

**La conexina-43 recluta a PTEN y
Csk para inhibir la actividad
oncogénica de c-Src en células de
glioma y astrocitos**

**Ana González Sánchez
Tesis Doctoral 2015**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

La conexina-43 recluta a PTEN y Csk para inhibir la actividad oncogénica de c-Src en células de glioma y astrocitos

Ana González Sánchez
Tesis Doctoral 2015

D^a ARÁNZAZU TABERNERO 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 “La conexina-43 recluta a PTEN y Csk para inhibir la actividad oncogénica de c-Src en células de glioma y astrocitos”, realizada bajo su dirección por la Licenciada en Biología D^a Ana González Sánchez en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firman el siguiente documento en Salamanca
a 23 de Junio de 2015.

Fdo. Aránzazu Tabernero Urbieto

Fdo. José María Medina Jiménez

Tabla de contenido

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León (JCyL), cofinanciado por la Consejería de Educación y el Fondo Social Europeo, en el marco de las Ayudas para la Contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación.

(ORDEN EDU/1177/2010, de 13 de agosto, por la que se establecen las bases reguladoras para la concesión de ayudas destinadas a financiar la contratación de personal investigador de reciente titulación universitaria, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo).

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Cbp/PAG1	Proteína de unión a Csk/fosfoproteína asociada con membrana enriquecida en fosfolípidos
CDK1	Kinasa dependiente de ciclina 1
CK1	Caseína kinasa 1
CSC	Células madre del cáncer
Csk	Kinasa C-terminal de c-Src
Cx43	Conexina-43
Cy5	Cianina-5
DMP	Dimetilpimelimidato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FAK	Kinasa de adhesión focal
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GJA1	<i>Gap junction alpha-1 protein</i> ; gen que codifica la Cx43
GBM	Glioblastoma multiforme
GSC	Célula madre de glioma
HA	Hemaglutinina
HIF1	Factor inducible por hipoxia 1
HSCs	Células madre hematopoyéticas
Hx-I	Hexoquinasa I
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IDR	Región intrínsecamente desordenada
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDZ	<i>Postsynaptic density protein–Drosophila disc large tumor suppressor–zonula occludens 1 protein</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3–kinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PKA	Proteína kinasa A

PKC..... Proteína kinasa C

PTEN..... Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa y protein fosfatasa de especificidad dual

PTP..... Proteína tirosina fosfatasa

PTPN13..... Proteína tirosina fosfatasa N13

PTPN2..... Proteína tirosina fosfatasa N2

SFKs..... Familia de tirosinas kirasas Src

SH2..... Dominio homólogo de Src 2

SH3..... Dominio homólogo de Src 3

SNC..... Sistema Nervioso Central

TERTp..... Promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa

ZO-1..... Proteína zonula occludens-1

β-ME..... Beta-mercaptoetanol

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.Características generales de los gliomas	1
1.1.1.Clasificación de los gliomas	1
1.1.2.Alteraciones moleculares en los gliomas.....	4
1.2.Comunicación intercelular y proliferación en células gliales.	6
1.2.1.Estructura de las uniones comunicantes. La conexina-43	9
1.2.2.Síntesis y degradación de las conexinas.	12
1.2.3.Fosforilación de la conexina-43. Relación con el ciclo celular.	13
1.2.4.La conexina-43 como proteína supresora de tumores en gliomas.....	15
1.3.Actividad oncogénica de c-Src	18
1.3.1.Relación entre conexina-43 y c-Src.....	21
1.4.Tirosina kinasa Csk	23
1.4.1.Estructura y regulación de Csk	24
1.4.2.Implicación de Csk en cáncer.....	26
1.5.Fosfatasa de especificidad dual PTEN	27
1.5.1.Alteraciones de PTEN en cáncer	27
1.5.2.Actividad fosfatasa de PTEN sobre proteínas	28
1.5.3.Actividad fosfatasa de PTEN sobre lípidos.....	28
1.5.4.Estructura y regulación de la actividad de PTEN	29
1.5.5.Otras funciones de PTEN relevantes en cáncer	32
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1.Material	35
3.1.1.Especie ensayada, condiciones del animalario y líneas celulares utilizadas....	35
3.1.2Medios instrumentales.....	35
3.1.3.Productos.....	37
3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares de las	
líneas celulares C6.	38
3.1.3.2. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de astrocitos.	
.....	38
3.1.3.3. Productos utilizados en la amplificación de plásmidos	38
3.1.3.4. Plásmidos utilizados en las transfecciones.....	39
3.1.3.5. Productos utilizados para las co-inmunoprecipitaciones y <i>pull-downs</i>	39
3.1.3.6. Productos empleados para el silenciamiento génico	40
3.1.3.7. Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas	
específicas.	40
3.1.3.8. Otros productos utilizados en los experimentos para la detección de	
proteínas específicas.	43
3.1.3.9. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular ...	43

Tabla de contenido

3.1.3.10. Otros productos.....	44
3.2.Métodos.....	45
3.2.1.Preparación de los cultivos celulares.....	45
3.2.1.1. Composición de las disoluciones.....	45
3.2.1.2. Preparación del cultivo de células de glioma.....	45
3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de astrocitos.....	46
3.2.2.Tratamientos con péptidos penetrantes.....	47
3.2.3.Sincronización del ciclo celular en células de glioma C6 en la fase G0/G1.....	47
3.2.4.Amplificación de plásmidos.....	48
3.2.4.1. Transformación bacteriana y extracción del ADN plasmídico.....	48
3.2.4.2. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción.....	48
3.2.4.3. Electroforesis de ADN.....	49
3.2.5.Transfección de las células C6 de glioma de rata.....	49
3.2.6.Selección de clones.....	49
3.2.7.Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA (<i>small interfering RNA</i>).....	50
3.2.8.Co-inmunoprecipitación.....	51
3.2.8.1. Co-inmunoprecipitación de proteínas endógenas.....	52
3.2.8.2.Co-inmunoprecipitación de proteínas exógenas.....	53
3.2.9. <i>Pull-down</i> avidina-biotina.....	53
3.2.10.Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western.....	54
3.2.10.1. Extracción de proteínas.....	54
3.2.10.2. Cuantificación de proteínas: Análisis en el fluorímetro Qubit con el kit de análisis de proteínas.....	54
3.2.10.3. Preparación de los geles.....	54
3.2.10.4. Preparación de las muestras para la electroforesis.....	55
3.2.10.5. Electroforesis de proteínas.....	55
3.2.10.6. Electrotransferencia.....	55
3.2.10.7. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana.....	55
3.2.10.8. Inmunodetección.....	56
3.2.11.Determinación de la expresión y localización de proteínas mediante inmunocitoquímica.....	57
4. RESULTADOS.....	61
4.1.Papel de Csk en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6.....	61
4.2.Papel de PTEN en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6.....	63
4.2.1.Estudio del efecto del silenciamiento de PTEN sobre la inhibición de la actividad de c-Src promovida por la Cx43.....	63
4.2.2. Estudio del efecto de la restauración de la expresión de Cx43 en los niveles de PTEN en células de glioma C6.....	67
4.3.Estudio de la interacción entre Cx43, PTEN, Csk y c-Src.....	73
4.3.1.Estudios de colocalización en células de glioma.....	73
4.3.2.Estudios de co-inmunoprecipitación en células de glioma.....	77

4.3.2.1. Puesta a punto de la técnica de co-inmunoprecipitación en células C6	77
4.3.2.2. Estudios de colocalización en astrocitos	78
4.3.3. Estudios de colocalización en astrocitos	79
4.3.4. Estudios de co-inmunoprecipitación en astrocitos	82
4.3.5. Estudio de la participación del motivo de unión a PDZ de PTEN en su interacción con la Cx43	82
4.3.6. Implicación de la región de la Cx43 que interacciona con c-Src en la interacción entre Cx43, PTEN, Csk y c-Src.	86
5. DISCUSIÓN	91
5.1. Papel de Csk en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6	91
5.2. Papel de PTEN en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6	92
5.3. Efecto de la restauración de la expresión de Cx43 en la expresión y funcionalidad de PTEN	93
5.4. Interacción entre la Cx43, PTEN, Csk y c-Src	96
5.5. Estudio de los dominios de PTEN implicados en su interacción con la Cx43	97
5.6. Estudio de las regiones de la Cx43 implicadas en su interacción con PTEN	98
6. CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	107

Lista de esquemas

Esquema 1	Clasificación molecular de los gliomas propuesta por Vigneswaran et al.....	4
Esquema 2	Interacciones entre células gliales y neuronas en el sistema nervioso.....	7
Esquema 3	Estructura de las uniones comunicantes. Modificado de Söhl et al., 2005.....	10
Esquema 4	Secuencia y sitios de fosforilación e interacción con proteínas del dominio carboxilo terminal de la Cx43. Extraído de Tabernero et al., 2015.....	11
Esquema 5	Síntesis y degradación de conexina-43. Modificado de Naus y Laird, 2010.....	12
Esquema 6	Fosforilación de la conexina-43. Modificado de Solan y Lampe, 2005.....	14
Esquema 7	Mecanismo propuesto de la parada del ciclo celular promovida por la conexina-43.....	18
Esquema 8	Dominios estructurales de c-Src y v-Src. Modificado de Yeatman et al., 2004.....	19
Esquema 9	Regulación de la actividad de c-Src. Modificado de Yeatman et al., 2004....	20
Esquema 10	Regulación de las uniones comunicantes mediante la interacción con c-Src. Modificado de Warn-Cramer y Lau,2004.....	22
Esquema 11	Mecanismo de activación e inactivación de Csk. Tomado de Okada, 2012..	24
Esquema 12	Bucle de regulación SFKs/Cbp/Csk. Tomado de Okada, 2012.....	26
Esquema 13	Mecanismo de regulación de la actividad de PTEN. Modificado de Vazquez, 2006.....	31
Esquema 14	Técnica de la microtripsinización.....	50
Esquema 15	Fundamento de la técnica del siRNA.....	51
Esquema 16	Fundamento de la técnica de co-inmunoprecipitación.....	52
Esquema 17	Fundamento de la técnica de <i>scrape loading</i>	59
Esquema 18	Hipótesis de interacción de la Cx43 con PTEN a través de los motivos de unión a PDZ de ambas y una proteína de andamiaje.....	83

Lista de figuras

Figura 1	Puesta a punto del silenciamiento de Csk en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.....	62
Figura 2	Efecto del silenciamiento de Csk sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.....	63
Figura 3	Puesta a punto del silenciamiento de PTEN en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.....	64
Figura 4	Efecto del silenciamiento de PTEN sobre la actividad de c-Src en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.....	65
Figura 5	Efecto del silenciamiento de PTEN sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.	66

Lista de figuras

Figura 6	Efecto del cosilenciamiento de PTEN y Csk sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.	67
Figura 7	Efecto de la restauración de la expresión de Cx43 sobre la expresión de PTEN en células de glioma C6.....	68
Figura 8	Cambios en la expresión de PTEN durante el ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en G0/G1.....	69
Figura 9	Expresión de Cx43 y determinación de la permeabilidad en las células de glioma C6 transfectadas con el vector pIRES-Cx43Y247F/Y265F.....	71
Figura 10	Efecto de la restauración de la Cx43 o del mutante de Cx43Y247F/Y265F en la activación de la cascada PTEN/PI3K/Akt.....	72
Figura 11	Tinción inmunocitoquímica de Csk en células de glioma C6-Cx43.....	73
Figura 12	Colocalización de Cx43 y Csk en células de glioma C6-Cx43.....	74
Figura 13	Tinción inmunocitoquímica de PTEN en células de glioma C6-Cx43.....	75
Figura 14	Colocalización de Cx43 y PTEN en células de glioma C6-Cx43.....	76
Figura 15	Puesta a punto de la co-inmunoprecipitación de HA-PTEN.....	78
Figura 16	Interacción entre Cx43, c-Src, CSK y PTEN en células de glioma C6.....	79
Figura 17	Colocalización de Cx43 y Csk en astrocitos.....	80
Figura 18	Colocalización de Cx43 y PTEN en astrocitos.....	81
Figura 19	Interacción entre Cx43, c-Src, CSK y PTEN en astrocitos.....	82
Figura 20	Puesta a punto de la co-inmunoprecipitación con la etiqueta Flag.....	84
Figura 21	Implicación del motivo de unión a PDZ de PTEN en la interacción con la Cx43 en células de glioma C6.....	85
Figura 22	Implicación del motivo de unión a PDZ de PTEN en la interacción con la Cx43 en astrocitos.....	86
Figura 23	Puesta a punto del pull-down de los péptidos biotinilados con avidina-agarosa.....	87
Figura 24	Estudio de la región de Cx43 implicada en la interacción entre PTEN, Cx43, c-Src, y Csk en células de glioma C6.....	88
Figura 25	Colocalización de GFP-PTEN y el péptido TAT-245-283-B en células de glioma C6.....	89

Lista de tablas

Tabla 1	Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western e inmunocitoquímica	42
Tabla 2	Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western e inmunocitoquímica.....	43

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 ependimarias (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; Ostrom et al., 2014). Los pacientes diagnosticados con GBM tienen una vida media de uno a dos años (Stupp et al., 2009); el hecho de ser un tumor altamente infiltrativo hace que sea más fácil la recurrencia del tumor tras la cirugía y las terapias actuales. Los glioblastomas se componen de una población de células heterogéneas, que incluye células con propiedades de células madre (*cancer stem cells*, CSC), denominadas células madre de glioma (*glioma stem cells*, GSC) (Chen et al., 2012; Gilbertson and Graham, 2012); para revisión, ver Germano and Binello, 2014; Turpin et al., 2015). Estas células se caracterizan por su alto potencial oncogénico, su resistencia a los tratamientos convencionales, su capacidad de autorrenovación, y su diferenciación en diferentes tipos celulares. Por ello, a estas células se les atribuye la recurrencia de estos tumores (Jackson et al., 2015).

A pesar de los avances en el estudio de esta patología, en los últimos años los tratamientos no han conseguido incrementar la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con un glioma maligno.

1.1.1. Clasificación de los gliomas

La clasificación de los tumores cerebrales ha estado clásicamente basada en criterios histopatológicos. Así, 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: atipia nuclear, actividad mitótica, proliferación vascular y necrosis (Gudinaviciene et al., 2004). 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, ya que, además, éstas pueden aportar datos acerca de cuál

puede ser el tratamiento más efectivo. Por esto, recientemente se han propuesto varias clasificaciones moleculares de los gliomas, de las que se hablará más adelante.

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres tipos de gliomas, atendiendo al origen celular. En esta Memoria nos centraremos en los astrocitomas, que son los más frecuentes y 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 histopatológica 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 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 estos tumores. 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 caloso. Los principales síntomas que presentan los pacientes incluyen dolor de cabeza, cambios en la personalidad y elevada presión intracraneal.

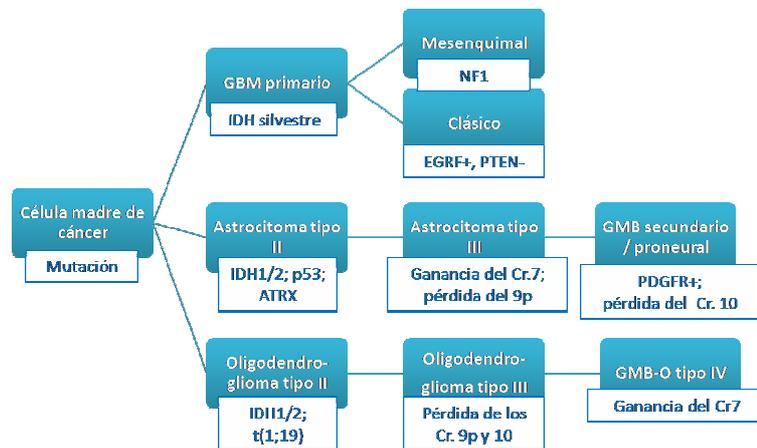
Desde el punto de vista histológico, el GBM presenta una amplia variedad de alteraciones, como son la necrosis, las hemorragias ocasionales, la prominente proliferación vascular, la aparición de células gigantes, el polimorfismo nuclear o la elevada actividad mitótica. Según la clasificación llevada a cabo por Scherer en el año 1940, existen dos grandes tipos de GBM: el GBM primario y el GBM secundario (Louis et al., 2007; 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; Vigneswaran et al., 2015). El GBM primario es mucho más frecuente que el GBM secundario y se caracteriza por la ausencia de un astrocitoma maligno preexistente, es decir, surge *de novo*. La incidencia es mayor en personas de edad avanzada, con un máximo entre los 60 y los 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).

Como se ha mencionado anteriormente, cada vez se hace más necesaria una clasificación de los gliomas atendiendo a criterios moleculares. A este respecto, se ha propuesto una clasificación en cuatro subtipos: proneural, neural, clásico y mesenquimal (Verhaak et al., 2010). Por su parte, Vigneswaran y col. han propuesto recientemente una clasificación utilizando datos del *Cancer Genome Atlas Research*, la cual se resume en el **esquema 1** (Vigneswaran et al., 2015). Esta se basa en nuevas mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1 e IDH2), el fenotipo de hipermetilación de las islas CpG (pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos), que

define un subtipo de glioma con mayor supervivencia, la codelección de los brazos de los cromosomas 1p/19q, que ayuda a la clasificación de los tumores de origen oligodendroglial, y las mutaciones en el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERTp) que se han correlacionado con un peor pronóstico y que permiten la división de los GBM, hasta ahora descritos como primarios o secundarios, en tres tipos: proneurales, mesenquimales y clásicos.

Mediante estos mismos marcadores, Eckel-Passow et al. han propuesto una clasificación similar en cinco tipos según las mutaciones en estos genes: triple positivo (mutaciones en TERTp e IDH más codelección de 1p/19q), mutante en TERTp e IDH, mutante sólo en IDH, mutante sólo en TERTp y triple-negativo (Eckel-Passow et al., 2015).

La incorporación de los cambios moleculares a la clasificación de la OMS ya existente puede mejorar el diagnóstico de los pacientes, el desarrollo de tratamientos personalizados y la eficacia de los ensayos clínicos



Esquema 1. Clasificación molecular de los gliomas propuesta por Vigneswaran et al.

1.1.2. Alteraciones moleculares en los gliomas

En las dos últimas décadas se han desarrollado mejoras en el tratamiento de los tumores gracias al estudio de las alteraciones genómicas, que ha posibilitado la creación de terapias dirigidas. Sin embargo, este éxito aún no se ha dado en el tratamiento de los gliomas.

La acumulación de múltiples mutaciones genéticas en una célula proporciona una ventaja en la supervivencia, relacionada con la proliferación y la evasión tanto de la supresión del crecimiento como de la apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2011). Hace tiempo que se describieron alteraciones cromosómicas en los gliomas, siendo las más comunes la amplificación de los cromosomas 7 y 12 y las deleciones en los cromosomas 1, 9 y 10 (Bello et al., 1994; Reifenberger et al., 1995). Los glioblastomas presentan grandes regiones con pérdida de heterocigosis (procesos en los que se pierde la copia funcional que quedaba de un supresor

tumoral), incluyendo deleciones en los cromosomas 1p, 10p, 10q, 13q, 19q y 22q (James et al., 1988; Fujimoto et al., 1989; Fujisawa et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Nakamura et al., 2005).

Los estudios actuales se centran en la comprensión de las mutaciones que podrían estar implicadas en la génesis del GBM, su origen celular y las causas de la carcinogénesis (Nduom et al., 2012). El proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer (*Cancer Genome Atlas*) 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 describió que la mayoría de las muestras de GBM contienen alteraciones críticas en tres vías: la vía RB1, lo cual elimina los puntos de control del ciclo celular, la vía TP53, para evadir la apoptosis y la senescencia, y la vías de RTK, relacionadas con el aumento de la proliferación (Cancer Genome Atlas Research 2008). La progresión al GBM se suele asociar con la deleción o mutación de diversos genes, entre ellos PTEN (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase*), p53, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) o TGF-beta (*transforming growth factor*) (Rao and James, 2004). La deleción o mutación de NF1 (*neurofibromin 1*) y la amplificación de ERBB2 (*receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*) son más frecuentes de lo que se había pensado; otras alteraciones descubiertas recientemente son las mutaciones frecuentes de los genes IDH1 e IDH2 en glioblastomas secundarios (para revisión, ver Purow and Schiff, 2009; Riemenschneider et al., 2010).

Además de las alteraciones genéticas, las anomalías epigenéticas, como son los cambios en los patrones de metilación de citosinas del ADN genómico, 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). En el GBM, la metilación media la inactivación de una amplia variedad de genes asociados con la supresión tumoral, el ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (para revisión, véase Yong and Tsankova, 2015).

Una proteína cuya expresión se pierde frecuentemente en los gliomas es la conexina-43 (Cx43). Tanto es así que, a medida que aumenta la malignidad de un tumor, disminuye la expresión de Cx43; es decir, los niveles de Cx43 son muy bajos en los astrocitomas anaplásicos (grado III) y prácticamente inexistentes en los GBM (grado IV) (Shinoura et al., 1996; Huang et al., 1999; Soroceanu et al., 2001; Pu et al., 2004; Caltabiano et al., 2010; Sin et al., 2012; Gielen et al., 2013).

En los últimos años se ha identificado el importante papel de los microARN (miARNs) en el desarrollo del cáncer (Lu et al., 2005). Los microARNs son moléculas pequeñas de RNA no codificantes, de 20-22 nucleótidos, que inhiben la expresión génica promoviendo la degradación de los ARN mensajeros o inhibiendo la traducción. Estos últimos años, se ha demostrado el importante papel de los microARNs en cáncer, incluyendo los glioblastomas, donde controlan la proliferación, la invasión, la angiogénesis y la apoptosis (Chan et al., 2005; Ernst et al., 2010; Brower et al., 2014).

Introducción

El más frecuente de ellos es el miR-21, que se encuentra expresado tanto en tejido tumoral de GBM como en líneas celulares de GBM y contribuye al fenotipo maligno inhibiendo la expresión de genes involucrados en la apoptosis (Chan et al., 2005).

Varios miARNs frecuentemente alterados en los gliomas regulan la expresión de Cx43, como el miRNA-125b (Jin et al., 2013) o el miR-19a/b (Danielson et al., 2013), que forma parte del *cluster* miR17-92, un oncogén potencial descrito en varios tumores incluyendo a los gliomas (Ernst et al., 2010), y cuya expresión correlaciona con la malignidad (Jia et al., 2013).

Otros miARNs alterados en los gliomas son los 221-222 (Ciafrè et al., 2005; Conti et al., 2009). Estos inhiben la transcripción de Cx43 (Hao et al., 2012) y de otras proteínas relevantes en los tumores como p27, un importante regulador del ciclo celular (Gillies and Lorimer, 2007), PTEN, uno de los supresores tumorales más frecuentemente alterados en los gliomas, de la que se hablará más adelante (Garofalo et al., 2009) y la proteína tirosina fosfatasa μ (PTP μ), un mediador de la invasividad (Quintavalle et al., 2012). Otro miRNA que afecta a la expresión de PTEN en los gliomas es el miR-494-3p, que media la proliferación celular, la invasión, la migración y la apoptosis en células de glioblastoma humano (Li et al., 2015).

Recientemente, Wong y col. han mostrado el papel del miR-148a y el miR-31 en la proliferación, el mantenimiento de las células madre y la angiogénesis de los gliomas. Parte de estas funciones están mediadas por una diana común a ambos, el factor de inhibición de HIF1 (FIH1, *factor inhibiting hypoxia-inducible factor 1*), y su vía del factor inducible por hipoxia (*HIF1 α* , *hypoxia-inducible factor*) y Notch. Así, estos miARNs proveen al tumor de una forma de activar la angiogénesis incluso en un entorno normóxico (Wong et al., 2015).

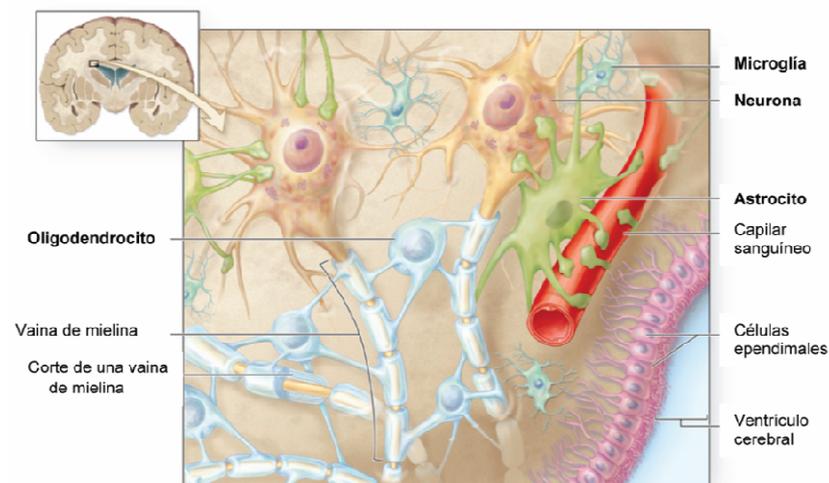
Por otra parte, en los gliomas se encuentran niveles muy bajos de otros microARNs relacionados con la regulación de funciones celulares que no benefician el crecimiento y la propagación del tumor (para revisión, véase (Martinez and Esteller, 2010; Chistiakov and Chekhonin, 2012)). Por ejemplo, el miR-34a, que regula la expresión de varios oncogenes, se encuentra reducido en glioblastomas humanos, y su restauración suprime el crecimiento en explantes de gliomas (Li et al., 2009).

1.2. Comunicación intercelular y proliferación en células gliales.

El sistema nervioso central (SNC) está formado por dos grandes tipos celulares: 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 clave para su correcto funcionamiento. Dentro de las células de la glía se distinguen diferentes clases: células ependimarias, células macrogliales y células microgliales. Las células macrogliales se pueden subdividir, a su vez, en dos grupos: astrocitos y oligodendrocitos.

Los astrocitos constituyen la glía mayoritaria del SNC (**Esquema 2**) y como se ha mencionado en el apartado anterior su malignización da lugar a los gliomas. Los astrocitos ejercen importantes funciones en el cerebro, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta. Entre estas funciones cabe destacar:

1. Inducción de la barrera hematoencefálica (Janzer and Raff, 1987; Abbott et al., 2006).
2. Apoyo a la migración y a la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Stevens, 2008; Kosodo and Huttner, 2009).
3. Soporte metabólico a las neuronas (Medina et al., 1999; Pellerin, 2003).
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).



Esquema 2. Interacciones entre células gliales y neuronas en el sistema nervioso.

Para poder ejercer correctamente estas funciones, los astrocitos necesitan estar acoplados a través de uniones comunicantes, lo que les permite coordinar su actividad y actuar como redes celulares (Giaume et al., 2010).

Globalmente, se puede 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.

Introducción

Las uniones comunicantes son especializaciones de membrana que contienen canales de comunicación intercelular, los cuales permiten el paso de moléculas pequeñas, de entre 1 y 1,5 kDa. Así, a través de estas uniones se pueden intercambiar segundos mensajeros o metabolitos energéticos entre células adyacentes, lo cual es clave para el correcto funcionamiento de los astrocitos.

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). 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 (Loewenstein, 1981; Bennett et al., 1991). 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).

Como especializaciones de membrana que son, las uniones comunicantes se encuentran insertadas en la bicapa lipídica. Se ha descrito que las proteínas componentes de las uniones comunicantes se localizan en las regiones de membrana llamadas balsas lipídicas o *lipid rafts*. Las balsas lipídicas son zonas de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos, lo cual confiere una mayor fluidez a la membrana en el entorno de la unión comunicante. Las balsas lipídicas juegan un importante papel en la señalización celular, puesto que en ellas se localizan los receptores de señalización y las caveolas. Se ha demostrado que las proteínas que componen las uniones comunicantes de los astrocitos colocalizan con la caveolina-1, una de las proteínas marcadoras de las caveolas (Schubert et al., 2002).

Una de las funciones de los astrocitos es la captación de K^+ , debido a la alta permeabilidad que presentan a este ión (Kuffler et al., 1966) tras lo que es transmitido de unos astrocitos a otros a través de las uniones comunicantes (Gardner-Medwin, 1986). En este sentido, Mobbs puso de manifiesto que el acoplamiento entre astrocitos a través de las uniones comunicantes aumenta su capacidad de amortiguar espacialmente el K^+ (Mobbs et al., 1988). 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 participan las uniones comunicantes es la neuromodulación (Pannasch and Rouach, 2013). Los astrocitos presentan una forma de excitabilidad basada directamente en la dinámica del Ca^{2+} intracelular, que es esencialmente independiente del potencial de membrana (Cornell-Bell et al., 1990; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991). Así, en los astrocitos se expresan una amplia variedad de receptores funcionales para agentes neuroactivos (Dermietzel et al., 1991), 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 Ca^{2+} intracelular, que se han denominado ondas de Ca^{2+} . Estas ondas de 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 Ca^{2+} (Cornell-Bell et al., 1990; Jensen and Chiu, 1990). La iniciación y propagación de las ondas de Ca^{2+} comprende una serie de pasos intra e intercelulares, en los cuales la fosfolipasa C, el inositol trisfosfato (IP3), los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y las

uniones comunicantes desempeñan un papel crítico (Naus et al., 1997). Dani y col. (Dani et al., 1992; Araque et al., 2002) han demostrado que las inervaciones aferentes de neuronas glutamatérgicas provocan la aparición de ondas de Ca^{2+} en astrocitos. El hecho de que las señales de 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 and 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 2**). 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, colaboran 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 (Vicario and Medina, 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).

Todo esto sugiere que los astrocitos, gracias al acoplamiento a través de las uniones comunicantes, se comportan como un sincitio metabólico: el paso de metabolitos a través de las uniones comunicantes permite la distribución de la fuente de energía y de esqueletos carbonados a través de todo el cerebro. Así, la regulación de la permeabilidad de estas uniones puede ser crucial en el metabolismo general del cerebro. En este sentido, se ha mostrado que 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 sólo obtienen este sustrato para mantener la actividad glutamatérgica cuando están conectados a través de las uniones comunicantes (Rouach et al., 2008).

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

La unidad de la unión comunicante es el llamado conexón. El conexón o hemicanal 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 3b**). 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).

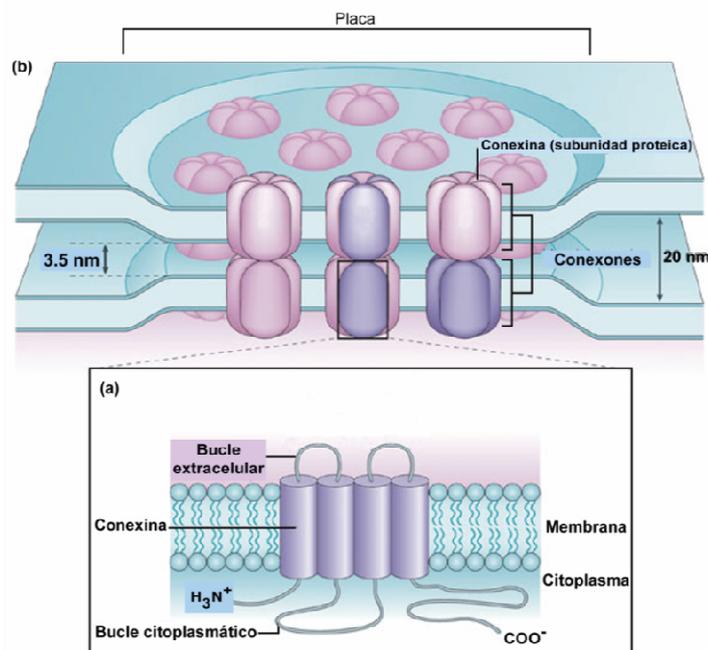
El análisis de difracción de rayos X de las uniones comunicantes aisladas demuestra que cada conexón tiene una estructura en anillo, formado por seis subunidades proteicas, que rodean un canal con características hidrofílicas. En los mamíferos, la familia de proteínas que integran las

Introducción

uniones comunicantes es la familia de las conexinas (Cxs) y, por el momento, se han caracterizado alrededor de 21 subtipos en la especie humana (para revisión, véase Nielsen et al., 2012).

En los astrocitos, la principal proteína que forma las uniones comunicantes es la conexina-43 (Cx43) (Dermietzel et al., 1991; 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).



Esquema 3. Estructura de las uniones comunicantes. Modificado de Söhl et al., 2005.

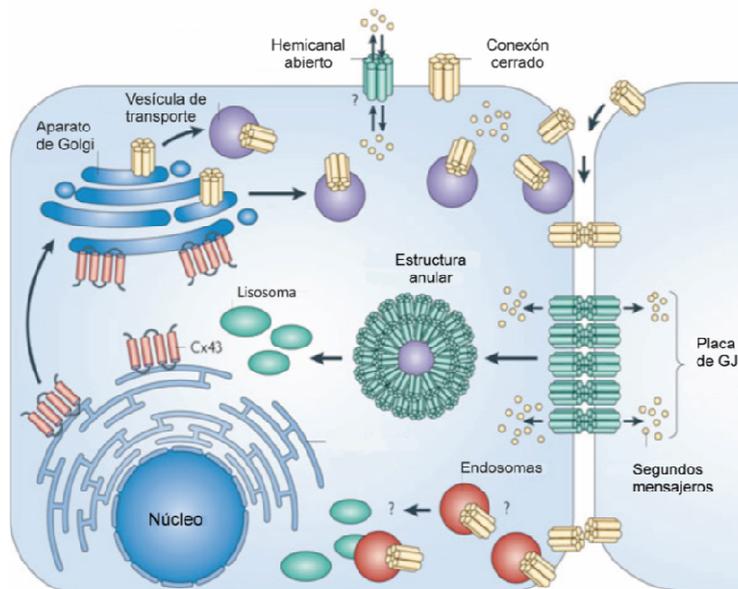
El análisis de la secuencia de aminoácidos de varias Cxs demuestra que presentan cuatro dominios transmembrana, dos dominios citoplasmáticos correspondientes a las terminaciones amino y carboxilo, dos dominios extracelulares y un bucle citoplasmático (Kumar and Gilula, 1996; Chaytor et al., 1997) (**Esquema 3a**). 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), mientras el resto son hidrofóbicos y por tanto responsables de la interacción con la bicapa lipídica. Las diferentes conexinas presentan una alta homología, excepto para el bucle citoplasmático y el extremo carboxilo terminal; la longitud de este último difiere mucho entre las conexinas y les confiere distintos pesos moleculares, que se

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 los conexones permanecen 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, ya que la transcripción de los genes de las conexinas está modulada por procesos epigenéticos, tales como modificaciones en las histonas, metilación del ADN y microARNs. 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 para enfermedades cardíacas, neurológicas o cáncer (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. Recientemente se ha descrito un mecanismo mediante el cual Akt, MAPK y c-Src se coordinan para regular el recambio rápido de las uniones comunicantes mediante la fosforilación de la Cx43 (Solan and Lampe, 2014).



Esquema 5. Síntesis y degradación de conexina-43. Modificado de Naus y Laird, 2010.

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; Shao et al., 2005; Naus and Laird, 2010) (**Esquema 5**).

La ubiquitinación de la Cx43 está implicada en su degradación asociada al retículo endoplásmico así como al tráfico de las conexinas a los lisosomas. A ambos niveles, este proceso está fuertemente afectado por cambios en el entorno extracelular. Cada vez hay más pruebas de que la ubiquitinación de las conexinas es un importante mecanismo para modificar rápidamente el nivel de las uniones comunicantes en la membrana tanto en condiciones normales como patológicas (para revisión, ver Kjenseth et al., 2010).

Se ha observado que las uniones comunicantes, una vez formadas, no pueden separarse de nuevo en conexones en condiciones fisiológicas. En estudios de microscopía electrónica se han observado 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 uniones comunicantes internalizadas por invaginación que son transportadas al interior del citoplasma para su posterior degradación (para revisión, véase Segretain and Falk, 2004; Naus and Laird, 2010). Las uniones comunicantes internalizadas son degradadas por lisosomas, mientras que los proteosomas desestabilizan las uniones comunicantes fosforiladas en el citoplasma (para revisión véase Segretain and Falk, 2004).

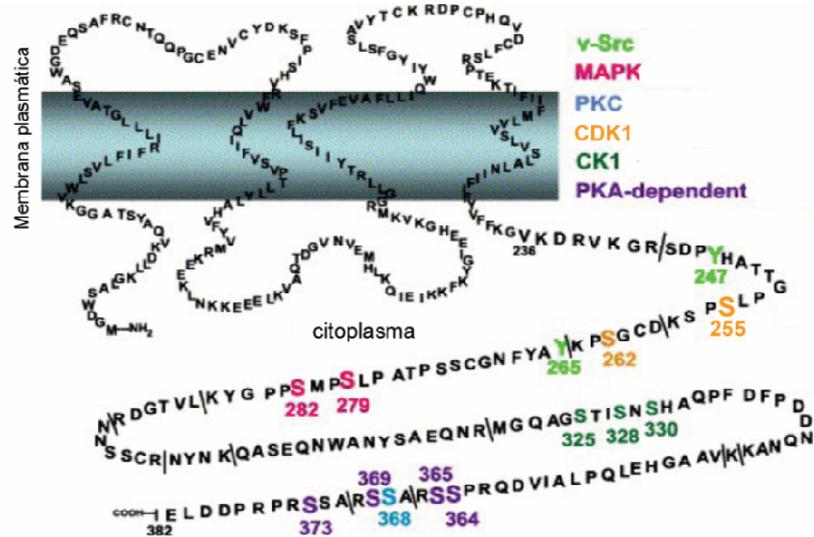
1.2.3. Fosforilación de la conexina-43. Relación con el ciclo celular.

La mayoría de las conexinas (Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 y Cx56) pueden ser 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 del extremo carboxilo de la Cx43 promueve la formación de las uniones comunicantes. Además, se ha demostrado que la fosforilación en el extremo carboxilo terminal de la Cx43 afecta al ensamblaje y a la degradación de esta proteína así como a la comunicación de las *gap junctions* (para revisión, véase: Solan and Lampe, 2005).

En el **esquema 6** se muestran las kinasas conocidas hasta el momento que fosforilan la Cx43 y los diferentes residuos que fosforilan. La activación de la proteína kinasa 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 kinasa 1 (CK1) también parece estar implicada en el ensamblaje de la Cx43 para la formación de los conexones dentro de las uniones comunicantes.

Introducción

Por su parte, la proteína quinasa C (PKC) fosforila directamente la Cx43 en los residuos de serina 262 y 368 (Reynhout et al., 1992).



Esquema 6. Fosforilación de la conexina-43. Modificado de Solan y Lampe, 2005.

Estudios recientes realizados en cardiomiocitos que expresaban Cx43 con una mutación en la serina 262 (S262A) encontraron una disminución en la síntesis de ADN, indicando que el residuo serina 262 sensible a la fosforilación por la PKC tiene un papel clave en la progresión del ciclo celular. La fosforilación en los residuos Ser279/Ser282 debida a la MAP quinasa tiene un importante papel 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 Tyr247 y Tyr265, disminuyendo la comunicación intercelular mediante el cierre de las uniones comunicantes (Lin et al., 2001). Esta fosforilación se modifica a lo largo del ciclo celular (Herrero-González et al., 2010).

La fosforilación, localización y funcionalidad de la Cx43 se encuentran reguladas durante el ciclo celular y pueden ser responsables de los cambios de comunicación observados a lo largo de éste (para revisión, véase Lampe and Lau, 2004; Solan and Lampe, 2005; Solan and Lampe, 2009). Estudios realizados en diferentes tipos celulares muestran que la expresión de la Cx43 aumenta durante las fases G1 y S y que sus niveles afectan a la expresión de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular (Chen et al., 1995; Zhang et al., 2003b).

Cuando las células se sincronizan en diferentes fases del ciclo celular, la fosforilación de la Cx43 aumenta a medida que las células pasan desde la fase G0/G1 a la fase S. En la línea celular de riñón de rata se ha observado que, durante la fase G0/G1, la Cx43 se encuentra predominantemente en la membrana plasmática, donde se ensambla formando las típicas placas de las uniones comunicantes (Solan and Lampe, 2005). A medida que las células progresan en el ciclo celular, el ensamblaje de la Cx43 en placas es menor. Esta disminución de la formación de las placas de las uniones comunicantes está acompañada de una mayor localización de la Cx43 en el citoplasma y un incremento en la fosforilación de la serina 368, residuo fosforilado por la PKC

(Lampe and Lau, 2000). No está muy claro si este aumento de la Cx43 en el citoplasma es debido a la inhibición de la formación de las uniones comunicantes o si es el resultado de la rotura de éstas. En cualquier caso, hay una disminución en el ensamblaje de placas para formar las uniones comunicantes durante la fase S y parece que la PKC tiene un papel importante en este proceso.

Aunque durante la fase S se observa una acumulación de la Cx43 en el citoplasma, muchas placas permanecen en la membrana plasmática, y sorprendentemente estas células muestran una mayor comunicación que en la fase G0/G1. Hay que mencionar que las placas que se observan en la fase S son diferentes de las placas observadas en la fase G0/G1; durante la fase G0/G1, la Cx43 se asocia preferentemente con ZO-1, mientras que la interacción de la Cx43 con ZO-2 se mantiene durante las fases G0/G1 y S (Singh et al., 2005). Estudios realizados por Koo y col. en células de hígado de rata muestran un incremento en la fosforilación de la Cx43 en la transición de la fase G0, G1 y S debida a la PKC. Sin embargo, en este caso, hay una disminución de la comunicación en la fase S (Koo et al., 1997).

Por último, estudios realizados en diferentes tipos celulares muestran que la Cx43 es fosforilada en la Ser255 y en la Ser262 por la kinasa dependiente de la ciclina B (CDK 1) durante la mitosis, lo que contribuye al incremento de la fosforilación de la Cx43 y a una fuerte disminución de la comunicación intercelular (Kanemitsu et al., 1998; Lampe et al., 1998; Cooper and Lampe, 2002). Hay que destacar que los últimos estudios revelan que la CDK1 es la única CDK indispensable para la progresión del ciclo celular (para revisión, véase Hochegger et al., 2008).

Durante la fase M, la Cx43 se encuentra predominantemente en el citoplasma formando agrupaciones de vesículas (Xie et al., 1997; Lampe et al., 1998). Todos estos datos, en su conjunto, indican que la fosforilación y la localización de la Cx43 se encuentran reguladas durante el ciclo celular y pueden ser responsables de los cambios de comunicación observados en estas circunstancias (Solan and Lampe, 2009).

1.2.4. La conexina-43 como proteína supresora de tumores en 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 (Loewenstein et al., 1966).

De hecho, se ha descrito que la expresión de Cx43 se relaciona inversamente con el grado de malignidad de los astrocitomas; así, es muy bajo en los astrocitomas anaplásicos (grado III) e indetectable en los GBM (grado IV) (Shinoura et al., 1996; Huang et al., 1999; Soroceanu et al., 2001; Pu et al., 2004; Caltabiano et al., 2010; Sin et al., 2012; Gielen et al., 2013).

