesario un sistema de clasificación y diagnóstico más objetivo, basado en las características moleculares de los diferentes gliomas. Por ello, actualmente se tiende a una clasificación basada en dichas características ya que, además, éstas pueden aportar datos acerca de cuál puede ser el tratamiento más efectivo.

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres tipos de gliomas, atendiendo al origen celular. En esta Memoria nos vamos a centrar en los astrocitomas, los cuales son más frecuentes y se sabe que muestran un comportamiento más agresivo que los oligodendrogliomas o ependimomas (Idoate and Echeveste 2007).

Los astrocitomas son tumores compuestos, principalmente, por astrocitos anaplásicos y se clasifican en cuatro grados, (Kleihues et al. 1993; Kleihues and Sobin 2000) según su nivel de malignidad, de acuerdo con la OMS:

- I. Astrocitoma pilocítico (Grado I)
- II. Astrocitoma de bajo grado (Grado II)
- III. Astrocitoma anaplásico (Grado III)
- IV. Glioblastoma (grado IV)

La última clasificación fue realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 (Furnari et al. 2007). En esta nueva revisión incluyen nuevas entidades patológicas así como variaciones de las ya existentes.

### **I. Astrocitoma pilocítico.**

El astrocitoma pilocítico es el tumor cerebral más frecuente en los niños, con un pico de incidencia alrededor de los 10 años. El astrocitoma pilocítico es una lesión definida, quística, que se expande lentamente y que, muy rara vez, muestra tendencia a progresar hacia la anaplasia y, por lo tanto, se clasifica, según la OMS, como grado I (Kleihues et al. 1993). El astrocitoma pilocítico suele localizarse en estructuras medias tales como el nervio óptico, el tercer ventrículo, el tálamo, el lóbulo medio temporal, el tallo cerebral y el cerebelo. Desde el punto de vista histológico, destaca la presencia de células bipolares, fusiformes o piloides, con una fibrilación densa. Las “fibras de Rosenthal” y los “cuerpos granulares” son marcadores histopatológicos de los astrocitomas pilocíticos.

### **II. Astrocitoma de bajo grado.**

El astrocitoma de bajo grado ocurre principalmente en adultos jóvenes, con un pico de incidencia entre los 40 y los 50 años. Se caracteriza por ser una lesión con márgenes poco definidos, con tendencia a la infiltración y que aparece, principalmente, en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales. Las figuras mitóticas son muy raras o están ausentes. Microscópicamente, el astrocitoma de bajo grado varía desde un tumor bien diferenciado hasta una lesión pleomórfica y los núcleos presentan un aspecto redondo u ovalado.

### III. Astrocitoma anaplásico.

El astrocitoma anaplásico presenta unas características intermedias entre el astrocitoma de bajo grado y el glioblastoma, con respecto a la edad de mayor incidencia y al grado de anormalidad macroscópica (Burger et al. 1985). El astrocitoma anaplásico presenta mayor pleomorfismo que el astrocitoma de bajo grado y las figuras mitóticas están presentes. Otra característica es la atipia nuclear. El astrocitoma anaplásico tiene una rápida tendencia a progresar hacia el GBM.

### IV. Glioblastoma multiforme (GBM).

El GBM es el más común y más maligno de los tumores cerebrales en adultos, constituyendo el 50% de todos los gliomas (Stark et al. 2005). Este tipo de tumores fueron descritos por primera vez por Rudolf Virchow en 1863, recibiendo la denominación de “espongioblastoma”. Posteriormente se cambió el término por el de “glioblastoma”. El término “multiforme” hace referencia a la heterogeneidad celular que presentan. El GBM se localiza, en la mayoría de los casos, en los hemisferios cerebrales, en especial en los lóbulos frontal y temporal. Stark y col. mostraron en un estudio con 267 pacientes adultos con GBM que, en la mayoría de los casos, la localización es multilobular (Stark et al. 2005), en parte debido a la migración de las células tumorales a través de estructuras mielinizadas, principalmente el cuerpo calloso. Los principales síntomas que presentan los pacientes incluyen: dolor de cabeza, cambios en la personalidad y elevada presión intracraneal.

Desde el punto de vista histológico, el GBM presenta una amplia variedad de alteraciones, como son la necrosis, las hemorragias ocasionales, la prominente proliferación vascular, la aparición de células gigantes, el polimorfismo nuclear o la elevada actividad mitótica. Según la clasificación hecha por Scherer en el año 1940, existen dos grandes tipos de GBM: el GBM primario y el GBM secundario (Ohgaki and Kleihues 2007). Aunque morfológica y clínicamente ambos tipos de GBM son indistinguibles (Furnari et al. 2007), en realidad constituyen dos entidades diferenciadas, puesto que afectan a pacientes con diferentes edades, se desarrollan a través de rutas genéticas distintas, presentan diferentes patrones de expresión de proteínas y RNA y sus respuestas a la radio y a la quimioterapia, varían (Ohgaki and Kleihues 2007). En apartados posteriores se explicarán con más detalle las diferencias, a este nivel, que existen entre ambos tipos de GBM.

El GBM primario es mucho más frecuente que el GBM secundario y se caracteriza por la ausencia de un astrocitoma maligno preexistente, es decir, que surge *de novo*. La incidencia es mayor en personas de edad avanzada, concretamente el pico está entre los 60-70 años (Franco-Hernandez et al. 2007), y el tiempo durante el cual progresa y se desarrolla la enfermedad es muy corto, de alrededor de 1 año.

Por el contrario, el GBM secundario se desarrolla más lentamente y lo hace a partir de astrocitomas de menor grado, como el astrocitoma de bajo grado (grado II) o el astrocitoma anaplásico (grado III), que progresan durante un período de unos 4 o 5 años hasta el GBM secundario. El mayor pico de incidencia en estos tumores está en torno a los 40-50 años (Franco-Hernandez et al. 2007).

### 1.1.2. Alteraciones moleculares en los gliomas

El cáncer es una enfermedad genética y algunas de las mejoras más eficaces en el tratamiento de los tumores, observadas en las dos últimas décadas, han sido el resultado de la asociación entre alteraciones genómicas y las terapias dirigidas. Sin embargo, tal éxito todavía no se ha visto en el tratamiento de gliomas.

La acumulación de múltiples mutaciones genéticas en una célula proporciona una ventaja en la supervivencia, relacionada con propiedades que incluyen la proliferación, la evasión de la supresión del crecimiento y la apoptosis (Hanahan and Weinberg 2011). Los estudios actuales se centran en la comprensión de cómo las mutaciones podrían estar implicadas en la génesis del GBM, cuáles son las célula(s) del origen y cuáles podrían ser las causas de la carcinogénesis (Nduom et al. 2012). El proyecto del Atlas del genoma del cáncer, tiene como objetivo acelerar la comprensión de la base molecular de cáncer, a través de la catalogación de los cambios genómicos presentes en más del 3% de los casos. En un informe inicial, se describe que la mayoría de las muestras de GBM contienen alteraciones críticas en tres vías: la vía RB1, eliminando los puntos de control del ciclo celular, la vía TP53, para evadir la apoptosis y la senescencia, y la vías de RTK, relacionada con el aumento de la proliferación (Cancer Genome Atlas Research 2008). La progresión al GMB se suele asociar con la delección o mutación de diversos genes, entre ellos PTEN, p53, EGFR o TGF-beta (Rao and James 2004).

Además de las alteraciones genéticas, las anomalías epigenéticas, como son los cambios en el DNA genómico en los patrones de metilación de citosinas, están asociados con todo tipo de cánceres. Diversos autores sugieren que los cambios epigenéticos están involucrados en las fases tempranas de la tumorigénesis y que predisponen a las células madre a cambios genéticos y epigenéticos que están involucrados en la progresión del tumor (Widschwendter et al. 2007; Zhao et al. 2007). La metilación en el GBM media la inactivación de una amplia variedad de genes asociados con la supresión del tumor, el ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis (para revisión, véase (Martinez and Esteller 2010)).

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNAs no codificadores, con 20-22 nucleótidos, que se describen como reguladores importantes de la expresión de genes. En los últimos años se ha identificado el papel importante de los microRNAs en el desarrollo del



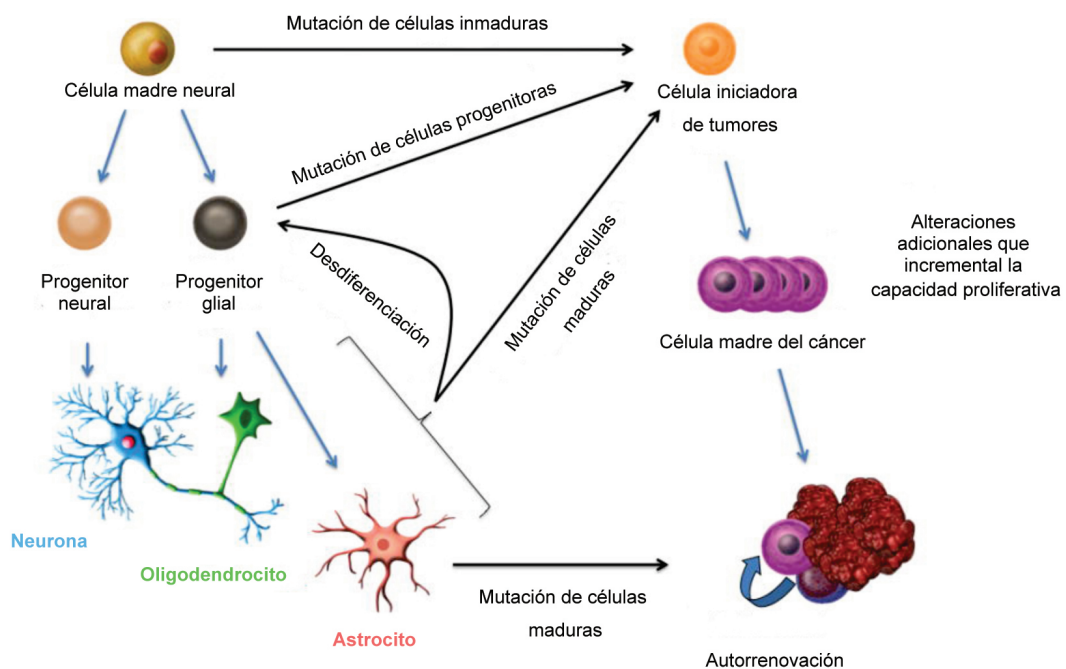
cáncer (Lu et al. 2005). En gliomas, algunos microRNAs se encuentran muy expresados y están involucrados en la proliferación y la migración. El más frecuente es el miR-21, que se encuentra expresado tanto en tejido tumoral de GBM como en líneas celulares de GBM (Chan et al. 2005) y contribuye al fenotipo maligno inhibiendo la expresión de genes involucrados en la apoptosis (Chan et al. 2005). Por el contrario, de otros microRNAs hay niveles muy bajos y normalmente éstos están relacionados con la regulación de las funciones celulares, las cuales no benefician el crecimiento del tumor y la propagación del tumor (para revisión, véase (Chistiakov and Chekhonin 2012; Martinez and Esteller 2010)).

### 1.1.3. Células madre de gliomas

A pesar de las décadas de investigación, un tercio de los pacientes con cáncer mueren a los 5 años del diagnóstico. Por lo tanto, no es de extrañar que aparezcan nuevos conceptos importantes para abordar el tratamiento del cáncer. Uno de esos conceptos es la hipótesis de las células madre de cáncer, la cual sugiere que hay una subpoblación de células en el cáncer con características de células madre, denominadas células madre del cáncer (*cancer stem cells*, CSC). Los datos experimentales muestran que en los gliomas existe esta subpoblación, denominada células madre de glioma (*glioma stem cells*, GSC) o células iniciadoras de glioma (*glioma initiating cells*, GIC) (Gilbertson and Graham 2012).

Hasta hace poco tiempo, la existencia de las células madre del cáncer había sido polémica, pero la hipótesis es extremadamente atractiva, porque proporciona un marco conceptual en el que se podrían construir nuevos enfoques terapéuticos: cualquier fármaco capaz de matar células madre podría ser, en teoría, curativo. Existen tres estudios independientes, en modelos de ratón, de tumores de cerebro (Chen et al. 2012), piel (Driessens et al. 2012) e intestinales (Schepers et al. 2012) que proporcionan evidencias de que las células madre del cáncer sí existen y surgen de nuevo durante la formación de tumores en los órganos intactos.

Las células madre de gliomas, se caracterizan por su alto potencial oncogénico, su resistencia a los tratamientos convencionales, su capacidad de autorrenovación, diferenciación en diferentes tipos celulares y su capacidad de generar neuroesferas. Al tratarse de un área emergente quedan cuestiones por resolver; por ejemplo: no está totalmente aclarado si las células madre de glioma derivan de las células madre neurales o si derivan de células tumorales que han readquirido el fenotipo de célula madre de glioma (Abel et al. 2009; Nduom et al. 2012) (esquema 1). Los últimos trabajos indican que el fenotipo de célula madre puede ser adquirido por otras células del tumor y se sugiere que, a medida que el cáncer progresa, más células adquieren las características de células madre (Dirks 2010).



**Esquema 1. Origen de las células madre de glioma**

Modificado de Nduom (2012)

Además, las GCS han sido aisladas de gliomas humanos usando técnicas pioneras de cultivo celular para el aislamiento de células madre neurales (Galli et al. 2004; Singh et al. 2003). Específicamente, estas células tumorales se han crecido como no adherentes, formando esferas en ausencia de suero y en condiciones definidas con factores de crecimiento. La habilidad para formar esferas o neuroesferas, se ha definido como una propiedad de las células madre neurales y de las GCS.

El uso de esferas para el estudio de las GSC tiene asociados varios problemas. En primer lugar, la eficiencia del aislamiento de las GSC de un tumor es baja (1%-30%) y ha sido atribuida a que las neuroesferas tienen tendencia a sufrir, de forma espontánea, procesos de diferenciación y/o apoptosis durante los pases de estas células (Pollard et al. 2009). El segundo problema es que sólo un pequeño porcentaje de las células dentro de una neuroesfera son verdaderas GSC; la mayoría de las células está parcial o completamente diferenciadas o muertas (Bez et al. 2003). Por último, las exigentes características del crecimiento no adherente de las neuroesferas hacen que las comparaciones de análisis moleculares entre laboratorios sean difíciles, incluso cuando se utilizan las mismas células. Por ello, el grupo de Peter Dirks, pionero en el estudio de las GSC, partiendo de metodología previamente descrita para crecer células madre neurales in vitro, desarrolló un protocolo estándar para que las GSC pudieran crecer como células adherentes en una monocapa. Pollard *et al* (Pollard et al. 2009) comprobaron que estas células mantiene las características

de GSC, como son: la expresión de marcadores de células madre, la capacidad de diferenciarse en astrocitos, neuronas o oligodendrocitos, un genoma que alberga anomalías genéticas similares al tumor parental y la capacidad de formar tumores altamente infiltrantes cuando son trasplantadas a cerebros de ratones inmunodeprimidos (Pollard et al. 2009). Lo más importante es que estos cultivos adherentes son capaces de mantener el fenotipo y genotipo de las GSC a lo largo de los pases de cultivo.

### **1.1.3.1. Marcadores de células madre de gliomas**

Como hemos mencionado anteriormente, la hipótesis de células madre del cáncer propone que hay una subpoblación celular, dentro del tumor, con características de célula madre. Para diferenciar qué células son células madre y cuáles no, se utilizan los diferentes marcadores de células madre. La realidad es que, a día de hoy, se sabe que no hay un solo marcador de célula madre adecuado para identificar todas las poblaciones de las GSC (Venere et al. 2011). A continuación, mencionaremos algunos de los marcadores más característicos de las GSC.

#### **1.1.3.1.1. CD133**

CD133 es una glicoproteína de membrana y es uno de los marcadores más usados de las GSC. Los primeros estudios sobre las GSC lo utilizaban para diferenciar las células madre de las que no lo eran, demostrando que las células CD133+ eran capaces de generar tumores en ratones inmunodeprimidos (Singh et al. 2003). En los últimos años, se ha demostrado que células que no expresaban CD133 eran capaces de generar tumores (Wang et al. 2008). Además, se han observado diferencias de detección de CD133 utilizando diferentes anticuerpos primarios contra este marcador, sugiriendo que las conclusiones basadas en la inmunohistoquímica de CD133 deben realizarse con precaución (Hermansen et al. 2011).

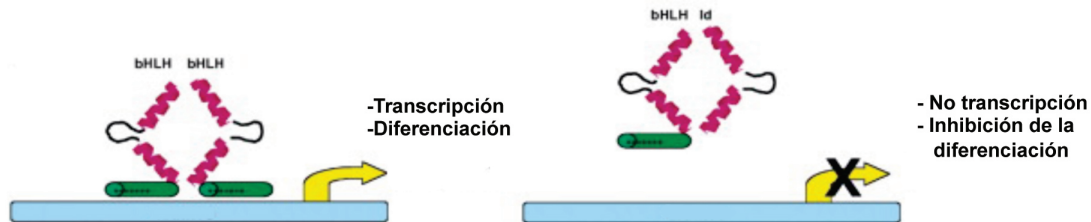
#### **1.1.3.1.2. Sox2**

A favor de la hipótesis de que los gliomas se originan a partir de células madre neurales, está el hecho de que las GSC expresan una serie de moléculas asociadas con el desarrollo de las células madre neurales normales (Galli et al. 2004). Una de ellas, es el factor de transcripción Sox2, que es especialmente interesante debido a su papel en el mantenimiento del crecimiento y autorrenovación de las células madre, tanto embrionarias como adultas (Kim et al. 2008; Masui et al. 2007). Junto con Oct3/4 y Nanog, Sox2 se considera un gen indispensable en la embriogénesis de mamíferos y puede ser parte de una compleja red de factores de transcripción que afectan a la pluripotencia y a la diferenciación de células madre embrionarias (Fong et al. 2008). Estos tres factores se sobreexpresan en diferentes tipos de cancer y están asociados con la progresión maligna del tumor y con un mal pronóstico.

Se ha encontrado expresión de Sox2 en gliomas (Schmitz et al. 2007). De acuerdo con la heterogeneidad de células presentes en el glioma, este tumor contiene células en diferentes estadios de diferenciación, Sox2 se expresa en un porcentaje que varía bastante, en el rango del 6% al 80% (Gangemi et al. 2009; Schmitz et al. 2007). De manera interesante, Gangemi *et al* encontraron que silenciando Sox2 en las GSC se detenía la proliferación y se perdía la tumorigenicidad en estas células (Gangemi et al. 2009).

### 1.1.3.1.3. Id1

Id1 es un regulador de la transcripción, que no tiene sitio de unión a DNA y que se une a factores de transcripción bHLH, implicados en procesos de diferenciación. Id1 se une a estos factores de diferenciación, impidiendo que se dimericen y se unan al DNA; por lo tanto, inhibe la diferenciación (Sikder et al. 2003) (ver esquema 2).



**Esquema 2. Id1**

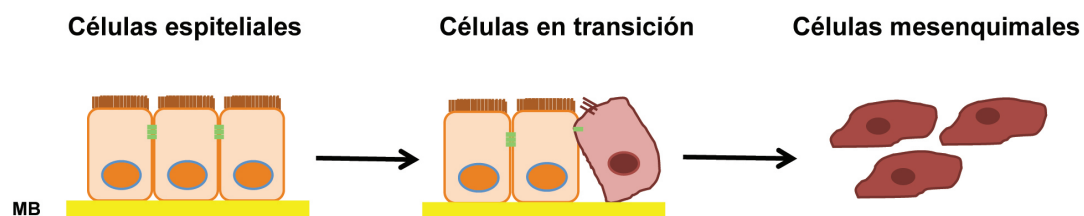
Modificado de Sikder (2009)

Los cuatro miembros de la familia de proteínas Id están implicados en la regulación de diferentes procesos celulares, incluyendo el crecimiento, la senescencia, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis y el desarrollo neoplásico. Se han detectado altos niveles de Id1 en diferentes tipos de tumores agresivos (para revisión, véase (Sikder et al. 2003)) y se ha demostrado que la expresión de Id1 aumenta con la malignidad del tumor cerebral, mientras que no hay expresión de este factor de transcripción en cerebros normales (Soroceanu et al. 2013). Soroceanu *et al* muestran cómo silenciando la expresión de Id1 se reduce la formación de neuroesferas y la expresión del factor de transcripción Sox2, que, como se ha descrito anteriormente, implicado en la autorrenovación de las células madre (Soroceanu et al. 2013). Se ha identificado Id1 como un marcador de las GSC en tumores de pacientes (Anido et al. 2010).

La expresión de Id1 parece estar regulada por la actividad del protooncogen c-Src. Así, se ha demostrado que inhibiendo la actividad de c-Src disminuye la expresión de Id1 en diferentes tipos de cáncer (próstata, pulmón, mama y colon) (Gautschi et al. 2008).

#### 1.1.3.1.4. Marcadores asociados con la transición epitelio-mesénquima:

La transición epitelio-mesénquima es un proceso de reprogramación durante el desarrollo, que permite a las células epiteliales, que de manera normal interactúan con la membrana basal, experimentar diferentes cambios, entre los que se incluyen la pérdida de interacciones célula-célula y de la polaridad ápico-basal, para adoptar un fenotipo mesenquimal, incrementando su capacidad de migración (Kalluri and Neilson 2003) (esquema 3). La transición epitelio-mesénquima se identificó inicialmente en embriones, como un proceso fundamental para la generación de tejidos y órganos. En los últimos 12-15 años, también ha sido reconocida por investigadores de diferentes campos como un proceso clave en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, tales como, el cáncer. La transición epitelio-mesénquima en las células tumorales se ha concebido como una manera de facilitar la cascada metastática en los pasos que requieren la migración activa para la difusión de las células tumorales (para revisión, véase (Nieto and Cano 2012)).



**Esquema 3. Transición epitelio-mesénquima**

La activación de este proceso se lleva a cabo por los llamados factores de transcripción epitelio-mesénquima, entre ellos: Snail, ZEB y factores bHLH (Peinado et al. 2007). En la transición epitelio-mesénquima también es muy característica la pérdida de la proteína E-cadherina (Peinado et al. 2007) o el cambio de isoformas de cadherinas (normalmente E-cadherina por N-cadherina), provocando un profundo efecto en la movilidad celular y el comportamiento invasivo. A veces los niveles de expresión de E-cadherina no cambian significativamente, pero la expresión de N-cadherina se incrementa (Wheelock et al. 2008).

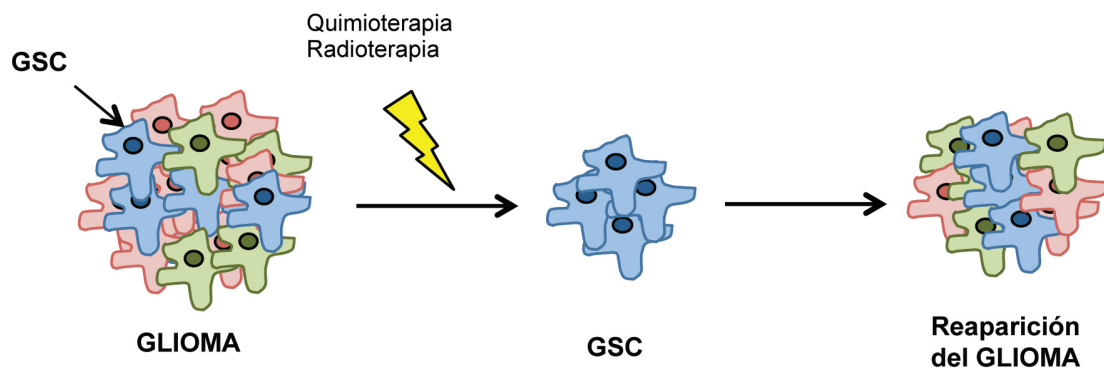
#### 1.1.3.2. Células madre como diana terapéutica

A diferencia de lo que ocurre con otros tipos de tumores, los gliomas se caracterizan por no desarrollar metástasis a larga distancia. El hecho de estar físicamente delimitados por la cavidad craneal hace difícil la diseminación del tumor. Sin embargo y, como ya se ha mencionado previamente, la capacidad de infiltración que presentan los hace muy poco susceptibles de una resección quirúrgica completa. A pesar de ello, sobre todo en los GBM, la cirugía, seguida de sesiones de radioterapia y quimioterapia, sigue siendo hoy en día, en muchos casos, la primera elección en el abordaje terapéutico de los gliomas.

Es de especial interés, en la biología de las GSC, la determinación de las vías que utilizan para mantener su fenotipo. Estas células se consideran las responsables de la resistencia a las terapias actuales, de la recurrencia y de la angiogénesis del tumor (Bao et al. 2006; Singh et al. 2004; Singh et al. 2003). Los mecanismos moleculares que subyacen al mantenimiento de las GSC no se conocen completamente. Por lo tanto, identificar y seleccionar las rutas utilizadas por estas GSC para su autorrenovación y el mantenimiento de su fenotipo, será clave para desarrollar un tratamiento óptimo contra ellas en el futuro. Una de las líneas actuales de actuación sobre las GSC es utilizar inhibidores de los receptores de TGF-beta para disminuir la población de células madre de glioma y su capacidad de iniciar tumores (Anido et al. 2010), debido a que TGF-beta es uno de los factores implicados en la autorenovación de las GSC (Penuelas et al. 2009). Además, TGF-beta juega un papel importante en la transición epitelio-mesénquima (Caja et al. 2011).

En las células madre se expresan genes de resistencia a múltiples fármacos ya que codifican proteínas transportadoras. Entre estos transportadores se encuentra el ABCG2 (*ATP-binding cassette half-transporter*), que es capaz de expulsar de la célula el colorante fluorescente Hoechst 33342. Esta característica permite la separación, mediante citometría de flujo, de las células que no incorporan dicho colorante, denominadas *side-population*, del resto de la población tumoral que sí lo incorpora (Scharenberg et al. 2002) Además, estos transportadores son, en muchos casos, los causantes de la resistencia, debido a que pueden excretar fármacos quimioterapéuticos, como la temozolomida (TMZ) de las GSC (Bleau et al. 2009).

Cheng *et al* han mostrado que, aunque los fármacos anticancerosos actuales pueden acabar con la mayoría de las células no madre, responsables del crecimiento del tumor, las GSC supervivientes puede repoblar el tumor (esquema 4). Por lo tanto, proponen una terapia que afecte tanto a las células que se dividen como a las GSC, para inhibir la progresión del glioma (Chen et al. 2012). Estos autores sugieren que son necesarias dos dianas en el tratamiento con los gliomas, una la masa tumoral y otra las GSC.



Esquema 4. Células madre como diana terapéutica

## 1.2. Comunicación intercelular y proliferación en células gliales.

El sistema nervioso central (SNC) está formado por distintos tipos de células: las neuronas y las células de la glía. Las neuronas son las células responsables de la transmisión de la información, gracias a su capacidad de transmitir el impulso nervioso. Aunque ésta constituye, sin duda, la función más relevante del SNC, las células no neuronales, es decir, las células de la glía, desempeñan también una función muy importante. Las células de la glía son de diferentes clases, distinguiéndose: células ependimarias, células macrogliales y células microgliales. Las células macrogliales se pueden subdividir, a su vez, en dos grupos: astrocitos y oligodendrocitos.

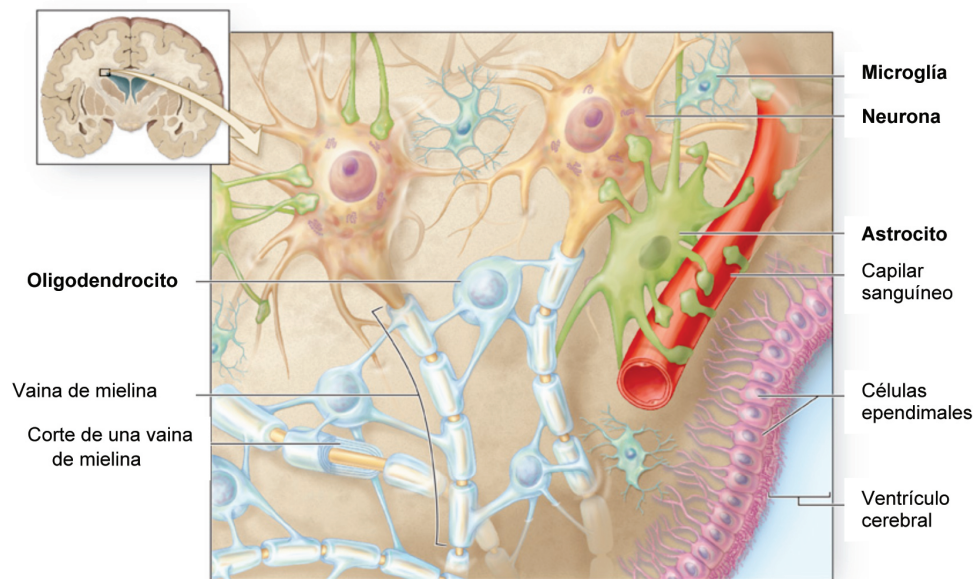
Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC (Esquema 5) y como se ha mencionado en el apartado anterior su malignización da lugar a los gliomas. Ejercen importantes funciones en el cerebro, tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto. Entre estas funciones podemos destacar:

1. Inducción de la barrera hematoencefálica (BHE) (Abbott et al. 2006; Janzer and Raff 1987).
2. Apoyo a la migración y a la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Kosodo and Huttner 2009; Stevens 2008 278).
3. Soporte metabólico a las neuronas (Medina et al. 1999; Pellerin 2003 331).
4. Mantenimiento de la homeostasis iónica neural (Mobbs et al. 1988; Philippi et al. 1996).
5. Recaptación de neurotransmisores (Schousboe and Waagepetersen 2006; Seifert et al. 2006).
6. Función neuromoduladora (Araque 2008).
7. Función neuroprotectora (Vega-Agapito et al. 2002).
8. Función de células madre. (Gritti et al. 2002; Sanai et al. 2004).

Globalmente, podemos considerar la existencia de tres tipos de uniones intercelulares: las uniones estrechas o *tight junctions*, los desmosomas y las uniones comunicantes o *gap junctions*. Las uniones estrechas son regiones diferenciadas de la membrana plasmática que sellan el espacio intercelular. Su función principal es impedir el transporte paracelular. Por otro lado, la adhesión mecánica entre célula y célula se mantiene, fundamentalmente, gracias a los desmosomas, confiriendo así rigidez al tejido.

Las uniones comunicantes son especializaciones de membrana que contienen canales de comunicación intercelular, es decir, que median en el movimiento de iones y moléculas pequeñas entre células. Desde el punto de vista morfológico, la característica que diferencia a

las uniones comunicantes de las uniones estrechas es que las células adyacentes unidas por gap junctions están separadas una distancia de dos o tres nanómetros (Musil et al. 2000).



**Esquema 6. Interacciones entre células gliales y neuronas en el sistema nervioso**

En los mamíferos adultos, las uniones comunicantes se encuentran en casi todos los tipos de células, a excepción de las fibras musculares esqueléticas, ciertas neuronas y las células sanguíneas circulantes (Bennett et al. 1991; Loewenstein 1981). Sin embargo, algunas células sanguíneas pueden expresar proteínas que forman las uniones comunicantes, así como estructuras similares a este tipo de unión intercelular (Beyer and Steinberg 1991).

Los astrocitos se caracterizan por estar ampliamente comunicados por las uniones comunicantes. Para llevar a cabo muchas de las funciones en el SNC, estas células aprovechan su acoplamiento a través de las uniones comunicantes, para ejercerlas de forma cooperativa.

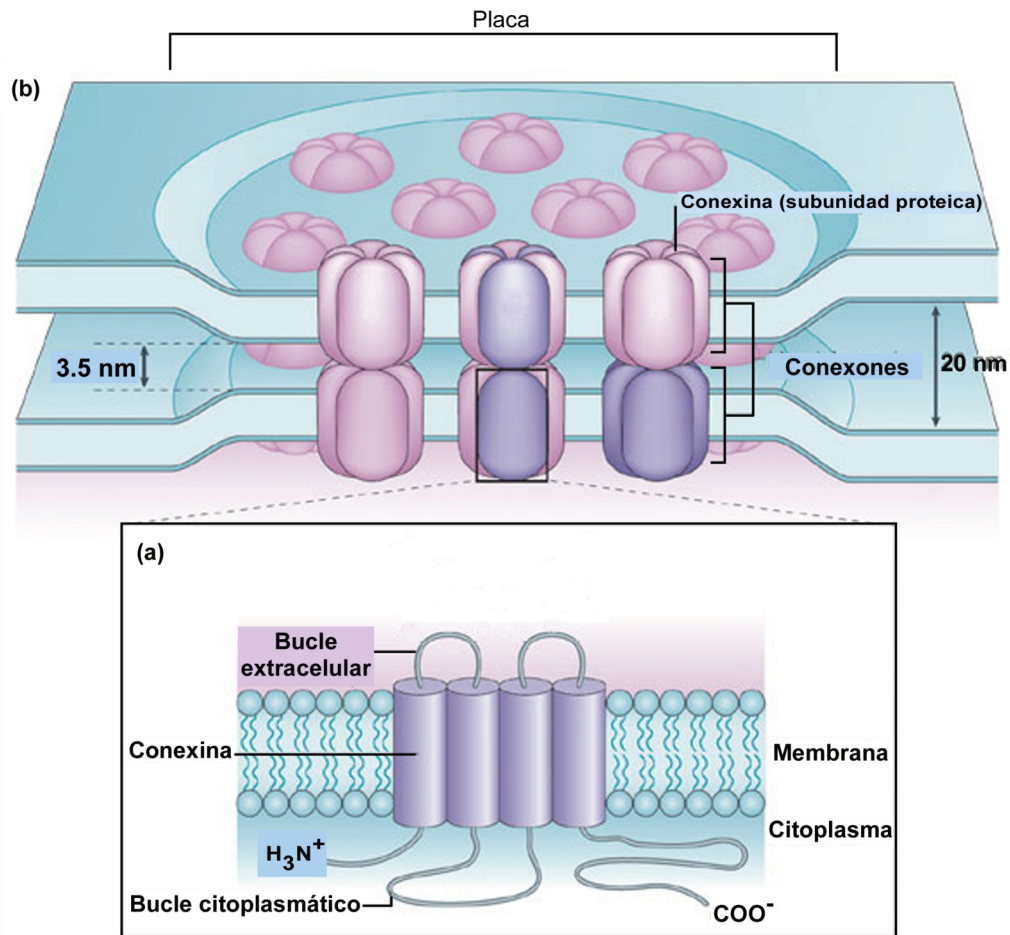
Una de estas funciones es la captación de  $K^+$ , debido a la alta permeabilidad que presentan a este ión (Kuffler et al. 1966) y lo transmiten de unos astrocitos a otros a través de las uniones comunicantes (Gardner-Medwin 1986). En este sentido, Mobbs (Mobbs et al. 1988) puso de manifiesto que el acoplamiento entre astrocitos a través de las uniones comunicantes aumenta su capacidad de amortiguar espacialmente el  $K^+$ . Por lo tanto las uniones comunicantes juegan un papel muy importante en la regulación de los niveles de  $K^+$  en el espacio que rodea a las neuronas para que tengan lugar adecuadamente los potenciales de acción.



Otra de las funciones, en las que las uniones comunicantes participan, es la neuromodulación (Pannasch and Rouach 2013). Los astrocitos presentan una forma de excitabilidad basada directamente en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que es esencialmente independiente del potencial de membrana (Cornell-Bell and Finkbeiner 1991; Cornell-Bell et al. 1990). Así, en los astrocitos se expresan una amplia variedad de receptores funcionales para agentes neuroactivos (Dermietzel et al. 1991b), como el glutamato (Cornell-Bell et al. 1990; Jensen and Chiu 1990) y otros (Salm and McCarthy 1990). Muchos de estos estudios han demostrado que el glutamato y otros neurotransmisores pueden provocar oscilaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que se han denominado ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  se propagan de un astrocito a otro a través de las uniones comunicantes, creando así una forma de excitabilidad basada en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cornell-Bell et al. 1990; Jensen and Chiu 1990). La iniciación y propagación de las “ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ ” comprende una serie de pasos intra e intercelulares, en los cuales la fosfolipasa C, el inositol trisfosfato (IP3), los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y las uniones comunicantes, desempeñan un papel crítico (Venance et al. 1997). Dani y col. (Araque et al. 2002; Dani et al. 1992) han demostrado que las inervaciones aferentes de neuronas glutamatérgicas provocan la aparición de “ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ ” en astrocitos. El hecho de que las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos se puedan propagar por ellos en respuesta a los neurotransmisores liberados durante la sinapsis, indica la existencia de comunicación entre neuronas y astrocitos (Perea y Araque, 2010). Esta propagación podría estar mediada por la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Pannasch and Rouach 2013).

Los astrocitos rodean totalmente, con sus ramificaciones, los capilares cerebrales (ver esquema 5). Por tanto, los sustratos han de atravesar estas terminaciones de astrocitos para acceder al resto del cerebro. Las uniones comunicantes, al permitir el paso de glucosa y otros metabolitos colabora en el transporte de metabolitos entre la sangre y las neuronas contribuyendo a mantener la actividad sináptica (Rouach et al. 2008).

En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la transferencia de los principales metabolitos a través de las uniones comunicantes de astrocitos. Así, la glucosa y su derivado fosforilado glucosa-6-fosfato, son capaces de atravesar las uniones comunicantes de los astrocitos (Tabernero et al. 1996). Además, el lactato, un sustrato esencial para el cerebro en desarrollo (Medina et al. 1992), es capaz de pasar de un astrocito a otro a través de las uniones comunicantes (Tabernero et al. 1996). Por último, el glutamato y la glutamina, implicados en la transferencia de carbonos entre neuronas y astrocitos, pueden difundir también a través de las uniones comunicantes (Giaume et al. 1997). El tráfico de glucosa a través de las uniones comunicantes está regulado por la actividad sináptica glutamatérgica mediada por receptores AMPA. Además, en ausencia de glucosa en el espacio extracelular, los astrocitos obtienen este sustrato para mantener la actividad glutamatérgica, sólo cuando están conectados a través de las uniones comunicantes (Rouach et al. 2008).



