



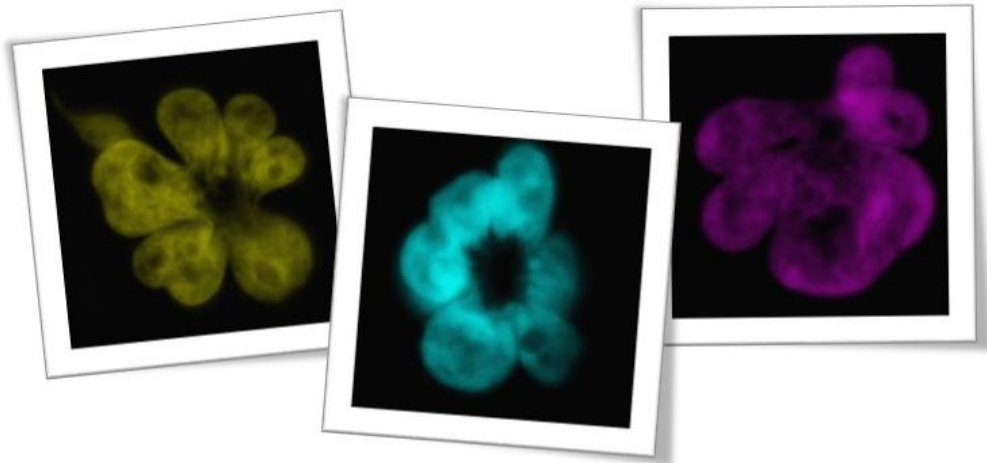
**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN**

# **Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células de glioma, neuronas y astrocitos**

**Uptake of cell-penetrating peptides in glioma cells,  
neurons and astrocytes**



**Laura García Vicente**

**Trabajo de Fin de Grado en Biología**

**Junio de 2016**

## RESUMEN

La conexina 43 (Cx43) es la principal proteína formadora de *gap junctions* en astrocitos y su expresión está disminuida en los gliomas. Estos tumores están formados por una población heterogénea de células, entre las que se incluyen algunas con propiedades de célula madre, denominadas células madre de glioma (GSCs, *glioma stem cells*), las cuales son altamente tumorigénicas y no expresan Cx43. La restauración de la Cx43 revierte el fenotipo de GSC y, con ello, disminuye la tumorigenicidad de estas células. Este efecto antitumorigénico se basa, entre otros mecanismos, en la interacción entre el extremo carboxilo terminal de la Cx43 y la tirosina kinasa c-Src por lo que, como posible estrategia terapéutica, se generaron péptidos penetrantes basados en las regiones de la Cx43 que interactúan con c-Src. Algunos de estos péptidos son capaces de mimetizar el efecto de la Cx43 sobre la inhibición de c-Src y, de esta manera, de revertir el fenotipo de GSC. Por ello, en este trabajo estudiamos la cinética y características de la internalización de estos péptidos en diferentes tipos celulares en cultivo, utilizando microscopía de fluorescencia. Nuestro estudio indica que la captación del péptido que contiene la secuencia de la Cx43 que interactúa con c-Src (aminoácidos del 266 al 283) es mayor en células de glioma, incluyendo las GSCs, que en astrocitos y es inapreciable en neuronas. Además, la localización subcelular de los péptidos internalizados depende de la secuencia de la Cx43 que contengan, lo cual se debe, probablemente, a interacciones con otras biomoléculas celulares. A este respecto, observamos que el péptido que contiene los aminoácidos del 266 al 283 de la Cx43 se dirige a la membrana plasmática, para interactuar con c-Src unido a fosfatidilserina.

## ABSTRACT

Connexin-43 (Cx43) is the main gap junction channel-forming protein in astrocytes and is downregulated in malignant gliomas. These tumours are composed of a heterogeneous population of cells that include many with stem-cell-like properties, called glioma stem cells (GSCs), which are highly tumorigenic and lack Cx43 expression. Interestingly, restoring Cx43 reverses GSC phenotype and consequently reduces their tumorigenicity. This antitumorigenic effect is based in the interaction between the carboxy tail of Cx43 and the tyrosine kinase c-Src, so that different cell-penetrating peptides based on the regions of Cx43 that interacts with c-Src were designed as a possible therapeutic target. Some of this peptides mimic the effect of Cx43 on c-Src inhibition and, consequently, reverse GSC phenotype. Therefore, we studied the internalization kinetics and characteristics of these peptides in different cell types expanded in adherent culture using fluorescence microscopy. We showed that the uptake of the peptide containing the sequence of Cx43 that interacts with c-Src (amino acids 266 to 283) is null in neurons, low in astrocytes and high in glioma cells, including GSCs. Our results revealed that different peptides reach different locations depending on the sequence of Cx43 contained. This fact is probably a consequence of their interactions with other cellular biomolecules. In this respect we found that the peptide containing amino acids 266 to 283 of Cx43 mainly goes to the plasma membrane, where it probably interacts with c-Src anchored to phosphatidylserine.

## ABREVIATURAS

CPP.....	Péptido penetrante
Cx43.....	Conexina-43
Cy2.....	Cianina-2
DAPI.....	4'6-diamino-2-fenilindol
DMEM.....	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO.....	Dimetil sulfóxido
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
EDTA.....	Ácido etilendiaminotetracético
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
FBS.....	Suero fetal bovino
FGF.....	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC.....	Isotiocianato de fluoresceína
GSC.....	Célula madre de glioma
HIV-1.....	Virus de la inmunodeficiencia humana 1
HSPG.....	Proteoglicano de heparán sulfato
IgG.....	Inmunoglobulina G
IP.....	Yoduro de propidio
PBS.....	Tampón fosfato salino
PS.....	Fosfatidilserina
RNA.....	Ácido ribonucleico
SNC.....	Sistema nervioso central
TAT.....	Transactivador de la transcripción del HIV-1
TuJ-1.....	$\beta$ III-tubulina
ZO-1.....	Zonula occludens-1

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Las células del sistema nervioso central .....	1
1.2. Los gliomas.....	1
1.3. Las uniones comunicantes .....	2
1.4. La conexina-43 como proteína supresora de tumores .....	3
1.5. Los péptidos penetrantes .....	4
1.6. El glicocálix de las células tumorales .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1. Material.....	8
3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario .....	8
3.1.2. Líneas celulares.....	8
3.1.3. Medios instrumentales .....	8
3.1.4. Productos.....	9
3.1.4.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de la línea celular C6.....	9
3.1.4.2. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de astrocitos y neuronas ....	10
3.1.4.3. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de las líneas G166 y G9 ....	10
3.1.4.4. Productos utilizados para estudiar la internalización de los péptidos .....	10
3.1.4.5. Péptidos penetrantes .....	10
3.2. Métodos .....	11
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares .....	11
3.2.1.1. Composición de las disoluciones .....	11
3.2.1.2. Cultivo de células de glioma .....	11
3.2.1.3. Cultivo de células madre de glioma .....	12
3.2.1.4. Cultivo primario de neuronas .....	12
3.2.1.5. Cultivo primario de astrocitos .....	12
3.2.2. Estudios de internalización de péptidos .....	13
3.2.3. Determinación de la expresión de proteínas mediante inmunocitoquímica .....	13
3.2.4. Determinación de la muerte neuronal con yoduro de propidio.....	14
3.2.5. Detección de fosfatidilserina con anexina V .....	14
3.2.6. Microscopía de fluorescencia y confocal.....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
4.1. Estudio de la cinética de internalización de péptidos penetrantes basados en la conexina-43	15
4.2. Estudio de la localización subcelular de péptidos penetrantes basados en la conexina-43 .....	21

<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las uniones comunicantes y la conexina-43.....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Dominio carboxilo terminal de la conexina-43 y proteínas con las que interacciona .....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Posibles vías de internalización de péptidos catiónicos con residuos de arginina .....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Glicanos implicados en la progresión tumoral. ....	<b>6</b>
<b>Figura 5.</b> Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en astrocitos .....	<b>16</b>
<b>Figura 6.</b> Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células de glioma C6.....	<b>17</b>
<b>Figura 7.</b> Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células madre de glioma G166	<b>18</b>
<b>Figura 8.</b> Efecto de la concentración en la internalización de péptidos penetrantes.....	<b>19</b>
<b>Figura 9.</b> Comparación de la internalización de péptidos penetrantes en diferentes líneas de células madre de glioma .....	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b> Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en neuronas .....	<b>20</b>
<b>Figura 11.</b> Relación entre muerte celular y captación de péptidos penetrantes en el cultivo de neuronas .....	<b>21</b>
<b>Figura 12.</b> Localización subcelular de péptidos penetrantes en astrocitos, células de glioma C6 y células madre de glioma G166.....	<b>22</b>
<b>Figura 13.</b> Localización de c-Src, fosfatidilserina y Cx43 <sub>266-283</sub> en células de glioma C6 .....	<b>23</b>
<b>Figura 14.</b> Mecanismo propuesto de interacción entre c-Src, los fosfolípidos con carga negativa de la cara interna de la membrana plasmática y el péptido TAT-Cx43 <sub>266-283</sub> .....	<b>25</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Las células del sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) está formado por distintos tipos celulares: neuronas y células gliales. Las neuronas son las células responsables de la transmisión de la información, la principal función del SNC, mediante la transmisión de impulsos nerviosos. Las células no neuronales, denominadas células gliales, desempeñan otras funciones, fundamentales para el correcto funcionamiento del SNC. Las células gliales se clasifican en células ependimarias, células microgliales y células macrogliales. A su vez, las células macrogliales se dividen en astrocitos y oligodendrocitos.

Los astrocitos constituyen la mayor población celular del SNC y realizan gran variedad de funciones. Participan activamente en las sinapsis neuronales<sup>1</sup>, forman parte de la barrera hematoencefálica<sup>2</sup>, proporcionan soporte metabólico a las neuronas<sup>3</sup>, sirven de apoyo a la diferenciación y migración neuronal durante el desarrollo embrionario<sup>4</sup>, tienen efecto neuroprotector<sup>5</sup> y funcionan como células madre<sup>6,7</sup>. La malignización de los astrocitos da lugar a los principales tumores cerebrales.

## 1.2. Los gliomas

Los tumores cerebrales constituyen aproximadamente un 2% de todas las neoplasias malignas<sup>8</sup> y presentan, en general, un mal pronóstico. Los tumores cerebrales más frecuentes son los gliomas y se forman a partir de cualquiera de los tres tipos de células gliales, siendo los más abundantes los derivados de astrocitos, denominados astrocitomas<sup>9</sup>.

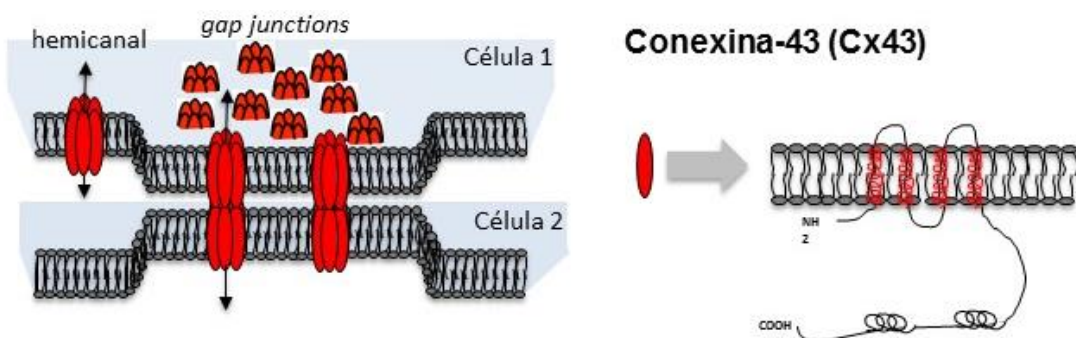
Los astrocitomas se clasifican tradicionalmente en cuatro grados histológicos<sup>10</sup>. Los astrocitomas de grado I (astrocitoma pilocítico) y grado II (astrocitoma difuso) son leves y crecen lentamente. Los astrocitomas de grado III (astrocitoma anaplásico) y grado IV (glioblastoma multiforme) son muy malignos y son, desgraciadamente, los más comunes en adultos<sup>11</sup>. Los glioblastomas son muy agresivos, progresan rápidamente y tienen alta actividad proliferativa e infiltrativa, lo cual supone una elevada tasa de recurrencia tras el tratamiento y reduce enormemente la esperanza de vida de las personas con este tipo de tumores.