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).

Hay que destacar que, en algunos glioblastomas, los niveles de ARN mensajero para la Cx43 no reflejan los niveles de proteína presente en las células (Caltabiano et al., 2010; Gielen et al., 2013; Sin et al., 2012). De hecho, Gielen et al. analizaron el número de copias del gen de la Cx43 (GJA1, *gap junction protein, alpha 1*) y sus niveles de ARN mensajero en astrocitomas de grado III y IV en el *Cancer Genome Atlas* (Gielen et al., 2013). Observaron que el gen Cx43/GJA1 tiene tendencia a estar deletado en el glioblastoma (11.3%) y que, mientras el 27.3% de los glioblastomas presentaban una disminución a la mitad del ARNm para la Cx43, el 20.3% de los GBM mostraban un aumento del doble de este ARNm comparado con tejidos normales. Al analizar muestras de tejido tumoral, encontraron niveles mínimos de la proteína Cx43 en los glioblastomas. Estos resultados indican que los reducidos niveles de Cx43 que se encuentran en gliomas de grado III y IV no se deben a un descenso de la transcripción, sino a la alteración de los mecanismos de regulación post-traducciona l de la Cx43 en estos tumores (Klotz, 2012).

A este respecto conviene destacar que, como se ha expuesto en el apartado 1.1.2, en los gliomas se han encontrado alteraciones en varios miARNs que inhiben la expresión de Cx43, entre ellos el miRNA-125b (Jin et al., 2013), el miR-19a/b (Danielson et al., 2013), cuya expresión correlaciona con la malignidad (Jia et al., 2013) y los 221-222 (Hao et al., 2012). El mecanismo más frecuente por el que los miARNs reducen la expresión de una proteína suele ser por el apareamiento imperfecto de bases de éstos con secuencias de la región no traducida 3' de los ARN mensajeros diana. Esto produce la inhibición de la traducción sin que se degrade el ARNm, lo que explicaría la falta de relación entre los niveles de ARNm para la Cx43 y los niveles de esta proteína en algunos gliomas de alto grado (Caltabiano et al., 2010; Sin et al., 2012; Gielen et al., 2013; para revisión, ver Tabernero et al., 2015).

La restauración del gen de la Cx43 en células tumorales y, por tanto, el restablecimiento de la comunicación intercelular, trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Mehta et al., 1991; Zhu et al., 1991; Hirschi et al., 1996; Huang et al., 1998; Naus, 2002; Yu et al., 2012).

Además, se ha descrito que la restauración de los niveles de Cx43 en células madre de glioma revierte su fenotipo y, consecuentemente, reduce la tumorigenicidad de estas células (Yu et al., 2012). En este sentido, Yu y col. demostraron que, transfectando Cx43 en células madre de glioma, 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 tumores más pequeños que las células madre de glioma sin Cx43. Por otra parte, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que tanto la restauración de la Cx43 como el tratamiento con un péptido penetrante basado en su secuencia 245-283 (que contiene la región de interacción con c-Src y los residuos de tirosina que son fosforilados por éste) son capaces de revertir el fenotipo de las células madre de glioma humano GliNS2, incluyendo el cambio de cadherinas, a través de la inhibición de la actividad de c-Src y sus efectos sobre Id1 y Sox2 (Gangoso et al., 2014).

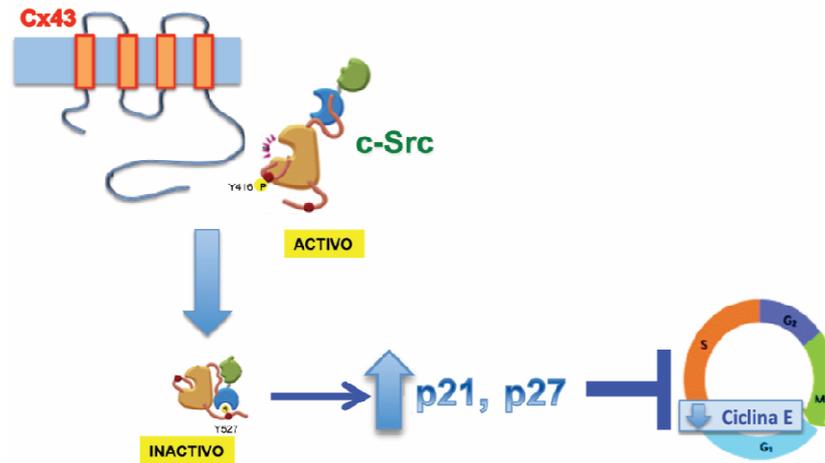
Por todo esto, la Cx43 se considera una proteína supresora de tumores.

Los mecanismos que explican la acción antitumoral de la Cx43 son variados. 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* (Mehta et al., 1986; Loewenstein and Rose, 1992). 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 (Sánchez-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). A este respecto, se sabe que la restauración de las conexinas mejora los resultados de la terapia génica suicida con la timidina kinasa del virus herpes simple y ganciclovir (HSVt/GCV k) a través del efecto *bystander* (Mesnil and Yamasaki, 2000; Paino et al., 2010). Paíno y col. desarrollaron un modelo experimental para esta terapia en células de glioma, y mostraron que el tratamiento con tolbutamida, que aumenta la comunicación a través de las uniones comunicantes, incrementaba la eficacia de la terapia génica suicida en células de glioma humano U373 (Paino et al., 2010). Recientemente se ha mostrado que el efecto *bystander* de las uniones comunicantes compuestas por Cx43 aumenta el efecto antitumoral del miR-124-3p en células de glioma C6 y en células de glioblastoma humano U87 (Zhang et al., 2015).

Por otro lado, hay autores que consideran que el efecto antiproliferativo es independiente de la comunicación (Huang et al., 1998; Moorby and Patel, 2001; Zhang et al., 2003a; Cherian et al., 2005; Dang et al., 2006). 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). A este respecto, se ha descrito que el dominio carboxilo terminal de la 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. 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; Lin et al., 2001; Lampe and Lau, 2004). Esta interacción entre Cx43 y c-Src disminuye la alta actividad del oncogén c-Src en las células de glioma C6. Además, Herrero-Gonzalez y col. observaron que,

cuando se disminuía la actividad de c-Src, aumentaba la expresión de p21 y p27, dos inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (Koffler et al., 2000; Zhang et al., 2001). Estos inhibidores provocan a su vez la reducción de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) 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 **esquema 7**.



Esquema 7. Mecanismo propuesto de la parada del ciclo celular promovida por la conexina-43.

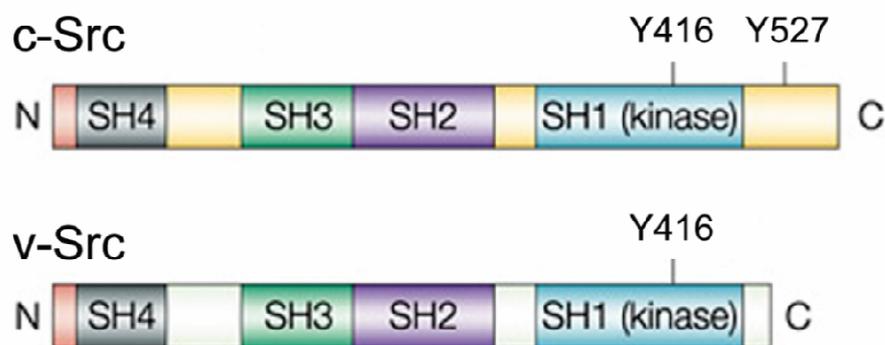
1.3. Actividad oncogénica de c-Src

La proteína kinasa c-Src forma parte de una gran familia de proteínas tirosina kinasas (PTK) no receptoras asociadas a membrana, la familia de kinasas Src (SFK, *Src family kinases*), de las cuales se han identificado 10 isoformas: Src, Frk, Lck, Lyn, Blk, Hck, Fyn, Yrk, Fgr y Yes, todas ellas importantes en el fenotipo tumoral (Sudol et al., 1993; Brown and Cooper, 1996). La principal función de las PTK es la regulación de vías de señalización intracelular catalizando la transferencia de un fosfato desde el ATP a residuos de tirosina de diferentes proteínas intracelulares.

La proteína kinasa c- Src (*cellular Src*) está involucrada en diferentes funciones, incluyendo adhesión, crecimiento, movimiento y diferenciación. 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 gliomas, Fyn, c-Src y Yes se sobreexpresan, siendo Fyn y c-Src efectores de la actividad oncogénica del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yang et al., 2009). También se ha encontrado una alta expresión de estas tres kinasas en células madre de glioma (Han et al., 2015). 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).

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 (Summy and Gallick, 2003; Sgroi, 2009). 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 reducción de la tasa de metástasis (Nam et al., 2002).

La estructura de las tirosina kinasas Src se muestra en el **esquema 8**.



Esquema 8. Dominios estructurales de c-Src y v-Src. Modificado de Yeatman et al., 2004.

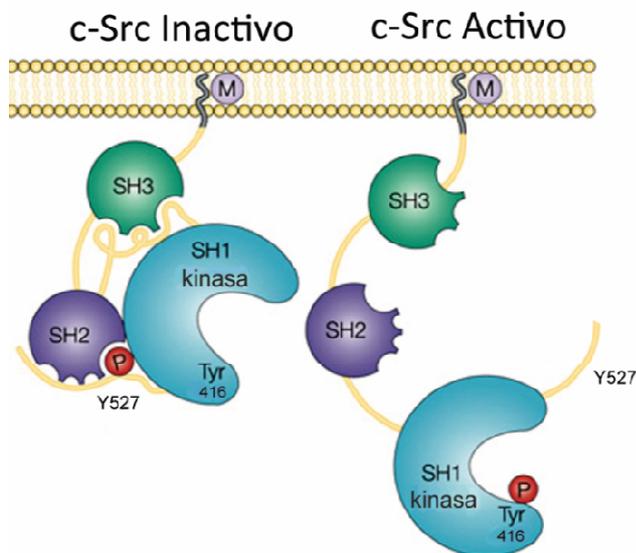
En el extremo amino terminal de las SFK hay una región, denominada SH4 (SH de *Src homology*), que contiene un sitio de miristilación y/o palmitoilación (Koegl et al., 1994), necesario para la asociación de estas proteínas con la membrana celular. A continuación se encuentran las regiones SH3, SH2, que permiten las interacciones proteína-proteína en las cascadas de señalización celular (Xu et al., 1997; Yeatman, 2004) y el dominio catalítico SH1, que contiene un sitio de autofosforilación en un bucle de activación. Seguidamente se halla el extremo carboxilo terminal, que incluye un residuo de tirosina cuya fosforilación contribuye a la inactivación de estas kinasas. Estos dominios se encuentran unidos entre sí por secuencias intrínsecamente desordenadas. Es interesante destacar que la secuencia que une los dominios SH3 y SH4 se llama “dominio único” por la falta de similaridad en su secuencia entre las diferentes SFK; sin embargo, el dominio único para cada miembro de la familia se encuentra bien conservado entre diferentes organismos, lo que sugiere un papel específico (Amata et al., 2014). En c-Src, este dominio puede unirse a lípidos, al dominio SH3 y a la calmodulina. La secuencia responsable de estas interacciones está conservada en c-Src, Fyn y Yes.

Introducción

Tanto los sitios N-terminales de modificación lipídica como el sitio de autofosforilación en el bucle de activación y los sitios c-terminales de regulación negativa se encuentran altamente conservados en las SFK.

El gen Src del virus del sarcoma de Rous fue el primer oncogén retrovítico identificado. Su producto, v-Src (*viral Src*), difiere de c-Src en una pérdida de aminoácidos en la secuencia del dominio carboxilo terminal, como la tirosina 527, clave para la inactivación de Src (Takeya and Hanafusa, 1983; Cooper et al., 1986). Es decir, v-Src se encuentra constitutivamente activo, mientras que c-Src tiene regulada su actividad. 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 está regulada por cambios conformacionales estabilizados por fosforilaciones, como se muestra en el **esquema 9**.



Esquema 9. Regulación de la actividad de c-Src. Modificado de Yeatman et al., 2004.

En su forma inactiva, c-Src se encuentra fosforilado en la tirosina 527, en el extremo carboxilo terminal. Esta tirosina fosforilada es reconocida por el dominio SH2, mientras que el dominio SH3 interacciona con un motivo de poli-prolinas de la región que une el dominio SH2 con el dominio catalítico. Estas interacciones intramoleculares cierran el dominio catalítico y secuestran los dominios SH2 y SH3, de forma que la enzima no puede interactuar con otras proteínas ni acceder a sus sustratos (Sicheri and Kuriyan, 1997; Williams et al., 1997; Xu et al., 1997; Schindler et al., 1999). La desfosforilación de la tirosina 527 libera a la molécula de esta conformación y permite la autofosforilación en la tirosina 416, en el sitio catalítico, lo que resulta en la activación completa de la kinasa.

La delección o la mutación de Y527 o el desplazamiento de SH2 y SH3 por interacciones intramoleculares o con ligandos de alta afinidad lleva también a la activación de c-Src en células

tumorales (Xu et al., 1997; Frame et al., 2002). Las fosfatasa que pueden activar a c-Src retirando el fosfato de la tirosina 527 todavía no están identificadas, pero algunos candidatos son (Roskoski et al., 2005): PTP α , PTP ϵ , PTP λ , CD45, PTP1B, SHP-1 y SHP-2 (Mustelin and Altman, 1990; Zheng et al., 1992; Fang et al., 1994; Somani et al., 1997; Bjorge et al., 2000; Zhang et al., 2004). Por último, la actividad de c-Src puede inhibirse mediante la fosforilación de la tirosina 527 por la kinasa C-terminal de Src (Csk, *C-terminal Src kinase*) (Pawson et al., 1987; Nada et al., 1991).

Hasta el momento se han descrito dos proteínas fosfatasa que pueden retirar el fosfato de la tirosina 416 de c-Src y producir con ello su inactivación: PTEN (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011) PTPN13 (*protein tyrosine phosphatase N13*) (Glondou-Lassis 2010) y TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*).

Los dominios SH2 y SH3 también son importantes para la actividad de c-Src, ya que las SFKs pueden activarse por la unión de ligandos a estos dominios (Brown and Cooper, 1996). Por ejemplo, c-Src es reclutado y activado por el receptor PDGF (*platelet derived growth factor*) a través de su interacción con el dominio SH2 (Kypta et al., 1990; Alonso et al., 1995). Varios sustratos de c-Src, como FAK (*focal adhesion kinase*) tienen motivos de unión a los dominios SH2 y SH3 de éste (Thomas et al., 1998). Además, las SFKs pueden activarse por el desplazamiento del dominio SH3 mientras el dominio SH2 sigue unido a la cola C-terminal (Moarefi et al., 1997).

Así, la estructura de la forma inactiva de las SFKs parece haber evolucionado para crear una estrecha relación de su activación con la unión a sus sustratos específicos.

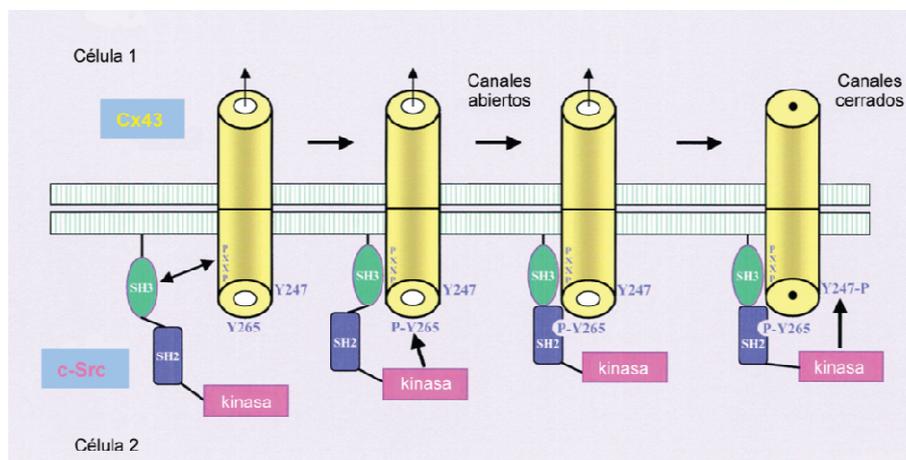
La actividad de c-Src puede inhibirse mediante interacciones con otras proteínas, como RACK1, (Mamidipudi et al., 2004), la caveolina-1, que disminuye su actividad mediante el reclutamiento de Csk (Li et al., 1996), y, como se describirá en el apartado 1.3.1., la Cx43.

Se ha descrito que c-Src es destruido por el proteosoma tras su ubiquitinación (Hakak and Martin, 1999; Laszlo and Cooper, 2009). Sólo la forma activa de c-Src es ubiquitinada, con lo que c-Src activo puede iniciar su propio proceso de eliminación (Hakak and Martin, 1999). La fosforilación de c-Src activo por la Csk le protege de su degradación y mantiene un reservorio de c-Src que puede ser activado rápidamente cuando se le necesita. Los defectos en estos mecanismos resultan en una hiperactivación de c-Src y contribuyen a la transformación celular (Brown and Schreiber, 1996; Russello and Shore, 2004; Laszlo and Cooper, 2009).

1.3.1. Relación entre conexina-43 y c-Src

Numerosos estudios muestran que c-Src Y416, 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; Swenson et al., 1990; Kurata and Lau, 1994; Giepmans et al., 2001a; Lin et al., 2001) (**Esquema 10**). v-Src fosforila directamente la Cx43, tanto *in vitro* como *in vivo* (Loo et al., 1999), 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 una 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) **(Esquema 10)**). La consecuencia de estas fosforilaciones es la reducción de la comunicación (Swenson et al., 1990; Giepmans et al., 2001a; Lin et al., 2001) y el comienzo del recambio de la Cx43 (Solan and Lampe, 2014).



Esquema 10. Regulación de las uniones comunicantes mediante la interacción con c-Src. Modificado de Warn-Cramer y Lau, 2004.

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 oncogénica 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, se desconoce qué parte exacta 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). En resultados recientes del laboratorio se ha mostrado que tanto la restauración de la expresión de la Cx43 como un péptido penetrante basado en su secuencia 245-238 del extremo carboxilo terminal pueden revertir el fenotipo de las células madre de glioma a través de la inhibición de la actividad de c-Src y sus efectos sobre Id1 y Sox2 (Gangoso et al., 2014).

Tomados en conjunto, estos datos indican que la Cx43 y c-Src se regulan mutuamente por un bucle de fosforilación y desfosforilación. Hay que mencionar que el mecanismo por el que la Cx43 reduce la fosforilación de c-Src en la Tyr-416 y aumenta la fosforilación en la Tyr-527 aún no se conoce.

La actividad oncogénica de c-Src está relacionada con varias vías de señalización cruciales, como la vía Ras-Raf-MEK-ERK (*MAPK/extracelular signal-regulated kinase (ERK)*) y la vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt (Frame, 2004), no es de extrañar que la inhibición de la actividad de c-Src por la Cx43 afecte a la regulación del ciclo celular, la captación de glucosa e incluso al fenotipo de célula madre de glioma (Tabernero et al., 2015).

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 (Toyofuku et al., 2001; Lampe and Lau, 2004; Gilleron et al., 2008). Por tanto, la interacción de la Cx43 con c-Src podría afectar a la interacción de otros efectores. A este respecto, mediante estudios de resonancia magnética nuclear se ha mostrado que, aunque la unión de c-Src se da en el motivo de unión al dominio SH3 del extremo C-terminal de la Cx43, los cambios conformacionales que produce esta unión se extienden a una gran distancia por el dominio C-T, afectando alostéricamente a la interacción con otras moléculas (Sorgen et al., 2004). Como consecuencia, algunas funciones celulares, como la proliferación o la migración, pueden verse fuertemente afectadas. Hasta ahora, se ha mostrado que la fosforilación de la Cx43 por c-Src modifica la interacción de ésta con ZO-1, tubulina, proteínas relacionadas con la autofagia (Bejarano et al., 2014) y la proteína fosfatasa TC-PTP (Li et al., 2014), la cual revierte la fosforilación de la Cx43 por c-Src (para revisión, ver Tabernero et al., 2015).

1.4. Tirosina kinasa Csk

Csk es una tirosina kinasa no receptora (Okada and Nakagawa, 1988a, b; Nada et al., 1991) que fosforila específicamente la tirosina 527 de c-Src y con ello inhibe su actividad (Okada et al., 1991; Bergman et al., 1992). La función reguladora de Csk sobre la familia de tirosina kinasas Src se demostró in vivo en ratones mutantes homocigóticos para Csk (Imamoto and Soriano, 1993; Nada et al., 1993); además, tanto los tejidos embrionarios mutantes como las líneas celulares deficientes en Csk presentan una elevada actividad de todas las tirosina kinasas Src, de la misma forma que la delección condicional de Csk en tejidos específicos (Nada et al., 1993).

El alineamiento de secuencias génicas revela que Csk se encuentra altamente conservada en el reino animal, del mismo modo que las tirosina kinasas Src (Segawa et al., 2006). Csk es una tirosina kinasa excepcional en el sentido de que posee una alta especificidad de sustrato hacia la tirosina C-terminal reguladora de las SFKs (T527 en c-Src). La secuencia que rodea a esta tirosina en el sitio regulador (QYQ) está altamente conservada en las SFKs; sin embargo, hay otra región (aminoácidos 504-525) importante para el reconocimiento específico por la Csk (Lee et al., 2003; Lee et al., 2006; Nicholas M. Levinson, 2008). Además de las SFKs, se han encontrado otras

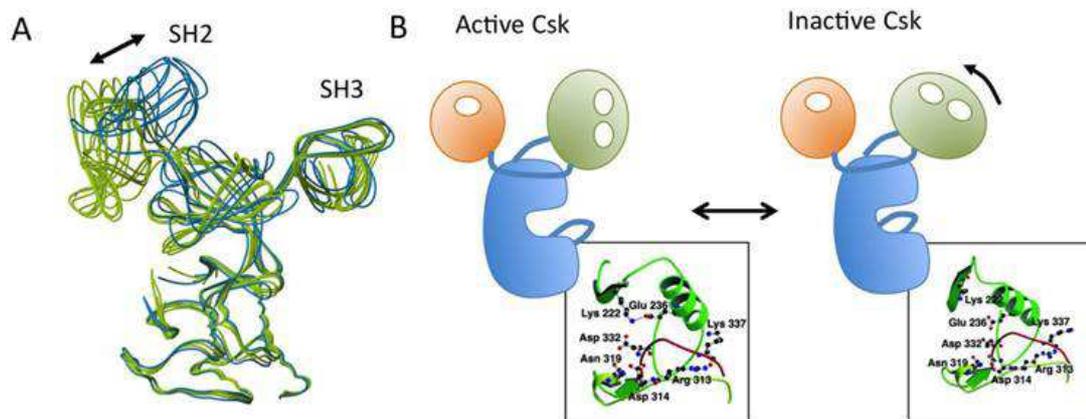
proteínas de señalización que son sustrato de Csk (Roskoski, 2005), como la paxilina (Sabe et al., 1994), el receptor P2X₃ (D'Arco et al., 2009), c-Jun (Zhu et al., 2006) y Lats (Stewart et al., 2003).

Se ha identificado una tirosina kinasa homóloga a Csk, Chk (*Csk-homologous kinase*) que inhibe la actividad de las SFKs en células hematopoyéticas de mamíferos (Bennett et al., 1994; Hamaguchi et al., 1994; Klages et al., 1994; McVicar et al., 1994; Sakano et al., 1994); sin embargo, los datos disponibles hasta ahora sugieren que Csk es la principal kinasa implicada en la regulación de SFKs in vivo y que Chk tiene papeles específicos en las células hematopoyéticas (Grgurevich et al., 1997).

1.4.1. Estructura y regulación de Csk

En su extremo N-terminal, Csk contiene un dominio SH3 y un dominio SH2, y un dominio catalítico kinasa en el extremo C-terminal (Nada et al., 1991), en una estructura similar a la de las SFKs, con la diferencia de que Csk no contiene sitios N-terminales de palmitoilación o miristilación, el sitio de auto-fosforilación en el bucle de activación ni los sitios C-terminales de regulación negativa, todos los cuales se encuentran conservados en las SFK. La ausencia de auto-fosforilación en el bucle de activación es una característica distintiva de Csk.

Algo que llama la atención sobre la estructura de Csk es que, al contrario que en las SFK, los bolsillos hidrofóbicos de los dominios SH3 y SH2 se encuentran orientados hacia fuera, lo que posibilita interacciones con otras moléculas. Esto indica que la regulación de la actividad de Csk es distinta de la de las SFKs.



Esquema 11. Mecanismo de activación e inactivación de Csk. Tomado de Okada, 2012.

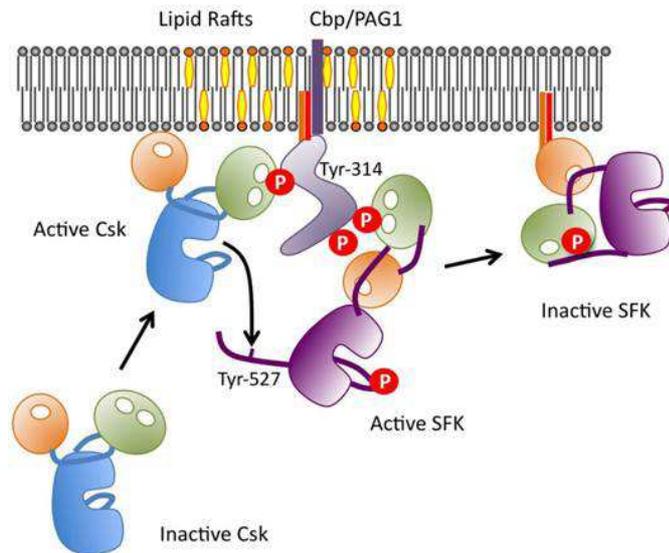
En la forma activa de Csk, las regiones que unen los dominios SH2 y kinasa y SH2 y SH3 se encuentran unidas al lóbulo N-terminal del dominio catalítico, lo que estabiliza la conformación activa, y hay una interacción directa entre los dominios SH2 y kinasa. En las moléculas inactivas, el dominio SH2 se encuentra rotado, lo que interrumpe dicha interacción (Ogawa et al., 2002) (**esquema 11**).

Se ha sugerido que hay un equilibrio dinámico entre la conformación activa e inactiva de Csk y que la actividad total se regula a través de la unión de otros factores al dominio SH2, lo que promovería la interacción de este dominio con el dominio catalítico (Ogawa et al., 2002).

Al carecer de dominio transmembrana y de modificaciones lipídicas, Csk se encuentra fundamentalmente en el citoplasma, mientras sus sustratos, las SFKs, están anclados a membrana por miristilación o palmitoilación. Por tanto, la translocación de Csk a la membrana se considera un paso crítico de su regulación. Hasta ahora se han identificado varias proteínas de andamiaje que actúan anclando a Csk a la membrana, como la caveolina-1, paxilina, Dab2, VE-cadherina, IGF-1R, IR, LIME y SIT1 (Sabe, 1994; Tobe 1996; Arbet-Engels, 1999; Baumeister, 2000; Cao, 2002; Brdickova, 2003; Zhou, 2003; Horejsí 2004).

También se ha encontrado una proteína transmembrana adaptadora, Cbp/PAG1 (*Csk binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched membrane*) en las balsas lipídicas de la membrana plasmática (Brdicka et al., 2000; Kawabuchi et al., 2000). Esta proteína se localiza exclusivamente en estos microdominios de la bicapa lipídica a través de un dominio transmembrana en el extremo N-terminal y dos sitios de palmitoilación a continuación de éste. Cbp contiene nueve residuos de tirosina susceptibles de fosforilación, los cuales son sustratos para las SFKs al colocalizar con ésta en las balsas lipídicas. Cuando Cbp es fosforilada por las SFK activas, recluta a Csk a las balsas lipídicas, lo que resulta en la inactivación de las SFKs (Oneyama et al., 2008; Oneyama et al., 2009; Kanou et al., 2011), que tras ello se transportan a zonas fuera de las *lipid rafts* (**esquema 12**). Este es un mecanismo de retroalimentación negativa crucial para el control de la señalización celular por receptores de factores de crecimiento (para revisión, ver Saitou 2014). Por otra parte, la activación de otros oncogenes, como Ras (Oneyama et al., 2008), también disminuye la expresión de Cbp. Otras proteínas que se unen a Csk, como la paxilina (Sabe et al., 1994) y la caveolina-1 (Cao et al., 2002), también son fosforiladas por las SFKs y participan en la regulación negativa de éstas reclutando a Csk (Howell and Cooper, 1994). Es interesante señalar que la caveolina-1 coopera con Cbp para promover la inactivación de c-Src (Place et al., 2011).

La unión de proteínas de andamiaje al dominio SH2 de Csk también puede activarla. La ocupación del dominio SH2 por la Cbp fosforilada afecta a la conformación del dominio catalítico, aumentando la actividad de Csk hacia las SFKs (Tanaka et al., 2013). Por tanto, puede que las proteínas de andamiaje aumenten la función de Csk activándola directamente, además de reclutarla a la membrana. También se ha observado que la actividad de Csk se ve influida por la oxidación del puente disulfuro del dominio SH2, lo que significa que Csk podría estar regulada por el estado redox de las células (Mills et al., 2007). Además, la kinasa PKA puede fosforilar la serina 364 de Csk, lo que aumenta su actividad (Yaqub et al., 2003). Para revisión de estos mecanismos, ver la et al., 2010).



Esquema 12. Bucle de regulación SFKs/Cbp/Csk. Tomado de Okada, 2012.

1.4.2. Implicación de Csk en cáncer

Hay pruebas de que Csk juega un papel en la supresión de tumores inhibiendo la actividad oncogénica de las SFKs; de hecho, la sobreexpresión de Csk inhibe el crecimiento tumoral en células humanas de cáncer de colon (Oneyama et al., 2008). Sin embargo, aunque la expresión de Csk se encuentra disminuida en algunos tipos de cáncer (Masaki et al., 1999), parece que hay niveles normales de Csk en muchos tipos de células cancerígenas (Watanabe et al., 1995), y no se han encontrado mutaciones somáticas en el gen *CSK*.

Paradójicamente, los niveles de Csk se encuentran elevados en algunos carcinomas humanos (Watanabe 1994). Recientemente, se ha identificado el factor de elongación eucariótico 2 (eEF2) como un nuevo sustrato de Csk. La fosforilación de eEF2 por la Csk no tiene efecto en su función citoplasmática de regulación de la traducción; sin embargo, sí promueve su degradación proteolítica y la translocación al núcleo de los fragmentos de eEF2, donde inducen cambios morfológicos y aneuploidía similar a la observada en células cancerosas. Esto sugiere que Csk puede jugar un papel en la tumorigénesis a través de la regulación de la localización de eEF2 (Yao 2014).

Por su parte, la expresión de Cbp/PAG1 está reducida en gran cantidad de tipos de células cancerígenas (Oneyama et al., 2008), posiblemente a través de un mecanismo epigenético (Suzuki et al., 1998). Esta disminución en los niveles de Cbp/PAG1 puede interferir con la translocación a membrana de Csk, eliminando la inactivación de las SFKs; así se podría explicar el aumento de la actividad de las SFKs en algunas células cancerosas. De hecho, se ha demostrado que la expresión ectópica de Cbp/PAG1 en células de cáncer de pulmón suprime su crecimiento a través de la inhibición de c-Src (Kanou et al., 2011). De la misma forma, se ha observado que la

sobreexpresión de Cbp/PAG1 en células de carcinoma esofágico reduce el crecimiento, la invasión y la migración de estas células inhibiendo la actividad de c-Src (Zhou et al., 2015).

1.5. Fosfatasa de especificidad dual PTEN

En los años 1990, dos grupos que buscaban supresores tumorales en el cromosoma 10q23, que se encuentra frecuentemente deleciónado en cánceres avanzados, identificaron independientemente una nueva fosfatasa, llamada PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*) o MMAC (*mutated in multiple advanced cancers*) (Li et al., 1997a; Steck et al., 1997). PTEN pertenece a la familia de proteínas tirosina fosfatasas (PTP, *protein tyrosine phosphatases*) y, dentro de ella, a la clase I y al subtipo de fosfatasas de especificidad dual tirosina y serina/treonina (DUSP, *tyrosine and serine/threonine dual-specific phosphatases*).

1.5.1. Alteraciones de PTEN en cáncer

PTEN es uno de los supresores tumorales más conocidos (Di Cristofano et al., 1998; Suzuki et al., 1998). La deleción o mutación de PTEN causa síndromes hereditarios de desarrollo de tumores benignos y predisposición al cáncer, como el síndrome de Cowden (Nelen et al., 1997; Liaw et al., 1997). La pérdida de PTEN ocurre en un amplio espectro de cánceres a través de mutaciones, deleciones, silenciamiento de la transcripción o inestabilidad de la proteína. Se encuentran mutaciones somáticas en un gran porcentaje de cánceres humanos, como en el cáncer de endometrio (38%), tumores del sistema nervioso central (20%), cáncer de piel (17%) y el cáncer de próstata (14%) (Datos tomados de la base de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) y recogidos en Chalhoub and Baker, 2009). PTEN también se encuentra alterada de forma no genómica en varios cánceres (para revisión, ver Leslie and Foti, 2011). Además, cada vez es más claro que incluso pequeños cambios en la cantidad de PTEN tienen un efecto importante en el desarrollo de los tumores (Alimonti et al., 2010); a este respecto, la pérdida parcial de la función de PTEN (haploinsuficiencia) puede promover la proliferación en algunos cánceres humanos. Es interesante señalar que, extrañamente, la pérdida total de PTEN es un potente mecanismo supresor de tumores; esto se debe a la activación de la senescencia celular tras la pérdida completa de PTEN (Berger et al., 2011). Por otra parte, recientemente se ha observado, en dos ratones transgénicos independientes, que la sobreexpresión de PTEN se asocia con un fenotipo resistente a la transformación oncogénica, entre otros efectos metabólicos (García-Cao et al., 2012; Ortega-Molina et al., 2012).

PTEN es una de las proteínas más frecuentemente alteradas en los gliomas (Steck et al., 1997; Sansal and Sellers, 2004). La pérdida de heterocigosis en el cromosoma 10q, en la región en la que se encuentra el gen *PTEN*, es común al 60-70% de los glioblastomas (Ohgaki et al., 2004). Recientemente, un meta-análisis de varias bases de datos ha mostrado que los pacientes con gliomas con mutaciones en el gen de PTEN presentaban una supervivencia significativamente menor que los pacientes cuyos gliomas no tenían mutaciones en PTEN (Xiao et al., 2014). Aunque el mecanismo más conocido por el que PTEN ejerce la supresión tumoral es su actividad sobre lípidos y con ello sobre la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), PTEN también

puede ejercer esos efectos a través de su actividad fosfatasa sobre proteínas (Tamura et al., 1998).

1.5.2. Actividad fosfatasa de PTEN sobre proteínas

Al ser una fosfatasa de especificidad dual, PTEN puede desfosforilar proteínas (Li et al., 1997b). De hecho, se ha descrito que la actividad fosfatasa sobre proteínas de PTEN es importante para la regulación del ciclo celular por esta proteína (Weng et al., 2001); de hecho, en células de cáncer de mama se ha observado que PTEN bloquea la fosforilación de MAPK a través de la inhibición de la fosforilación de IRS-1, posiblemente a través de su actividad fosfatasa sobre proteínas; esto lleva a la disminución de la expresión de la ciclina D1 y, con ello, a la inhibición de la progresión del ciclo celular y el crecimiento (Weng et al., 2001).

Se ha demostrado la actividad fosfatasa de PTEN sobre FAK (*focal adhesion kinase*) (Tamura et al., 1998), CREB (*cAMP responsive-element-binding protein*) (Gu et al., 2011), actividad clave en la regulación de la diferenciación de las células madre neurales (Lyu et al., 2015), y a c-Src (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011). Es importante señalar que la relación entre PTEN y c-Src se ha descrito en células de glioma humanas, cuya migración controla PTEN a través de la regulación de la actividad de c-Src (Dey et al., 2008) y que la interacción entre estas dos proteínas se ha probado en células de cáncer de mama mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Zhang et al., 2011).

1.5.3. Actividad fosfatasa de PTEN sobre lípidos

A pesar de su actividad fosfatasa sobre proteínas, la actividad de PTEN sobre lípidos es la que más contribuye a su función supresora tumoral (Chow and Baker, 2006; Engelman et al., 2006).

Mediante su actividad fosfatasa sobre lípidos, PTEN antagoniza de forma directa la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). Esta vía regula procesos celulares diversos, como metabolismo, supervivencia, proliferación, apoptosis, crecimiento y migración celular (Engelman et al., 2006). La familia de las PI3K son kinasas lipídicas intracelulares que fosforilan el grupo hidroxilo de la posición 3' de los fosfatidilinositoles y fosfoinosítidos. Estas se clasifican en tres clases (I, II, y III) dependiendo de su estructura y su especificidad de sustrato (Engelman et al., 2006); las PI3K de clase I fosforilan el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para generar el segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3). Los miembros de esta clase se subdividen según las señales que los activan; así, las PI3K de clase IA son activadas por tirosina kinasas receptoras de factores de crecimiento, y las de clase IB se activan por receptores acoplados a proteína G (Engelman et al., 2006). En mamíferos, las PI3K de clase IA intervienen en la señalización de la insulina y de factores de crecimiento para regular la proliferación, supervivencia, crecimiento y la homeostasis de la glucosa (Engelman et al., 2006).

A pesar de que la señalización a través de todas las clases de PI3K está conectada con importantes procesos de regulación del crecimiento, hasta ahora sólo se ha demostrado un papel central en el cáncer para las PI3Ks de clase IA. De ahí la relevancia de la inhibición de esta vía por

la actividad fosfatasa sobre lípidos de PTEN. En concreto, PTEN antagoniza la acción de la PI3K desfosforilando el PIP3 de nuevo a PIP2 (Maehama and Dixon, 1998) y terminando con ello la cascada de señalización; así, PTEN es el regulador negativo central de la PI3K. La consecuencia de la pérdida de función de PTEN es la acumulación de PIP3 en las células y la activación indiscriminada de sus dianas (Maehama and Dixon, 1998); para revisión, ver Chow and Baker, 2006).

Un efector clave de PIP3 es la serina-treonina kinasa Akt (también llamada PKB), que es reclutada a la membrana mediante la unión a PIP3 y es activada mediante la fosforilación en su treonina 308 por la PDK1 (kinasa dependiente de 3-fosfoinosítido) (Mora et al., 2004) y en la serina 473 por el complejo mTOR insensible a rapamicina (mTORC2) (Sarbasov et al., 2005). Por su parte, Akt aumenta la proliferación y la supervivencia a través de la fosforilación del factor de transcripción FOXO, lo que inhibe la transcripción de genes reguladores del ciclo celular como p27 y genes proapoptóticos como FasL y Bim (Engelman et al., 2006). En este sentido, se ha mostrado que la restauración de PTEN en células de glioblastoma humano suprime el crecimiento y la tumorigenicidad, en un efecto mediado por la capacidad de PTEN de bloquear la progresión del ciclo celular en la fase G1. Esta parada correlaciona con un incremento de la expresión de p27 y, con ello, una reducción de la actividad de las ciclinas dependientes de kinasas de la fase G1 (Weng et al., 2001).

Akt también puede fosforilar a TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), activando el complejo mTOR sensible a rapamicina (mTORC1). La actividad de este complejo promueve el crecimiento a través de la activación de la síntesis de proteínas (Wullschleger et al., 2006). Por último, Akt también actúa sobre otros sustratos que aumentan el crecimiento, la proliferación y la supervivencia; por ejemplo, inhibiendo la actividad de la proteína proapoptótica BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) y de la glicógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) (Revisado en Manning and Cantley, 2007), que modula el metabolismo glucídico y otras proteínas reguladoras del ciclo celular (Cohen and Frame, 2001); o activando a MDM2 (*murine double minute 2*), que promueve la degradación del supresor tumoral p53, y al factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).

Otra función de PIP3 es la de afectar a la motilidad celular a través de Rac y Cdc42 (Liliental et al., 2000; revisado en Van Haastert et al., 2004), lo que conecta a esta vía con la invasión tumoral y el desarrollo.

1.5.4. Estructura y regulación de la actividad de PTEN

PTEN puede ser regulada a través de múltiples mecanismos, como modificaciones post-traduccionales, localización subcelular y efectores alostéricos.

PTEN presenta cinco dominios funcionales: un dominio de unión a PIP2 en posición N-terminal, un dominio catalítico fosfatasa, un dominio C2 de asociación a membrana (mediante unión a fosfatidilserina), y una cola C-terminal con regiones intrínsecamente desordenadas que contiene un dominio de unión a PDZ (Lee et al., 1999). A juzgar por la diversidad de las mutaciones

Introducción

de PTEN asociadas a tumores que se han encontrado en todos sus dominios, parece que todos ellos son relevantes para la supresión tumoral ejercida por PTEN.

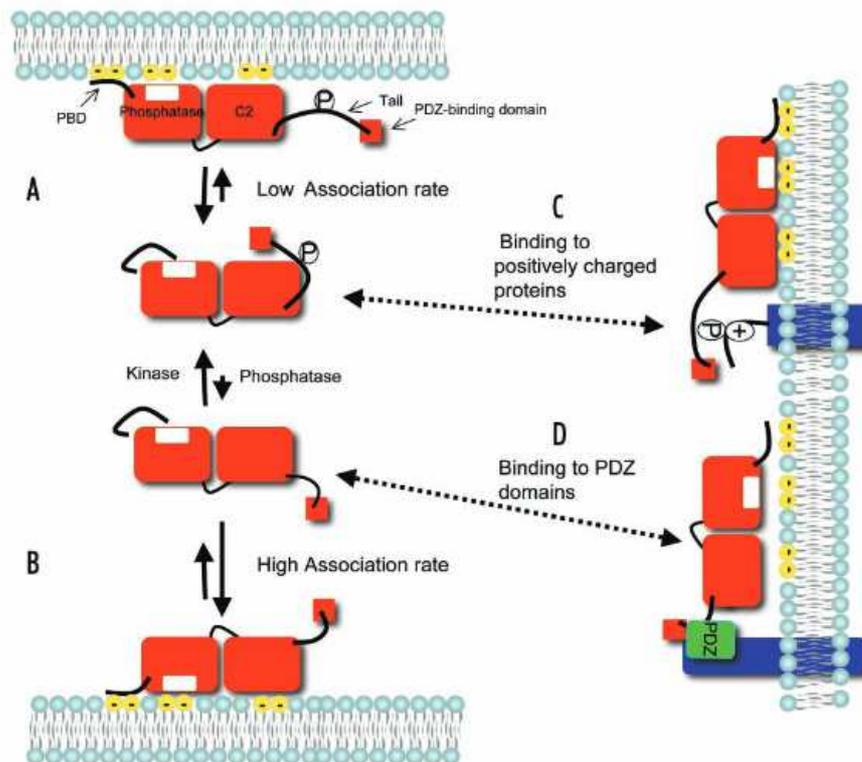
La mayoría de las mutaciones de pérdida de sentido de PTEN se localizan en el dominio catalítico y afectan a su actividad fosfatasa (Eng, 2003). Se ha descrito que las alteraciones en los residuos del dominio C2 disminuyen la interacción de PTEN con lípidos y con ello su actividad supresora del crecimiento (Georgescu et al., 2000).