**Esquema 6. Estructura de las uniones comunicantes.**

Modificado de Söhl (2005)

### 1.2.1. Estructura de las uniones comunicantes. La conexina-43

La unidad de la unión comunicante es el llamado conexón. El conexón es una estructura proteica que atraviesa la bicapa lipídica de cada una de las dos membranas celulares, así como el espacio que queda entre ellas, permitiendo el contacto del citoplasma de las células adyacentes (esquema 6b). La comunicación intercelular consiste, principalmente, en la transferencia de iones y moléculas de una masa molecular menor de 1,5 KDa (para revisión, véase: (Giaume et al. 1997).

El análisis de difracción de rayos X de las uniones comunicantes aisladas demuestra que cada conexón tiene una estructura en anillo, formado por seis subunidades proteicas, que rodean un canal con características hidrofílicas. En los mamíferos, la proteína que integra las uniones comunicantes se denomina conexina (Cx) y, por el momento, se han caracterizado alrededor de 21 subtipos en la especie humana (para revisión, véase: (Segretain and Falk

2004). En los astrocitos, la principal proteína que forma las uniones comunicantes es la conexina-43 (Cx43) (Dermietzel et al. 1991a), (Giaume et al. 1991). Sin embargo, se ha sugerido que la Cx26, o una proteína con secuencia homóloga, así como la Cx30, pueden coexpresarse y colocarse junto con la Cx43 en algunos astrocitos (Nagy et al. 2001). Además, también se han detectado niveles de Cx40, Cx45 y Cx46 en estas células (para revisión, véase: (Rouach et al. 2002).

Existe una estrecha relación entre la proteína que integra la unión comunicante y sus características electrofisiológicas. Cada tipo de Cx confiere diferente conductancia unitaria y distinta cooperación metabólica a través de las uniones comunicantes. Así, dependiendo del tipo de Cx que forma este tipo de unión intercelular, las uniones comunicantes pueden tener distinta función (Giaume et al. 1991).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de varias Cxs demuestra que presentan cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana, dos dominios citoplasmáticos de las terminaciones amino y carboxilo, dos dominios extracelulares y un bucle citoplasmático (Chaytor et al. 1997; Kumar and Gilula 1996) (Esquema 6a). El dominio carboxilo terminal es bastante variable, posee sitios de fosforilación y es responsable de la regulación de las Cxs (Delmar et al. 2004). El tercer dominio transmembrana contiene una alta proporción de aminoácidos hidrofílicos, quedando éste hacia la luz de la unión comunicante (para revisión, véase (Trosko and Ruch 1998)).

### **1.2.1.2. La conexina y la formación de hemicanales.**

Cuando un conexón, integrado en la membrana celular, no encuentra el conexón de la célula adyacente y no forma una unión comunicante, se denomina hemicanal. Estos hemicanales pueden ser utilizados para fines específicos en algunos tipos de células (Thompson and Macvicar 2008), permitiendo la comunicación entre el citoplasma celular y el medio extracelular, para dar un soporte autocrino y paracrino (Spray et al. 2006). Además, los hemicanales también pueden estar formados por panexinas, otra familia de proteínas de membrana, homólogas a las conexinas (Scemes et al. 2007). Una de las características de las panexinas es que no forman uniones comunicantes (Giaume and Theis 2010; Sosinsky et al. 2011). En los astrocitos los hemicanales pueden contribuir a la liberación de importantes señales neurales como el ATP o el glutamato (Bennett et al. 2012).

### **1.2.2. Síntesis y degradación de las conexinas.**

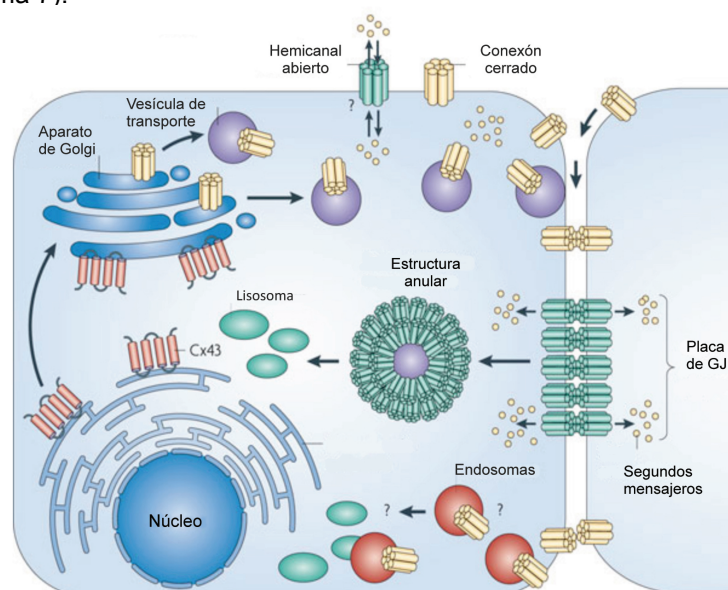
La Cx43 se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, se transporta al aparato de Golgi y, por último, es trasladada a la membrana plasmática (para revisión, véase: (Lampe and

Lau 2000), donde permanece en un estado cerrado hasta la formación de canales que conectan dos células (Vanslyke et al. 2009) para revisión, véase (Trosko and Ruch 1998)

En la actualidad se sabe que la regulación de las conexinas es un proceso complejo, la transcripción de las conexinas está modulada por procesos epigenéticos, tales como modificaciones en las histonas, metilación del DNA y microRNA. Sin embargo, cómo tiene lugar la interacción entre estos mecanismos reguladores, a día de hoy es un punto con muchas preguntas por contestar. El conocimiento de la regulación de la expresión de las conexinas en situaciones fisiológicas y patológicas, podría ayudar en un futuro, a desarrollar terapias en enfermedades cardíacas, cáncer o enfermedades neurológicas (para revisión, véase (Oyamada et al. 2013)).

Una de las características más inusuales de las conexinas es su corta vida media. Al analizar la velocidad de degradación de las proteínas de la superficie celular, se ha observado que la vida media de la mayoría de las proteínas que se localizan en la membrana plasmática excede las 24 horas. Sin embargo, las conexinas tienen una duración de entre 1,5 y 5 horas, incluso después de su incorporación a la estructura de las uniones comunicantes. La inestabilidad de la conexina es especialmente destacable en comparación con la larga vida media de los componentes de las uniones estrechas y de los desmosomas.

Existen dos vías proteolíticas implicadas en el reciclaje de las conexinas. La primera es la degradación en el lisosoma. La segunda vía es el proteosoma, un complejo multicatalítico de proteasas que degrada rápidamente las proteínas en el citosol y que también desempeña un papel importante en la degradación de proteínas de la vía secretora (Laird 2005; Naus and Laird 2010)(Esquema 7).



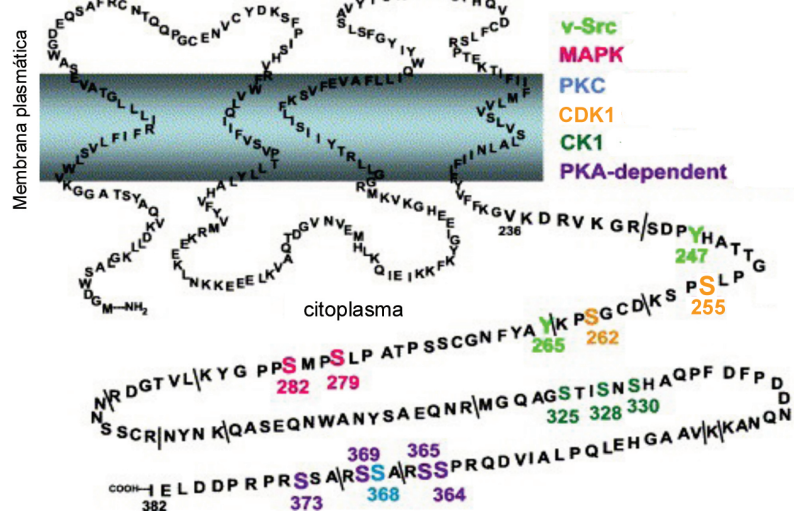
**Esquema 7. Síntesis y degradación de conexina-43**

Modificado Naus and Laird (2010)

Se ha observado que las uniones comunicantes, una vez formadas, no pueden separarse de nuevo en conexiones en condiciones fisiológicas. En estudios de microscopía electrónica se han visto vesículas de doble membrana, semejantes a la estructura de las uniones comunicantes, en el citoplasma de células en cultivo y en tejidos. Posteriormente se ha demostrado que estas estructuras son uniones comunicantes altamente empaquetadas. Esto sugiere que las estructuras anulares proceden de productos internalizados de uniones comunicantes por invaginación y son transportadas al interior del citoplasma para su posterior degradación (para revisión, véase: (Segretain and Falk 2004).

### 1.2.3. Fosforilación de la conexina-43.

La mayoría de las conexinas (Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 y Cx56) son fosforiladas en su extremo carboxilo terminal. Al analizar la Cx43 mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se observa una banda correspondiente a la Cx43 no fosforilada (NP) y, al menos, dos bandas que presentan una velocidad de migración menor, debido a la fosforilación, denominadas comúnmente P1 y P2. Se ha demostrado que, en células transfectadas con la Cx43 sin su extremo carboxilo terminal, ésta no es capaz de formar uniones comunicantes funcionales, sugiriendo que la fosforilación de la Cx43 promueve la formación de las uniones comunicantes. Además, la fosforilación del carboxilo terminal de la Cx43 se ha demostrado que afecta a la comunicación de las *gap junctions*, al ensamblaje y a la degradación de esta proteína (para revisiones, véanse: (Lampe and Lau 2000; Solan and Lampe 2005)).



Esquema 8. Fosforilación de la conexina-43

Modificado de Solan y Lampre (2005)

En el esquema 8 se muestran las quinasas, conocidas hasta el momento, que fosforilan la Cx43 y los diferentes residuos que fosforilan. La activación de la proteína quinasa A (PKA) se ha relacionado con un incremento en el movimiento de la Cx43 en la membrana plasmática para la formación de los conexones. La caseína quinasa 1 (CK1) también parece estar implicada en el ensamblaje de la Cx43 para la formación de los conexones dentro de las uniones comunicantes. Otra quinasa que fosforila la Cx43 es la proteína quinasa C (PKC). Esta quinasa fosforila directamente la Cx43 en los residuos Ser<sup>262</sup> y Ser<sup>368</sup> (Reynhout et al. 1992). Estudios recientes realizados en cardiomiocitos que expresaban Cx43 con una mutación en la Ser<sup>262</sup> (S262A), presentan una disminución en la síntesis de DNA, indicando que el residuo Ser<sup>262</sup> sensible a la fosforilación de la PKC tiene un papel muy importante en la progresión del ciclo celular. La fosforilación en los residuos Ser<sup>279</sup>/Ser<sup>282</sup> debida a la MAP quinasa, tiene un papel importante en la disminución de la comunicación a través de las uniones comunicantes (Warn-Cramer et al. 1996). La tirosina quinasa c-Src también fosforila directamente a la Cx43 en los residuos Tyr<sup>247</sup> y Tyr<sup>265</sup>, disminuyendo la comunicación intercelular (Lin et al. 2001). Por último la quinasa dependiente de la ciclina B (CDK 1) fosforila la Cx43 en la Ser<sup>255</sup> y en la Ser<sup>262</sup>, durante la mitosis, lo que conlleva una fuerte disminución de la comunicación a través de las uniones comunicantes (Cooper and Lampe 2002). La fosforilación y la localización de la Cx43 se encuentran reguladas durante el ciclo celular y pueden ser responsables de los cambios de comunicación (para revisión, véase: (Lampe and Lau 2004; Marquez-Rosado et al. ; Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009)).

### 1.2.4. La conexina-43 en los gliomas.

En los tumores en general y en los gliomas en particular, el nivel de comunicación intercelular se reduce considerablemente comparado con las células sanas. Como se ha comentado, los gliomas son tumores del sistema nervioso, de origen glial y mayoritariamente astrocítico. Constituyen los tumores más abundantes del cerebro y, en términos generales, presentan muy mal pronóstico; además, son extremadamente diversos con respecto a su localización, morfología, diferenciación y respuesta a la terapia (para revisión, véase: (Caskey et al. 2000), (Nduom et al. 2012)).

El grado de malignidad de los gliomas está inversamente relacionado con el nivel de expresión de la Cx43, siendo éste muy bajo en los astrocitomas anaplásicos (grado III) e indetectable en los GBM (grado IV) (Huang et al. 1999) (Soroceanu et al. 2001). Además, se ha determinado la funcionalidad de la comunicación intercelular con marcadores fluorescentes y se ha comprobado que, a medida que aumenta el grado de malignidad de los gliomas disminuye la difusión de moléculas entre células adyacentes (Soroceanu et al. 2001). Por tanto, se sugiere que la pérdida de comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la formación de estos tumores cerebrales malignos (Soroceanu et al. 2001).

#### 1.2.4.1. La conexina-43 como proteína supresora de tumores.

La Cx43 se considera una proteína supresora de tumores porque la restauración de este gen en las células tumorales y, por tanto, el establecimiento de la comunicación intercelular, trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Hirschi et al. 1996; Huang et al. 1998; Mehta et al. 1991; Naus 2002; Zhu et al. 1991). De hecho, cuando las células C6 de glioma de rata se cocultivan con células de esta misma línea transfectadas con el cDNA de la Cx43, se inhibe la proliferación de la línea celular C6. Por consiguiente, Zhu y col (Zhu et al. 1992) sugieren que la inhibición de la proliferación se lleva a cabo por la secreción de factores inhibidores del crecimiento y que en esta secreción están directamente implicadas las uniones comunicantes.

Trabajos recientes de nuestro laboratorio, muestran que la Cx43 impide el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en las células C6 de glioma de rata (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Así, la Cx43 modifica la expresión de varios genes implicados en la regulación del ciclo celular, como p21 y p27, dos inhibidores de kinasas dependientes de ciclina (Koffler et al. 2000; Zhang et al. 2001). El aumento de p27 se debe a una reducción de su degradación mediada por skp2 (Zhang et al. 2003), una proteína que regula la ubiquitinación de p27.

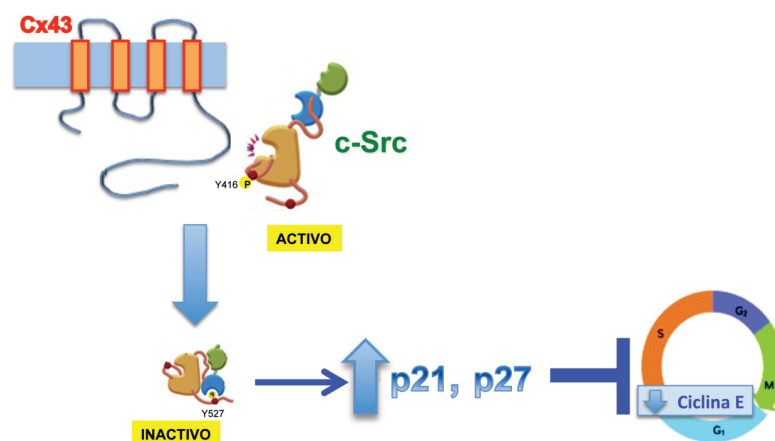
Los mecanismos que explican la acción de la Cx43 como proteína supresora de tumores son variados, según los diversos autores. Así, algunos autores han observado que el efecto antiproliferativo de la Cx43 está relacionado con su capacidad para aumentar la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* (Loewenstein 1992; Mehta et al. 1986). En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que la tolbutamida y el cAMP aumentan la expresión de la Cx43 y la comunicación intercelular en la línea C6 de glioma de rata, lo cual viene acompañado de una disminución en la proliferación de estas células tumorales (Sánchez-Alvarez et al. 2001). Además, como consecuencia del aumento de la expresión de la Cx43, se produce una disminución de la Ki-67, una proteína presente en todas las fases activas del ciclo celular, indicando una reducción de la proliferación en estas células de glioma (Sanchez-Alvarez et al. 2006). En este sentido, las uniones comunicantes se pueden usar como conductos para el paso de tratamientos antitumorales e incrementar la muerte celular (Mesnil and Yamasaki 2000; Paino et al. 2010).

Por otro lado, hay autores que consideran que el efecto antiproliferativo es independiente de la comunicación (Dang et al. 2006; Huang et al. 1998; Jiang and Gu 2005; Moorby and Patel 2001; Zhang et al. 2003). En este sentido, la Cx43 se ha caracterizado por la abundancia de residuos fosforilables (Moorby and Patel 2001) y varios dominios específicos de interacción con otras proteínas (Giepmans et al. 2001b; Schubert et al. 2002), entre las que cabe destacar la ZO-1 (zona occludens-1) (Toyofuku et al. 1998) y la proteína tirosina kinasa c-Src (Giepmans et al. 2001a). Al respecto, se ha descrito que el dominio carboxilo terminal de la

## Introducción

Cx43 desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular (Moorby and Patel 2001). Este efecto se podría llevar a cabo a través de interacciones con c-Src o con ZO-1, puesto que ambas proteínas están implicadas en la regulación de la proliferación celular. Por otro lado, la interacción de la Cx43 con ZO-1, a través de los dominios PDZ, podría ralentizar la proliferación, puesto que el dominio PDZ de ZO-1 libre en el citoplasma induce la malignización celular (Reichert et al. 2000). Otra de las proteínas que interacciona con la Cx43, es CCN3 (NOV, *Nephroblastoma overexpressed*), una proteína de la familia CCN, con efecto antiproliferativo. Así, se ha observado que la Cx43 aumenta los niveles de expresión de CCN3, la cual, además, es capaz de unirse al extremo carboxilo terminal de la Cx43 (Fu et al. 2004; Gellhaus et al. 2004).

En cuanto a la vía de señalización por la que la Cx43 logra modificar la expresión de los genes reguladores del ciclo celular, los resultados de nuestro laboratorio indican que la interacción del extremo carboxilo terminal citoplasmático de la Cx43 con c-Src desencadena este efecto. Cuando c-Src está en su forma activa, fosforila los residuos Tyr247 y Tyr265 de la Cx43, provocando una inhibición de la comunicación intercelular (Giepmans et al. 2001a; Lampe and Lau 2004; Lin et al. 2001). Esta interacción entre Cx43 y c-Src disminuye la alta actividad del oncogén c-Src en las células de glioma C6. Además, Herrero-Gonzalez *et al* observaron que cuando se disminuía la actividad de c-Src, aumentaba la expresión de p27 y p21. Los inhibidores, p21 y p27, provocan la reducción de la fosforilación del retinoblastoma y, como consecuencia, la reducción de la expresión de la ciclina E, responsable del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. El mutante de Cx43 en Tyr247 y Tyr265, los residuos que fosforila c-Src, carece de actividad sobre la proliferación y sobre la expresión de estos reguladores del ciclo celular (Herrero-Gonzalez et al. 2010). El modelo propuesto se resume en el siguiente esquema (esquema 9):



**Esquema 9. Mecanismo propuesto de parada del ciclo celular, promovido por la conexina-43**

Estudios recientes han demostrado que restaurando los niveles de Cx43 se revierte el fenotipo de célula madre de glioma y, consecuentemente, se reduce la tumorigenicidad de



estas células (Yu et al. 2012). En este sentido, Yu *et al* han demostrado que transfectando Cx43 en células madre de glioma, obtenidas de la línea celular U87 y cultivadas en medio que contiene suero, se reduce la expresión de marcadores de células madre, como Sox2, y aumenta la expresión de E-cadherina (Yu et al. 2012). Como consecuencia, estas células originan menos tumor que las células madre de glioma sin Cx43.

### **1.2.4.2. Implicación de la conexina-43 en la migración, adhesión e invasión de los gliomas**

Una característica fundamental que presentan los gliomas, responsable, en gran parte, del fallo de los tratamientos que se aplican actualmente, es la recurrencia. Las células que constituyen la masa tumoral en los gliomas tienen gran capacidad para migrar e invadir el parénquima cerebral sano, dando lugar a tumores con bordes difusos, difíciles de reseccionar quirúrgicamente. Los componentes que participan en los procesos de migración e invasión en los gliomas son variados. Así, se ha observado la participación de proteínas de matriz extracelular, como la vitronectina (Gladson and Cheresch 1991) y de moléculas de superficie, como las integrinas (D'Abaco and Kaye 2007) .

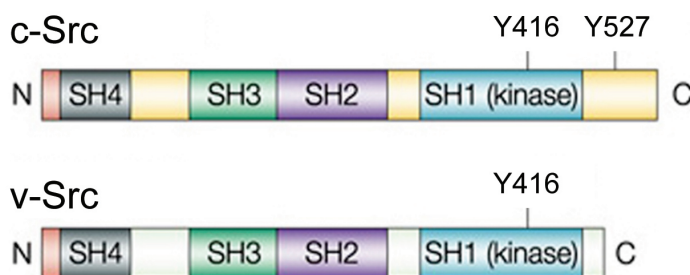
Junto con su función en la comunicación celular, las conexinas tienen también un papel en la morfología celular, la polaridad y cambios en el citoesqueleto que afectan al movimiento celular. La Cx43, una de las primeras conexinas en ser identificadas, es la única que posee un largo extremo carboxilo terminal con múltiples sitios de interacción con otras proteínas, siendo esto importante para su participación en interacciones y señalización intracelular (para revisión, véase (Matsuuchi and Naus 2013; Naus and Laird 2010).

Aunque el mecanismo que relaciona la migración celular y la Cx43 no está todavía descrito, se ha demostrado que la Cx43 afecta al citoesqueleto (Olk et al. 2010), supuestamente a través de las interacciones con actina a través de la ZO-1 (Laird 2010) y mediando la adhesión intercelular (Elias et al. 2007; Lin et al. 2002). Según Lin *et al* (Lin et al. 2002) la sobreexpresión de la Cx43 en células C6 de glioma de rata está relacionada con el incremento de su capacidad de adhesión célula a célula y, por lo tanto, de migración. Además, el intercambio a través de las uniones comunicantes, de metabolitos como la glucosa o el ATP, con los astrocitos, proporcionaría una mayor energía para la dispersión de las células de glioma (Lin et al. 2002). La cooperación entre los astrocitos y las células de glioma se establece a través de las *gap junctions*, puesto que la carbenexolona (Inhibidor de las gap junctions) inhibe los procesos de migración (Oliveira et al. 2005). Por otro lado, también se ha descrito la relación inversa entre la capacidad para establecer uniones comunicantes y la capacidad de migración. De esta forma, se ha observado que la capacidad de una célula de glioma para migrar más allá de la masa tumoral es directamente proporcional a su capacidad para romper la comunicación intercelular con las células tumorales vecinas (McDonough et al. 1999).

### 1.3. Actividad oncogénica de c-Src

La proteína kinasa c-Src forma parte de una gran familia de proteínas tirosina kinasas (PTK) no receptoras, asociadas a membrana, de las cuales se han identificado 9 tipos. La principal función de las PTK es la regulación de vías de señalización intracelular. Las PTK catalizan la transferencia de un fosfato desde el ATP a residuos de tirosina de diferentes proteínas intracelulares. Estas kinasas tienen un segmento homólogo que se ha denominado SH (de c-Src homólogo). El extremo amino terminal de c-Src tiene una región, denominada SH4, que contiene la región de miristilación, necesaria para la asociación de c-Src con la membrana celular. A continuación se encuentran las regiones SH3, SH2 y la región catalítica SH1, seguida del extremo carboxilo terminal, que incluye un residuo de tirosina (Y527) que se fosforila inactivando c-Src. La región catalítica SH1 contiene el sitio de autofosforilación Y416, clave en la actividad de c-Src. Las regiones SH2 y SH3 permiten las interacciones proteína-proteína en las cascadas de señalización celular (Xu et al. 1997; Yeatman 2004) (esquema 10).

La proteína kinasa v-Src fue el primer retrovirus oncogénico identificado. v-Src difiere de c-Src en una sustitución de la secuencia en el carboxilo terminal, resultando en una pérdida de aminoácidos, como la tirosina 527 (Y527), que cuando se fosforila se une a los dominios SH2 y estabiliza la conformación cerrada o inactiva de la molécula (Esquema 10). Es decir, v-Src siempre se encuentra activo, mientras que c-Src tiene regulada su actividad.



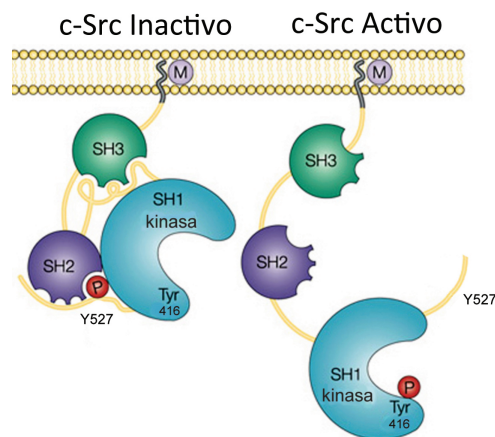
**Esquema 10. Dominios estructurales de c-Src y v-Src**

Modificado de Yeatman (2004)

La tirosina kinasa c-Src, junto con Fyn, Lyn, Yes, Hck, y Blk, pertenece a la familia de las kinasas Src, todas ellas importantes en el fenotipo tumoral (Brown and Cooper 1996). En gliomas, Fyn, c-Src y Yes se sobreexpresan, siendo Fyn y c-Src efectores de la actividad oncogénica del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Lu et al. 2009). La proteína kinasa c-Src está involucrada en diferentes funciones, incluyendo adhesión, crecimiento, movimiento y diferenciación. En condiciones normales, la forma predominante de c-Src en las células es la inactiva, activándose de manera específica en respuesta a diferentes efectores. La actividad de

c-Src puede alterarse por mutaciones en ella misma o mutaciones en las proteínas que regula. Se ha demostrado que hay una elevada actividad de c-Src en tumores en general y en glioblastomas en particular (Du et al. 2009). El aumento de la actividad de c-Src en glioblastomas no se debe, en general, a la amplificación o mutación del gen, porque en el “*Cancer Genome Atlas Research*” no se encontraron cambios en la expresión de mRNA ni mutaciones en c-Src en glioblastomas (Cancer Genome Atlas Research 2008). En células madre se ha observado que la actividad de c-Src es necesaria para la autorrenovación y la diferenciación (Anneren et al. 2004; Singh et al. 2012).

Una óptima actividad de c-Src requiere la autofosforilación de la tirosina 416 (Y416). Estudios de cristalografía y determinación de la estructura revelan que la actividad de esta proteína, además de estar regulada por autofosforilación, está regulada por interacciones intramoleculares. La fosforilación en Y527, próxima al carboxilo terminal, permite la interacción de este extremo de la proteína con la región SH2 y pasar a la conformación cerrada o inactiva (Esquema 11). La fosforilación de Y527 es debida a otra tirosina kinasa llamada Csk. La desfosforilación de Y527 por tirosinas fosfatasas, la delección o la mutación de Y527 o el desplazamiento de SH2 y SH3 por interacciones intramoleculares o con ligandos de alta afinidad, conlleva también a la activación de c-Src en células tumorales (Frame 2002 114; Xu et al. 1997). Csk recluta tirosina fosfatasas para retirar la fosforilación de la Tyr416; entre ellas se encuentra PTEN, una de las proteínas más frecuentemente alterada en los gliomas (Sansal and Sellers 2004).



**Esquema 11. Regulación de la actividad de c-Src**  
Modificado de Yeatman (2004)

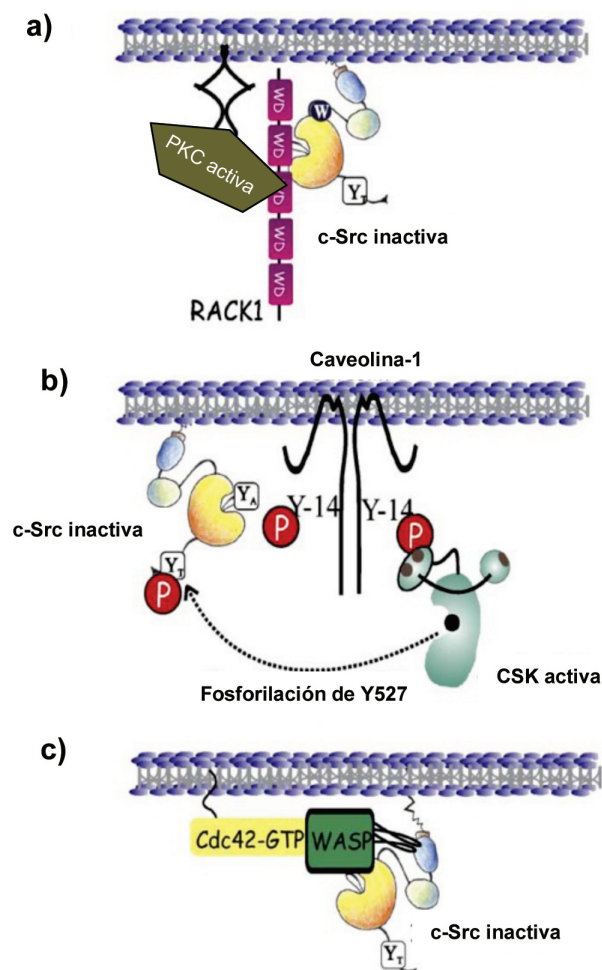
La actividad de c-Src también se regula mediante interacciones con moléculas endógenas o moléculas “no endógenas”. Entre las moléculas endógenas se encuentran RACK1, la caveolina-1, WASP y como se describirá en el apartado 1.3.3. la Cx43. RACK1 es un receptor intracelular para la PKC activa. Se ha demostrado que RACK1 también interacciona con c-Src, además de con la PKC. Así, estudios realizados con fibroblastos en los

## Introducción

que se sobreexpresó RACK1 revelan que esta proteína inhibe la actividad de c-Src y, como consecuencia, disminuye la expresión de la ciclina D1 y la actividad de CDK4 y CDK2, aumentando la expresión de p27 y la actividad del pRb, que mantiene secuestrado E2F, lo que conlleva el retraso de la transición de la fase G1 a S (Mamidipudi et al. 2004); para revisión, véase: (Chong et al. 2005)) (Esquema 12a).

Las caveolinas son unas proteínas integrantes de la membrana plasmática. El segmento citosólico próximo a la membrana plasmática de la caveolina-1 interacciona con c-Src. Al sobreexpresar caveolina-1 y c-Src en células HEK293T, estas dos proteínas forman complejos estables y disminuyen la actividad de c-Src mediante el reclutamiento de Csk (Li et al. 1996); para revisión, véase: (Chong et al. 2005)) (Esquema 12b).

WASP es una proteína involucrada en la regulación del citoesqueleto. WASP disminuye la actividad de c-Src, mediante la unión de una región rica en prolinas a la región SH3 de c-Src y mediante una región inhibidora del dominio catalítico de c-Src (Schulte and Sefton 2003); para revisión véase: (Chong et al. 2005) (Esquema 12c).



**Esquema 12. Regulación de la actividad de c-Src mediante la interacción con RACK 1, caveolina-1 y WASP.**

Modificado de Chong (2005)

### 1.3.1. Inhibidores de la actividad de c-Src en el cáncer.

Un gran número de estudios han identificado, definitivamente, a c-Src como una molécula clave en la progresión tumoral, ya que puede proporcionar señales oncogénicas para la supervivencia de las células tumorales, la mitogénesis, la transición epitelio-mesénquima, la invasión, la angiogénesis y la metástasis (Sgroi 2009; Summy and Gallick 2003). c-Src es un componente crítico en la base de múltiples eventos bioquímicos y en la progresión maligna del tumor. Además, participa en la autorrenovación de las células madre tumorales (Singh et al. 2012). Por todo esto se está convirtiendo en una posible diana molecular para la terapia contra el cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de c-Src en células cancerosas resulta en la regulación positiva de E-cadherina, mejora de la adherencia entre células y reduce la tasa de metástasis (Nam et al. 2002).

Hay una serie de moléculas no endógenas que regulan la actividad de la c-Src, entre las que se encuentran PP2, sacaratinib, SU6656 o el dasatinib. PP2 es un compuesto pirazolo-pirimidil-amino, ampliamente utilizado como inhibidor de c-Src para estudiar las vías de señalización celular de esta proteína. Este compuesto bloquea los sitios de unión para el ATP de c-Src (para revisión, véase (Chong et al. 2005)). El dasatinib es un inhibidor de la actividad de c-Src y otras tirosina kinasas que disminuye la proliferación e induce la apoptosis, además de inhibir la migración de las GSC (Du et al. 2009). El dasatinib está siendo utilizado en ensayos preclínicos. Algo a destacar de este inhibidor de la actividad de c-Src es que atraviesa la barrera hematoencefálica (Porkka et al. 2008). Además de como monoterapia, también se está utilizando combinado con otros agentes o con radioterapia (para revisión, véase (Ahluwalia et al. 2010)).

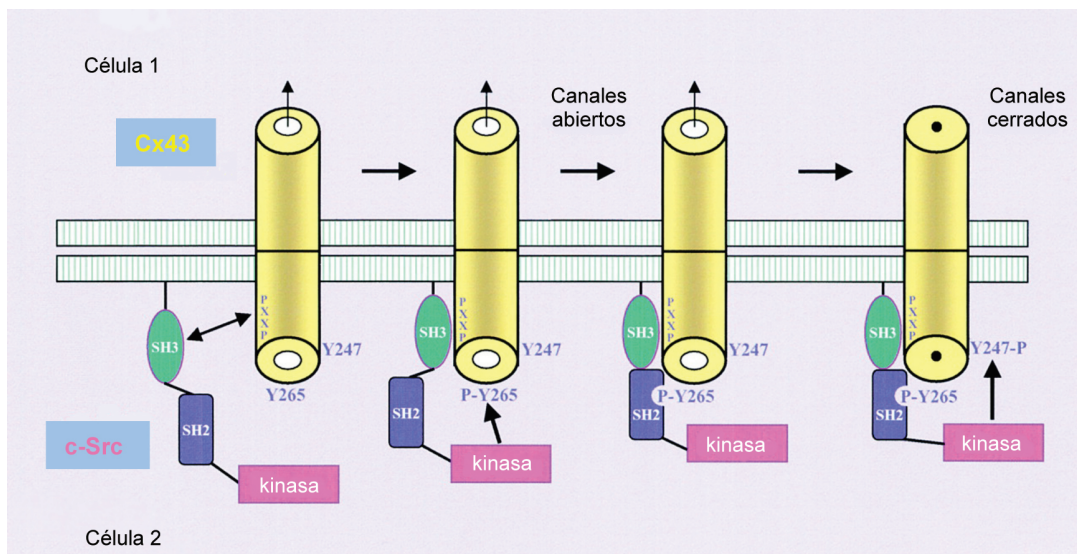
### 1.3.3. Relación entre conexina-43 y c-Src

Numerosos estudios muestran que Src, la forma activa de c-Src, fosforila la Cx43 en residuos de tirosina, lo que conlleva una inhibición de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Crow et al. 1990; Giepmans et al. 2001a; Kurata and Lau 1994; Lin et al. 2001; Swenson et al. 1990) (Esquema 13). v-Src fosforila directamente la Cx43, tanto *in vitro* como *in vivo* (Loo et al. 1995), en el residuo de tirosina 265 (Y265) del extremo carboxilo terminal de la Cx43 (Kanemitsu et al. 1997). La transfección de diferentes líneas celulares con la Cx43 en la que se había mutado Y265 por una fenilalanina, muestra que c-Src, también fosforila la Cx43 en Y247 (Giepmans et al. 2001a). Estudios más recientes no sólo confirman que v-Src fosforila a la Cx43 en Y265, si no que, posteriormente, también fosforila la tirosina 247 (Y247). Así, la fosforilación de Y265 no es suficiente para cerrar los canales de las uniones comunicantes y necesita una segunda fosforilación en Y247 para el cierre de estos canales. En esta interacción participan las regiones SH2 y SH3 de v-Src y una región rica en prolinas de la Cx43. Para ello, el dominio SH3 de v-Src interacciona, inicialmente, con la región rica en

prolinas de la Cx43, consiguiendo la proximidad necesaria para la fosforilación de Y265 e Y247 de la Cx43 por el dominio kinasa de v-Src. Estos datos sugieren que la fosforilación en Y265 es necesaria para la interacción entre v-Src y la Cx43 y que la fosforilación en Y247 se requiere para el cierre de las uniones comunicantes (para revisión, véase: (Lampe and Lau 2004) (esquema12).

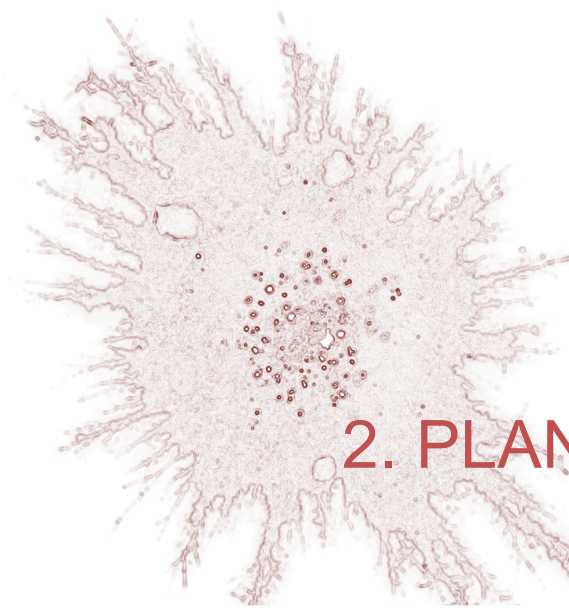
Recientemente en nuestro grupo, se ha descrito que la interacción entre la Cx43 y c-Src disminuye la alta actividad oncogénica de c-Src en las células C6 de glioma de rata. Tanto es así que el mutante de Cx43 en Tyr247 y Tyr265 (residuos que fosforila c-Src), carece de actividad sobre la proliferación y sobre la expresión de los reguladores del ciclo celular. Estos resultados indican que, al actuar como sustrato de c-Src, la Cx43 reduce la actividad onogénica de c-Src y, por tanto, la proliferación de las células de glioma C6 (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Aunque sabemos que los residuos Tyr247 y Tyr265, localizados en el extremo carboxilo terminal de la Cx43, están implicados en la inhibición de c-Src, desconocemos qué parte de la proteína es necesaria para llevar a cabo este efecto. En este sentido, trabajos previos han demostrado que el extremo carboxilo terminal de la Cx43 es suficiente para reducir la proliferación de las células de glioma (Dang et al. 2003).