Los glioblastomas están formados por una población heterogénea de células, que incluye células con propiedades de célula madre, denominadas células madre de glioma (GSCs, *glioma stem cells*)<sup>12,13</sup>. Estas células se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y diferenciación en diferentes tipos celulares y su resistencia a los tratamientos convencionales, lo que les confiere un

alto potencial oncogénico<sup>14</sup>. Existe un intenso debate sobre el papel de las GSC en los gliomas, que sugiere que el fenotipo de GSC es dinámico y su reversión parece una estrategia terapéutica prometedora<sup>15</sup>.

### 1.3. Las uniones comunicantes

Los astrocitos están acoplados a través de uniones comunicantes que les permiten coordinar su actividad y actuar como redes celulares<sup>16</sup>. Las uniones comunicantes o *gap junctions* están formadas por proteínas de la familia de las conexinas (**Figura 1**). Las conexinas se agrupan formando un anillo hexamérico denominado conexón, que atraviesa la bicapa lipídica. Cada conexina posee cuatro regiones transmembrana, dos bucles extracelulares, uno intracelular y los extremos amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma. Los bucles extracelulares de las conexinas de dos células adyacentes interactúan provocando la unión de los dos conexones. El diámetro del poro que se forma es de aproximadamente 14 Å y permite el intercambio de iones y moléculas de hasta 1 kDa, como segundos mensajeros o metabolitos<sup>17</sup>. Cuando un conexón no forma unión comunicante con el conexón de una célula vecina se denomina hemicanal y permite la comunicación entre el citoplasma y el medio extracelular, para dar un soporte autocrino y paracrino<sup>18</sup>.



**Figura 1. Estructura de las uniones comunicantes y la conexina-43** (tomada de Taberner *et al.*, 2016)<sup>19</sup>

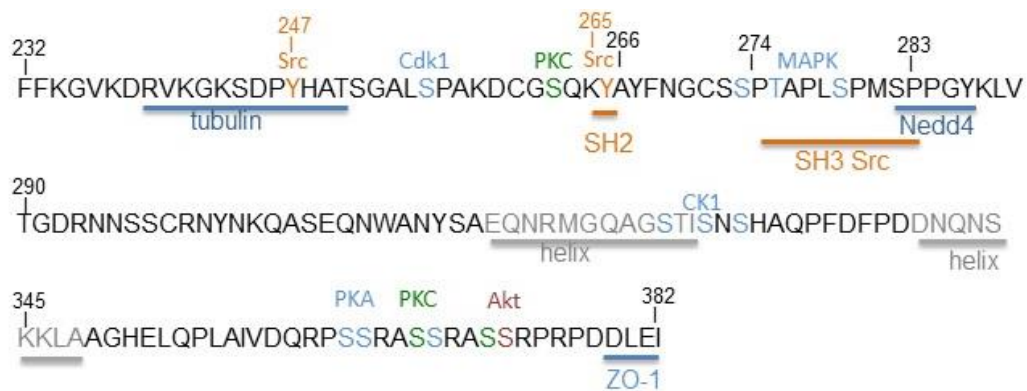
En los astrocitos, las uniones comunicantes están formadas fundamentalmente por conexina-43 (Cx43)<sup>20,21</sup>. Además de permitir la comunicación celular, el extremo carboxilo terminal de la Cx43 interactúa con un gran número de proteínas intracelulares de señalización y andamiaje, como cadherinas, ZO-1, c-Src, PKC o caveolinas, que permiten modificar la conformación de la conexina y regular la apertura y cierre del canal de forma aislada o cooperativa.

Este tipo de comunicación intercelular se pierde en la mayoría de células tumorales<sup>22</sup>. De hecho, la expresión de Cx43 se pierde frecuentemente en los gliomas de manera que, a medida que aumenta la malignidad de un tumor, disminuye la expresión de Cx43, llegando a niveles prácticamente inexistentes en los glioblastomas<sup>23</sup>.

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

Existen evidencias de que la restauración de la expresión de la Cx43 y el consecuente establecimiento de la comunicación intercelular disminuyen la velocidad de crecimiento de las células de glioma<sup>24</sup> y su tumorigenicidad<sup>25</sup>, por lo que se la considera una proteína supresora de tumores. Además, se ha descrito que la restauración de los niveles de Cx43 en células madre de glioma revierte su fenotipo tumoral, de manera que se originan tumores más pequeños que los formados por células madre de glioma sin Cx43. Los mecanismos que explican la acción antitumoral de la Cx43 son variados. Algunos autores proponen que se debe al aumento de la comunicación intercelular<sup>26,27</sup>, mientras que otros sostienen que es independiente de ésta<sup>28-31</sup>.

La Cx43 se ha caracterizado por abundancia de residuos fosforilables y varios dominios específicos de interacción con otras proteínas<sup>32-34</sup>. En concreto, el dominio carboxilo terminal de la Cx43 está implicado en la regulación de la proliferación celular, probablemente a través de interacciones con c-Src o ZO-1 (**Figura 1**).



**Figura 2. Dominio carboxilo terminal de la conexina-43 y proteínas con las que interacciona** (tomada de Tabernero *et al.*, 2016)<sup>19</sup>

La Cx43 interacciona con c-Src, una tirosina kinasa no receptora implicada en rutas de señalización que controlan diversos eventos biológicos como proliferación, diferenciación, supervivencia y migración. c-Src se une al dominio de unión a SH3 (*Src homology 3*) de la Cx43 (aminoácidos 274-284), una región rica en prolina y fosforila la tirosina 265, proporcionando un dominio de unión a SH2 (*Src homology 2*) y desencadenando la fosforilación de la tirosina 247<sup>35</sup>. Como consecuencia de estas fosforilaciones, la comunicación intercelular disminuye<sup>36,37</sup> y se producen cambios conformacionales que modifican el extremo carboxilo terminal de la Cx43<sup>38</sup>, afectando a la interacción con otras moléculas, como *Zonula occludens 1* (ZO-1)<sup>39</sup>.

La Cx43 interacciona con el segundo dominio PDZ de ZO-1 (PDZ-2) a través del dominio de unión a PDZ (últimos cuatro aminoácidos de la Cx43)<sup>40</sup>. Esta interacción interviene en la localización



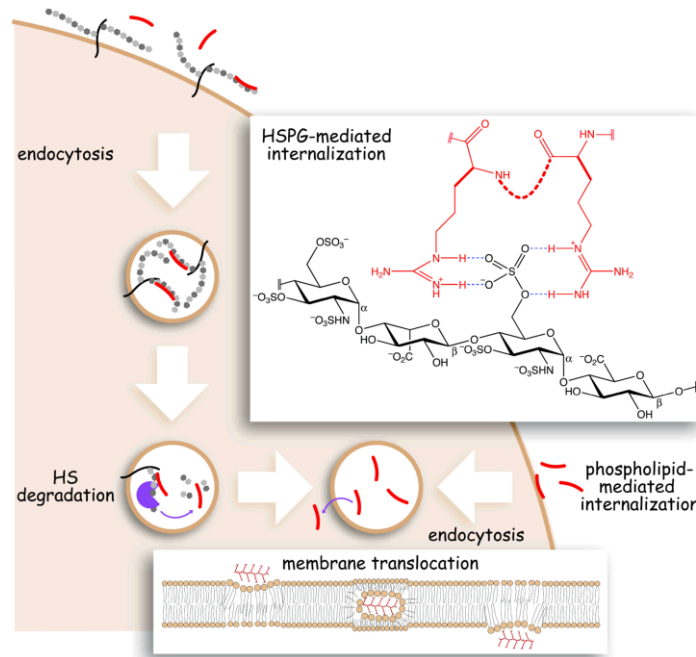
de la Cx43 en la superficie celular. Además, la interacción entre Cx43 y ZO-1 previene la localización citoplasmática de los dominios PDZ de ZO-1, que podría provocar la malignización celular<sup>41</sup>.

Aunque la capacidad de c-Src para fosforilar a la Cx43 e inhibir la comunicación intercelular es bien conocida, recientemente se ha demostrado que la interacción de la Cx43 con c-Src puede inhibir la actividad oncogénica de este último. Las células de glioma muestran gran actividad oncogénica de c-Src<sup>42</sup>, fundamental en la transformación fenotípica en los astrocitomas, y se ha comprobado que la restauración de la Cx43 en células de glioma reduce la actividad de c-Src al disminuir su forma activa (fosforilada en Tyr416) y aumentar su forma inactiva (fosforilada en Tyr527)<sup>43</sup>. Además, se ha demostrado que un péptido penetrante que contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src es capaz de mimetizar el efecto de la Cx43 sobre la actividad de c-Src y, por consiguiente, sobre el fenotipo de GSC, mostrándose como una estrategia terapéutica prometedora<sup>44</sup>.

### **1.5. Los péptidos penetrantes**

La membrana celular es impermeable a péptidos, proteínas, DNA y oligonucleótidos, lo cual limita el uso terapéutico de estos agentes biológicos. Sin embargo, existen pequeños péptidos catiónicos, conocidos como *protein transduction domains* (PTDs) o *cell-penetrating peptides* (CPPs), que cruzan eficientemente la membrana y permiten el transporte de macromoléculas heterólogas al interior celular<sup>45</sup>. Estos péptidos son internalizados por las células cuando se encuentran en el medio celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque la vía mediante la que lo hacen no se conoce claramente. Probablemente, se producen de manera inicial interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del péptido y las cargas negativas de la membrana celular que permiten la entrada en la célula. De manera general, la internalización de los CPPs parece requerir interacciones con los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) de la superficie celular<sup>46</sup>, seguidas por endocitosis de los complejos obtenidos por macropinocitosis y/o endocitosis dependiente de clatrina o caveolina<sup>47,48</sup>. Los HSPGs juegan un papel fundamental en la internalización de gran número de macromoléculas como factores de crecimiento<sup>49</sup>, poliaminas<sup>50</sup> y virus<sup>51</sup> y existen evidencias de que, además de encontrarse en la superficie celular, son transportados al citosol y al núcleo<sup>52</sup>, sugiriendo que existe una vía por la que algunos HSPGs escapan de la degradación en los lisosomas. Por tanto, es perfectamente plausible que los CPPs puedan viajar asociados a estas moléculas. El mecanismo endocítico utilizado dependerá de la naturaleza del agente y del complejo formado, así como del tipo y distribución de los proteoglicanos en la superficie celular, que varía en los diferentes tipos celulares. Una vez dentro de la célula, el péptido internalizado ejerce su función, aunque su potencia puede depender de la vía de entrada.

La capacidad de los policationes para facilitar la toma de macromoléculas se conoce desde hace casi 60 años<sup>53</sup>, pero el interés por este fenómeno reemergió en 1988 con el descubrimiento de la capacidad de la proteína TAT (factor de transactivación del HIV-1) para entrar en las células de mamíferos<sup>54,55</sup>. Desde entonces, TAT ha sido ampliamente estudiado con el objeto de determinar la secuencia necesaria para su internalización, concluyéndose que ésta se produce gracias a una secuencia de once aminoácidos correspondiente a una porción del dominio de unión al RNA (YGRKKRRQRRR)<sup>56</sup>. Esta región contiene seis residuos de arginina que parecen especialmente importantes en el proceso. La importancia de los residuos de arginina radica en sus grupos guanidino, que en condiciones fisiológicas presentan una carga positiva y gran capacidad de formar puentes de hidrógeno<sup>57</sup>. Aunque el papel de los grupos guanidino en la internalización de CPPs no se comprende completamente, existen evidencias de que estos grupos interaccionan estrechamente con la heparina, una forma de heparán sulfato altamente sulfatada presente en la superficie de las células de mamíferos<sup>58,59</sup>. Un papel alternativo de los grupos guanidino podría consistir en facilitar la unión a los lípidos de la superficie celular para formar complejos neutros que se translocarían a través de la bicapa lipídica<sup>60</sup>.