Además, hay mutaciones que producen proteínas PTEN truncadas a las que les falta el extremo C-terminal y el motivo de interacción con PDZ. Estos mutantes, aunque conservan el dominio fosfatasa y el dominio C2 funcionales, no son capaces de suprimir la vía de PI3K (Georgescu et al., 1999). Esto no es de extrañar, puesto que se ha observado que la cola C-terminal y el motivo de unión a PDZ son importantes para la estabilidad de PTEN (Valiente et al., 2005) y su reclutamiento a membrana (Vazquez and Devreotes, 2006). El extremo C-terminal de PTEN contiene múltiples sitios de fosforilación importantes en la regulación de su estabilidad, actividad y reclutamiento a la membrana (Vazquez and Devreotes, 2006). Por su parte, el motivo de unión a PDZ también posibilita su reclutamiento a membrana por parte de proteínas de andamiaje que contienen dominios PDZ (Valiente et al., 2005; Bonifant et al., 2007).

Se ha sugerido que PTEN se encuentra en una conformación inactiva en el citosol, con el dominio de unión a PIP2 ocultando el sitio catalítico, mientras que la unión a PIP2 en la membrana plasmática resultaría en un cambio a la conformación activa de PTEN (Vazquez and Devreotes, 2006).

Algunos microARNs inhiben la traducción de PTEN, lo que promueve tumorigénesis o enfermedades metabólicas; por ejemplo, el miR-19 en leucemia y síndrome de Cowden (Olive et al., 2009; Mavrakis et al., 2010), el miR-21 en varios cánceres y enfermedades inflamatorias y metabólicas (Meng et al., 2007; Ma et al., 2011), o el miR-494-3p, que regula la proliferación celular, la invasión, la migración y la apoptosis mediante la vía PTEN/PI3K/Akt en células de glioblastoma humano (Li et al., 2015).

Además, PTEN puede ser regulada por varios mecanismos post-traduccionales como fosforilación, acetilación, oxidación y ubiquitinación (para revisión, ver Tamguney and Stokoe, 2007; Singh and Chan, 2011).



Esquema 13. Mecanismo de regulación de la actividad de PTEN. Modificado de Vazquez, 2006.

Para explicar la regulación de PTEN por fosforilación se ha propuesto el modelo de la conformación abierta/cerrada, resumido en el **esquema 13** (Das et al., 2003; Ross and Gericke, 2009). En la conformación cerrada, la cola C-terminal fosforilada se une al dominio catalítico y al dominio C3, impidiendo la asociación a membrana e inhibiendo sus interacciones con proteínas con dominios PDZ (Vazquez et al., 2000). La desfosforilación del extremo C-terminal libera a éste, con lo que puede darse la asociación de PTEN con la membrana a través de interacciones electrostáticas inespecíficas (Lee et al., 1999; Das et al., 2003). Tras esta asociación, se da la unión del dominio C2 a la fosfatidilserina de la membrana celular (Lee et al., 1999) y del motivo de unión a PIP2 a éste, lo que lleva a un cambio conformacional que activa el dominio catalítico (Campbell et al., 2003; Redfern et al., 2008). La fosforilación de la cola C-terminal de PTEN, además de mantener inhibida su actividad, estabiliza la proteína, mientras que su desfosforilación causa un incremento de su actividad seguido por una rápida degradación, lo que mantiene a PTEN estrechamente regulada. Entre las kinasas capaces de fosforilar la cola C-terminal de PTEN se encuentran CK2, GSK3 β , PIC-T-1 y Rock y c-Src. Así, la forma activa de c-Src inhibe la actividad de PTEN y su señalización y, además, puede regular los niveles de PTEN (Lu et al., 2003).

Otros mecanismos de regulación post traduccional de PTEN son la acetilación, lo que inhibe su actividad (Okumura et al., 2006), o la oxidación del residuo C124 en el dominio catalítico, que inactiva la enzima formando un puente disulfuro con C71 (Seo et al., 2005). Además, la estabilidad de PTEN puede ser regulada mediante ubiquitinación por la E3 ligasa NEDD4-1 (Wang et al., 2007).

La actividad de PTEN también puede ser regulada mediante el control de su localización dentro de la célula. PTEN es una proteína citosólica que puede ser reclutada a la membrana plasmática ya sea mediante interacciones con varias proteínas de membrana como MAGI, PAR-3, MAST, SAST, NHERF o NEP, a través de su motivo de unión a PDZ, o a través de la unión a PIP2 (Bonifant et al., 2007; Tamguney and Stokoe, 2007). El reclutamiento de PTEN puede ser muy transitorio, ya que para desfosforilar el PIP3 y antagonizar la señalización por PI3K sólo hacen falta algunos milisegundos (Vazquez and Devreotes, 2006).

Sin embargo, se ha observado localización de PTEN en el núcleo celular. PTEN presenta dos señales de localización nuclear (NLS) (Chung et al., 2005) y también múltiples dominios de exclusión nuclear (Gil et al., 2006). La importación de PTEN al núcleo puede ser regulada por monoubiquitinación (Trotman et al., 2007); es interesante que la monoubiquitinación de PTEN sirva para mantener su actividad en el núcleo y su poliubiquitinación reduzca los niveles de PTEN y con ello su actividad supresora de tumores, lo que apunta a la proporción entre los niveles de PTEN mono- y poli-ubiquitinada como mecanismo de regulación de su actividad. Por último, Liu y col. mostraron que PTEN puede entrar en el núcleo por difusión simple (Liu et al., 2005).

1.5.5. Otras funciones de PTEN relevantes en cáncer

Además de los efectos descritos anteriormente, se han descrito la implicación de PTEN en procesos importantes para la carcinogénesis. A este respecto, PTEN contribuye a la integridad genómica mediante sus funciones en el núcleo, donde regula la estabilidad de los cromosomas, las respuestas al daño en el ADN y el ciclo celular (Puc et al., 2005; Shen et al., 2007; Planchon et al., 2008).

Además, PTEN está implicada en el control de la migración celular. En mamíferos, la vía de PI3K regula la formación de protrusiones en la membrana, la expansión de la membrana y la motilidad celular a través de Rho, Rac1 y cdc42 (Liliental et al., 2000). Por otra parte, la sobreexpresión de PTEN puede inhibir la migración en células de glioma mediante su actividad fosfatasa sobre proteínas (Raftopoulou et al., 2004), y más concretamente, a través de la regulación de la familia c-Src (Dey et al., 2008).

Por último, se ha demostrado un importante papel de PTEN en la autorrenovación de células madre hematopoyéticas tanto normales (HSCs) como leucémicas (Zhang et al., 2006); la pérdida de PTEN resulta en la generación de células leucémicas y la depleción de las HSCs normales. Se ha sugerido que PTEN mantiene a las HSCs en estado de quiescencia, mientras la deficiencia de PTEN las empuja a seguir con el ciclo celular, con lo que se agotan sus reservas. Sin embargo, la pérdida de PTEN en el sistema nervioso aumenta el número de células madre neurales al mismo tiempo que se altera su proliferación, curiosamente por una aumento en la entrada en el ciclo celular desde la fase G0/G1 (Groszer et al., 2001; Groszer et al., 2006).

2. Objetivos

Teniendo en cuenta la información expuesta en la Introducción, y con el objeto de elucidar el mecanismo por el que la Cx43 inhibe la actividad oncogénica de c-Src, se establecieron los siguientes Objetivos para este trabajo:

1. Estudiar la participación de la kinasa inhibidora de c-Src (Csk) en la inhibición de la proliferación promovida por la Cx43.
2. Estudiar la participación de la fosfatasa PTEN en la inhibición de la actividad de c-Src y en el efecto antiproliferativo de la Cx43.
3. Estudiar la posible interacción de la Cx43 con las proteínas responsables de la inhibición de c-Src.
4. Estudiar la secuencia de la Cx43 necesaria para interactuar con las proteínas responsables de la inhibición de c-Src.

3. Material y métodos

3.1. Material

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

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-Ires, C6-Cx43 y C6-Cx43Y247F/Y265F, que son células C6 transfectadas establemente con los plásmidos Ires vacío, Ires que contiene Cx43 e Ires que contiene Cx43 mutada en los residuos de tirosina que le permiten interaccionar con c-Src, respectivamente, y que fueron generadas por la Dra. Sandra Herrero (C6-Ires y C6-Cx43) (Herrero-Gonzalez et al., 2010a) y por la doctoranda como parte del trabajo de Tesis Doctoral, respectivamente (C6-Cx43Y247F/Y265F).

Se han empleado ratas albinas Wistar de distintas edades, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se criaron en jaulas. Se mantuvo un ritmo de luz-oscuridad de 12 horas. La humedad osciló entre el 45 y el 65% y la temperatura se mantuvo entre 20 y 25 °C. Se alimentaron con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7% de glúcidos, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad). Además, los animales tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida. Se emplearon neonatos de 1 día de vida postnatal para la preparación del cultivo primario de astrocitos.

3.1.2. Medios instrumentales

- El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo Milli-Q^R Integral 3 System (Millipore Ibérica, Madrid, España), con dispensadores y filtros de agua Elix (agua purificada tipo II) y agua Milli-Q (agua ultrapura tipo I).
- Las pesadas se realizaron en balanzas 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 (HachLange GmbH, Düsseldorf, Alemania).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, EEUU.) modelo J2-21M, una centrífuga Beckman de mesa modelo TJ-6, dos

Material y métodos

centrífugas Eppendorf, modelos minispin, 5414R, 5702 y 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

- Las cabinas de flujo laminar utilizadas fueron una modelo TC 48 (GelaireFlowLaboratories, McLean, EEUU) 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 diámetro 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®, PallGelmanLaboratory, Michigan, EEUU).
- Los medios y soluciones de cultivo fueron calentados en baños termostatzados a 37 °C, modelos Precistern y Precisdig (Selecta). Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se han utilizado un baño modelo HaakeFisons GH con termostato acoplado, un baño modelo HaakeFisons 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), termostatzada 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 modelos 437 o Autester ST.
- Las células se mantuvieron en cultivo en incubadores de CO₂ modelos Galaxy S y Galaxy 170 (RS Biotech, Northants, Reino Unido).
- Se utilizaron botellas de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono suministradas por Air Liquide (Valladolid, España).
- El conteo de las células previo a la siembra en placas se realizó en una cámara cuenta-glóbulos 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) y Fine Vortex (FINEPCR, Corea del Sur).
- 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 MicroscopySystems) y una cámara de video digital modelo Leica DC 350F (Leica Microsystems).

- Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio láser confocal modelo Leica DM-IRE2 (Leica MicroscopySystems), propiedad del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL/Universidad de Salamanca, España). Las imágenes se analizaron empleando el programa informático de análisis de imagen LCS Lite (Leica).
- Se utilizó un fluorímetro modelo Qubit Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) para la cuantificación de proteínas.
- Para la sonicación de las muestras empleadas en la transferencia tipo Western se utilizó un baño de sonicación modelo BandelinSonorex (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, Alemania).
- Para los análisis de transferencia tipo Western se utilizaron 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", ambos de Bio-Rad (Hercules, EEUU.). 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 SurelockMidi-Cell" (Invitrogen, Life Technologies).
- Las membranas utilizadas fueron de PVDF (MilliporeIberica, Thermo Fisher). Para la transferencia de geles realizada en el dispositivo iBlot (Invitrogen, Life Technologies) se emplearon "iBlot Gel Transfer Stacks", con membranas de nitrocelulosa o PVDF (Invitrogen, Life Technologies).
- Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa o PVDF con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un agitador rotatorio modelo Navigator 129 (BioComp, Fredericton, Canadá).
- El programa de análisis de imagen utilizado fue ImageJ, desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación de NationalInstitutes of Health (Bethesda, USA).
- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel 2000, asociado a una cabina "Universal Hood II" (Bio-Rad).
- Se empleó un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific), para la cuantificación de pequeños volúmenes de ADN plasmídico.
- 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, modelo Appliskan 2001 (Thermo Electro Corporation).

3.1.3. Productos

Material y métodos

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.

- 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) y la tripsina-EDTA procedían de la casa Gibco (Life Technologies).
- La penicilina G, (P3032), la estreptomicina (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 de astrocitos.

- El medio de cultivo, el suero fetal bovino (FBS), la tripsina-EDTA y los antibióticos fueron los mismos que los utilizados para el cultivo de las células de glioma C6.
- La DNasa I y la albúmina (fracción V) fueron suministradas por Roche Diagnostics S.L. (Barcelona, España).
- La poli-L-lisina con la que se recubrió el fondo de las placas de cultivo fue adquirida en Sigma.
- La citosina- β -arabinofuranósido procedía de Sigma.

3.1.3.3. Productos utilizados en la amplificación de plásmidos

- La triptona y el extracto de levadura para la elaboración del medio de bacterias procedieron de la casa Scharlau (Chemie, S.A. Barcelona, España). El agar bacteriológico europeo para la elaboración del medio de cultivo sólido procedió de Conda (Madrid, España).
- Los antibióticos utilizados para la selección de *E. coli*, kanamicina y ampicilina, fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

- Los productos utilizados para la purificación del ADN plasmídico fueron de las casas Promega o MOBIO (Solana Beach, CA. EEUU).
- La enzima de restricción *Bam*HI, su tampón de reacción correspondiente y la albúmina acetilada se adquirieron en la casa comercial Promega (Madison, WI, EEUU).
- La agarosa utilizada en las electroforesis procedió de la casa Pronadisa (Madrid, España) y para visualizar el ADN se utilizó el reactivo SybrSafe, de Invitrogen.
- Como marcador de tamaño de ADN se utilizó el marcador de alto peso molecular de Life Technologies (Madrid, España).

3.1.3.4. Plásmidos utilizados en las transfecciones

Los plásmidos utilizados en los experimentos de co-inmunoprecipitación fueron los siguientes:

- Plásmidos con la secuencia de la Cx43: Estos plásmidos fueron construidos por la Dra. Sandra Herrero (Herrero-Gonzalez et al., 2010a)
 - pRESpuro2 Cx43wt
 - pRESpuro2 Cx43Y247F/Y265F
- Plásmidos con la secuencia de PTEN:
 - Vector pcADN3:
pcADN3 GFP-PTEN (Addgene 13039)
 - Vector pCMV-Tag:
pCMV Flag (plásmido vacío). Este vector fue cedido por el Dr. Juan Carlos Arévalo (Instituto de Neurociencias de Castilla y León)
pCMV Flag WT-PTEN (Addgene 22231)
pCMV Flag dPDZ-PTEN (1-400) (Addgene 22232)
 - Vector pSG5L:
401 pSG5L (plásmido vacío) (Addgene 10737)
pSG5L HA PTEN wt (Addgene 10750)

3.1.3.5. Productos utilizados para las co-inmunoprecipitaciones y *pull-downs*

Material y métodos

- Los anticuerpos utilizados para co-inmunoprecipitación fueron: α -Hexoquinasa I (Chemicon/Millipore), α -Cx43 (BD Transduction Laboratories), α -HA (Roche), α -GAPDH (Ambion/Life Technologies) y α -Csk (Cell Signalling).
- Las matrices de afinidad utilizadas para co-inmunoprecipitación fueron: proteína A-Sefarosa CL-4B (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Barcelona, España), proteína G-Sefarosa (Santa Cruz), anti-Flag[®] M2 Affinity Gel (Sigma) y EZview[™] Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma-Aldrich).
- La albúmina con la que se bloquearon las matrices de afinidad procedió de Roche.
- La matriz de avidina utilizada para los *pull-down* de péptidos biotinilados fue NeutrAvidinAgaroseResin (ThermoScientific).

3.1.3.6. Productos empleados para el silenciamiento génico

- La Lipofectamina 2000[®] utilizada para la transfección de los siRNA, así como el medio Opti-MEM[®], procedieron de la casa comercial Invitrogen.
- Los siRNA utilizados para el silenciamiento de PTEN (Baumeister et al., 2005) procedieron de la casa comercial BioNova científica S.L. (Madrid, España) y tienen las siguientes secuencias:
Cadena sentido: 5'-GUUAGCAGAAACAAAAGGAGATT-3'
Cadena antisentido: 5'-UCUCCUUUUGUUUCUGCUAAC-TT-3'
- Los siRNA utilizados para el silenciamiento de Csk (Baumeister et al., 2005) procedieron de la casa comercial BioNova científica S.L. (Madrid, España) y tienen las siguientes secuencias:
Cadena sentido: 5'-AGUACCCAGCAAUUGGGCATT-3'
Cadena antisentido: 5'-UGCCCAUUUGCUGGGUACUTT-3'
- El siRNA sin diana (non target-siRNA o NT-siRNA), utilizado como control negativo, procedió de la casa comercial Ambion.

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

- El cóctel de inhibidores de proteasas procedió de la casa comercial Calbiochem (Calbiochem-Merck, EEUU).
- El PMSF procedía de la casa Sigma.
- Para la cuantificación de proteínas se utilizó el fluorímetro Qubit, con los kits comerciales aconsejados por Invitrogen (Life Technologies).
- 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 (Bio-Rad Laboratories) y, como agentes coadyuvantes 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 diámetro 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 Bis-Tris Midi-Gels de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies). En este caso, las soluciones de electroforesis MOPS-SDS y MES-SDS se adquirieron en la misma casa, así como las membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de diámetro de poro y las membranas de PVDF de 0,2 μm de diámetro de poro utilizadas con el sistema iBlot de transferencia semiseca.
- Los marcadores de peso molecular de proteínas procedían de Bio-Rad y de Life Technologies.
- Las películas de autorradiografía para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de rayos X de la marca Fujifilm (Madrid, España).
- Los líquidos de revelado fueron "X-Fix-Fixer&Replenisher" y "AnatomixDeveloperReplenisher" (FujiHunt-Fujifilm, Europe WV, Bélgica).
- El paraformaldehído para fijar las células procedía 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 ADN, fueron suministrados por Molecular Probes (Life Technologies).
- Los portaobjetos y cubreobjetos utilizados para el montaje de inmunocitoquímicas fueron adquiridos en la casa comercial ThermoScientific.
- El detergente Triton X-100 para la permeabilización fue suministrado por la casa Sigma.

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western e inmunocitoquímica

Antígeno	Casa comercial	Dilución	Tipo	Especie de procedencia
Cx43	BD Biosciences	1:200	Monoclonal	Ratón
Cx43	Life Technologies	1:50	Policlonal	Conejo
Y416 c-Src	Cell Signaling	1:250	Policlonal	Conejo
Y527 c-Src	Cell Signaling	1:250	Policlonal	Conejo
Total c-Src	Cell Signaling	1:500	Policlonal	Conejo
Total c-Src	Cell Signaling	1:500	Monoclonal	Ratón
PTEN	Cell Signaling	1:500	Policlonal	Conejo
PTEN	Cell Signaling	1:500	Policlonal	Ratón
Csk	Cell Signaling	1:500	Policlonal	Conejo
Akt	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Conejo
S473 Akt	Cell Signaling	1:2000	Monoclonal	Conejo
T308 Akt	Cell Signaling	1:1000	Monoclonal	Conejo
Flag	Sigma-Aldrich	1:500	Policlonal	Conejo
Hemaglutinina	Roche	1:500	Monoclonal	Ratón
α -Actinina	Merk Millipore	1:1000	Monoclonal	Humano
GAPDH	Ambion	1:6000	Monoclonal	Ratón

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas en transferencia tipo Western e inmunocitoquímica

Espece que reconoce	Casa Comercial	Dilución	Conjugado	Espece de procedencia
Ratón	Santa Cruz	1:2500	Peroxidasa	Cabra
Conejo	Santa Cruz	1:5000	Peroxidasa	Cabra
Ratón	Invitrogen	1:1000	Alexa 488	Cabra
Conejo	Invitrogen	1:1000	Alexa 488	Cabra
Ratón	Invitrogen	1:1000	Alexa 594	Cabra
Conejo	Invitrogen	1:1000	Alexa 594	Cabra
Conejo	Jackson ImmunoResearch	1:500	Cy5	Cabra
Conejo	Invitrogen	1:1000	Alexa 647	Cabra

3.1.3.8. Otros productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas.

- La proteína A conjugada con peroxidasa, utilizada para detectar anticuerpos nativos en los Western blot de co-inmunoprecipitaciones, fue adquirida a Invitrogen.
- La estreptavidina conjugada con peroxidasa, utilizada para detectar péptidos biotinilados en los Western blot de pull-down de avidina-biotina, procedió de Life Technologies.
- La estreptavidina conjugada con Cy5, utilizada para teñir péptidos biotinilados en inmunocitoquímicas, se adquirió a Life Technologies.

3.1.3.9. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular

En la determinación de la viabilidad celular medida por el método de MTT se emplearon 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).

3.1.3.10. Otros productos

- Los péptidos sintéticos utilizados procedieron de GenScript (Piscataway, USA).
- El antibiótico G-418, utilizado para la selección de células C6-Cx43, ha sido adquirido en Promega (Madison, WI, EEUU).

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 H₂O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2, excepto en los casos en que se indique otro pH, y se esterizaron por filtración (diámetro de poro: 0,22 µm).

Medio de cultivo

DMEM + 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 ₂ PO ₄	7,8 mM
KH ₂ PO ₄	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 se cultivaron según el método descrito previamente por Tabernero y col (Tabernero et al., 1996a). Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM 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 CO₂, según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento, se procesaron para los distintos experimentos o se sembraron 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)

Material y métodos

para finalizar la tripsinización y 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. Si no se indica otra densidad, las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm².

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

3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos fueron realizados por D^a Marta Domínguez o por la Dra. Arantxa Tabernero, al no disponer la doctoranda de licencia para manipular animales de experimentación.

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al., 1996b). Se emplearon neonatos de rata de 1 día de vida postnatal. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización, que se llevó a cabo a 37°C. Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y se extrajeron los cerebros, de los que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa petri que contenía solución "A" (EBSS pH 7,2 suplementado con DNAsa tipo I 20 µg/mL y albúmina (fracción V) 3 µg/mL). La solución EBSS, o de *Earle*, está compuesta por: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, rojo fenol 10 mg/l, D-glucosa 14 mM; pH 7,2. El tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C, en solución "B" (EBSS pH 7,2 suplementado con tripsina 0,25 µg/mL, DNAsa tipo I 60 µg/mL y albúmina (fracción V) 3 µg/mL). Posteriormente, se detuvo la tripsinización añadiendo al tejido disgregado medio de cultivo. Finalizada la tripsinización, se centrifugó el tejido durante 5 minutos a 500 x g, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el tejido en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta Pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y se repitió dos veces más el tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, con aceleración y deceleración suaves. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo. Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,2% (v/v), para la determinación de la viabilidad celular y del número de células. A continuación, se sembraron las células en medio de cultivo (DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v), penicilina G 50 U/mL, estreptomycin 37,5 U/mL, pH 7,2), en placas petri recubiertas con poli-L-lisina (1µg/cm²), a una densidad de 1,0 x 10⁵ células/cm² y se colocaron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂. Al tercer día se añadió citosina β-arabinofuranósido 10 µM, que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la proliferación de la microglía y de las células del linaje O-2A (Tabernero et al. 1996b). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana con medio de cultivo. En estas condiciones se obtienen cultivos de astrocitos de tipo-1 de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el

anticuerpo específico anti-GFAP (Tabernero et al., 1996b). En todos los experimentos se utilizaron astrocitos cultivados a los 21-28 días in vitro.

3.2.2. Tratamientos con péptidos penetrantes

En los experimentos realizados con péptidos sintéticos (> 90% de pureza), las diferentes secuencias se añadieron 24 horas después de la resiembra o la transfección. En todos los experimentos se utilizaron concentraciones de 50 μ M y se mantuvieron 30 minutos a 37 °C, excepto si se indican otras condiciones.

Todos los péptidos utilizados se encuentran biotinilados en el extremo C-terminal y presentan la secuencia penetrante TAT en su extremo amino. Las secuencias fueron:

- TAT-B: YGRKKRRQRRR-{Lys(biotina)}. Esta secuencia es la responsable de que el péptido penetre en la célula (Gump and Dowdy, 2007).
- TAT-245-283-B: TAT-DPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP-{Lys(biotina)}. Esta secuencia contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src y las dos tirosinas que son fosforiladas por c-Src.
- TAT-266-283-B: TAT-AYFNGCSSPTAPLSPMSP-{Lys(biotina)}. Esta secuencia contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src y los siete aminoácidos anteriores pero no las tirosinas fosforilables por c-Src.
- TAT-274-283-B: TAT-PTAPLSPMSP-{Lys(biotina)}. Esta secuencia corresponde al dominio de unión a SH3.
- TAT-372-382-B: TAT-SRASSRASSRPRPDDLEI-{Lys(biotina)}. Esta secuencia contiene el motivo de unión a PDZ.

3.2.3. Sincronización del ciclo celular en células de glioma C6 en la fase G0/G1

Para sincronizar el ciclo celular se siguió el método puesto a punto anteriormente en el laboratorio (Herrero-Gonzalez et al., 2010). Éste consiste en producir una parada del ciclo celular en fase G0/G1 mediante la retirada del suero del medio de cultivo durante 60 horas, después de las cuales se vuelven a incubar las células con medio más suero, para disparar de nuevo el ciclo celular de forma sincronizada.

3.2.4. Amplificación de plásmidos

3.2.4.1. Transformación bacteriana y extracción del ADN plasmídico

El medio utilizado para crecer *E. coli*, cepa DH5- α , 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 50 μ L de células competentes (cepa DH5- α de *E. coli*) con 20 ng de ADN plasmídico, con agitación suave. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4 °C. A continuación se incubó a 42°C durante 1 minuto y, de nuevo, a 4°C durante 1 minuto. Posteriormente se añadió 1 mL de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación (200 rpm). Finalmente, se sembraron diferentes cantidades de las células transformadas en placas de medio selectivo (LB-agar con ampicilina o kanamicina) y se incubaron a 37 °C. Al cabo de 16 horas se recogieron distintas colonias que crecieron en LB con el antibiótico de selección.

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

3.2.4.2. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción

Para las digestiones del ADN con enzimas de restricción se siguieron las recomendaciones y se utilizaron los tampones proporcionados por la casa comercial. La enzima de restricción utilizada fue BamH I. Así, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 500 ng de ADN
- 1 U de enzima de restricción
- 1 μ L de tampón
- 1 μ L de albúmina acetilada (0,1 mg/mL)
- H₂O ultrapura estéril hasta 10 μ L

La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas. Una pequeña alícuota se separó en un gel de agarosa para determinar el contenido y la calidad del ADN.

El ADN plasmídico se cuantificó con ayuda del aparato NanoDrop® que, además de la concentración, indica el espectro de absorbancia de la muestra, con lo que puede confirmarse que ésta está compuesta de ADN y si hay contaminación de otras sustancias.

3.2.4.3. Electroforesis de ADN

Los productos de la amplificación se analizaron mediante una electroforesis de ADN 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 SybrSafe al 0,0005% (v/v). Se tomaron fotografías de los productos de la amplificación con un transiluminador de luz ultravioleta con una cámara acoplada.

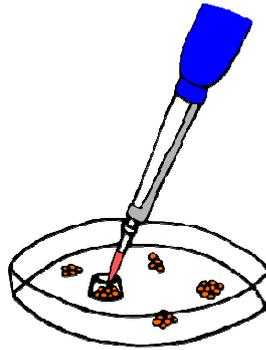
3.2.5. Transfección de las células C6 de glioma de rata

La transfección de las células C6 de glioma de rata con los plásmidos correspondientes se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000®. 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 tomó 1 µL de ADN plasmídico (1 µg/µL) y se diluyó en 100 µl de Opti-MEM®. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se diluyeron 2,5 µl de Lipofectamina 2000® 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 ADN plasmídico y la Lipofectamina 2000® 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 CO₂ 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 tras la transfección se añadió al medio antibiótico y geneticina 0,5 mg/mL.

3.2.6. Selección de clones

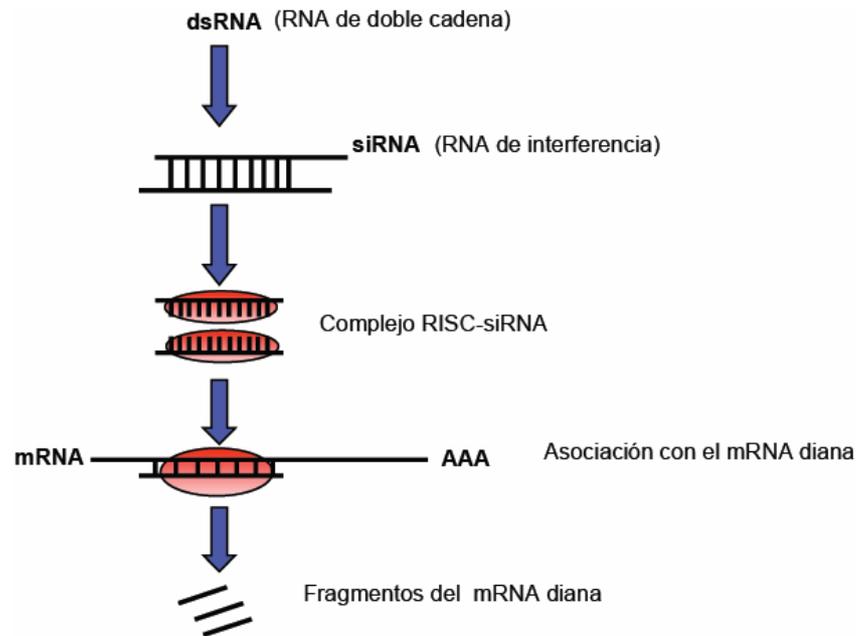
Para generar líneas de células C6 transfectadas establemente con el plásmido que contiene la Cx43 Y247F/Y265F, en primer lugar se transfectaron células C6 con este plásmido, como se ha explicado anteriormente. A las 48 horas post-transfección, éstas se sembraron a baja densidad en medio de cultivo que contenía geneticina 0,5 mg/mL. Como control se utilizaron células no transfectadas, a las que también se incubó con medio de cultivo con geneticina 0,5 mg/mL. En el momento en el que las células control murieron debido al tratamiento con geneticina, se procedió al aislamiento de los clones establemente transfectados mediante microtripsinización, tal y como se muestra en el **esquema 14**.



Esquema 14. Técnica de la microtripsinización

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 (Fire et al., 1998), 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 15**. 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 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.

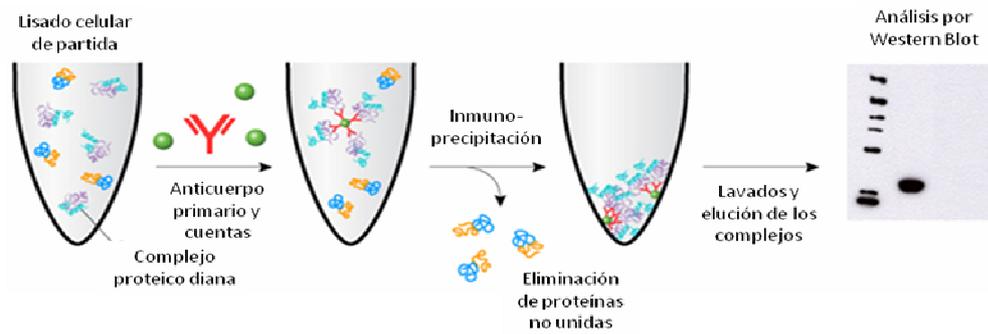


Esquema 15. Fundamento de la técnica del siRNA

El silenciamiento del mRNA de la Csk o de PTEN se realizó en el momento de la resiembra en medio de cultivo sin antibiótico. Se diluyó el siRNA específico de PTEN o de Csk, (PTEN-siRNA o Csk-siRNA) o el siRNA sin diana (*non-target*-siRNA, NT-siRNA), todos a una concentración de 50 nM, en medio comercial Opti-MEM® y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Por otro lado, se diluyó la Lipofectamina 2000 en Opti-MEM® (30 µL/mL), incubándose también esta mezcla durante 5 minutos. Pasado este tiempo, 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 celular (200 µL/mL de 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 CO₂ el tiempo necesario para los distintos experimentos.

3.2.8. Co-inmunoprecipitación

La técnica de la co-inmunoprecipitación permite aislar complejos proteicos e identificar sus componentes (esquema 16). Para ello, las células en cultivo se lisan; parte de estos lisados se reservan para conocer el contenido de partida de las muestras (lisados) y otra parte se incubó con un anticuerpo contra la proteína cuyo complejo se desea conocer (inmunoprecipitados). Tras la incubación, los anticuerpos se secuestran con unas cuentas microscópicas de sefarosa conjugadas con proteína A, que tiene una alta afinidad por las inmunoglobulinas. Después, las cuentas se recogen por centrifugación, lo que arrastra los inmunocomplejos, se lavan para eliminar todas las proteínas que no se han unido a ellas y se separan las proteínas asociadas en el inmunocomplejo. A continuación se lleva a cabo un Western blot con la muestra resultante para detectar las proteínas presentes en el inmunocomplejo.



Esquema 16. Fundamento de la técnica de co-inmunoprecipitación

3.2.8.1. Co-inmunoprecipitación de proteínas endógenas

Las disoluciones utilizadas para estos experimentos fueron:

- RIPA: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,2%, 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.
- Buffer A: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,2% y EDTA 2 mM.
- Buffer B: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, Triton X-100 al 0,2% y EDTA 2 mM.
- Buffer C: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0).

Las proteínas de las células de glioma C6 en confluencia o de los astrocitos en cultivo se recogieron en tampón de extracción RIPA. Los lisados fueron centrifugados a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes incubados a 4°C durante 12 horas, con agitación (rotación) suave, en presencia del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra hexokinasa I, utilizado como control negativo, anticuerpo monoclonal de ratón contra Cx43, anticuerpo monoclonal de conejo contra GAPDH y anticuerpo monoclonal de conejo contra Csk. Las co-inmunoprecipitaciones de proteínas fusionadas a la etiqueta HA (hemaglutinina) también se llevaron a cabo por este método, para lo que se usó un anticuerpo monoclonal de ratón contra HA.

Los inmunocomplejos (complejo proteína-anticuerpo) fueron secuestrados con 50 µL de la matriz proteína-A Sefarosa, durante 4 horas a 4°C, con rotación suave. La matriz fue previamente saturada con albúmina al 5% en buffer A durante 12 horas a 4°C y con agitación suave. El complejo matriz-anticuerpo-proteína fue aislado por centrifugación (11000 x g durante 1 minuto a 4°C), lavado 4 veces con buffer A, una vez con buffer B y una vez con buffer C, tras lo que las proteínas fueron eluidas con 30 µL de tampón Laemmli 2x (cuya composición se detalla en el

apartado 3.2.10.1.) durante 5 minutos a 95°C. Finalmente, los sobrenadantes se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas fueron analizadas mediante transferencia tipo Western.

3.2.8.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas exógenas

Se co-inmunoprecipitaron dos tipos de proteínas exógenas: proteínas de fusión HA-PTEN o Flag-PTEN. Para ello, las células se transfectaron con los plásmidos con la secuencia de estas proteínas o con plásmidos vacíos para la situación control, como se ha descrito anteriormente. Las proteínas se recogieron a las 24 horas post-transfección y se sometieron a inmunoprecipitación. En el caso de las proteínas HA-PTEN, se inmunoprecipitaron de la misma forma que las proteínas endógenas.

En el caso de las proteínas Flag-PTEN, se inmunoprecipitaron con la matriz comercial anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma). Esta matriz consiste en anticuerpos monoclonales de ratón contra Flag, unidos covalentemente a microcuentas de agarosa. En este caso, las proteínas se recogieron en una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 137 mM, IGEPAL 1% (p/v), 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. La matriz se lavó en tampón de lisis varias veces, se resuspendió en tampón de lisis y se añadieron 40 µL de ésta por cada mililitro de lisado celular. Esta mezcla se incubó 12 horas a 4°C con agitación suave. A continuación, el complejo matriz-anticuerpo-proteína fue aislado por centrifugación (11000 x g durante 1 minuto, a 4 °C), lavado 5 veces con tampón de lisis, y las proteínas fueron eluidas con 30 µL de tampón de carga Laemmli 2x (cuya composición se detalla en el apartado 3.2.10.1.), durante 5 minutos a 95 °C. Finalmente, los sobrenadantes se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida para llevar a cabo un análisis mediante transferencia tipo Western.

3.2.9. Pull-down avidina-biotina

Para estudiar la interacción entre los péptidos penetrantes basados en la secuencia de la Cx43 y el resto de proteínas objeto de esta Memoria, las células se trataron con dichos péptidos conjugados con biotina a una concentración de 50 µM, durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, las células se lisaron con una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 137 mM, IGEPAL 1% (p/v), 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. Los lisados fueron centrifugados a 11000 x g durante 10 minutos, a 4 °C, se tomaron muestras de los sobrenadantes (lisados) y el resto de los sobrenadantes fueron incubados con la matriz NeutrAvidin-Agarose (Sigma), a 4 °C durante 12 horas. A continuación, los complejos matriz-avidina-péptido biotinilado fueron aislados por centrifugación (3000 x g durante 1 minuto a 4°C), lavados 5 veces con tampón de lisis, y las proteínas fueron eluidas con 20 µL de tampón de carga Laemmli 2x (cuya composición se detalla en el apartado 3.2.10.1.), durante 5 minutos a 95 °C. Finalmente, los sobrenadantes se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida para llevar a cabo un análisis mediante transferencia tipo Western.

3.2.10. 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).

3.2.10.1. 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 a concentración final 1x (4x: Tris-HCl 0,18 M pH 6,8; glicerol 5 M; SDS 3,7 % (p/v); β -mercaptoetanol 0,6 M o 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.

3.2.10.2. Cuantificación de proteínas: 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 en el kit de determinación, sin que interfieran en la medición ácidos nucleicos ni sustancias tales como el DTT o el mercaptoetanol. La cuantificación se realiza en un espectrofluorímetro modelo Qubit (Invitrogen). El estándar proporcionado por la casa comercial es albúmina sérica bovina (BSA).

3.2.10.3. Preparación de los geles

La electroforesis SDS-PAGE se realizó en geles de 0,75 mm de grosor, compuestos por un gel de separación (7,5% de poliacrilamida) y un gel de concentración (4% de poliacrilamida). 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 electroforesis NuPAGE Novex Bis-Tris Midigels de concentraciones 4-12% y 10% (Invitrogen).

3.2.10.4. Preparación de las muestras para la electroforesis

Una vez calculada la concentración de proteínas en las muestras, se calculó el volumen necesario para cargar 20 µg de proteína. Se hirvió la mezcla durante 5 minutos y, tras realizar una rápida centrifugación, se procedió a la carga en el gel.

3.2.10.5. Electroforesis de proteínas

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

En el caso de las electroforesis NuPAGE, los tampones utilizados para la electroforesis fueron NuPAGE MOPS SDS y NuPAGE MES (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 pesos moleculares. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a un voltaje constante entre 80 y 140 V, dependiendo del gel empleado.

3.2.10.6. 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 25 V durante toda la noche o de 90 V durante 120 minutos, en ambos casos 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 0,45 µm de diámetro de poro o de PVDF de 0,2 µm de tamaño de poro. El tiempo de transferencia fue de 10 minutos, a un voltaje fijo de 20 V.

3.2.10.7. 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,

Material y métodos

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).

3.2.10.8. Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, ésta 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 (ratón) (1:200), anti-Cx43 (conejo) (1:50), anti-c-Src total (conejo) (1:500), anti-c-Src total (ratón) (1:500), anti-c-SrcY416 (1:200), anti-c-SrcY527 (1:200) anti-PTEN (conejo) (1:500), anti-PTEN (ratón) (1:500), anti-Csk (1:500), anti-Flag (1:500), anti-Akt (1:1000), anti-AktS473 (1:500), anti-AktT308 (1:500), anti-GAPDH (1:6000), anti- α -actinina (1:1000).

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 la membrana 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.

En el caso de las muestras procedentes de co-inmunoprecipitaciones, se utilizaron proteína A o proteína G, conjugadas con peroxidasa en lugar de anticuerpos secundarios (1:1000 y 1:5000 respectivamente). Estas proteínas se unen a la fracción constante de los anticuerpos únicamente cuando éstos se encuentran en conformación nativa; así se evitan las inespecificidades que podrían producirse por la presencia de inmunoglobulinas en las muestras de co-inmunoprecipitación, ya que éstas se encuentran desnaturalizadas.

De forma similar, en el caso de las muestras procedentes de los *pull-down* de avidina-biotina, se utilizó estreptavidina conjugada con peroxidasa para la detección de los péptidos biotinilados (1:40000).

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 (H₂O₂), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental emitiendo 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.

3.2.11. 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 incubaron las células con el anticuerpo primario, diluido en solución de anticuerpos con Triton X-100 al 0,1%, durante 2 horas y media a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, diluido en solución de anticuerpos con Triton X-100 al 0,1%, durante 1 hora, a temperatura ambiente en oscuridad y sin agitación, colocando las placas sobre una superficie lisa. Posteriormente, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron durante 1 minuto 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-Cx43 (1:200), anti-PTEN (1:100), anti-Csk (1:100). Los anticuerpos secundarios se utilizaron a las siguientes diluciones: anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor 488, AlexaFluor 594 o AlexaFluor 647 (todos ellos diluidos a 1:1000); anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 488 o AlexaFluor 594 (ambos a 1:1000). La solución de anticuerpos en la que se disolvieron los anticuerpos primarios y secundarios estaba compuesta por FCS 10%, lisina 0,1 M y azida sódica 0,02% (p/v) disueltos en PBS 1x.

En el caso de las células tratadas con péptidos biotinilados, se reveló la presencia de éstos mediante estreptavidina conjugada con Cy5 (1:250).

3.2.12. Microscopía de epifluorescencia y confocal

Las células teñidas por inmunocitoquímica se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia para comprobar la efectividad de la tinción. Para los ensayos de colocalización, las células se observaron en un microscopio confocal, que permite filtrar la luz emitida por los fluorocromos que se encuentran en un único plano. En todos los casos, una de las proteínas de estudio se visualizó en rojo y la otra en verde, de forma que, cuando un píxel aparece en amarillo, se considera que es por la colocalización de ambas proteínas.