Estudios realizados en miocitos por Toyofuku y col. sugieren que la región SH2 de c-Src compite con ZO-1, una proteína componente de las *tight junctions*, en la interacción con la Cx43. Así, cuando c-Src fosforila a la Cx43 disminuye la comunicación intercelular y la interacción de la Cx43 con ZO-1 (Gilleron et al. 2008; Lampe and Lau 2004 1171; Toyofuku et al. 2001). Por tanto, la interacción de la Cx43 con c-Src podría afectar a la interacción de otros efectores.



**Esquema 13. Regulación de las uniones comunicantes mediante la interacción con c-Src.**

Modificado de Warn-Cramer y Lau (2004)



## 2. PLAN DE TRABAJO

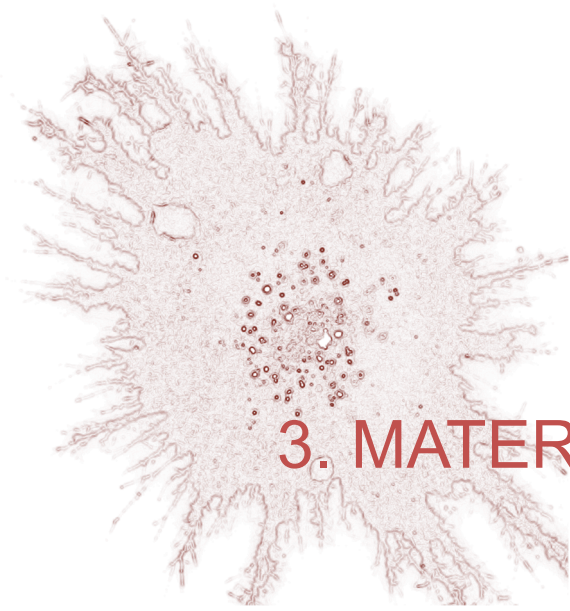




Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la Introducción y con el objeto de conocer el papel de la conexina-43 como modulador de c-Src en células madre de glioma, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

- 1- Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en los astrocitos reactivos con baja conexina-43 tras la lesión neuronal por excitotoxicidad.
- 2- Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en células de glioma humano, incluyendo las células madre de glioma.
- 3- Estudio de los cambios en el fenotipo de célula madre de glioma tras la restauración de la conexina-43.
- 4- Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina-43 en la reversión del fenotipo de célula madre de glioma.





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. Material

#### 3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario y líneas celulares utilizadas.

Se emplearon ratones C57BL6 de 6-7 semanas para realizar las lesiones. Los experimentos con estos animales se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Christian Giaume, en el Collège de France, París, Francia, de acuerdo con la normativa europea vigente para el uso de animales de experimentación, 24 de Noviembre 1986 (86/609/EEC).

Se empleó la línea celular de glioma de rata C6, proporcionada por el Prof. Christian Giaume del Collège de France, París, Francia. Es una línea celular con características de glioblastoma multiforme (grado IV) (Auer et al. 1981).

Se emplearon células C6-Cx43 y C6-Ct, son células transfectadas establemente con los plásmidos que contienen Cx43 y el carboxilo terminal de la Cx43, respectivamente y fueron realizadas por la Dra. Sandra Herrero (Herrero-Gonzalez et al. 2010)

Se empleó la línea celular de glioma humano U373 MG (U373), proporcionada por el Prof. Dr. Fernando Valdivieso del Instituto de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid. Está línea está clasificada como astrocitoma-glioblastoma grado III (Gonzalez-Aguero et al. 2007).

Se empleó la línea celular de glioma humano T98-G, que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC) y que está clasificada por ésta como glioblastoma multiforme (grado IV).

Se empleó la línea celular de glioma humano SW1088 (HTB12), que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC) que está clasificada por ésta como astrocitoma (grado III).

Se empleó la línea celular de glioma humano Hs686 (HTB138), que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC). Según la casa comercial, esta línea no resulta tumorigénica en ratones inmunodeprimidos pero sí lo es en medio semisólido. Según diversos autores está clasificada como glioma de bajo grado (grado II) (Konduri et al. 2003; Rao et al. 2001).

Las líneas de células madre de gliomas G166, G179, G144, GliNS2, fueron suministradas por la casa comercial Biorep (Italia) (Pollard et al. 2009).

Las muestras de proteínas de gliomas humanos, OB1 y TG10 fueron proporcionadas por el Dr. Hervé Chneiweiss, Centro de Psiquiatría y Neurociencias, París, Francia. Estas células procedían de un oligoastrocitoma grado III (OB1) y un glioblastoma multiforme (TG10) (Silvestre et al. 2011).

### 3.1.2. Medios instrumentales

- El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo Milli-Q<sup>R</sup> Integral 3 System (Millipore Ibérica, Madrid, España), con dispensadores y filtros de agua Ellix (agua purificada tipo II) y agua Milli-Q (agua ultrapura tipo I).
- Las pesadas se realizaron en balanzas, granatarias (Sartorius, modelo 1216MP, GMBH, Göttingern, Alemania) o analíticas (Acculab, modelo Atilon ATL-224-I; Sartorius modelo 1207 MP, GMBH, Alemania).
- El pH se determinó con un medidor de protones, marca Crison (Selecta, Barcelona, España) y otro medidor marca Hach modelo HQ440d (Hach Lange GMBH, Düsseldorf, Alemania).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, U.S.A.) modelo J2-21M, una centrifuga Beckman de mesa modelo TJ-6, una centrifuga Eppendorf, modelo 5414R, modelo 5702 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- La cabina de flujo laminar utilizada es un modelo TC 48 (Gelaire Flow Laboratories, McLean, U.S.A) y una modelo CULTair BC100 (Cultek, S.L.U., Madrid, España).
- Los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro modelo 595-4520 de la casa Nalgene (adquiridos a VWR, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España). Para pequeños volúmenes de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (Acrodisc, Pall Gelman Laboratory, Michigan, U.S.A).
- Los medios de cultivo y soluciones de cultivos fueron calentadas en un baño termostático a 37°C; modelo Precistern y modelo Precisdig (Selecta). Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se ha utilizado un baño modelo Haake Fisons GH con termostato acoplado, modelo Haake Fisons D8 (Haake, Berlín, Alemania) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).
- El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa marca Selecta (modelo S-20), termostaticada a 170°C.
- El agua y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterilizaron por medio de calor húmedo en un autoclave Selecta modelo 437 o modelo Autester ST.
- Las células se mantuvieron en cultivo en el incubador de CO<sub>2</sub> modelo Galaxy S y Galaxy 170 (RS Biotech, Northants, Reino Unido).
- Se utilizaron botellas de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono suministradas por la Sociedad Castellana de Oxígeno (Valladolid, España).

- El conteo de las células previo a la siembra en placas se realizó en una cámara cuenta-globulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) o mediante un dispositivo automático Countess (Invitrogen, Life Technologies), en el que se ha adaptado un protocolo para el diámetro y forma celular de las diferentes líneas celulares.
- Para la realización de las agitaciones mecánicas, se emplearon dispositivos tipo vórtex, modelos MS-1 minishaker (IKA-Works Inc, USA).
- Las células se observaron periódicamente con un microscopio de contraste de fases, modelo Nikon TS100 (Nikon, China).
- Se empleó un microscopio de fluorescencia invertido modelo Nikon Eclipse TS2000 (Nikon, China), captándose las imágenes con un programa informático TCS-SP (Leica Microscopy Systems) y una cámara de video digital modelo Leica DC 350F (Leica Microsystems).
- Se empleó un nanofotómetro de la casa comercial IMPLEM (BioNova, Munich, Alemania), para medidas en pequeños volúmenes. También se utilizó un fluorímetro modelo Qubit Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) para la cuantificación de proteínas y mRNA.
- Para la sonicación de las muestras empleadas en la transferencia tipo Western se utilizó un baño de sonicación modelo Bandelin Sonorex (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, Alemania).
- Para los análisis de transferencia tipo Western se utilizó un sistema de electroforesis vertical y un sistema de electrotransferencia modelo "Mini-Trans-Blot Transfer Cell" conectado a una fuente de alimentación modelo "PowerPac 300" de Bio-Rad (Hercules, U.S.A.). En la utilización de los geles "pre-cast" se empleó un sistema similar al anterior pero adaptado al tamaño de los geles, modelo "X-Cell4 Surelock Midi-Cell" (Invitrogen, Life Technologies).
- Las membranas utilizadas fueron de PVDF (Millipore Iberica, Thermo Fischer). La transferencia de geles realizada en el dispositivo iBlot (Invitrogen, Life Technologies), en cuyo caso se emplearon "iBlot Gel Transfer Stacks" con membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, Life Technologies).
- Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un "Navigator" (Fredericton, Canada).
- El revelado de las películas de autorradiografía (Fujifilm) se llevó a cabo manualmente, con líquidos de la marca Fujifilm, "X-Fix-Fixer & Replenisher, y Anatomix Developer Replenisher" (FujiHunt-Fujifilm, Europe WV, Bélgica).
- El programa de análisis de imagen utilizado fue ImageJ, desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación del National Institutes of Health (Bethesda, USA).
- Para llevar a cabo la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT y PCR, respectivamente) se utilizó un termociclador modelo GeneCycler (Bio-Rad).
- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel 2000 asociado a una cabina "Universal Hood II" (Bio-Rad). En la utilización de los

geles “pre-cast” se empleó un sistema “E-Gel iBase Power System” acoplado a un transiluminador a tiempo real “E-Gel Safe Imager” (Invitrogen, Life Technologies).

- Para la electroporación se empleó el sistema de electroporación Neon (Invitrogen, Life Technologies).
- La secuenciación del inserto correspondiente al cDNA de la conexina-43 se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España).
- Para la realización del ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se utilizó un fotómetro de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EEUU) y un fotómetro de microplacas Appliskan (Thermo Electro Corporation).

### 3.1.3. Productos

Los productos utilizados en la preparación de disoluciones y tampones que no se detallan a continuación, fueron adquiridos en las casas comerciales Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) o Merck (Darmstadt, Alemania).

#### 3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares de las líneas celulares C6, HTB12, HTB138, U373 y T98-G.

- El medio de cultivo de líneas celulares procedía de la casa Sigma y es del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).
- El suero fetal bovino (FBS) procedía de la casa Gibco (Life Technologies).
- La tripsina procedía de la casa Gibco (Life Technologies).
- La penicilina G, (P3032), la estreptomina (S9137) y la anfotericina (A9528) para la preparación de la mezcla de antibióticos procedieron de la casa Sigma.
- El DMSO utilizado para congelar las células se adquirió en la casa comercial Fluka (Sigma-Aldrich).

#### 3.1.3.2. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares de las líneas celulares GliNS2, G179, G144 y G166.

- La laminina para recubrir las placas procedía de la casa invitrogen (Life Technologies)
- El medio de cultivo para estas líneas celulares RHB-A fue de la casa comercial SC Proven (StemCells, Cambridge, Reino Unido).
- La acutasa procedía de la casa comercial Sigma-Aldrich.
- B27 y N2 procedían de la casa comercial invitrogen (Life Technologies).



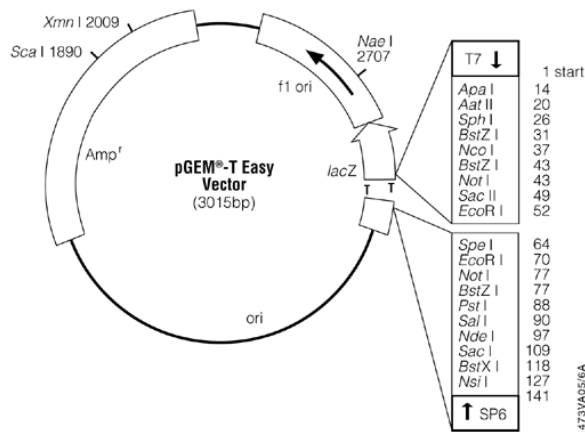
- Los factores de crecimiento EGF y FGF-basic se adquirieron en la casa comercial Peprotech (Reino Unido).
- El medio de congelación de estas líneas celulares, CryoStor™CS10 procede de la casa comercial STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Francia).

### 3.1.3.3. Productos utilizados para el análisis del mRNA

- El reactivo para la extracción del RNA (Trizol Reagent), así como los hexanucleótidos empleados como cebadores (random hexamer primers), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el ditioneitol (DTT) y la enzima transcriptasa inversa (SuperScriptII Reverse Transcriptase), utilizados en la RT, procedían de Invitrogen (Life Technologies).
- El inhibidor de RNAsas fue suministrado por Ambion (Cambridgeshire, Reino Unido).
- El dietilpirocarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas fue adquirido en Sigma.
- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Reino Unido).
- La polimerasa de DNA utilizada en la PCR, fue la DNA Taq incluida en la PCR Master Mix, fue adquirida en Promega.
- Los reactivos y productos utilizados en la preparación de soluciones y tampones para biología molecular estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa Sigma.
- La agarosa utilizada en las electroforesis procedió de la casa Pronadisa (Madrid, España). También se han utilizado geles “pre-cast” E-gel 1,2% con Sybr Safe de Invitrogen.
- Como marcador de tamaño de DNA, se utilizó el marcador de alto peso molecular de Invitrogen.

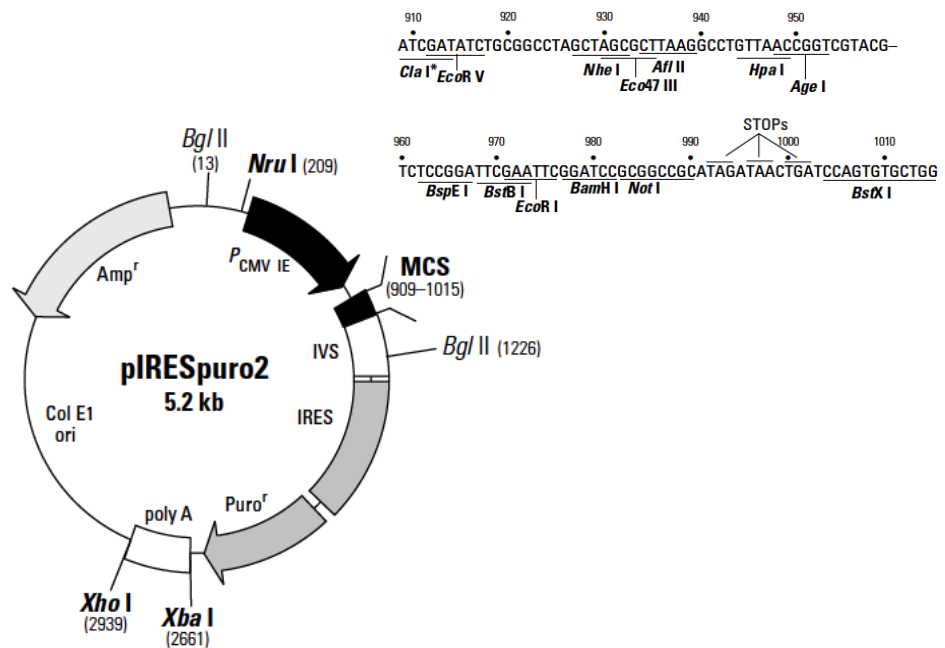
### 3.1.3.4. Productos utilizados en la construcción del plásmido plres-Cx43

- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR se adquirieron en Sigma-Genosys. En apartados posteriores se indican sus secuencias.
- Para la amplificación del DNA se utilizó la polimerasa Triple Master®, procedente de la casa Eppendorf, que permite amplificar la secuencia de interés con alta fidelidad.
- Para la purificación del DNA lineal se utilizó geles “pre-cast” E-Gel CloneWell 0,8% con Sybr Safe de Invitrogen.
- La triptona y el extracto de levadura para la elaboración del medio de bacterias procedieron de la casa Scharlau (Chemie, S.A. Barcelona, España). La ampicilina, utilizada para la selección de *E. coli*, procedió de la casa Sigma-Aldrich. El antibiótico Puromicina para la selección de las células eurocaritas, procedió de la casa Sigma.
- El vector pGEM-T Easy utilizado para la clonación, procedió la casa comercial Promega (véase esquema 14).



**Esquema 14. Plásmido pGEMT-Easy**

- Las enzimas de restricción *Bam*HI, *Age*I, *Xho*I, se adquirieron en la casa comercial Promega. La ligasa T4 procedió de Roche Diagnostics (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).
- Los productos utilizados para la purificación del DNA plasmídico fueron de las casas Promega o MOBIO (Solana Beach, CA. U.S.A.).
- Los geles de agarosa, los marcadores de tamaño de DNA así como los reactivos y productos utilizados fueron los mismos que se indican en el apartado 3.1.3.3.
- El vector pIRESpuro2 (véase esquema 15) procedió de Clontech (Palo Alto, CA, U.S.A.). Presenta, entre otras, las siguientes características:
  - El promotor del citomegalovirus (CMV) humano.
  - Un sitio de multiclonación (MCS), con sitios de restricción para diferentes enzimas.
  - Una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*).
  - La señal de poliadenilación
  - Un origen de replicación Col E1
  - Un gen de resistencia a puromicina que permite la selección en células eucariotas utilizando el antibiótico puromicina. También posee el gen de resistencia a ampicilina que permite la selección en células procariontas.
  - Tiene un tamaño de 5,2 Kb.



Esquema 15. Estructura del plásmido pRESpuro2

### 3.1.3.5. Productos empleados para el silenciamiento génico

- La Lipofectamina 2000<sup>®</sup> utilizada para la transfección de los siRNA, así como el medio Opti-MEM<sup>®</sup>, procedieron de la casa comercial Invitrogen.
- Los siRNA utilizados para el silenciamiento de la conexina-43 procedieron de la casa comercial BioNova científica S.L. (Madrid, España) y tienen las siguientes secuencias:

cadena sentido: 5'-GCUGGUUACUGGUGACAGATT-3'

cadena antisentido: 5'-UCUGUCACCAGUAACCAGCTT-3'

- El siRNA sin diana (*non target*-siRNA o nt-siRNA), utilizado como control negativo, procedió de la casa comercial Ambion.

### 3.1.3.6 Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas.

- El cocktail de inhibidores de proteasas procedió de la casa comercial Calbiochem (Calbiochem-Merck, USA).
- El PMSF procedía de la casa Sigma.

## Material y Métodos

- Para la cuantificación de proteínas se utilizó el fluorímetro Qubit, con los kits comercial aconsejados por Invitrogen (Life Technologies). Para la cuantificación de proteínas de tejido se utilizó el kit de análisis de proteínas por BCA de Pierce (Thermo-Scientific).
- Cuando se prepararon geles de acrilamida para la electroforesis con proteínas, se utilizó una solución 30% acrilamida/N,N'-metilbisacrilamida (29:1) de la casa comercial Bio-Rad (BioRad Laboratories) y, como agentes coayudantes para la gelificación, tanto N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) como persulfato amónico (AMPS), procedentes de la casa comercial Sigma. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore). El metanol utilizado en la preparación de la solución de transferencia tipo Western era de la casa comercial Panreac Química SA (Barcelona, España).
- Así mismo se utilizaron geles comerciales preparados, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Midi-Gel de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies). En este caso la solución de electroforesis MOPS-SDS se adquirió en la casa Invitrogen (Life Technologies). También se adquirieron en la misma casa comercial las membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro utilizadas con el sistema iBlot de transferencia seca.
- El marcador de peso molecular de proteínas procedía de Bio-Rad.

Antígeno	Casa Comercial	Dilución	Tipo	Especie de procedencia
Cx43	BD Biosciences	1:100	Monoclonal	Ratón
Y416-cSrc	Cell Signaling	1:250	Policlonal	Conejo
Total-cSrc	Cell Signaling	1:500	Policlonal	Conejo
Total-cSrc	Cell Signaling	1:500	Monoclonal	Ratón
Id 1	Santa Cruz	1:500	Policlonal	Conejo
BLBP	Merk Millipore	1:1000	Policlonal	Conejo
GFAP	Sigma	1:500	Monoclonal	Ratón
Sox2	Abcam	1:500 1:1000	Policlonal	Conejo
p27	Santa Cruz	1:100	Monoclonal	Ratón
Ki-67	Sigma	1:200	Monoclonal	Ratón
E-cadherina	Santa Cruz	1:100	Policlonal	Conejo
N-cadherina	Santa Cruz	1:200 1:500	Policlonal	Conejo
α-Actinina	Merk Millipore	1:1000	Monoclonal	Humano
GAPDH	Ambion	1:6000	Monoclonal	Ratón

Tabla 1.- Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western y inmunocitoquímica.

Antígeno	Casa Comercial	Dilución	Conjugado	Especie de procedencia
$\alpha$ -Ratón	Santa Cruz	1:2500	Peroxidasa	Cabra
$\alpha$ -Conejo	Santa Cruz	1:5000	Peroxidasa	Cabra
$\alpha$ -Ratón	Invitrogen	1:1000	Alexa 488	Cabra
$\alpha$ -Ratón	Invitrogen	1:1000	Alexa 594	Cabra
$\alpha$ -Conejo	Invitrogen	1:1000	Alexa 488	Cabra

**Tabla 2.- Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western y inmunocitoquímica .**

- Las películas de autorradiografía para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la marca Fujifilm (Madrid, España).
- El paraformaldehído para fijar las células procedían de la casa Sigma.
- El medio de montaje para observaciones al microscopio *SlowFade Gold antifade reagent* y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente del DNA, fueron suministrados por Molecular Probes (Life Technologies).
- Los portaobjetos y cubreobjetos utilizados para el montaje de inmunos, fueron adquiridos en la casa comercial Thermo Scientific.
- El detergente Triton X-100 para la permeabilización, fue suministrado por la casa Sigma.

### 3.1.3.7. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular

- En la determinación de la viabilidad celular medida por el método de MTT se empleó el reactivo de MTT, la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de la casa comercial Sigma y dimetilsulfóxido de la casa comercial Fluka (Fluka-Sigma).

### 3.1.3.8. Otros productos

- El agente inhibidor de Src, PP2, fue suministrados por Calbiochem (Nottingham, Reino Unido). Los agentes inhibidores de Src, dasatinib y saracatinib, fueron suministrados por Selleck Chemicals (Munich, Alemania)
- Los péptidos sintéticos utilizados procedieron de GenScript (Piscataway, USA). Las secuencias fueron:
  - TAT: YGRKKRRQRRR
  - TAT-Cx43Src: TAT-DPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP
- El antibiótico G-418, utilizado para la selección de células C6-Cx43 ha sido adquirido en Promega.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparación de los cultivos celulares

##### 3.2.1.1. Composición de las disoluciones

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2 excepto en los casos en que se indique otro pH, y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

##### Medio de cultivo

DEMEM + FCS 10%(v/v)

Penicilina G            50 U/mL

Estreptomicina        37,5 U/mL

Anfotericina B        0,23 µg/mL

##### Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl                    136 mM

KCl                     2,7 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            7,8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            1,7 mM

Penicilina G            50 U/mL

Estreptomicina        37,5 U/mL

Anfotericina B        0,23 µg/mL

##### 3.2.1.2. Preparación del cultivo de células de glioma

Las células de glioma de rata C6 y las células de glioma humano HTB12, HTB138, U373, T98-G se cultivaron según el método descrito previamente por Taberero y col. (Taberero et al. 1996). Las células se cultivaron , en medio de cultivo suplementado con FCS al 10% (v/v), a pH 7,2, con dos cambios de medio por semana. Se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento se procesaron para los distintos experimentos o se resembraron a menor densidad.

Para la resiembra de las células de glioma, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina/EDTA durante 1 minuto a 37 °C. Se recogieron en DMEM + FCS 10% (v/v), para finalizar la tripsinización, se centrifugaron durante 5 minutos a 500 x g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio de cultivo. Se cuantificó el número

de células empleando el dispositivo Countess y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada según el tipo de experimento.

La congelación de las células de glioma se llevó a cabo en un congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , manteniendo las células en crioviales, con un medio crioprotector consistente en FCS + DMSO 8% (v/v).

### **3.2.1.3. Preparación de cultivos de células madre de glioma.**

Las células madre de glioma G166, G144, G179, GliNS2 se cultivaron según el método descrito previamente por (Pollard et al. 2009). Las células se sembraron en placas petri recubiertas con laminina  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio RHB-A suplementado con 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml b-FGF, Penicilina G 50 U/mL, Estreptomina 37,5 U/mL y Anfotericina B  $0,23\mu\text{g}/\text{mL}$ , con dos cambios de medio por semana.

En los experimentos en condiciones de diferenciación, el medio RHB-A fue suplementado con 1% de N2, 2% de B27 y 5% de FCS. Se mantuvieron en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , con un 5% de  $\text{CO}_2$  según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento se procesaron para los distintos experimentos o se resembraron a menor densidad.

Para la resiembra de las células madre de glioma humano, las células se lavaron con PBS y se incubaron con acetasa en el incubador a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre 1 y 5 minutos. Se centrifugan durante 5 minutos a  $1000\times g$ . Se cuantificó el número de células empleando una cámara de Neubauer o el dispositivo Countess y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada al tipo de experimento.

La congelación de las células se llevó a cabo en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniendo las células en crioviales, con un medio crioprotector (CryoStor<sup>TM</sup>CS10).

### **3.2.2. Tratamientos celulares**

En los experimentos realizados con los inhibidores de c-Src: dasatinib  $1-2\mu\text{M}$ , saracatinib  $1-2\mu\text{M}$  y PP2  $10-20\mu\text{M}$ , se utilizó como control DMSO, ya que fue el vehículo empleado en su disolución. Estos inhibidores se añadieron al experimento 12 horas después de la resiembra y se mantuvieron presentes a la misma concentración durante el resto del experimento.

En los experimentos realizados con péptidos sintéticos (> 90% de pureza), las secuencias TAT (YGRKKRRQRRR), responsable de que el péptido penetre en la célula (Gump and Dowdy 2007) y la secuencia TAT-Cx43Src es

(DPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP). Se añadieron 24 horas después de la resiembra. En todos los experimentos se utilizaron concentraciones de 50  $\mu$ M y se mantuvieron 24 o 48 horas a 37 °C.

### **3.2.3. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante RetroTranscripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

Para la construcción del plásmido bicistrónico, que codificase el cDNA de la Cx43 humana y el gen de la resistencia a Puomicina, se utilizaron los siguientes métodos.

La secuencia del cDNA que codifica la conexina-43 humana procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), nº de identificación: NM\_000165.3. Para la síntesis del cDNA de la conexina-43 humana se empleó como molde RNA total de la línea de células madre de glioma humano GliNS2 y se realizó una retrotranscripción para pasar de RNA total a cDNA.

#### **3.2.3.1. Extracción del RNA total de los cultivos**

Para la extracción del RNA de las células en cultivo se utilizó Trizol, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de Trizol, se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos y se realizó una incubación de 3 minutos en reposo, finalizada se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 15 minutos. Una vez recogida la fase acuosa se precipitó el RNA por adición de 0,5 volúmenes de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron durante 10 minutos y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con un volumen de etanol al 75%. A continuación, las muestras se agitaron y se centrifugaron a 7500 x g durante 5 minutos, a 4°C. El precipitado de RNA se dejó secar parcialmente a temperatura ambiente y se redisolvió en agua DEPC estéril, incubándolo después durante 10 minutos a 55°C. Por último, se añadieron 0,05 volúmenes del inhibidor de RNAsas por cada volumen resuspendido.

#### **3.2.3.2. Cuantificación del RNA**

La calidad del RNA se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), comprobándose la presencia de las bandas de RNA ribosómico (18 S y 28 S). La cuantificación del RNA se realizó en un espectrofluorímetro, modelo Qubit (Invitrogen), el cual está adaptado para los patrones y reactivos correspondientes al kit de cuantificación de RNA de la marca comercial.



### 3.2.3.3. Retrotranscripción (RT)

Para realizar la transcripción del RNA total a DNA complementario (cDNA) se utilizó la enzima transcriptasa SuperScriptII, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total se mezcló con 200ng de cebadores hexaméricos aleatorios (*random hexamer primers*) en un volumen total de 11 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 70°C y seguidamente en baño de hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 9 µL de una mezcla compuesta por 5 µL del tampón de la transcriptasa, 1 µL de la transcriptasa SuperScriptII, 1 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1µL de inhibidor de RNAsas y 1µL de ditioneitol (DTT). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador y consistió en un paso inicial de anillamiento (10 minutos a 20°C), seguido de elongación (45 minutos a 42°C) y desnaturalización (5 minutos a 99°C). Al final de la reacción, la temperatura se mantuvo a 7°C. Finalizada la reacción, el volumen se completó hasta 50 µL con H<sub>2</sub>O-DEPC.

### 3.2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del cDNA obtenido en el paso anterior, se amplificó el gen de interés en cada caso, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los nucleótidos seleccionados para amplificar el cDNA de la conexina-43 humana fueron:

Cadena sentido: 5'- ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAG -3'

Cadena antisentido: 5'- CTAGATCTCCAGGTCATCAGG -3'

Se preparó, por cada tubo, una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos:

- 3 µl de cDNA molde.
- 2 µl de cada oligonucleótido.
- 25 µl de DNA polimerasa Master Mix
- 18 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.

Para la amplificación del gen de la conexina-43 humana se utilizó PCR Master Mix de Promega, que contiene *Taq* DNA plimerasa, dNTPs, Cl<sub>2</sub>Mg y buffer de reacción.

Una vez preparada la mezcla, los tubos se llevaron al termociclador para amplificar la conexina-43 humana, se utilizaron 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos (94 °C 15", 60,4 °C 30", 72 °C 1min 30").

Una vez obtenido del cDNA de la Cx43 se amplificó mediante una segunda PCR con cebadores que contenían secuencias de restricción (los extremos subrayados) para las enzimas Age I y BamH I.

Cadena sentido: 5'- TATATACCGGTATGGGTGACTGGAGCGCCTT -3'

Cadena antisentido: 5'- CGG'GATCCCCGCTAGATCTCCAGGTCATCAG-3'

Las condiciones de esta segunda PCR fueron 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 94 °C 15", 60,4 °C 30", 72 °C 1min 30.

### 3.2.3.5. Electroforesis de DNA

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (0,04 M Tris acetato y 1 mM EDTA, pH 8,3), en presencia de bromuro de etidio al 0,005% (v/v). Se tomaron fotografías de los productos de PCR con un transiluminador de luz ultravioleta, que tiene acoplada una cámara.

### 3.2.4. Construcción del plásmido plres-Cx43

#### 3.2.4.1 Transformación bacteriana y extracción del DNA plasmídico

El medio utilizado para crecer *E. coli*, cepa DH5- $\alpha$ , fue LB (Luria Bertani), que se preparó utilizando 10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 g de extracto de levadura. Estos compuestos se disolvieron en 1L de agua ultrapura. En caso de requerir medio sólido y resistencia a antibiótico, se añadió agar al 1,5 % (p/v) .

El proceso de transformación consistió en la mezcla de 75  $\mu$ L de células competentes (cepa DH5- $\alpha$  de *E. coli*) con DNA (20ng/ $\mu$ L), con agitación suave. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4 °C. A continuación se incubó a 42 °C durante 45 segundos, y de nuevo a 4° C durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 600  $\mu$ L de medio 2xYT que contenía 16 gr de triptona, 5 gr de NaCl y 10 g de extracto de levadura. Estos compuestos se disolvieron en 1L de agua ultrapura. Se incubó 1 hora y 30 minutos a 37 °C en agitación (180rpm). Finalmente, se sembraron diferentes cantidades de las células transformadas en placas de medio selectivo (LB con ampicilina). Al cabo de 16 horas se recogieron diferentes colonias que crecieron en LB con ampicilina.

Para la extracción del DNA plásmidico, en el caso de bacterias crecidas en un volumen de LB inferior a 5mL se utilizó el kit comercial UltraClean Mini Plasmid Pred Kit (MOBIO) y en el caso de bacterias crecidas en un volumen de LB de 100 mL se utilizó el kit Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). En ambas situaciones, el procedimiento realizado para la extracción del DNA plasmídico fue el que se aconsejaba en las instrucciones del fabricante.

### 3.2.4.2 Construcción del plásmido pGEM- T-Cx43

El fragmento con los sitios de restricción del cDNA de la Cx43 humana se insertó en el plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de ligación fueron las siguientes: 200 ng de cDNA, 125 ng del vector pGEM-T, 3 U de ligasa T4 y 1  $\mu$ L de tampón de ligasa T4. Se mezclaron suavemente y se incubaron toda la noche a 4°C.

El resultado de la ligación se utilizó para la transformación de bacterias con el objetivo de obtener mayor cantidad de DNA plasmídico. Para ello se mezclaron 2  $\mu$ L de la reacción de ligación con 75  $\mu$ L de células competentes de *E. Coli* DH5- $\alpha$ . Se siguió el proceso de transformación indicado en el apartado 3.2.4.1.

Para la selección de colonias se añadió previamente a la placa IPTG al 20% y X-Gal al 2%. Las placas se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Se seleccionaron las colonias blancas. Cuando el inserto se introduce adecuadamente en la posición de clonaje interrumpe la secuencia codificante de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que evita la reacción de coloración azul que produce la  $\beta$ -galactosidasa al actuar sobre el IPTG y el X-Gal y, por tanto, se producen colonias blancas.

Para confirmar que las colonias blancas habían incorporado correctamente la secuencia, incubamos una pequeña cantidad de cada clon en 5 ml de medio 2xYT y ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Al cabo de 7 horas. Y se realizó la extracción de DNA plasmídico descrito en el apartado 3.2.4.1.

Finalmente se digirió el DNA plasmídico con la enzima de restricción BamH I y se analizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Una vez obtenido el plásmido pGEM-T-Cx43 que contiene el inserto de la conexina-43 con las secuencias de restricción adecuadas para la inserción en el plásmido pRIESpuro2, se llevó a cabo la construcción plres-Cx43, para lo cual se utilizaron los siguientes métodos:

### 3.2.4.3 Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción

Para las digestiones del DNA con enzimas de restricción se siguieron las recomendaciones y se utilizaron los tampones proporcionados por la casa comercial. Las enzimas de restricción utilizadas fueron BamH I y Age I. Así se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 100-150 ng de DNA
- 1 U de enzima de restricción
- 1  $\mu$ L de tampón
- 1  $\mu$ L de albúmina (0,1 mg/mL)
- H<sub>2</sub>O ultrapura estéril hasta 10  $\mu$ L

La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas. A continuación, se purificó el DNA resultante de la digestión, utilizando el sistema de geles de agarosa E-Gel CloneWell de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante y se recuperó en H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Una pequeña alícuota se separó en un gel de agarosa para determinar el contenido y la calidad del DNA.

### 3.2.4.4. Ligación del cDNA de la Cx43 con el vector pIRESpuo2

La ligación del cDNA de la Cx43 humana en el vector pIRESpuo2 se llevó a cabo utilizando la enzima ligasa T4. Las condiciones de la ligación fueron las siguientes:

- 20-25 ng del cDNA de la Cx43
- 100 ng del vector pIRESpuo2
- 1  $\mu$ L de tampón
- H<sub>2</sub>O ultrapura estéril hasta 10  $\mu$ L

Se mezclaron suavemente y se incubaron a 4°C durante 12 horas. El producto de la ligación se utilizó para la transformación bacteriana (3.2.4.1).

### 3.2.4.5 Secuenciación

La secuenciación de la Cx43 humana a partir de la construcción plasmídica pIres-Cx43, se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca (edificio Departamental, Salamanca, España).

### 3.2.5. Transfección de las células madre de gliomas.

La transfección de las células madre de glioma humano GliNS2 con los plásmidos correspondientes, se llevó a cabo mediante electroporación, utilizando el sistema de transfección Neon (Life Technologies). La transfección se realizó en el momento de la resiembra. El protocolo de transfección fue el suministrado por la casa comercial. Para ello, en primer lugar se prepararon las células y medios necesarios en la transfección. Hemos utilizado dos tipos de punta para la transfección; 10 y 100  $\mu$ L. Las células se despegaron tal y como se describe en el apartado 3.2.1.3.. Después de la centrifugación las células se lavaron en PBS filtrado sin antibiótico, y se contaron. Las células necesarias para el experimento se centrifugamos 5 minutos a 1000 x g y se resuspendieron en tampón de resuspensión del kit Neon Transfection. Las condiciones de electroporación fueron las recomendadas por la casa comercial, que indica que el 90% del volumen ha de ser células en tampón de resuspensión y el 10% del volumen será DNA plasmídico.

Una vez preparada la mezcla de células y DNA plasmídico, se procedió a la electroporación siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial (ver esquema 16). Tras probar diferentes combinaciones de pulsos y voltajes se selecciono un pulso de 30 ms a 1200 Voltios, la combinación que logró mayor eficacia en la transfección de las células GliNS2. Tras la electroporación las células, se sembraron placas con laminina y en medio sin antibiótico. Las cantidad de DNA plasmídico y el tipo de voltaje y pulso, se decidieron después de realizar protocolos de optimización para células GliNS2.



**Esquema 16. Electroporación**

Los plásmidos utilizados poseen un gen de resistencia a puomicina, que permite la selección de la células transfectadas. Al cabo de 24 horas de la transfección se añadió al

medio antibiótico y puromicina 0,25 µg/mL. La concentración de puromicina utilizada se decidió después de realizar una curva de toxicidad con concentraciones de 0 a 2 µg/mL en las células madre de glioma GliNS2. Se seleccionó la concentración que provocaba la muerte de las células al cabo de 5 días.