**Figura 3. Posibles vías de internalización de péptidos catiónicos con residuos de arginina** (tomada de Fuchs and Raines, 2006)<sup>61</sup>

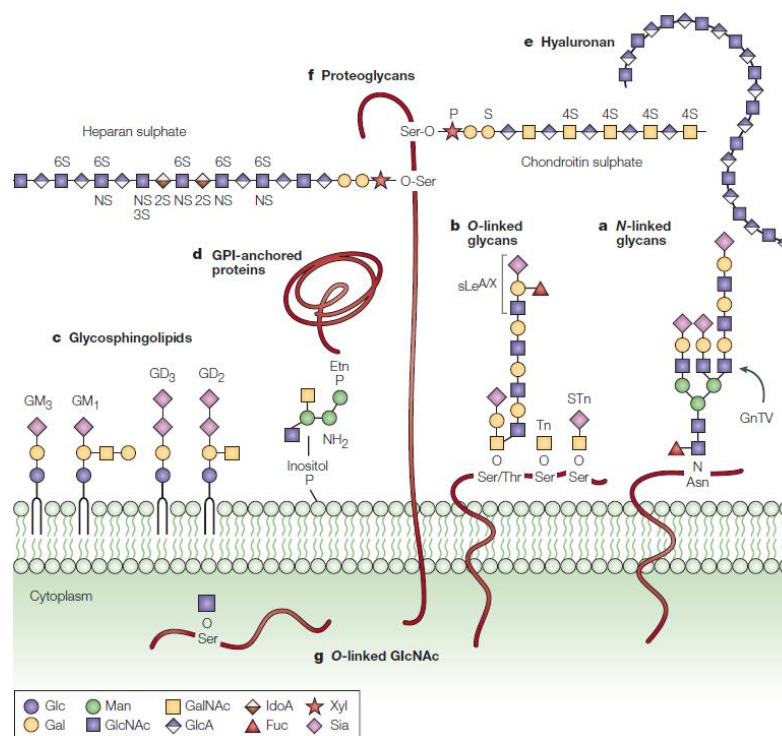
Se ha observado que TAT puede dirigir la internalización de grandes proteínas al interior de las células con cinéticas relativamente rápidas, por lo que se utiliza como herramienta biotecnológica para la transducción de proteínas. En este sentido, se ha utilizado la región penetrante de TAT para generar péptidos penetrantes basados en la Cx43, capaces de mimetizar la interacción de la Cx43 con c-Src y de revertir el fenotipo tumoral en células de glioma<sup>44</sup>.

## 1.6. El glicocáliz de las células tumorales

Las células tumorales expresan, de manera aberrante, numerosos glicanos (oligosacáridos y polisacáridos) en su superficie celular. Estos glicanos participan las interacciones célula-célula y en la transducción de señales y son fundamentales para muchos aspectos relacionados con la progresión del tumor, como proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis<sup>62</sup>. Las glicoproteínas juegan también un papel fundamental en la biología de las células madre tumorales, determinando procesos como la autorrenovación, la proliferación y la diferenciación.

Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) tienen gran importancia en estos procesos y se encuentran sobreexpresados en la superficie de las células tumorales, donde actúan como correceptores para factores de crecimiento facilitando la formación de complejos ligando-receptor, además de promover la proliferación y la angiogénesis<sup>63-65</sup>. Varios análisis bioquímicos e histológicos han mostrado que la síntesis de heparán sulfato se encuentra aumentada en células de glioma con respecto a células sanas y que existe en éstas un incremento en la secreción de glicosaminoglicanos al medio y a la superficie celular<sup>66</sup>. Por ejemplo, el glipicano-1, implicado en la regulación de la división y en la supervivencia celular, está sobreexpresado en células de glioma<sup>67</sup>.

Un gran número de glicanos sobreexpresados en las células tumorales en general y en los gliomas en particular tienen carga negativa (**Figura 4**) y, por ello, podrían favorecer la interacción con CPPs catiónicos. Es el caso de los residuos de ácido siálico (Sia), ácido glucurónico (GlcA) y grupos sulfato (S), entre otros.



**Figura 4. Glicanos implicados en la progresión tumoral** (tomada de Fuster and Esko, 2005)<sup>62</sup>

## **2. OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la Introducción, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la cinética de internalización de péptidos penetrantes basados en la conexina-43 en neuronas, astrocitos y células de glioma, incluidas las células madre de glioma.
2. Comparar la eficacia de la internalización de péptidos penetrantes basados en la conexina-43 en los diferentes tipos celulares.
3. Estudiar la localización subcelular de péptidos penetrantes basados en la conexina-43.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario**

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon ratas albinas Wistar, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA). Los animales se criaron en jaulas manteniendo el número de ejemplares adecuado a las dimensiones de las mismas. Se emplearon ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La humedad osciló entre el 45 y el 65% y la temperatura se mantuvo entre los 20 y los 25°C. Los animales fueron alimentados con una dieta sólida estándar (17% proteínas; 3% lípidos; 58,7% glúcidos; 4,3% celulosa; 5% sales minerales y 12% humedad). En todo momento los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y a la comida.

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas se emplearon fetos de 17,5 días de gestación (E17,5), mientras que para la obtención de los cultivos de astrocitos se utilizaron neonatos de un día de vida (P1). En todos los casos, los sacrificios de los animales fueron realizados siguiendo las normativas vigentes para la experimentación y el sacrificio de animales, según las directrices europeas (Convenio 123, Decisión 1999/575/CE, Directiva 2003/65/CE y Directiva 2010/63/UE), la legislación española (Ley 32/2007, Ley 6/2013, Real Decreto 1201/2005 y Real Decreto 53/2013) y de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Decreto 266/1998); así como los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

##### **3.1.2. Líneas celulares**

La línea celular de glioma de rata C6 fue proporcionada por el Prof. Christian Giaume del Collège de France (París, Francia) y tiene características de glioblastoma multiforme (grado IV)<sup>68</sup>.

La línea de células madre de glioma humano G166 fue suministrada por la casa comercial Biorep (Italia)<sup>69</sup>. La línea de células madre de glioma humano G9 fue obtenida en el laboratorio por D<sup>a</sup> Myriam Jaraíz en colaboración con el servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca (IBSAL).

##### **3.1.3. Medios instrumentales**

El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo *Milli-QR Integral 3 System* (Millipore Ibérica), con dispensadores y filtros de agua *Ellix* (agua purificada tipo II) y agua *Milli-Q* (agua ultrapura tipo I). Las pesadas se realizaron en balanzas analíticas Acculab, modelo *Atilon ATL-224-I* y Sartorius, modelo *1207 MP*. El pH se determinó con un medidor de protones HACH LANGE, modelo *HQ440d multi*.

Las centrifugaciones se realizaron centrífugas Eppendorf, modelos *miniSpin, 5414R* y *5702*.

Las cabinas de flujo laminar utilizadas fueron un modelo *TC 48* (Gelaire Flow Laboratories) y un modelo *CULTair BC100* (Cultek, S.L.U.).

Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y con flujo constante de CO<sub>2</sub> al 5%, en los incubadores automáticos de CO<sub>2</sub> modelos *Galaxy S* y *Galaxy 170* (RS Biotech). Los medios de cultivo y soluciones de cultivo fueron calentados en baños termostatzados a 37°C, modelos *Precistern* y *Precisdig* (Selecta).

Los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro, modelo *595-4520* (Nalgene, adquiridos a VWR). Para volúmenes pequeños de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (Acrodisc).

El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa modelo *S-20* termostatzada a 170°C (Selecta). El agua y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterilizaron por medio de calor húmedo en autoclaves Selecta modelos *437* o *Autester ST*.

Los cultivos primarios se realizaron empleando material estéril y fabricado específicamente para tal fin. Las neuronas fueron sembradas en placas Petri de 35 mm de diámetro, de la casa comercial BD Falcon, modelo *353001* (Becton & Dickinson Labware Europe). Los astrocitos y las células de glioma se sembraron siempre en placas *Nunc*, de diferentes tipos.

El conteo de las células previo a la siembra en placas se realizó mediante el dispositivo automático *Countess* (Invitrogen), en el que se han adaptado distintos protocolos para el diámetro y forma celular para cada tipo celular.

Para la realización de las agitaciones mecánicas, se emplearon dispositivos tipo vórtex, modelos *MS-1 minishaker* (IKA-Works Inc.) y *Fine Vortex* (FINEPCR).

La observación periódica de las células se realizó mediante un microscopio de contraste de fases modelo *Nikon TS100*. Se empleó un microscopio de fluorescencia invertido modelo *Nikon Eclipse TS2000*, captándose las imágenes con un programa informático *TCS-SP* (Leica Microscopy Systems) y una cámara de vídeo digital modelo *Leica DC 350F* (Leica Microsystems). El análisis de imágenes se llevó a cabo mediante el programa *ImageJ* (NIH Image), desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación del *National Institute of Health*. Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio láser confocal modelo *Leica DM-IRE2* (Leica Microscopy Systems) y las imágenes se analizaron empleando el programa informático de análisis de imagen *LCS Lite* (Leica).

### **3.1.4. Productos**

#### **3.1.4.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de la línea celular C6**

El medio de cultivo para el crecimiento de las células de glioma de la línea C6 fue del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), y procedió de la casa Sigma, así como la

penicilina G, la estreptomycinina y la anfotericina B. El suero fetal bovino (FBS) y la tripsina-EDTA procedieron de la casa Gibco. El DMSO utilizado para congelar las células se adquirió a Fluka.

#### 3.1.4.2 Productos utilizados para la preparación de los cultivos de astrocitos y neuronas

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 bovina (Fracción V) fueron suministradas por Roche Diagnostics SL. La tripsina y la citosina- $\beta$ -arabinofuranósido procedieron de la casa Sigma. La poli-L-lisina, utilizada para recubrir el fondo de las placas de cultivo, con objeto de facilitar la fijación de las células, procedía de la casa Sigma.

#### 3.1.4.3. Productos utilizados para la preparación de los cultivos de las líneas G166 y G9

El medio de cultivo RHB-A fue de la casa comercial SC Proven (StemCells). Los factores de crecimiento EGF y FGF-basic se adquirieron en la casa comercial Peprotech. B27 y N2 procedieron de la casa comercial Invitrogen. La acutasa procedió de la casa comercial Sigma-Aldrich. El medio de congelación *CryoStorTMCS10* procedió de la casa comercial STEMCELL Technologies SARL. La laminina utilizada para recubrir el fondo de las placas procedió de la casa Invitrogen.

#### 3.1.4.4. Productos utilizados para estudiar la internalización de los péptidos

El paraformaldehído utilizado para fijar las células y el detergente Triton X-100 para la permeabilización de las células procedieron de la casa Sigma. El medio de montaje para observaciones al microscopio *SlowFade Gold Antifade Reagent*, el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente del DNA y la anexina V empleada para la detección de fosfatidilserina fueron suministrados por Molecular Probes. Los portaobjetos y cubreobjetos utilizados para el montaje de inmunocitoquímicas fueron adquiridos en la casa comercial Thermo Scientific. La estreptavidina conjugada con Cy2 para la detección de los péptidos biotinilados procedió de Jackson ImmunoResearch, mientras que la estreptavidina conjugada con Cy5 se adquirió a Life Technologies. El yoduro de propidio utilizado para determinar la muerte celular procedió de la casa Fluka. El anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina (TuJ-1) (monoclonal, procedente de suero de ratón) procedió de la casa comercial Covance y el anticuerpo anti-c-Src (policlonal, procedente de suero de conejo) procedió de Cell Signaling. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 594, anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 594 y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488 (procedentes de suero de cabra) procedieron de Invitrogen.

#### 3.1.4.5. Péptidos penetrantes

Los péptidos sintéticos utilizados procedieron de GenScript. Las secuencias fueron:

TAT-biotina: YGRKKRRQRRR{LYS(BIOTIN)}

TAT-Cx43<sub>274-283</sub>-biotina: YGRKKRRQRRRPTAPLSPMSP{LYS(BIOTIN)}

TAT-Cx43<sub>266-283</sub>-biotina: YGRKKRRQRRRAYFNGCSSPTAPLSPMSP{LYS(BIOTIN)}

TAT-Cx43<sub>245-283</sub>-biotina: YGRKKRRQRRRDPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSP{LYS(BIOTIN)}

TAT-Cx43<sub>245-269</sub>-biotina: YGRKKRRQRRRDPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFN{LYS(BIOTIN)}

TAT-Cx43<sub>372-382</sub>-biotina: YGRKKRRQRRRSRASSRPRPDDLE{LYS(BIOTIN)}

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparación de los cultivos celulares

#### 3.2.1.1. Composición de las disoluciones

Las disoluciones empleadas se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2 y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

#### Medio de cultivo

DMEM + FBS 10%	(v/v)
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL

#### Medio de cultivo para células madre

RHB-A	(v/v)
N2	1%
B27	2%
EGF	20 ng/mL
b-FGF	20 ng/mL
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL

#### Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL

#### 3.2.1.2. Cultivo de células de glioma

Las células de glioma de rata C6 se cultivaron según el método descrito previamente por Taberero *et al.*<sup>70</sup>. Las células se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo en condiciones de crecimiento estándar, con dos cambios de medio por semana. Se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento, se procesaron para los distintos experimentos o se resembraron a menor densidad.

Para la resiembra, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con tripsina/EDTA durante 3-4 minutos a 37°C. Se recogieron en medio de cultivo 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 un contador de células automático y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada para los experimentos.