3.2.13. Determinación de la 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

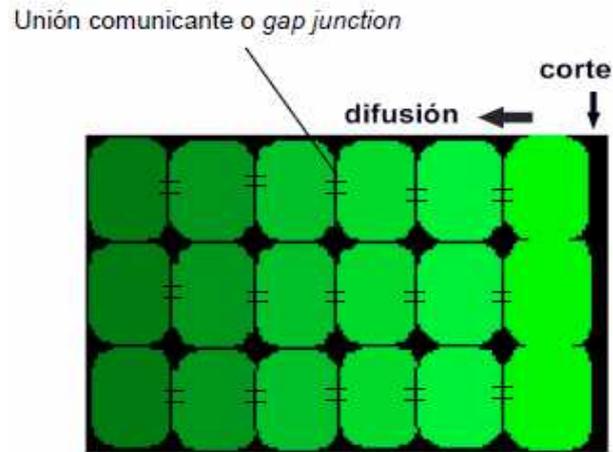
Material y métodos

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 menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante este ensayo, 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 CO₂ al 5 %. A continuación se aspiró este medio, se añadieron 300 µL de DMSO y se incubó 10 minutos en oscuridad y agitación muy suave hasta disolución homogénea de los cristales de formazán 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.

3.2.14. Determinación de la permeabilidad celular

La permeabilidad de las uniones comunicantes o *gap junctions* se determinó mediante la técnica conocida como *scrape loading*, según el método descrito por el-Fouly y colaboradores (el-Fouly et al., 1987), con algunas modificaciones (Tabernerero et al., 2001). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se realizaron varios lavados con solución externa, pH 7,2 (NaCl 130 mM, KCl 2,8 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM). A continuación, se realizaron varios lavados con solución sinCa²⁺ (con la misma composición que la solución anterior pero sin CaCl₂), incubándose las células con el medio del último lavado durante 2 minutos. Después, la placa se incubó con el colorante fluorescente amarillo de Lucifer disuelto en la solución sin-Ca²⁺ (1mg/mL) durante 5 minutos. En presencia del colorante y con ayuda de un bisturí, se realizó suavemente un corte sobre la monocapa de células en el centro de la placa. Este tratamiento permite la entrada del amarillo de Lucifer en el interior celular, puesto que la ruptura de la célula se ve seguida de una rápida vesiculación de la membrana plasmática. El amarillo de Lucifer es una molécula cuyo tamaño molecular es lo suficientemente pequeño (457 Daltons) como para difundir libremente a través de las uniones comunicantes. Sin embargo, es incapaz de difundir a través de la membrana plasmática (el-Fouly et al., 1987). Consecuentemente, una vez que el amarillo de Lucifer ha penetrado en la célula, difundirá hacia las células adyacentes exclusivamente a través de las uniones comunicantes (esquema 17).



Esquema 17. Fundamento de la técnica de *scrape loading*

3.2.15. 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 (* $p < 0,5$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$). Para comparar más de dos grupos entre sí se recurrió al análisis de la varianza (ANOVA de una vía), seguido del post-test apropiado según el tipo de datos. La significatividad de las diferencias está expresada como (* $p < 0,5$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

4. Resultados

4.1. Papel de Csk en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6

Como se ha descrito en la Introducción, el mecanismo más conocido para lograr la inactivación de la tirosina kinasa Src (c-Src) se refiere a la kinasa C-terminal de Src (Csk, *C-terminal Src kinase*), que como su propio nombre indica fosforila a c-Src en la tirosina 527, en el extremo carboxilo terminal (Nada et al., 1991; Okada et al., 1991), y estabiliza la molécula en su conformación inactiva (Liu et al., 1993). Dado que la restauración de la conexina 43 (Cx43) en células de glioma reduce su proliferación a través de la inactivación de c-Src por, entre otros efectos, aumentar los niveles de c-Src fosforilado en la tirosina 527 (Herrero-González et al., 2010), nos planteamos que la Cx43 podría estar promoviendo la fosforilación de c-Src en este residuo a través de Csk. Así, nuestro primer objetivo fue estudiar la implicación de Csk en la fosforilación de c-Src promovida por la Cx43.

Para estudiar el posible papel de Csk en este mecanismo, recurrimos al silenciamiento génico mediante la tecnología del siRNA (*small interfering RNA*). El primer paso fue poner a punto el silenciamiento de Csk en nuestra línea celular. Para ello, empleamos la secuencia de siRNA descrita por Baumeister y col. (Baumeister et al., 2005), con capacidad de silenciar Csk (Csk-siRNA) y probamos distintas concentraciones de siRNA contra Csk (25, 50 y 75 nM) durante 48 y 72 horas, en las células C6-Ires (transfectadas establemente con el vector Ires vacío) y C6-Cx43 (transfectadas establemente con el vector Ires que lleva el inserto de la Cx43 silvestre). Como control se utilizó un siRNA sin diana en la célula (*non-target* siRNA, NT-siRNA). Como se puede ver en la **figura 1**, la secuencia de siRNA contra Csk redujo considerablemente la expresión de Csk en ambos tipos celulares. En ambos casos, el silenciamiento era más eficaz a las 48 horas después de añadir el siRNA a las células (**figura 1 a**). En lo que respecta a las concentraciones, en las C6-Ires, la concentración de 25 nM de Csk-siRNA lograba un descenso de Csk de más del 60%, la de 50 nM del 80% aproximadamente, y la de 75 nM, de alrededor de un 70% (**figura 1 b**). En las C6-Cx43, la concentración de 25 nM de Csk-siRNA lograba un descenso de Csk de un 60% aproximadamente y las de 50 nM y 75 nM, de cerca del 80% (**figura 1 c**). La concentración más eficaz en ambos tipos celulares fue 50 nM, por lo que se eligió para los siguientes experimentos de silenciamiento.

Para estudiar si Csk estaba implicada en el efecto antiproliferativo de la Cx43, silenciamos su expresión en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43 y analizamos su proliferación, midiendo la cantidad de células viables por placa mediante la técnica del MTT a diferentes tiempos tras el silenciamiento.

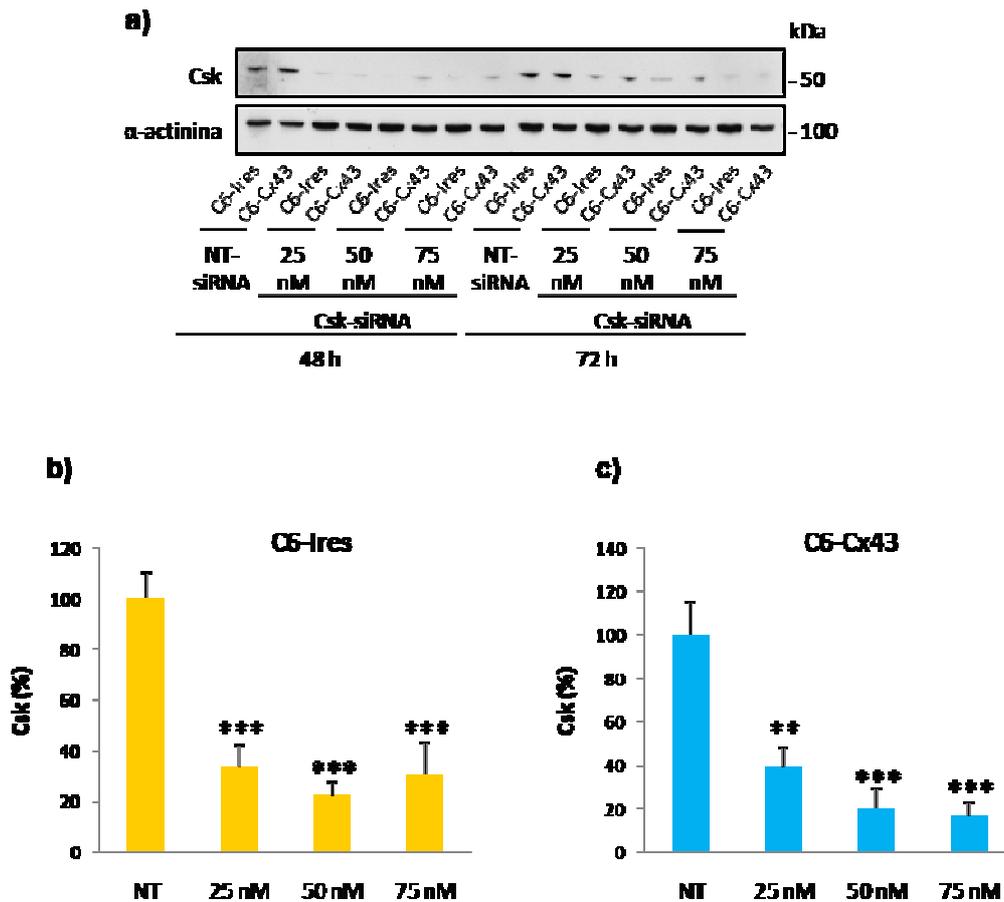


Figura 1. Puesta a punto del silenciamiento de Csk en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires (transfectadas establemente con el vector Ires vacío) y C6-Cx43 (transfectadas establemente con el vector Ires que lleva el inserto de la Cx43 silvestre), se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se trataron con un siRNA sin diana (*non-target* siRNA, NT-siRNA) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de Csk (Csk-siRNA), durante los tiempos indicados, tras lo que fueron lisadas y la expresión de proteínas se analizó mediante Western blot. **(a)** Western blot de Csk y α -actinina en las células C6-Ires y C6-Cx43 tras la transfección de NT-siRNA (50 nM) y de diferentes concentraciones de Csk-siRNA (25, 50 o 75 nM). **(b)** Los niveles de Csk fueron cuantificados y normalizados con α -actinina. Los resultados se expresan en porcentajes respecto al valor del control (NT-siRNA) \pm SEM (n \geq 3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como: **p<0.01, ***p<0.001 (ANOVA).

En la **figura 2 a** se puede observar, como era previsible, que en la situación control (NT-siRNA), la restauración de la Cx43 producía un descenso de la velocidad de proliferación, visible a partir del segundo día del experimento y que tal descenso se mantenía en el tiempo, de forma que al octavo día la cantidad de células C6-Cx43 viables correspondía, aproximadamente, al 25% de la cantidad de células C6-Ires. Sin embargo, como se puede ver en la **figura 2 b**, al silenciar Csk el efecto antiproliferativo de la Cx43 se redujo drásticamente: la forma de la curva de crecimiento de las células C6-Cx43 se aproximaba mucho a la de las células C6-Ires, las células C6-Cx43 entraban antes en fase de crecimiento exponencial y, al final del experimento, al octavo día, el número de células C6-Cx43 era de cerca de dos tercios del de las células C6-Ires, es decir, aproximadamente un 65% de la cantidad de células C6-Ires.

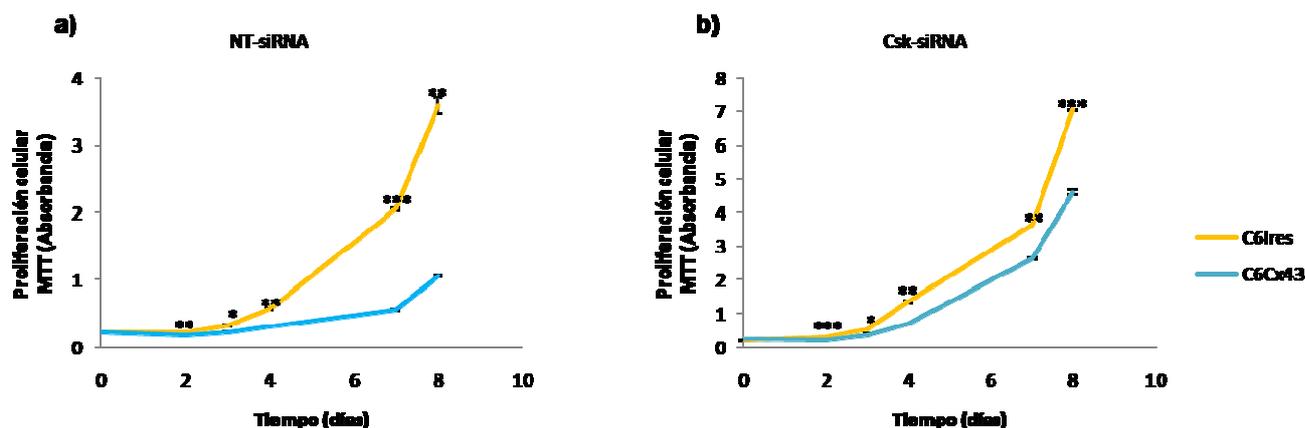


Figura 2. Efecto del silenciamiento de Csk sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se transfectaron con NT-siRNA o con Csk-siRNA 50 nM. A distintos tiempos, se realizaron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT, tal y como se describe en Métodos. (a) Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 en la situación control (NT-siRNA). (b) Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 cuando la expresión de Csk se encuentra silenciada (Csk-siRNA). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias \pm SEM ($n \geq 4$). Algunas barras de error no se aprecian a causa de la escala. La significatividad de las diferencias C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test *t* de Student).

4.2. Papel de PTEN en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6

4.2.1. Estudio del efecto del silenciamiento de PTEN sobre la inhibición de la actividad de c-Src promovida por la Cx43

Como se ha explicado en la Introducción, una de las fosfatasa que se ha descrito que puede desfosforilar c-Src en la tirosina 416 es la fosfatasa de especificidad dual PTEN (PTEN); (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011), que es conocida por su capacidad supresora de tumores (Di Cristofano et al., 1998; Suzuki et al., 1998). Sobre todo se conoce por su actividad sobre lípidos, en concreto sobre el fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (Maehama and Dixon, 1998), pero también puede desfosforilar proteínas (Li et al., 1997) y, además, es una de las proteínas más frecuentemente alteradas en los gliomas (Sansal and Sellers, 2004; Steck et al., 1997). Por todo ello, nos propusimos investigar su posible papel en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src mediada por la Cx43.

De la misma forma que con Csk, para averiguar si PTEN participa en este mecanismo recurrimos al silenciamiento génico. Así, pusimos a punto el silenciamiento de PTEN en nuestras líneas celulares. Utilizamos la secuencia de siRNA descrita en (Baumeister et al., 2005), con capacidad de silenciar PTEN (PTEN-siRNA), de la que probamos distintas concentraciones (25, 50 y

Resultados

75 nM); el resultado se muestra en la **figura 3 a**. De esta manera, pudimos comprobar que la concentración que silenciaba mejor PTEN en ambos tipos celulares era la de 50 nM. Una vez escogida esta concentración, evaluamos distintos tiempos de silenciamiento (**figura 3 b**) en las células C6-Ires y C6-Cx43. Como puede observarse, el mayor silenciamiento se da en las células C6-Ires a las 24 horas post-transfección y en las células C6-Cx43 a las 72 horas. Por tanto, elegimos un tiempo intermedio (60 horas) para los siguientes experimentos.

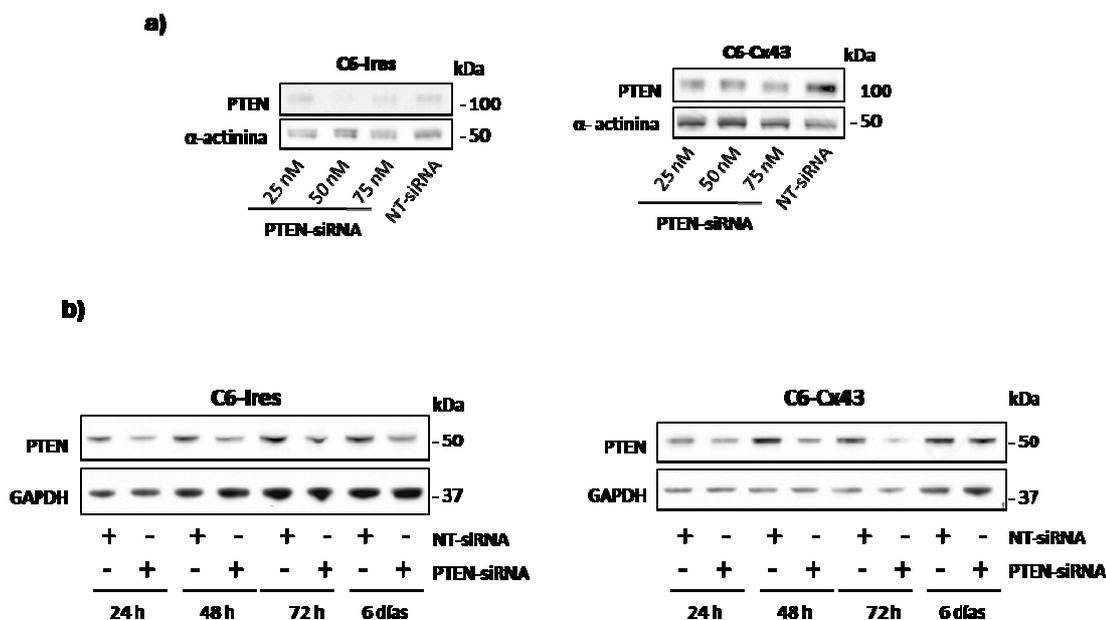


Figura 3. Puesta a punto del silenciamiento de PTEN en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se trataron con NT-siRNA o con un siRNA específico para silenciar la expresión de PTEN (PTEN-siRNA), tras lo que se lisaron y la expresión de proteínas se analizó mediante Western blot. **(a)** Transfección de NT-siRNA (50 nM) y de diferentes concentraciones de PTEN-siRNA (25, 50 y 75 nM) en células C6-Ires y C6-Cx43. Las proteínas se recogieron a las 48 horas del silenciamiento. Western blot de PTEN y α -actinina. **(b)** Una vez escogida la concentración de 50 nM para ambos tipos celulares, se procedió a hacer un *time-course* del silenciamiento. Las células fueron silenciadas con NT-siRNA o con PTEN-siRNA 50 nM y se lisaron a los tiempos indicados. La expresión de proteínas fue analizada mediante Western blot. Western blot de PTEN y α -actinina en C6-Ires y C6-Cx43.

Para averiguar si PTEN participa en la desfosforilación de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma C6, silenciamos la expresión de PTEN en células C6-Ires y C6-Cx43 con las condiciones elegidas en la puesta a punto (**figura 4 a y b**). Como se puede ver en la **figura 4 a y c**, en la situación control, cuando se restauraba la expresión de Cx43, descendía la cantidad de c-Src activo en estas células en aproximadamente un 30%, tal y como ya esperábamos. Sin embargo, este efecto inhibitor de la Cx43 sobre la actividad de c-Src se perdía cuando la expresión de PTEN se encontraba silenciada; es decir, en ausencia de PTEN, la Cx43 dejaba de producir la desfosforilación de la tirosina Y416 de c-Src.

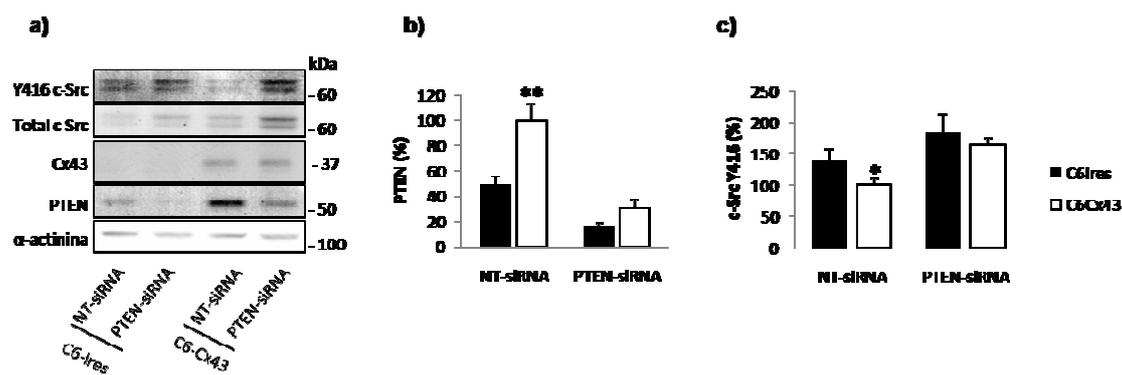


Figura 4. Efecto del silenciamiento de PTEN sobre la actividad de c-Src en células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se transfectaron con los siRNAs indicados a una concentración de 50 nM. **(a)** Western blot de c-Src Y416, c-Src total, PTEN y α -actinina. Los valores de PTEN **(b)** y c-Src Y416 **(c)** se normalizaron con α -actinina. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor de C6-Cx43 NT-siRNA y son medias + SEM (n \geq 12). La significatividad de las diferencias respecto a C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como *p<0.05, **p<0.01 (test t de Student).

Con estos datos, nos propusimos estudiar el posible papel de PTEN en la inhibición de la proliferación de las células de glioma C6 promovida por la Cx43. Para ello, de la misma forma que para investigar el papel de Csk, silenciamos la expresión de PTEN en células C6-Ires y C6-Cx43 y seguimos la proliferación de estas células a lo largo del tiempo mediante el ensayo del MTT. En la **figura 5 a** se observa de nuevo el efecto inhibitorio de la Cx43 sobre la proliferación de las células de glioma C6 en la situación control. Sin embargo, cuando PTEN se encontraba silenciada, la velocidad de crecimiento de las células C6-Cx43 aumentaba y se aproximaba a la de las células C6-Ires, y ambas curvas tardaban más en separarse (**figura 5 b**). Así, en el último punto temporal del experimento, la cantidad de células C6-Cx43 era de alrededor del 50% de la cantidad de células C6-Ires, en contraste con la situación control, donde esta cantidad representaba menos del 20% de la cantidad de células C6-Ires (**figura 5 a**).

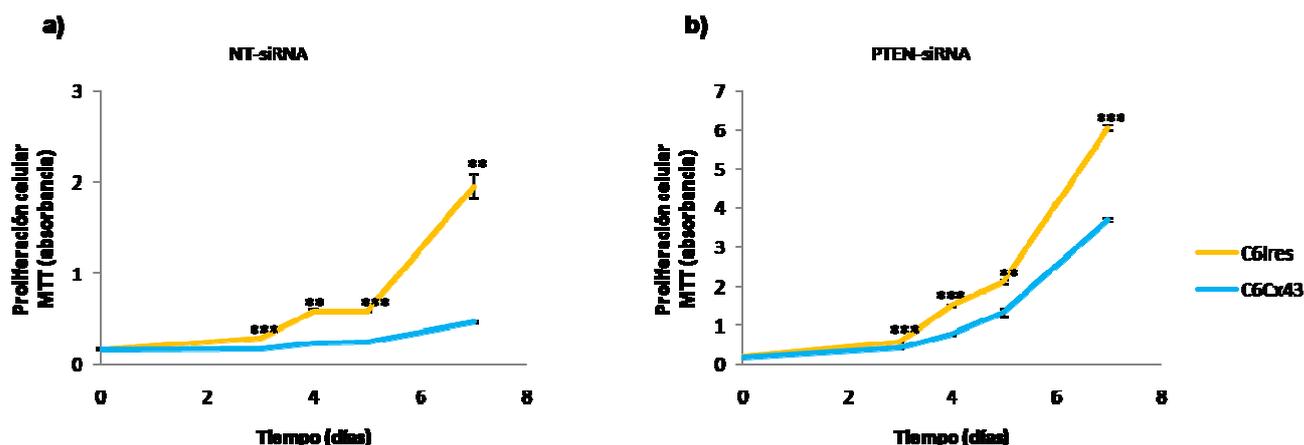


Figura 5. Efecto del silenciamiento de PTEN sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se transfectaron con NT-siRNA o con PTEN-siRNA 50 nM. A distintos tiempos, se realizaron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT. **(a)** Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 en la situación control (NT-siRNA). **(b)** Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 cuando la expresión de PTEN se encuentra silenciada (PTEN-siRNA). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias \pm SEM ($n \geq 4$). Algunas barras de error no se aprecian a causa de la escala. La significatividad de las diferencias C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test t de Student).

Tanto al realizar el estudio de proliferación en estas células con la Csk silenciada como con PTEN silenciada, pudimos observar que, aunque la Cx43 perdía gran parte de su efecto inhibitor sobre la proliferación al silenciar una de estas dos proteínas, todavía existían diferencias entre las curvas de crecimiento de las células que expresaban Cx43 y las que no. Hipotetizamos que esto se debía a que sólo estábamos silenciando la expresión de una de las dos enzimas y, por tanto, decidimos llevar a cabo un cosilenciamiento de Csk y PTEN. En la **figura 6** se puede ver cómo, al cosilenciar la expresión de Csk y de PTEN, la Cx43 perdía prácticamente la totalidad de su efecto sobre la proliferación y las curvas de crecimiento pasaban a tener la misma forma, independientemente de la cantidad de Cx43 de las células. De hecho, el crecimiento era tan alto que, en el último punto de medida, las células habían proliferado tanto que estaban empezando a morir; de ahí el descenso de viabilidad reflejado en la gráfica.

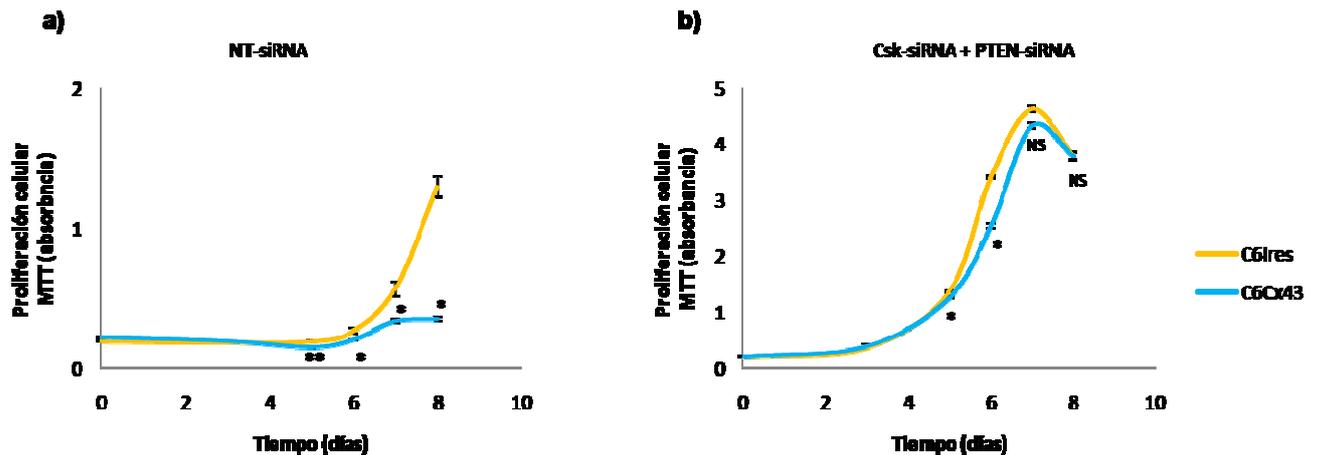


Figura 6. Efecto del cosilenciamiento de PTEN y Csk sobre la proliferación de las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y se transfectaron con NT-siRNA o con PTEN-siRNA y Csk-siRNA 50 nM. A distintos tiempos, se realizaron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT. **(a)** Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 en la situación control (NT-siRNA). **(b)** Proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43 cuando la expresión de Csk y de PTEN se encuentra silenciada (Csk-siRNA + PTEN-siRNA). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias \pm SEM ($n \geq 4$). Algunas barras de error no se aprecian a causa de la escala. La significatividad de las diferencias C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test *t* de Student).

4.2.2. Estudio del efecto de la restauración de la expresión de Cx43 en los niveles de PTEN en células de glioma C6.

Al realizar los experimentos de silenciamiento de PTEN en células C6-Ires y C6-Cx43, pudimos comprobar que la restauración de la Cx43 en las células de glioma aumentaba los niveles de expresión de PTEN. Dada la relevancia de PTEN en células de glioma (Sansal and Sellers, 2004), decidimos profundizar en el estudio de este efecto. Como se puede ver en la **figura 7**, la restauración de la expresión de Cx43 en células de glioma C6 producía un aumento significativo, de aproximadamente un 45%, de los niveles de PTEN (**figura 7 a y b**). Este aumento se veía acompañado de una disminución de la cantidad de c-Src activo (c-Src Y416), en estas células, de un 55% aproximadamente (**figura 7 a y c**), lo que concuerda con trabajos anteriores de nuestro laboratorio, en los que se observaba que al restaurar la expresión de Cx43 en células C6 disminuía la actividad de c-Src (Herrero-Gonzalez et al., 2010).

Resultados

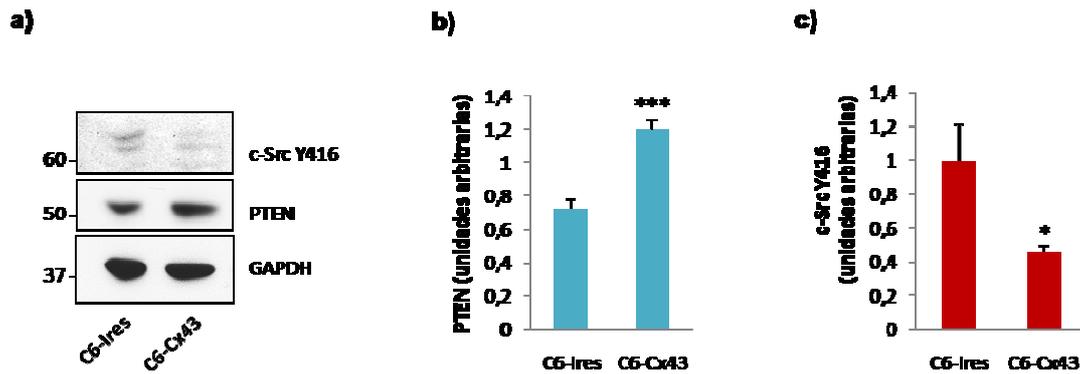


Figura 7. Efecto de la restauración de la expresión de Cx43 sobre la expresión de PTEN en células de glioma C6.

Las proteínas de las células C6-Ires y C6-Cx43 fueron recogidas al alcanzar éstas la confluencia y la expresión se analizó mediante Western blot. (a) Western blot de PTEN, c-Src Y416, Cx43 y GAPDH. Los valores de PTEN (b) y c-Src Y416 (c) fueron cuantificados y normalizados con GAPDH. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) y son medias + SEM (n≥6). La significatividad de las diferencias C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como: *p<0.05, ***p<0.001 (test t de Student).

A continuación, nos propusimos investigar si este aumento de PTEN se debía a que las células estaban en diferentes fases del ciclo celular o si se producía a lo largo de todo el ciclo. Así, sincronizamos células de glioma C6-Ires y C6-Cx43 y realizamos un seguimiento de los niveles de PTEN durante todo el ciclo celular. Como se puede observar en la **figura 8**, las células de glioma que expresaban Cx43 tenían niveles más altos de PTEN que las C6-Ires durante todo el ciclo celular, especialmente cuando las células estaban quiescentes y cuando debían entrar en la fase S del ciclo celular. Además, en las células C6-Cx43 las fluctuaciones en el nivel de PTEN eran mucho más pronunciadas y tendían a ser contrarias a las fluctuaciones observadas en las células C6-Ires (**figura 8 b**).

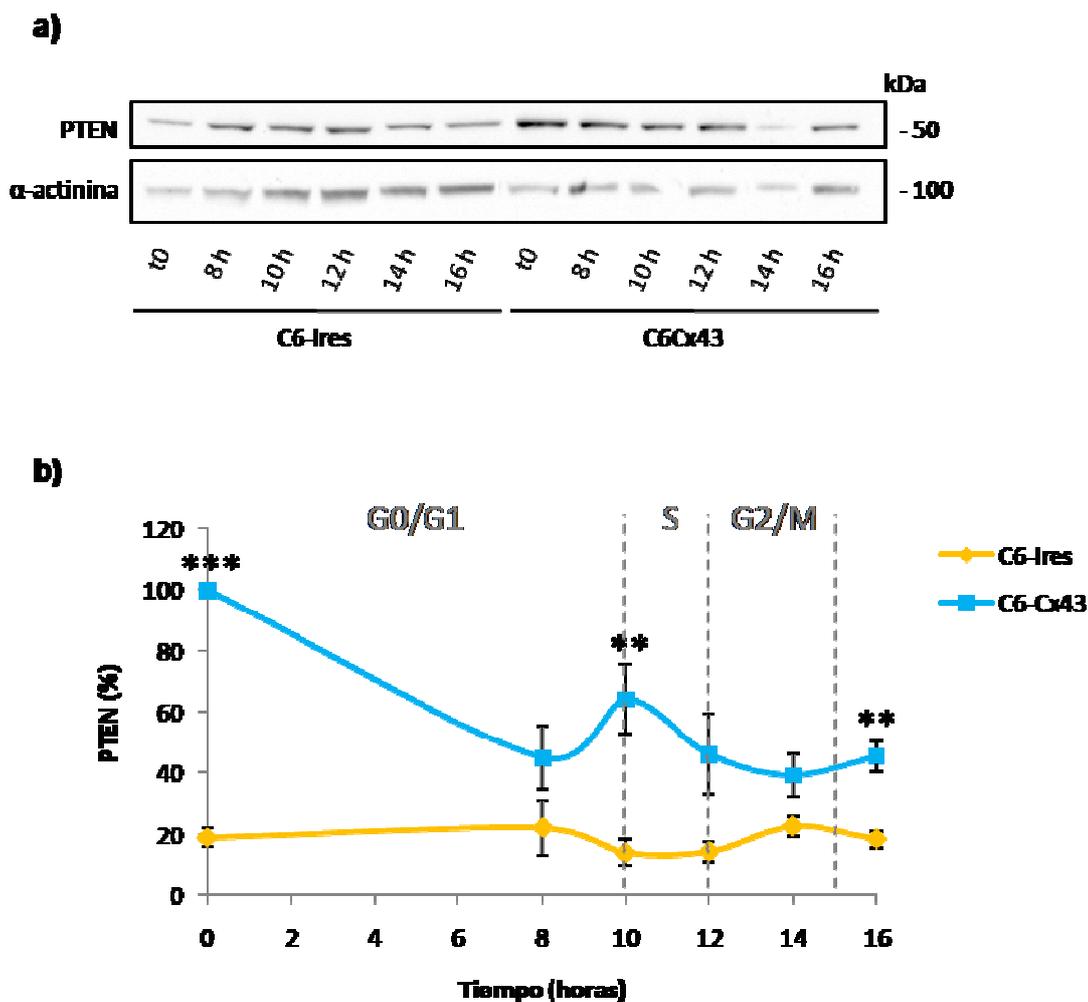


Figura 8. Cambios en la expresión de PTEN durante el ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en G0/G1.

Las células se sembraron a una densidad de 28.000 células/cm² (en el caso de las células C6-Ires) o 51.000 células/cm² (en el caso de las células C6-Cx43), se sincronizaron los ciclos celulares mediante privación de suero y se recogieron las proteínas a distintos tiempos (t0 = momento en el que se dispara el ciclo celular de nuevo desde la fase G0/G1). La expresión de proteínas fue analizada mediante Western blot. **(a)** Western blot de PTEN y α -actinina en C6-Ires y C6-Cx43 durante el ciclo celular. **(b)** Los valores de PTEN fueron cuantificados y normalizados con α -actinina. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de PTEN (C6-Cx43 a t0) y son medias \pm SEM ($n \geq 17$). La significatividad de las diferencias C6-Ires vs C6-Cx43 se expresa como: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test t de Student). Las fases del ciclo celular en las células C6 están separadas por líneas de puntos, tal y como fueron descritas previamente en el laboratorio (Herrero-Gonzalez et al., 2010).

Una vez que supimos que los niveles de PTEN aumentan al restaurar la expresión de Cx43, nos propusimos averiguar si, además de tener mayor expresión, también presentaba mayor actividad. Por los resultados del silenciamiento, sabíamos que tenía actividad fosfatasa sobre c-Src, por lo que investigamos su actividad sobre lípidos, evaluando la activación de la cascada PI3K/Akt. Es necesario recordar que la actividad más conocida de PTEN es su capacidad de desfosforilar lípidos, concretamente el fosfatidilinositol trisfosfato necesario para activar Akt, por

Resultados

lo que PTEN actúa como un inhibidor de Akt (Stambolic et al., 1998). Para determinar su actividad sobre esta vía analizamos los niveles de Akt activa, es decir fosforilada en la serina 473 y la treonina 308 (Manning and Cantley, 2007), en células C6-Ires y C6-Cx43.

Además, queríamos averiguar si el aumento de PTEN dependía de la interacción de c-Src con la Cx43. Con este fin, recurrimos a una Cx43 mutante, en la que se sustituyeron los dos residuos de tirosina que son fosforilados por c-Src por fenilalaninas (**figura 9a**), de forma que esta Cx43 mutante no puede interaccionar con c-Src y por tanto no inhibe su actividad (Herrero-Gonzalez et al., 2010a). En primer lugar, se generaron clones de células de glioma C6 establemente transfectados con la Cx43 mutante (Cx43 Y247F/Y265F). Para ello, se transfectaron células de glioma C6 con la construcción pIres-Cx43Y247F/Y265F y se seleccionaron clones que se denominaron C6-Cx43Y247F/Y265F, como se describe en Métodos. Estos clones se sembraron y, una vez las células llegaron a la confluencia, se recogieron las proteínas para analizar la expresión de la Cx43 mediante Western blot y se analizó su funcionalidad, es decir, la comunicación a través de uniones intercelulares, mediante la técnica del *scrape loading*, de los clones que fueron elegidos para los siguientes experimentos. En la **figura 9 b** se muestra el análisis por Western blot de la expresión de la Cx43 en las células que fueron transfectadas establemente, con éxito, con la Cx43Y247F/Y265F (10 clones numerados según el pocillo original) y se compara con la expresión de la Cx43 silvestre en las células C6-Ires y C6-Cx43. Se puede apreciar cómo los clones 5, 15 y 16 expresaban gran cantidad de Cx43 mutante, mientras que los clones 14 y 14.2 contenían una cantidad más próxima a la de las células C6-Cx43 y los clones 9, 10, 19 y 20 presentaban muy poca o ninguna Cx43 mutante. Así, de estos clones se eligieron los números 14, 14.2, 15 y 16 por sus niveles de Cx43 mutante y se procedió a analizar su comunicación intercelular (**figura 9 c**), que fue similar a las células C6-Cx43 que expresan la Cx43 silvestre.

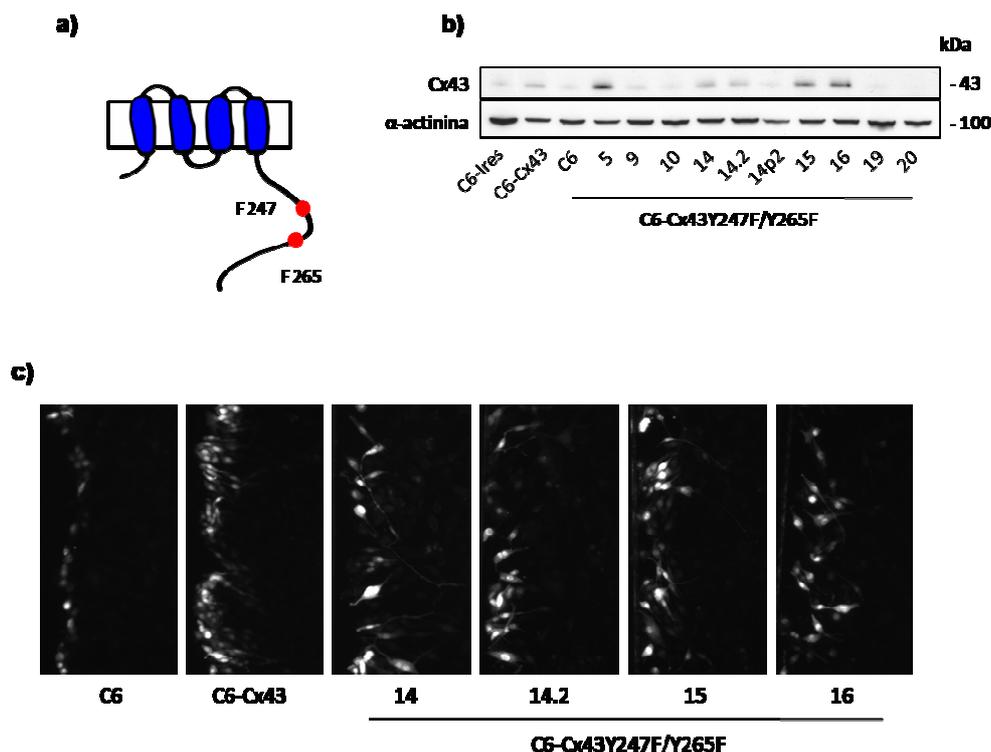


Figura 9. Expresión de Cx43 y determinación de la permeabilidad en las células de glioma C6 transfectadas con el vector pIRES-Cx43Y247F/Y265F

Las células C6-Ires, C6-Cx43 y los clones seleccionados de células C6 transfectados con la construcción pIRES-Cx43Y247F/Y265F, en la que, tal y como indica el esquema, las tirosinas 247 y 265 se sustituyeron por fenilalaninas (a), se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm². Una vez llegaron a la confluencia, se procesaron para su análisis. (b) Western blot de Cx43 y α -actinina. (c) Permeabilidad intercelular de algunos de los clones estudiados, determinada mediante la técnica del *scrape loading*.

Una vez elegidos los clones de células C6-Cx43Y247F/Y265F, éstos se cultivaron para analizar sus niveles de PTEN, así como la actividad de ésta sobre c-Src y la vía PI3K/Akt en estas células y compararlos con las células C6-Ires y C6-Cx43. Así, estudiamos la expresión de c-Src activo y total en estas células, así como la de Akt total y activa (fosforilada en la serina 473 y en la treonina 308) mediante Western blot. Como se puede apreciar en el Western blot y en las cuantificaciones de la **figura 10**, el efecto que produjo la restauración de la Cx43 silvestre sobre los niveles de PTEN y de c-Src activo no se observaba cuando la Cx43 que se restauraba se encontraba mutada y no se producía la interacción de ésta con c-Src. Concretamente, la Cx43 silvestre duplicó los niveles de PTEN, mientras que la Cx43 mutante no los modificó (**figura 10 c**). Por su parte, como se había comprobado en trabajos previos (Herrero-Gonzalez et al., 2010b), los niveles de c-Src total no fueron afectados por la restauración de ninguna de las conexinas (**figura 10 d**); sin embargo, como era de esperar, la Cx43 silvestre produjo un descenso de aproximadamente un 40% de los niveles de c-Src activo (Y416), que la Cx43 mutante no ejerció (**figura 10 e**). En lo que respecta a la actividad de Akt, se puede observar que ninguna de las conexinas utilizadas afectó a los niveles de Akt total (**figura 10 f**); sin embargo, la restauración de la Cx43 silvestre produjo un descenso de la cantidad de Akt activa, medida como la cantidad de Akt fosforilada en la serina 473 (45% de reducción aproximadamente) (**figura 10 g**) y la treonina 308 (descenso de cerca del 50%) (**figura 10 h**). Este descenso no se produjo con la Cx43 mutante

Resultados

que no interacciona ni inhibe a c-Src (**figura 10 g y h**). Es cierto que, en el caso de la Akt fosforilada en la treonina 308, se observaba una tendencia a la baja cuando se restaura la expresión de la Cx43 mutante, pero esta reducción no es estadísticamente significativa (**figura 10 h**).