### **3.2.6. Transfección de las células C6 de glioma de rata.**

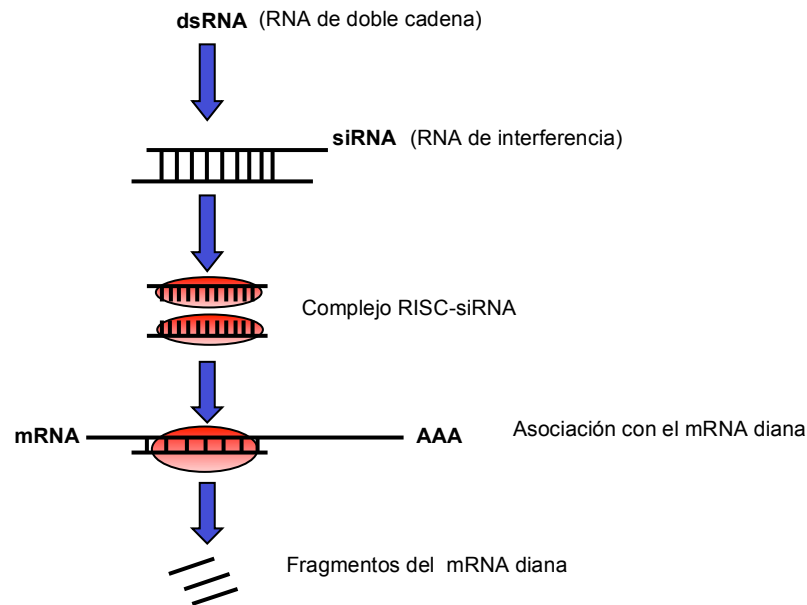
La transfección de las células C6 de glioma de rata con los plásmidos correspondientes, se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000<sup>®</sup>. El protocolo de transfección fue el suministrado por la casa comercial. Para ello, en primer lugar se cambió el medio de cultivo por DMEM + FCS 10% sin antibióticos. La preparación de los complejos de transfección para cada placa, fue como sigue. Se tomaron 2 µl de DNA plasmídico (1 µg/µL) y se diluyeron en 100 µl de Opti-MEM<sup>®</sup>. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se diluyeron 3 µl de Lipofectamina 2000<sup>®</sup> en 100 µl de Opti-MEM. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron las soluciones que contenían el DNA plasmídico y la Lipofectamina 2000<sup>®</sup> y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, se añadió la mezcla a la placa de células, mezclando bien (200 µL/ml medio). Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> y se les cambió el medio a DMEM + FCS 10% + antibióticos, entre 6 y 12 horas después de la transfección.

Los plásmidos utilizados poseen un gen de resistencia a geneticina, que permite la selección de las células transfectadas. Al cabo de 24 horas después de la transfección se añadió al medio antibiótico y geneticina 0,5 mg/mL.

### **3.2.7. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA (small interfering RNA).**

El mecanismo del RNA de interferencia (RNAi), que consiste en el bloqueo de la expresión de un gen específico, se ha observado en todos los tipos de células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Se cree que este mecanismo está implicado en la protección del genoma frente a las infecciones víricas, además de jugar un papel en la regulación de la proliferación, muerte y diferenciación celulares e, incluso, en la oncogénesis. Actualmente, el RNAi es una herramienta útil para llevar a cabo el silenciamiento de un gen específico. El mecanismo de actuación del RNAi en la célula se representa en el esquema 17. En primer lugar, el RNA de doble cadena (double stranded RNA, dsRNA) es digerido por una enzima denominada Dicer, similar a la RNasa III. Así se obtienen pequeños fragmentos de doble cadena de RNA, de entre 20-25 nucleótidos, denominados siRNA (small interfering RNA). Estos se ensamblan en un complejo denominado RISC (RNA-induced silencing

complex) que contiene una endorribonucleasa, la cual separa la doble cadena de siRNA. Finalmente, la monocadena de siRNA se une a su cadena complementaria en el mRNA de la célula y el complejo RISC digiere el mRNA diana.



**Esquema 17. Fundamento de la técnica del siRNA**

El silenciamiento del mRNA de la conexina-43, se realizó en el momento de la resiembra en el medio de cultivo específico de cada tipo de células sin antibiótico. Se diluyó el siRNA de la Cx43 (Cx43-siRNA) o el siRNA sin diana (non target-siRNA, NT-siRNA), ambos a una concentración 100 nM para el silenciamiento de las C6-Cx43 y 25-50nM en el caso de la línea celular G166, en medio comercial Opti-MEM y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Por otro lado, se diluyó la Lipofectamina 2000 en Opti-MEM (0,03  $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ), incubándose también esta mezcla durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron los medios que contenían el siRNA y la Lipofectamina 2000 (1:1) y se incubó la mezcla durante 20 minutos. Después de este tiempo, la mezcla se añadió al cultivo de células de glioma (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del medio de cultivo). Al cabo de 8-12 horas de la transfección se cambió el medio de cultivo, por medio con antibiótico. Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> el tiempo necesario para ser procesadas para los siguientes experimentos.

### **3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western**

El análisis de la expresión de proteínas por transferencia tipo Western se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

### 3.2.8.1. Extracción de proteínas

Las proteínas procedentes de las células en cultivo se recogieron en solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 5 mM (pH 6,8), SDS al 2 % (p/v), EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Cocktail III, Calbiochem) 1:100 (v/v), NaF 1 mM y ortovanadato 0,1 mM. Después de extraerlas, se resuspendieron en un tampón Laemmli 4x (Tris-HCl 0,18 M y pH 6,8; glicerol 5 M; SDS 3,7 % (p/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 0,6 M ó DTT 9 mM y azul de bromofenol (BB) 0,04 % (v/v)). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, después se sonicaron 5 minutos y se centrifugaron a 20800 x g durante 5 minutos.

### 3.2.8.2. Cuantificación de proteínas

#### 3.2.8.2.1 Análisis en el fluorímetro Qubit con el kit de análisis de proteínas.

Este método se basa en la unión selectiva a proteínas, de un reactivo fluorescente proporcionado por el kit de determinación, sin que interfieran en la medición ácidos nucleicos o sustancias tales como el DTT o el mercaptoetanol. La cuantificación se realiza en un espectrofluorímetro, modelo Qubit (Invitrogen), de manera similar a lo descrito en el apartado 3.2.3.2. En este caso, el estándar proporcionado por la casa comercial, es albúmina sérica bovina (BSA).

#### 3.2.8.2.2. Cuantificación de proteínas de tejido por el método BCA

Este método se basa en la reducción de iones de  $\text{Cu}^{2+}$  mediante interacción con las proteínas, el ácido bicinónico (BCA) se une a los iones de  $\text{Cu}^{1+}$  y forman un producto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente.

El estándar utilizado es BSA a concentraciones de 0,05-1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En una placa de Nunc de 96 pocillos se añadió 10  $\mu\text{L}$  de patrón o muestra. A todos los pocillos se añaden 150  $\mu\text{L}$  de la solución que contiene el ácido bicinónico. Se agito e incubó 5 minutos en oscuridad. Después se leyó la absorbancia en un lector de placas

### 3.2.8.3. Preparación de los geles

La electroforesis SDS-PAGE se realizó en geles de grosor de 0,75 mm, compuestos por un gel de separación de (7,5% de poli(acrilamida)) y por un gel de concentración (4% poli(acrilamida)). El gel de separación estaba compuesto por Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), acrilamida/Bis al 7,5% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), persulfato de amonio (AMPS) al 0,05% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED) al 0,05% (p/v). El gel de concentración estaba



compuesto por Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), acrilamida/Bis al 4% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), AMPS al 0,05% (p/v) y TEMED al 0,05% (p/v).

Asimismo, se utilizaron geles comerciales para la electroforesis NuPAGE Novex Bis-Tris (4-12%) Midi gels (Invitrogen).

### **3.2.8.4. Preparación de las muestras para la electroforesis**

Una vez calculada la concentración de proteínas en las muestras, se prepararon 20 µg de proteína en tampón Laemmli 4X. Se hirvió la mezcla durante 5 minutos, y tras realizar una rápida centrifugación, y se procedió a la carga en el gel.

### **3.2.8.5. Electroforesis de proteínas**

Se utilizó un tampón para sumergir los electrodos y los geles, compuesto por Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,3), con SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se aplicaron en los distintos pocillos del gel, incluyendo un marcador de masas moleculares (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa).

En el caso de las electroforesis NuPAGE, el tampón utilizado para la electroforesis fue NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen), con un antioxidante añadido al tampón que cubre los pocillos del gel. Las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel, incluyendo un marcador de masas moleculares. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a un voltaje constante entre 80-140 V, dependiendo del gel empleado.

### **3.2.8.6. Electrotransferencia**

En la transferencia de tipo "húmedo" las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de PDVF de 0,45 µm de tamaño de poro. El tampón de transferencia tenía la siguiente composición: Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,6), con SDS al 0,1% y metanol al 10%. Para la electrotransferencia se aplicó un voltaje de 35V durante toda la noche o a un voltaje de 90V durante 120 minutos, ambas a 4°C, de manera que las proteínas van pasando a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmovilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

La transferencia de los geles NuPAGE se realizó de forma semiseca, haciendo uso del dispositivo iBlot (Invitrogen), a una membrana de Nitrocelulosa de 0,2µm de tamaño de poro. El tiempo de transferencia fue de 10 minutos con un voltaje fijo de 20 V.

### 3.2.8.7. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo Ponceau al 10% (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TTBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 1:1000 pH 7,5).

### 3.2.8.8. Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-Cx43 (1:100), anti-GAPDH (1:5000), anti- $\alpha$ -actinina (1:1000), anti-c-Src total (1:500), anti-c-SrcY416 (1:200), anti-Sox2 (1:1000), anti-Id1 (1:500), anti-E-cadherina (1:100), anti-N-cadherina (1:500), anti-p27 (1:100), anti-GFAP (1:500).

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de TTBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 1:1000 pH 7,5) y 2% de azida sódica.

A continuación, se incubó con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón o conejo, conjugado con peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de ratón se utilizó a una concentración de 1:2500 y el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de conejo se utilizó a una concentración de 1:5000 preparados en TTBS. En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía, mediante su escaneado en un escáner de doble haz y un programa informático de análisis de imagen.

### **3.2.9. Determinación de la expresión y localización de proteínas mediante inmunocitoquímica.**

Con el objetivo de determinar la expresión y localización de las diferentes proteínas de interés, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se hicieron tres lavados con PBS y se pusieron en solución de anticuerpos una hora a 4°C. Después, se realizaron lavados con PBS y se incubaron las células con el anticuerpo primario, diluído en solución de anticuerpos con Triton X-100 al 0,1%, durante 5 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente, diluído en solución de anticuerpos con Tritón X-100 0,1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron durante 5 minutos con DAPI (1:5000), con el objetivo de visualizar los núcleos celulares. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con PBS y se montaron las placas con el medio protector de fluorescencia SlowFade Gold antifade reagent. De esta forma, las placas estuvieron preparadas para ser visualizadas con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

Los anticuerpos primarios empleados, cuyas especificaciones se recogen en la tabla 1 del apartado de Material, se utilizaron a las siguientes diluciones: anti-Ki-67 (1:200), anti-BLBP (1:1000), anti-Cx43 (1:200), anti-Id1 (1:500), anti-Sox2 (1:500), anti-N-cadherina (1:200). Los anticuerpos primarios se prepararon, generalmente, en una solución de PBS, azida sódica 0,02% (p/v) y Triton X-100 al 0,1%.

Después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, durante una hora, a temperatura ambiente en oscuridad y sin agitación, colocando las placas sobre una superficie lisa. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo secundario anti-IgG de ratón; conjugado con AlexaFluor 488 (1:1000), o AlexaFluor 594 (1:1000), anti-IgG de conejo; conjugado con AlexaFluor 488 (1:1000).

### **3.2.10. Determinación de viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.**

Se empleó el método espectrofotométrico de reducción del bromuro de tiazol azul de tetrazolio (MTT), propuesto por Mosmann (Mosmann 1983) como un método para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de dichos cristales en DMSO, se obtiene un medio de color violeta, cuya mayor o menos absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT, se aspiró el medio de cultivo y las células se incubaron con una solución de MTT 0,5 mg/mL en medio de cultivo, durante 1 hora y 15 minutos en oscuridad a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación se aspiró este medio y se añadieron 300 µL de DMSO y se incubaron 10 minutos en oscuridad y agitación muy suave hasta disolución homogénea de los cristales de formazan formados en el paso anterior. Volúmenes de 200 µL de cada condición se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 570 nm en un espectrofluorímetro de placas.

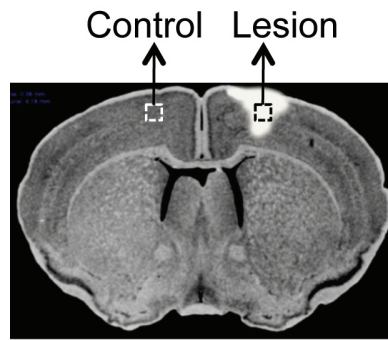
### **3.2.11. Experimentos realizados “in vivo” en ratones C57BL6**

#### **3.2.11.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6**

Se realizaron inyecciones intracraneales de ácido kaínico en ratones adultos C57BL6, según el método descrito por Koulakoff y col. (Koulakoff et al. 2008) con pequeñas modificaciones. Brevemente, los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de avertina al 2% (p/v). A continuación, se colocó al animal en un aparato de estereotaxis y se le inyectó intracranalmente 1 nmol de ácido kaínico en 1 µL de suero salino, siguiendo las coordenadas: -1mm anteroposterior, 1,5 mm mediolateral y 0,6 mm dorsoventral en bregma. De la misma manera, a los ratones control se les inyectó 1 µL de suero salino. La inyección se realizó en la corteza cerebral, en la parte derecha del cerebro. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical a diferentes días después de la inyección.

#### **3.2.11.2. Extracción de las proteínas del tejido**

Después de eliminar las meninges, se recogieron muestras en la zona del cortex cerebral, de la zona lesionada con ácido kaínico ó con PBS y también de la zona contralateral del mismo cerebro, usando esta zona como control (esquema 18). Se obtuvo aproximadamente 10µL de tejido de estas zonas mediante el uso de una pipeta. Una vez extraídas las muestras se congelaron directamente en hielo seco. Después de la congelación se añadieron 140µL de SDS 2% en ebullición junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se sonicaron las muestras, se les añadieron 40 µL de Laemmli y se calentaron 5 minutos a 100 °C. Una vez preparadas la proteínas se congelaron las muestras a -20 °C.

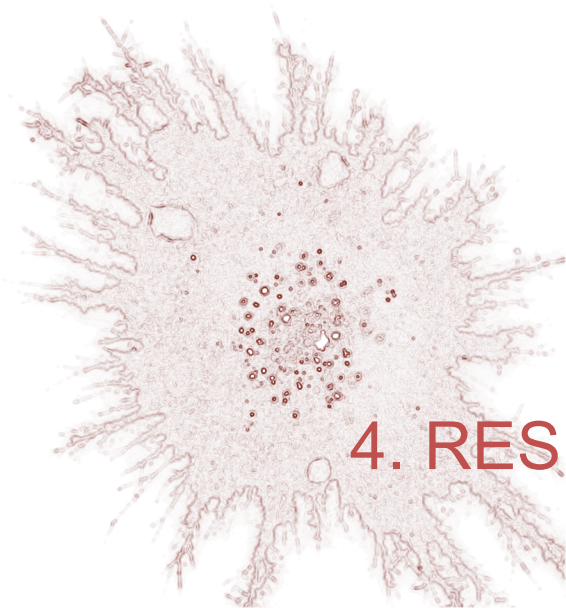


**Esquema 18. Áreas de la corteza cerebral recogidas tras la lesión para procesar por Western blot**

### **3.2.12. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes ( $n \geq 3$ ). El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student, cuando se comparaban dos variables entre sí (\*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ).





## 4. RESULTADOS





#### **4.1. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en astrocitos reactivos y células de glioma, incluidas las células madre de glioma humano.**

Los gliomas son tumores del sistema nervioso, de origen glial y mayoritariamente astrocítico. Constituyen los tumores más abundantes del cerebro y, en términos generales, presentan muy mal pronóstico (para revisión, véase: (Caskey et al. 2000; Nduom et al. 2012). Se ha sugerido que la pérdida de comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la formación de estos tumores cerebrales (Soroceanu et al. 2001).

La Cx43 tiene varios residuos en el extremo carboxilo terminal citoplasmático, que pueden ser fosforilados por diferentes kinasas (Hervé et al. 2007; Solan and Lampe 2009), entre las que se encuentra la tirosina kinasa c-Src. Concretamente, c-Src fosforila la Cx43 en los residuos de tirosina 247 y 265, localizados en el extremo carboxilo terminal de la Cx43.

Para que c-Src se active se requiere la autofosforilación del residuo de tirosina 416 (Y416). Por lo tanto, para conocer la actividad de c-Src, en este trabajo utilizamos un anticuerpo específico que reconoce la forma activa (c-Src Y416) y un anticuerpo que reconoce c-Src, independientemente de su estado de fosforilación (c-Src total).

En trabajos recientes en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre la regulación de la proliferación en células C6 de glioma de rata (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Además, se ha demostrado que la disminución de la Cx43 en astrocitos en cultivo provoca un aumento en la actividad de c-Src (Valle-Casuso et al. 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos, como primer objetivo del trabajo, confirmar si la relación de la Cx43 con la actividad de c-Src tiene lugar no solamente en células en cultivo sino también en situación in vivo.

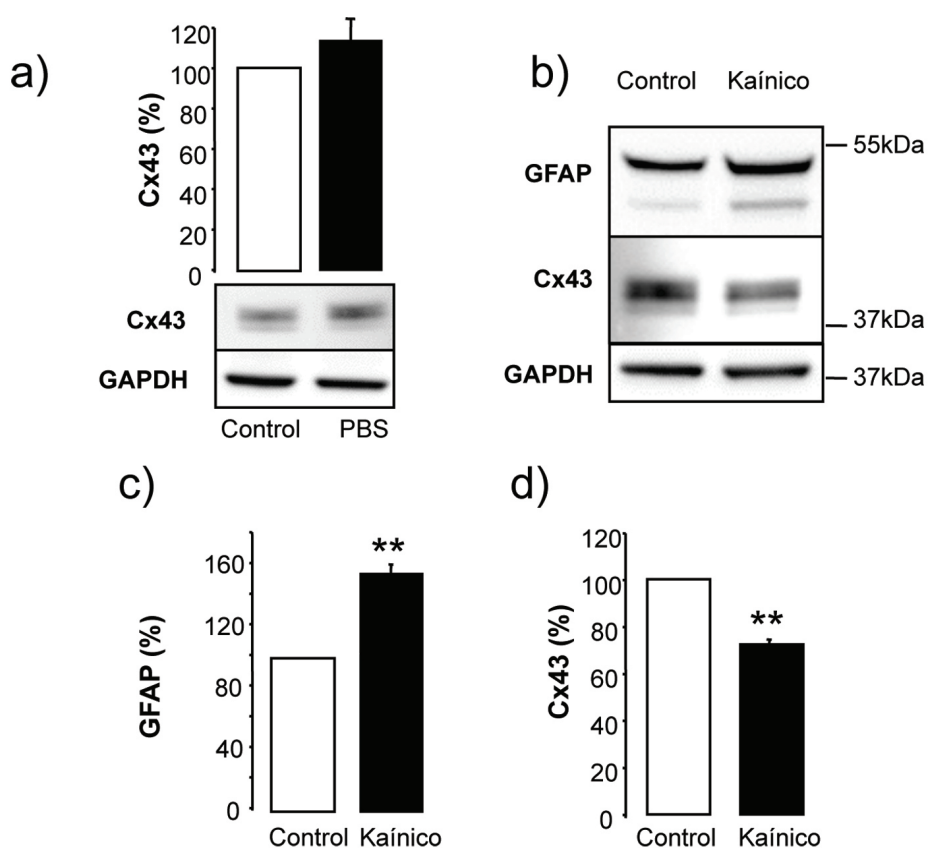
##### **4.1.1. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en los astrocitos de la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.**

In vivo, la expresión y función de la Cx43 responde a cambios en los astrocitos producidos por lesiones o patologías del cerebro (Giaume et al. 2010), entre ellas, el daño excitotóxico. Al producirse una lesión cerebral, las células gliales sufren un proceso reactivo denominado gliosis reactiva. Por ejemplo, la lesión cerebral provocada por la inyección de ácido kaínico produce la muerte neuronal por excitotoxicidad y, como consecuencia, tiene lugar una fuerte gliosis reactiva. Esta reacción se caracteriza por el aumento de la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en los astrocitos, seguida por la pérdida de la expresión de la Cx43, una semana después de la inyección (Koulakoff et al. 2008). Estudios previos de

## Resultados

nuestro laboratorio han demostrado que la disminución de la Cx43 en los astrocitos en cultivo provoca un aumento en la actividad de c-Src (Valle-Casuso et al. 2012). Por ello, decidimos investigar si en este modelo in vivo, en el que los astrocitos pierden la expresión de la Cx43 como consecuencia del daño excitotóxico, se producen cambios en la actividad de c-Src.

Para ello, se inyectó intracranealmente ácido kaínico o PBS a ratones de 6 semanas de vida postnatal. Los ratones se sacrificaron a diferentes días después de la inyección y se recogieron muestras en la zona del córtex cerebral, lesionada con ácido kaínico o con PBS y también de la zona contralateral del mismo cerebro, para ser usada como control (ver esquema 18 del apartado Material y Métodos).

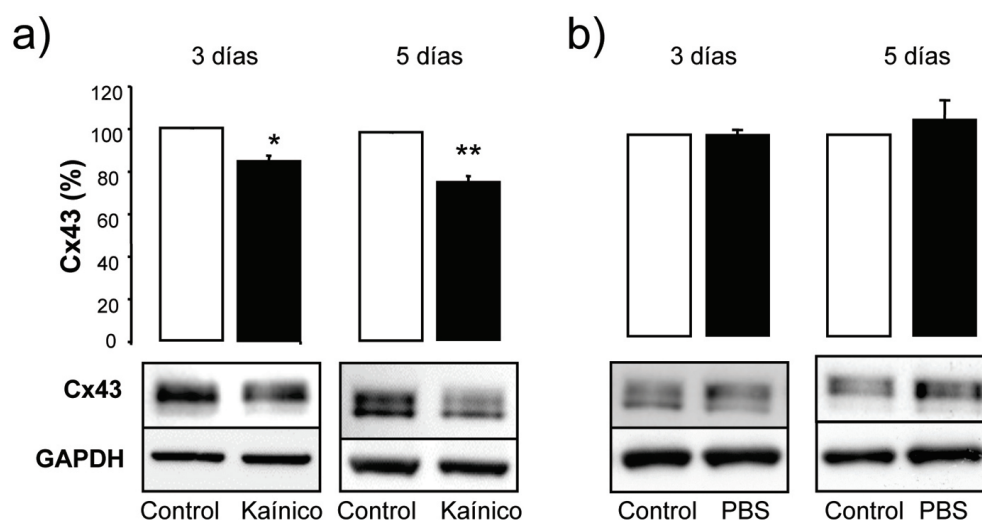


**Figura 1. La gliosis producida por el ácido kaínico disminuye la expresión de la Cx43 en los astrocitos in vivo**

Se inyectó intracranealmente PBS o ácido kaínico (1 $\mu$ g/mL) en la corteza de ratones de 6 semanas, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección. Se extrajeron las proteínas de la zona correspondiente a la lesión y de la zona control (hemisferio contralateral) y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot y cuantificación de la Cx43, 7 días después de la lesión con PBS. **b)** Western blot de GFAP, Cx43 y GAPDH 7 días después de la lesión con ácido kaínico. Los valores de GFAP (**c**) y Cx43 (**d**) fueron cuantificados y normalizados con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\* $p < 0,01$  (test  $t$  de Student).

La figura 1a muestra el Western blot y la cuantificación de la Cx43, donde no se observan cambios significativos de la expresión en la Cx43 en la zona lesionada con PBS respecto a la zona control (hemisferio contralateral). Sin embargo, la gliosis producida por la inyección de ácido kaínico se caracteriza por un aumento en la expresión de GFAP y una disminución de la expresión de la Cx43, 7 días después de la lesión, con respecto a la zona control (figura 1b). Las cuantificaciones de estos análisis tipo Western muestran un aumento de la expresión de GFAP (figura 1c) del 50% y una disminución del 30% de la Cx43 (figura 1d), en la zona lesionada con ácido kaínico comparada con el hemisferio contralateral (control).

Con el objetivo de hacer un seguimiento más exhaustivo de la evolución en la expresión de la Cx43, analizamos también los niveles de esta proteína 3 y 5 días después de la lesión. En la figura 2a se muestra una disminución del 18% y el 22% de la Cx43 en el área lesionada, 3 y 5 días después de la inyección de ácido kaínico, respectivamente. Sin embargo, después de la lesión con PBS, no se encontraron cambios significativos en la expresión de la Cx43 al cabo de 3 y 5 días (figura 2b).



**Figura 2. Cambio de los niveles de expresión de la Cx43 respecto al tiempo en los astrocitos reactivos después de la lesión con ácido kaínico**

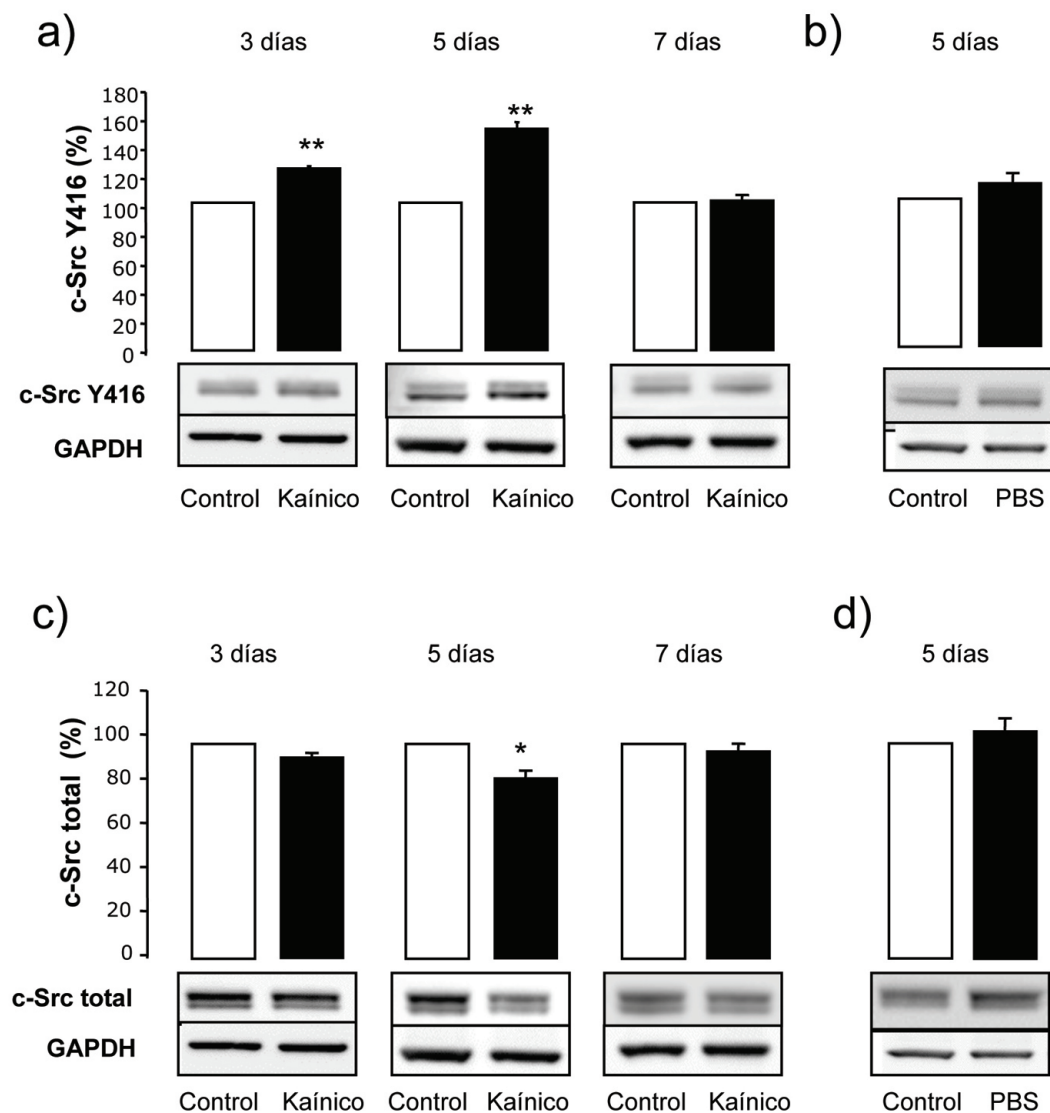
Se inyectó intracranalmente PBS o ácido kaínico (1µg/mL) en la corteza de ratones de 6 semanas, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron 3 y 5 días después de la inyección. Se extrajeron las proteínas de la zona correspondiente a la lesión y de la zona control (hemisferio contralateral) y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot y cuantificación de la Cx43 después de la inyección con ácido kaínico. **b)** Western blot y cuantificación de la Cx43 después de la inyección con PBS. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control tras la normalización con GAPDH y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 (test t de Student).

## Resultados

---

Una vez caracterizada la evolución de la Cx43 en los astrocitos reactivos tras el daño excitotóxico, nos propusimos estudiar la actividad de c-Src en la zona de la gliosis reactiva en este modelo de lesión neuronal.

La figura 3a muestra la actividad de c-Src 3, 5 y 7 días después de la inyección con ácido kaínico. Nuestros resultados indican que la lesión con ácido kaínico produce un aumento transitorio en los niveles de Y416 c-Src, es decir, en la forma activa de c-Src. Así, los niveles de c-Src Y416 aumentan un 20% y un 50% a los 3 y 5 días, respectivamente, mientras que los niveles de actividad de c-Src a 7 días no varían significativamente en la zona lesionada respecto al control. Sin embargo, la actividad de c-Src no se modificó 5 días después de la lesión con PBS (figura 3b). Por otra parte, los niveles totales de c-Src (figura 3c) no se modificaron a 3 y 7 días o se redujeron ligeramente 5 días después de la lesión con ácido kaínico. En la figura 3d se muestra el Western y la cuantificación de c-Src total 5 días después de la lesión con PBS y se puede apreciar que no hay cambios de expresión de c-Src en la zona lesionada respecto al control.



**Figura 3. Actividad de c-Src en los astrocitos reactivos después de la lesión con ácido kaínico**

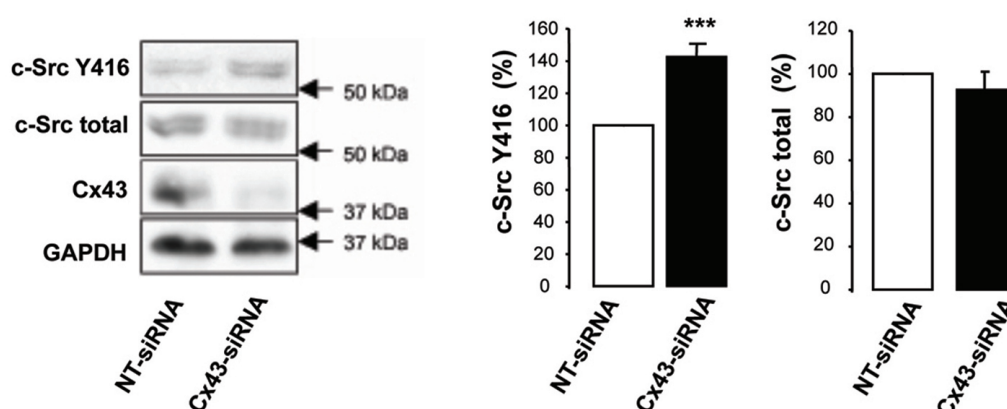
Se inyectó intracranalmente PBS o ácido kaínico (1µg/mL) en la corteza de ratones de 6 semanas, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron 3, 5 y 7 días después de la inyección. Se extrajeron las proteínas de la zona correspondiente a la lesión y de la zona control (hemisferio contralateral) y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de c-Src Y416 y cuantificación a los 3, 5 y 7 días desde la inyección con ácido kaínico. **b)** Western blot de c-Src Y416 y cuantificación 5 días después de la lesión con PBS. **c)** Western blot de c-Src total y cuantificación a los 3, 5 y 7 días desde la inyección con ácido kaínico. **d)** Western blot de c-Src total y cuantificación 5 días después de la lesión con PBS. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control tras la normalización con GAPDH y son medias  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  (test  $t$  de Student).

## Resultados

### 4.1.2. Estudio de la relación de la conexina-43 con c-Src en células C6 de glioma de rata.

Trabajos previos del laboratorio (Herrero-Gonzalez et al. 2010) mostraron que la transfección con la Cx43 en células C6 de glioma de rata disminuye la cantidad de forma activa de c-Src sin modificar la cantidad de c-Src total. Para confirmar que la inhibición de la actividad de c-Src se debía a la Cx43, en este trabajo decidimos silenciar la Cx43 en las células transfectadas con Cx43, para tratar de mostrar su efecto sobre la actividad de c-Src.

Para ello, se transfectaron células C6-Cx43 con un siRNA específico para el silenciamiento de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), que empleamos como control, tal y como se describe en Material y Métodos. Se recogieron proteínas 72 horas después de la transfección y se analizaron por Western blot. Las figuras 4a, 4b y 4c muestran que la transfección con Cx43-siRNA incrementó, aproximadamente, un 40% la forma activa de c-Src, respecto a las células transfectadas con NT-siRNA. Sin embargo, la cantidad total de c-Src no varió entre ambas condiciones.

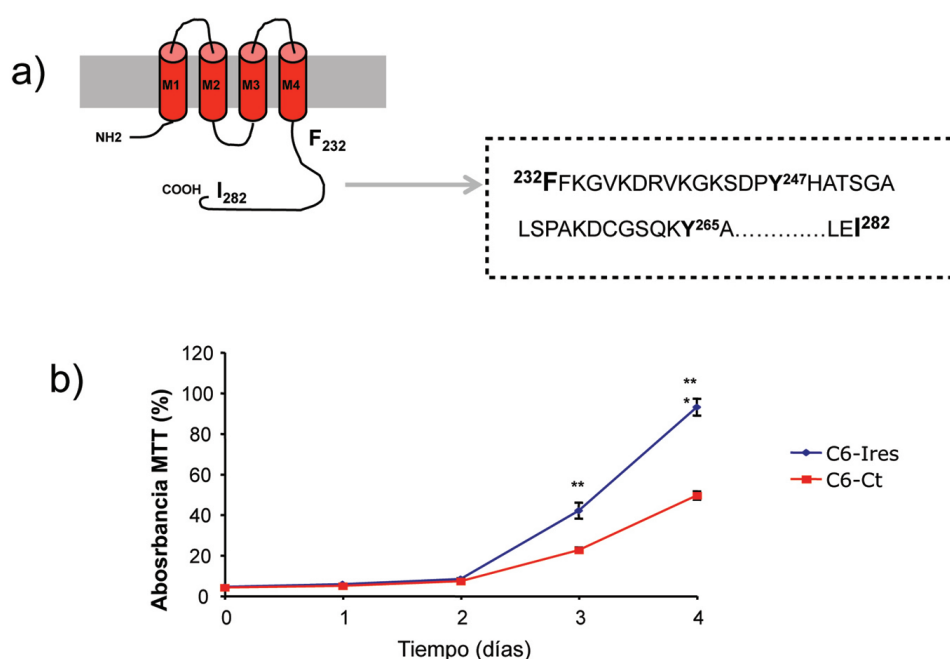


**Figura 4. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en células de glioma de rata C6-Cx43.**

Las células C6-Cx43 se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas 72 horas después de la transfección. **a)** Western blot de c-Src Y416, c-Src total y Cx43. Los valores de c-Src Y416 **(b)** y c-Src total **(c)** se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de NT-siRNA y son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a NT-siRNA se expresa como \*\*\* $p < 0,001$  (test *t* de Student).

Tal y como se ha mencionado, trabajos previos del laboratorio mostraron que la Cx43 reduce la velocidad de proliferación en células C6 de glioma de rata y este efecto depende de la interacción de la Cx43 con c-Src (Herrero-Gonzalez et al. 2010). En este trabajo, quisimos confirmar que el efecto antiproliferativo de la Cx43 se debe al extremo carboxilo terminal (del amino ácido 232 al 282) que contiene los residuos de tirosina fosforilables por c-Src. En la figura 5a se muestra la estructura de la Cx43 y se señala la región citosólica del carboxilo terminal, incluyendo las dos tirosinas fosforilables por la Cx43.

Por tanto, las células C6 de glioma de rata se transfectaron con la construcción que contiene el extremo carboxilo terminal (plres-Ct) o la construcción vacía (plres) descrita por Herrero-González *et al* (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Las células se sembraron a una densidad de 2000 células/cm<sup>2</sup> y se realizó una curva de crecimiento, siguiendo el número de células vivas a lo largo del tiempo analizado mediante el ensayo del MTT. La figura 5b muestra que las células transfectadas con el extremo carboxilo terminal de la Cx43 (C6-Ct) tienen una velocidad de proliferación menor que las células C6-Ires, siendo esta diferencia altamente significativa al cabo de 3 y 4 días.



**Figura 5. Efecto del carboxilo terminal de la Cx43 sobre la proliferación de las células C6 de glioma de rata.**

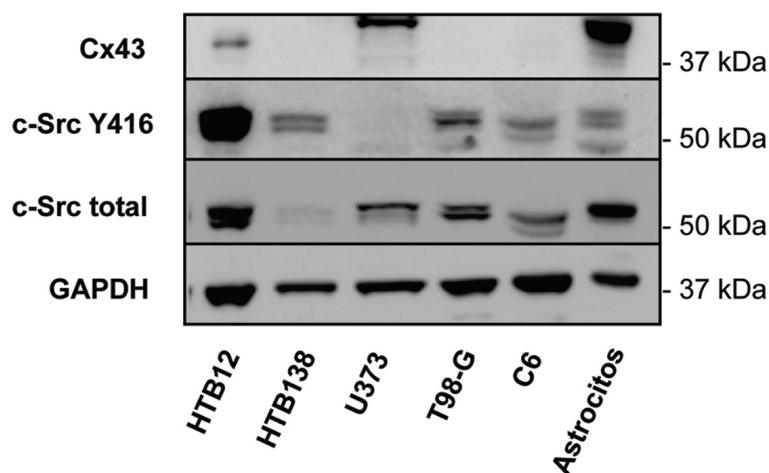
Las células C6 de glioma de rata se transfectaron con el extremo carboxilo terminal de la Cx43 (C6-Ct) o el vector vacío (C6-Ires) y se sembraron a una densidad de 2.000 células/cm<sup>2</sup>. Se realizaron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Estructura de la Cx43 y secuencia del carboxilo terminal (del amino ácido 232 al 282); las tirosinas fosforiladas por c-Src aparecen en negrita y más grandes. **b)** Los resultados se expresan como porcentaje de la absorbancia encontrada respecto a la condición que mostró mayor absorbancia y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control (C6-Ires) se expresa como \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 (test *t* de Student).