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

#### 3.2.1.3. Cultivo de células madre de glioma

Las células madre de glioma de las líneas G166 y G9 se cultivaron según el método descrito previamente por Pollard *et al.*<sup>69</sup>. Las células se sembraron en placas Petri recubiertas con laminina  $10\mu\text{g/mL}$  en el medio para células madre. Se mantuvieron en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , con un 5% de  $\text{CO}_2$  según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento se procesaron para los distintos experimentos o se resembraron a menor densidad.

Para la resiembra de las células madre de glioma humano, las células se lavaron con PBS y se incubaron con acetasa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4-5 minutos. Se centrifugaron durante 5 minutos a  $1000 \times g$ . Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio de cultivo. Se cuantificó el número de células empleando un contador de células automático y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada para los experimentos.

La congelación de las células se llevó a cabo en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniendo las células en crioviales, con un medio crioprotector.

#### 3.2.1.4. Cultivo primario de neuronas

Los cultivos de neuronas se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero *et al.*<sup>71</sup>. Los cultivos fueron realizados por la Dra. Marta Domínguez o la Dra. Ana Velasco, que están calificadas para manipular animales de experimentación.

Las células se sembraron en placas recubiertas con poli-L-lisina ( $1 \mu\text{g/cm}^2$ ) en medio de cultivo, a una densidad de  $0,7 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$ . Las neuronas se mantuvieron en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$  con un 5% de  $\text{CO}_2$ . En estas condiciones se obtienen cultivos de neuronas de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico contra el neurofilamento<sup>72</sup>. Los experimentos se realizaron cuatro días después de la siembra.

#### 3.2.1.5. Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero *et al.*<sup>71</sup>. Los cultivos fueron realizados por la Dra. Marta Domínguez o por la Dra. Ana Velasco, que están calificadas para manipular animales de experimentación.

Las células se sembraron en placas recubiertas con poli-L-lisina ( $1 \mu\text{g/cm}^2$ ) en medio de cultivo, con dos cambios de medio por semana, a una densidad de  $1,0 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$  y se colocaron en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Al tercer día se añadió citosina  $\beta$ -arabinofuranósido  $10 \mu\text{M}$ , que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la proliferación de la microglía y de las

células del linaje O-2A. 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<sup>70</sup>.

Para la realización de los experimentos se utilizaron astrocitos cultivados entre 18 y 21 días *in vitro* (DIV). Los astrocitos se sembraron como se indica en el apartado 3.2.1.2.

### **3.2.2. Estudios de internalización de péptidos**

Para la realización de las curvas dosis-respuesta, las células fueron incubadas durante cinco minutos a 37°C con distintas concentraciones (entre 0 y 50 µM) de los péptidos TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> biotinilados. Para los estudios de internalización y localización de los distintos péptidos, las células fueron incubadas durante treinta minutos a 37°C con los péptidos TAT, TAT-Cx43<sub>274-283</sub>, TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, TAT-Cx43<sub>245-283</sub>, TAT-Cx43<sub>245-269</sub> y TAT-Cx43<sub>372-382</sub> biotinilados, utilizándose en todos los casos concentraciones de 50 µM.

Las células incubadas con los péptidos se lavaron con abundante PBS en frío sobre hielo para detener la reacción. Es importante realizar bien estos lavados para eliminar los restos de péptido que se encuentren en el medio o adheridos a las membranas. A continuación, las células se fijaron con 500 µL/placa de formaldehído al 4% (p/v) durante 20 minutos, a temperatura ambiente y sin agitación. Pasado este tiempo, se lavaron varias veces con PBS. Una vez fijadas las células, se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy2, que revela la presencia de los péptidos biotinilados, diluida en solución de anticuerpos (FBS 10%, lisina 0,1 M y azida sódica 0,02% (p/v) disueltos en PBS 1x) (1:500) con Triton X-100 al 0,1% durante una 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 un minuto con DAPI diluido en solución de anticuerpos (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.

### **3.2.3. Determinación de la expresión de proteínas mediante inmunocitoquímica**

Con el objetivo de determinar la expresión y localización de las diferentes proteínas de interés, las células incubadas con el péptido y preparadas como se indica en el apartado anterior (sin montar) fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en solución de anticuerpos con Triton X-100 al 0,1%, durante tres horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con PBS y se incubaron las células con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, diluido en solución de anticuerpos con Triton X-100 al 0,1% durante una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y sin agitación.

Las diluciones empleadas fueron 1:500 para anti- $\beta$ III-tubulina, 1:50 para anti-c-*Src* y 1:1000 para los anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor® 594, anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor® 488 y anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor® 594).

#### **3.2.4. Determinación de la muerte neuronal con yoduro de propidio**

La adición de yoduro de propidio (IP) al medio con las células sin fijar nos permite identificar aquellas células que van a morir por necrosis y que presentan rupturas en su membrana, ya que estas células incorporan el yoduro de propidio, que se une al DNA y puede ser detectado por fluorescencia en la región roja del espectro.

Con el objetivo de determinar si el péptido provoca la muerte neuronal, se añadió el yoduro de propidio al medio del cultivo primario de neuronas (5:100), después de haber sido éstas incubadas con el péptido como se describe en el apartado 3.2.2. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y, una vez transcurrido este tiempo, se lavaron varias veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4%. Posteriormente, se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy2 y DAPI y se montaron para su observación. Con el objetivo de determinar si la muerte neuronal es previa a la incorporación del péptido, se procedió de la misma manera que en el caso anterior pero incubando las células con el yoduro de propidio antes del tratamiento con el péptido.

#### **3.2.5. Detección de fosfatidilserina con anexina V**

La fosfatidilserina es un fosfolípido de membrana localizado en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. La anexina V es una molécula capaz de unirse a la fosfatidilserina, por lo que si se encuentra conjugada con algún tipo de fluoróforo permite su observación mediante microscopía de fluorescencia.

Las células fijadas se incubaron durante 10 minutos con un tampón específico que contiene calcio para favorecer la unión anexina V-fosfatidilserina y, posteriormente, con anexina V conjugada con FITC diluida en el mismo tampón (1:500) durante 15 minutos con agitación muy suave. Pasado este tiempo, se lavaron una vez con el tampón, se fijaron durante 10 minutos con formaldehído y se realizaron varios lavados con PBS.

#### **3.2.6. Microscopía de fluorescencia y confocal**

Las células teñidas por inmunocitoquímica se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia. Para cuantificar la fluorescencia en las distintas condiciones se utilizó el programa *ImageJ*; se cuantificó la fluorescencia del canal verde y se normalizó en relación a la fluorescencia de los núcleos. 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.

## 4. RESULTADOS

Como se ha mencionado en la introducción, la Cx43 está implicada en la comunicación intercelular entre astrocitos mediante la formación de *gap junctions* y participa en la regulación de procesos celulares a través de su interacción con numerosas proteínas. La expresión de Cx43 se pierde frecuentemente en las células de glioma y se ha comprobado que su restauración en dichas células reduce su tasa de proliferación y su tumorigenicidad. De esta manera, se han generado, como posible opción terapéutica, péptidos penetrantes capaces de mimetizar el efecto de la Cx43 en células de glioma.

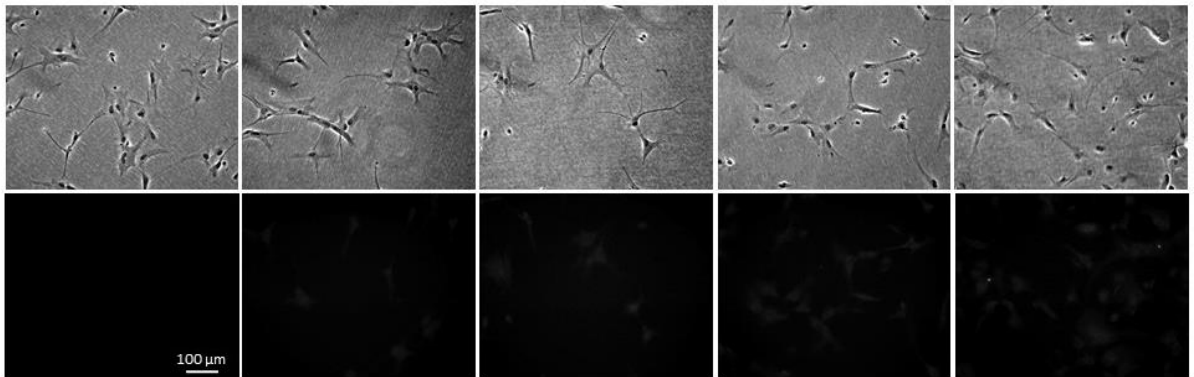
### 4.1. Estudio de la cinética de internalización de péptidos penetrantes basados en la conexina-43

Para el estudio de la cinética de internalización de péptidos penetrantes se utilizó la región de la Cx43 que interacciona con c-Src (aminoácidos del 266 al 283), fusionada a la secuencia penetrante de TAT. Se ha comprobado que este péptido es capaz de mimetizar el efecto de la Cx43 sobre la actividad de c-Src y, de esta manera, de revertir el fenotipo de GSC. Por ello, nos propusimos estudiar la cinética de internalización de este péptido en células sanas (astrocitos y neuronas) y en células malignas (células de glioma y células madre de glioma), con el objeto de comparar la eficacia de internalización de este péptido respecto a la secuencia penetrante de TAT y de determinar si existen diferencias entre los diferentes tipos celulares.

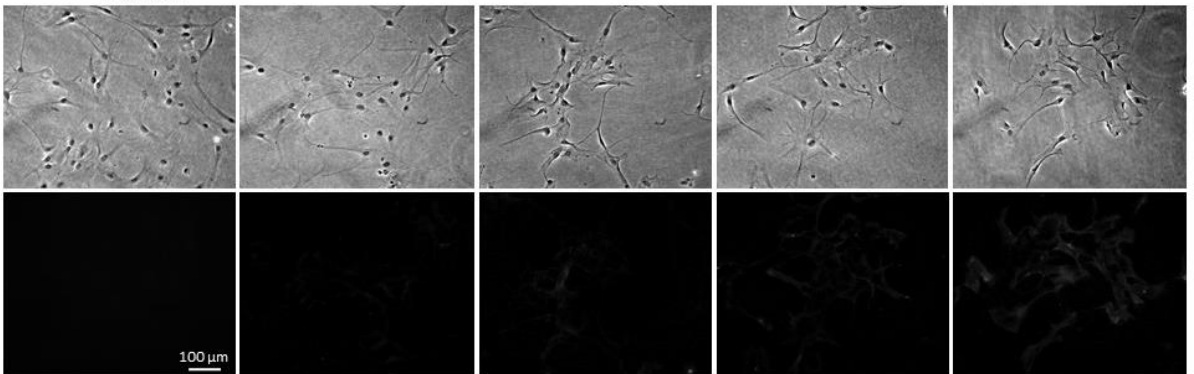
Para ello, las células se incubaron durante cinco minutos con el péptido (TAT o TAT-Cx43<sub>266-283</sub>) biotinilado a diferentes concentraciones, se fijaron y se reveló la presencia del péptido con estreptavidina, que se une específicamente a la biotina y está marcada con un fluoróforo (en este caso Cy2) que permite su observación mediante microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes en un microscopio de epifluorescencia y se cuantificó la fluorescencia mediante el programa *ImageJ*. Los valores de fluorescencia obtenidos corresponden a la cantidad de péptido internalizado por las células y permiten la realización de curvas dosis-respuesta para el estudio de la cinética de internalización en cada tipo celular, aunque no permiten la comparación entre los distintos tipos celulares.

De esta manera, se observó que la internalización del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> es dosis-dependiente tanto en astrocitos (**Figura 5**), como en células de glioma (**Figura 6**) y células madre de glioma (**Figura 7**), mientras que la internalización de TAT no lo es en tanta medida o alcanza antes valores de saturación.