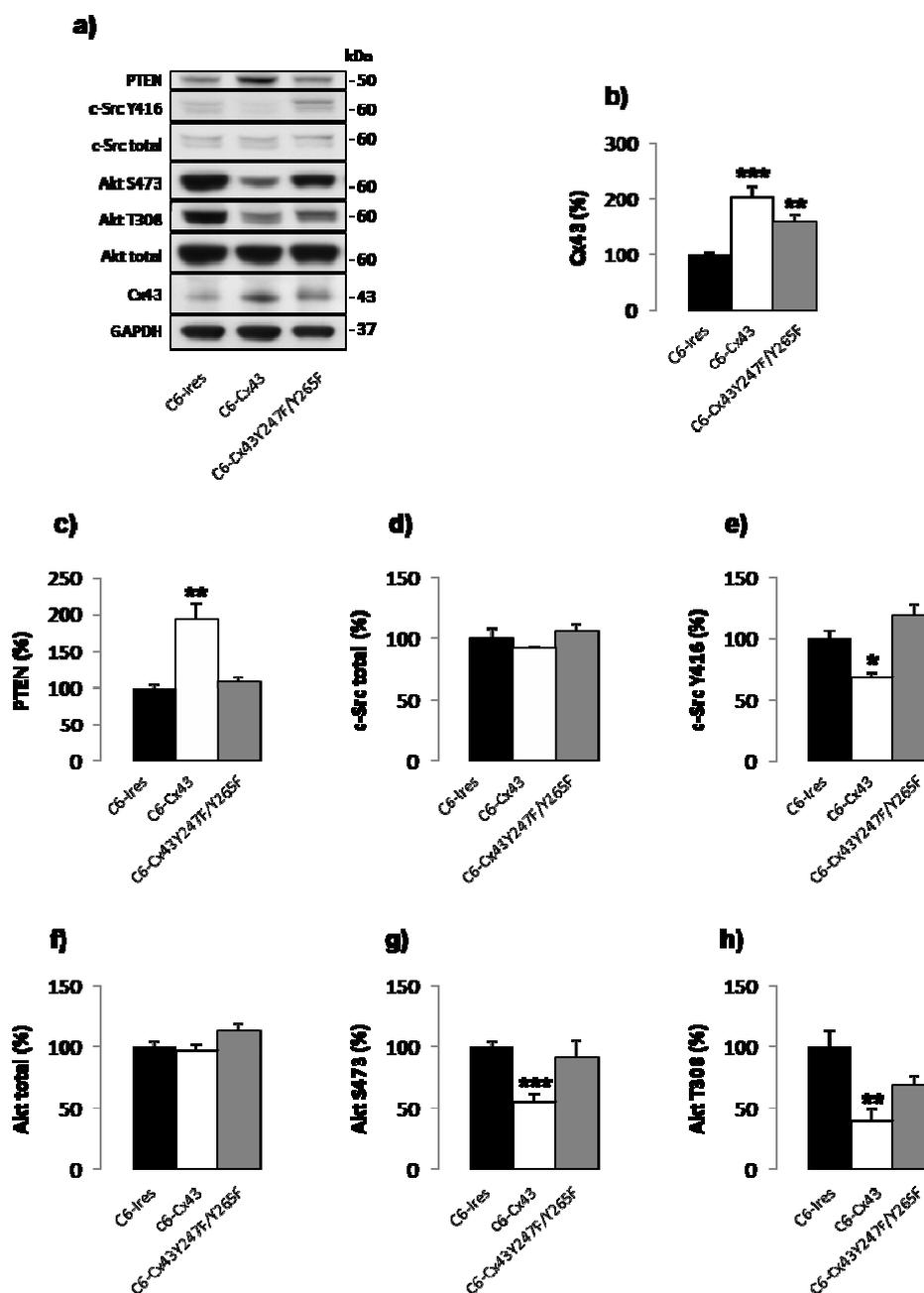


Figura 10. Efecto de la restauración de la Cx43 o del mutante de Cx43Y247F/Y265F en la activación de la cascada PTEN/PI3K/Akt.

Una vez obtenidas las células transfectadas establemente con la Cx43 Y247F/Y265F, se cultivaron éstas y células C6-Ires y C6-Cx43 y se lisaron al alcanzar la confluencia para analizar los niveles de expresión de las distintas proteínas de la vía PTEN/PI3K/Akt. **(a)** Western blot de Cx43, PTEN, c-Src Y416, c-Src total, Akt S473, Akt T308 y Akt total. Cuantificación de Cx43 **(b)**, PTEN **(c)**, c-Src total **(d)**, c-Src Y416 **(e)**, Akt total **(f)**, Akt S473 **(g)** y Akt T308 **(h)**. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor de C6-Ires y son medias + SEM (n≥6). La significatividad de las diferencias respecto a C6-Ires se expresa como: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (ANOVA de una vía).

4.3. Estudio de la interacción entre Cx43, PTEN, Csk y c-Src.

4.3.1. Estudios de colocalización en células de glioma.

Una vez que comprobamos la implicación de Csk y PTEN en la inhibición de c-Src por la Cx43, nos propusimos investigar si estas proteínas interactuaban entre sí para ejercer este efecto. En primer lugar, estudiamos mediante microscopía confocal si estas moléculas colocalizaban en nuestras células.

Para ello, realizamos tinciones inmunocitoquímicas contra estas proteínas en células C6-Cx43. En primer lugar, probamos la eficacia de los anticuerpos de que disponíamos para detectar Csk en nuestras células. Como se puede ver en la **figura 11**, en las células C6 apenas se detectaba Csk, pero en las células C6Cx43 la tinción era bien visible. A continuación, analizamos las muestras con un microscopio confocal. En la **figura 12** se muestra la tinción de Cx43 (en rojo, **figura 12 a**) y Csk (en verde, **figura 12 b**). Se muestran los dos canales por separado y la superposición (**figura 12 c**), así como una ampliación de una zona con abundante colocalización (**figura 12 d**). La colocalización de Cx43 y Csk se puede observar en amarillo en la superposición (ver flechas). Además, haciendo múltiples barridos en el eje Z de la zona, se puede reconstruir una proyección ortogonal de la localización de las proteínas. Ésta se muestra en los lados inferior y derecho de la imagen y corresponde únicamente a los ejes marcados en la imagen. Así, se puede ver que, en la mayoría de los casos, la colocalización de Csk y Cx43 se mantenía a lo largo del eje Z (ver flechas).

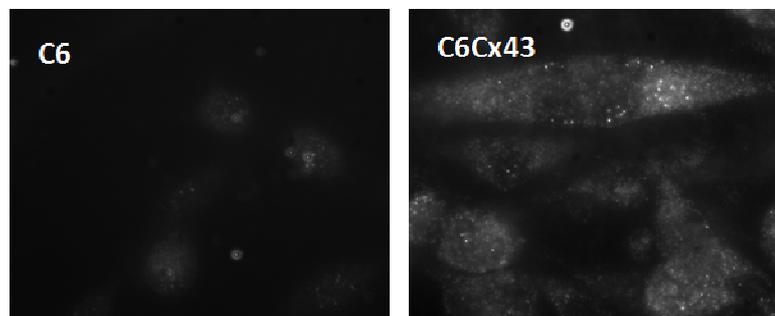


Figura 11. Tinción inmunocitoquímica de Csk en células de glioma C6-Cx43.

Las células C6 y C6-Cx43 se cultivaron hasta la confluencia, se fijaron y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas con el anticuerpo contra Csk a distintas concentraciones. Se muestra la tinción con la concentración de 1:100, que es la que se utilizó en los siguientes experimentos.

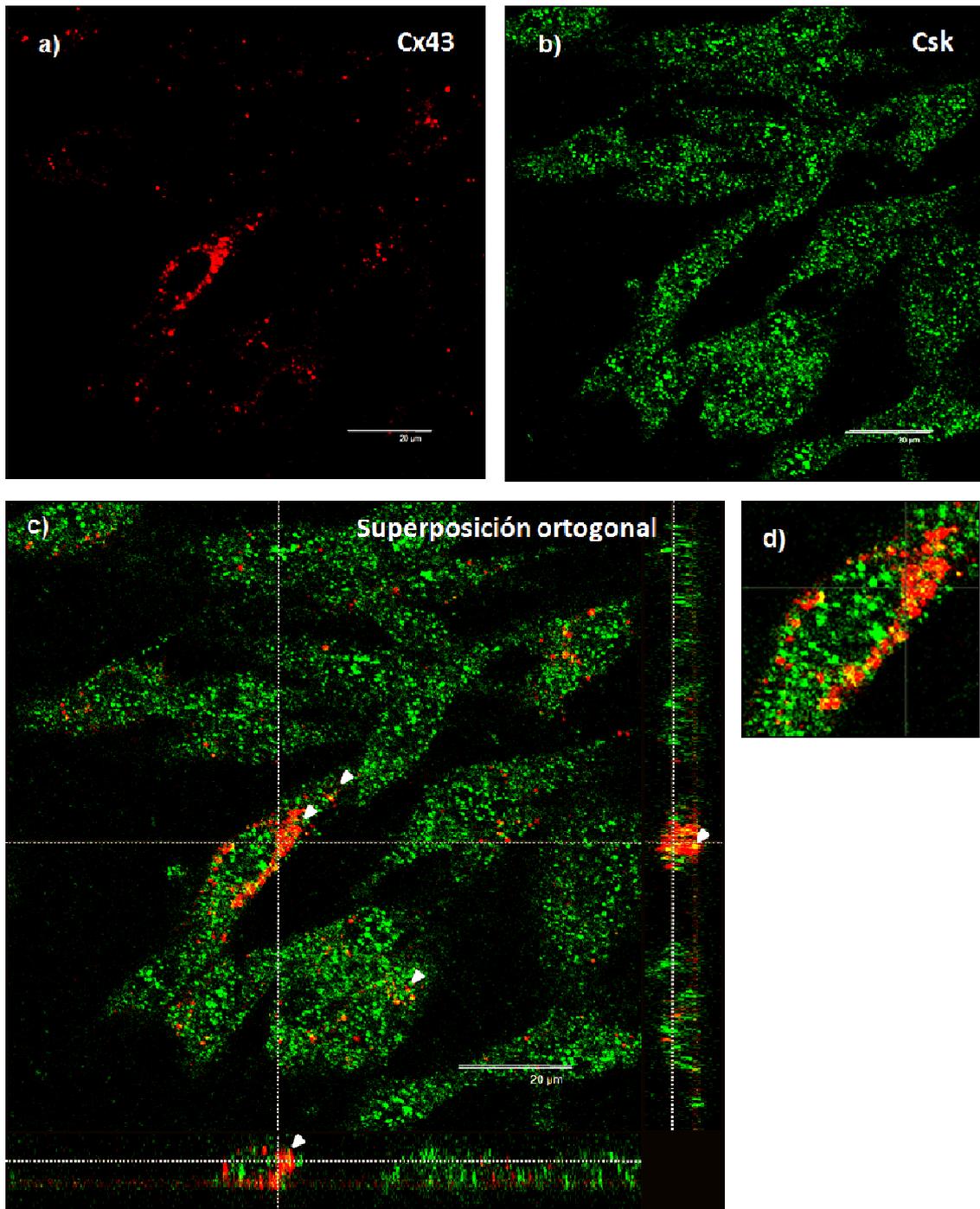


Figura 12. Colocalización de Cx43 y Csk en células de glioma C6-Cx43.

Las células C6-Cx43 confluyentes se fijaron y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas de Cx43 (rojo, **a**) y Csk (verde, **b**). La colocalización de ambas proteínas se observa en amarillo en la superposición de los dos canales (**c**). Se muestran las proyecciones ortogonales a lo largo del eje Z de la serie de fotografías confocales (márgenes derecho e inferior de la superposición). Asimismo, se muestra una ampliación de un área con abundantes puntos de colocalización (**d**). Barras de escala: 20 μm.

En segundo lugar, repetimos el mismo procedimiento con PTEN. En la **figura 13** se muestran las pruebas de tinción, en las que se puede observar que en las células C6 la tinción de PTEN, aunque era mayor que la de Csk, no era muy intensa, y que en las células C6-Cx43 la tinción fue mejor, aunque menos visible que la de Csk. En estas condiciones, no conseguimos detectar PTEN con el microscopio confocal, para el que se requiere una tinción intensa. Por esto, decidimos expresar la proteína de fusión GFP-PTEN en células C6-Cx43. El resultado se muestra en la figura 14, con la tinción de Cx43 en rojo (**figura 14 a**) y GFP-PTEN en verde (**figura 14 b**). En la **figura 14 c** puede verse la superposición de los dos canales con la proyección ortogonal. Como se puede observar, encontramos numerosos puntos de colocalización de Cx43 y GFP-PTEN, en amarillo (ver flechas y ampliación, **figura 14 d**).

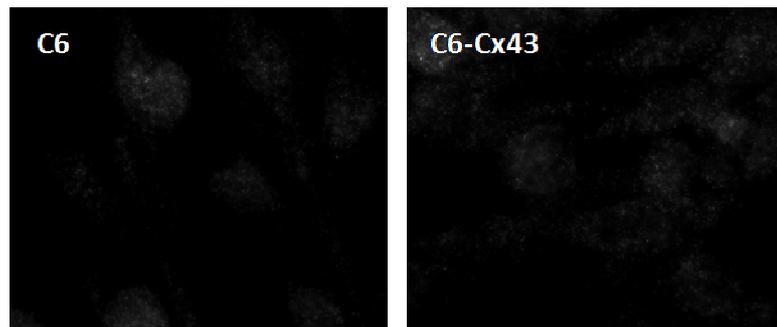


Figura 13. Tinción inmunocitoquímica de PTEN en células de glioma C6-Cx43.

Las células C6 y C6-Cx43 se cultivaron hasta la confluencia, se fijaron y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas con el anticuerpo contra PTEN a distintas concentraciones. Al no conseguirse una buena tinción, se decidió transfectar las células con GFP-PTEN para los siguientes experimentos.

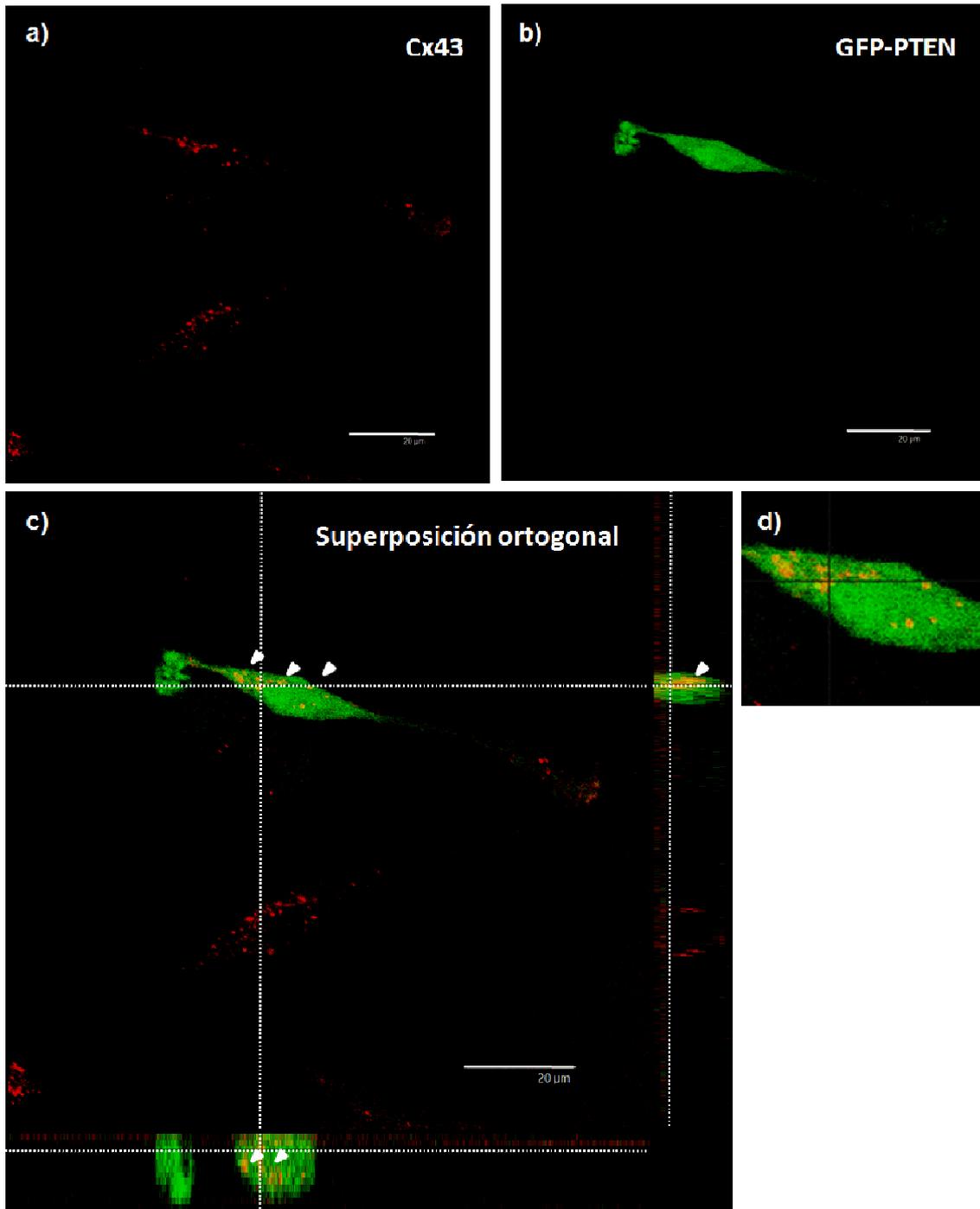


Figura 14. Colocalización de Cx43 y PTEN en células de glioma C6-Cx43.

Para estudiar la colocalización de la Cx43 y PTEN, se transfectaron las células con GFP-PTEN. A las 24 horas post-transfección, las células C6-Cx43 confluyentes se fijaron y se realizó una tinción inmunocitoquímica de Cx43 (rojo, **a**); GFP-PTEN se visualiza en verde (**b**). En la superposición de los dos canales se observa la colocalización de ambas proteínas en amarillo (**c**). Se muestran las proyecciones ortogonales a lo largo del eje Z de las series de fotografías confocales. Asimismo, se muestra una ampliación de un área con abundantes puntos de colocalización (**d**). Barras de escala: 20 μm .

Para confirmar estos resultados, recurrimos a la técnica de la co-inmunoprecipitación, que permite aislar complejos proteicos e identificar sus componentes. Para ello, las células en cultivo

se lisaron; parte de estos lisados se reservaron para conocer el contenido de partida de las muestras (que denominaremos lisados) y otra parte se incubó con un anticuerpo contra la proteína cuyo complejo se deseaba conocer (que llamaremos inmunoprecipitados, IP). Tras la incubación, los anticuerpos se secuestraron con unas cuentas microscópicas de sefarosa, conjugadas con proteína A, que tiene una alta afinidad por las inmunoglobulinas. Después, las cuentas se recogieron por centrifugación, lo que arrastró los inmunocomplejos, se lavaron para eliminar todas las proteínas que no se habían unido a ellas y se eluyeron las proteínas asociadas al inmunocomplejo. A continuación se llevó a cabo un Western blot con la muestra resultante para detectar las proteínas presentes en el inmunocomplejo.

4.3.2. Estudios de co-inmunoprecipitación en células de glioma

4.3.2.1. Puesta a punto de la técnica de co-inmunoprecipitación en células C6

En primer lugar, fue necesario poner a punto la técnica con nuestras líneas celulares y nuestros anticuerpos (**figura 15**).

Los experimentos se llevaron a cabo transfectando células C6-Ires y C6-Cx43 con HA-PTEN (PTEN fusionada a la etiqueta HA, hemaglutinina) o con su vector vacío (pSG5L), lisándolas a las 24 horas post-transfección e incubando los lisados con un anticuerpo contra HA y con proteína A-Sefarosa. En los primeros intentos, en las muestras de inmunoprecipitaciones encontramos gran cantidad de inmunoglobulinas procedentes del anticuerpo contra HA, que se habían disociado de la matriz de proteína A-Sefarosa durante la elución de los complejos proteicos. Estas inmunoglobulinas daban señal aproximadamente a 25 kDa (cadenas ligeras) y 50 kDa (cadenas pesadas), como se puede apreciar en la **figura 15 a** (ver flechas). Dichas señales dificultaban la interpretación de los resultados ya que muchas de nuestras proteínas de interés tienen un peso molecular similar a la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Así, recurrimos a revelar la señal de Csk en los inmunoprecipitados con proteína A conjugada con HRP (**figura 15 b**). La proteína A sólo se une a los anticuerpos en conformación nativa, con lo que sólo los anticuerpos primarios con los que se incuban las membranas generan señal y las inmunoglobulinas presentes en la muestra, que están desnaturalizadas, no se detectan. De esta forma, como se ve en el Western blot de Csk en la **figura 15 b**, no se observaba la señal de las inmunoglobulinas.

En todo caso, para evitar la aparición de las inmunoglobulinas en la membrana, probamos a realizar la co-inmunoprecipitación utilizando la técnica del *cross-linking*, es decir, uniendo covalentemente el anticuerpo anti-HA y la proteína A-Sefarosa; el resultado se muestra en la **figura 15 c**. Para comprobar que el *cross-linking* se había realizado correctamente, se recogió una muestra antes del proceso (control positivo, en el que deben aparecer las inmunoglobulinas) y después (control negativo, que debe aparecer limpio). Sin embargo, aunque los controles eran correctos, seguíamos encontrando una cantidad considerable de inmunoglobulinas en las muestras de co-inmunoprecipitados (flechas rojas en la **figura 15 c**). Por ello, decidimos prescindir del *cross-linking* y resolver este problema combinando varias estrategias: En primer lugar, separar

Resultados

más las bandas de proteínas; para ello llevamos a cabo las electroforesis en gels de mayor tamaño, con distintas concentraciones de poliacrilamida y a menores voltajes, para permitir un mejor empaquetamiento; y en segundo, evitar la señal de las inmunoglobulinas revelando con proteína A-HRP.

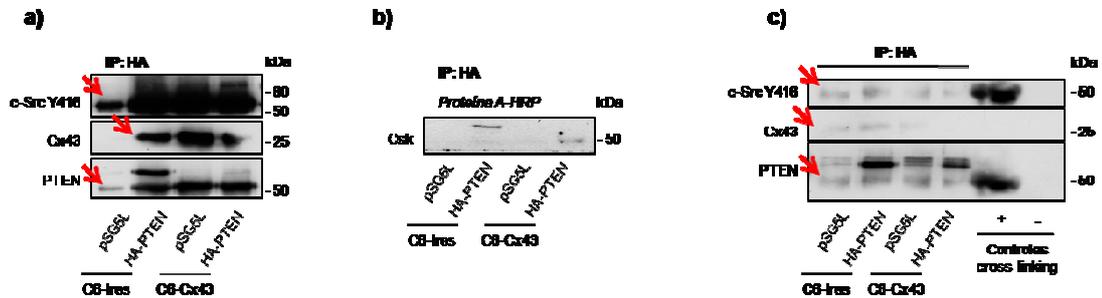


Figura 15. Puesta a punto de la co-inmunoprecipitación de HA-PTEN

Las células C-6Ires y C6-Cx43 en confluencia se transfectaron con HA-PTEN o con un vector vacío (pSG5L, control), se lisaron a las 24 horas post-transfección y se realizó la co-inmunoprecipitación con un anticuerpo contra HA y proteína A-Sefarosa. **(a)** Western blot de PTEN, Cx43, c-Src Y416 y Csk total en los lisados y co-inmunoprecipitaciones. **(b)** Co-inmunoprecipitación de HA-PTEN con *cross-linking*: unión covalente del anticuerpo anti-HA a la proteína A-Sefarosa mediante un tratamiento con dimetilpimelimidato (DMP). **(c)** Western blot de PTEN, Cx43 y c-Src Y416 en lisados, co-inmunoprecipitaciones y controles positivo y negativo del *cross-linking*. La muestra del control positivo se recoge antes de añadir el DMP, de forma que las inmunoglobulinas deben aparecer, y la del control negativo se recoge al final del proceso, con lo que en el blot no debe haber señal.

4.3.2.2. Estudios de colocalización en astrocitos

En la **figura 16** se muestra el resultado de las co-inmunoprecipitaciones de HA-PTEN en células C6-Ires y C6-Cx43 transfectadas con HA-PTEN y aplicando las condiciones que dieron mejor resultado en las pruebas. En los lisados (las muestras de partida, **figura 16 a**) se pueden ver las proteínas que estaban presentes en las células antes de la co-inmunoprecipitación. Como era de esperar, las células C6-Ires apenas presentaban expresión de Cx43, mientras que las células C6-Cx43 sí la expresaban, y su expresión de PTEN era mayor que la de las C6-Ires. También se puede observar la gran cantidad de HA-PTEN que expresaban estas células tras la transfección. Por su parte, en las muestras co-inmunoprecipitadas (**figura 16 b**) se aprecia que, como era de esperar, en las células transfectadas con el plásmido vacío no se encontraba ninguna proteína del complejo. En las células C6-Ires transfectadas con HA-PTEN sólo se recuperó esta proteína al co-inmunoprecipitar. Sin embargo, en las células C6-Cx43 con HA-PTEN, en el inmunocomplejo que formaba HA-PTEN aparecían Cx43, c-Src y Csk en las células de glioma que contienen Cx43.

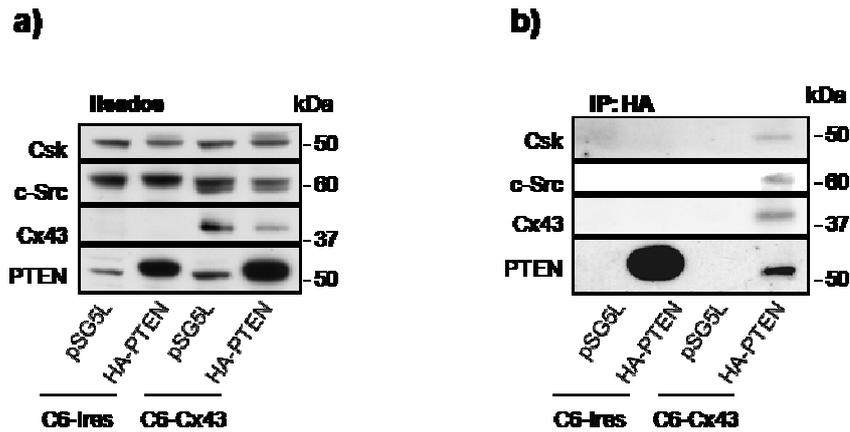


Figura 16. Interacción entre Cx43, c-Src, Csk y PTEN en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 en confluencia se transfectoron con un plásmido vacío (control, pSG5L) o con HA-PTEN, se lisaron a las 24 horas post-transfección y se llevaron a cabo co-inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-HA. Se muestran los Western blot de PTEN, Cx43, c-Src total y Csk de los lisados totales **(a)** y de las co-inmunoprecipitaciones **(b)**.

4.3.3. Estudios de colocalización en astrocitos

Tal y como se ha indicado, estos resultados de interacción entre PTEN, Cx43, c-Src y Csk en células de glioma se obtuvieron transfectorando dichas células para que expresaran HA-PTEN exógeno. Por tanto, nos preguntamos si esta interacción se daría en condiciones de expresión endógena en células no tumorales. Para ello, recurrimos a astrocitos en cultivo primario, que expresan altos niveles de Cx43 y PTEN de forma fisiológica.

En primer lugar se realizaron tinciones inmunocitoquímicas contra Cx43 y Csk **(figura 17)**. Así, mediante microscopía confocal pudimos observar gran cantidad de puntos de colocalización **(figura 17 c, en amarillo, ver flechas)** de ambas proteínas en los astrocitos (ver ampliación, **figura 17 d**). Además se obtuvo la reconstrucción de la proyección ortogonal del eje Z (márgenes derecho e inferior de la fotografía). Así, podemos ver que, en la mayoría de los casos, la colocalización de Csk y Cx43 se mantenía a lo largo del eje Z **(figura 17 c, ver flechas)**.

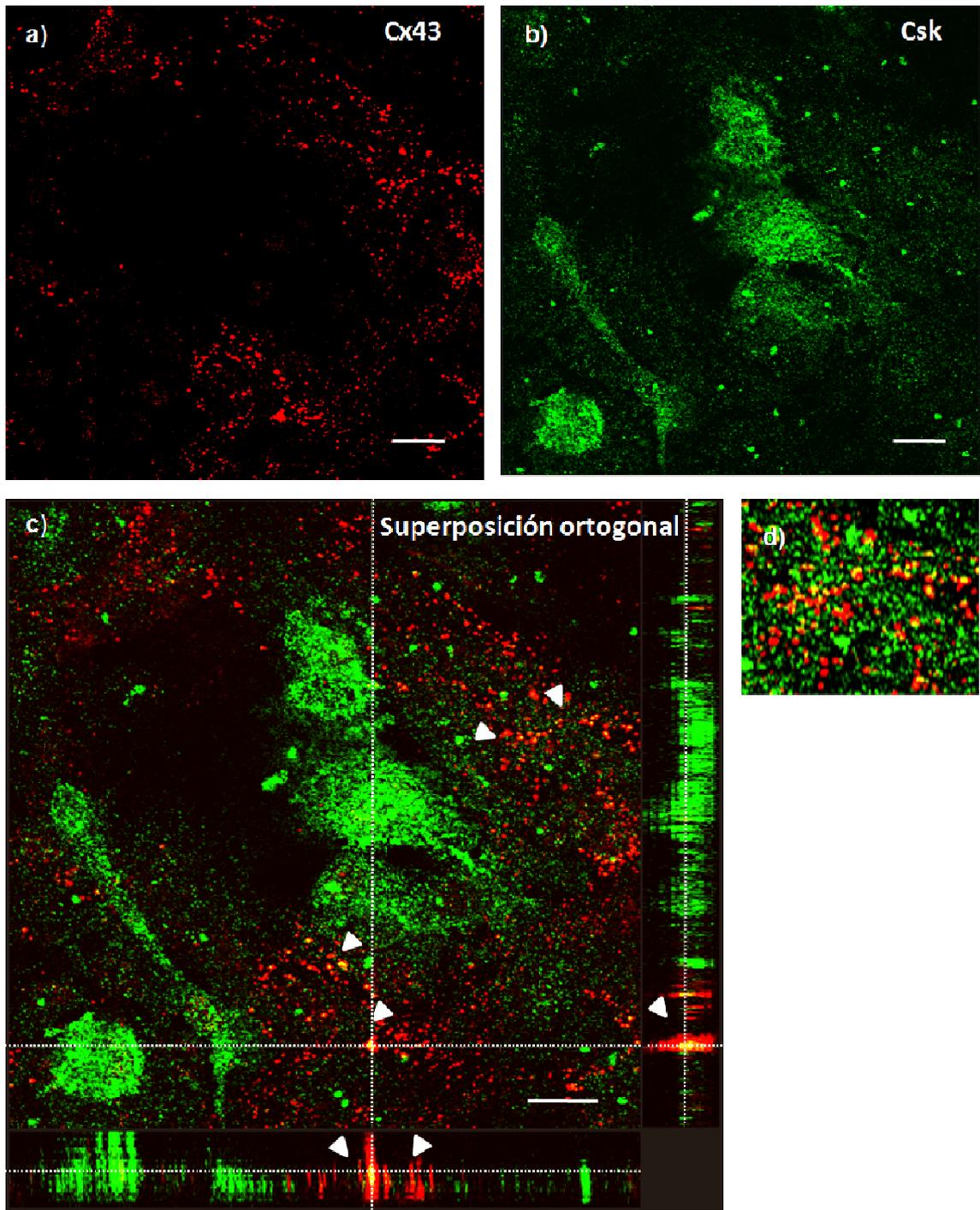


Figura 17. Colocalización de Cx43 y Csk en astrocitos.

Los astrocitos en cultivo primario se fijaron y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas de Cx43 (rojo, **a**) y Csk (verde, **b**). La colocalización de ambas proteínas se observa en amarillo en la superposición de los dos canales (**c**). Se muestran las proyecciones ortogonales a lo largo del eje Z de las series de fotografías confocales (márgenes derecho e inferior de la superposición). Asimismo se muestra una ampliación de un área con abundantes puntos de colocalización (**d**). Barras de escala: 20 μm .

De la misma manera, llevamos a cabo tinciones contra Cx43 y PTEN en astrocitos, en las que pudimos comprobar que estas proteínas también colocalizaban en este tipo celular (**figura 18**

c, en amarillo, ver flechas). Esta colocalización también puede verse en la proyección ortogonal (figura 18 c) y en la ampliación (figura 18 d).

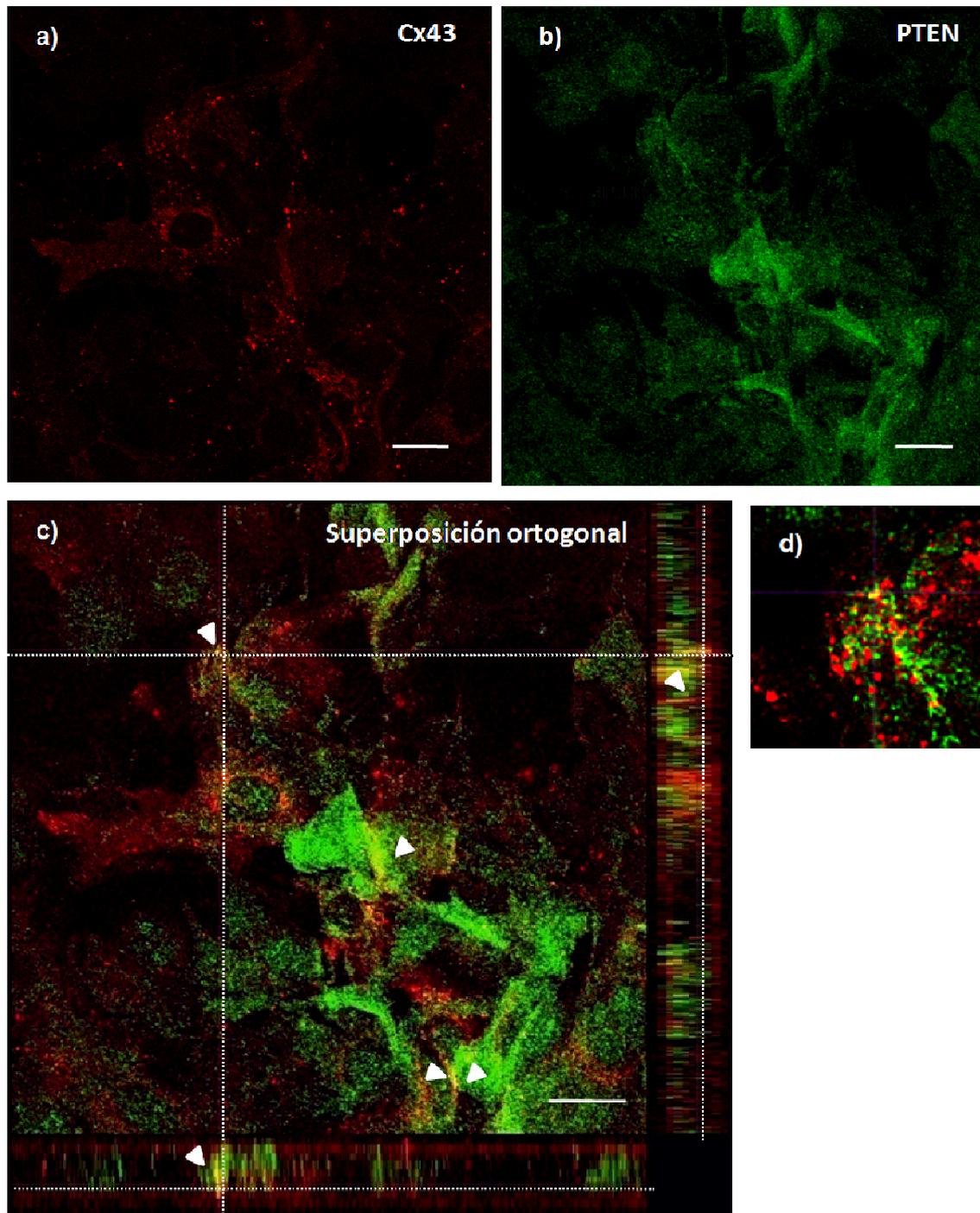


Figura 18. Colocalización de Cx43 y PTEN en astrocitos.

Los astrocitos en cultivo primario se fijaron y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas de Cx43 (rojo, **a**) y PTEN (verde, **b**). En la superposición de los dos canales se puede observar la colocalización de ambas proteínas en amarillo (**c**). Se muestran las proyecciones ortogonales a lo largo del eje Z de las series de fotografías confocales. Asimismo se muestra una ampliación de un área con abundante colocalización en ambos casos (**d**). Barras de escala: 20 μm .

4.3.4. Estudios de co-inmunoprecipitación en astrocitos

Para confirmar la interacción entre la Cx43, PTEN, c-Src y Csk endógenas, decidimos llevar a cabo co-inmunoprecipitaciones en astrocitos, que se muestran en la **figura 19**. En concreto, realizamos co-inmunoprecipitaciones de proteínas endógenas: en primer lugar, de Cx43 (**figura 19 a**). Como puede observarse, en el carril de muestras co-inmunoprecipitadas con un anticuerpo contra hexoquinasa I (control), no se encontró señal para ninguna de las proteínas investigadas, mientras que al co-inmunoprecipitar con un anticuerpo contra la Cx43, obtuvimos un complejo en el que también se encontraban PTEN y c-Src. En segundo lugar, realizamos co-inmunoprecipitación con un anticuerpo contra Csk (**figura 19 b**) y pudimos encontrar a la Cx43 y a c-Src en el inmunocomplejo. En este caso, como control se utilizó un anticuerpo contra GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y, como se puede observar, no encontramos señal en el carril del control.

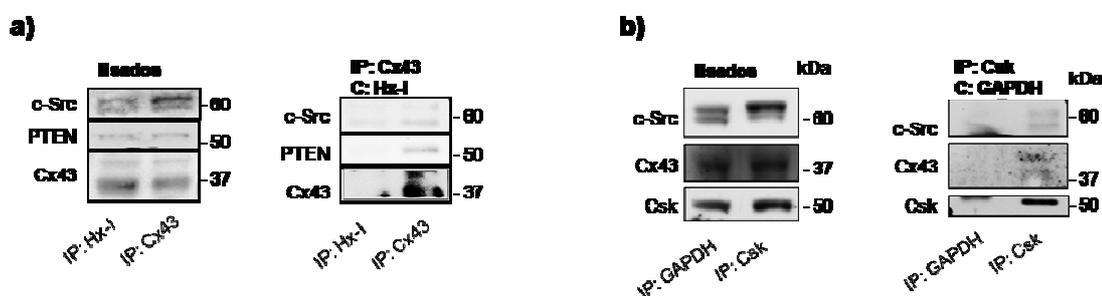


Figura 19. Interacción entre Cx43, c-Src, CSK y PTEN en astrocitos.

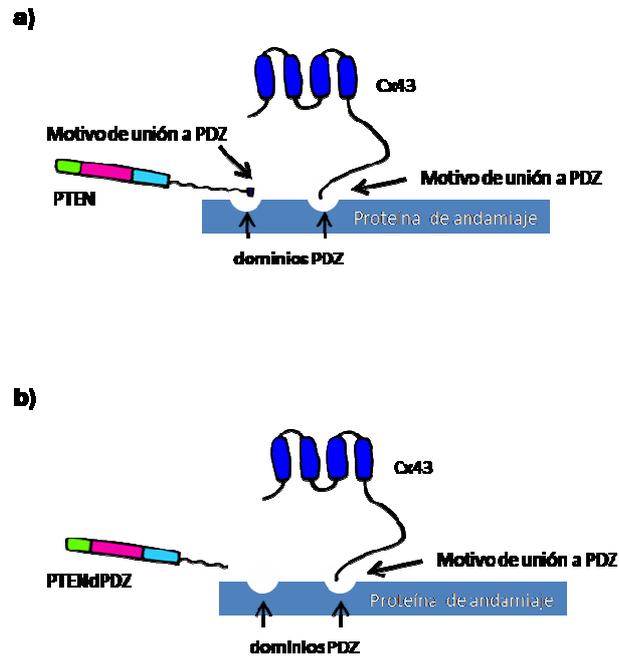
Los astrocitos en cultivo primario se lisaron y se procedió a la co-inmunoprecipitación con los anticuerpos indicados. **(a)** Co-inmunoprecipitación de Cx43 y hexoquinasa I (control). Western blot de Cx43, PTEN y c-Src total de los lisados totales y de las co-inmunoprecipitaciones. **(b)** Co-inmunoprecipitación de Csk y GAPDH (control). Western blot de Csk, Cx43 y c-Src total de los lisados totales y de las co-inmunoprecipitaciones.

4.3.5. Estudio de la participación del motivo de unión a PDZ de PTEN en su interacción con la Cx43

Tras comprobar que PTEN puede interactuar con la Cx43, nos preguntamos cómo podría darse dicha interacción. PTEN posee un motivo de unión a PDZ (Georgescu et al., 1999), que, como su nombre indica, interactúa con dominios PDZ, que están presentes en gran cantidad de proteínas y especialmente en proteínas de andamiaje (Lee and Zheng, 2010). Por otro lado, la Cx43 también tiene un motivo de unión a PDZ (Sorgen et al., 2004), con el que interactúa con proteínas de andamiaje como ZO-1 (Giepmans and Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998). Así, hipotetizamos que PTEN y la Cx43 podrían interactuar a través de una de estas proteínas de andamiaje, como PTPN13 o ZO-1, que tienen varios dominios PDZ (**esquema 18 a**).

Para comprobar nuestra hipótesis, utilizamos un mutante de PTEN sin los tres últimos aminoácidos de su secuencia, que constituyen el motivo de unión a PDZ (PTENdPDZ) (**esquema 18**

b). Este mutante está fusionado a la etiqueta Flag para favorecer su inmunoprecipitación, por ello se comparó con Flag-PTENwt (PTEN silvestre) y Flag vacío (control).



Esquema 18. Hipótesis de interacción de la Cx43 con PTEN a través de los motivos de unión a PDZ de ambas y una proteína de andamiaje.