## Resultados

### 4.1.3. Estudio de la relación de la Cx43 con c-Src en células madre de glioma humano.

En general, los gliomas tienen niveles de Cx43 muy bajos comparados con los astrocitos; de hecho, se ha descrito una relación inversa entre la expresión de la Cx43 y la malignidad de los tumores (Huang et al. 1999; Soroceanu et al. 2001). También se ha descrito que la actividad de c-Src es muy elevada en muestras de glioblastoma de pacientes y en líneas celulares de gliomas, comparadas con el tejido normal (Ahluwalia et al. 2010; Du et al. 2009a 77). Hasta el momento, hemos descrito una relación inversa de la Cx43 con la actividad de c-Src en diferentes modelos murinos, tanto in vivo como in vitro; por tanto, decidimos investigar si esta relación de la Cx43 con c-Src tiene lugar en células procedentes de gliomas humanos.

En primer lugar, analizamos la expresión de Cx43 y la actividad de c-Src en cuatro líneas celulares de glioma humano, con diferente grado de malignidad; HTB12, HTB138, U373 Y T-98G. La línea HTB12 procedió de la American Type Culture Collection (ATCC) y está clasificada como astrocitoma (grado III). La línea HTB138 está clasificada por la ATCC como glioma de bajo grado (grado II). La línea celular de glioma humano U373 cedida por el Prof. Dr. Fernando Valdivieso, está clasificada como astrocitoma-glioblastoma (grado III) (Gonzalez-Aguero et al. 2007). Finalmente, se utilizó la línea celular T98-G, que está clasificada por la ATCC como glioblastoma multiforme (grado IV). Tras realizar los diferentes cultivos, se extrajeron proteínas de estas células y se llevó a cabo la determinación de los niveles de Cx43, c-Src Y416 y c-Src total, mediante Western blot.



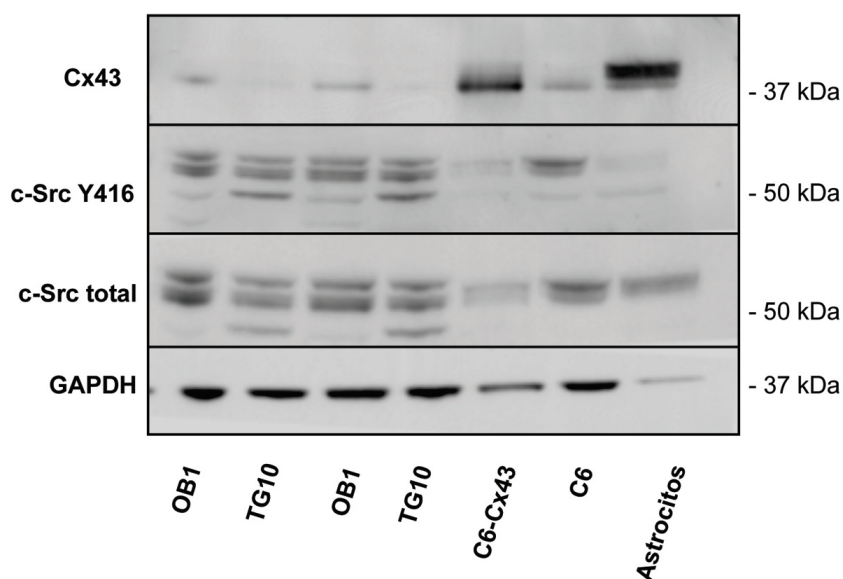
**Figura 6. Expresión de la Cx43 y actividad de c-Src en líneas celulares de glioma humano**

Las proteínas de las células de glioma humano HTB12 y HTB138, U373 y T98-G se extrajeron tal y como se describe en Material y Métodos. Western blot de Cx43, c-Src Y416 y c-Src total. Se empleó GAPDH como control de carga. Como control positivo de la Cx43 se emplearon proteínas de astrocitos y como control positivo de c-Src Y416 muestras de células C6 de glioma de rata.



Nuestros resultados muestran que todas las células presentan menos niveles de Cx43 que los astrocitos, que se utilizaron como control positivo de Cx43. Las líneas HTB12 y U373 son las que poseen mayor expresión de Cx43 (figura 6). En cuanto a la actividad de c-Src, utilizamos muestras de células C6 de glioma de rata como control positivo de c-Src Y416. Las líneas HTB12, HTB138 y T98-G presentan, al igual que la línea C6, niveles iguales o superiores de c-Src activo que de c-Src total, mientras que la línea U373 presenta menos actividad de c-Src que c-Src total, al igual que ocurre en los astrocitos.

Tal y como se ha comentado, las GSC son las más resistentes a los tratamientos y muy tumorigénicas, por ello son una excelente diana terapéutica. Para ello, comprobados los bajos niveles de Cx43 y alta actividad de c-Src en las líneas de gliomas humanos, analizamos, a continuación, las células madre de glioblastomas de pacientes. Estas muestras de proteínas fueron cedidas por el Dr. Hervé Chneiweiss (Laboratorio de plasticidad glial, de la Universidad París Descartes). Las muestras procedentes de las células denominadas OB1 (Oligoastrocitoma de grado III) y TG10 (glioblastoma multiforme de grado IV) (Silvestre et al. 2011) se analizaron por Western blot.



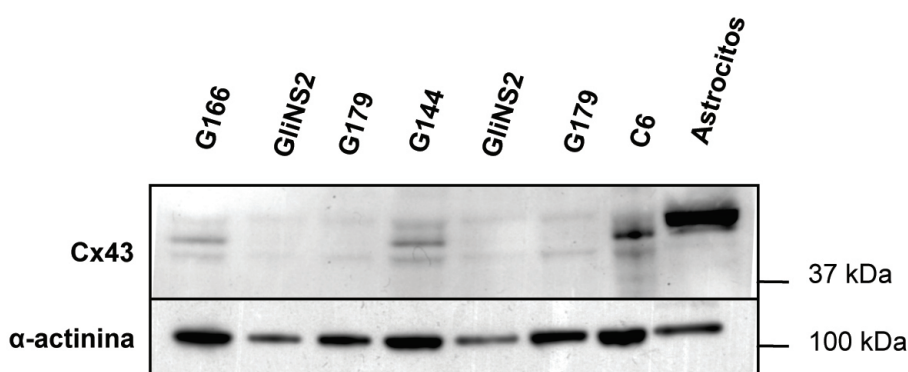
**Figura 7. Expresión de la Cx43 y actividad de c-Src en las células madre de gliomas de pacientes.**

Las proteínas de las células madre de glioblastomas de pacientes OB1 y TG10 se extrajeron tal y como se describe en Material y Métodos. Western blot de Cx43, c-Src Y416 y c-Src total. Se utilizó GAPDH como control de carga. Como control positivo de la Cx43 se emplearon proteínas de astrocitos y C6-Cx43 y como control positivo de c-Src Y416, muestras de células C6 de glioma de rata.

## Resultados

En la figura 7 se observa que los niveles de expresión de la Cx43 en las GSC de pacientes son muy bajos, comparados con astrocitos y C6-Cx43 (células C6 de glioma de rata transfectadas establemente con Cx43). De hecho, los niveles de la Cx43 en OB1 y TG10 son incluso más bajos que en la línea celular C6 de glioma de rata. Tanto los niveles de c-Src total como la actividad de c-Src fueron muy elevados en las muestras de células madre de pacientes, siendo similar a las células C6 de glioma de rata y muy superior a los encontrados en astrocitos o en C6-Cx43.

Una vez estudiada la expresión de la Cx43 y la actividad de c-Src en las GSC humanas, aprovechamos que el laboratorio pionero en el estudio de GSC ya había caracterizado y depositado GSC de pacientes en el repositorio de células Biorep. Decidimos estudiar estas células por su utilidad para futuros experimentos de manipulación génica. Por tanto, estudiamos los niveles de Cx43 y la actividad de c-Src mediante Western blot, en las células G166, GliNS2, G179, G144 (Pollard et al. 2009).

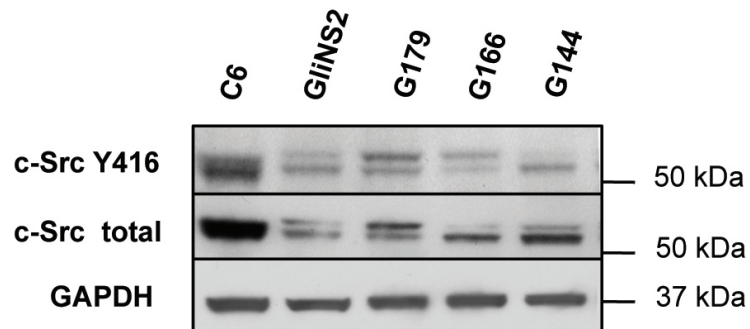


**Figura 8. Expresión de la Cx43 en líneas de células madre de glioma humano**

Las células madre de glioma G166, GliNS2, G179 y G144 se cultivaron y cuando las células alcanzaron la confluencia, se recogieron las proteínas para el análisis de Cx43 por Western blot. Como control de carga se utilizó GAPDH. Se emplearon proteínas de astrocitos y muestras de C6 como control positivo de Cx43.

En la figura 8 observamos los niveles de expresión de la Cx43 en estas células. La línea GliNS2 resultó ser, junto con la línea G179, la que menos expresión de la Cx43 presentó, incluso menos que la línea celular C6 de glioma de rata. Las otras dos líneas G144 y G166 presentaron niveles más altos de Cx43, pero inferiores a los niveles de Cx43 en astrocitos y C6. Por otro lado, en la figura 9 se muestran los niveles de c-Src Y416 y c-Src total en estas

células. Se observa que todas ellas tienen actividad de c-Src y las líneas G144 y G166 presentan una actividad de c-Src más baja, comparada con la observada en las líneas GliNS2 y G179. Se puede observar que las líneas celulares con más actividad de c-Src son, como hemos visto en la figura 8, las que tienen menos expresión de Cx43.



**Figura 9. Actividad de c-Src en líneas de células madre de glioma humano**

Las células madre de glioma GliNS2, G179, G166 y G144 se cultivaron y cuando las células alcanzaron la confluencia, se recogieron las proteínas para el análisis de c-Src Y416 y c-Src total por Western blot. Como control de carga se utilizó GAPDH. Se emplearon muestras de glioma de rata C6 como control positivo de c-Src Y416.

### 4.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de la conexina-43 en células madre de glioma humano.

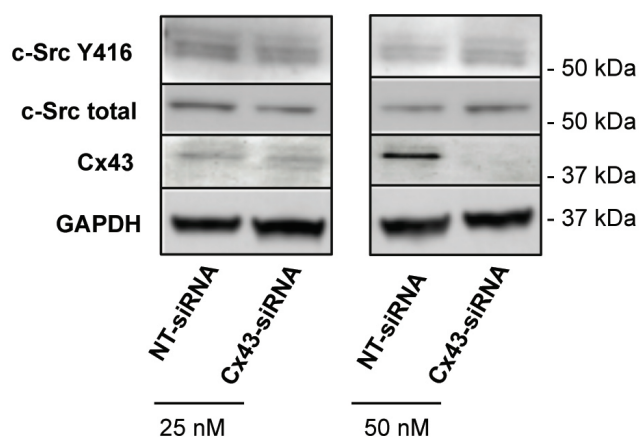
Una vez conocida la baja expresión de Cx43 y la actividad de c-Src en las GSC humano, quisimos conocer el efecto de los cambios en la Cx43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las GSC. Para reducir la expresión de la Cx43, utilizamos el silenciamiento mediante la técnica del siRNA, en la línea G166. Para aumentar la expresión de la Cx43 en la línea GliNS2, transfectamos estas células con un plásmido que contiene la región codificadora de la Cx43 humana.

#### 4.2.1 Efecto del silenciamiento de la conexina-43 en células madre de glioma humano.

Con el objetivo de reducir la expresión de la Cx43, utilizamos la línea G166, por ser una de las líneas de células madre que tiene más expresión de Cx43. Para disminuir la expresión de Cx43, pusimos a punto el silenciamiento de esta proteína mediante la técnica del siRNA. Una vez silenciada la expresión de la Cx43, se evaluó la actividad de c-Src y también la velocidad de proliferación de estas células.

##### 4.2.1.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina-43 en las células madre de glioma G166.

Para silenciar la Cx43, las células madre de glioma G166 se transfectaron con un siRNA específico para el silenciamiento de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), que empleamos como control, tal y como se describe en Material y Métodos. Ambas secuencias se emplearon a una concentración 25 o 50 nM.



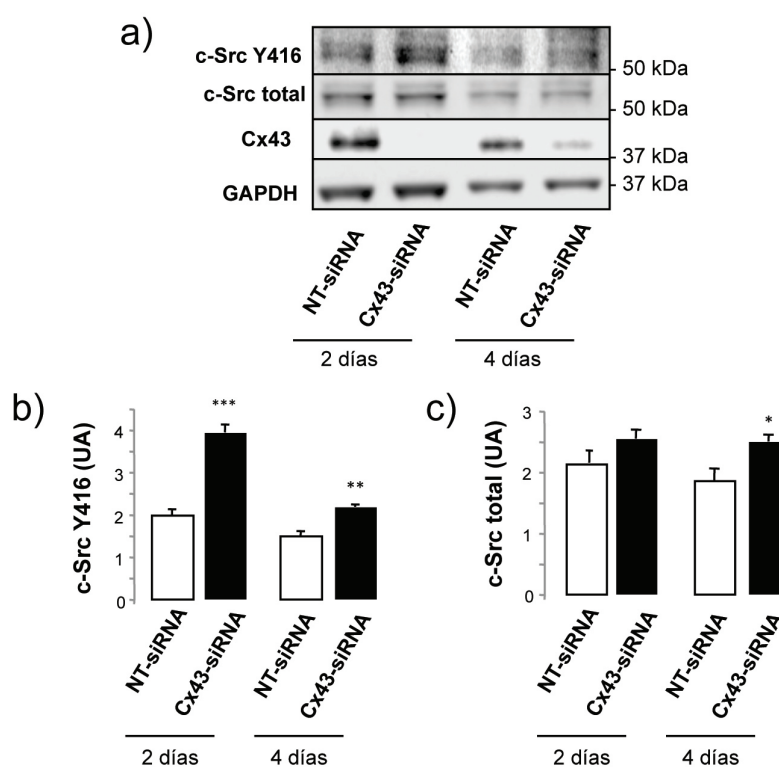
**Figura 10. Puesta a punto del silenciamiento de la Cx43 de las células madre de glioma G166**

Las células madre de glioma G166 se transfectaron con diferentes concentraciones (25 nM o 50 nM) de NT-siRNA o Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas 48h después de la transfección. Western blot de c-Src Y416, c-Src total y Cx43. Se utilizó GAPDH como control de carga.

La figura 10 muestra que, 48 horas después de la transfección con Cx43-siRNA 50 nM, el nivel de Cx43 disminuyó, comparado con las células transfectadas con NT-siRNA. Cuando empleamos 25 nM de Cx43-siRNA, no encontramos un silenciamiento significativo de la Cx43. Además, en esta figura podemos observar cómo en las células transfectadas con 50 nM de Cx43-siRNA, en las que se ha conseguido silenciar la proteína Cx43, los niveles de actividad de c-Src aumentan respecto a las células transfectadas con NT-siRNA. Por lo tanto, en los siguientes experimentos utilizamos la concentración de 50 nM.

#### 4.2.1.2. Efecto del silenciamiento de la conexina-43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células madre de glioma G166.

Una vez puesto a punto el silenciamiento de la Cx43 en estas células, se quiso determinar el efecto de la pérdida de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en la línea G166. Para ello, las células se transfectaron con 50 nM del siRNA de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) y se recogieron proteínas 2 y 4 días después de la transfección. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante la técnica de Western blot.



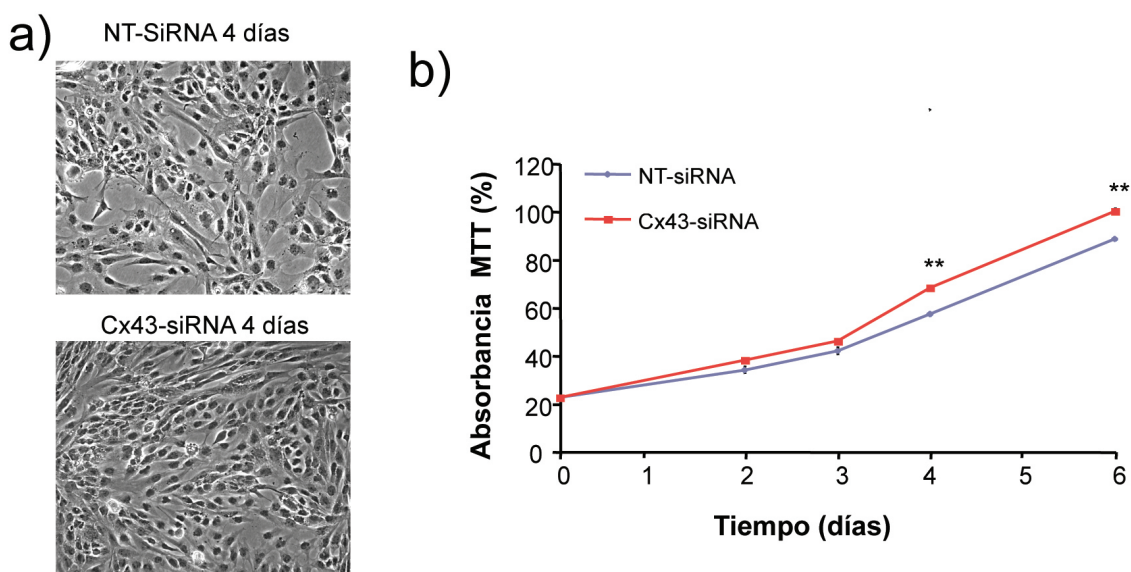
**Figura 11. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en las células madre de glioma G166**

Las células madre de glioma G166 se transfectaron con 50 nM de NT-siRNA o Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas 2 y 4 días después de la transfección. **a)** Western blot de c-Src Y416, c-Src total, Cx43 y GAPDH. Los valores de c-Src Y416 (**b)** y c-Src total (**c)** fueron cuantificados y normalizados con GAPDH. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresan como \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 (test t de Student).

## Resultados

En la figura 11a se observa que 2 días después de la transfección los niveles de la Cx43 se redujeron notablemente, mientras que a los 4 días el efecto del silenciamiento es menor, aunque se mantiene. Además, en la figura 11a también vemos que la forma activa de c-Src, 2 días después de la transfección, se duplica en las células transfectadas con Cx43-siRNA, comparándolas con las transfectadas con NT-siRNA. A los 4 días de la transfección este aumento es del 40% (figura 11b). La cuantificación de los niveles de c-Src total, muestra que 4 días después de la transfección estos niveles aumentan, aproximadamente, un 25% en las células transfectadas con Cx43-siRNA respecto a las NT-siRNA (figura 11c).

Para conocer el efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la proliferación de las GSC, las células G166 se transfectaron con el siRNA de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) y se determinó el número de células vivas por placa, desde 3 horas hasta 6 días después de la transfección, mediante el ensayo de la absorbancia del MTT, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.



**Figura 12. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre el crecimiento en las células madre de glioma G166**

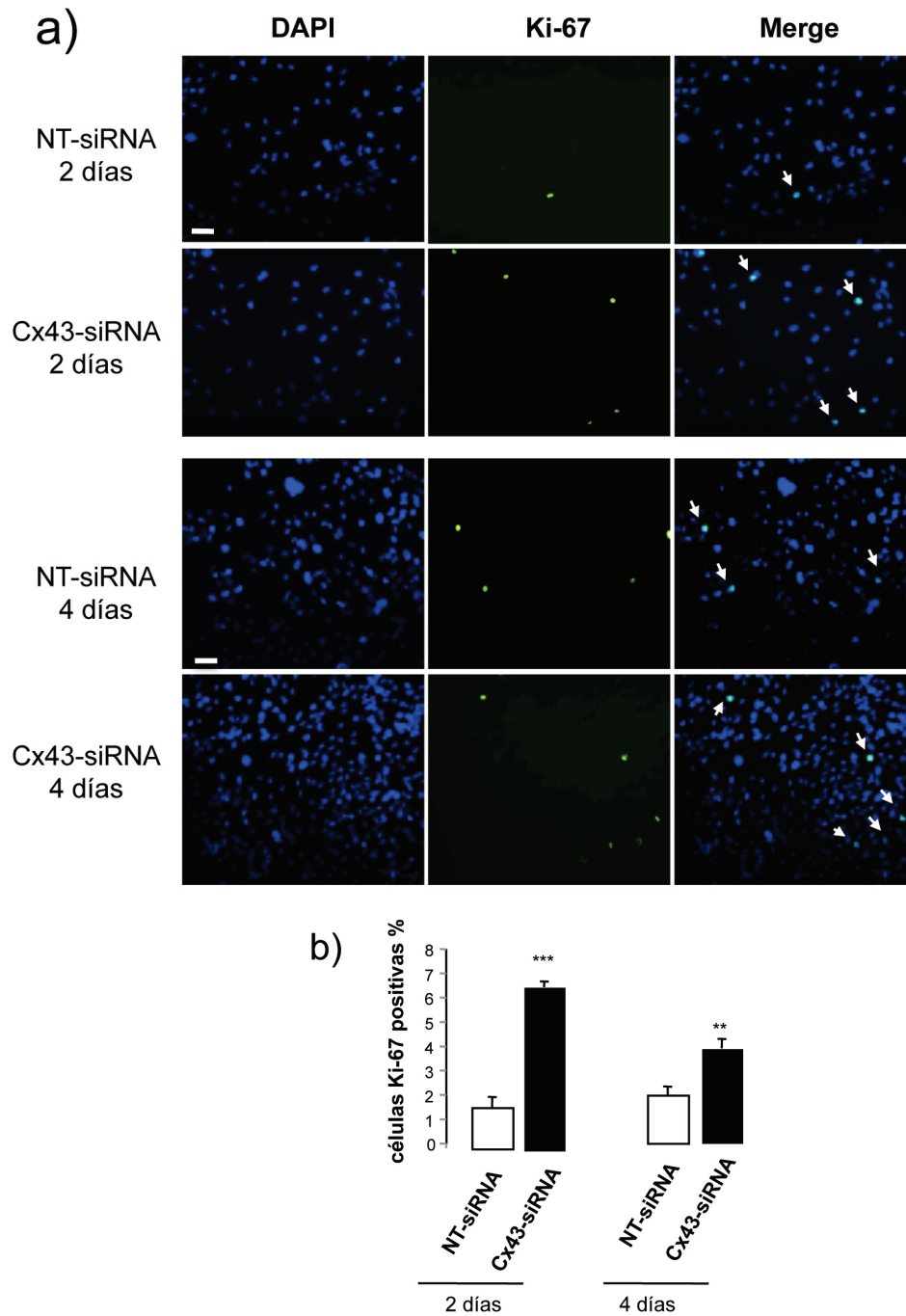
Las células madre de glioma G166 se transfectaron con 50 nM de NT-siRNA o Cx43-siRNA. Fotomicrografías representativas en contraste de fases, que muestran el aumento de la densidad celular cuando transfectamos con Cx43-siRNA. Tres horas después de la transfección, y durante 6 días, se hicieron medidas del número de células viables por placa, mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo valor de absorbancia a día 6 y son medias + SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como \*\* p<0,01 (test t de Student).

Como se muestra en las imágenes de contraste de fases, la densidad celular aumentó 4 días después de la transfección con Cx43-siRNA (figura 12a). Esta observación se confirmó analizando el crecimiento mediante MTT. La transfección con Cx43-siRNA promovió un aumento en el número de células, de aproximadamente un 20%, 4 días después de la transfección y se mantuvo constante hasta el día 6 (figura 12b).

Con objeto de averiguar si el aumento de células observado en las células G166 cuya Cx43 había sido silenciada se debía a un aumento de la velocidad de la proliferación, se analizó la expresión de la proteína Ki-67. Gerdes *et al* describieron que Ki-67 está presente en el núcleo de las células en estado proliferativo, pero ausente en las células quiescentes (Gerdes et al. 1991; Gerdes et al. 1983).

Para ello, las células G166 transfectadas con Cx43-siRNA o NT-siRNA, se fijaron 2 y 4 días después de la transfección para realizar una inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos.

La figura 13a muestra imágenes, de las células G166 transfectadas con NT-siRNA o Cx43-siRNA. Las células se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI (tiñe la totalidad de los núcleos celulares) y con el anticuerpo contra Ki-67, mostrándose imágenes de ambas tinciones en el mismo campo. Nuestros resultados muestran que 2 días después de la transfección hay más núcleos Ki-67 positivos en las células en las que se ha silenciado la Cx43. Efecto que se observa también después de 4 días. La figura 13b muestra el porcentaje de núcleos Ki-67 positivos con respecto al número total de núcleos, 2 y 4 días después de la transfección. Se observa que 2 días después de la transfección hay un incremento importante del porcentaje de núcleos Ki-67 positivos en las células que se ha silenciado la Cx43. Cuatro días después de la transfección se observa un aumento, aunque menor del porcentaje de núcleos Ki-67 positivos en las células que se ha silenciado la Cx43.



**Figura 13. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la expresión de la proteína Ki-67 en las células madre de glioma G166**

Las células madre de glioma G166 se transfectaron con 50 nM de NT-siRNA o Cx43-siRNA. Se fijaron las células 2 y 4 días después de la transfección, para realizar una inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Las fotomicrográficas muestran la tinción nuclear con DAPI, la inmunocitoquímica de Ki-67 y la superposición de ambas, 2 y 4 días después de la transfección con siRNA. Las células que son positivas para Ki-67 se señalan con una flecha en la imagen superpuesta. Barra= 20µm. **b)** Porcentaje de células Ki-67 positivas 2 y 4 días después de la transfección. Se cuantificó el porcentaje de células Ki-67 positivas con respecto al número total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  (test *t* de Student).



#### 4.2.2. Efecto de la restauración de la conexina-43 en células madre de glioma humano

Para estudiar el efecto de la ganancia de función de la Cx43 en las GSC humano elegimos las células GliNS2, que prácticamente carecen de expresión de Cx43 (figura 8). En primer lugar, se construyó un plásmido bicistrónico que codificase nuestra proteína de interés, la Cx43 humana. Posteriormente, se puso a punto la transfección de las GSC y se transfectaron las células GliNS2 con dicho plásmido.

##### 4.2.2.1. Construcción del plásmido pIres-Cx43.

#### I.A. Clonación de la secuencia del cDNA de la región codificadora de la Cx43 humana.

Para la obtención del cDNA de la región codificadora de la Cx43 humana se buscó el mRNA de la Cx43 humana en la base de datos del *GenBank* del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI), obteniéndose la secuencia que aparece en la figura 14a, con el número de identificación: NM\_000165.3. La zona en color azul corresponde a la región codificadora del mRNA. A continuación seleccionamos oligonucleótidos específicos flanqueando la región codificadora, que actuaron de cebadores en la reacción de RT-PCR (Fig.14b). Para la síntesis del cDNA de la Cx43 se utilizó como molde el RNA total de GliNS2. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo tal y como se describe en Material y Métodos, sección 3.2.3. El resultado de la RT-PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez obtenido el cDNA codificador de la Cx43, se purificó y se diseñaron nuevos oligonucleótidos específicos que contuvieran secuencias de restricción para las enzimas Age I y BamH I (Fig. 14c). Se llevó a cabo una segunda PCR y el producto resultante se analizó en una electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose una banda ligeramente superior a 1 Kb, que se corresponde con el tamaño de la región codificadora de la Cx43, de 1149 pb. Este fragmento se purificó, obteniéndose el cDNA de la región codificadora de la Cx43, cuyos extremos contenían secuencias de restricción para las enzimas Age I y BamH I (Fig. 15).

## Resultados

a)

```

1   gagtcagtgg cttgaaactt ttaaaagctc tgtgctccaa gttacaaaaa agcttttacg
61  aggtatcagc acttttcttt cattaggggg aaggcgtgag gaaagtacca aacagcagcg
121 gagttttaa ctttaaatag acaggctctg gtgcctgaac ttgccttttc attttacttc
181 atcctccaag gagttcaatc acttggcgtg acttcactac ttttaagcaa aagagtggtg
241 cccaggcaac atgggtgact ggagcgcctt aggcbaactc cttgacaagg ttcaagccta
301 ctcaactgct ggaggggaag tgtggctgct agtacttttc attttccgaa tctgtctgct
361 ggggacagcg gttgagtcag cctggggaga tgagcagtct gcctttcgtt gtaacactca
421 gcaacctggt tgtgaaaatg tctgctatga caagtctttc ccaatctctc atgtgcgctt
481 ctgggtcctg cagatcatat ttgtgtctgt acccacactc ttgtacctgg ctcatgtggt
541 ctatgtgatg cgaaaggaag agaaactgaa caagaaagag gaagaactca aggttgccca
601 aactgatggt gtcaatgtgg acatgcactt gaagcagatt gagataaaga agttcaagta
661 cgggtattgaa gagcatggtg aggtgaaaat gcgagggggg ttgctgcgaa cctacatcat
721 cagtatcctc ttcaagtcta tctttgaggt ggcttcttgg ctgatccagt ggtacatcta
781 tggattcagc ttgagtgctg tttacacttg caaaagagat ccctgccac atcaggtgga
841 ctgtttcctc tctcgcccca cggagaaaac catcttcac atcttcacgc tggtggtgct
901 cttggtgtcc ctggccttga atatcattga actcttctat gttttcttca agggcgtaa
961 ggatcgggtt aagggaaaga gcgaccctta ccatgcgacc agtggtgctc tgagccctgc
1021 caaagactgt gggctcctcaa aatatgctta tttcaatggc tgctcctcac caaccgctcc
1081 cctctcgcct atgtctcctc ctgggtacaa gctgggtact ggcgacagaa acaattcttc
1141 ttgccgcaat tacaacaagc aagcaagtga gcaaaactgg gctaattaca gtgcagaaca
1201 aaatcgaatg gggcagggcg gaagcacat ctctaactcc catgcacagc cttttgatt
1261 ccccgatgat aaccagaatt ctaaaaaact agctgctgga catgaattac agccactagc
1321 cattgttgaa cagcgacctt caagcagagc cagcagtcgt gccagcagca gacctggcc
1381 tgatgacctg gagatctaga tacaggcttg aaagcatcaa gattccactc aattgtggag
1441 aagaaaaaag gtgctgtaga aagtgcacca ggtgttaatt ttgatccggt ggaggtggta
1501 ctcaacagcc ttattcatga ggcttagaaa -----3130
  
```

b)

Cadena sentido: 5'- ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAG-3'

Cadena antisentido: 5'- CTAGATCTCCAGGTCATCAGG-3'

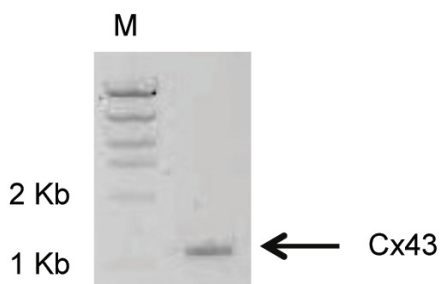
c)

Cadena sentido: 5'- TATATACCGGTATGGGTGACTGGAGCGCCTT-3'  
Age I

Cadena antisentido: 5'- CGGGATCCCGCTAGATCTCCAGGTCATCAG-3'  
BamH I

**Figura 14. Secuencia de la región codificadora de la Cx43 humana y oligonucleótidos diseñados para su amplificación.**

a) En el cDNA del mRNA de la Cx43 humana obtenido de la base de datos del NCBI con número de identificación NM 000165.3, se localizó la secuencia codificadora de la proteína de 1149 pb, señalada en azul y rojo. En color rojo están los oligonucleótidos seleccionados como cebadores para la primera amplificación de la Cx43. b) Cebadores empleados para la amplificación. c) Cebadores con las secuencias que contienen los sitios de restricción (en negro y subrayados) de las enzimas Age I y BamH I, diseñados para la clonación en el vector pIRESpuro2.



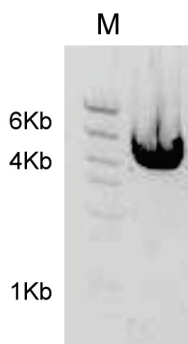
**Figura 15. Amplificación de la secuencia de la Cx43 humana.**

Para la amplificación de la Cx43 se realizó una RT-PCR, empleando los cebadores descritos en la figura 15b y como molde el RNA de la línea celular GliNS2. El resultado de la RT-PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo una banda ligeramente superior a 1Kb, que corresponde al tamaño del cDNA de la secuencia codificadora de la Cx43 (1149 pb). M: marcador de tamaño de DNA.

### I.B. Inserción del la secuencia del cDNA codificador de la Cx43 en el vector pGEM-T Easy.

El fragmento con los sitios de restricción de cDNA de Cx43 humana obtenido, se insertó en el plásmido pGEM-T Easy (véase esquema 14 del apartado Material y Métodos). Este vector es lineal y cuenta con una timina en el extremo 3'. La presencia de esta base aumenta la eficiencia de ligación de productos de PCR con el vector, ya que la Taq polimerasa deja desoxiadenosinas en el fragmento de DNA amplificado. Después de la ligación del producto de PCR con el pGEM-T, el plásmido se amplificó mediante transformación bacteriana, utilizando la cepa DH5- $\alpha$  de *E.coli*. Esta cepa transformada se sembró en placas de agar con medio LB más ampicilina, en presencia de IPTG y X-Gal y se cultivó a 37°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron las colonias blancas, las cuales poseían el inserto y se crecieron en volúmenes mayores de medio de cultivo. Todo este proceso se llevó a cabo tal y como se describe en Material y Métodos.

Después de purificarlo, el DNA plasmídico se digirió con la enzima de restricción BamH I y se realizó una electroforesis en el gel de agarosa. El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 16. Se observa una banda situada por encima de 4 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pGEM-T Easy que contiene el inserto de la Cx43 humana.

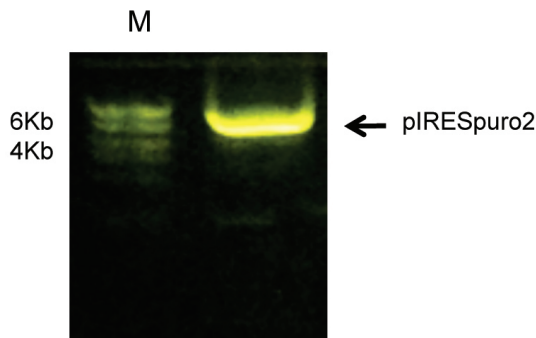


**Figura 16. Resultado de la ligación entre el cDNA de la Cx43 y el vector pGEM-T Easy.**

El producto de la ligación del cDNA de la Cx43 y el pGEM-T Easy, se sometió a transformación bacteriana, se seleccionaron las colonias que crecieron en medio selectivo y se purificó el DNA plasmídico. Éste se digirió con la enzima BamH I, observándose una banda que corresponde con el tamaño esperado del plásmido.

### I.C. Clonación del vector pIRESpuro2.

El vector pIRESpuro2 (véase esquema 15 de la sección Material y Métodos) fue clonado utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. La cepa transformada creció en medio LB más ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Después de purificar el DNA plasmídico, éste se digirió con la enzima de restricción Xho I y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 17 se muestra el resultado de dicha electroforesis, observándose una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pIRESpuro2, de 5,2 Kb.

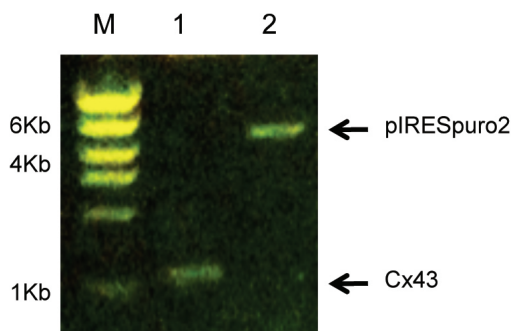


**Figura 17. Clonación del vector pIRESpuro2.**

El vector pIRESpuro2 fue clonado mediante transformación bacteriana. Posteriormente, se purificó y se tomó una alícuota que se digirió con la enzima Xho I, observándose una banda entre 4 y 6 Kb, que corresponde con el tamaño del plásmido pIRESpuro2, de 5,2 Kb. M: marcador de tamaño de DNA.

### I.D. Inserción de la secuencia del cDNA codificador de la Cx43 en el vector pIRESpuro2.

Para llevar a cabo la inserción de la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43 humana en el vector pIRESpuro2, se realizó una digestión enzimática, con las enzimas de restricción Age I y BamH I, del plásmido pGEM-T Easy-Cx43, que contiene la Cx43 con los extremos de restricción para estas enzimas, y del vector pIRESpuro2, que posee un sitio de restricción para cada una de estas enzimas en su sitio de multiclonación (MCS) (véase esquema 15 del apartado Material y Métodos). Tras la digestión, el DNA se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, observándose el resultado en la figura 18. En el carril 1 se observa una banda ligeramente superior a 1 Kb, que se corresponde con el tamaño de la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43, que es de 1,149 Kb. Asimismo, se observa en el carril 2 una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del plásmido pIRESpuro2, de 5,2 Kb. Ambos fragmentos se purificaron para proceder a su ligación.

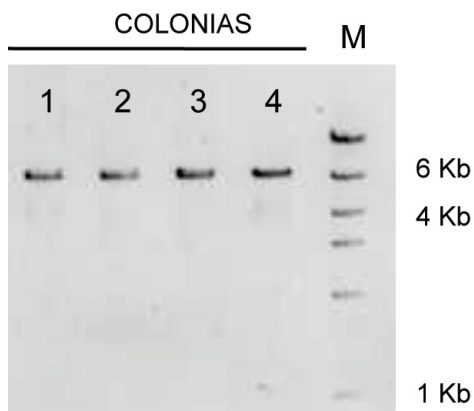


**Figura 18. Digestión enzimática del cDNA de la Cx43 y del vector pIRESpuro2 previamente amplificados**

El cDNA de la Cx43, amplificado según se describe en la figura 15, y el vector pIRESpuro2, se digirieron con las enzimas de restricción Age I y BamH I. En el carril 1 se observa una banda ligeramente superior a 1 Kb, que corresponde al tamaño del cDNA de la Cx43, de 1,149 Kb. En el carril 2 se observa una banda entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del plásmido pIRESpuro2, de 5,2 Kb. M: marcador de tamaño de DNA.