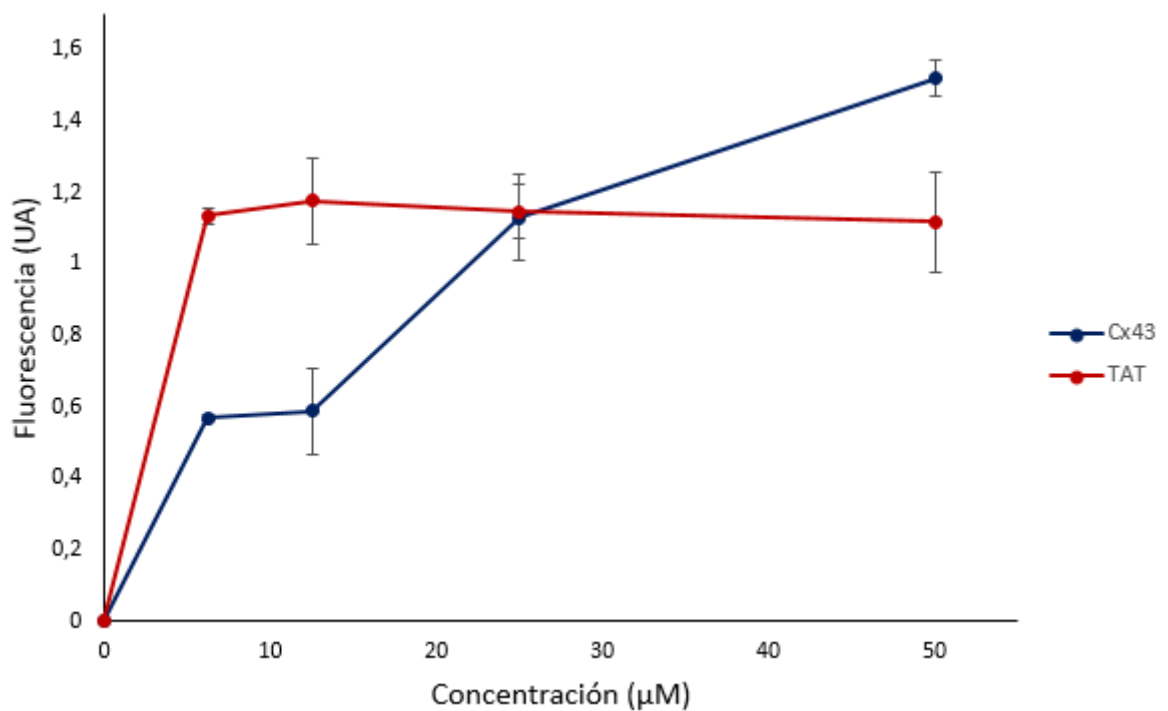
## A TAT



## TAT-Cx43<sub>266-283</sub>

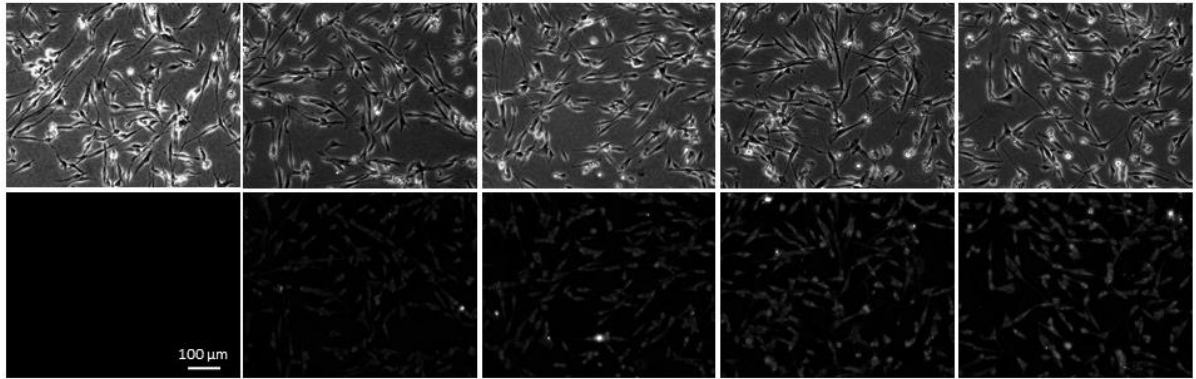


## B

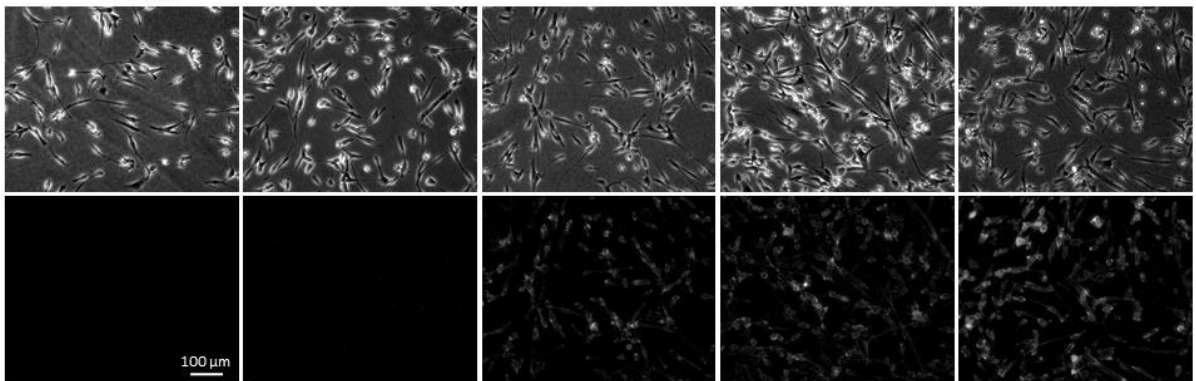


**Figura 5. Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en astrocitos.** Se muestran imágenes de contraste de fases y de microscopía de fluorescencia de células incubadas durante 5 minutos con 5 concentraciones entre 0 y 50 μM (de izquierda a derecha) de TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (A) y las curvas dosis-respuesta resultantes de la cuantificación de la fluorescencia en ambas condiciones (B). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) y corresponden a valores medios ± error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes.

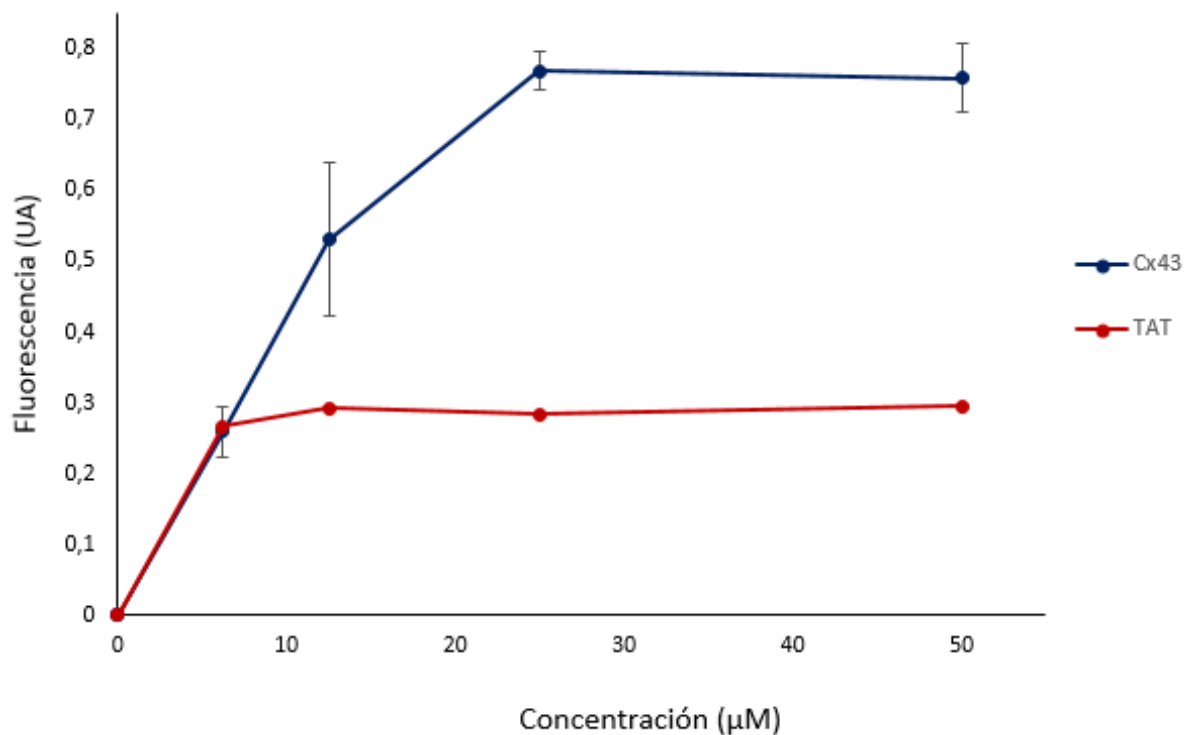
## A TAT



## TAT-Cx43<sub>266-283</sub>

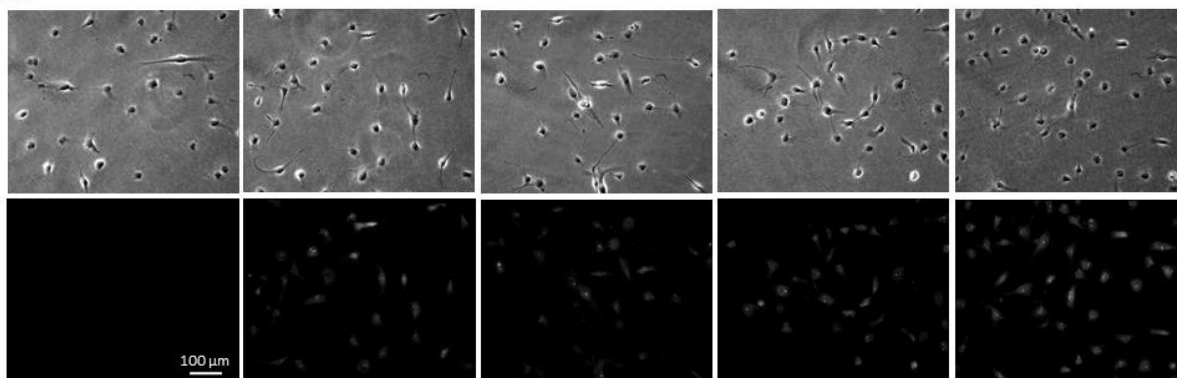
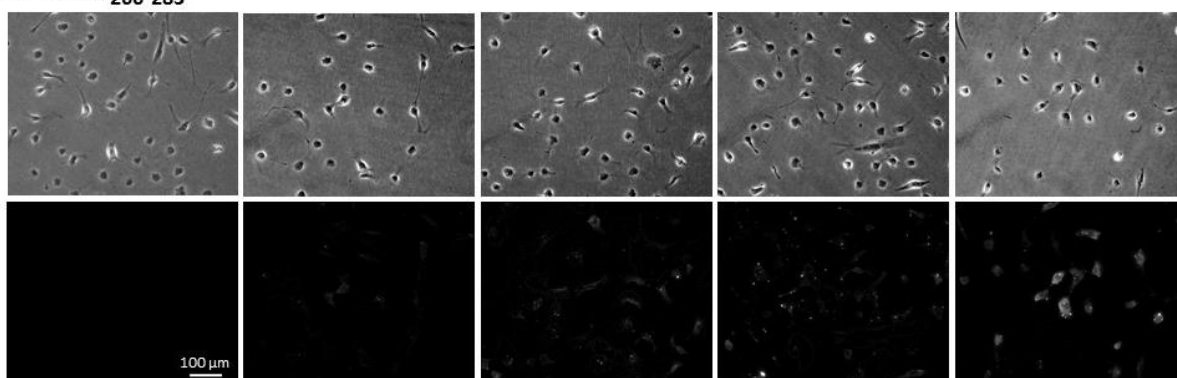
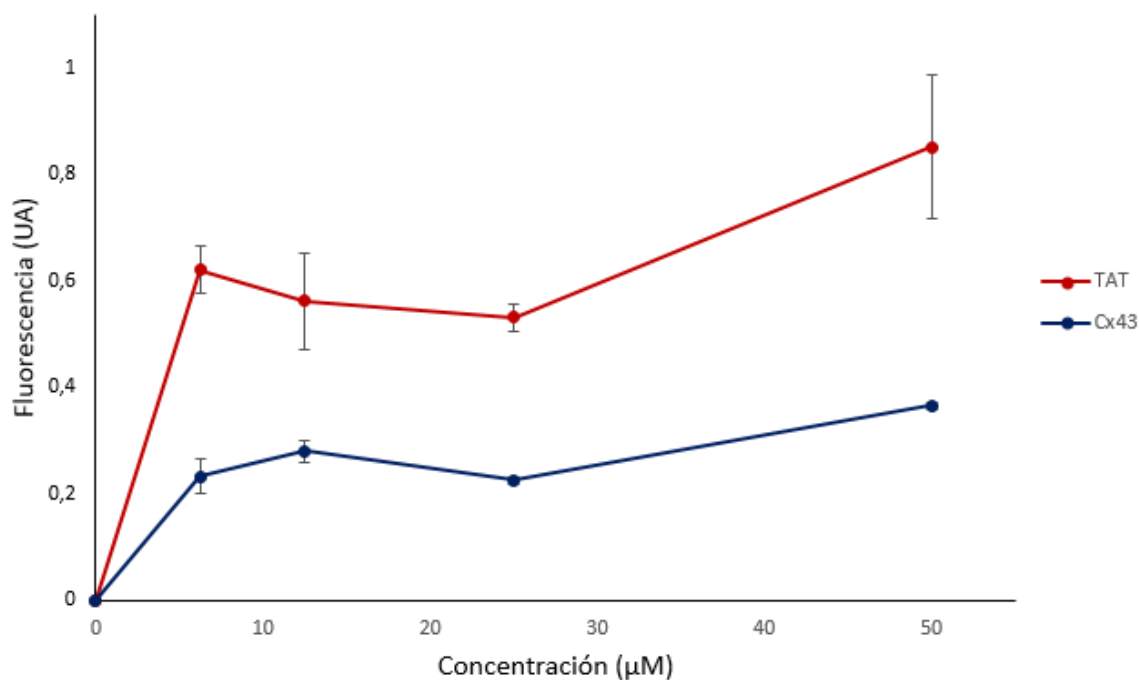