El primer paso fue poner a punto la técnica de co-inmunoprecipitación de la etiqueta Flag (**figura 20**). Llevamos a cabo estos experimentos con una matriz comercial (anti-Flag M2, Sigma-Aldrich), de anticuerpo contra Flag unido covalentemente a agarosa. Esta unión puede verse afectada por agentes reductores presentes en los tampones de elución, provocando la disociación de las inmunoglobulinas de la agarosa y la aparición de éstas en el Western blot. Así, para determinar si el tratamiento con agentes reductores incrementaba la cantidad de inmunoglobulinas en las muestras, se probaron dos tampones de elución, uno con agente reductor (beta-mercaptoetanol, β -ME) y otro sin él. Con estos tampones se trataron unas muestras que contenían únicamente la matriz anti-Flag y otras muestras solamente de lisados celulares, las cuales, tras ser hervidas, se sometieron a un análisis de tipo Western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios procedentes de dos especies distintas (conejo y ratón) para averiguar si éstos reconocían a las inmunoglobulinas presentes en la muestra, en caso de haberlas. El resultado de estas pruebas se muestra en la **figura 20**. La primera prueba fue incubar una membrana con el anticuerpo contra Cx43 (generado en ratón) y con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón (**figura 20 a**). Como se puede apreciar, el anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón reconoce los restos de anticuerpo anti-Flag, ya que éste está generado en ratón y, por tanto, son inmunoglobulinas de ratón. Además, se observa que la eliminación del agente reductor del tampón de elución no impedía la separación del anticuerpo anti-Flag de la agarosa, ya que la señal de las inmunoglobulinas podía verse a 50 y 25 kDa (cadenas pesada y ligera, respectivamente). También

Resultados

se comprueba que, en la muestra de lisado celular tratado sin β -ME, los monómeros de Cx43 no se separaron correctamente, apareciendo a alturas mayores de lo habitual (entre 50 y 75 kDa, cuando los monómeros pesan 43 kDa). Esto se debe a que los monómeros de Cx43 se unen entre sí por puentes disulfuro, que en ausencia de agente reductor permanecen intactos. Por otra parte, se probaron anticuerpos primarios generados en conejo con anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de conejo (anticuerpos contra PTEN, c-Src y Csk, **figura 20 b**). Como se puede apreciar, estos anticuerpos no reconocían las inmunoglobulinas anti-Flag que se separaban de la matriz. También se puede observar que, en ausencia de β -ME, se perdía la señal de c-Src y PTEN, lo que indica una incorrecta elución de los complejos proteicos.

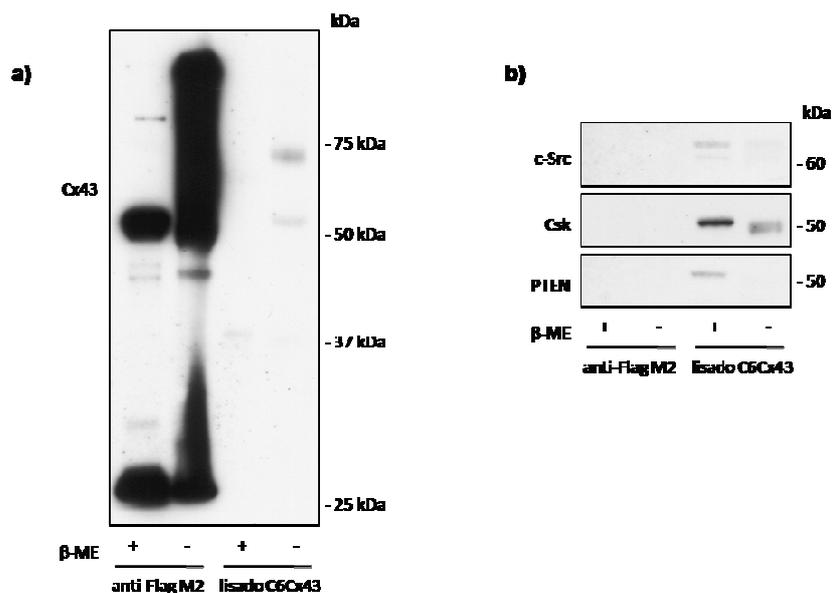


Figura 20. Puesta a punto de la co-inmunoprecipitación con la etiqueta Flag

Para determinar si el agente reductor presente en el tampón de elución separa las inmunoglobulinas del anticuerpo contra Flag de las microcuentas de agarosa al que se encuentra unido, se hirvieron muestras de la matriz anti-Flag o muestras de lisados de células C6Cx43 con tampón de elución con y sin beta-mercaptoetanol (β -ME). Se realizó un análisis tipo Western blot y las membranas se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios de distintas especies. **(a)** La membrana se incubó con un anticuerpo primario de ratón contra Cx43 y un anticuerpo secundario de cabra contra ratón. **(b)** Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios de conejo contra Csk, c-Src y PTEN y anticuerpos secundarios de cabra contra conejo.

Así, llegamos a la conclusión de que el procedimiento de elución separaba los anticuerpos anti-Flag de la agarosa, independientemente de la presencia de β -ME. También observamos que el β -ME es necesario para la correcta elución de los complejos proteicos y la separación de las proteínas que los componen, ya que los monómeros de Cx43 se unen entre sí por puentes disulfuro. Por último, comprobamos que los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de ratón detectan las inmunoglobulinas del anticuerpo contra Flag que se desprenden de la agarosa, pero no así los anticuerpos contra inmunoglobulinas de conejo, lo que era de esperar, considerando que este anticuerpo está generado en ratón. Así, decidimos utilizar un tampón de elución reductor para los siguientes experimentos y evitar la señal de las inmunoglobulinas

utilizando anticuerpos primarios generados en conejo y/o proteína A-HRP, como se explicó anteriormente en la puesta a punto de la co-inmunoprecipitación con HA.

Una vez puesta a punto la técnica, llevamos a cabo co-inmunoprecipitaciones de Flag, transfectando células C6-Cx43 con los plásmidos Flag, Flag-PTENwt y Flag-PTENdPDZ (**Esquema 18 a**). Como se puede observar, al arrastrar Flag, tanto en el caso de Flag-PTENwt como de Flag-PTENdPDZ, pero no en el del vector vacío, pudimos recuperar un inmunocomplejo en el que estaban presentes Flag-PTEN, Cx43 y c-Src (**figura 21**).

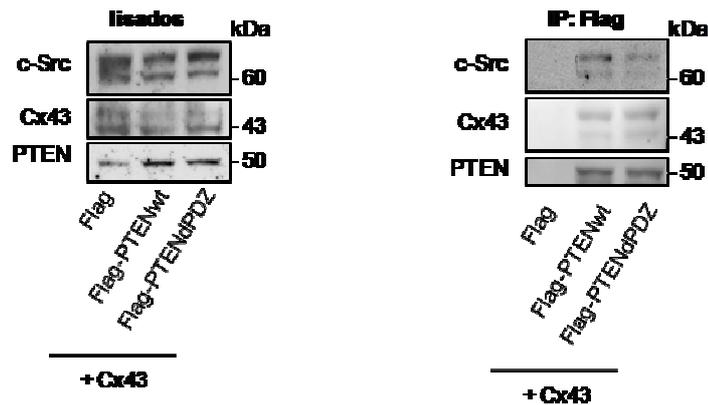


Figura 21. Implicación del motivo de unión a PDZ de PTEN en la interacción con la Cx43 en células de glioma C6.

Las células de glioma C6 en confluencia fueron co-transfectadas con el vector que contiene la Cx43 y con uno de los tres plásmidos siguientes: Flag vacío, Flag-PTENwt o Flag-PTENdPDZ (PTEN con el motivo de unión a PDZ deleciónado). Las células se lisaron a las 24 horas post-transfección y se procedió a la co-inmunoprecipitación con una matriz anti-Flag. Se muestra el Western blot de Flag, Cx43 y c-Src total en los lisados totales y en las co-inmunoprecipitaciones.

De nuevo quisimos comprobar si en células no tumorales se observaban los mismos resultados, por lo que repetimos este experimento en astrocitos en cultivo primario, que expresan Cx43 de forma fisiológica. Como se muestra en la **figura 22**, al igual que ocurría en las células C6-Cx43, al inmunoprecipitar Flag obteníamos un complejo en el que se encontraban Flag-PTEN, Cx43, c-Src y, además, Csk, independientemente de que la proteína de fusión Flag-PTEN conservara su motivo de unión a PDZ o no.

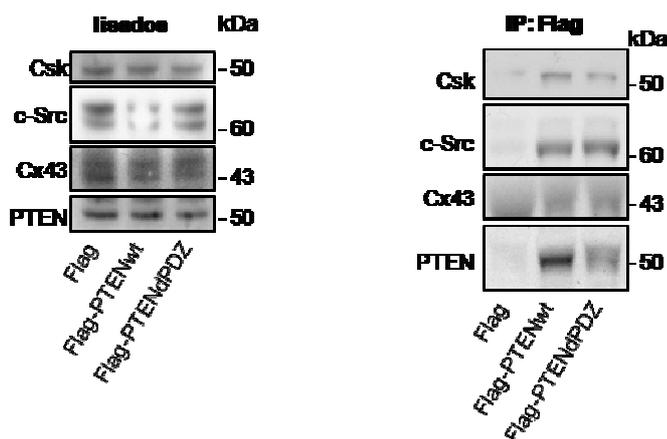


Figura 22. Implicación del motivo de unión a PDZ de PTEN en la interacción con la Cx43 en astrocitos.

Los astrocitos en cultivo primario fueron transfectados con uno de los tres plásmidos siguientes: Flag vacío, Flag-PTENwt o Flag-PTENdPDZ. Las células se lisaron a las 24 horas post-transfección y se procedió a la co-inmunoprecipitación con una matriz anti-Flag. Western blot de PTEN, Cx43, c-Src y Csk en los lisados totales y en las co-inmunoprecipitaciones.

4.3.6. Implicación de la región de la Cx43 que interacciona con c-Src en la interacción entre Cx43, PTEN, Csk y c-Src.

Una vez descartada la participación de los motivos de unión a PDZ en la interacción entre la Cx43 y PTEN, decidimos estudiar si la región de la Cx43 que interacciona con c-Src también interacciona con PTEN y Csk.

Para ello, se seleccionaron las siguientes regiones de la Cx43 implicadas en la interacción con c-Src, algunas de ellas ya empleadas previamente en el laboratorio, con capacidad de inhibir la actividad de c-Src (Gangoso et al., 2014).

Todos los péptidos utilizados se fusionaron a la secuencia penetrante TAT en su extremo amino, lo que les permite introducirse en las células (Gump and Dowdy, 2007). Además, se fusionaron a biotina en su extremo carboxilo, para favorecer su purificación e identificación (**figura 23 a**). Estos péptidos fueron:

- TAT-B: secuencia responsable de que el péptido penetre en la célula, que, por tanto, se empleó como control.
- TAT-245-283-B: secuencia que contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src junto con las dos tirosinas que son fosforiladas por c-Src.
- TAT-266-283-B: secuencia que contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src y los siete aminoácidos anteriores, pero no las tirosinas fosforilables por c-Src.

- TAT-274-283-B: secuencia que contiene exclusivamente el dominio de unión a SH3 de c-Src.
- TAT-372-382-B: secuencia que contiene el motivo de unión a PDZ.

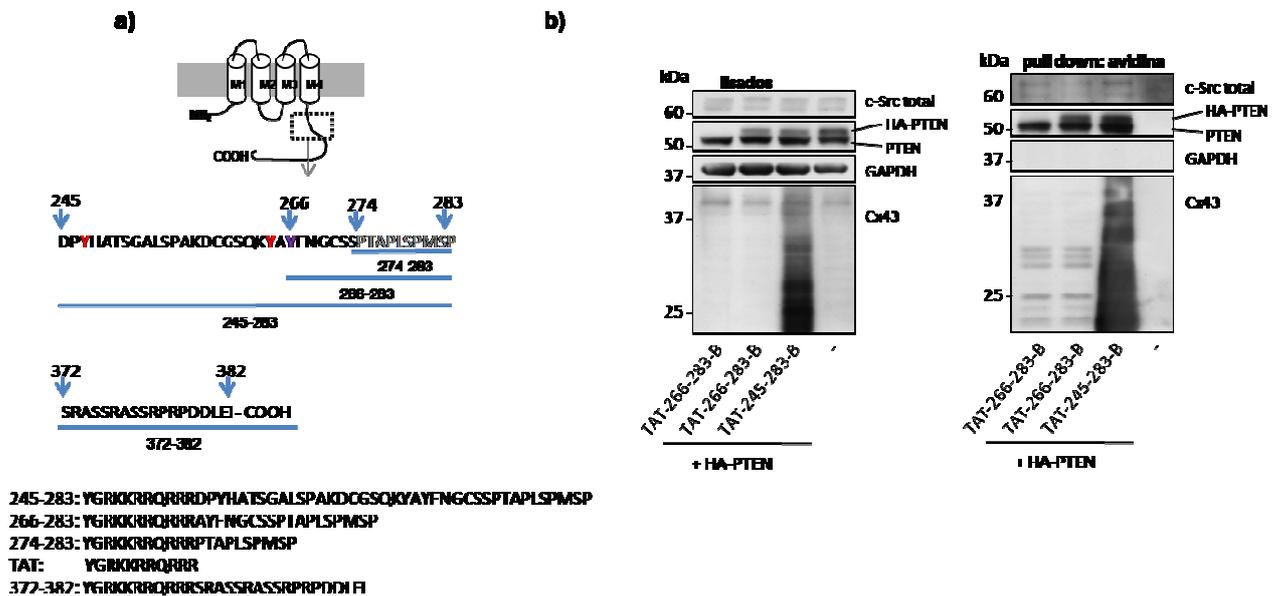


Figura 23. Puesta a punto del pull-down de los péptidos biotinilados con avidina-agarosa.

Para la puesta a punto, se probaron los péptidos correspondientes a las secuencias 245-283 y 266-283 (**a**); en rojo se muestran las tirosinas que son fosforiladas por c-Src, en morado la tirosina contenida en el péptido 266-283 y en gris el dominio de unión a SH3). Las células C6 se sembraron y, una vez que llegaron a la confluencia, se transfectaron con HA-PTEN o se trataron únicamente con lipofectamina (control). A las 24 horas post-transfección, las células se incubaron con los péptidos penetrantes conjugados con biotina, a una concentración de 50 μ M durante 30 minutos. Tras sucesivos lavados, las células se lisaron, se tomaron muestras de los lisados totales y con el resto de los lisados se llevó a cabo el *pull-down* con la matriz avidina-agarosa. Una vez eluidos los complejos proteicos, se analizó el resultado mediante Western blot (**b**). Se muestran los Western blot de PTEN, Cx43, c-Src y GAPDH (control negativo) en los lisados totales y en el *pull-down*.

En primer lugar, se puso a punto la técnica del *pull-down* de los péptidos biotinilados con avidina-agarosa. Esta técnica es similar a la de la co-inmunoprecipitación, con la diferencia de que, en este caso, se basa en la afinidad de la avidina por la biotina. Las células C6 se sembraron y, una vez que llegaron a la confluencia, se transfectaron con HA-PTEN o se añadió únicamente lipofectamina (control). A las 24 horas post-transfección, las células se incubaron con dos de los péptidos (TAT-266-283-B o TAT-245-283-B), a una concentración de 50 μ M durante 30 minutos, se lisaron, se tomaron muestras de los lisados totales y con el resto de los lisados se llevó a cabo el *pull-down* con una matriz avidina-agarosa, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. El tiempo de incubación se escogió gracias a observaciones previas del laboratorio de que estos péptidos se internalizan a tiempos tan cortos como 10 minutos de incubación. Una vez eluidos los complejos proteicos, se analizó el resultado mediante Western blot, el cual se muestra en la **figura 23 b**. Se puede observar que en el *pull-down* del carril control (células sin tratamiento de péptido y transfectadas con HA-PTEN) no fue posible aislar ningún complejo proteico, lo que demuestra la fiabilidad de dicho control. En el blot de PTEN, tanto en lisados como en las muestras de *pull-down*, pueden verse dos bandas: una superior, correspondiente a HA-PTEN, en

Resultados

las células transfectadas, y una inferior, correspondiente a la PTEN endógena de estas células. Es decir, los péptidos interactuaban tanto con la PTEN endógena como con HA-PTEN, por lo que dedujimos que no era necesario transfectar las células C6 para detectar la interacción de los péptidos miméticos de la Cx43 con PTEN, a pesar de los bajos niveles endógenos de PTEN que presentan estas células. Este efecto se puede explicar por la alta afinidad de la avidina por la biotina, con el consiguiente incremento de la sensibilidad de la técnica. Por otra parte, se puede observar que, como era de esperar, el anticuerpo contra la Cx43 sólo detectaba el péptido TAT-245-283-B, ya que es el único que contiene la secuencia antigénica descrita por la casa comercial; por ello decidimos utilizar estreptavidina conjugada con HRP para revelar la señal de los péptidos biotinilados. Por último, se incubaron las membranas con un anticuerpo contra GAPDH como control negativo adicional del *pull-down*. Como se puede observar, la señal de GAPDH sólo apareció en los lisados, lo que confirma la especificidad del método.

Tras estas pruebas, decidimos no transfectar las células de glioma C6 con HA-PTEN para los siguientes experimentos. El *pull-down* de todos los péptidos se muestra en la **figura 24**. Como se puede ver, en el pull-down de las muestras incubadas con el péptido TAT (control) no había señal para ninguna de las proteínas del complejo. En cambio, tanto el péptido 245-283 (con las dos tirosinas que son fosforiladas por c-Src) como el 266-283 (que no contiene estas tirosinas pero interactúa con Src), eran capaces de unirse a PTEN, c-Src y Csk. Por otra parte, en el caso de los péptidos 274-283 (correspondiente al dominio de unión a SH3) y 372-382 (motivo de unión a PDZ), prácticamente no se apreciaban las bandas de PTEN, c-Src y Csk.

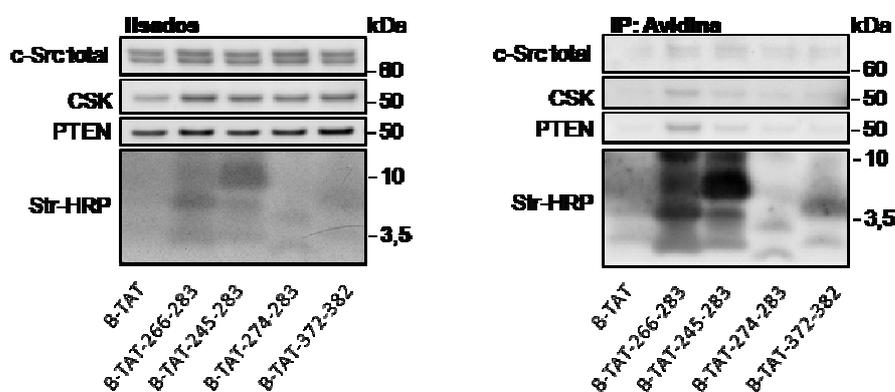


Figura 24. Estudio de la región de Cx43 implicada en la interacción entre PTEN, Cx43, c-Src, y Csk en células de glioma C6.

Las células de glioma C6 en confluencia fueron incubadas con los péptidos indicados, a una concentración de 50 μ M durante 30 minutos, tras lo que fueron lisadas. A continuación se llevó a cabo el pull-down de los péptidos biotinilados utilizando cuentas de agarosa conjugadas con avidina, tal y como se describe en Métodos. Se muestran los Western blot de los péptidos (detectados con estreptavidina-HRP, Str-HRP), PTEN, Csk, c-Src total y c-Src Y416.

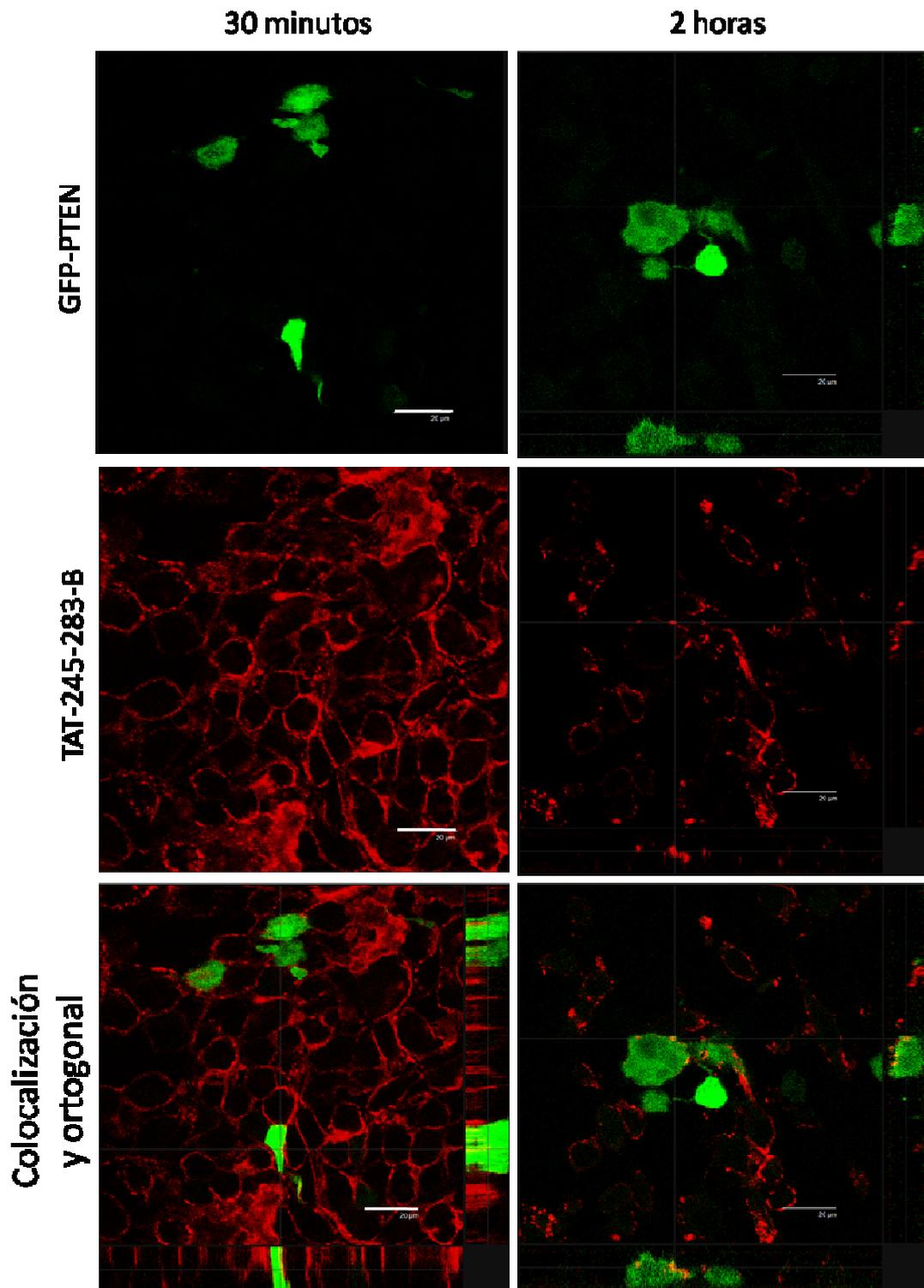


Figura 25. Colocalización de GFP-PTEN y el péptido TAT-245-283-B en células de glioma C6

Las células fueron transfectadas con GFP-PTEN y a las 24 horas post-transfección se comprobó la expresión de esta proteína por epifluorescencia. A continuación las células fueron incubadas con el péptido TAT-245-283-B, durante 30 minutos o 2 horas, tras lo que se procedió a fijarlas y a realizar una tinción contra biotina utilizando avidina conjugada con Cy5. Tras el montaje de las placas, se tomaron series de fotografías en el eje Z con un microscopio confocal. La colocalización entre GFP-PTEN y el péptido se observa en amarillo. Se muestran las proyecciones ortogonales a lo largo del eje Z de las series de fotografías. Barras de escala: 20 µm.

Resultados

Por último, nos propusimos investigar la colocalización de PTEN con el péptido TAT-245-283-B. Para ello, transfectamos células C6 con GFP-PTEN y, a las 24 horas post-transfección, las incubamos con dicho péptido durante 30 minutos o 2 horas. A estos tiempos, las células se fijaron y se les realizaron tinciones inmunocitoquímicas contra la biotina presente en los péptidos, con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy5. En la **figura 25** se puede observar que, a los 30 minutos de comenzar el tratamiento, la cantidad de péptido que había penetrado en las células era máxima y que éste colocalizaba con GFP-PTEN (colocalización en amarillo). A las dos horas, aunque los niveles de péptido disminuían, seguía observándose colocalización del péptido TAT-245-283-B y GFP-PTEN. En todos los casos, gracias a la proyección ortogonal es posible observar que la colocalización del péptido y GFP-PTEN se mantenía a lo largo del eje Z.

5. Discusión

Los gliomas son los tumores cerebrales más frecuentes y presentan, en general, muy mal pronóstico. 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.

Una de las características de los gliomas es la alta actividad de la tirosina kinasa c-Src (Du et al., 2009), una enzima clave en la regulación del crecimiento y la proliferación celular, y una baja expresión de la conexina-43 (Cx43). La Cx43 pertenece a la familia de las conexinas, las proteínas que forman las uniones comunicantes entre las células (Beyer et al., 1987; Zimmer et al., 1987). En concreto, la Cx43 es la isoforma más expresada en astrocitos (Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991). La Cx43 se considera una proteína supresora de tumores porque la restauración de este gen en las células tumorales y, con ello, el restablecimiento de la comunicación intercelular, trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Zhu et al., 1991; Hirschi et al., 1996; Huang et al., 1998; Naus, 2002). En trabajos previos de nuestro grupo se puso de relieve que la restauración de la Cx43 en células de glioma de rata C6 inhibe la actividad oncogénica de c-Src, lo que resulta el bloqueo del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular a través del aumento de la expresión de p27 y p21 (Herrero-Gonzalez et al., 2010). Por ello, en este trabajo nos propusimos profundizar en el mecanismo molecular responsable de la inhibición de c-Src por la Cx43. Estudios previos de otros grupos mostraron que la actividad de c-Src se regula mediante fosforilación por la enzima C-terminal Src kinase (Csk) (Nada et al., 1991; Okada et al., 1991) y desfosforilación por proteínas tirosina fosfatasas, como PTEN (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011). Por esta razón, pensamos que la Cx43 podría regular la actividad de c-Src a través de la regulación de estas enzimas.

5.1. Papel de Csk en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6

Como se ha explicado en la Introducción, la enzima Csk (*C-terminal Src kinase*) se ha descrito como la responsable de fosforilar la tirosina 527 de c-Src (Okada y Nakagawa, 1989; Nada et al., 1991; Okada et al., 1991), lo que contribuye a su inactivación (Kmieciak y Shalloway, 1987; Kmieciak et al., 1988), ya que estabiliza la molécula en su conformación inactiva (Liu et al., 1993; Moarefi et al., 1997; Sicheri y Kuriyan, 1997). Por tanto, en este trabajo nos propusimos investigar la posible participación de Csk en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src ejercida por la Cx43.

Para ello, utilizamos un modelo de pérdida de función de Csk en células de glioma C6 mediante la tecnología del siRNA y estudiamos el efecto de la Cx43 sobre la proliferación en estas circunstancias (**figura 2**).

Nuestros resultados muestran que, cuando se silencia la expresión de Csk, se produce un incremento en la velocidad de proliferación de las células de glioma, indicando la importancia de esta enzima en los procesos tumorales (Masaki et al., 1999)(Oneyama et al., 2008). Además, el efecto antiproliferativo de la Cx43 se ve muy reducido, es decir, que la restauración de la expresión de Cx43 en células de glioma no es suficiente para disminuir la proliferación si estas células no expresan Csk.

Analizando esta información, podemos proponer que el inhibidor de c-Src, Csk, participa en la inhibición de la proliferación que lleva a cabo la Cx43 en células de glioma. Cabe recordar que Csk inactiva c-Src al fosforilar el residuo de tirosina 527. Por lo tanto, nuestros resultados explican el aumento de la forma inactiva de c-Src (Y527c-Src) que se observa al restaurar la expresión de Cx43 en células de glioma (Herrero-Gonzalez et al., 2010).

5.2. Papel de PTEN en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src promovida por la Cx43 en células de glioma de rata C6

Además de la fosforilación de la tirosina 527, la completa inhibición de la actividad de c-Src requiere la retirada del grupo fosfato de su tirosina Y426 por una tirosina fosfatasa (Smart et al., 1981), lo que provoca un cambio de conformación de forma que el sitio catalítico de c-Src queda cerrado y no puede acceder a sus sustratos (Yamaguchi and Hendrickson, 1996). Una fosfatasa cuya capacidad para desfosforilar la tirosina Y426 de c-Src se ha descrito recientemente es la fosfatasa de especificidad dual PTEN (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011). Esta enzima es uno de los supresores tumorales más conocidos (Di Cristofano et al., 1998; Suzuki et al., 1998), ya que se han encontrado mutaciones para el gen Pten en gran cantidad de tumores (Steck et al., 1997), como el cáncer de próstata (Di Cristofano et al., 2001), de mama (Li et al., 1997) y en gliomas (Bigner et al., 1984), siendo una de las proteínas más frecuentemente alteradas en los gliomas (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011). Así, PTEN es una buena candidata para ser la fosfatasa que utiliza la Cx43 para inactivar a c-Src y, por ello, en este trabajo decidimos estudiar su posible implicación en la inhibición de la actividad oncogénica de c-Src ejercida por la Cx43.

Con este fin, decidimos estudiar la pérdida de función de PTEN en células de glioma C6 utilizando siRNA. En primer lugar, estudiamos el efecto del silenciamiento de PTEN sobre la actividad de c-Src (**figura 4**).

Nuestros resultados muestran que la pérdida de función de PTEN se acompaña de un aumento en la actividad de c-Src (Y416 c-Src) en las células de glioma. Además, la inhibición que ejerce la Cx43 sobre c-Src Y416 en estas células se pierde cuando se silencia la expresión de PTEN. Es decir, la presencia de PTEN en la célula es necesaria para el efecto inhibidor de la Cx43 sobre la actividad oncogénica de c-Src. Esto indica que PTEN es la enzima que desfosforila la tirosina 416 de c-Src tras la restauración de la expresión de la Cx43.

Además, estudiamos el efecto de la pérdida de función de PTEN en la proliferación de las células de glioma (**figura 5**). Pudimos observar que, cuando se silencia la expresión de PTEN, la

velocidad de proliferación aumenta, independientemente de que se hubiera restaurado la Cx43 en estas células y, de hecho, las células que expresaban Cx43 crecían a un ritmo similar a las que no la expresaban. Esto indica, por una parte, que PTEN es un importante regulador de la proliferación de las células de glioma y, por otro, que PTEN está implicada en el efecto antiproliferativo de la Cx43, ya que, en ausencia de PTEN, se reduce el efecto de la Cx43 sobre la velocidad del ciclo celular.

Contando, además, con el efecto del silenciamiento de PTEN sobre c-Src, se puede proponer que PTEN toma parte en el efecto antiproliferativo de la Cx43 mediante la desfosforilación de la tirosina 416 de c-Src.

Sin embargo, tanto en estos experimentos como en los de silenciamiento de Csk, se observa una diferencia entre la velocidad de proliferación de las células que expresan Cx43 y las que no la expresan en ausencia de expresión de una de estas dos enzimas. Es decir, cuando silenciamos la expresión de Csk o la de PTEN por separado, las células que expresan Cx43 proliferan de una manera más parecida a las células que no la expresan, pero no llegan al mismo nivel de proliferación que éstas. Nos planteamos que esto podría deberse a que en las células sólo estábamos silenciando la expresión de una de las enzimas, con lo que la que no se encontraba silenciada podría contribuir, en su propia medida, a la inhibición de c-Src. Por ello, hipotetizamos que, si cosilenciáramos la expresión de Csk y PTEN, esta diferencia de proliferación disminuiría más aún.

Al estudiar el efecto de la pérdida simultánea de función de Csk y PTEN (**figura 6**) se observó que la pérdida de expresión de ambas enzimas contrarresta el efecto inhibitorio de la Cx43 sobre la proliferación celular. Es decir, la Cx43 pierde prácticamente la totalidad de su capacidad de regular la proliferación de las células de glioma C6 si en estas células no hay expresión de PTEN ni de Csk. Además, cuando se co-silencian Csk y PTEN, las células de glioma presentan una proliferación muy superior a la situación control, corroborando el papel de estas proteínas como supresores tumorales (Masaki et al., 1999; Oneyama et al., 2008; Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011).

En conclusión, la pérdida simultánea de PTEN y Csk es suficiente para que la Cx43 pierda su capacidad de inhibir la proliferación en estas células.

5.3. Efecto de la restauración de la expresión de Cx43 en la expresión y funcionalidad de PTEN

Cuando se realizó el estudio de pérdida de función de PTEN en células de glioma, observamos que la restauración de la Cx43 en las células de glioma aumentaba los niveles de expresión de PTEN. Dada la relevancia de PTEN en células de glioma (Dey et al., 2008; Zhang et al., 2011), decidimos analizar este efecto detenidamente (**figura 7**). Nuestros resultados confirmaron mayor expresión de PTEN en las células transfectadas con Cx43 que en las células transfectadas con el vector vacío. Además, como era de esperar, la restauración de la Cx43 y, con ello, el aumento de PTEN, estaban acompañadas de una disminución de la actividad de c-Src.

Discusión

En un cultivo de células de glioma, estas células se encuentran en momentos distintos del ciclo celular; por ello, para comprobar que el efecto sobre la expresión de PTEN no era consecuencia de la fase del ciclo celular en la que se encontraran las células, se procedió a sincronizar los ciclos celulares y a evaluar la expresión de PTEN a lo largo del ciclo en células de glioma que expresaban y que no expresaban Cx43 (**figura 8**). Así, pudimos comprobar que los niveles de PTEN eran más altos en las células con la Cx43 restaurada, en todos los momentos del ciclo. Además, los resultados sobre las fluctuaciones de PTEN que se dan durante el ciclo celular fueron muy interesantes.

En primer lugar, se observaba que, en el comienzo del ciclo, en la fase G0/G1, en las células que expresaban Cx43 los niveles de PTEN eran mucho más altos, para luego ir disminuyendo progresivamente durante las primeras ocho horas del ciclo, tras las cuales vuelven a aumentar. Es interesante destacar que, en trabajos previos de nuestro grupo, se encontró que en las células de glioma C6, el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S se da a las 10 horas del ciclo (Herrero-Gonzalez et al., 2010), lo que hemos observado que coincide con una disminución de los niveles de PTEN en estas células. Sin embargo, en las células que expresan Cx43, en este mismo momento se produce un pico de expresión de PTEN.

Precisamente, como se ha mostrado en trabajos anteriores del laboratorio, la Cx43 produce un bloqueo del paso de la fase G0/G1 a S a través de la regulación de la expresión de varios genes implicados en el control del ciclo celular, como p21 y p27, dos inhibidores de kinasas dependientes de ciclina (CKI). De hecho, la expresión de Cx43 alcanza un pico precisamente a 10 horas del ciclo en las células en las que se restaura, seguido por un pico de permeabilidad, la cual desciende en ese momento en las células de glioma C6 (Herrero-Gonzalez et al., 2010). En estos trabajos, también se vio que la actividad de c-Src aumenta en este mismo momento en las células C6 y que, sin embargo, en las células que expresaban Cx43 esta actividad disminuye a las 10 horas del ciclo (Herrero-Gonzalez et al., 2010).

Es decir, que en las células de glioma C6 se produce simultáneamente una disminución de la expresión de Cx43 y PTEN y de la permeabilidad celular junto a un aumento de actividad de c-Src, todo a las 10 horas del ciclo celular, lo que coincide con el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S en estas células. Al restaurar la expresión de Cx43, este efecto se invierte y, a las 10 horas del ciclo, se observa un aumento de la expresión de Cx43 y de PTEN y de la permeabilidad, junto con una disminución de la actividad de c-Src y un retraso en la entrada en la fase S del ciclo.

Esto nos lleva a pensar que, en las células de glioma, los niveles de Cx43 son demasiado bajos como para poder aumentar la expresión de PTEN y, por tanto, la actividad de c-Src no puede ser regulada correctamente. En relación a ello, y de acuerdo a los resultados previamente obtenidos en el laboratorio (Herrero-Gonzalez et al., 2010), los niveles de c-Src aumentan, ya que éste puede activarse por autofosforilación en la tirosina 416 (Smart et al., 1981). Esta hiperactivación de c-Src produce el paso prematuro de la fase G0/G1 a la fase S mediante la inhibición de la expresión de p21 y p27 (Chu et al., 2007; Grimmler et al., 2007), al mismo tiempo que produce el cierre de las uniones comunicantes y con ello la degradación de la Cx43 (Swenson et al., 1990; Giepmans et al., 2001a; Lin et al., 2001; Solan and Lampe, 2014), resultando en una disminución indirecta de los niveles de PTEN. Además, c-Src puede fosforilar directamente a PTEN

en su extremo carboxilo terminal, provocando su inactivación (Georgescu et al., 1999; Vazquez et al., 2000; Downes et al., 2007; Ross and Gericke, 2009). Todo esto llevaría a la generación de un bucle de inhibición de la expresión de Cx43 y PTEN por parte de c-Src y, con ello, al aumento de la velocidad de proliferación de estas células.

Cuando se restaura la expresión de Cx43 en células de glioma, aumentan los niveles de PTEN, que puede regular la actividad de c-Src; así, PTEN podría controlar la activación excesiva de c-Src y así inhibir el paso de la fase G0/G1 a la S. A este respecto, la caída en la actividad de c-Src que se observa en las células que expresan Cx43 podría deberse al aumento de expresión de PTEN, ya que la disminución de la actividad de c-Src se produce justo tras el pico de PTEN.

Así, en las células de glioma, la pérdida de mecanismos para inhibir la actividad de c-Src resulta en un bucle de hiperactivación de c-Src y una regulación negativa de Cx43 y PTEN, lo que desemboca en la progresión descontrolada del ciclo celular, mientras que, en las células con la Cx43 restaurada, ésta aumenta la expresión de PTEN, que podría, por su parte, impedir la hiperactivación de c-Src y, por tanto, retrasar la entrada en la fase S del ciclo, reduciendo así la proliferación celular.

La actividad más conocida de PTEN es su capacidad de desfosforilar lípidos (Maehama and Dixon, 1998) y su función supresora de tumores mediante la inhibición de la cascada PI3K/Akt. Así, se ha descrito que la capacidad de PTEN de suprimir el crecimiento se debe a que promueve la parada del ciclo celular a través de la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt (Stambolic et al., 1998; Chalhoub and Baker, 2009). Es interesante que este proceso se asocia con un aumento de la expresión de p21 y p27 y con la disminución de la expresión de ciclinas D y A y la menor activación de la quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2). (Cheney et al., 1999; Paramio et al., 1999; Wu, R.C. et al., 2000; Weng et al., 2001b; Gottschalk et al., 2001). Además, se ha descrito que algunos miembros de la familia Src pueden alterar la capacidad de PTEN para antagonizar la vía PI3K/Akt (Lu et al., 2003).

Por ello, y teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que la Cx43 aumenta la expresión de PTEN, nos preguntamos si el aumento en la expresión de PTEN se acompañaba de una disminución de la actividad de Akt. Por ello, investigamos el efecto sobre esta vía de la restauración de la expresión de Cx43 silvestre y lo comparamos con el efecto de una Cx43 mutada en los sitios de interacción con c-Src, de forma que no es capaz de interactuar con c-Src ni de inhibir su actividad oncogénica (Lin et al., 2001; Herrero-Gonzalez et al., 2010) (**figura 10**).

En las células C6 encontramos una pequeña cantidad de PTEN, una gran actividad de c-Src, y una alta activación de Akt (medida como Akt fosforilada en la tirosina 308 y en la serina 473). En las células que expresaban la Cx43 silvestre, la actividad de c-Src era menor, como se había descrito previamente (Herrero-Gonzalez et al., 2010), la cantidad de PTEN mayor, y la cantidad de Akt activa mucho menor que en las células que no expresaban Cx43. En las células en las que se restauró la expresión de la Cx43 mutada, la cantidad de PTEN era baja, la actividad de c-Src alta y la de Akt igualmente elevada, de la misma forma que en las células que no expresaban Cx43.

Es decir, que el efecto que produjo la restauración de la Cx43 silvestre sobre los niveles de PTEN, la actividad de c-Src y la actividad de Akt no se observaba cuando la Cx43 que se restauraba

se encontraba mutada y no se producía la interacción de ésta con c-Src. Esto indica que la interacción entre c-Src y la Cx43, a través de los residuos de tirosina de la Cx43 que son fosforilados por c-Src, es necesaria para que la Cx43 ejerza su efecto positivo sobre la expresión de PTEN. Además, la mayor cantidad de PTEN que contienen estas células se refleja en una inhibición de la vía PI3K/Akt, lo que depende de la actividad sobre lípidos de PTEN, además de en su efecto inhibitor sobre la actividad de c-Src.

Estos resultados sugieren que parte del efecto inhibitor de la Cx43 sobre la proliferación de las células C6 podría deberse a la actividad de PTEN sobre la ruta PI3K/Akt, lo que concuerda con resultados de estudios anteriores (Cheney et al., 1999; Paramio et al., 1999; Gottschalk et al., 2001; Weng et al., 2001b).

5.4. Interacción entre la Cx43, PTEN, Csk y c-Src.

Tras comprobar que Csk y PTEN participan en el mecanismo de inhibición de la actividad oncogénica de c-Src por la Cx43, quisimos comprobar que estas proteínas interactúan con la Cx43. En trabajos previos (Herrero-Gonzalez et al., 2010; Lin et al., 2001) se comprobó la interacción entre la Cx43 y c-Src; por tanto, nos planteamos que la Cx43, al interactuar con c-Src, podría producir el reclutamiento de Csk y PTEN para inhibir su actividad, en lo que sería un bucle de regulación negativa.

Nuestros estudios de microscopía confocal (**figuras 12 y 14**) mostraron que, cuando se expresa ectópicamente la Cx43 en células de glioma, ésta interactúa con Csk y con PTEN. Asimismo pudimos confirmar, mediante co-inmunoprecipitación, que estas proteínas interactúan entre ellas y con c-Src en células de glioma C6 (**figura 16**). Esto nos lleva a pensar que se forma un complejo entre Cx43, c-Src, PTEN y Csk. Además, el hecho de que estas proteínas apenas aparezcan unidas en las células C6 libres sugiere que la Cx43 recluta a dichas proteínas para la formación del complejo.

De igual manera hemos comprobado que esta interacción se da también en condiciones fisiológicas utilizando astrocitos en cultivo primario, que expresan altos niveles de estas proteínas de forma natural. Así, pudimos encontrar colocalización de la Cx43 con Csk y con PTEN (**figura 19**). Además, realizando co-inmunoprecipitación de la Cx43 endógena, encontramos PTEN y c-Src en el inmunocomplejo y, recíprocamente, precipitando la Csk endógena, obtuvimos un complejo de Cx43 y c-Src. Estos resultados son de gran relevancia, ya que quieren decir que PTEN y Csk interactúan con la Cx43 y con c-Src cuando todas estas proteínas se expresan de forma endógena en la célula.