Para la ligación, los fragmentos del cDNA codificador de la Cx43 y del vector pIRESpuro2, obtenidos tras la digestión con Age I y BamH I, se incubaron en presencia de la ligasa T4, tal y como se describe en Material y Métodos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Las bacterias se sembraron en placas de agar con medio LB más ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Al cabo de 24 horas se recogieron 10 colonias y se incubaron en medio LB más ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Posteriormente, se

extrajo el DNA plasmídico de cada una de estas colonias y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, digiriéndolo previamente con Xho I. En la figura 19 se observa la electroforesis correspondiente a 4 de las 10 colonias seleccionadas. Así, las 4 colonias incorporaron la construcción plres-Cx43, ya que se sitúan a una altura más próxima a las 6 Kb, siendo su tamaño teórico 6,3 Kb, aproximadamente.



**Figura 19. Resultado de la ligación entre el cDNA de la Cx43 y el vector pIRESpuro2.**

A partir de los productos de la digestión con Age I y BamH I del cDNA de la Cx43 y del vector pIRESpuro2, se llevó a cabo la ligación de los mismos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana, se seleccionaron las colonias que crecieron en medio selectivo y se purificó el DNA plasmídico. Éste se digirió con la enzima Xho I y se separó en un gel de agarosa. En la imagen se observa el resultado obtenido en 4 de estas colonias. M: marcador de tamaño de DNA.

Una vez seleccionada la colonia número 1, que contenía la construcción plres-Cx43, se amplificó con el fin de incrementar la cantidad de plásmido. Esta colonia creció en medio LB más ampicilina (100 µg/mL) durante 12 horas y después se extrajo el DNA plasmídico. Posteriormente se determinó la concentración de plásmido obtenida y, a continuación, se secuenció el inserto correspondiente a la Cx43 humana, en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca, utilizando los oligonucleótidos especificados en la sección Material y Métodos (apartado 3.2.3.4.). La secuencia obtenida (R.S., Resultado de la Secuenciación) se alineó con la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43 humana (S.C., Secuencia de la Cx43 humana), utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>), obteniéndose un 100% de homología. El resultado del alineamiento se observa en la figura 20.

#### **4.2.2.2. Puesta a punto de la transfección de la construcción plres-Cx43 en células madre de glioma humano GliNS2.**

Puesto que la construcción plres-Cx43 confiere resistencia a la puomicina, en primer lugar se estudió la toxicidad de la puomicina en las células de glioma humano GliNS2 sin transfectar, para seleccionar la concentración de puomicina tóxica para las células GliNS2. Para ello, las células GliNS2 se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Cuando las células estaban pegadas se añadieron concentraciones crecientes de puomicina (0-2 µg/mL). Al cabo de 5 días de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el método MTT. Se midió la absorbancia a 570 nm, la cual es indicativa de las células vivas presentes en cada condición.

## Resultados

```

S.C. 1 ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAGGCAAACCTCTGACAAGGTTCAAGCCTACTCAACTGCT 60
      |||
R.S. 1 ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAGGCAAACCTCTGACAAGGTTCAAGCCTACTCAACTGCT 60

S.C. 61 GGAGGGAAGGTGTGGCTGTCTAGTACTTTTCATTTTCCGAATCCTGCTGCTGGGGACAGCG 120
      |||
R.S. 61 GGAGGGAAGGTGTGGCTGTCTAGTACTTTTCATTTTCCGAATCCTGCTGCTGGGGACAGCG 120

S.C. 121 GTTGAGTCAGCCTGGGAGATGAGCAGTCTGCCTTTCGTTGTAACACTCAGCAACCTGGT 180
      |||
R.S. 121 GTTGAGTCAGCCTGGGAGATGAGCAGTCTGCCTTTCGTTGTAACACTCAGCAACCTGGT 180

S.C. 181 TGTGAAAATGCTGCTATGACAAGTCTTCCCAATCTCTCATGTGCGCTTCTGGGTCCTG 240
      |||
R.S. 181 TGTGAAAATGCTGCTATGACAAGTCTTCCCAATCTCTCATGTGCGCTTCTGGGTCCTG 240

S.C. 241 CAGATCATATTTGTCTGTACCCACACTCTTGTACCTGGCTCATGTGTTCTATGTGATG 300
      |||
R.S. 241 CAGATCATATTTGTCTGTACCCACACTCTTGTACCTGGCTCATGTGTTCTATGTGATG 300

S.C. 301 CGAAAGGAAGAGAACTGAACAAGAAAGAGGAAGAACTCAAGTTGCCAAACTGATGGT 360
      |||
R.S. 301 CGAAAGGAAGAGAACTGAACAAGAAAGAGGAAGAACTCAAGTTGCCAAACTGATGGT 360

S.C. 361 GTCAATGTGGACATGCACCTGAAGCAGATTGAGATAAAGAAGTTCAAGTACGGTATTGAA 420
      |||
R.S. 361 GTCAATGTGGACATGCACCTGAAGCAGATTGAGATAAAGAAGTTCAAGTACGGTATTGAA 420

S.C. 421 GAGCATGGTAAAGTGAAAATGCGAGGGGGTGTCTGCGAACCTACATCATCAGTATCCTC 480
      |||
R.S. 421 GAGCATGGTAAAGTGAAAATGCGAGGGGGTGTCTGCGAACCTACATCATCAGTATCCTC 480

S.C. 481 TTCAAGTCTATCTTGAAGTGGCCTTCTGTCTGATCCAGTGGTACATCTATGGATTGAG 540
      |||
R.S. 481 TTCAAGTCTATCTTGAAGTGGCCTTCTGTCTGATCCAGTGGTACATCTATGGATTGAG 540

S.C. 541 TTGAGTGTCTTTACACTTGCAAAGAGATCCCTGCCACATCAGGTGGACTGTTTCCTC 600
      |||
R.S. 541 TTGAGTGTCTTTACACTTGCAAAGAGATCCCTGCCACATCAGGTGGACTGTTTCCTC 600

S.C. 601 TCTCGCCCCACGGAGAAAACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCC 660
      |||
R.S. 601 TCTCGCCCCACGGAGAAAACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCC 660

S.C. 661 CTGGCCTTGAATATCATTTGAACCTTCTATGTTTTCTCAAGGGCGTTAAGGATCGGGTT 720
      |||
R.S. 661 CTGGCCTTGAATATCATTTGAACCTTCTATGTTTTCTCAAGGGCGTTAAGGATCGGGTT 720

S.C. 721 AAGGGAAGAGCGACCCCTTACCATGCGACAGTGGTGGCTGAGCCCTGCCAAAGACTGT 780
      |||
R.S. 721 AAGGGAAGAGCGACCCCTTACCATGCGACAGTGGTGGCTGAGCCCTGCCAAAGACTGT 780

S.C. 781 GGGTCTCAAAAATATGCTTATTTCAATGGTGTCTCACCACCGCTCCCTCTCGCCT 840
      |||
R.S. 781 GGGTCTCAAAAATATGCTTATTTCAATGGTGTCTCACCACCGCTCCCTCTCGCCT 840

S.C. 841 ATGTCTCCTCTGGGTACAAGCTGGTTACTGGCGACAGAAACAATTCTTCTTCCGCAAT 900
      |||
R.S. 841 ATGTCTCCTCTGGGTACAAGCTGGTTACTGGCGACAGAAACAATTCTTCTTCCGCAAT 900

S.C. 901 TACAACAAGCAAGCAAGTGAAGCAAACTGGGCTAATTACAGTGCAGAACAAAATCGAATG 960
      |||
R.S. 901 TACAACAAGCAAGCAAGTGAAGCAAACTGGGCTAATTACAGTGCAGAACAAAATCGAATG 960

S.C. 961 GGGCAGGCGGGAAGCACCATCTTAACCTCCATGCACAGCCTTTTGATTTCCCGATGAT 1020
      |||
R.S. 961 GGGCAGGCGGGAAGCACCATCTTAACCTCCATGCACAGCCTTTTGATTTCCCGATGAT 1020

S.C. 1021 AACCAGAATTCTAAAAAAGTAGCTGCTGGACATGAATTACAGCCACTAGCCATTGTGGAC 1080
      |||
R.S. 1021 AACCAGAATTCTAAAAAAGTAGCTGCTGGACATGAATTACAGCCACTAGCCATTGTGGAC 1080

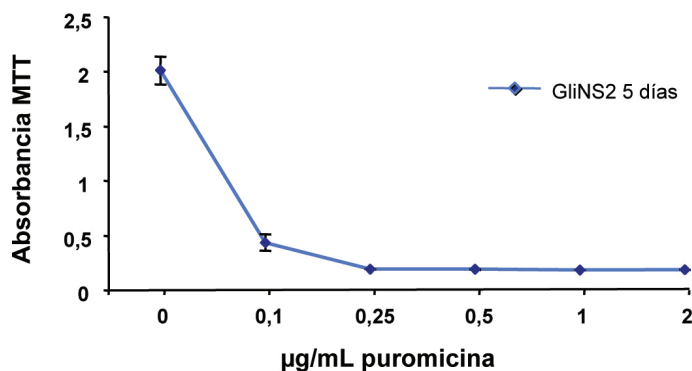
S.C. 1081 CAGCGACCTTCAAGCAGAGCCAGCAGTCTGTCAGCAGCAGACCTCGGCCTGATGACCTG 1140
      |||
R.S. 1081 CAGCGACCTTCAAGCAGAGCCAGCAGTCTGTCAGCAGCAGACCTCGGCCTGATGACCTG 1140

S.C. 1141 GAGATCTAG 1149
      |||
R.S. 1141 GAGATCTAG 1149
  
```

**Figura 20. Resultado del alineamiento de la secuencia clonada, obtenida por secuenciación automática, con la secuencia de la región codificadora de la Cx43 humana.**

La secuencia del cDNA de la Cx43, obtenida mediante secuenciación automática a partir de la construcción plasmídica plres-Cx43 (R.S.: Resultado de la secuenciación) se alineó frente a la secuencia del cDNA de la proteína Cx43 humana, con número de identificación NM 000165.3 (S.C.: Secuencia de la Cx43), utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). El resultado del alineamiento fue 100% de homología.

En la figura 21 se puede observar que la puromicina es muy tóxica, incluso a bajas concentraciones. Se eligió la concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como la concentración necesaria para seleccionar las células con resistencia a la puromicina, por expresar el plásmido pIres-Cx43, el cual confiere resistencia a la puromicina.

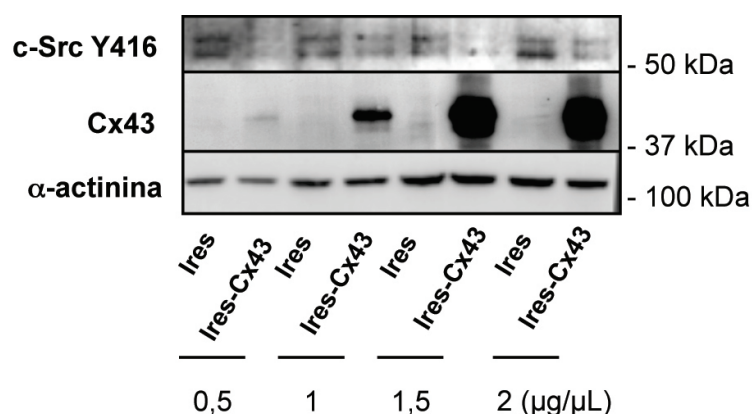


**Figura 21. Evaluación de la toxicidad de la puromicina en las células madre de glioma humano GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se resembraron a una densidad de 1000 células/ $\text{cm}^2$ . Pasadas 24 horas, se inició el tratamiento con concentraciones crecientes de puromicina (0-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Después de cuatro días, se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante el método del MTT. Los resultados son medias  $\pm$  SEM (n=6).

El siguiente paso fue transfectar las células madre de glioma GliNS2 con el plásmido pIres-Cx43 (Ires-Cx43), así como con el vector vacío (Ires). Se realizó mediante la técnica de electroporación, tal y como se describe en Material y Métodos. Lo primero que hicimos fue transfectar con diferentes concentraciones de plásmido (0,5-2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A las 48 horas de la transfección, se recogieron las proteínas y se realizó una transferencia tipo Western para determinar la expresión de la Cx43.

En la figura 22 se observa un aumento de expresión de la Cx43 a medida que aumenta la concentración de plásmido. En este mismo experimento analizamos la actividad de c-Src y, como se puede observar, las células transfectadas con el plásmido que contiene Cx43 tienen menos Src activo, incluso a las concentraciones más bajas de plásmido. Después de analizar estos resultados, seleccionamos la concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para restaurar los niveles de expresión de Cx43 sin sobreexpresar esta proteína.



**Figura 22. Dosis-respuesta de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con diferentes concentraciones (0,5, 1, 1,5 y 2 µg/µL) de plásmido Ires o Ires-Cx43 y se recogieron las proteínas 48h después de la transfección. Western blot de c-Src Y416, c-Src total y Cx43. Se utilizó α-actinina como control de carga.

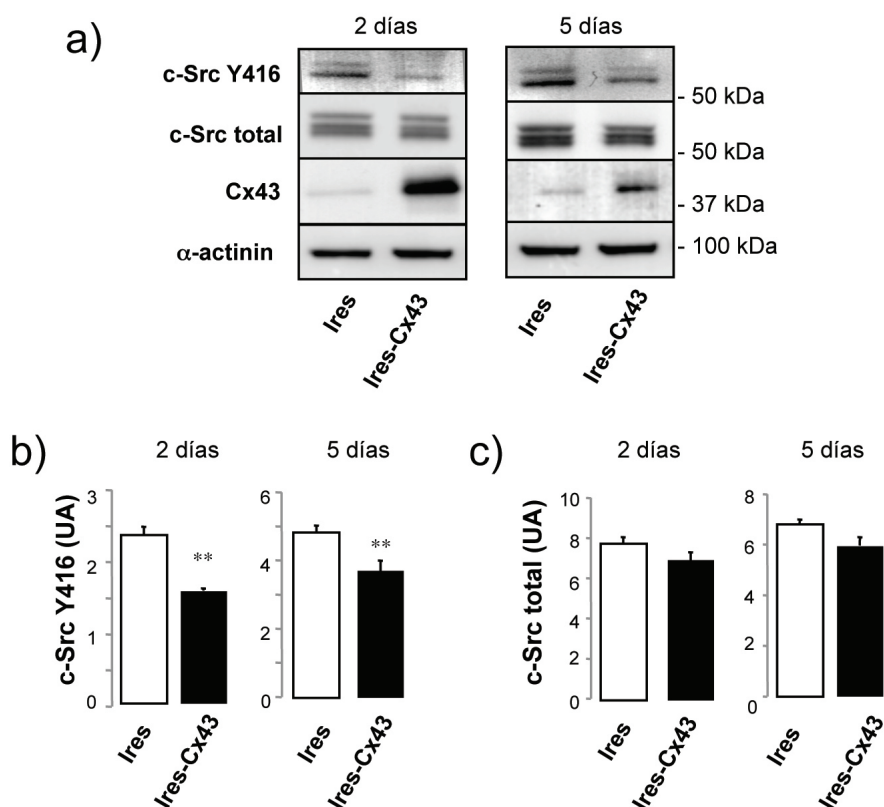
#### **4.2.2.3. Efecto de la restauración de la conexina-43 sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células madre de glioma GliNS2.**

Una vez obtenido el plásmido pIres-Cx43 y puesta a punto su transfección, estudiamos el efecto de la ganancia de función de la Cx43 sobre la actividad de c-Src en la línea GliNS2. Para ello, las células GliNS2 se transfectaron por electroporación con 1 µg/µL de la construcción Ires-Cx43, o con el vector vacío Ires, y se recogieron proteínas 2 y 5 días después de la transfección. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante la técnica de Western blot.

La figura 23 muestra que la transfección con Ires-Cx43 disminuyó, aproximadamente, un 35% y un 25% la forma activa de c-Src, 2 y 5 días después de la transfección, respectivamente. Sin embargo, los niveles de c-Src total no se modificaron significativamente con la restauración de la Cx43.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la transfección de la Cx43 en las células C6 de glioma disminuye considerablemente la velocidad de proliferación de estas células (Zhu et al. 1991). Por ello, una vez comprobado que la restauración de la Cx43 disminuye la actividad de c-Src en las células madre de glioma humano, decidimos estudiar la velocidad de proliferación en estas circunstancias. Para ello, las células madre de glioma GliNS2, se transfectaron con 1 µg/µL de los plásmidos Ires e Ires-Cx43 y se determinó el número de células vivas por placa mediante el ensayo de absorbancia de MTT, desde 3 horas hasta 7 días después de la transfección.





**Figura 23. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre actividad de c-Src en las células madre de glioma GliNS2.**

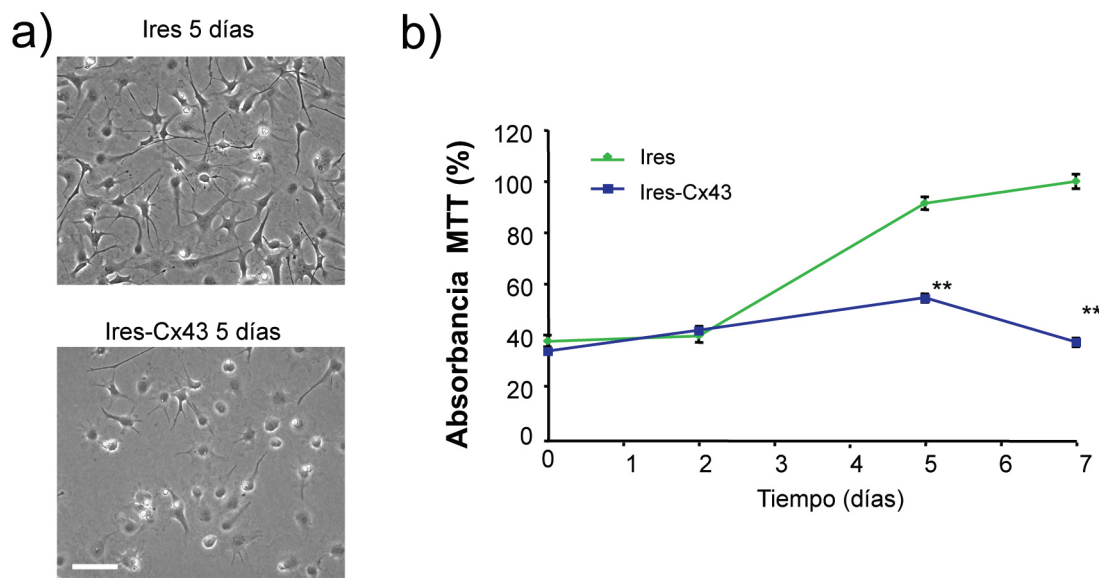
Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires o Ires-Cx43 y se recogieron las proteínas 2 y 5 días después de la transfección. **a)** Western blot de c-Src Y416, c-Src total, Cx43 y  $\alpha$ -actinina. Los valores de c-Src Y416 (**b**) y c-Src total (**c**) fueron cuantificados y normalizados con  $\alpha$ -actinina. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) y son medias  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresan como \*\* $p < 0,01$  (test  $t$  de Student).

En las imágenes de contraste de fases (figura 24a) se observa que la restauración de la Cx43 redujo la densidad celular a los 5 días de la transfección. De hecho, la figura 24b muestra que las células transfectadas con Cx43 (Ires-Cx43) tienen una curva de crecimiento analizada por MTT, menor que las células transfectadas con el plásmido vacío (Ires), siendo esta diferencia altamente significativa al cabo de 5 y 7 días.

Puesto que, como se ha explicado previamente, la determinación de Ki-67 da un idea del estado proliferativo de las células (Gerdes et al. 1983), analizamos si la disminución del crecimiento se debía a una disminución en la proliferación de estas células. Para ello, las células GliNS2 transfectadas con Ires-Cx43 o Ires, se fijaron 2 y 5 días después de la

## Resultados

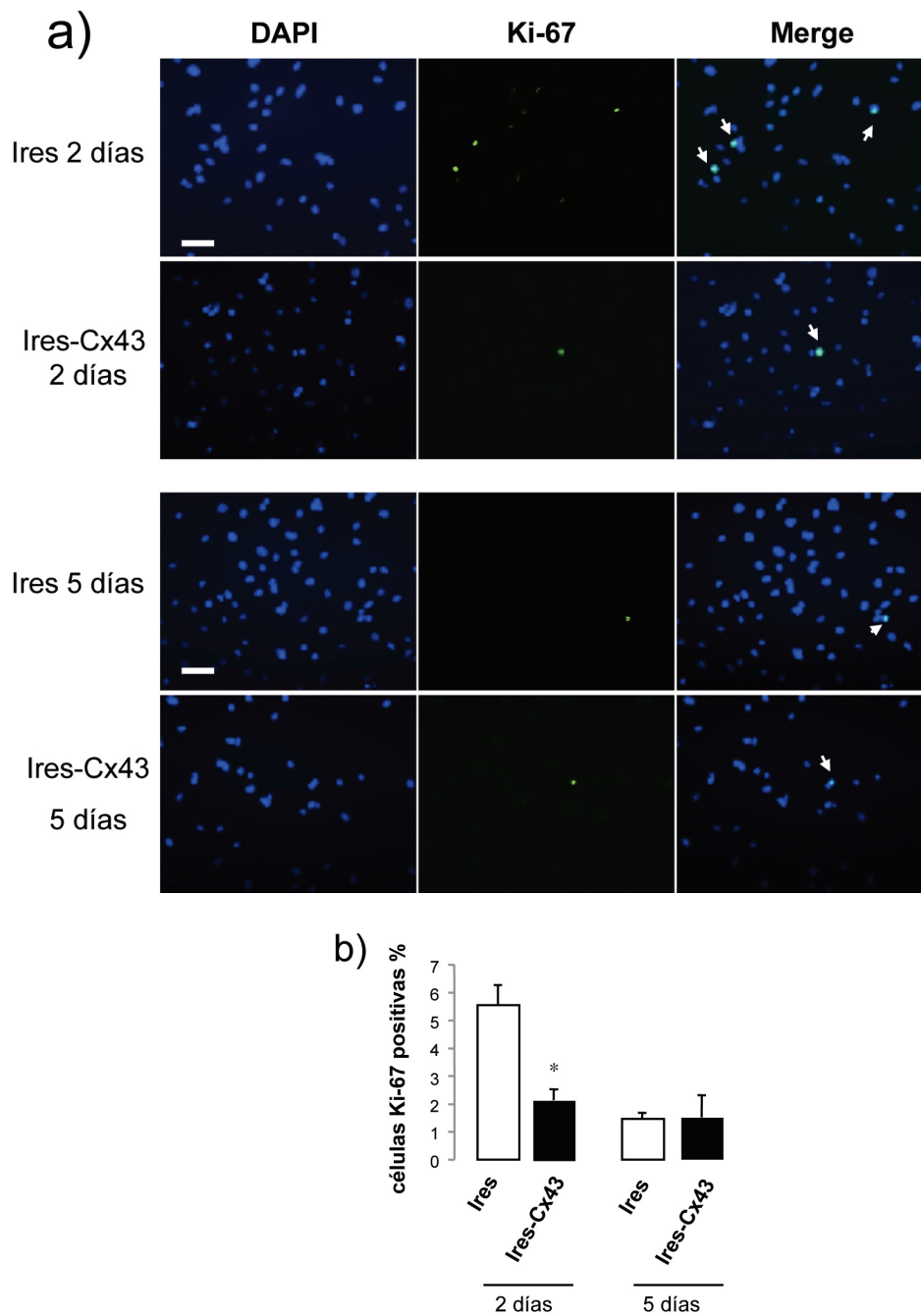
transfección con paraformaldehído, para realizar una inmunocitoquímica contra Ki-67, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.



**Figura 24. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre el crecimiento de las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires o Ires-Cx43. **a)** Fotomicrografías representativas en contraste de fases, que muestran la disminución de la densidad celular cuando transfectamos con Ires-Cx43. Barra=  $20\mu\text{m}$ . **b)** A partir de 3 h desde la transfección, y durante 7 días, se hicieron medidas del número de células viables por placa, mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo valor de absorbancia a día 7 y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*  $p < 0,01$  (test *t* de Student).

La figura 25a muestra imágenes de las células GliNS2 transfectadas con Ires o Ires-Cx43. Las células se tiñeron con colorante fluorescente DAPI (que tiñe la totalidad de los núcleos) y con el anticuerpo contra Ki-67, mostrándose imágenes de ambas tinciones en el mismo campo. Nuestros resultados muestran que 2 días después de la transfección hay menos núcleos Ki-67 positivos en las células en las que hemos restaurado la Cx43. Después de 5 días no se observan diferencias. La figura 25b muestra el porcentaje de núcleos Ki-67 positivos con respecto al número total de núcleos, 2 y 5 días después de la restauración de la Cx43. Se observa una disminución significativa del porcentaje de núcleos Ki-67 positivos, 2 días después de la transfección con el vector Ires-Cx43, comparadas con las células transfectadas con el vector vacío. Cinco días después de la transfección no se observan diferencias significativas.



**Figura 25. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre la expresión de la proteína Ki-67 en las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires ó Ires-Cx43. Se fijaron las células 2 y 5 días después de la transfección, para realizar una inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Las fotomicrografías muestran la tinción nuclear con DAPI, la inmunocitoquímica de Ki-67 y la superposición de ambas, 2 y 5 días después de la transfección con los plásmidos. Las células que son positivas para Ki-67 se señalan con una flecha en la imagen superpuesta. Barra=  $20\mu\text{m}$ . **b)** Porcentaje de células Ki-67 positivas 2 y 5 días después de la transfección. Se cuantificó el porcentaje de células Ki-67 positivas con respecto al número total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como \*  $p<0,05$  (test  $t$  de Student).

### **4.3. Efecto de la restauración de la conexina-43 sobre el fenotipo característico de células madre de glioma.**

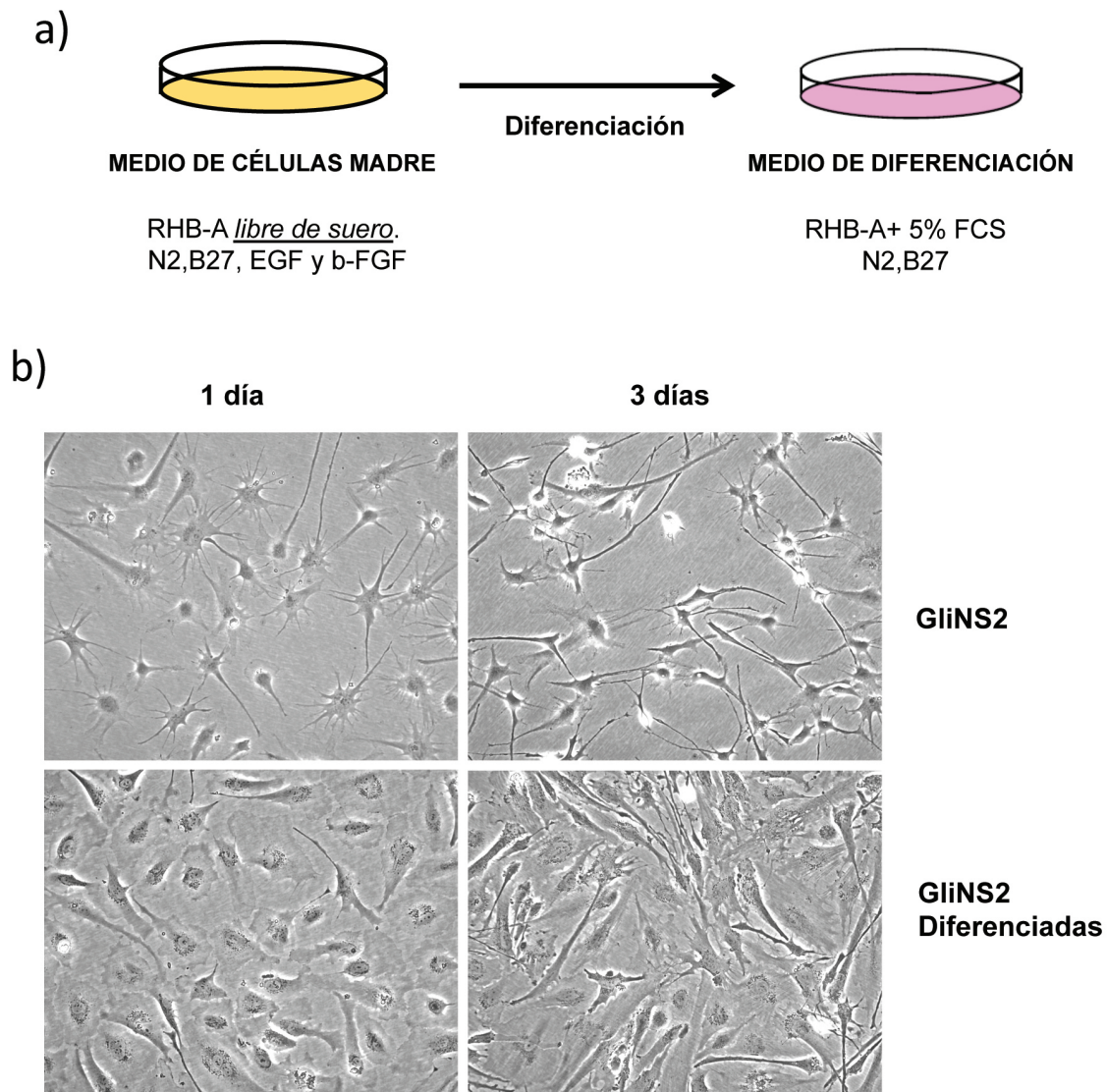
Como hemos mencionado anteriormente los gliomas están compuestos de una población heterogénea de células. Algunas de ellas poseen características de células madre y son las llamadas células madre del glioma. Estas células se caracterizan por su autorrenovación, la generación de múltiples tipos de células, su alto potencial oncogénico y la resistencia a los tratamientos convencionales (Dirks 2010b). Muchos autores sugieren que este fenotipo de célula madre es reversible, siendo este punto crítico para la búsqueda de una nueva estrategia terapéutica (Chen et al. 2012; Friedmann-Morvinski et al. 2012).

Una de las características mencionadas es la capacidad de estas células de generar múltiples linajes. Pollard *et al* han caracterizado exhaustivamente las células empleadas en este trabajo y han descrito que son capaces de perder el fenotipo de célula madre y diferenciarse en astrocitos cuando se retiran del medio los factores de crecimiento EGF y b-FGF y se añade un 5% de FCS. Los factores de crecimiento suprimen la capacidad de estas células de diferenciarse en diferentes linajes (neuronas, oligodendrocitos y astrocitos), además de conferirle su capacidad de autorrenovación (Pollard et al. 2009). Por lo tanto, estas células son un excelente modelo para poder estudiar la pérdida del fenotipo de célula madre.

Recientemente Yu *et al* han mostrado que la Cx43 revierte el fenotipo de célula madre de glioma y, consecuentemente, reduce su tumorigenicidad (Yu et al. 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de la Cx43 en el fenotipo de las células madre de glioma humano GliNS2, así como el mecanismo molecular responsable de este efecto.

#### **4.3.1. Efecto de la conexina-43 en el fenotipo de las células madre de glioma, en presencia o ausencia de suero.**

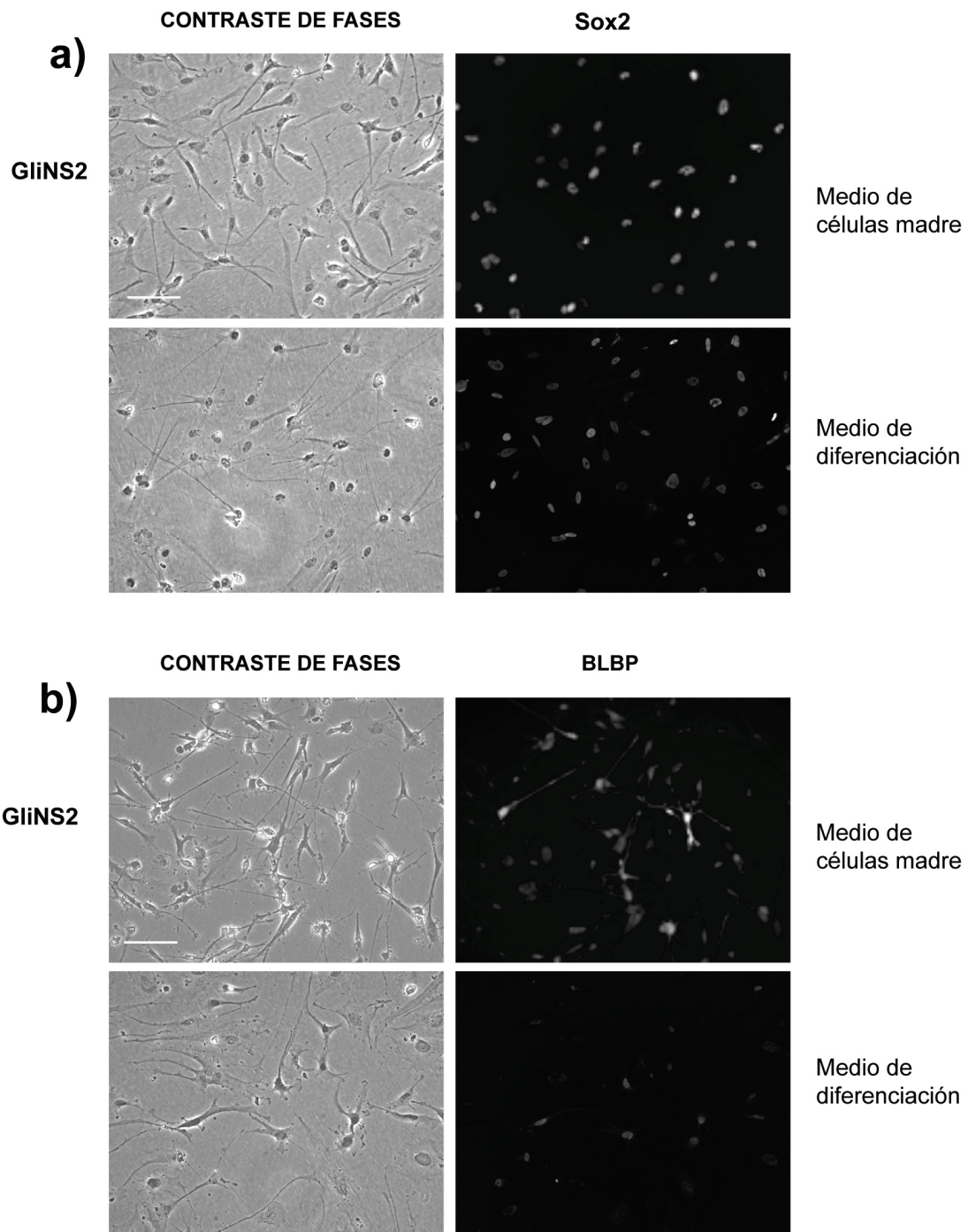
Como ya se ha mencionado anteriormente, las células madre de glioma GliNS2 pueden diferenciarse a astrocitos (Pollard et al. 2009). Nuestro siguiente objetivo fue determinar los cambios producidos por la diferenciación de las GSC. Para promover la diferenciación, el medio habitual empleado para el crecimiento de células madre (medio de células madre), se cambió por el medio de diferenciación en el que se retiraron el EGF y el b-FGF y se añadió un 5% de FCS (figura 26a). En la figura 26b se pueden observar los cambios morfológicos producidos por las condiciones de diferenciación. Las células parecen estar más adheridas a la placa y hay más contacto entre ellas, cuando están diferenciadas.



**Figura 26. Efecto de la diferenciación en la morfología de las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se resembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. **a)** Para promover la diferenciación se retiraron el b-FGF y EGF del medio de células madre y se añadió un 5% de FCS (medio de diferenciación). **b)** Las fotomicrografías muestran los cambios morfológicos al cabo de 1 y 3 días después de mantenerse en condiciones de diferenciación.

Quisimos saber si estos cambios morfológicos se acompañaban de modificaciones en la expresión de los marcadores de células madre. En primer lugar analizamos la expresión de Sox2, un factor de transcripción responsable de la autorrenovación de las células madre (Singh et al. 2012), que se emplea frecuentemente como marcador del fenotipo de células madre. Además, analizamos la expresión de BLBP, un marcador característico de la glía radial o de los progenitores en estadios tempranos.



**Figura 27. Efecto de la diferenciación sobre los marcadores de células madre Sox2 y BLBP, en las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se resembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Se cultivaron en medio de células madre o medio de diferenciación y se fijaron 3 días después para realizar una inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Fotomicrografías de contraste de fases y la tinción con Sox2 para las células GliNS2 y las células GliNS2 diferenciadas. **b)** Fotomicrografías de contraste de fases y de la tinción con BLBP para las células GliNS2 y las células GliNS2 diferenciadas.