## B



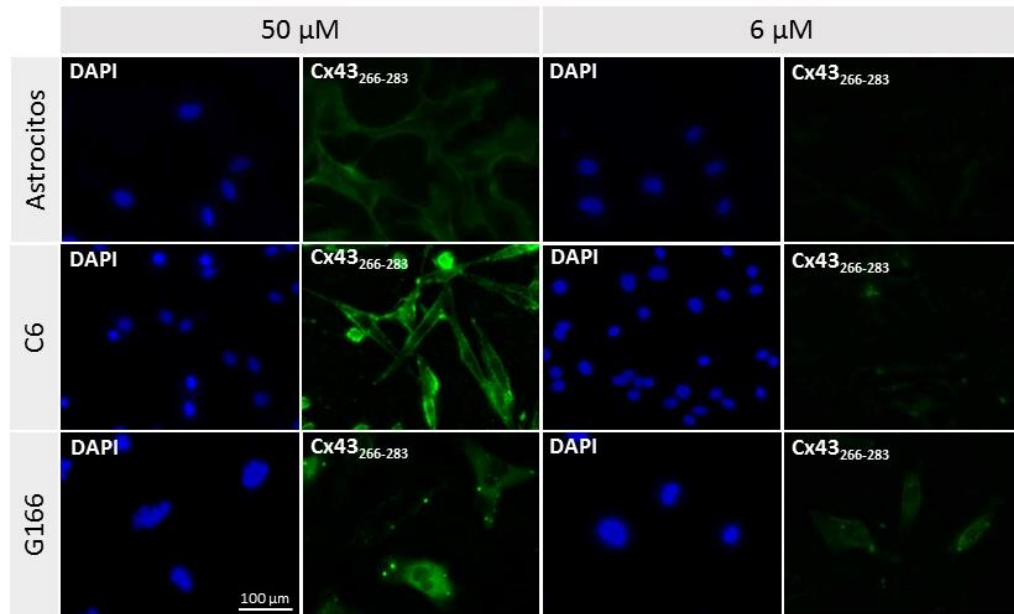
**Figura 6. Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células de glioma C6.** Se muestran imágenes de contraste de fases y de microscopía de fluorescencia de células incubadas durante 5 minutos con 5 concentraciones entre 0 y 50  $\mu\text{M}$  (de izquierda a derecha) de TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (A) y las curvas dosis-respuesta resultantes de la cuantificación de la fluorescencia en ambas condiciones (B). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) y corresponden a valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes.



**A TAT****TAT-Cx43<sub>266-283</sub>****B**

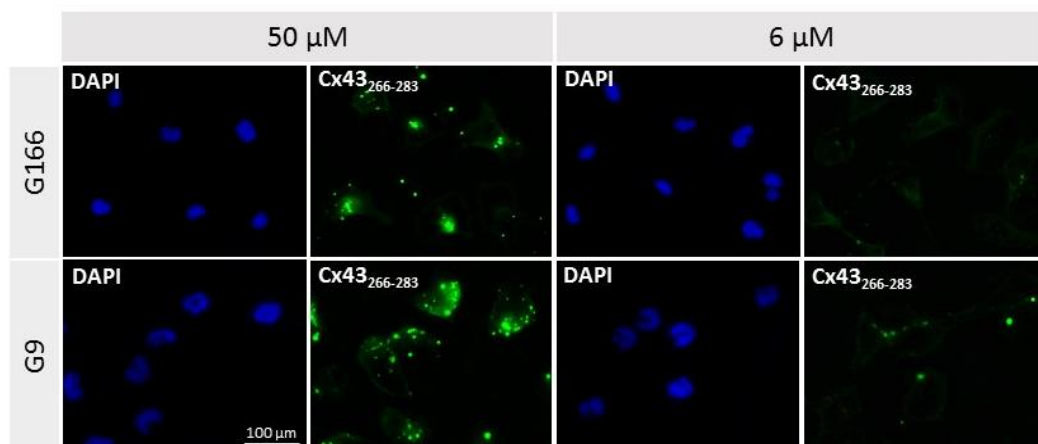
**Figura 7. Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en células madre de glioma G166.** Se muestran imágenes de contraste de fases y de microscopía de fluorescencia de células incubadas durante 5 minutos con 5 concentraciones entre 0 y 50  $\mu\text{M}$  (de izquierda a derecha) de TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> (A) y las curvas dosis-respuesta resultantes de la cuantificación de la fluorescencia en ambas condiciones (B). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) y corresponden a valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes.

Por otro lado, se observó que la cantidad de péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> internalizado a la concentración más alta utilizada (50  $\mu$ M) es menor en astrocitos que en las líneas de células de glioma y células madre de glioma empleadas y que la internalización de este péptido continúa siendo notable a concentraciones bajas (6  $\mu$ M) en células madre de glioma, mientras que no lo es en los otros tipos celulares (**Figura 8**).



**Figura 8. Efecto de la concentración en la internalización de péptidos penetrantes.** Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de astrocitos, células de glioma C6 y células madre de glioma G166 para dos concentraciones diferentes del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>; DAPI muestra los núcleos.

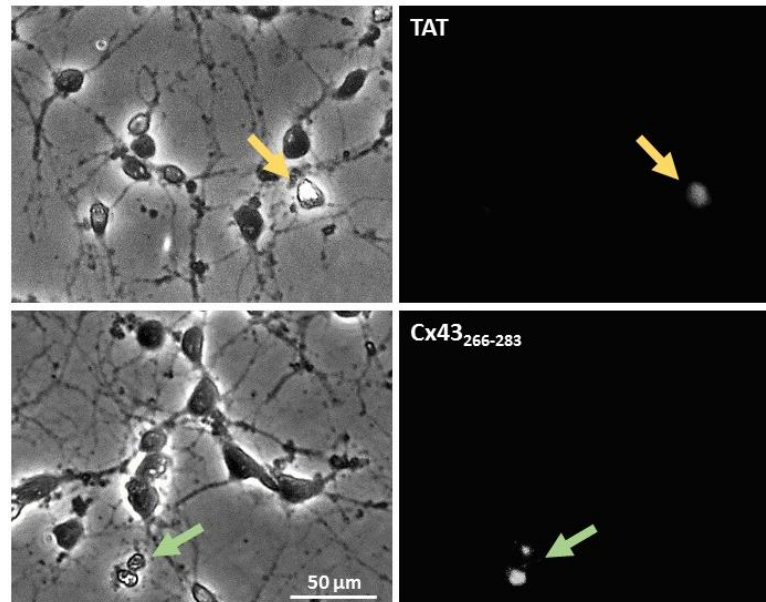
Con el objeto de determinar si el péptido se internaliza en mayor medida en las células madre de glioma de manera general o se trata de una peculiaridad de la línea celular utilizada, se realizó el ensayo en la línea celular G9, que tiene también características de célula madre de glioma. Observamos que la internalización en ambas líneas celulares es muy similar (**Figura 9**).



**Figura 9. Comparación de la internalización de péptidos penetrantes en diferentes líneas de células madre de glioma.** Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células madre de glioma de las líneas G166 y G9 para dos concentraciones diferentes del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>; DAPI muestra los núcleos.

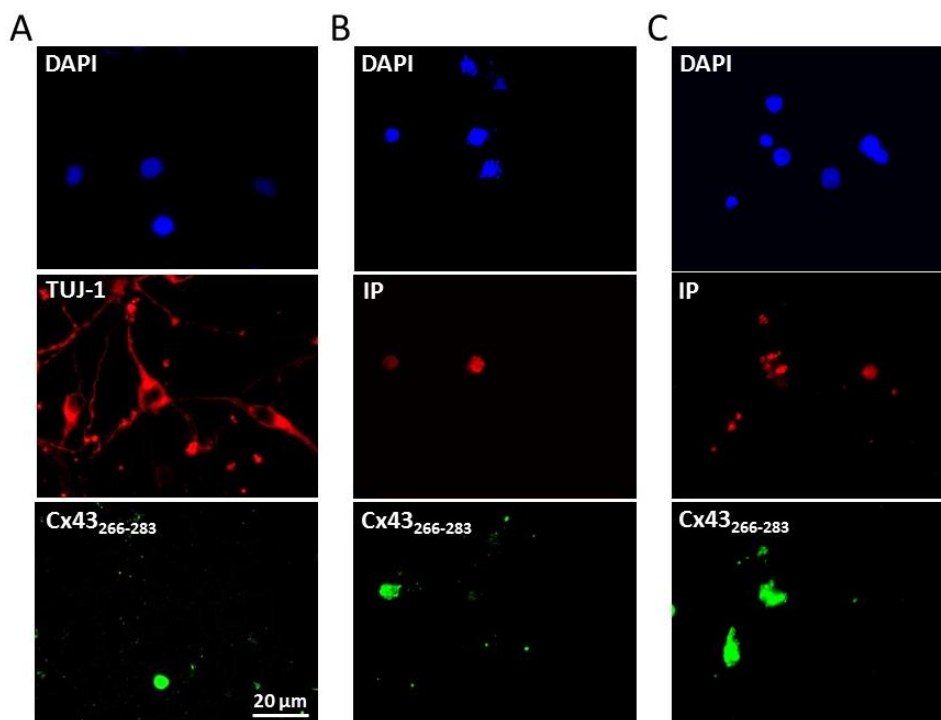


Los resultados obtenidos en neuronas fueron notablemente diferentes. Observamos que únicamente algunas células internalizaban los péptidos y que además estas células presentaban una morfología diferente al observarlas en contraste de fases (**Figura 10**).



**Figura 10. Capacidad de internalización de péptidos penetrantes en neuronas.** Se muestran imágenes de contraste de fases y de microscopía de fluorescencia de células incubadas durante 5 minutos con los péptidos TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> a una concentración de 50  $\mu$ M. Las flechas señalan las células que han internalizado el péptido.

Con el objeto de determinar las diferencias de estas células que permitían la internalización del péptido, las células se incubaron con un anticuerpo contra  $\beta$ III-tubulina (TuJ-1), una proteína exclusiva del citoesqueleto de neuronas. Se observó que las células que expresan  $\beta$ III-tubulina no internalizan el péptido, por lo que no se trata de neuronas (**Figura 11A**). Además, con el objeto de determinar si se trataba de células muertas se añadió yoduro de propidio (IP) al cultivo de neuronas tras el tratamiento con el péptido. Las células que van a morir por necrosis presentan rupturas en su membrana e incorporan el yoduro de propidio, que se une a los núcleos, mientras que las células sanas no lo hacen. Observamos que las células que incorporan IP son las que han internalizado el péptido (**Figura 11B**). Para descartar que la muerte celular estuviera provocada por el péptido, las células se incubaron con IP antes del tratamiento con el péptido y se observó que las células que internalizan el péptido son las que incorporaron en el IP (**Figura 11C**). Por tanto, podemos concluir que en el cultivo de neuronas el péptido únicamente es internalizado por las células que estaban muertas antes de ser incubadas con él.



**Figura 11. Relación entre muerte celular y captación de péptidos penetrantes en el cultivo de neuronas.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de neuronas tratadas con el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> e incubadas con un anticuerpo contra  $\beta$ III-tubulina (TuJ-1); DAPI muestra los núcleos (A). En la figura B, se muestran células tratadas con el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> e incubadas posteriormente con IP (B) y células incubadas con IP previamente al tratamiento con el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>; DAPI muestra los núcleos (C).