Así, podemos proponer que la Cx43 es capaz de reclutar e interactuar con Csk y PTEN.

La función de esta interacción podría ser la de terminar con la actividad de c-Src y regular de esta forma la activación transitoria del mismo. Es bien conocido que c-Src activo se une a la Cx43, regulando la permeabilidad de las uniones comunicantes (Crow et al., 1990; Giepmans et al., 2001a; Kurata and Lau, 1994; Lin et al., 2001; Swenson et al., 1990) y promoviendo la internalización de los conexones para su posterior degradación (Solan and Lampe, 2014).

Obviamente, este efecto ha de tener una duración controlada. Para ello, se ha descrito que la fosfatasa TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*), o PTPN2, se une a la Cx43, desfosforilando las tirosinas 245 y 267 (Li et al., 2014). Nuestros resultados indican que PTEN y Csk se unirían al complejo y se encargarían de inhibir la actividad de c-Src para evitar que continuara fosforilando a la Cx43.

5.5. Estudio de los dominios de PTEN implicados en su interacción con la Cx43

Tras comprobar la interacción entre estas proteínas, decidimos profundizar en el estudio de los dominios importantes para dicha interacción. En el extremo carboxilo terminal, PTEN y la Cx43 tienen un motivo de unión a PDZ (Andres-Pons et al., 2005), que se unen a dominios PDZ, los cuales son muy abundantes en gran cantidad de proteínas y, especialmente, en proteínas de andamiaje (Kennedy, 1995; Lee and Zheng, 2010). Así, PTEN puede interaccionar con el dominio PDZ presente en varias proteínas a través de su motivo de unión a PDZ y, de hecho, estas interacciones afectan a la estabilidad y la fosforilación de PTEN (Valiente et al., 2005). Por su parte, la Cx43, a través de su motivo de unión a PDZ, interacciona con proteínas de andamiaje como ZO-1 (Giepmans and Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998), la cual tiene varios dominios de unión a PDZ (González-Mariscal et al., 2000).

Así, nuestra hipótesis era que PTEN y la Cx43 podrían interaccionar a través de alguna de estas proteínas (ver **esquema 18**), por ejemplo, ZO-1, con uno de cuyos dominios PDZ puede unirse la Cx43 (Sorgen et al. 2004; Chen et al., 2008), o la tirosina fosfatasa PTPN13, que se ha descrito que interacciona con PTEN a través de su dominio PDZ (Sotelo et al., 2015).

Para investigar el posible papel del motivo de unión a PDZ de PTEN, se expresaron, en células de glioma C6 y en astrocitos, dos proteínas de fusión Flag-PTEN: Flag-PTEN silvestre y Flag-PTEN con el motivo de unión a PDZ delecionado (**figuras 21 y 22**). Los resultados mostraron que PTEN seguía interaccionando con la Cx43 pese a tener delecionado el motivo de unión a PDZ, es decir, que dicho motivo no es imprescindible para la interacción entre la Cx43 y PTEN.

A este respecto, Valiente y col. han descrito que, cuando se deleciona el motivo de unión a PDZ de PTEN, aparece otro motivo (los tres aminoácidos siguientes) que también puede unirse a PDZ (Valiente et al, 2005). Por eso, no podemos descartar que nuestros resultados puedan deberse a este efecto. En todo caso, Georgescu y col. describieron cómo la expresión de PTEN mutada en el extremo carboxilo terminal era incapaz de producir la supresión del crecimiento que sí ejercía PTEN silvestre; sin embargo, encontraron que el dominio de unión a PDZ no era indispensable para la función supresora de tumores de PTEN (Georgescu et al., 1999).

Por tanto, decidimos explorar otras regiones implicadas en la interacción de la Cx43 con PTEN.

5.6. Estudio de las regiones de la Cx43 implicadas en su interacción con PTEN

Ante la posibilidad de que sean otros los dominios que median la interacción entre PTEN y la Cx43, nos planteamos estudiar la participación de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, *intrinsically disordered regions*) de PTEN (Malaney et al., 2013) en su interacción con la Cx43. Estas regiones carecen de estructura secundaria, son flexibles, se modifican por fosforilación y participan activamente en la interacción de proteínas, por lo que facilitan interacciones más rápidas, reversibles y dinámicas, como las que se dan en las zonas de señalización del citoplasma próximas a la membrana plasmática (Dunker et al., 2001; Romero et al., 2004; Romero et al., 1998; Romero et al., 2001). La Cx43 también presenta estas regiones IDR, una de las cuales incluye el sitio de interacción con c-Src (Gangoso et al., 2014).

En trabajos previos del laboratorio, se desarrollaron y patentaron una serie de péptidos penetrantes basados en la secuencia de la Cx43 (Gangoso et al., 2014). Dos de estos contienen una IDR de la Cx43; por tanto, decidimos utilizar estos péptidos para averiguar si dicha región está implicada en la interacción entre Cx43, c-Src, PTEN y Csk (**figura 24**).

Las regiones estudiadas fueron:

- 245-283: secuencia que contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src junto con las dos tirosinas que son fosforiladas por c-Src.
- 266-283: secuencia que contiene el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src y los siete aminoácidos anteriores, pero no las tirosinas fosforilables por c-Src.
- 274-283: secuencia que contiene exclusivamente el dominio de unión a SH3 de c-Src.
- 372-382: secuencia que contiene el motivo de unión a PDZ.

Nuestros resultados muestran que los péptidos capaces de interactuar con PTEN, c-Src y Csk son el péptido 245-283 y el 266-283, es decir, que la región que media dicha interacción es la que se encuentra comprendida entre los aminoácidos 266 y 283 de la Cx43. Es interesante señalar que esta región no incluye las dos tirosinas de la Cx43 (247 y 265) que se ha descrito que son fosforiladas por c-Src (Giepmans et al., 2001; Lin et al., 2001); pero sí contiene otra tirosina, la número 267, que pensamos que podría ser importante para la interacción con c-Src, ya que el péptido 266-283 es capaz de unirse a c-Src.

Por otra parte, la región 274-283 (dominio de unión a SH3) parece interactuar ligeramente con PTEN, c-Src y Csk. El dominio de unión a SH3 de la Cx43 es una secuencia consenso rica en prolinas (Kanemitsu et al., 1997). Es interesante destacar que Spray y col. mostraron que, al unirse la Cx43 con c-Src por este dominio, se producen cambios conformacionales en la Cx43, los cuales afectan a varios aminoácidos hacia el extremo amino-terminal (Sorgen et al., 2004). Además, esta secuencia, al contener un dominio de unión a SH3,

podría actuar como un inhibidor competitivo de la actividad de c-Src, al unirse a su dominio SH3 e impedir así la unión a otros sustratos.

Finalmente, la secuencia 372-382 (motivo de unión a PDZ) no parece ser determinante para la interacción entre la Cx43, PTEN, c-Src y Csk. Este resultado concuerda con los de Georgescu y col. descritos más arriba, que describieron que la falta del dominio de unión a PDZ no afecta a la función supresora de tumores de PTEN (Georgescu et al., 1999).

Por todo esto, pensamos que es posible que la interacción entre la Cx43 y PTEN se dé a través de las regiones IDR y que los dominios de unión a SH3 y a PDZ sirvan para estabilizar dicha interacción.

En conjunto, los resultados presentados en esta Memoria nos permiten proponer un mecanismo por el cual la Cx43 puede inhibir la actividad oncogénica de c-Src en células de glioma C6. El mecanismo se resume en el **esquema 19** y sería el siguiente:

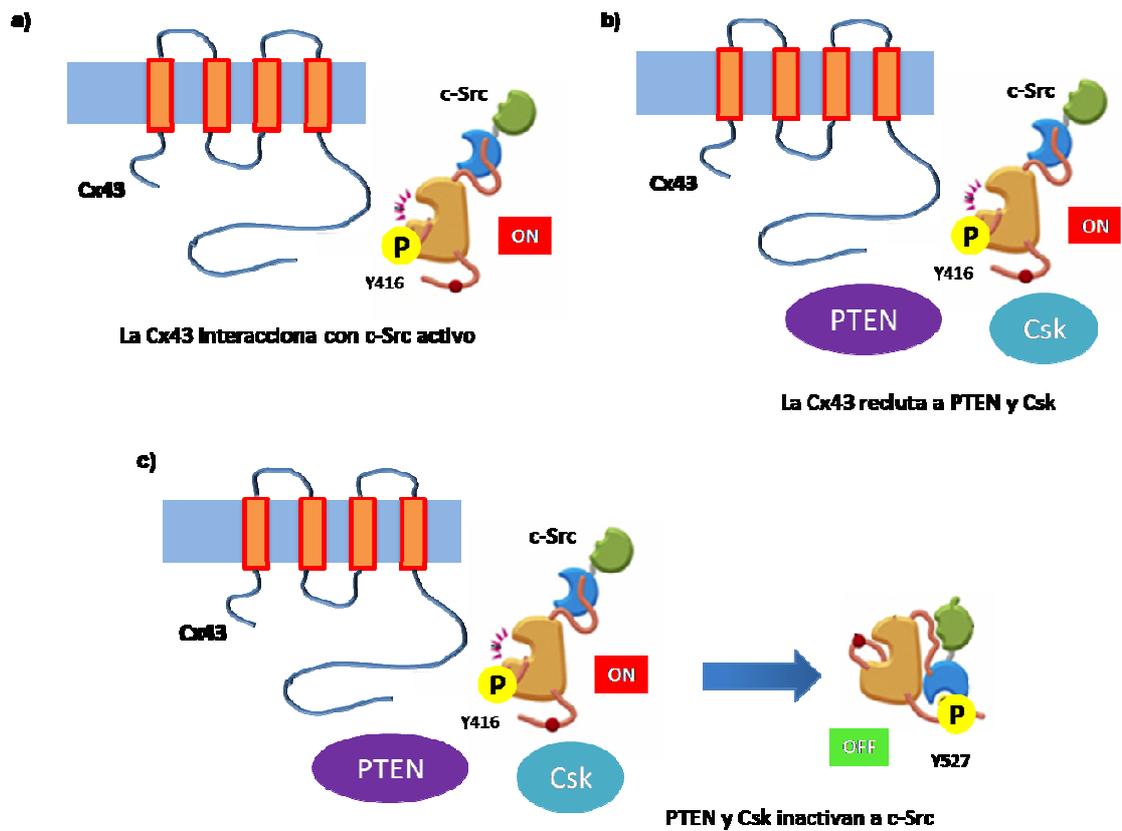
La forma activa de c-Src interacciona con la Cx43 y, a raíz de esta interacción, la Cx43 recluta a PTEN y a Csk a través de la región intrínsecamente desordenada 266-283. PTEN y Csk desfosforilan y fosforilan, respectivamente, a c-Src, cerrando la molécula en su conformación inactiva y, por tanto, inhibiendo su actividad. Esto produce una disminución de la velocidad del ciclo celular a través del aumento de la expresión de p21 y p27 y, con ello, una disminución de la proliferación.

Además, la conexina-43 aumenta la expresión de PTEN, con la consiguiente inhibición de la vía de Akt, lo que pensamos que contribuye a inhibir la proliferación y, además, podría ser un mecanismo para controlar la actividad de c-Src a largo plazo.

En resumen, la Cx43, al ser fosforilada por c-Src, generaría un bucle de retroalimentación negativa, a través del reclutamiento de Csk y PTEN, para finalizar la cascada de señalización de c-Src.

En los astrocitos sanos, ésta sería la situación normal; como en todas las vías de señalización por fosforilación, la presencia de fosfatasa es necesaria para terminar las cascadas de señalización iniciadas por kinasas. En este sentido, se han descrito muchas kinasas con capacidad de interactuar con la Cx43 (Reynhout et al., 1992; Warn-Cramer et al., 1996; Lin et al., 2001; Cooper and Lampe, 2000) pero, por el momento, sólo dos fosfatasa: TC-PTP (Li et al., 2014) y PTEN, en nuestro estudio. Es previsible que en el futuro cercano la lista de fosfatasa que interactúan con la Cx43 se incremente notablemente.

En las células de glioma, al perderse la expresión de Cx43, el mecanismo de terminación de la señalización está alterado y la actividad de c-Src, al liberarse de la inhibición, se encuentra descontrolada, produciendo su hiperactivación y su efecto oncogénico. Así, al restaurar la expresión de la Cx43 se produce una inhibición de la actividad de c-Src, que resulta en una disminución de la proliferación de las células de glioma (Herrero-Gonzalez et al., 2010).



Esquema 19. Propuesta de mecanismo molecular de inhibición de la actividad oncogénica de c-Src por la Cx43

Estos resultados tienen importantes implicaciones, ya que señalan nuevas dianas terapéuticas para combatir una enfermedad tan devastadora como son los gliomas. Además, el mecanismo descrito en esta Memoria explica resultados recientes del laboratorio, en los que se ha mostrado que, tanto la restauración de la Cx43 como el péptido penetrante basado en su secuencia 245-238, son capaces no sólo de inhibir la proliferación de las células de glioma (Herrero-González et al., 2010; Gangoso et al., 2014), sino de revertir el fenotipo de las células madre de glioma a través de la inhibición de la actividad de c-Src y sus efectos sobre Id1 y Sox2 (Gangoso et al., 2014). Las células madre del cáncer (*cancer stem cells*, CSC) son una subpoblación celular en los tumores, con características de células madre, y se caracterizan por su alto potencial oncogénico, su resistencia a los tratamientos convencionales, su capacidad de autorrenovación y su diferenciación en diferentes tipos celulares. Por ello, se piensa que estas células, al sobrevivir a los tratamientos, son las responsables de la regeneración de los tumores. 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) (Chen et al., 2012; Gilbertson and Graham 2012). Al conseguir revertir el fenotipo de células madre de glioma, estas células volverían a ser sensibles a los tratamientos y, por tanto, se podría evitar la recurrencia del tumor. Esto sería un gran paso en el tratamiento de los gliomas, ya que

éstos presentan una gran capacidad de infiltración que dificulta una resección quirúrgica completa, lo que junto a la resistencia de las células madre de glioma a la radioterapia y a la quimioterapia, hacen de la recurrencia uno de los grandes problemas a la hora de tratar estos tumores.

Por tanto, conocer el mecanismo molecular por el que tanto la Cx43 como su péptido mimético pueden producir estos efectos sobre células de glioma de rata C6 y células madre de glioma puede ser crucial para diseñar nuevos tratamientos y estrategias contra los gliomas.

6. Conclusiones

1. El silenciamiento de Csk (kinasa C-terminal de Src) reduce el efecto antiproliferativo de la Cx43 en células de glioma. Dado que Csk fosforila la tirosina 527 de c-Src, promoviendo su inactivación, se puede concluir que Csk está implicada en la reducción de la proliferación que ejerce la Cx43 en las células de glioma.
2. El silenciamiento de PTEN (fosfatasa de especificidad dual PTEN) aumenta los niveles de la forma activa de c-Src, es decir, c-Src fosforilado en la tirosina 416. De hecho, el silenciamiento de PTEN impide la inhibición de c-Src promovida por la Cx43, indicando que esta fosfatasa es responsable de retirar el fosfato de c-Src tras la restauración de la Cx43.
3. El silenciamiento de PTEN reduce el efecto antiproliferativo de la Cx43 en células de glioma, indicando que PTEN está implicada en la reducción de la proliferación que ejerce la Cx43 en estas células.
4. La restauración de la expresión de Cx43 en las células de glioma promueve un aumento en los niveles de expresión de PTEN, detectable en todas las fases del ciclo celular, especialmente en la fase G0 y en el momento de impedir la entrada a la fase S del ciclo celular.
5. La restauración de la Cx43 en las células de glioma reduce la actividad de Akt, una de las principales consecuencias de la actividad de PTEN. Sin embargo, la restauración de un mutante de Cx43 que no inhibe la actividad de c-Src no modifica los niveles de expresión de PTEN ni la actividad de Akt, sugiriendo que el efecto de la Cx43 sobre la expresión y actividad de PTEN depende de su capacidad de inhibir c-Src.
6. Tanto los resultados de colocalización mediante microscopía confocal, como los de co-inmunoprecipitación, indican que la Cx43 interacciona con c-Src, PTEN y Csk, tanto en células de glioma tras la transfección de Cx43, como en astrocitos, donde estas proteínas se expresan endógenamente.
7. Tanto PTEN como el mutante de PTEN sin dominio de unión a PDZ, interaccionan con la Cx43 en células de glioma y astrocitos, lo que sugiere que PTEN y Cx43 no interaccionan a través de dominios PDZ.
8. Los estudios de interacción empleando diferentes regiones de la Cx43 unida a secuencias penetrantes y a biotina, indican que la secuencia de la Cx43 comprendida entre los aminoácidos 266 y 283 es la responsable de la interacción de ésta con c-Src, PTEN y Csk.

Conclusión final. Nuestros resultados, tomados en su conjunto, indican que la Cx43, a través de la región intrínsecamente desordenada 266-283, interacciona con el protooncogén c-Src y con sus

Conclusiones

inhibidores Csk y PTEN. Nuestra propuesta es que, de esta manera, se favorece la aproximación y el reordenamiento de estas proteínas, necesarios para que Csk fosforile a c-Src en la tirosina 527 y PTEN retire el fosfato de la tirosina 416 de c-Src, completando la inactivación del protooncogén. Consecuentemente, la Cx43 sería un regulador fisiológico de c-Src en astrocitos. Por su parte, en células de glioma este mecanismo explicaría por qué la restauración de la Cx43, o de un péptido penetrante que contiene la secuencia mencionada, promueve la inactivación de c-Src y la reducción de la elevada tasa de proliferación de estas células tumorales.

Bibliografía

- Abbott, N. J., L. Ronnback, and E. Hansson, 2006, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier: *Nat Rev Neurosci*, v. 7, p. 41-53.
- Alimonti, A., A. Carracedo, J. G. Clohessy, L. C. Trotman, C. Nardella, A. Egia, L. Salmena, K. Sampieri, W. J. Haveman, E. Brogi, A. L. Richardson, J. Zhang, and P. P. Pandolfi, 2010, Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility: *Nat Genet*, v. 42, p. 454-8.
- Alonso, G., M. Koegl, N. Mazurenko, and S. A. Courtneidge, 1995, Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors: *J Biol Chem*, v. 270, p. 9840-8.
- Amata, I., M. Maffei, M. Pons, and mpons@ub.edu, 2014, Phosphorylation of unique domains of Src family kinases: *Frontiers in Genetics*, v. 5.
- Andres-Pons, A., M. Valiente, J. Torres, A. Gil, I. Rogla, F. Ripoll, J. Cervera, and R. Pulido, 2005, Functional definition of relevant epitopes on the tumor suppressor PTEN protein: *Cancer Lett*, v. 223, p. 303-12.
- Anneren, C., C. A. Cowan, and D. A. Melton, 2004, The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal: *J Biol Chem*, v. 279, p. 31590-8.
- Araque, A., 2008, Astrocytes process synaptic information: *Neuron Glia Biol*, v. 4, p. 3-10.
- Araque, A., E. D. Martin, G. Perea, J. I. Arellano, and W. Buno, 2002, Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices: *J Neurosci*, v. 22, p. 2443-50.
- Arbet-Engels C, Tartare-Deckert S, Eckhart W., 1999, C-terminal Src kinase associates with ligand-stimulated insulin-like growth factor-I receptor. *J Biol Chem*.274:5422–8.
- Auer, R. N., R. F. Del Maestro, and R. Anderson, 1981, A simple and reproducible experimental in vivo glioma model: *Can J Neurol Sci*, v. 8, p. 325-31.
- Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch, and D. Vestweber, 2005, Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation, *EMBO J*, v. 24: England, p. 1686-95.
- Bejarano, E., A. Yuste, B. Patel, R. F. Stout, Jr., D. C. Spray, and A. M. Cuervo, 2014, Connexins modulate autophagosome biogenesis: *Nat Cell Biol*, v. 16, p. 401-14.
- Bello, M. J., J. Vaquero, J. M. de Campos, M. E. Kusak, J. L. Sarasa, J. Saez-Castresana, A. Pestana, and J. A. Rey, 1994, Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors: *Int J Cancer*, v. 57, p. 172-5.
- Bennett, B. D., S. Cowley, S. Jiang, R. London, B. Deng, J. Grabarek, J. E. Groopman, D. V. Goeddel, and H. Avraham, 1994, Identification and characterization of a novel tyrosine kinase from megakaryocytes: *J Biol Chem*, v. 269, p. 1068-74.
- Bennett, M. V., L. C. Barrio, T. A. Bargiello, D. C. Spray, E. Hertzberg, and J. C. Saez, 1991, Gap junctions: new tools, new answers, new questions: *Neuron*, v. 6, p. 305-20.
- Berger, A. H., A. G. Knudson, and P. P. Pandolfi, 2011, A continuum model for tumour suppression: *Nature*, v. 476, p. 163-9.

Bibliografía

- Bergman, M., T. Mustelin, C. Oetken, J. Partanen, N. A. Flint, K. E. Amrein, M. Autero, P. Burn, and K. Alitalo, 1992, The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity: *Embo j*, v. 11, p. 2919-24.
- Beyer, E. C., and T. H. Steinberg, 1991, Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages: *J Biol Chem*, v. 266, p. 7971-4.
- Beyer, E. C., D. L. Paul, and D. A. Goodenough, 1987, Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver: *J Cell Biol*, v. 105, p. 2621-9.
- Bigner, S. H., J. Mark, M. S. Mahaley, and D. D. Bigner, 1984, Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas: *Hereditas*, v. 101, p. 103-13.
- Bjorge, J. D., A. Pang, and D. J. Fujita, 2000, Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines: *J Biol Chem*, v. 275, p. 41439-46.
- Bonifant, C. L., J. S. Kim, and T. Waldman, 2007, NHERFs, NEP, MAGUKs, and More: Interactions That Regulate PTEN: *J Cell Biochem*, v. 102, p. 878-85.
- Brdicka, T., D. Pavlistova, A. Leo, E. Bruyns, V. Korinek, P. Angelisova, J. Scherer, A. Shevchenko, I. Hilgert, J. Cerny, K. Drbal, Y. Kuramitsu, B. Kornacker, V. Horejsi, and B. Schraven, 2000, Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation: *J Exp Med*, v. 191, p. 1591-604.
- Brdicková N, Brdicka T, Angelisová P, Horváth O, Spicka J, Hilgert I., 2003, LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. *J Exp Med*.198:1453–62.
- Brower, J. V., P. A. Clark, W. Lyon, and J. S. Kuo, 2014, MicroRNAs in cancer: glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells: *Neurochem Int*, v. 77, p. 68-77.
- Brown, E. J., and S. L. Schreiber, 1996, A signaling pathway to translational control: *Cell*, v. 86, p. 517-20.
- Brown, M. T., and J. A. Cooper, 1996, Regulation, substrates and functions of src: *Biochim Biophys Acta*, v. 1287, p. 121-49.
- Burger, P. C., F. S. Vogel, S. B. Green, and T. A. Strike, 1985, Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications: *Cancer*, v. 56, p. 1106-11.
- Caltabiano, R., A. Torrisi, D. Condorelli, V. Albanese, and S. Lanzafame, 2010, High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization: *Acta Histochem*, v. 112, p. 529-35.
- Campbell, R. B., F. Liu, and A. H. Ross, 2003, Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: *J Biol Chem*, v. 278, p. 33617-20.
- Cao, H., W. E. Courchesne, and C. C. Mastick, 2002, A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase: *J Biol Chem*, v. 277, p. 8771-4.
- Caskey, L. S., G. N. Fuller, J. M. Bruner, W. K. Yung, R. E. Sawaya, E. C. Holland, and W. Zhang, 2000, Toward a molecular classification of the gliomas: histopathology, molecular genetics, and gene expression profiling: *Histol Histopathol*, v. 15, p. 971-81.
- Chalhoub, N., and S. J. Baker, 2009, PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer: *Annu Rev Pathol*, v. 4, p. 127-50.

- Chan, J. A., A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik, 2005, MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells: *Cancer Res*, v. 65, p. 6029-33.
- Chaytor, A. T., W. H. Evans, and T. M. Griffith, 1997, Peptides homologous to extracellular loop of motifs connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries: *J. Physiol.*, v. 503.1, p. 99-110.
- Chen, J., L. Pan, Z. Wei, Y. Zhao, and M. Zhang, 2008, Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites: *EMBO J*, v. 27, p. 2113-23.
- Chen, J., Y. Li, T. S. Yu, R. M. McKay, D. K. Burns, S. G. Kernie, and L. F. Parada, 2012, A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy: *Nature*, v. 488, p. 522-6.
- Chen, S. C., D. B. Pelletier, P. Ao, and A. L. Boynton, 1995, Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases: *Cell Growth Differ*, v. 6, p. 681-90.
- Cheney IW, Neuteboom ST, Vaillancourt MT, Ramachandra M, Bookstein R., 1999, Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res*. 59(10):2318-23.
- Cherian, P. P., A. J. Siller-Jackson, S. Gu, X. Wang, L. F. Bonewald, E. Sprague, and J. X. Jiang, 2005, Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 3100-6.
- Chistiakov, D. A., and V. P. Chekhonin, 2012, Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential: *Eur J Pharmacol*, v. 684, p. 8-18.
- Chow, L. M., and S. J. Baker, 2006, PTEN function in normal and neoplastic growth: *Cancer Lett*, v. 241, p. 184-96.
- Chu I1, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, Sun P, Tan CK, Hengst L, Slingerland J., 2007, p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*. 128(2):281-94.
- Chung, J. H., M. E. Ginn-Pease, and C. Eng, 2005, Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein: *Cancer Res*, v. 65, p. 4108-16.
- Ciafrè, S. A., S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C. G. Liu, G. Sabatino, M. Negrini, G. Maira, C. M. Croce, and M. G. Farace, 2005, Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 334, p. 1351-8.
- Cohen, P., and S. Frame, 2001, The renaissance of GSK3: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, p. 769-76.
- Conti, A., M. Aguenouz, D. La Torre, C. Tomasello, S. Cardali, F. F. Angileri, F. Maio, A. Cama, A. Germanò, G. Vita, and F. Tomasello, 2009, miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors: *J Neurooncol*, v. 93, p. 325-32.
- Cooper, C. D., and P. D. Lampe, 2002, Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly: *J Biol Chem*, v. 277, p. 44962-8.
- Cooper, J. A., K. L. Gould, C. A. Cartwright, and T. Hunter, 1986, Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation: *Science*, v. 231, p. 1431-4.
- Cornell-Bell, A. H., and S. M. Finkbeiner, 1991, Ca²⁺ waves in astrocytes: *Cell Calcium*, v. 12, p. 185-204.
- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper, and S. J. Smith, 1990, Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling: *Science*, v. 247, p. 470-3.

Bibliografía

- Crow, D. S., E. C. Beyer, D. L. Paul, S. S. Kobe, and A. F. Lau, 1990, Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts: *Mol Cell Biol*, v. 10, p. 1754-63.
- Dang, X., B. W. Doble, and E. Kardami, 2003, The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth: *Mol Cell Biochem*, v. 242, p. 35-8.
- Dang, X., M. Jeyaraman, and E. Kardami, 2006, Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability: *Mol Cell Biochem*, v. 289, p. 201-7.
- Dani, J. W., A. Chernjavsky, and S. J. Smith, 1992, Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks: *Neuron*, v. 8, p. 429-40.
- Danielson, L. S., D. S. Park, N. Rotllan, A. Chamorro-Jorganes, M. V. Guijarro, C. Fernandez-Hernando, G. I. Fishman, C. K. Phoon, and E. Hernando, 2013, Cardiovascular dysregulation of miR-17-92 causes a lethal hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenesis: *FASEB J*, v. 27, p. 1460-7.
- D'Arco, M., R. Giniatullin, V. Leone, P. Carloni, N. Birsa, A. Nair, A. Nistri, and E. Fabbretti, 2009, The C-terminal Src inhibitory kinase (Csk)-mediated tyrosine phosphorylation is a novel molecular mechanism to limit P2X3 receptor function in mouse sensory neurons: *J Biol Chem*, v. 284, p. 21393-401.
- Das, S., J. E. Dixon, and W. Cho, 2003, Membrane-binding and activation mechanism of PTEN, *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 7491-6.
- De Pina-Benabou, M. H., M. Srinivas, D. C. Spray, and E. Scemes, 2001, Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes: *J Neurosci*, v. 21, p. 6635-43.
- Delmar, M., W. Coombs, P. Sorgen, H. S. Duffy, and S. M. Taffet, 2004, Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels: *Cardiovasc Res*, v. 62, p. 268-75.
- Dermietzel, R., E. L. Hertberg, J. A. Kessler, and D. C. Spray, 1991, Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis: *J Neurosci*, v. 11, p. 1421-32.
- Dey, N., H. E. Crosswell, P. De, R. Parsons, Q. Peng, J. D. Su, and D. L. Durden, 2008, The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration: *Cancer Res*, v. 68, p. 1862-71.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi, 1998, Pten is essential for embryonic development and tumour suppression: *Nat Genet*, v. 19, p. 348-55.
- Di Cristofano, A., M. De Acetis, A. Koff, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi, 2001, Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse: *Nat Genet*, v. 27, p. 222-4.
- Downes, C. P., N. Perera, S. Ross, and N. R. Leslie, 2007, Substrate specificity and acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: *Biochem Soc Symp*, p. 69-80.
- Du, J., P. Bernasconi, K. R. Clauser, D. R. Mani, S. P. Finn, R. Beroukhi, M. Burns, B. Julian, X. P. Peng, H. Hieronymus, R. L. Maglathlin, T. A. Lewis, L. M. Liau, P. Nghiemphu, I. K. Mellinghoff, D. N. Louis, M. Loda, S. A. Carr, A. L. Kung, and T. R. Golub, 2009, Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy: *Nat Biotechnol*, v. 27, p. 77-83.
- Dunker, A. K., J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R.

- Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner, and Z. Obradovic, 2001, Intrinsically disordered protein: *J Mol Graph Model*, v. 19, p. 26-59.
- Eckel-Passow, J. E., D. H. Lachance, A. M. Molinaro, K. M. Walsh, P. A. Decker, H. Sicotte, M. Pekmezci, T. Rice, M. L. Kosel, I. V. Smirnov, G. Sarkar, A. A. Caron, T. M. Kollmeyer, C. E. Praska, A. R. Chada, C. Halder, H. M. Hansen, L. S. McCoy, P. M. Bracci, R. Marshall, S. Zheng, G. F. Reis, A. R. Pico, B. P. O'Neill, J. C. Buckner, C. Giannini, J. T. Huse, A. Perry, T. Tihan, M. S. Berger, S. M. Chang, M. D. Prados, J. Wiemels, J. K. Wiencke, M. R. Wrensch, and R. B. Jenkins, 2015, Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors: *N Engl J Med*.
- el-Fouly, M. H., J. E. Trosko, and C. C. Chang, 1987, Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication: *Exp Cell Res*, v. 168, p. 422-30.
- Eng, C., 2003, PTEN: one gene, many syndromes: *Hum Mutat*, v. 22, p. 183-98.
- Engelman, J. A., J. Luo, and L. C. Cantley, 2006, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism: *Nat Rev Genet*, v. 7, p. 606-19.
- Ernst, A., B. Campos, J. Meier, F. Devens, F. Liesenberg, M. Wolter, G. Reifenberger, C. Herold-Mende, P. Lichter, and B. Radlwimmer, 2010, De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures: *Oncogene*, v. 29, p. 3411-22.
- Fang, K. S., H. Sabe, H. Saito, and H. Hanafusa, 1994, Comparative study of three protein-tyrosine phosphatases. Chicken protein-tyrosine phosphatase lambda dephosphorylates c-Src tyrosine 527: *J Biol Chem*, v. 269, p. 20194-200.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*: *Nature*, v. 391, p. 806-11.
- Frame, M. C., 2004, Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it: *J Cell Sci*, v. 117, p. 989-98.
- Frame, M. C., V. J. Fincham, N. O. Carragher, and J. A. Wyke, 2002, v-Src's hold over actin and cell adhesions: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 233-45.
- Franco-Hernandez, C., V. Martinez-Glez, and J. A. Rey, 2007, [Biology molecular of glioblastomas]: *Neurocirugia (Astur)*, v. 18, p. 373-82.
- Fu, C. T., J. F. Bechberger, M. A. Ozog, B. Perbal, and C. C. Naus, 2004, CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression: *J Biol Chem*, v. 279, p. 36943-50.
- Fujimoto, M., D. W. Fults, G. A. Thomas, Y. Nakamura, M. P. Heilbrun, R. White, J. L. Story, S. L. Naylor, K. S. Kagan-Hallet, and P. J. Sheridan, 1989, Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme: *Genomics*, v. 4, p. 210-4.
- Fujisawa, H., R. M. Reis, M. Nakamura, S. Colella, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, 2000, Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas: *Lab Invest*, v. 80, p. 65-72.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho, and W. K. Cavenee, 2007, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment: *Genes Dev*, v. 21, p. 2683-710.

Bibliografía

- Gangoso, E., C. Thirant, H. Chneiweiss, J. M. Medina, and A. Tabernero, 2014, A cell-penetrating peptide based on the interaction between c-Src and connexin43 reverses glioma stem cell phenotype: *Cell Death Dis*, v. 5, p. e1023.
- Garcia-Cao, I., M. S. Song, R. M. Hobbs, G. Laurent, C. Giorgi, V. C. J. de Boer, D. Anastasiou, K. Ito, A. T. Sasaki, L. Rameh, A. Carracedo, M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, P. Pinton, M. C. Haigis, and P. P. Pandolfi, 2012, Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State: *Cell*, v. 149, p. 49-62.
- Gardner-Medwin, A. R., 1986, A new framework for assessment of potassium-buffering mechanisms: *Ann N Y Acad Sci*, v. 481, p. 287-302.
- Garofalo, M., G. Di Leva, G. Romano, G. Nuovo, S. S. Suh, A. Ngankee, C. Taccioli, F. Pichiorri, H. Alder, P. Secchiero, P. Gasparini, A. Gonelli, S. Costinean, M. Acunzo, G. Condorelli, and C. M. Croce, 2009, miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation: *Cancer Cell*, v. 16, p. 498-509.
- Gellhaus, A., X. Dong, S. Propson, K. Maass, L. Klein-Hitpass, M. Kibschull, O. Traub, K. Willecke, B. Perbal, S. J. Lye, and E. Winterhager, 2004, Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells: *J Biol Chem*, v. 279, p. 36931-42.
- Georgescu, M. M., K. H. Kirsch, P. Kaloudis, H. Yang, N. P. Pavletich, and H. Hanafusa, 2000, Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor: *Cancer Res*, v. 60, p. 7033-8.
- Georgescu, M. M., K. H. Kirsch, T. Akagi, T. Shishido, and H. Hanafusa, 1999, The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 10182-7.
- Germano, I. M., and E. Binello, 2014, Stem cells and gliomas: past, present, and future: *J Neurooncol*, v. 119, p. 547-55.
- Giaume, C., A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman, and N. Rouach, 2010, Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions: *Nat Rev Neurosci*, v. 11, p. 87-99.
- Giaume, C., A. Tabernero, and J. Medina, 1997, Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions: *Glia*, v. 21, p. 114-123.
- Giaume, C., C. Fromaget, A. el Aoumari, J. Cordier, J. Glowinski, and D. Gros, 1991, Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein: *Neuron*, v. 6, p. 133-43.
- Gielen, P. R., Q. Aftab, N. Ma, V. C. Chen, X. Hong, S. Lozinsky, C. C. Naus, and W. C. Sin, 2013, Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway: *Neuropharmacology*, v. 75, p. 539-48.
- Giepmans, B. N., 2004, Gap junctions and connexin-interacting proteins: *Cardiovasc Res*, v. 62, p. 233-45.
- Giepmans, B. N., I. Verlaan, T. Hengeveld, H. Janssen, J. Calafat, M. M. Falk, and W. H. Moolenaar, 2001b, Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules: *Curr Biol*, v. 11, p. 1364-8.
- Giepmans, B. N., T. Hengeveld, F. R. Postma, and W. H. Moolenaar, 2001a, Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication: *J Biol Chem*, v. 276, p. 8544-9.
- Giepmans, B., and W. Moolenaar, 1998, The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein: *Curr. Biol.*, v. 8, p. 931-934.

- Gil, A., A. Andrés-Pons, E. Fernández, M. Valiente, J. Torres, J. Cervera, and R. Pulido, 2006, Nuclear Localization of PTEN by a Ran-dependent Mechanism Enhances Apoptosis: Involvement of an N-Terminal Nuclear Localization Domain and Multiple Nuclear Exclusion Motifs, *Mol Biol Cell*, v. 17, p. 4002-13.
- Gilbertson, R. J., and T. A. Graham, 2012, Cancer: Resolving the stem-cell debate: *Nature*, v. 488, p. 462-3.
- Gilleron, J., C. Fiorini, D. Carette, C. Avondet, M. M. Falk, D. Segretain, and G. Pointis, 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*, v. 121, p. 4069-78.
- Gillies, J. K., and I. A. Lorimer, 2007, Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma: *Cell Cycle*, v. 6, p. 2005-9.
- González-Mariscal, L., A. Betanzos, and A. Avila-Flores, 2000, MAGUK proteins: structure and role in the tight junction: *Semin Cell Dev Biol*, v. 11, p. 315-24.
- Gottschalk AR, Basila D, Wong M, Dean NM, Brandts CH, Stokoe D, Haas-Kogan DA., 2001, p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest. *Cancer Res*. 61(5):2105-11.
- Grgurevich, S., D. Linnekin, T. Musso, X. Zhang, W. Modi, L. Varesio, F. W. Ruscetti, J. R. Ortaldo, and D. W. McVicar, 1997, The Csk-like proteins Lsk, Hyl, and Matk represent the same Csk homologous kinase (Chk) and are regulated by stem cell factor in the megakaryoblastic cell line MO7e: *Growth Factors*, v. 14, p. 103-15.
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L., 2007, Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*. 128(2):269-80.
- Gritti, A., L. Bonfanti, F. Doetsch, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, D. A. Lim, R. Galli, J. M. Verdugo, D. G. Herrera, and A. L. Vescovi, 2002, Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents: *J Neurosci*, v. 22, p. 437-45.
- Grosely, R., J. L. Kopanic, S. Nabors, F. Kieken, G. Spagnol, M. Al-Mugotir, S. Zach, and P. L. Sorgen, 2013, Effects of phosphorylation on the structure and backbone dynamics of the intrinsically disordered connexin43 C-terminal domain: *J Biol Chem*, v. 288, p. 24857-70.
- Groszer, M., R. Erickson, D. D. Scripture-Adams, J. D. Dougherty, J. Le Belle, J. A. Zack, D. H. Geschwind, X. Liu, H. I. Kornblum, and H. Wu, 2006, PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 111-6.
- Groszer, M., R. Erickson, D. D. Scripture-Adams, R. Lesche, A. Trumpp, J. A. Zack, H. I. Kornblum, X. Liu, and H. Wu, 2001, Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo: *Science*, v. 294, p. 2186-9.
- Gu, T., Z. Zhang, J. Wang, J. Guo, W. H. Shen, and Y. Yin, 2011, CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase: *Cancer Res*, v. 71, p. 2821-5.
- Gudinaviciene, I., D. Pranys, and E. Juozaityte, 2004, Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas: *Medicina (Kaunas)*, v. 40, p. 112-20.
- Gump, J. M., and S. F. Dowdy, 2007, TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects: *Trends Mol Med*, v. 13, p. 443-8.
- Hakak, Y., and G. S. Martin, 1999, Ubiquitin-dependent degradation of active Src: *Curr Biol*, v. 9, p. 1039-42.

Bibliografía

- Hamaguchi, I., A. Iwama, N. Yamaguchi, S. Sakano, Y. Matsuda, and T. Suda, 1994, Characterization of mouse non-receptor tyrosine kinase gene, HYL: *Oncogene*, v. 9, p. 3371-4.
- Han, X., W. Zhang, X. Yang, C. G. Wheeler, C. P. Langford, L. Wu, N. Filippova, G. K. Friedman, Q. Ding, H. M. Fathallah-Shaykh, G. Y. Gillespie, L. B. Nabors, 2015, The role of Src family kinases in growth and migration of glioma stem cells: *International Journal of Oncology*, v. 45, p. 302-310.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation: *Cell*, v. 144, p. 646-74.
- Hao, J., C. Zhang, A. Zhang, K. Wang, Z. Jia, G. Wang, L. Han, C. Kang, and P. Pu, 2012, miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells: *Oncol Rep*, v. 27, p. 1504-10.
- Herrero-Gonzalez, S., E. Gangoso, C. Giaume, C. C. Naus, J. M. Medina, and A. Taberner, 2010a, Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells: *Oncogene*, v. 29, p. 5712-23.
- Herve, J. C., N. Bourmeyster, D. Sarrouilhe, and H. S. Duffy, 2007, Gap junctional complexes: from partners to functions: *Prog Biophys Mol Biol*, v. 94, p. 29-65.
- Hirschi, K. K., C. E. Xu, T. Tsukamoto, and R. Sager, 1996, Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential: *Cell Growth Differ*, v. 7, p. 861-70.
- Hochegger, H., S. Takeda, and T. Hunt, 2008, Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 910-6.
- Horejsí V., 2004, Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunol Lett*.92:43–9.
- Howell, B. W., and J. A. Cooper, 1994, Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity: *Mol Cell Biol*, v. 14, p. 5402-11.
- Huang, R. P., Y. Fan, M. Z. Hossain, A. Peng, Z. L. Zeng, and A. L. Boynton, 1998, Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43): *Cancer Res*, v. 58, p. 5089-96.
- Huang, R.-P., M. Hossain, A. Sehgal, and A. Boynton, 1999, Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells: *J. Surg. Oncol.*, v. 70, p. 21-24.
- Ia, K. K., R. D. Mills, M. I. Hossain, K. C. Chan, B. Jarasrassamee, R. N. Jorissen, and H. C. Cheng, 2010, Structural elements and allosteric mechanisms governing regulation and catalysis of CSK-family kinases and their inhibition of Src-family kinases: *Growth Factors*, v. 28, p. 329-50.
- Idoate, M. A., and J. Echeveste, 2007, [Update on the molecular biology of gliomas: towards a pathomolecular classification of gliomas]: *Rev Neurol*, v. 44, p. 217-24.
- Imamoto, A., and P. Soriano, 1993, Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice: *Cell*, v. 73, p. 1117-24.
- Jackson, M., F. Hassiotou, and A. Nowak, 2015, Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target: *Carcinogenesis*, v. 36, p. 177-85.