Para ello, las células madre GliNS2 se cultivaron en medio de células madre o en condiciones de diferenciación, y se fijaron 3 días después con paraformaldehído, para realizar una inmunocitoquímica tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

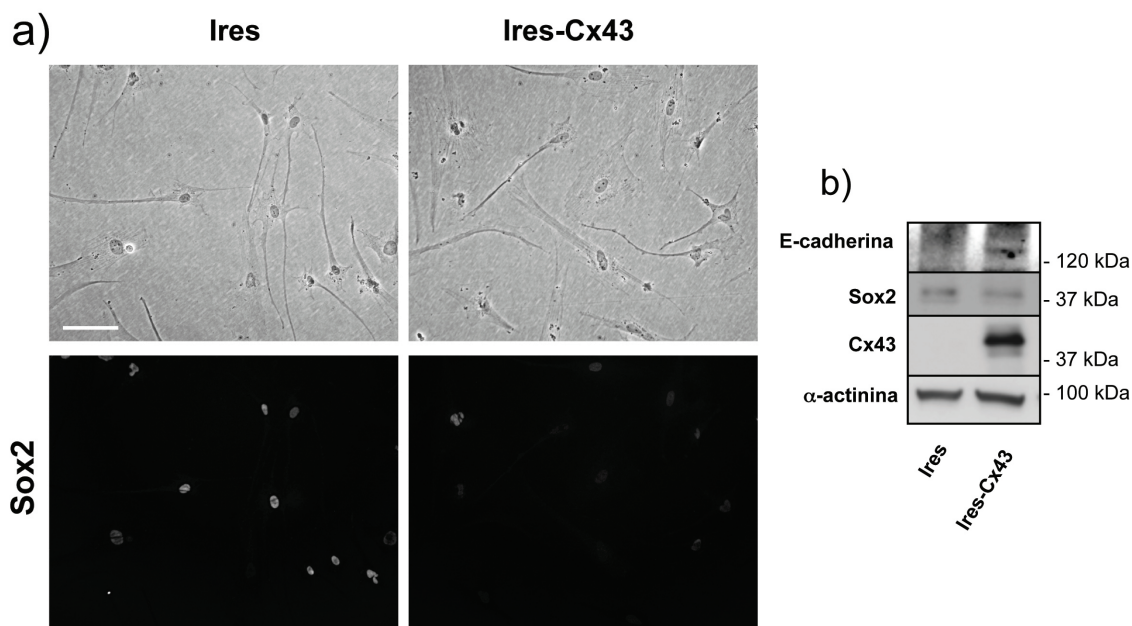
En las figuras 27a y 27b se observa que las células GliNS2, en condiciones de diferenciación, tienen menos expresión de los marcadores Sox2 y BLBP que las células en las condiciones de cultivo de célula madre. Por lo tanto, las condiciones de diferenciación promueven cambios en la morfología y provocan una disminución de la expresión de marcadores de células madre, como son Sox2 y BLBP.

Estudios recientes sugieren que el fenotipo de GSC se puede revertir (Yu et al. 2012). Yu et al han mostrado que transfectando Cx43 en las GSC, obtenidas de la línea celular U87 y cultivadas en condiciones de diferenciación, se reduce la expresión de algunos marcadores de células madre, como Sox2, y aumenta la expresión de E-cadherina. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue confirmar este efecto de la Cx43 en las células madre GliNS2.

Para ello, las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de los plásmidos Ires e Ires-Cx43 y se cultivaron en condiciones de diferenciación. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección.

En la figura 28a se muestra que las células en las que se ha restaurado la Cx43 tienen menos expresión de Sox2 comparadas con las células transfectadas con el plásmido vacío. El Western blot de la figura 28b confirma la disminución de Sox2 en las células a las que se ha restaurado la Cx43. Además, se observa un aumento de la expresión de E-cadherina en estas células.

Confirmando el efecto de la Cx43 en condiciones de diferenciación quisimos investigar si la Cx43 podría revertir el fenotipo de células madre en ausencia de suero. Hay que recordar que el suero presente en el medio de diferenciación es capaz de revertir el fenotipo de célula madre (figura 27) (Pollard et al. 2009). Por tanto, las células se transfectaron y cultivaron en condiciones de célula madre y se procesaron para analizar por Western blot o inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección.



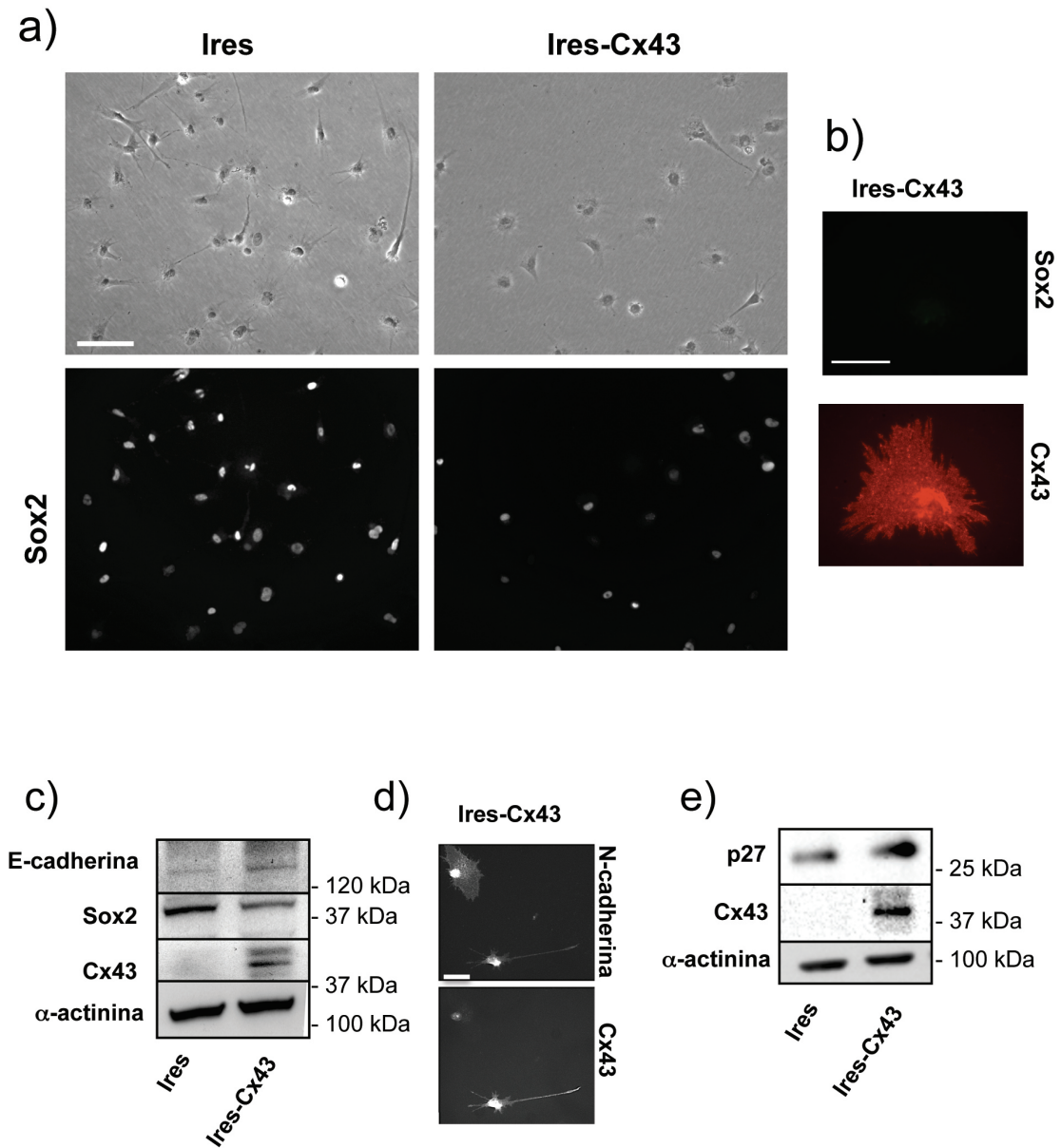
**Figura 28. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Sox2 y E-cadherina, en la línea de células madre de glioma GliNS2 en condiciones de diferenciación.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires o Ires-Cx43 y se cultivaron en medio de diferenciación. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. **a)** Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Sox2. **b)** Western blot de E-cadherina, Sox2, Cx43 y  $\alpha$ -actinina.

En la figura 29a se muestran fotomicrografías de la inmunocitoquímica de Sox2 en las células transfectadas. Los resultados indican que los niveles de Sox2 disminuyen en las células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43, comparadas con células transfectadas con el plásmido Ires. Más específicamente, Sox2 disminuye en las células que contienen niveles muy altos de Cx43 (figura 29b). La figura 29c muestra el Western blot que confirma la disminución de Sox2 y el aumento de E-cadherina en las células GliNS2 en las que se ha restaurado la Cx43 en ausencia de suero.

Numerosos estudios han mostrado la pérdida de E-cadherina en tumores (Nieman et al. 1999; Wheelock et al. 2001), en muchas ocasiones acompañado por una ganancia de N-cadherina, que promueve la movilidad e invasión de las células (Hazan et al. 2000; Nieman et al. 1999). Por tanto, quisimos determinar la expresión de N-cadherina en nuestras condiciones experimentales. La figura 29d muestra que en las células GliNS2 que expresan Cx43 disminuye la expresión de N-cadherina, sugiriendo que la Cx43 promueve el cambio en la expresión de las isoformas de cadherinas en las GSC. Es decir, se produce un cambio de E-cadherina por N-cadherina.





**Figura 29. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Sox2, E-cadherina, N-cadherina y p27 en la línea de células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires ó Ires-Cx43. Se cultivaron en condiciones de célula madre. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. **a)** Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Sox2. Barra=  $20\mu\text{m}$  **b)** Doble inmunocitoquímica de Sox2 y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43. Barra=  $10\mu\text{m}$  **c)** Western blot de E-cadherina, Sox2, Cx43 y  $\alpha$ -actinina. **d)** Doble inmunocitoquímica de N-cadherina y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43. **e)** Western blot de p27, Cx43 y  $\alpha$ -actinina.

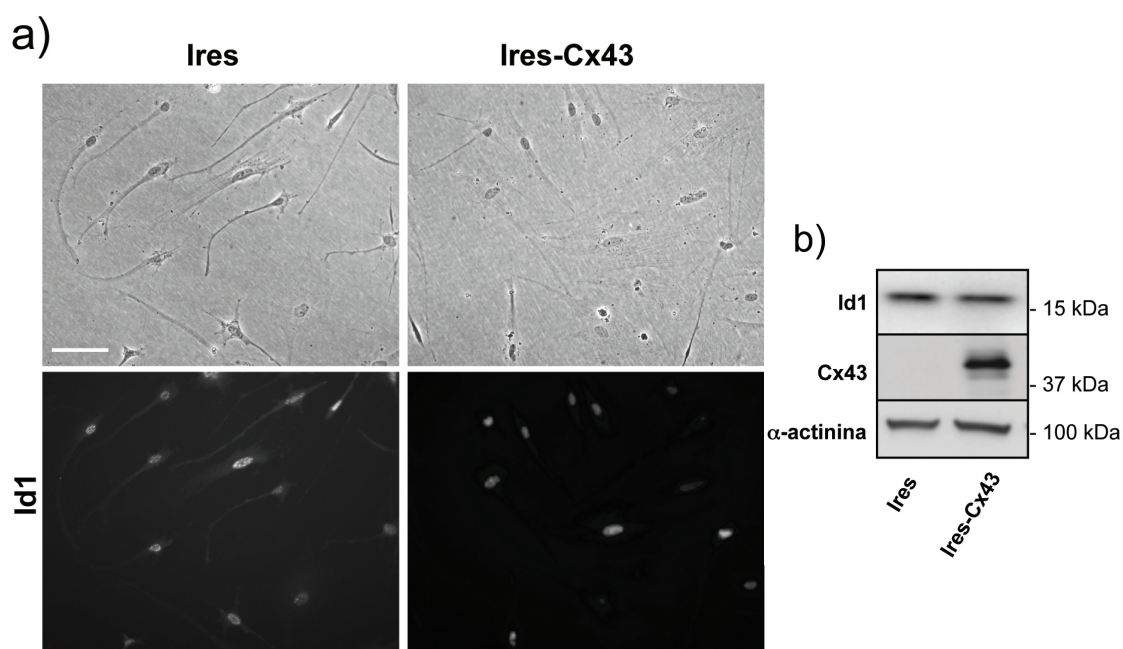
### 4.3.2. Estudio de la vía de señalización de la conexina-43 en las células madre de glioma.

Estudios recientes muestran que las células que carecen del supresor tumoral p27 presentan unos niveles de expresión de Sox2 muy altos. De hecho, estos estudios demuestran que p27 contribuye a la represión de Sox2 (Li et al. 2012). Estudios anteriores de nuestro laboratorio mostraron que la sobreexpresión de la Cx43 en células C6 de glioma aumentaba los niveles de expresión del supresor tumoral p27 (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Por lo tanto, decidimos investigar la expresión de p27 en las GSC cuando se restauran los niveles de Cx43. En el Western blot de la figura 29e se observa que las células en las que se ha restaurado la Cx43 aumenta la expresión de p27, sugiriendo que puede contribuir a la represión de Sox2 observada en estas circunstancias.

Tanto la expresión de Sox2 (Soroceanu et al. 2013) como el cambio de N-cadherina a E-cadherina (Cheung et al. 2011) están reguladas por el inhibidor de diferenciación Id1. El regulador transcripcional Id1 juega un papel crítico, modulando la invasividad en células de glioma. Así, la inhibición de Id1 reduce la invasividad de las células y la expresión de marcadores mesenquimales (Soroceanu et al. 2013). Por tanto, decidimos investigar si Id1 podría participar en los cambios de expresión de Sox2 y en el intercambio de N-cadherina por E-cadherina promovido por la Cx43.

Para ello, siguiendo el mismo protocolo experimental, analizamos la expresión de Id1. Al igual que hicimos con los marcadores Sox2 y E-cadherina, realizamos los experimentos en condiciones de diferenciación y en condiciones de células madre.

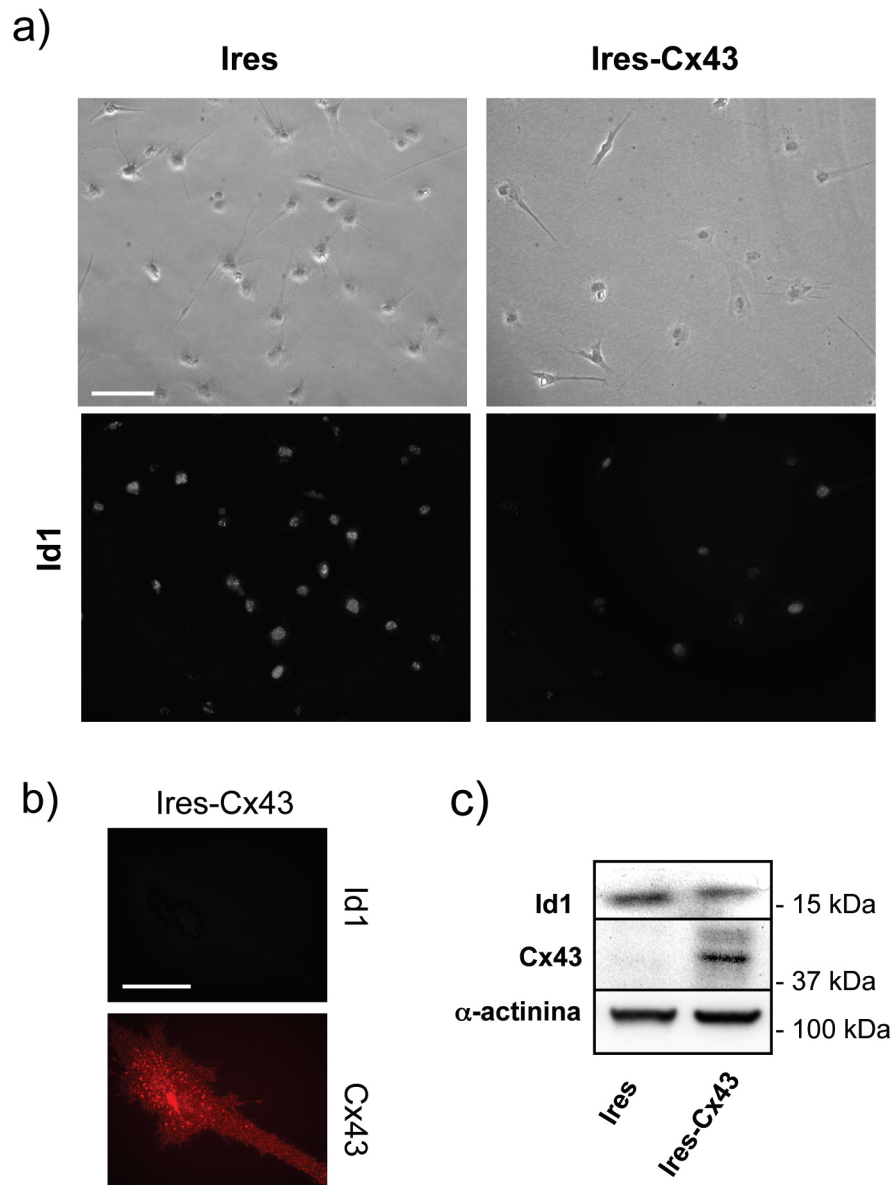
En la figura 30a se muestran imágenes de las células transfectadas e incubadas en condiciones de diferenciación. Las imágenes muestran que las células en las que se ha restaurado la Cx43, tienen menos expresión de Id1, comparadas con las células transfectadas con el plásmido vacío. El Western blot de la figura 30b confirma la disminución en la expresión de Id1 en las células en las que se ha restaurado la Cx43.



**Figura 30. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Id1 en las células madre de glioma GliNS2 en condiciones de diferenciación.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires o Ires-Cx43. Se cultivaron en medio de diferenciación. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. **a)** Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Id1. **b)** Western blot de Id1, Cx43 y  $\alpha$ -actinina.

En la figura 31a se muestran los resultados obtenidos en ausencia de suero. Las fotomicrografías de la inmunocitoquímica de Id1 en las células transfectadas, muestran que los niveles de Id1 disminuyen en las células que expresan Cx43, comparadas con células transfectadas con el plásmido Ires. Más concretamente, Id1 disminuye en células que contienen niveles más altos de Cx43 (figura 31b). Es de señalar que la disminución de Id1 es más acusada cuando las células están en condiciones de células madre. El Western blot de la figura 31c confirma la disminución de Id1 en las células en las que se ha restaurado la Cx43.



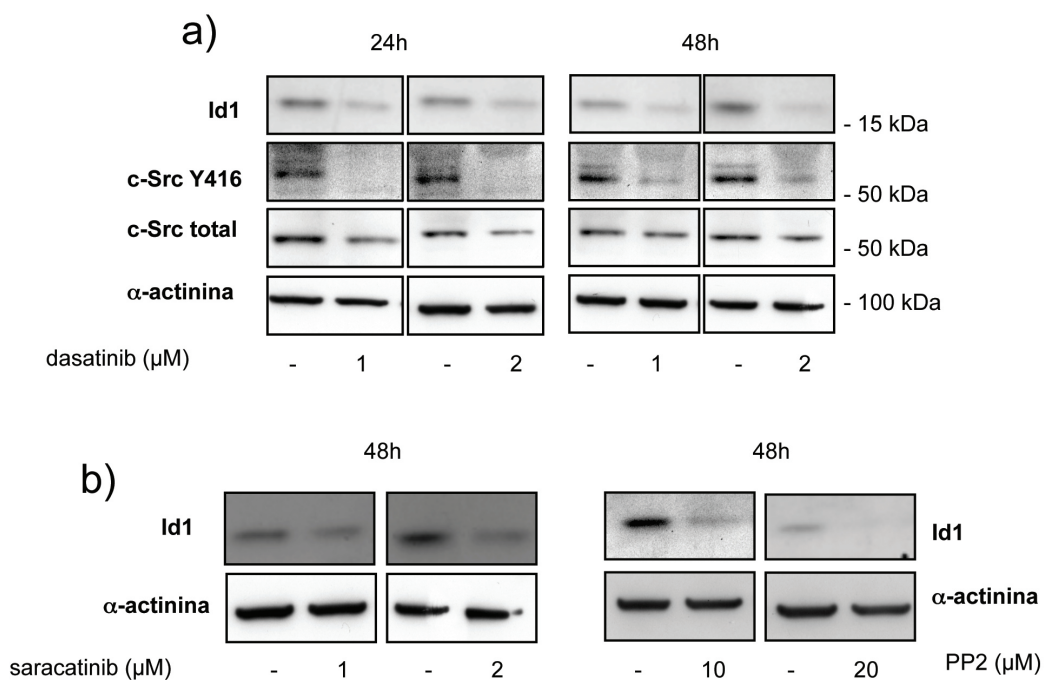
**Figura 31. Efecto de la Cx43 sobre la expresión de Id1 en las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre de glioma GliNS2 se transfectaron con  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plásmido Ires o Ires-Cx43. Se cultivaron en medio de células madre. Las células se procesaron para analizar por Western blot o se fijaron para inmunocitoquímica, 5 días después de la transfección. **a)** Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Id1 **b)** Doble inmunocitoquímica de Id1 y Cx43 en células transfectadas con el plásmido Ires-Cx43. **c)** Western blot de Id1, Cx43 y  $\alpha$ -actinina.

### 4.3.3. Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina-43 sobre el fenotipo de célula madre.

Los resultados descritos anteriormente muestran que la restauración de la Cx43 en las GSC reduce la expresión de Id1. Hay que mencionar que la expresión de Id1 esta regulada por la actividad de c-Src en distintos tipos de células tumorales (Gautschi et al. 2008), aunque no hay nada descrito de esta relación en gliomas. Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran una relación entre la Cx43 y la actividad de c-Src en células C6 de glioma de rata (Herrero-Gonzalez et al. 2010). En este trabajo se muestra que la Cx43 disminuye la actividad de c-Src, la expresión de Id1, la de Sox2 y el cambio de expresión de cadherinas. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue determinar si c-Src era el mediador en el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de GSC. Para ello, en primer lugar analizamos el efecto de la inhibición de c-Src en la expresión de Id1 en las GSC.

Las células GliNS2 se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de la actividad de c-Src: dasatinib, saracatinib y PP2. Se usó siempre como control DMSO, que es el vehículo empleado para disolver estos inhibidores. Las células se procesaron para analizar por Western blot al cabo de 24 y 48 horas.



**Figura 32. Efecto de la inhibición de c-Src sobre la expresión de Id1 en las células madre de glioma GliNS2.**

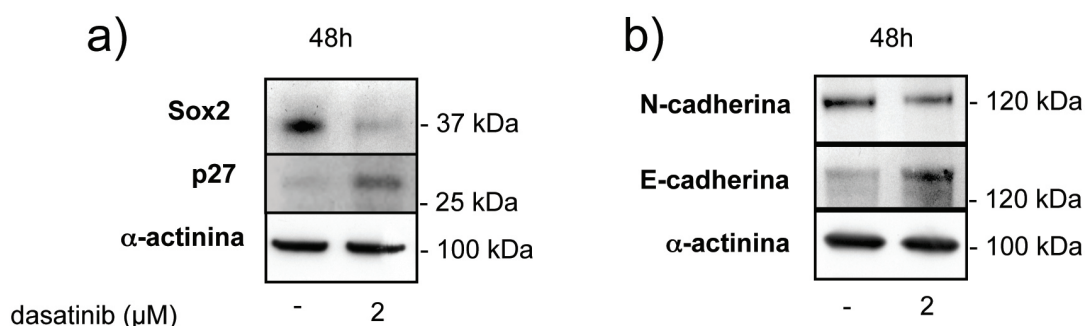
Las células madre de glioma GliNS2 se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de c-Src, dasatinib, saracatinib y PP2, usando siempre como control la misma concentración de DMSO, empleado como vehículo. Al cabo de 24 o 48 horas se recogieron proteínas y se analizaron

## Resultados

La figura 32a muestra cómo la inhibición de la actividad de c-Src con dasatinib disminuye los niveles de expresión de Id1 respecto al control, a las dos concentraciones utilizadas y tanto a 24 como a 48 horas. Estos resultados se corroboraron con saracatinib y PP2 (figura 32b).

Id1 inhibe la unión a DNA de factores de transcripción bHLH implicados en la diferenciación celular (Benezra et al. 1990), y se expresa específicamente en gliomas de alto grado de malignidad (Soroceanu et al. 2013). Como se ha mencionado, Id1 regula la expresión de Sox2 (Soroceanu et al. 2013) y promueve el cambio de N-cadherina por E-cadherina, contribuyendo a la reducción del fenotipo mesenquimal (Cheung et al. 2011). Por lo tanto, estudiamos el efecto de la inhibición de la actividad de c-Src sobre la expresión de Sox2, de p27 y el cambio de cadherinas.

Para ello, inhibimos la actividad de c-Src con dasatinib, usando como control DMSO. Se recogieron las proteínas 48 horas después y se analizaron por Western blot. En la figura 33a se observa cómo al inhibir la actividad de c-Src aumenta la expresión de p27 y disminuye la expresión de Sox2. Además está inhibición promueve una disminución de N-cadherina y un aumento de E-cadherina (figura 33b).



**Figura 33. Efecto de la inhibición de c-Src sobre la expresión de Sox2, p27, E-cadherina y N-cadherina en las células madre de glioma GliNS2.**

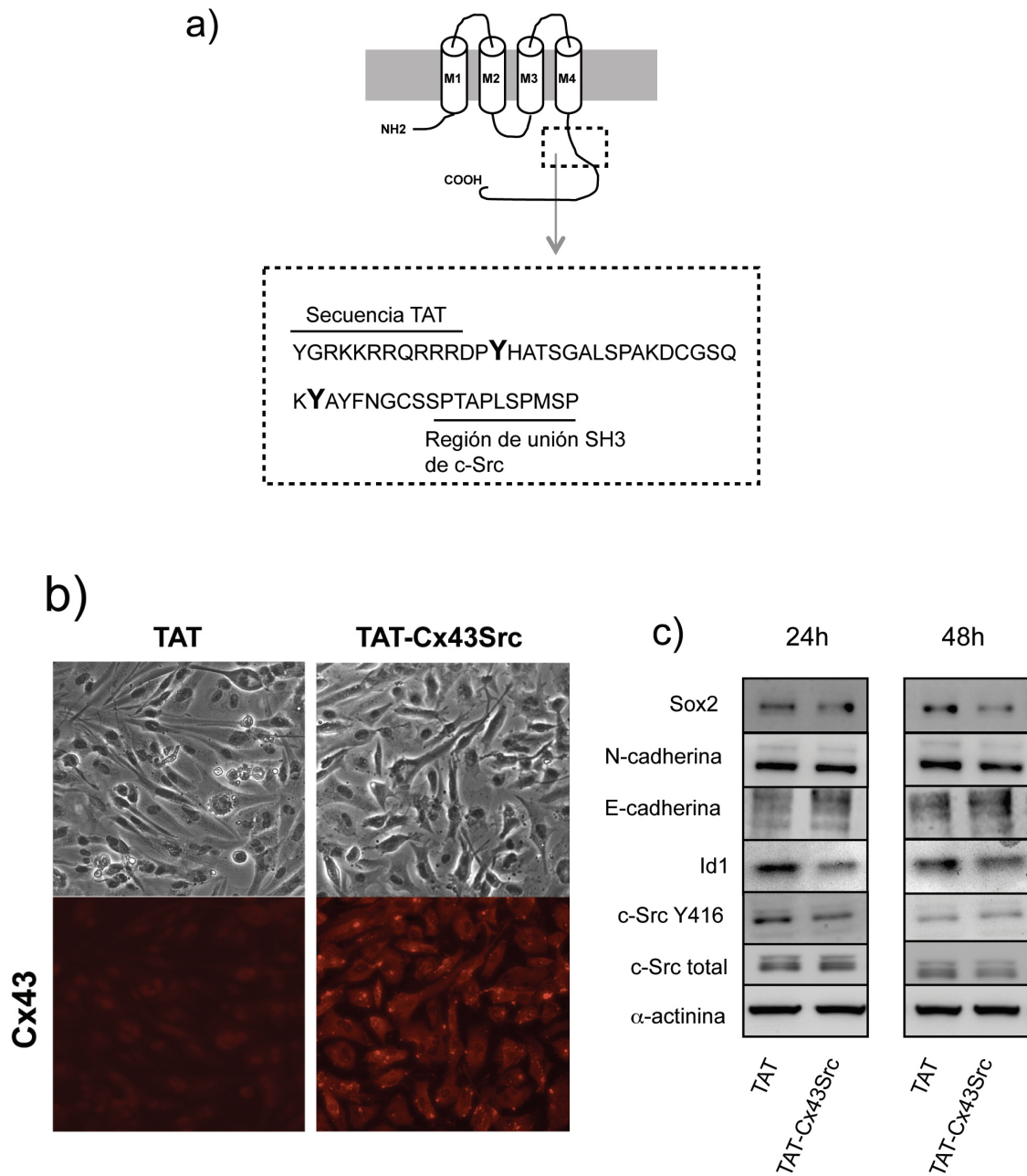
Las células madre de glioma GliNS2 se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en presencia de dasatinib (2μM), usando siempre como control la misma concentración de DMSO, empleado como vehículo. Al cabo de 48 horas se recogieron proteínas y se analizaron mediante análisis de transferencia tipo Western **a)** Western blot de Sox2, p27 y α-actinina. **b)** Western de N-cadherina, E-cadherina y α-actinina.

Una vez conocido el efecto de la inhibición de c-Src sobre el fenotipo de las GSC, quisimos confirmar la participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre el cambio de fenotipo de estas células madre. Para ello, diseñamos un péptido penetrante basado en la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. Este péptido penetrante incluye la secuencia del carboxilo terminal de la Cx43, que contiene el dominio de unión a c-Src y las dos tirosinas que fosforila

esta kinasa (figura 34a: del amino ácido 247 al 283 de la Cx43) (Sorgen et al. 2004), y la secuencia penetrante TAT (YGRKKRRQRRR) (Gump and Dowdy 2007).

Por tanto, las células GliNS2 se incubaron con el péptido TAT-Cx43Src o con el péptido TAT, usado como control, durante 24 o 48 horas. Las células se procesaron para el análisis por inmunohistoquímica o Western blot, según se describe en el apartado de Material y Métodos.

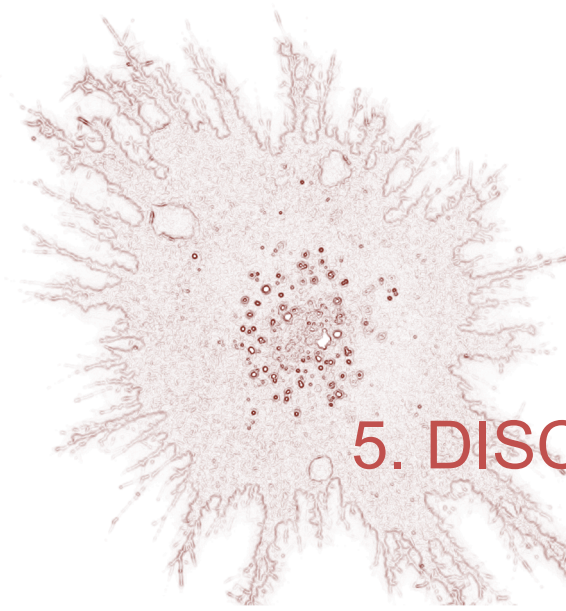
En la figura 34b se muestra una inmunocitoquímica de Cx43, 24 horas después de la incubación con el péptido. Como se puede observar el péptido TAT-Cx43Src se internaliza muy eficazmente en todas las células del cultivo. Como es de esperar, las células incubadas con el péptido TAT no muestra expresión de la Cx43. Además el Western blot muestra que el péptido TAT-Cx43Src disminuyó, transitoriamente, la actividad de Src en las GSC. Así, los niveles de c-Src Y416 descendieron a las 24 horas y se recuperaron a las 48 horas. Por último, nuestros resultados muestran que TAT-Cx43Src disminuyó la expresión de Id1, N-cadherina (solo a las 48 horas) y Sox2 mientras que la expresión de E-cadherina aumentó, comparando con el péptido control TAT.



**Figura 34 . Efecto del péptido TAT-Cx43Src sobre la expresión de Sox2, Id1, N-cadherina, E-cadherina, c-Src Y416 y c-Src total en las células madre de glioma GliNS2.**

Las células madre GliNS2 se resembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron en presencia de los péptidos TAT o TAT-Cx43Src, a la concentración de 50 μM. Se recogieron muestras a las 24 y 48 horas y se analizaron mediante transferencia tipo Western. **a)** Secuencia del péptido penetrante que contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src. La secuencia TAT es YGRKKRRQRRD, las tirosinas fosforiladas por c-Src aparecen en negrita y más grandes y la región de unión SH3 de c-Src aparece subrayada. **b)** Fotomicrografías de contraste de fases e inmunocitoquímica de Cx43 **c)** Western blot de Sox2, Id1, N-cadherina, E-cadherina, c-Src Y416, c-Src total y α-actinina.





## 5. DISCUSIÓN



## 5. Discusión

En el SNC los astrocitos se encuentran comunicados a través de las uniones comunicantes, formando una red cooperativa que mantiene la homeostasis iónica, metabólica y funcional. La comunicación intercelular es fundamental para controlar, entre otros, procesos como la proliferación (Loewenstein and Kanno 1966), la diferenciación de las células y el paso de moléculas como la glucosa (Giaume et al. 1997; Tabernerero et al. 1996). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la inhibición de las uniones comunicantes de los astrocitos en cultivo provocaba un aumento de la proliferación (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Tabernerero et al. 2006) y de la captación de glucosa (Valle-Casuso et al. 2012).

Por otro lado, se ha observado en los gliomas, los tumores más frecuentes del SNC derivados de astrocitos, que los niveles de comunicación intercelular y la expresión de la Cx43, la proteína que forma las uniones comunicantes en los astrocitos (Dermietzel et al. 1991b; Giaume et al. 1991), son muy bajos (Holden et al. 1997; Laird et al. 1999; Saito et al. 2001) y se correlacionan inversamente con el grado de malignidad (Huang et al. 1999; Pu et al. 2004; Soroceanu et al. 2001). Así mismo, se ha observado en células altamente proliferativas que, tanto la introducción directa del gen de la Cx43 (Hirschi et al. 1996; Huang et al. 1998; Mesnil et al. 1995), como la estimulación farmacológica de la permeabilidad de las uniones comunicantes (Sanchez-Alvarez et al. 2006; Sánchez-Alvarez et al. 2001) reducen la proliferación. Por todo ello, se considera a la Cx43 una proteína supresora de tumores. En nuestro laboratorio se ha propuesto que c-Src, una tirosina kinasa que interacciona con la Cx43, participa en el aumento de la captación de glucosa y de la proliferación en astrocitos (Valle-Casuso et al. 2012). Por otro lado, esta tirosina kinasa presenta una actividad muy elevada en gliomas (Du et al 2009), que se reduce con la restauración de la Cx43, al menos en las células C6 de glioma de rata (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Además, estudios muy recientes muestran que los niveles de expresión de la Cx43 en las GSC son muy bajos (Yu et al. 2012) y la restauración de Cx43 revierte el fenotipo tumoral de estas células. A pesar de la importancia terapéutica de este efecto, los mecanismos moleculares que relacionan la Cx43 con la proliferación en las GSC no están todavía claros.

Por todo ello, en este trabajo abordamos, en primer lugar, el estudio de la relación de la Cx43 con c-Src en otros modelos celulares. Así, analizamos una situación en la que los niveles de Cx43 se reducen en astrocitos in vivo. A continuación, estudiamos esta relación en células de glioma humano, incluidas las GSC. Finalmente, investigamos si c-Src forma parte del mecanismo por el que la Cx43 revierte el fenotipo y, por tanto, la tumorigenicidad de las células madre de glioma humano.

### **5.1. Relación de la Cx43 y c-Src en astrocitos reactivos.**

Una característica de los astrocitos es su capacidad para reaccionar en un gran número de patologías del SNC que cursan con lesiones neuronales, como la isquemia o la enfermedad de Alzheimer. Frente al daño, los astrocitos reaccionan saliendo de su estado quiescente, volviéndose reactivos. Durante este proceso, denominado gliosis reactiva, una de las proteínas que aumenta su expresión es la proteína fibrilar ácida de la glía, GFAP. Existe un modelo experimental de lesión neural por excitotoxicidad provocada por la inyección de ácido kaínico, que produce una fuerte gliosis reactiva, caracterizada por el aumento de expresión de GFAP, seguido de la pérdida de la expresión de la Cx43 en los astrocitos reactivos (Koulakoff et al. 2008). Por ello, elegimos este modelo para investigar si la reducción de la Cx43 en los astrocitos in vivo provocaba cambios en la actividad de c-Src en estas células.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, en astrocitos en cultivo, se demostró que la inhibición de la Cx43 aumentaba la captación de glucosa por un mecanismo dependiente de c-Src (Valle-Casuso et al. 2012). Además, c-Src es un conocido activador de la proliferación celular (Kmiecik and Shalloway 1987). En cultivos primarios de astrocitos, la disminución de la Cx43 produce la proliferación de los astrocitos, caracterizada por el aumento de las ciclinas D1 y D3 (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Tabernero et al. 2006). En este trabajo, hemos estudiado un modelo de gliosis reactiva in vivo, para saber si la bajada de Cx43 regula c-Src y, como consecuencia, aumenta la captación de glucosa y la proliferación en astrocitos.

Los resultados obtenidos muestran que, tras la lesión del córtex cerebral de ratón con ácido kaínico, se produce un aumento de la actividad de c-Src que coincide con la disminución de la expresión de la Cx43. Por otro lado, cuando se inyecta solamente el vehículo (PBS), observamos que no hay modificaciones de los niveles de la Cx43 ni de la actividad de c-Src en los astrocitos. Además, estos astrocitos reactivos muestran un aumento en la proliferación y en la expresión de la maquinaria necesaria para aumentar la velocidad de captación de glucosa (Gangoso et al. 2012). En este sentido, la glucosa captada por los astrocitos puede tener efectos neuroprotectores (Rouach et al. 2008). Por tanto, estos datos obtenidos tras la lesión con ácido kaínico, junto con los obtenidos previamente en cultivo de astrocitos, sugieren que c-Src podría ser una prometedor diana terapéutica para modular la respuesta de los astrocitos frente a ciertas patologías del SNC.

### **5.2. Niveles de Cx43 y actividad de c-Src en células de glioma.**

Tal y como se ha mencionado, en los gliomas la expresión de Cx43 es inversamente proporcional al grado de malignidad del tumor (Huang et al. 1999; Pu et al. 2004; Soroceanu et al. 2001). Además, se ha demostrado que restaurando los niveles de expresión de la Cx43 en

gliomas (Huang et al. 1998; Zhu et al. 1991; Sanchez-Alvarez et al. 2006), se reduce el grado de proliferación de estas células. En cuanto a la vía de señalización por la que la Cx43 logra modificar el ciclo celular, hay que mencionar que el extremo carboxilo terminal citoplasmático de la Cx43 interacciona con un gran número de señales y proteínas de andamiaje (Giepmans et al. 2001a; Hervé et al. 2007). Una de estas proteínas es la proteína kinasa c-Src. Además, otra característica de las células de glioma es que tienen una alta actividad de la proteína kinasa c-Src (Du et al. 2009). Estudios llevados a cabo en la línea celular C6 de glioma de rata, demuestran que la interacción de la Cx43 con la tirosina kinasa c-Src desencadena el efecto antiproliferativo (Herrero-Gonzalez et al. 2010).

En este trabajo quisimos investigar si la Cx43 también se relaciona con la actividad de c-Src en células de glioma humano. Los resultados obtenidos indican que, en las diferentes líneas celulares de glioma humano analizadas, hay una baja expresión de la Cx43 y una alta actividad del protooncogén c-Src.

Como hemos mencionado anteriormente, los gliomas están formados por un conjunto heterogéneo de células, entre las que se encuentran las GSC. Las GSC se consideran las responsables de la resistencia a las terapias convencionales, de la recurrencia del tumor y de la angiogénesis (Bao et al. 2006; Chen et al. 2012; Singh et al. 2004; Singh et al. 2003). Por ello, esta subpoblación celular se ha convertido en una prometedora diana terapéutica.

En este trabajo hemos estudiado los niveles de Cx43 y la actividad de c-Src en las GSC humanas. Estos estudios los realizamos tanto con muestras de GSC de glioblastomas de pacientes, como con líneas de GSC caracterizadas y depositadas por Pollard *et al* (Pollard et al. 2009). Nuestros resultados muestran unos bajos niveles de expresión de Cx43 y una alta actividad de c-Src en las GSC.

### **5.3. Efecto de la modulación de la Cx43 en la actividad de c-Src en las células madre de glioma**

Una vez conocida la baja expresión de la Cx43 y la alta actividad de c-Src en las GSC, quisimos estudiar el efecto de la modulación de la Cx43 sobre la actividad de c-Src. Para ello, utilizamos un modelo de pérdida y otro de ganancia de función. Para el modelo de pérdida de función silenciamos la Cx43 mediante el uso de siRNA y observamos que se produce un aumento en la actividad de c-Src en las GSC que pierden la expresión de Cx43. Además, el silenciamiento de la Cx43 viene acompañado de un aumento de la proliferación de estas células. Para el modelo de ganancia de función las GSC se transfectaron con el cDNA de la Cx43. En este caso, se observa una disminución en la actividad de c-Src y en la proliferación de las GSC.

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que la restauración de la Cx43 en las GSC reduce la actividad de c-Src y la velocidad de proliferación. Puesto que c-Src es un importante regulador de la autorrenovación de las células madre (Singh et al. 2012), se podría sugerir que la inhibición de la proliferación es consecuencia de la inhibición de la actividad de c-Src provocada por la Cx43.

### **5.4. Efecto de la restauración de la Cx43 sobre el fenotipo característico de las células madre de glioma**

Estudios recientes han demostrado que cuando se restaura la Cx43 en las GSC, éstas reducen su tumorigenicidad (Yu et al. 2012). Así, el tamaño de los tumores que se generan con las GSC transfectadas con Cx43 es mucho más pequeño y estos animales sobrevivían más tiempo (Yu et al. 2012). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que la Cx43 revierte la tumorigenicidad de las GSC. Hay que mencionar que la pérdida de fenotipo de célula madre es uno de los objetivos a la hora de plantear una estrategia que emplee las GSC como diana terapéutica (Chen et al. 2012).

Nuestros resultados y los de Yu *et al* (Yu et al. 2012) muestran que la restauración de la Cx43 en las GSC disminuye la expresión de Sox2, un factor de transcripción responsable de la autorrenovación de las células madre (Gangemi et al. 2009; Singh et al. 2012). Estos resultados sugieren que, dado que Sox2 es un regulador de la proliferación de las GSC, la disminución en la proliferación encontrada en las GSC después de restaurar la Cx43, podría estar mediada, en última instancia, por este factor de transcripción.

Li *et al* han descrito que Sox2 se regula por el supresor tumoral p27 (Li et al. 2012). Nuestros resultados indican que el aumento de expresión de p27 está también ligado con el aumento de expresión de Cx43 en las GSC, algo ya descrito en las células C6 de glioma (Herrero-Gonzalez et al. 2010). Por tanto, el aumento de p27 promovido por la Cx43 podría participar en la regulación de Sox2 en las GSC.

Yu *et al* muestran en su trabajo que la restauración de los niveles de Cx43 en GSC aumenta la expresión de la E-cadherina (Yu et al. 2012). Nuestros resultados confirman el aumento de E-cadherina, pero, además, muestran que se produce una pérdida de expresión de N-cadherina en las GSC en las que se ha restaurado la Cx43.

De hecho, otra características de las células madre es el cambio en las isoformas de cadherinas, concretamente: se reduce E-cadherina y se compensa con el aumento de N-cadherina. De esta forma, las células pasan a tener un fenotipo mesenquimal, promoviendo la movilidad e invasión de estas células (Nieto and Cano 2012; Hazan et al. 2000; Nieman et al.

1999). En este sentido, este intercambio de N- a E-cadherinas podría explicar que las GSC en las que se ha restaurado la Cx43 tengan un carácter menos invasivo y metastático y, por tanto, sean menos tumorigénicas.

Tanto la expresión de Sox2 (Soroceanu et al. 2013) como el cambio de N-cadherina a E-cadherina (Cheung et al. 2011), están regulados por Id1 (Soroceanu et al. 2013). Id1 es un regulador transcripcional presente en los gliomas malignos y, más concretamente, en las GSC (Soroceanu et al. 2013), que mantiene a la célula en un estado indiferenciado. Id1 impide la unión al DNA de los factores de transcripción bHLH, implicados en la diferenciación (Benezra et al. 1990). Se ha propuesto como una excelente diana terapéutica en las GSC, donde presenta unos niveles muy altos (Anido et al. 2010). Así, los niveles de Id1 se pueden reducir en GSC empleando inhibidores de TGF-beta, consiguiendo resultados muy prometedores en modelos preclínicos de gliomas (Anido et al. 2010). Efectivamente, nuestros resultados muestran una clara disminución de la expresión de Id1 en las células de GSC a las que se ha restaurado la Cx43. Es importante destacar que, hasta el momento, aparte de los resultados presentados en esta Memoria, no ha sido descrita ninguna relación entre la Cx43 y este importante regulador transcripcional.

Por tanto, se podría sugerir que, tanto la reducción en la expresión de Sox2 como el cambio de N-cadherina por E-cadherina, podrían estar ocasionados por la disminución en los niveles de Id1 provocada por la restauración de la Cx43 en GSC.

### **5.5. Participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de las células madre de glioma**

Puesto que nuestros resultados muestran que la Cx43 reduce la actividad de c-Src en las GSC y revierte el fenotipo de célula madre, nuestro siguiente objetivo fue investigar si estos dos efectos estaban relacionados. En otras palabras, si c-Src mediaba el efecto de la Cx43 sobre el fenotipo de las GSC.

Para investigar la participación de c-Src en la vía que relaciona la Cx43 con la disminución de la proliferación y la reversión del fenotipo de célula madre, en primer lugar usamos inhibidores de la actividad de c-Src, como son: PP2, saracatinb y dasatinib. El dasatinib se ha empleado en diferentes estudios preclínicos; de hecho, se encuentra en fase I para el tratamiento en gliomas (Reardon et al. 2012). Los experimentos realizados en presencia de estos inhibidores de la actividad de c-Src muestran que, cuando se inhibe la actividad de c-Src, se reduce la expresión de Id1y Sox2 y se observa un cambio en la expresión de las isoformas N y E-cadherina. Por tanto, la inhibición de c-Src ejerce el mismo efecto que la

## Discusión

---

restauración de la Cx43 en las células madre de glioma, es decir, revierte el fenotipo de célula madre de glioma.

El uso del dasatinib, inhibidor de c-Src y otras tirosina kinasas, de manera oral como terapia frente a los gliomas (Reardon et al. 2012), tiene el riesgo de la pérdida de la actividad de estas kinasas en el resto de tipos celulares, siendo éstas reguladores importantes de diferentes procesos de señalización celular. Por ello, debido a la escasa eficiencia de los tratamientos convencionales utilizados en los gliomas y a la inespecificidad del uso de los inhibidores de c-Src, se hace necesario el empleo de terapias más dirigidas.

El hecho de que los resultados obtenidos con los inhibidores de c-Src sean similares a los obtenidos con la restauración de la Cx43, sugiere que la proteína Cx43 está realizando este efecto a través de la disminución de la actividad de c-Src. Cuando c-Src está activa, fosforila los residuos Tyr247 y Tyr265 de la Cx43 (Giepmans et al. 2001a; Gilleron et al. 2008; Lampe and Lau 2004; Lin et al. 2001), localizados en el carboxilo terminal de la Cx43. Tal y como se ha mencionado, la restauración de la Cx43 reduce la actividad de c-Src en GSC y en células C6 de glioma de rata (Herrero-Gonzalez et al. 2010). De hecho, en estas últimas se ha demostrado que el efecto antiproliferativo de la Cx43 depende de la interacción de esta proteína con c-Src. Así, Herrero-Gonzalez *et al* demostraron que, cuando la Cx43 está mutada en los residuos fosforilables por la c-Src (Tyr247 y Tyr265), no se modifican los niveles de actividad de c-Src ni la proliferación de C6.

Para confirmar la participación de c-Src en el efecto antitumorigénico de la Cx43 en las GSC, en este trabajo hemos diseñado un péptido penetrante, que contiene la secuencia de la Cx43 que interacciona con el dominio SH3 de c-Src (Sorgen et al. 2004) junto con los residuos Tyr247 y Tyr265 de la Cx43 que fosforila c-Src. A esta secuencia de aminoácidos se le añadió la secuencia TAT, empleada para promover la internalización del péptido en la célula (Gump and Dowdy 2007). Nuestros resultados muestran que este péptido penetrante ejerce el mismo efecto que la proteína Cx43. Es decir, el péptido diseñado es capaz de revertir el fenotipo de las GSC, disminuyendo la actividad de c-Src, los niveles de Id1 y Sox2, además de provocar el cambio de N- por E-cadherina.

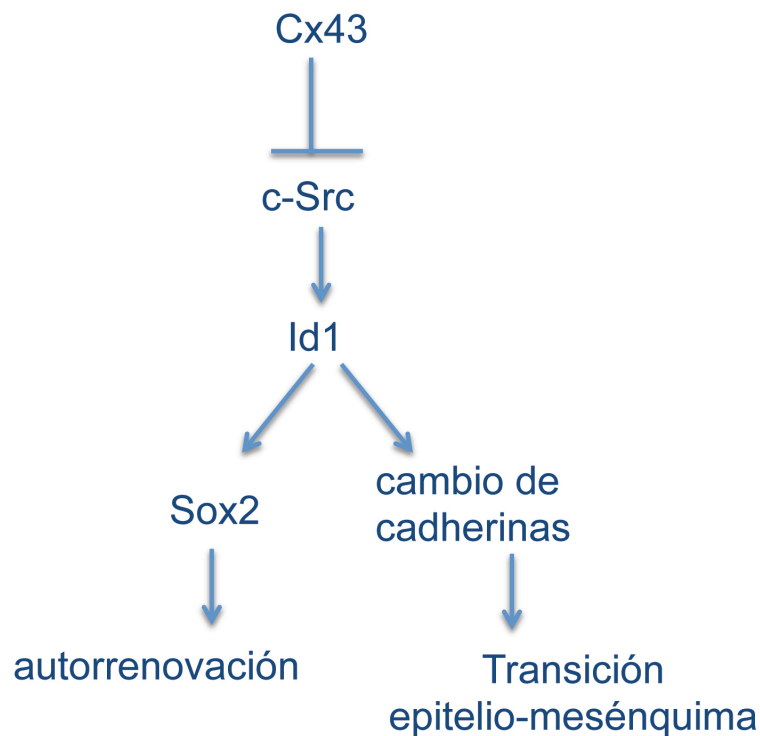
Como hemos descrito hasta el momento, la Cx43 es una proteína de gran interés para el tratamiento de los gliomas. Sin embargo, promover la expresión de esta proteína en las células del tumor es una dificultad a día de hoy. La terapia génica se perfiló como una alternativa; no obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos en ensayos preclínicos, no termina de ser una terapia eficaz para la restauración de una proteína, debido a la falta de vectores que accedan a toda la población tumoral. En este sentido, el empleo de péptidos penetrantes, como



el diseñado en este trabajo, pueden ser una alternativa interesante, ya que se internalizan en la célula, sin necesidad de emplear técnicas de terapia génica.

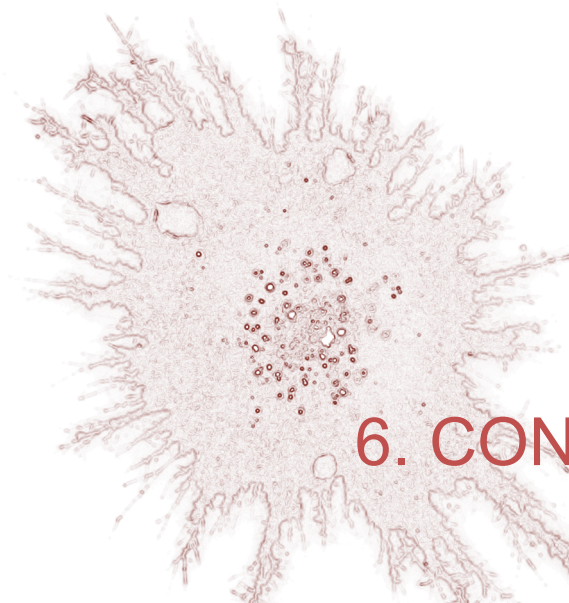
En este sentido, hay un gran número de estudios que han usado péptidos penetrantes para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, péptidos penetrantes para interrumpir PP2A, una serina/treonina fosfatasa crítica en el proceso de apoptosis de las células tumorales, han mostrado efectos antitumorales, tanto in vitro como in vivo, en modelos de cáncer de pulmón y de mama (Arrouss et al. 2013).

En conjunto, los resultados presentados en esta Memoria nos permiten proponer un mecanismo por el cual la Cx43 revierte el fenotipo de célula madre en las GSC humanas. Proponemos que la Cx43 inhibe la actividad del protooncogen c-Src. La disminución de la actividad de c-Src reduce la expresión de Id1, regulador transcripcional que mantiene a las células indiferenciadas. La reducción en la expresión de Id1 provoca la disminución en la expresión de Sox2 y el intercambio de N- por E-cadherina. Como consecuencia de la reducción en Sox2, disminuye la autorrenovación de las GSC y el cambio de isoformas de cadherinas reduce la propagación de estas células por el parénquima cerebral (ver esquema 19). Estos cambios moleculares explican la reducción de la tumorigenicidad observada en las GSC tras la restauración de la Cx43.



**Esquema 19. Modelo propuesto para explicar la reversión del fenotipo de célula madre de glioma por la conexina-43**





## 6. CONCLUSIONES



## 6. Conclusiones

1- La lesión neural provocada por el ácido kaínico en el córtex de ratón adulto induce una gliosis reactiva, que se acompaña de la disminución en la expresión de la conexina-43 y de un aumento en la actividad de c-Src, lo que sugiere que la conexina-43 está relacionada con c-Src en los astrocitos in vivo.

2- Las células de glioma humano, incluidas las células madre, presentan una baja expresión de la conexina-43 y una alta actividad de c-Src.

3- La modulación de los niveles de conexina-43 en células madre de glioma humano regula la actividad del protooncogen c-Src y la proliferación de estas células.

4- La restauración de la conexina-43 en células madre de glioma humano disminuye la expresión de Sox2 y promueve un intercambio de N-cadherina por E-cadherina, confirmando que la conexina-43 revierte el fenotipo de célula madre de glioma.

5- Tanto la restauración de la conexina-43 como la inhibición de c-Src reducen la expresión de Id1, un importante regulador del fenotipo de célula madre. Estos resultados sugieren que la conexina-43, al inhibir la actividad de c-Src, reduce la expresión de Id1, con la consiguiente reversión del fenotipo característico de célula madre de glioma.

7- Hemos diseñado un péptido penetrante que contiene la región de la conexina-43 que interacciona con c-Src. Este péptido presenta una alta eficacia de internalización en las células madre de glioma humano y es capaz de mimetizar los efectos de la conexina-43 en la reversión del fenotipo de célula madre. Todo ello confirma que la interacción entre la conexina-43 y c-Src es crítica para revertir la tumorigenicidad de las células madre de glioma humano.

### **Conclusión final:**

La conexina-43 es una proteína especializada en la comunicación intercelular que, además de formar canales intercelulares, posee un extremo carboxilo terminal con el que interacciona con diversas proteínas señalizadoras. En este sentido, nuestros resultados confirman la relevancia de la relación del extremo carboxilo terminal de la Cx43 con la tirosina kinasa c-Src en astrocitos y células de glioma, incluidas las células madre de glioma. Así, c-Src es responsable de la reversión del fenotipo de célula madre de glioma que ocasiona la restauración de la Cx43 en estas células. La determinación de este mecanismo nos ha permitido diseñar un péptido penetrante con capacidad de revertir el fenotipo tumorigénico de las células madre de glioma humano. Puesto que la reversión del fenotipo de célula madre se propone como una prometedora estrategia para el tratamiento de estos devastadores tumores, pensamos que este péptido penetrante tiene un importante potencial terapéutico.



### Conclusions

1- Neuronal injury, promoted by a kainic acid injection in adult mouse cortex, induces a decrease in connexin43 expression and an increase in the activity of c-Src in reactive astrocytes surrounding the lesion. These data suggest that connexin43 is linked to c-Src in astrocytes in vivo.

2- Human glioma cells, including glioma stem cells, express low levels of Cx43 and exhibit a high activity of the tyrosine kinase c-Src.

3- Modulation of connexin43 in human glioma stem cells regulates the activity of the protooncogen c-Src and the rate of cell proliferation.

4- Restoring connexin43 reduces the expression of Sox2 and promotes N-cadherin to E-cadherin switching. These data confirm that connexin-43 reverses glioma stem cell-like phenotype.

5- Both, the inhibition of c-Src activity and the restoration of Cx43 in glioma stem cells, promote a reduction in the expression of Id1, a master regulator of genes required to maintain a stem-like phenotype, such as Sox-2 or the isoforms of cadherins. These results suggest that connexin43 inhibits c-Src activity, which in turn reduces the expression of the transcriptional regulator Id1 and consequently reverses glioma stem-like phenotype.

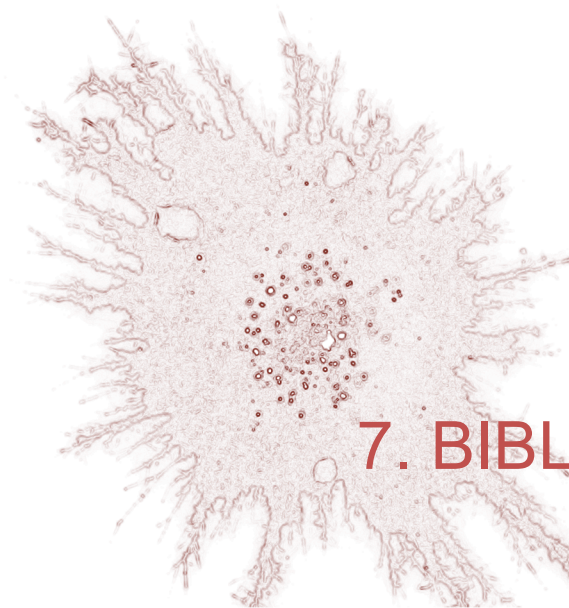
6- We have designed a cell penetrating peptide containing the region of Cx43 that interacts with c-Src. This peptide is efficiently internalized by human glioma stem cells and mimics the effects of connexin43 on glioma stem-like phenotype. This data confirm that the interaction between Cx43 and c-Src is critical for the antitumorigenic effect.

### FINAL CONCLUSION

Connexin43 is a protein designed to communicate that, apart from its role in forming gap junction channels, contains a C-terminal domain that interacts with several signalling and scaffolding proteins. Our results confirm the relevance of the interaction between Cx43 and c-Src in astrocytes and glioma cells, including human glioma stem cells. Thus, c-Src is responsible for the reversion of the glioma stem like phenotype promoted by Cx43 in human glioma stem cells. Based on this mechanism we have designed a cell penetrating peptide with the ability to revert stem-like properties. Since the reversion of the glioma stem-like phenotype is a promising therapeutic strategy for the treatment of this devastating disease, we propose that this is a cell penetrating peptide with potential therapeutic opportunities.







## 7. BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografia

---

- Abbott JD, Kip KE, Vlachos HA, Sawhney N, Srinivas VS, Jacobs AK, Holmes DR, Williams DO. 2006. Recent trends in the percutaneous treatment of chronic total coronary occlusions. *Am J Cardiol* 97:1691-6.
- Abel TW, Clark C, Bierie B, Chytil A, Aakre M, Gorska A, Moses HL. 2009. GFAP-Cre-mediated activation of oncogenic K-ras results in expansion of the subventricular zone and infiltrating glioma. *Mol Cancer Res* 7:645-53.
- Ahluwalia MS, Groot Jd, Liu W, Gladson CL. 2010. Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: Rationale and preclinical studies. *Cancer letters* 298:139-149.
- Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sanchez RM, Barba I, Martinez-Saez E, Prudkin L and others. 2010. TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18:655-68.
- Anneren C, Cowan CA, Melton DA. 2004. The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J Biol Chem* 279:31590-8.
- Araque A. 2008. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4:3-10.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W. 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-50.
- Arrouss I, Nemati F, Roncal F, Wislez M, Dorgham K, Vallerand D, Rabbe N, Karboul N, Carlotti F, Bravo J and others. 2013. Specific Targeting of Caspase-9/PP2A Interaction as Potential New Anti-Cancer Therapy. *PLoS One* 8:e60816.
- Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. 1981. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8:325-31.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756-60.
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59.
- Bennett MV, Garre JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Saez JC. 2012. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487:3-15.
- Bennett MVL, Barrio TA, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. 1991. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305-320.
- Beyer EC, Steinberg TH. 1991. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J Biol Chem* 266:7971-4.
- Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, Pagano SF, Parati EA. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 993:18-29.

- Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC. 2009. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4:226-35.
- Brown MT, Cooper JA. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121-49.
- Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. 1985. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56:1106-11.
- Caja L, Bertran E, Campbell J, Fausto N, Fabregat I. 2011. The transforming growth factor-beta (TGF-beta) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J Cell Physiol* 226:1214-23.
- Cancer Genome Atlas Research N. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-8.
- Caskey LS, Fuller GN, Bruner JM, Yung WK, Sawaya RE, Holland EC, Zhang W. 2000. Toward a molecular classification of the gliomas: histopathology, molecular genetics, and gene expression profiling. *Histol Histopathol* 15:971-81.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65:6029-33.
- Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. 1997. Peptides homologous to extracellular loop of motifs connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J Physiol* 503.1:99-110.
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488:522-6.
- Cheung PY, Yip YL, Tsao SW, Ching YP, Cheung AL. 2011. Id-1 induces cell invasiveness in immortalized epithelial cells by regulating cadherin switching and Rho GTPases. *J Cell Biochem* 112:157-68.
- Chistiakov DA, Chekhonin VP. 2012. Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 684:8-18.
- Chong YP, Ia KK, Mulhern TD, Cheng HC. 2005. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1754:210-20.
- Cooper CD, Lampe PD. 2002. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 277:44962-8.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM. 1991. Calcium waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12:185-204.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signalling. *Science* 247:470-473.
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF. 1990. Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10:1754-63.

- D'Abaco GM, Kaye AH. 2007. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 14:1041-8.
- Dang X, Doble BW, Kardami E. 2003. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem* 242:35-8.
- Dang X, Jeyaraman M, Kardami E. 2006. Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Mol Cell Biochem* 289:201-7.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.
- Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. 2004. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res* 62:268-75.
- Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC. 1991a. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-32.
- Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC. 1991b. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Dirks P. 2010a. Cancer stem cells: Invitation to a second round. *Nature* 466:40-1.
- Dirks PB. 2010b. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol* 4:420-30.
- Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. 2012. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 488:527-30.
- Du J, Bernasconi P, Clauser KR, Mani DR, Finn SP, Beroukhim R, Burns M, Julian B, Peng XP, Hieronymus H and others. 2009. Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat Biotechnol* 27:77-83.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. 2007. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-7.
- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:1931-8.
- Frame MC. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602:114-30.
- Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Rey JA. 2007. [Biology molecular of glioblastomas]. *Neurocirugia (Astur)* 18:373-82.
- Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. 2012. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338:1080-4.

- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC. 2004. CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279:36943-50.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C and others. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-710.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64:7011-21.
- Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G. 2009. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27:40-8.
- Gangoso E, Ezan P, Valle-Casuso JC, Herrero-Gonzalez S, Koulakoff A, Medina JM, Giaume C, Tabernero A. 2012. Reduced connexin43 expression correlates with c-Src activation, proliferation, and glucose uptake in reactive astrocytes after an excitotoxic insult. *Glia* 60:2040-9.
- Gardner-Medwin AR. 1986. A new framework for assessment of potassium-buffering mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 481:287-302.
- Gautschi O, Tepper CG, Purnell PR, Izumiya Y, Evans CP, Green TP, Desprez PY, Lara PN, Gandara DR, Mack PC and others. 2008. Regulation of Id1 expression by SRC: implications for targeting of the bone morphogenetic protein pathway in cancer. *Cancer Res* 68:2250-8.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ and others. 2004. Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 279:36931-42.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. 1991. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867-73.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20.
- Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. 1991. Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-43.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.

- Giaume C, Tabernero A, Medina JM. 1997. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 21:114-123.
- Giaume C, Theis M. 2010. Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* 63:160-76.
- Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH. 2001a. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276:8544-9.
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. 2001b. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11:1364-8.
- Gilbertson RJ, Graham TA. 2012. Cancer: Resolving the stem-cell debate. *Nature* 488:462-3.
- Gilleron J, Fiorini C, Carette D, Avondet C, Falk MM, Segretain D, Pointis G. 2008. Molecular reorganization of Cx43, Zo-1 and Src complexes during the endocytosis of gap junction plaques in response to a non-genomic carcinogen. *J Cell Sci* 121:4069-78.
- Gladson CL, Cheresch DA. 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88:1924-32.
- Gonzalez-Aguero G, Gutierrez AA, Gonzalez-Espinosa D, Solano JD, Morales R, Gonzalez-Arenas A, Cabrera-Munoz E, Camacho-Arroyo I. 2007. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32:129-35.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-45.
- Gudinaviciene I, Pranys D, Juozaityte E. 2004. Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas. *Medicina (Kaunas)* 40:112-20.
- Gump JM, Dowdy SF. 2007. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med* 13:443-8.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148:779-90.
- Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, Kristensen BW. 2011. Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem* 59:391-407.
- Herrero-Gonzalez S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A. 2010. Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* 29:5712-23.

- Herrero-Gonzalez S, Valle-Casuso JC, Sanchez-Alvarez R, Giaume C, Medina JM, Tabernero A. 2009. Connexin43 is involved in the effect of endothelin-1 on astrocyte proliferation and glucose uptake. *Glia* 57:222-33.
- Hervé J-C, Bourmeyster N, Sarrouilhe D, Duffy HS. 2007. Gap junctional complexes: From partners to functions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94:29-65.
- Hirschi K, Xu C, Tsukamoto T, Sager R. 1996. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff* 7:861-870.
- Holden PR, McGuire B, Stoler A, Balmain A, Pitts JD. 1997. Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:15-21.
- Huang R, Fan Y, Hossain M, Peng A, Zeng Z, Boynton A. 1998. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58:5089-5096.
- Huang R-P, Hossain M, Sehgal A, Boynton A. 1999. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70:21-24.
- Idoate MA, Echeveste J. 2007. [Update on the molecular biology of gliomas: towards a pathomolecular classification of gliomas]. *Rev Neurol* 44:217-24.
- Janzer RC, Raff MC. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-256.
- Jensen AM, Chiu SY. 1990. Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci* 10:1165-1175.
- Jiang JX, Gu S. 2005. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 1711:208-14.
- Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-84.
- Kanemitsu MY, Loo LW, Simon S, Lau AF, Eckhart W. 1997. Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J Biol Chem* 272:22824-31.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. 2008. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132:1049-61.
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. 1993. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3:255-68.
- Kleihues P, Sobin LH. 2000. World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88:2887.
- Kmieciak TE, Shalloway D. 1987. Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* 49:65-73.



- Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ. 2000. Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1 )after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem* 79:347-54.
- Konduri SD, Srivenugopal KS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Ali-Osman F, Kondraganti S and others. 2003. Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), a gene encoding an inhibitor of matrix metalloproteinases in human glioma cells. *Oncogene* 22:4509-16.
- Kosodo Y, Huttner WB. 2009. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ* 51:251-61.
- Koulakoff A, Ezan P, Giaume C. 2008. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56:1299-311.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. 1966. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Kurata WE, Lau AF. 1994. p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src. *Oncogene* 9:329-35.
- Laird D, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh H, Carystinos G, Alaoui-Jamali M. 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 59:4104-4110.
- Laird DW. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711:172-82.
- Laird DW. 2010. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 20:92-101.
- Lampe PD, Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384:205-15.
- Lampe PD, Lau AF. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1171-86.
- Li H, Collado M, Villasante A, Matheu A, Lynch CJ, Canamero M, Rizzoti K, Carneiro C, Martinez G, Vidal A and others. 2012. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 11:845-52.
- Li S, Couet J, Lisanti MP. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:29182-90.
- Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H and others. 2002. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 22:4302-11.

- Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF. 2001. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol* 154:815-27.
- Loewenstein W. 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61:829-913.
- Loewenstein W. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* 3:59-79.
- Loewenstein WR, Kanno Y. 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209:1248-9.
- Loo LW, Berestecky JM, Kanemitsu MY, Lau AF. 1995. pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J Biol Chem* 270:12751-61.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA and others. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-8.
- Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D, Dang J, Dinca EB, Plaisier SB, Oderberg I and others. 2009. Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res* 69:6889-98.
- Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA. 2004. RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol* 24:6788-98.
- Marquez-Rosado L, Solan JL, Dunn CA, Norris RP, Lampe PD. 2012. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochim Biophys Acta* 1818:1985-92.
- Martinez R, Esteller M. 2010. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. *Neurobiol Dis* 39:40-6.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA and others. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9:625-35.
- Matsuuchi L, Naus CC. 2013. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim Biophys Acta* 1828:94-108.
- McDonough WS, Johansson A, Joffee H, Giese A, Berens ME. 1999. Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int J Dev Neurosci* 17:601-11.
- Medina JM, Giaume C, Tabernero A. 1999. Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. In: Matsas R, Tsacopoulos M, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*. New York: Plenum Publishers. p 361-371.
- Medina JM, Vicario C, Juanes M, Fernández E. 1992. Biochemical adaptations to early extrauterine life. In: Herrera E, Knopp R, editors. *Perinatal Biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 233-258.

- Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. 1986. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 44:187-96.
- Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR. 1991. Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 124:207-25.
- Mesnil M, Piccoli C, Krutovskikh V, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H. 1995. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin-species specificity. *Cancer Res* 55:629-639.
- Mesnil M, Yamasaki H. 2000. Bystander effect in herpes simple virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: Role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res* 60:3989-3999.
- Mobbs P, Brew H, Attwell DA. 1988. A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axotolol (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res* 460:235-245.
- Moorby C, Patel M. 2001. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271:238-48.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. 2000. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 275:25207-15.
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE. 2001. Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441:302-23.
- Nam JS, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S. 2002. Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 8:2430-6.
- Naus CC. 2002. Gap junctions and tumour progression. *Can J Physiol Pharmacol* 80:136-41.
- Naus CC, Laird DW. 2010. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10:435-41.
- Nduom EK, Hadjipanayis CG, Van Meir EG. 2012. Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment. *Cancer J* 18:100-6.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147:631-44.
- Nieto MA, Cano A. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 22:361-8.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-53.

- Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, de Bouard S, Palfi S, Venance L, Tardy M, Peschanski M. 2005. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* 6:7.
- Olk S, Turchinovich A, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE, Zoidl G, Dermietzel R. 2010. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. *Glia* 58:494-505.
- Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1828:118-33.
- Paino T, Gangoso E, Medina JM, Tabernero A. 2010. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels increases HSV-tk/GCV bystander effect in U373 human glioma cells by enhancing gap junctional intercellular communication. *Neuropharmacology* 59:480-91.
- Pannasch U, Rouach N. 2013. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci*.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-28.
- Pellerin L. 2003. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 43:331-8.
- Penuelas S, Anido J, Prieto-Sanchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, Garcia-Dorado D, Poca MA, Sahuquillo J, Baselga J and others. 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 15:315-27.
- Philippi M, Vyklicky L, Orkand RK. 1996. Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia* 17:72-82.
- Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M and others. 2009. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4:568-80.
- Porkka K, Koskenvesa P, Lundan T, Rimpilainen J, Mustjoki S, Smykla R, Wild R, Luo R, Arnan M, Brethon B and others. 2008. Dasatinib crosses the blood-brain barrier and is an efficient therapy for central nervous system Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood* 112:1005-12.
- Pu P, Xia Z, Yu S, Huang Q. 2004. Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors. *Clin Neurol Neurosurg* 107:49-54.
- Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, Rao JS. 2001. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin Cancer Res* 7:570-6.
- Rao RD, James CD. 2004. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol* 31:595-604.

- Reardon DA, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Peters KB, Sathornsumetee S, Threatt S, Sampson JH, Herndon JE, 2nd, Coan A, McSherry F and others. 2012. Phase 1 trial of dasatinib plus erlotinib in adults with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 108:499-506.
- Reichert M, Muller T, Hunziker W. 2000. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem* 275:9492-500.
- Reynhout JK, Lampe PD, Johnson RG. 1992. An activator of protein kinase C inhibits gap junction communication between cultured bovine lens cells. *Exp Cell Res* 198:337-42.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C. 2002. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-75.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551-5.
- Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H. 2001. Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int J Cancer* 93:317-23.
- Salm AK, McCarthy KD. 1990. Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia. *Glia* 3:529-538.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J and others. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-4.
- Sanchez-Alvarez R, Paino T, Herrero-Gonzalez S, Medina JM, Tabernero A. 2006. Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. *Glia* 54:125-34.
- Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Sanchez-Abarca LI, Orfao A, Giaume C, Medina JM. 2001. Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS Lett* 509:202-6.
- Sansal I, Sellers WR. 2004. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22:2954-63.
- Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 3:199-208.
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99:507-12.

- Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H. 2012. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337:730-5.
- Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, Wehner R, Schackert G, Schackert HK, Fussel M and others. 2007. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer* 96:1293-301.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. 2006. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem* 6:929-34.
- Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. 2002. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41:5754-64.
- Schulte RJ, Sefton BM. 2003. Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* 42:9424-30.
- Segretain D, Falk MM. 2004. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662:3-21.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Sgroi DC. 2009. Breast cancer SRC activity: bad to the bone. *Cancer Cell* 16:1-2.
- Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM. 2003. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3:525-30.
- Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, Junier MP, Chneiweiss H, Boussin FD. 2011. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells* 29:440-51.
- Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiock S, Chellappan SP. 2012. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 11:73.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. 2004. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23:7267-73.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821-8.
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6:191-200.
- Solan JL, Lampe PD. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711:154-63.
- Solan JL, Lampe PD. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419:261-72.

- Sorgen PL, Duffy HS, Sahoo P, Coombs W, Delmar M, Spray DC. 2004. 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* 279:54695-701.
- Soroceanu L, Manning T, Sontheimer H. 2001. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33:107-117.
- Soroceanu L, Murase R, Limbad C, Singer E, Allison J, Adrados I, Kawamura R, Pakdel A, Fukuyo Y, Nguyen D and others. 2013. Id-1 Is a Key Transcriptional Regulator of Glioblastoma Aggressiveness and a Novel Therapeutic Target. *Cancer Res*.
- Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC and others. 2011. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5:193-7.
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. 2006. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54:758-73.
- Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blomer U. 2005. Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol* 63:162-9; discussion 169.
- Stevens B. 2008. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 16:278-88.
- Summy JM, Gallick GE. 2003. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22:337-58.
- Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, Paul DL. 1990. Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regul* 1:989-1002.
- Taberner A, Giaume C, Medina JM. 1996. Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16:187-195.
- Taberner A, Sanchez-Alvarez R, Medina JM. 2006. Increased levels of cyclins D1 and D3 after inhibition of gap junctional communication in astrocytes. *J Neurochem* 96:973-82.
- Thompson RJ, Macvicar BA. 2008. Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2:81-6.
- Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, Hori M. 2001. c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276:1780-8.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. 1998. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725-12731.
- Trosko JE, Ruch RJ. 1998. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 3:D208-36.
- Valle-Casuso JC, Gonzalez-Sanchez A, Medina JM, Taberner A. 2012. HIF-1 and c-Src mediate increased glucose uptake induced by endothelin-1 and connexin43 in astrocytes. *PLoS One* 7:e32448.

- Vanslyke JK, Naus CC, Musil LS. 2009. Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins. *Mol Biol Cell* 20:2451-63.
- Vega-Agapito V, Almeida A, Hatzoglou M, Bolanos JP. 2002. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system  $\gamma(+)$  in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J Biol Chem* 277:29753-9.
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C. 1997. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signalling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.
- Venere M, Fine HA, Dirks PB, Rich JN. 2011. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia* 59:1148-54.
- Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L and others. 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122:761-8.
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF. 1996. Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J Biol Chem* 271:3779-86.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci* 121:727-35.
- Wheelock MJ, Soler AP, Knudsen KA. 2001. Cadherin junctions in mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:275-85.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I and others. 2007. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39:157-8.
- Xu W, Harrison SC, Eck MJ. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602.
- Yeatman TJ. 2004. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4:470-80.
- Yu SC, Xiao HL, Jiang XF, Wang QL, Li Y, Yang XJ, Ping YF, Duan JJ, Jiang JY, Ye XZ and others. 2012. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells* 30:108-20.
- Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. 2001. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20:4138-49.
- Zhang YW, Nakayama K, Morita I. 2003. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63:1623-30.
- Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, Orlov YL, Sung WK, Shahab A, Kuznetsov VA and others. 2007. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations



- reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 1:286-98.
- Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CCG. 1991. Transfection of C6 glioma-cells with connexin-43 cDNA - analysis of expression, intercellular coupling, and cell-proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1883-1887.
- Zhu DG, Kidder GM, Caveney S, Naus CCG. 1992. Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10218-10221.
- Zhu Y, Parada LF. 2002. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2:616-26.