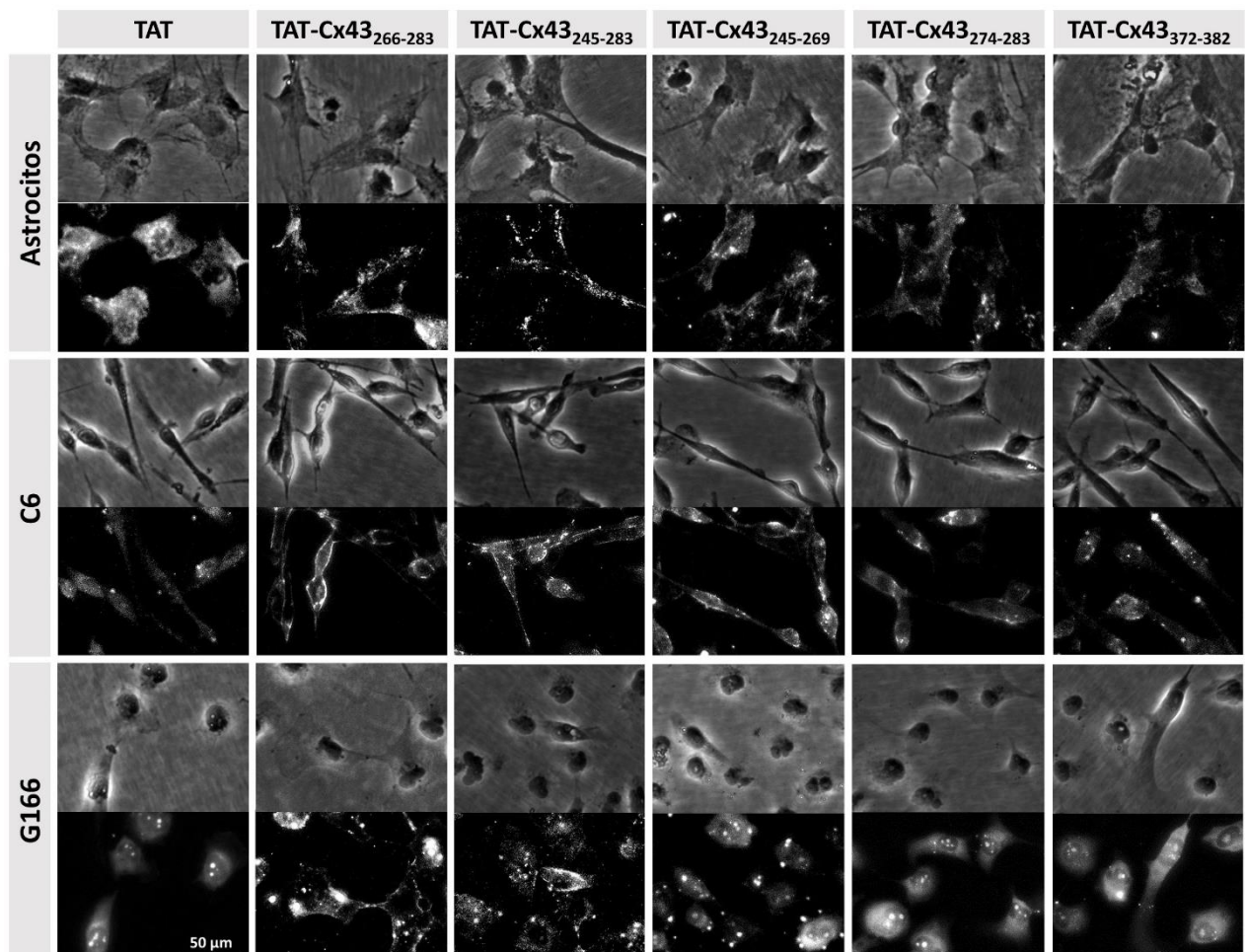
#### 4.2. Estudio de la localización subcelular de péptidos penetrantes basados en la conexina-43

La Cx43 interacciona con numerosas proteínas a través de su extremo carboxilo terminal, entre las que se encuentran c-Src y ZO-1. Estas interacciones son imprescindibles para la acción de la Cx43 como proteína supresora de tumores, por lo que se estudió la internalización y localización subcelular de péptidos penetrantes que contienen diferentes regiones de la Cx43 implicadas en su interacción con otras proteínas.

Además del péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, que contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src, se empleó el péptido TAT-Cx43<sub>245-283</sub>, que contiene también las dos tirosinas que son fosforiladas por c-Src (Tyr247 y Tyr265). El péptido TAT-Cx43<sub>245-269</sub> contiene únicamente estas dos tirosinas y el péptido TAT-Cx43<sub>274-283</sub> contiene exclusivamente el motivo de unión al dominio SH3 de c-Src. El péptido TAT-Cx43<sub>372-382</sub> contiene el dominio de unión a PDZ que interacciona con ZO-1. (Véase la Figura 2)

Las células se incubaron durante 30 minutos con los diferentes péptidos biotinilados, se fijaron y se reveló la presencia de los péptidos mediante estreptavidina conjugada con Cy2. Las imágenes se tomaron en un microscopio de epifluorescencia.

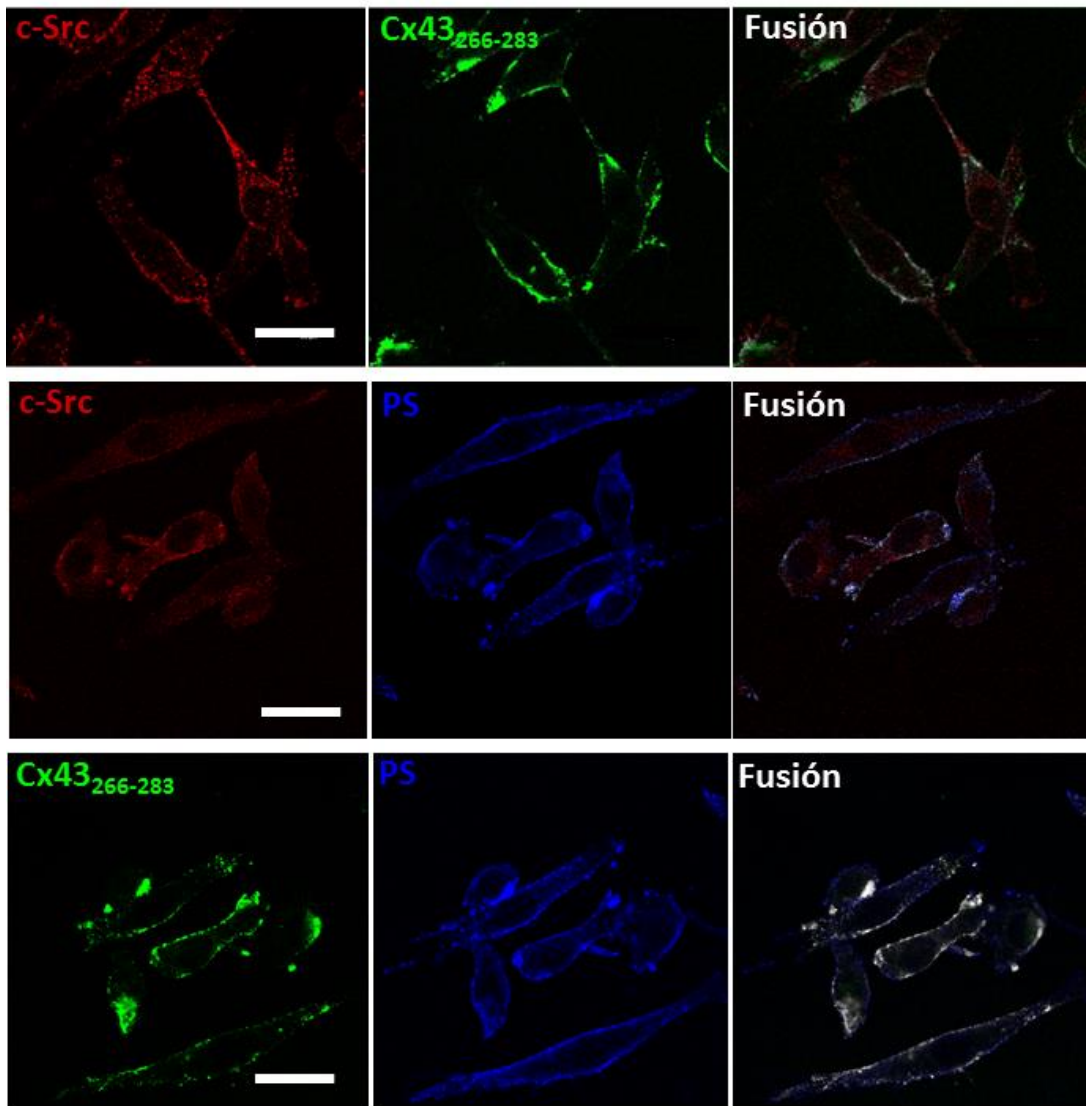
De este modo, observamos que la localización subcelular que alcanzan los péptidos internalizados es diferente en función de la secuencia de la Cx43 que contienen (**Figura 12**). De manera aislada, TAT se distribuye en todos los casos de manera uniforme por el citoplasma. Sin embargo, los péptidos TAT-Cx43<sub>266-283</sub> y TAT-Cx43<sub>245-283</sub> se desplazan hacia la membrana en los tres tipos celulares empleados. En células de glioma C6, se observa que el péptido TAT-Cx43<sub>245-269</sub> también se desplaza hacia la membrana, aunque esta localización no es tan clara en astrocitos y células madre de glioma G166. Los péptidos TAT-Cx43<sub>274-283</sub> y TAT-Cx43<sub>245-269</sub> tienen una localización citoplasmática similar a la que presenta la secuencia TAT.



**Figura 12. Localización subcelular de péptidos penetrantes en astrocitos, células de glioma C6 y células madre de glioma G166.** Se muestran imágenes de contraste de fases y de microscopía de fluorescencia de células incubadas durante 30 minutos con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de TAT, TAT-Cx43<sub>266-283</sub>, TAT-Cx43<sub>245-283</sub>, TAT-Cx43<sub>266-269</sub>, TAT-Cx43<sub>274-283</sub> o TAT-Cx43<sub>245-269</sub>.

Tras observar estas diferencias en la localización de los diferentes péptidos, quisimos estudiar si esta localización se debía a las interacciones de la Cx43 con otras biomoléculas celulares. Como se ha mencionado, el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub> contiene la región de la Cx43 que interacciona con c-Src, por lo que realizamos inmunocitoquímica contra c-Src. Además, marcamos la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido con carga negativa que se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana

plasmática y al que se une probablemente c-Src. De esta manera observamos que, aunque c-Src se encuentra distribuido por el citoplasma, una parte del mismo se encuentra anclado a la membrana plasmática (**Figura 13**). De hecho, aparecen puntos de colocalización tanto con la fosfatidilserina como con el péptido. Además, se observa colocalización entre el péptido y la fosfatidilserina.



**Figura 13. Localización de c-Src, fosfatidilserina y Cx43<sub>266-283</sub> en células de glioma C6.** Se muestran imágenes de microscopía confocal de células incubadas con el péptido Cx43<sub>266-283</sub> para las cuales se ha realizado inmunocitoquímica contra c-Src y se ha marcado la fosfatidilserina con anexina V. Los puntos de colocalización se muestran en blanco. La barra de escala equivale a 20µm.

## 5. DISCUSIÓN

La Cx43 es una proteína fundamental en los astrocitos, ya que forma parte de las *gap junctions* y regula la comunicación intercelular, fundamental para controlar de forma coordinada procesos como la proliferación y la diferenciación celular<sup>22</sup>. Los niveles de expresión de esta proteína disminuyen en los gliomas, los tumores del SNC más frecuentes, de manera inversamente proporcional a su malignidad. La restauración de la Cx43 en células de glioma disminuye su tasa de proliferación y su tumorigenicidad, por lo que se la considera una proteína supresora de tumores.

Como posible estrategia terapéutica, se han generado péptidos penetrantes a partir de diferentes regiones de la Cx43. En concreto, el péptido que contiene la región de la Cx43 que interacciona con la tirosina kinasa c-Src (aminoácidos del 266 al 283), es capaz de mimetizar el efecto de la Cx43 sobre la inhibición de c-Src. La actividad de c-Src está aumentada en células de glioma, favoreciendo la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la migración de estas células<sup>44</sup>.

Para conocer las posibilidades terapéuticas de este péptido es necesario, entre otras cosas, conocer su cinética de internalización, tanto en células sanas como tumorales. Nuestros resultados muestran que la internalización de este péptido es mayor en células tumorales, de hecho, en las condiciones ensayadas, la internalización del péptido es inapreciable en neuronas y escasa en astrocitos, mientras que es mucho mayor en células de glioma, incluidas las células madre de glioma.

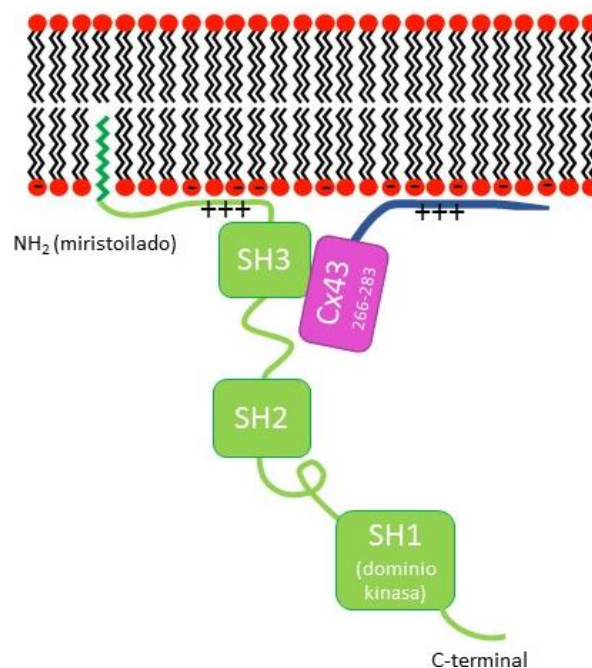
La estrategia utilizada para la fabricación de estos péptidos consiste en fusionar una región de la Cx43 a la región penetrante de la proteína TAT, un péptido catiónico rico en residuos de lisina y arginina. La internalización de péptidos penetrantes basados en TAT parece estar mediada por los proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular, que actúan como receptores para los grupos guanidino de los residuos de arginina de TAT<sup>46</sup>. El glicocáliz de las células tumorales es especialmente rico en glicanos con cargas negativas, entre ellos proteoglicanos de heparán sulfato, ácido glucurónico y ácido siálico (**véase la Figura 4**). Este ambiente electronegativo en la superficie celular podría estar favoreciendo la unión e internalización de nuestros péptidos en las células de glioma y ser responsable de la alta eficacia de internalización observada en nuestros experimentos.

Una vez internalizado, el péptido formado únicamente por la región penetrante de TAT se distribuye de manera uniforme por el citoplasma en todos los tipos celulares analizados. Sin embargo, hemos observado que al añadir determinadas secuencias de la Cx43 a la región penetrante de TAT, éstas son capaces de dirigir la localización subcelular de los péptidos. En concreto, los péptidos que contienen la región de la Cx43 que interacciona con c-Src (TAT-Cx43<sub>266-283</sub> y TAT-Cx43<sub>245-283</sub>) se



dirigen a la cara interna de la membrana plasmática, mientras que el resto de péptidos presentan una localización citoplasmática similar a la del péptido TAT.

En los estudios de colocalización, observamos que parte de c-Src se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática en células de glioma C6, muy próximo a la fosfatidilserina. De hecho, c-Src contiene en su extremo amino terminal un dominio SH4 que puede miristoilarse o palmitoilarse<sup>73</sup>. El dominio SH4 contiene además una serie de aminoácidos básicos (Myr-GSSKSKPKDPSQRRR, carga neta = +5) que median la interacción con los fosfolípidos con carga negativa, como la fosfatidilserina, presente fundamentalmente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. De esta manera, el dominio SH4 de c-Src facilita su unión a la cara interna de la membrana plasmática. Nuestros resultados sugieren que los péptidos que contienen los aminoácidos del 266 al 283 de la Cx43 interactúan mayoritariamente con la fracción de c-Src que se encuentra anclada a la membrana plasmática. Esta localización puede ser debida, en primer lugar, a su capacidad para interactuar con c-Src y, en segundo lugar, por la interacción entre los residuos con carga positiva de TAT y los fosfolípidos negativos como la fosfatidilserina (**Figura 14**). La localización subcelular específica de estos péptidos contribuye al esclarecimiento de su mecanismo de acción sobre la inhibición de c-Src y el consiguiente efecto anti tumorigénico. Además, la mayor eficacia de internalización de estos péptidos en células de glioma y, en particular, en células madre de glioma, incrementa las posibilidades terapéuticas de estos péptidos en la lucha contra los tumores cerebrales más frecuentes, los gliomas.



**Figura 14. Mecanismo propuesto de interacción entre c-Src, los fosfolípidos con carga negativa de la cara interna de la membrana plasmática y el péptido TAT-Cx43<sub>266-283</sub>.** El péptido está formado por los aminoácidos del 266 al 283 de la Cx43 (en rosa) y la región penetrante de TAT (en azul). c-Src se representa en verde.

## 6. CONCLUSIONES

1. La internalización de los péptidos TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> es rápida y dosis-dependiente en astrocitos, células de glioma C6 y células madre de glioma G166 y G9.
2. Los péptidos TAT y TAT-Cx43<sub>266-283</sub> no son internalizados por neuronas, al menos con tratamientos de cinco minutos.
3. Las células de glioma y, especialmente, las células madre de glioma, internalizan con mayor eficacia péptidos penetrantes generados a partir de la secuencia TAT. Esto podría deberse al elevado número de cargas negativas y proteoglicanos de heparán sulfato presentes en el glicocáliz de estas células, que estarían actuando como receptores para la secuencia TAT.
4. La localización subcelular de péptidos penetrantes basados en la conexina-43 depende de la región de la conexina-43 empleada.
5. Los péptidos TAT-Cx43<sub>266-283</sub> y TAT-Cx43<sub>245-283</sub>, una vez internalizados, se desplazan a la cara interna de la membrana plasmática, donde probablemente interaccionan con c-Src, que se encuentra anclado a la fosfatidilserina.

**Conclusión final:** la localización subcelular específica de TAT-Cx43<sub>266-283</sub> ayuda a entender su mecanismo de acción sobre la inhibición de c-Src y su efecto antitumorigénico. Además, la mayor eficacia de internalización de estos péptidos en células de glioma y, en particular, en células madre de glioma, incrementa las posibilidades terapéuticas de estos péptidos en la lucha contra los gliomas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
2. Janzer RC, Raff MC. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-256.
3. Medina JM, Giaume C, Tabernero A. 1999. Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. In: Matsas R, Tsacopoulos M, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*. New York: Plenum Publishers 361-371.
4. Kosodo Y, Huttner WB. 2009. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ* 51:251-61.
5. Vega-Agapito V, Almeida A, Hatzoglou M, Bolanos JP. 2002. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y(+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J Biol Chem* 277:29753-9
6. Sanaï N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J and others. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-4.
7. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-45.
8. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C and others. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-710.
9. Caskey LS, Fuller GN, Bruner JM, Yung WK, Sawaya RE, Holland EC, Zhang W. 2000. Toward a molecular classification of the gliomas: histopathology, molecular genetics, and gene expression profiling. *Histol Histopathol* 15:971-81.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
11. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology* 16(Suppl. 4):iv1-iv63.
12. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488:522-6.
13. Gilbertson RJ, Graham TA. 2012. Cancer: Resolving the stem-cell debate. *Nature* 488:462-3.
14. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. 2015. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 36:177-85.
15. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O. 2012. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338:1080-84.
16. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.
17. Giaume C, Tabernero A, Medina JM. 1997. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 21:114-123.
18. Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. 2006. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54:758-73.
19. Tabernero A, Gangoso E, Jaraíz-Rodríguez M, Medina JM. 2016. The role of connexin43-*Src* interaction in astrocytomas: a molecular puzzle. *Neurosci* 323:183-94.
20. Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. 1991. Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-43.



21. Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC. 1991b. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
22. Loewenstein WR, Kanno Y. 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209:1248-9.
23. Huang R-P, Hossain M, Sehgal A, Boynton A. 1999. Reduced connexin43 expression in highgrade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70:21-24.
24. Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CC. Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 88:1883-1887.
25. Yu SC, Xiao HL, Jiang XF, Wang QL, Li Y, Yang XJ, Ping YF, Duan JJ, Jiang JY, Ye XZ and others. 2012. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells* 30:108-20.
26. Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. 1986. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 44:187-96.
27. Loewenstein W. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* 3:59-79.
28. Huang R, Fan Y, Hossain M, Peng A, Zeng Z, Boynton A. 1998. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58:5089-5096.
29. Jiang JX, Gu S. 2005. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 1711:208-14.
30. Moorby C, Patel M. 2001. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271:238-48.
31. Zhang YW, Nakayama K, Morita I. 2003. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63:1623-30.
32. Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH. 2001a. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276:8544-9.
33. Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. 2001b. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11:1364-8.
34. Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. 2002. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41:5754-64.
35. Kanemitsu MY, Loo LW, Simon S, Lau AF, Eckhart W. 1997. Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J Biol Chem* 272:22824-31.
36. Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, Paul DL. 1990. Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regul* 1:989-1002
37. Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF. 2001. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol* 154:815-27.
38. Sorgen PL, Duffy HS, Sahoo P, Coombs W, Delmar M, Spray DC. 2004. Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. *J Biol Chem* 279:54695-701.
39. Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, Hori M. 2001. c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276:1780-8.
40. Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. 1998. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725-12731.
41. Reichert M, Muller T, Hunziker W. 2000. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem* 275:9492-500.

42. Du J, Bernasconi P, Clauser KR, Mani DR, Finn SP, Beroukhim R, Burns M, Julian B, Peng XP, Hieronymus H and others. 2009. Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat Biotechnol* 27:77-83.
43. Herrero-González S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A. 2010. Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* 29:5712-5723.
44. Gangoso E, Thirant C, Chneiweiss H, Medina JM, Tabernero A. 2014. A cell-penetrating peptide based on the interaction between c-Src and connexin43 reverses glioma stem cell phenotype. *Cell Death Dis* 5:e1023.
45. Panagiotis S, Kabouridis. 2003. Biological applications of protein transduction technology. *Trends Biotechnol* 21:11:498-503
46. Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M. 2001. Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276:3254-61.
47. Fuchs SM, Raines RT. 2004. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* 43:2438-53
48. Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. 2002. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem* 227:2437-2443.
49. Wiedlocha A, Sorensen V. 2004. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 286:45-79.
50. Belting M, Persson S, Fransson LA. 1999. Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem J*;338:317-323.
51. Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D, Koshy TI. 1992. Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol* 313:341-353.
52. Kolset SO, Prydz K, Pejler G. 2004. Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 379:217-227.
53. Ryser HJ, Hancock R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. 1965. *Science* 150:501-503.
54. Frankel AD, Pabo CO. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.
55. Green M, Loewenstein PM. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179-1188.
56. Vives E, Brodin P, Lebleu B. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272:16010-16017.
57. Rothbard JB, Jessop TC, Wender PA. 2005. Adaptive translocation: The role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv Drug Deliv Re* 57:495-504.
58. Rusnati M, Coltrini D, Oreste P, Zoppetti G, Albini A, Noonan D, d'Adda di Fagagna F, Giacca M, Presta M. 1997. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol Chem* 272:11313-11320.
59. Hakansson S, Jacobs A, Caffrey M. 2001. Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. *Protein Sci* 10:2138-2139.
60. Sakai N, Matile S. 2003. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes. *J Am Chem Soc* 125:14348-14356.
61. Fuchs SM, Raines RT. 2006. Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. *Cell Mol Life Sci* 63:1819-22.
62. Fuster MM, Esko JD. 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 5:526-42
63. Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Büchler MW, Lander AD, Korc M. 1998. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J Clin Invest* 102:1662-1673.

64. Tumova S, Woods A, Couchman JR. 2000. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 32:269–288.
65. Sanderson RD. 2001. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 12:89–98.
66. Steck PA, Moser RP, Bruner JM, Liang L, Freidman AN, Hwang TL & Yung WK. 1989. Altered expression and distribution of heparan sulfate proteoglycans in human gliomas. *Cancer Res* 49, 2096–2103.
67. Su G, Meyer K, Nandini CD, Qiao D, Salamat S, Friedl A. 2006. Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am J Pathol* 168:2014–2026
68. Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. 1981. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8:325-31.
69. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M and others. 2009. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4:568-80.
70. Tabernero A, Giaume C, Medina JM. 1996. Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16:187-195.
71. Tabernero A, Bolaños JP, Medina JM. 1993. Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 294:635-638.
72. Vicario C, Tabernero A, Medina JM. 1993. Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Pediatr Res* 34:709-715.
73. Sigal CT, Zhou W, Buser CA, McLaughlin S, Resh MD. 1994. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc Natl Acad Sci* 91:12253-12257.



800 AÑOS

VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

1218 ~ 2018