- James, C. D., E. Carlbom, J. P. Dumanski, M. Hansen, M. Nordenskjold, V. P. Collins, and W. K. Cavenee, 1988, Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages: *Cancer Res*, v. 48, p. 5546-51.
- Janzer, R. C., and M. C. Raff, 1987, Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells: *Nature*, v. 325, p. 253-7.
- Jensen, A. M., and S. Y. Chiu, 1990, Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes: *J Neurosci*, v. 10, p. 1165-75.
- Jia, Z., K. Wang, A. Zhang, G. Wang, C. Kang, L. Han, and P. Pu, 2013, miR-19a and miR-19b overexpression in gliomas: *Pathol Oncol Res*, v. 19, p. 847-53.
- Jin, Z., S. Xu, H. Yu, B. Yang, H. Zhao, and G. Zhao, 2013, miR-125b inhibits Connexin43 and promotes glioma growth: *Cell Mol Neurobiol*, v. 33, p. 1143-8.
- Kanemitsu, M. Y., L. W. Loo, S. Simon, A. F. Lau, and W. Eckhart, 1997, Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions: *J Biol Chem*, v. 272, p. 22824-31.
- Kanemitsu, M. Y., W. Jiang, and W. Eckhart, 1998, Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis: *Cell Growth Differ*, v. 9, p. 13-21.
- Kanou, T., C. Oneyama, K. Kawahara, A. Okimura, M. Ohta, N. Ikeda, Y. Shintani, M. Okumura, and M. Okada, 2011, The transmembrane adaptor Cbp/PAG1 controls the malignant potential of human non-small cell lung cancers that have c-src upregulation: *Mol Cancer Res*, v. 9, p. 103-14.
- Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky, and M. Okada, 2000, Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases: *Nature*, v. 404, p. 999-1003.
- Kennedy, M. B., 1995, Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains, *Trends Biochem Sci*, v. 20: England, p. 350.
- Kjenseth, A., T. Fykerud, E. Rivedal, and E. Leithe, 2010, Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system: *Cell Signal*, v. 22, p. 1267-73.
- Klages, S., D. Adam, K. Class, J. Fagnoli, J. B. Bolen, and R. C. Penhallow, 1994, Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 2597-601.
- Kleihues, P., and L. H. Sobin, 2000, World Health Organization classification of tumors: *Cancer*, v. 88, p. 2887.
- Kleihues, P., P. C. Burger, and B. W. Scheithauer, 1993, The new WHO classification of brain tumours: *Brain Pathol*, v. 3, p. 255-68.
- Klotz, L. O., 2012, Posttranscriptional regulation of connexin-43 expression: *Arch Biochem Biophys*, v. 524, p. 23-9.
- Kmieciak, T. E., and D. Shalloway, 1987, Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation: *Cell*, v. 49, p. 65-73.
- Kmieciak, T. E., P. J. Johnson, and D. Shalloway, 1988, Regulation by the autophosphorylation site in overexpressed pp60c-src: *Mol Cell Biol*, v. 8, p. 4541-6.
- Koegl, M., P. Zlatkine, S. C. Ley, S. A. Courtneidge, and A. I. Magee, 1994, Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif: *Biochem J*, v. 303 (Pt 3), p. 749-53.

Bibliografía

- Koffler, L., S. Roshong, I. Kyu Park, K. Cesen-Cummings, D. C. Thompson, L. D. Dwyer-Nield, P. Rice, C. Mamay, A. M. Malkinson, and R. J. Ruch, 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*, v. 79, p. 347-54.
- Koo, S. K., D. Y. Kim, S. D. Park, K. W. Kang, and C. O. Joe, 1997, PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells: *Mol Cell Biochem*, v. 167, p. 41-9.
- Kopanic, J. L., M. H. Al-mugotir, F. Kieken, S. Zach, A. J. Trease, and P. L. Sorgen, 2014, Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners: *Biophys J*, v. 106, p. 2184-95.
- Kosodo, Y., and W. B. Huttner, 2009, Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain: *Dev Growth Differ*, v. 51, p. 251-61.
- Kuffler, S. W., J. G. Nicholls, and R. K. Orkand, 1966, Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia: *J Neurophysiol*, v. 29, p. 768-87.
- Kumar, N. M., and N. B. Gilula, 1996, The gap junction communication channel: *Cell*, v. 84, p. 381-8.
- Kurata, W. E., and A. F. Lau, 1994, p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src: *Oncogene*, v. 9, p. 329-35.
- Kypta, R. M., Y. Goldberg, E. T. Ulug, and S. A. Courtneidge, 1990, Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases: *Cell*, v. 62, p. 481-92.
- Laird, D. W., 2005, Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation: *Biochim Biophys Acta*, v. 1711, p. 172-82.
- Laird, D. W., 2010, The gap junction proteome and its relationship to disease: *Trends in Cell Biology*, v. 20, p. 92-101.
- Lampe, P. D., and A. F. Lau, 2000, Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins: *Arch Biochem Biophys*, v. 384, p. 205-15.
- Lampe, P. D., and A. F. Lau, 2004, The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, p. 1171-86.
- Lampe, P. D., W. E. Kurata, B. J. Warn-Cramer, and A. F. Lau, 1998, Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase: *J Cell Sci*, v. 111 (Pt 6), p. 833-41.
- Laszlo, G. S., and J. A. Cooper, 2009, Restriction of Src activity by Cullin-5: *Curr Biol*, v. 19, p. 157-62.
- Lee, H. J., and J. J. Zheng, 2010, PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification, *Cell Commun Signal*, v. 8, p. 8.
- Lee, J. O., H. Yang, M. M. Georgescu, A. Di Cristofano, T. Maehama, Y. Shi, J. E. Dixon, P. Pandolfi, and N. P. Pavletich, 1999, Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association: *Cell*, v. 99, p. 323-34.
- Lee, S., M. K. Ayrapetov, D. J. Kemble, K. Parang, and G. Sun, 2006, Docking-based substrate recognition by the catalytic domain of a protein tyrosine kinase, C-terminal Src kinase (Csk): *J Biol Chem*, v. 281, p. 8183-9.

- Lee, S., X. Lin, N. H. Nam, K. Parang, and G. Sun, 2003, Determination of the substrate-docking site of protein tyrosine kinase C-terminal Src kinase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 14707-12.
- Leslie, N. R., and M. Foti, 2011, Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes: *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, p. 131-140.
- Li, H., G. Spagnol, N. Naslavsky, S. Caplan, and P. L. Sorgen, 2014, TC-PTP directly interacts with connexin43 to regulate gap junction intercellular communication: *J Cell Sci*, v. 127, p. 3269-79.
- Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliareis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, and R. Parsons, 1997, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer: *Science*, v. 275, p. 1943-7..
- Li, S., J. Couet, and M. P. Lisanti, 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*, v. 271, p. 29182-90.
- Li, X. T., H. Z. Wang, Z. W. Wu, T. Q. Yang, Z. H. Zhao, G. L. Chen, X. S. Xie, B. Li, Y. X. Wei, Y. L. Huang, Y. X. Zhou, and Z. W. Du, 2015, miR-494-3p Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by PTEN/AKT Signaling in Human Glioblastoma Cells: *Cell Mol Neurobiol*.
- Li, Y., F. Guessous, Y. Zhang, C. Dipierro, B. Kefas, E. Johnson, L. Marcinkiewicz, J. Jiang, Y. Yang, T. D. Schmittgen, B. Lopes, D. Schiff, B. Purow, and R. Abounader, 2009, MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes: *Cancer Res*, v. 69, p. 7569-76.
- Liaw D1, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R., 1997, Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* (1):64-7.
- Liliental, J., S. Y. Moon, R. Lesche, R. Mamillapalli, D. Li, Y. Zheng, H. Sun, and H. Wu, 2000, Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases: *Curr Biol*, v. 10, p. 401-4.
- Lin, R., B. J. Warn-Cramer, W. E. Kurata, and A. F. Lau, 2001, v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication: *J Cell Biol*, v. 154, p. 815-27.
- Liu, F., S. Wagner, R. B. Campbell, J. A. Nickerson, C. A. Schiffer, and A. H. Ross, 2005, PTEN enters the nucleus by diffusion: *J Cell Biochem*, v. 96, p. 221-34.
- Liu, X., S. R. Brodeur, G. Gish, Z. Songyang, L. C. Cantley, A. P. Laudano, and T. Pawson, 1993, Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain: *Oncogene*, v. 8, p. 1119-26.
- Loewenstein WR, Kanno Y., 1966, Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209(5029):1248-9.
- Loewenstein, W. R., 1981, Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel: *Physiol Rev*, v. 61, p. 829-913.
- Loewenstein, W. R., and B. Rose, 1992, The cell-cell channel in the control of growth: *Semin Cell Biol*, v. 3, p. 59-79.

Bibliografía

- Loo, L. W., M. Y. Kanemitsu, and A. F. Lau, 1999, In vivo association of pp60v-src and the gap-junction protein connexin 43 in v-src-transformed fibroblasts: *Mol Carcinog*, v. 25, p. 187-95.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, 2007, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system: *Acta Neuropathol*, v. 114, p. 97-109.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub, 2005, MicroRNA expression profiles classify human cancers: *Nature*, v. 435, p. 834-8.
- Lu, Y., Q. Yu, J. H. Liu, J. Zhang, H. Wang, D. Koul, J. S. McMurray, X. Fang, W. K. Yung, K. A. Siminovitch, and G. B. Mills, 2003, Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades: *J Biol Chem*, v. 278, p. 40057-66.
- Lyu, J., X. Yu, L. He, T. Cheng, J. Zhou, C. Cheng, Z. Chen, G. Cheng, Z. Qiu, and W. Zhou, 2015, The protein phosphatase activity of PTEN is essential for regulating neural stem cell differentiation: *Mol Brain*, v. 8, p. 26.
- Ma, W. J., G. D. Lv, A. Tuersun, Q. Liu, H. Liu, S. T. Zheng, C. G. Huang, J. G. Feng, X. Wang, R. Y. Lin, I. Sheyhidin, and X. M. Lu, 2011, Role of microRNA-21 and effect on PTEN in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma: *Mol Biol Rep*, v. 38, p. 3253-60.
- Maehama, T., and J. E. Dixon, 1998, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: *J Biol Chem*, v. 273, p. 13375-8.
- Malaney, P., R. R. Pathak, B. Xue, V. N. Uversky, and V. Davé, 2013, Intrinsic Disorder in PTEN and its Interactome Confers Structural Plasticity and Functional Versatility: *Scientific Reports*, v. 3.
- Mamidipudi, V., J. Zhang, K. C. Lee, and C. A. Cartwright, 2004, RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity: *Mol Cell Biol*, v. 24, p. 6788-98.
- Manning, B. D., and L. C. Cantley, 2007, AKT/PKB signaling: navigating downstream: *Cell*, v. 129, p. 1261-74.
- Martinez, R., and M. Esteller, 2010, The DNA methylome of glioblastoma multiforme: *Neurobiol Dis*, v. 39, p. 40-6.
- Masaki, T., M. Okada, M. Tokuda, Y. Shiratori, O. Hatase, M. Shirai, M. Nishioka, and M. Omata, 1999, Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 29, p. 379-84.
- Mavrakis, K. J., A. L. Wolfe, E. Oricchio, T. Palomero, K. de Keersmaecker, K. McJunkin, J. Zuber, T. James, A. A. Khan, C. S. Leslie, J. S. Parker, P. J. Paddison, W. Tam, A. Ferrando, and H. G. Wendel, 2010, Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia: *Nat Cell Biol*, v. 12, p. 372-9.
- McVicar, D. W., B. K. Lal, A. Lloyd, M. Kawamura, Y. Q. Chen, X. Zhang, J. E. Staples, J. R. Ortaldo, and J. J. O'Shea, 1994, Molecular cloning of Isk, a carboxyl-terminal src kinase (csk) related gene, expressed in leukocytes: *Oncogene*, v. 9, p. 2037-44.
- Medina, J., C. Giaume, A. Taberner, R. Matsas, and M. Tsacopoulos, 1999, Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis, *The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease*, v. 468, p. 361-371.

- Mehta, P. P., A. Hotz-Wagenblatt, B. Rose, D. Shalloway, and W. R. Loewenstein, 1991, Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth: *J Membr Biol*, v. 124, p. 207-25.
- Mehta, P. P., J. S. Bertram, and W. R. Loewenstein, 1986, Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells: *Cell*, v. 44, p. 187-96.
- Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel, 2007, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer: *Gastroenterology*, v. 133, p. 647-58.
- Mesnil, M., and H. Yamasaki, 2000, Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication: *Cancer Res*, v. 60, p. 3989-99.
- Mills, J. E., P. C. Whitford, J. Shaffer, J. N. Onuchic, J. A. Adams, and P. A. Jennings, 2007, A novel disulfide bond in the SH2 Domain of the C-terminal Src kinase controls catalytic activity: *J Mol Biol*, v. 365, p. 1460-8.
- Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. H. Lee, J. Kuriyan, and W. T. Miller, 1997, Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement: *Nature*, v. 385, p. 650-3.
- Mobbs, P., H. Brew, and D. Attwell, 1988, A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*): *Brain Res*, v. 460, p. 235-45.
- Moorby, C., and M. Patel, 2001, Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation: *Exp Cell Res*, v. 271, p. 238-48.
- Mora, A., D. Komander, D. M. van Aalten, and D. R. Alessi, 2004, PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction: *Semin Cell Dev Biol*, v. 15, p. 161-70.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: *J Immunol Methods*, v. 65, p. 55-63.
- Musil, L. S., A. C. Le, J. K. VanSlyke, and L. M. Roberts, 2000, Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function: *J Biol Chem*, v. 275, p. 25207-15.
- Mustelin, T., and A. Altman, 1990, Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase pp56lck by the leukocyte common antigen (CD45): *Oncogene*, v. 5, p. 809-13.
- Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J. A. Cooper, and H. Nakagawa, 1991, Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src: *Nature*, v. 351, p. 69-72.
- Nada, S., T. Yagi, H. Takeda, T. Tokunaga, H. Nakagawa, Y. Ikawa, M. Okada, and S. Aizawa, 1993, Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk: *Cell*, v. 73, p. 1125-35.
- Nagy, J. I., X. Li, J. Rempel, G. Stelmack, D. Patel, W. A. Staines, T. Yasumura, and J. E. Rash, 2001, Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43: *J Comp Neurol*, v. 441, p. 302-23.
- Nakamura, M., E. Ishida, K. Shimada, M. Kishi, H. Nakase, T. Sakaki, and N. Konishi, 2005, Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas: *Lab Invest*, v. 85, p. 165-75.

Bibliografía

- Nakamura, M., F. Yang, H. Fujisawa, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, 2000, Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas: *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 59, p. 539-43.
- Nam, J. S., Y. Ino, M. Sakamoto, and S. Hirohashi, 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*, v. 8, p. 2430-6.
- Naus, C. C., 2002, Gap junctions and tumour progression: *Can J Physiol Pharmacol*, v. 80, p. 136-41.
- Naus, C. C., and D. W. Laird, 2010, Implications and challenges of connexin connections to cancer: *Nat Rev Cancer*, v. 10, p. 435-41.
- Naus, C. C., J. F. Bechberger, Y. Zhang, L. Venance, H. Yamasaki, S. C. Juneja, G. M. Kidder, and C. Giaume, 1997, Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin 43: *J. Neurosci. Res.*, v. 49, p. 528-540.
- Nduom, E. K. E., C. G. Hadjipanayis, and E. G. Van Meir, 2012, Glioblastoma Cancer Stem-like Cells – Implications for Pathogenesis and Treatment: *Cancer J*, v. 18, p. 100-6.
- Nelen MR1, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, Fryns JP, Sijmons RH, Woods DG, Mariman EC, Padberg GW, Kremer H., 1997, Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet.* (8):1383-7.
- Nicholas M. Levinson, M. A. S., Philip A. Cole, John Kuriyan, 2008, Structural Basis for the Recognition of c-Src by Its Inactivator Csk, v. Volume 134, p. 124–134.
- Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar, and N. H. Holstein-Rathlou, 2012, Gap Junctions: *Compr Physiol*, v. 2.
- Ogawa, A., Y. Takayama, H. Sakai, K. T. Chong, S. Takeuchi, A. Nakagawa, S. Nada, M. Okada, and T. Tsukihara, 2002, Structure of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk: *J Biol Chem*, v. 277, p. 14351-4.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues, 2007, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma: *Am J Pathol*, v. 170, p. 1445-53.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lutolf, and P. Kleihues, 2004, Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study: *Cancer Res*, v. 64, p. 6892-9.
- Okada, M., and H. Nakagawa, 1988a, Identification of a novel protein tyrosine kinase that phosphorylates pp60c-src and regulates its activity in neonatal rat brain: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 154, p. 796-802.
- Okada, M., and H. Nakagawa, 1988b, Protein tyrosine kinase in rat brain: neonatal rat brain expresses two types of pp60c-src and a novel protein tyrosine kinase: *J Biochem*, v. 104, p. 297-305.
- Okada, M., and H. Nakagawa, 1989, A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function: *J Biol Chem*, v. 264, p. 20886-93.
- Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and H. Nakagawa, 1991, CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases: *J Biol Chem*, v. 266, p. 24249-52.
- Okumura, K., M. Mendoza, R. M. Bachoo, R. A. DePinho, W. K. Cavenee, and F. B. Furnari, 2006, PCAF modulates PTEN activity: *J Biol Chem*, v. 281, p. 26562-8.

- Olive, V., M. J. Bennett, J. C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q. J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon, and L. He, 2009, miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92: *Genes Dev*, v. 23, p. 2839-49.
- Oneyama, C., T. Hikita, K. Enya, M. W. Dobenecker, K. Saito, S. Nada, A. Tarakhovsky, and M. Okada, 2008, The lipid raft-anchored adaptor protein Cbp controls the oncogenic potential of c-Src: *Mol Cell*, v. 30, p. 426-36.
- Oneyama, C., T. Iino, K. Saito, K. Suzuki, A. Ogawa, and M. Okada, 2009, Transforming potential of Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain: *Mol Cell Biol*, v. 29, p. 6462-72.
- Ortega-Molina, A., A. Efeyan, E. Lopez-Guadamillas, M. Muñoz-Martin, G. Gómez-López, M. Cañamero, F. Mulero, J. Pastor, S. Martinez, E. Romanos, M. Mar Gonzalez-Barroso, E. Rial, A. M. Valverde, J. R. Bischoff, and M. Serrano, 2012, Pten Positively Regulates Brown Adipose Function, Energy Expenditure, and Longevity: *Cell Metabolism*, v. 15, p. 382-394.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, Y. Wolinsky, C. Kruchko, and J. Barnholtz-Sloan, 2014, CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011: *Neuro Oncol*, v. 16 Suppl 4, p. iv1-iv63.
- Oyamada, M., K. Takebe, and Y. Oyamada, 2013, Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms: *Biochim Biophys Acta*, v. 1828, p. 118-33.
- Paino, T., E. Gangoso, J. M. Medina, and A. Tabernero, 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*, v. 59, p. 480-491.
- Pannasch, U., and N. Rouach, 2013, Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior: *Trends Neurosci*, v. 36, p. 405-17.
- Paramio JM, Navarro M, Segrelles C, Gómez-Casero E, Jorcano JL., 1999, PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 18(52):7462-8.
- Pellerin, L., 2003, Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation: *Neurochem Int*, v. 43, p. 331-8.
- Perea, G., and A. Araque, 2010, GLIA modulates synaptic transmission: *Brain Res Rev*, v. 63, p. 93-102.
- Philippi, M., L. Vyklicky, and R. K. Orkand, 1996, Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve: *Glia*, v. 17, p. 72-82.
- Piwnicka-Worms, H., K. B. Saunders, T. M. Roberts, A. E. Smith, and S. H. Cheng, 1987, Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src: *Cell*, v. 49, p. 75-82.
- Place, A. T., Z. Chen, F. R. Bakhshi, G. Liu, J. P. O'Bryan, and R. D. Minshall, 2011, Cooperative Role of Caveolin-1 and C-Terminal Src Kinase Binding Protein in C-Terminal Src Kinase-Mediated Negative Regulation of c-Src, *Mol Pharmacol*, v. 80, p. 665-72.
- Planchon, S. M., K. A. Waite, and C. Eng, 2008, The nuclear affairs of PTEN: *J Cell Sci*, v. 121, p. 249-53.

Bibliografía

- Pu, P., Z. Xia, S. Yu, and Q. Huang, 2004, Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors: *Clin Neurol Neurosurg*, v. 107, p. 49-54.
- Puc, J., M. Keniry, H. S. Li, T. K. Pandita, A. D. Choudhury, L. Memeo, M. Mansukhani, V. V. Murty, Z. Gaciong, S. E. Meek, H. Piwnica-Worms, H. Hibshoosh, and R. Parsons, 2005, Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability: *Cancer Cell*, v. 7, p. 193-204.
- Purow, B., and D. Schiff, 2009, Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass?: *Nat Rev Neurol*, v. 5, p. 419-26.
- Quintavalle, C., M. Garofalo, C. Zanca, G. Romano, M. Iaboni, M. del Basso De Caro, J. C. Martinez-Montero, M. Incoronato, G. Nuovo, C. M. Croce, and G. Condorelli, 2012, miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphatase PTP μ : *Oncogene*, v. 31, p. 858-68.
- Raftopoulou, M., S. Etienne-Manneville, A. Self, S. Nicholls, and A. Hall, 2004, Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN: *Science*, v. 303, p. 1179-81.
- Rao, R. D., and C. D. James, 2004, Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues: *Semin Oncol*, v. 31, p. 595-604.
- Redfern, R. E., D. Redfern, M. L. Furgason, M. Munson, A. H. Ross, and A. Gericke, 2008, PTEN phosphatase selectively binds phosphoinositides and undergoes structural changes: *Biochemistry*, v. 47, p. 2162-71.
- Reifenberger, G., J. Reifenberger, K. Ichimura, and V. P. Collins, 1995, Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site: *Cancer Res*, v. 55, p. 731-4.
- Reynhout, J. K., P. D. Lampe, and R. G. Johnson, 1992, An activator of protein kinase C inhibits gap junction communication between cultured bovine lens cells: *Exp Cell Res*, v. 198, p. 337-42.
- Riemenschneider, M. J., J. W. Jeuken, P. Wesseling, and G. Reifenberger, 2010, Molecular diagnostics of gliomas: state of the art: *Acta Neuropathol*, v. 120, p. 567-84.
- Romero, P., Z. Obradovic, and A. K. Dunker, 2004, Natively disordered proteins: functions and predictions: *Appl Bioinformatics*, v. 3, p. 105-13.
- Romero, P., Z. Obradovic, C. R. Kissinger, J. E. Villafranca, E. Garner, S. Guillot, and A. K. Dunker, 1998, Thousands of proteins likely to have long disordered regions: *Pac Symp Biocomput*, p. 437-48.
- Romero, P., Z. Obradovic, X. Li, E. C. Garner, C. J. Brown, and A. K. Dunker, 2001, Sequence complexity of disordered protein: *Proteins*, v. 42, p. 38-48.
- Roskoski R Jr., 2005, Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 331(1):1-14.
- Ross, A. H., and A. Gericke, 2009, Phosphorylation keeps PTEN phosphatase closed for business: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, p. 1297-8.
- Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, and C. Giaume, 2008, Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission: *Science*, v. 322, p. 1551-5.
- Rouach, N., E. Avignone, W. Meme, A. Koulakoff, L. Venance, F. Blomstrand, and C. Giaume, 2002, Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system: *Biol. Cell*, v. 94, p. 457-75.
- Russello, S. V., and S. K. Shore, 2004, SRC in human carcinogenesis: *Front Biosci*, v. 9, p. 139-44.

- Sabe, H., A. Hata, M. Okada, H. Nakagawa, and H. Hanafusa, 1994, Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 3984-8.
- Saitou T, Kajiwara K, Oneyama C, Suzuki T, Okada M. 2014, Roles of raft-anchored adaptor Cbp/PAG1 in spatial regulation of c-Src kinase. *PLoS One*. 9(3):e93470.
- Sakano, S., A. Iwama, J. Inazawa, T. Ariyama, M. Ohno, and T. Suda, 1994, Molecular cloning of a novel non-receptor tyrosine kinase, HYL (hematopoietic consensus tyrosine-lacking kinase): *Oncogene*, v. 9, p. 1155-61.
- Salm, A. K., and K. D. McCarthy, 1990, Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia: *Glia*, v. 3, p. 529-38.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger, and A. Alvarez-Buylla, 2004, Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration: *Nature*, v. 427, p. 740-4.
- Sánchez-Alvarez, R., A. Tabernero, L. I. Sánchez-Abarca, A. Orfao, C. Giaume, and J. M. Medina, 2001, Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide: *FEBS Lett*, v. 509, p. 202-6.
- Sánchez-Alvarez, R., T. Paíno, S. Herrero-González, J. M. Medina, and A. Tabernero, 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*, v. 54, p. 125-34.
- Sansal, I., and W. R. Sellers, 2004, The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway: *J Clin Oncol*, v. 22, p. 2954-63.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini, 2005, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex: *Science*, v. 307, p. 1098-101.
- Schindler, T., F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, and J. Kuriyan, 1999, Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor: *Mol Cell*, v. 3, p. 639-48.
- Schousboe, A., and H. S. Waagepetersen, 2006, Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission: *Curr Top Med Chem*, v. 6, p. 929-34.
- Schubert, A. L., W. Schubert, D. C. Spray, and M. P. Lisanti, 2002, Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1: *Biochemistry*, v. 41, p. 5754-64.
- Segawa, Y., H. Suga, N. Iwabe, C. Oneyama, T. Akagi, T. Miyata, and M. Okada, 2006, Functional development of Src tyrosine kinases during evolution from a unicellular ancestor to multicellular animals: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 12021-6.
- Segretain, D., and M. M. Falk, 2004, Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal: *Biochim Biophys Acta*, v. 1662, p. 3-21.
- Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhauser, 2006, Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective: *Nat Rev Neurosci*, v. 7, p. 194-206.
- Seo, J. H., Y. Ahn, S. R. Lee, C. Y. Yeo, and K. C. Hur, 2005, The Major Target of the Endogenously Generated Reactive Oxygen Species in Response to Insulin Stimulation Is Phosphatase and Tensin Homolog and Not Phosphoinositide-3 Kinase (PI-3 Kinase) in the PI-3 Kinase/Akt Pathway, *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 348-57.

Bibliografía

- Sgroi, D. C., 2009, Breast cancer SRC activity: bad to the bone: *Cancer Cell*, v. 16, p. 1-2.
- Shao, Q., H. Wang, E. McLachlan, G. I. Veitch, and D. W. Laird, 2005, Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype: *Cancer Res*, v. 65, p. 2705-11.
- Shen, W. H., A. S. Balajee, J. Wang, H. Wu, C. Eng, P. P. Pandolfi, and Y. Yin, 2007, Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity: *Cell*, v. 128, p. 157-70.
- Shinoura, N., L. Chen, M. A. Wani, Y. G. Kim, J. J. Larson, R. E. Warnick, M. Simon, A. G. Menon, W. L. Bi, and P. J. Stambrook, 1996, Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: implications in brain tumor gene therapy: *J Neurosurg*, v. 84, p. 839-45.
- Sicheri, F., and J. Kuriyan, 1997, Structures of Src-family tyrosine kinases: *Curr Opin Struct Biol*, v. 7, p. 777-85.
- Sin, W. C., S. Crespin, and M. Mesnil, 2012, Opposing roles of connexin43 in glioma progression: *Biochim Biophys Acta*, v. 1818, p. 2058-67.
- Singh, D., J. L. Solan, S. M. Taffet, R. Javier, and P. D. Lampe, 2005, Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner: *J Biol Chem*, v. 280, p. 30416-21.
- Singh, G., and A. M. Chan, 2011, Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications: *Curr Cancer Drug Targets*, v. 11, p. 536-47.
- Singh, S., J. Trevino, N. Bora-Singhal, D. Coppola, E. Haura, S. Altiok, and S. P. Chellappan, 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*, v. 11, p. 73.
- Smart, J. E., H. Oppermann, A. P. Czernilofsky, A. F. Purchio, R. L. Erikson, and J. M. Bishop, 1981, Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src): *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, p. 6013-7.
- Söhl, G., S. Maxeiner, and K. Willecke, 2005, Expression and functions of neuronal gap junctions: *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, p. 191-200.
- Solan, J. L., and P. D. Lampe, 2005, Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly: *Biochim Biophys Acta*, v. 1711, p. 154-63.
- Solan, J. L., and P. D. Lampe, 2009, Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects: *Biochem J*, v. 419, p. 261-72.
- Solan, J. L., and P. D. Lampe, 2014, Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo: *FEBS Lett*, v. 588, p. 1423-9.
- Somani, A. K., J. S. Bignon, G. B. Mills, K. A. Siminovitch, and D. R. Branch, 1997, Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase: *J Biol Chem*, v. 272, p. 21113-9.
- Sorgen, P. L., H. S. Duffy, P. Sahoo, W. Coombs, M. Delmar, and D. C. Spray, 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*, v. 279, p. 54695-701.
- Soroceanu, L., T. Manning, and H. Sontheimer, 2001, Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas: *Glia*, v. 33, p. 107-117.
- Sotelo, N. S., J. T. Schepens, M. Valiente, W. J. Hendriks, and R. Pulido, 2015, PTEN-PDZ domain interactions: binding of PTEN to PDZ domains of PTPN13: *Methods*, v. 77-78, p. 147-56.

- Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski, and T. W. Mak, 1998, Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN: *Cell*, v. 95, p. 29-39.
- Stark, A. M., A. Nabavi, H. M. Mehdorn, and U. Blomer, 2005, Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution: *Surg Neurol*, v. 63, p. 162-9; discussion 169.
- Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng, and S. V. Tavtigian, 1997, Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers: *Nat Genet*, v. 15, p. 356-62.
- Stevens, B., 2008, Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits: *Neurosignals*, v. 16, p. 278-88.
- Stewart, R. A., D. M. Li, H. Huang, and T. Xu, 2003, A genetic screen for modifiers of the lats tumor suppressor gene identifies C-terminal Src kinase as a regulator of cell proliferation in *Drosophila*: *Oncogene*, v. 22, p. 6436-44.
- Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, and R. O. Mirimanoff, 2009, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial: *Lancet Oncol*, v. 10, p. 459-66.
- Sudol, M., H. Greulich, L. Newman, A. Sarkar, J. Sukegawa, and T. Yamamoto, 1993, A novel Yes-related kinase, Yrk, is expressed at elevated levels in neural and hematopoietic tissues: *Oncogene*, v. 8, p. 823-31.
- Summy, J. M., and G. E. Gallick, 2003, Src family kinases in tumor progression and metastasis: *Cancer Metastasis Rev*, v. 22, p. 337-58.
- Suzuki, A., J. L. de la Pompa, V. Stambolic, A. J. Elia, T. Sasaki, I. del Barco Barrantes, A. Ho, A. Wakeham, A. Itie, W. Khoo, M. Fukumoto, and T. W. Mak, 1998, High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice: *Curr Biol*, v. 8, p. 1169-78.
- Swenson, K. I., H. Piwnicka-Worms, H. McNamee, and D. L. Paul, 1990, Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication: *Cell Regul*, v. 1, p. 989-1002.
- Tabernerero A, Gangoso E, Jaraíz-Rodríguez M, Medina JM, 2015, The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. *Neuroscience*.
- Tabernerero, A., A. Orfao, and J. Medina, 1996b, Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry: *Neuroscience Research*, v. 24, p. 131-138.
- Tabernerero, A., C. Giaume, and J. Medina, 1996a, Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions: *Glia*, v. 16, p. 187-195.
- Tabernerero, A., C. Jiménez, A. Velasco, C. Giaume, and J. M. Medina, 2001, The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation: *J Neurochem*, v. 78, p. 890-8.

Bibliografía

- Takeya, T., and H. Hanafusa, 1983, Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus: *Cell*, v. 32, p. 881-90.
- Tamguney, T., and D. Stokoe, 2007, New insights into PTEN: *J Cell Sci*, v. 120, p. 4071-9.
- Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, and K. M. Yamada, 1998, Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN: *Science*, v. 280, p. 1614-7.
- Tanaka, H., K. Akagi, C. Oneyama, M. Tanaka, Y. Sasaki, T. Kanou, Y. H. Lee, D. Yokogawa, M. W. Dobenecker, A. Nakagawa, M. Okada, and T. Ikegami, 2013, Identification of a new interaction mode between the Src homology 2 domain of C-terminal Src kinase (Csk) and Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains: *J Biol Chem*, v. 288, p. 15240-54.
- Thevenin, A. F., T. J. Kowal, J. T. Fong, R. M. Kells, C. G. Fisher, and M. M. Falk, 2013, Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation: *Physiology (Bethesda)*, v. 28, p. 93-116.
- Thomas, J. W., B. Ellis, R. J. Boerner, W. B. Knight, G. C. White, 2nd, and M. D. Schaller, 1998, SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src: *J Biol Chem*, v. 273, p. 577-83.
- Tobe K, Sabe H, Yamamoto T, Yamauchi T, Asai S, Kaburagi Y., 1996, Csk enhances insulin-stimulated dephosphorylation of focal adhesion proteins. *Mol Cell Biol*.16:4765–72.
- Toyofuku, T., M. Yabuki, K. Otsu, T. Kuzuya, M. Hori, and M. Tada, 1998, Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes: *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 12725-12731.
- Toyofuku, T., Y. Akamatsu, H. Zhang, T. Kuzuya, M. Tada, and M. Hori, 2001, c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes: *J Biol Chem*, v. 276, p. 1780-8.
- Trosko, J. E., and R. J. Ruch, 1998, Cell-cell communication in carcinogenesis: *Front Biosci*, v. 3, p. D208-36.
- Trotman, L. C., X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N. P. Pavletich, B. S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. G. Chi, H. J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, and P. P. Pandolfi, 2007, Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression: *Cell*, v. 128, p. 141-56.
- Turpin, A., A. Sharif, L. Stoven, S. Blond, C. A. Maurage, and E. Le Rhun, 2015, [The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]: *Bull Cancer*, v. 102, p. 24-33.
- Valiente, M., A. Andres-Pons, B. Gomar, J. Torres, A. Gil, C. Tapparel, S. E. Antonarakis, and R. Pulido, 2005, Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases: *J Biol Chem*, v. 280, p. 28936-43.
- Van Haastert PJ1, Devreotes PN., 2004, Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(8):626-34.
- Vanslyke, J. K., C. C. Naus, and L. S. Musil, 2009, Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins: *Mol Biol Cell*, v. 20, p. 2451-63.

- Vazquez, F., and P. Devreotes, 2006, Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction: *Cell Cycle*, v. 5, p. 1523-7.
- Vazquez, F., S. Ramaswamy, N. Nakamura, and W. R. Sellers, 2000, Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function, *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 5010-8.
- Vega-Agapito, V., A. Almeida, M. Hatzoglou, and J. P. Bolanos, 2002, Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system $\gamma(+)$ in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine: *J Biol Chem*, v. 277, p. 29753-9.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, and D. N. Hayes, 2010, Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1: *Cancer Cell*, v. 17, p. 98-110.
- Vicario, C., and J. M. Medina, 1992, Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period: *J Neurochem*, v. 59, p. 32-40.
- Vigneswaran, K., S. Neill, and C. G. Hadjipanayis, 2015, Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification: 3.
- Wang, X., L. C. Trotman, T. Koppie, A. Alimonti, Z. Chen, Z. Gao, J. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Cordon-Cardo, P. P. Pandolfi, and X. Jiang, 2007, NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN: *Cell*, v. 128, p. 129-39.
- Warn-Cramer, B. J., P. D. Lampe, W. E. Kurata, M. Y. Kanemitsu, L. W. Loo, W. Eckhart, and A. F. Lau, 1996, Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein: *J Biol Chem*, v. 271, p. 3779-86.
- Watanabe, N., S. Matsuda, S. Kuramochi, J. Tsuzuku, T. Yamamoto, and K. Endo, 1995, Expression of C-terminal src kinase in human colorectal cancer cell lines: *Jpn J Clin Oncol*, v. 25, p. 5-9.
- Weng, L.-P., J. L. Brown, and C. Eng, 2001, PTEN coordinates G1 arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model.
- Widschwendter, M., H. Fieggl, D. Egle, E. Mueller-Holzner, G. Spizzo, C. Marth, D. J. Weisenberger, M. Campan, J. Young, I. Jacobs, and P. W. Laird, 2007, Epigenetic stem cell signature in cancer: *Nat Genet*, v. 39, p. 157-8.
- Williams, J. C., A. Weijland, S. Gonfloni, A. Thompson, S. A. Courtneidge, G. Superti-Furga, and R. K. Wierenga, 1997, The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions: *J Mol Biol*, v. 274, p. 757-75.
- Wong, H. K., R. E. Fatimy, C. Onodera, Z. Wei, M. Yi, A. Mohan, S. Gowrisankaran, P. Karmali, E. Marcusson, H. Wakimoto, R. Stephens, E. J. Uhlmann, J. S. Song, B. Tannous, and A. M. Krichevsky, 2015, The Cancer Genome Atlas Analysis Predicts MicroRNA for Targeting Cancer Growth and Vascularization in Glioblastoma: *Mol Ther*.
- Wu RC1, Li X, Schönthal AH., 2000, Transcriptional activation of p21WAF1 by PTEN/MMAC1 tumor suppressor. *Mol Cell Biochem*. 203(1-2):59-71.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M. N. Hall, 2006, TOR signaling in growth and metabolism: *Cell*, v. 124, p. 471-84.

Bibliografía

- Xiao, W. Z., D. H. Han, F. Wang, Y. Q. Wang, Y. H. Zhu, Y. F. Wu, N. T. Liu, and J. Y. Sun, 2014, Relationships between PTEN gene mutations and prognosis in glioma: a meta-analysis: *Tumour Biol*, v. 35, p. 6687-93.
- Xie, H., D. W. Laird, T. H. Chang, and V. W. Hu, 1997, A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization: *J Cell Biol*, v. 137, p. 203-10.
- Xu, W., S. C. Harrison, and M. J. Eck, 1997, Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src: *Nature*, v. 385, p. 595-602.
- Yamaguchi, H., and W. A. Hendrickson, 1996, Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation: *Nature*, v. 384, p. 484-9.
- Yang, G., Q. Li, S. Ren, X. Lu, L. Fang, W. Zhou, F. Zhang, F. Xu, Z. Zhang, R. Zeng, F. Lottspeich, and Z. Chen, 2009, Proteomic, functional and motif-based analysis of C-terminal Src kinase-interacting proteins: *Proteomics*, v. 9, p. 4944-61.
- Yao Q1, Liu BQ, Li H, McGarrigle D, Xing BW, Zhou MT, Wang Z, Zhang JJ, Huang XY, Guo L., 2014, C-terminal Src kinase (Csk)-mediated phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) promotes proteolytic cleavage and nuclear translocation of eEF2. *J Biol Chem*. 289(18):12666-78. doi: 10.1074/jbc.M113.546481. Epub 2014 Mar 19.
- Yaqub, S., H. Abrahamsen, B. Zimmerman, N. Kholod, K. M. Torgersen, T. Mustelin, F. W. Herberg, K. Tasken, and T. Vang, 2003, Activation of C-terminal Src kinase (Csk) by phosphorylation at serine-364 depends on the Csk-Src homology 3 domain: *Biochem J*, v. 372, p. 271-8.
- Yeatman, T. J., 2004, A renaissance for SRC: *Nat Rev Cancer*, v. 4, p. 470-80.
- Yong, R. L., and N. M. Tsankova, 2015, Emerging Interplay of Genetics and Epigenetics in Gliomas: A New Hope for Targeted Therapy: *Semin Pediatr Neurol*, v. 22, p. 14-22.
- Yu, S. C., H. L. Xiao, X. F. Jiang, Q. L. Wang, Y. Li, X. J. Yang, Y. F. Ping, J. J. Duan, J. Y. Jiang, X. Z.
- Ye, S. L. Xu, Y. H. Xin, X. H. Yao, J. H. Chen, W. H. Chu, W. Sun, B. Wang, J. M. Wang, X. Zhang, and X. W. Bian, 2012, Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin: *Stem Cells*, v. 30, p. 108-20.
- Zhang, J., J. C. Grindley, T. Yin, S. Jayasinghe, X. C. He, J. T. Ross, J. S. Haug, D. Rupp, K. S. Porter-Westpfahl, L. M. Wiedemann, H. Wu, and L. Li, 2006, PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention: *Nature*, v. 441, p. 518-22.
- Zhang, S. Q., W. Yang, M. I. Kontaridis, T. G. Bivona, G. Wen, T. Araki, J. Luo, J. A. Thompson, B. L. Schraven, M. R. Philips, and B. G. Neel, 2004, Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment: *Mol Cell*, v. 13, p. 341-55.
- Zhang, S., Q. Wang, L. Liu, X. Hong, Y. Zhang, and L. Tao, 2015, Gap Junctions Enhance the Antiproliferative Effect of MicroRNA-124-3p in Glioblastoma Cells: *J Cell Physiol*.
- Zhang, S., W. C. Huang, P. Li, H. Guo, S. B. Poh, S. W. Brady, Y. Xiong, L. M. Tseng, S. H. Li, Z. Ding, A. A. Sahin, F. J. Esteva, G. N. Hortobagyi, and D. Yu, 2011, Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways: *Nat Med*, v. 17, p. 461-9.
- Zhang, Y. W., I. Morita, M. Ikeda, K. W. Ma, and S. Murota, 2001, Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27: *Oncogene*, v. 20, p. 4138-49.

- Zhang, Y. W., K. Nakayama, and I. Morita, 2003b, A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2): *Cancer Res*, v. 63, p. 1623-30.
- Zhang, Y. W., M. Kaneda, and I. Morita, 2003a, The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43: *J Biol Chem*, v. 278, p. 44852-6.
- Zheng, X. M., Y. Wang, and C. J. Pallen, 1992, Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase: *Nature*, v. 359, p. 336-9.
- Zhou J, Scholes J, Hsieh JT., 2003, Characterization of a novel negative regulator (DOC-2/DAB2) of c-Src in normal prostatic epithelium and cancer. *J Biol Chem*.278:6936–41.
- Zhou, D., P. Dong, Y. M. Li, F. C. Guo, A. P. Zhang, R. Z. Song, Y. M. Zhang, Z. Y. Li, D. Yuan, and C. Yang, 2015, Overexpression of Csk-binding protein decreases growth, invasion, and migration of esophageal carcinoma cells by controlling Src activation: *World J Gastroenterol*, v. 21, p. 1814-20.
- Zhu, D., S. Caveney, G. M. Kidder, and C. C. G. Naus, 1991, Transfection of C6 glioma-cells with connexin-43 cDNA - analysis of expression, intercellular coupling, and cell-proliferation: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 1883-1887.
- Zhu, F., B. Y. Choi, W. Y. Ma, Z. Zhao, Y. Zhang, Y. Y. Cho, H. S. Choi, A. Imamoto, A. M. Bode, and Z. Dong, 2006, COOH-terminal Src kinase-mediated c-Jun phosphorylation promotes c-Jun degradation and inhibits cell transformation: *Cancer Res*, v. 66, p. 5729-36.
- Zimmer, D. B., C. R. Green, W. H. Evans, and N. B. Gilula, 1987, Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures.