



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Instituto de Neurociencias de Castilla y León

**PAPEL DE LA CONEXINA43 EN EL CONTROL  
DE LA PROLIFERACIÓN  
DE ASTROCITOS Y CÉLULAS DE GLIOMA**

**SANDRA HERRERO GONZÁLEZ**

TESIS DOCTORAL 2009

D<sup>a</sup> ARÁNZAZU TABERNERO URBIETA, Profesora Titular de Universidad y D. JOSE M. 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 "*Papel de la conexina43 en el control de la proliferación de astrocitos y células de glioma*" que ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia D<sup>a</sup> Sandra Herrero González en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste firman el siguiente documento en Salamanca a 25 de Mayo de 2009.

Fdo. Aránzazu Tabernero Urbieto

Fdo. Jose M. Medina Jiménez

**ILMO. SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

## ABREVIATURAS

AGA	Ácido 18- $\alpha$ -glicerretínico
AA	Ácido araquidónico
AMPS	Persulfato amónico
BHE	Barrera hematoencefálica
BrdU	5-Bromo-2'-dexoxtiuridina
CBX	Carbenoxolona
CDK	Kinasa dependiente de ciclinas
CK1	Caseína kinasa 1
CKI	Inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas
CMV	Promotor del citomegalovirus humano
Cx43-NP	Conexina43 no fosforilada
Cy3	Cianina 3
Cx43-P	Conexina43 fosforilada
DAPI	4'6-diamino-2-fenilindol
dbcAMP	dibutilil-AMP cíclico
DNA	Ácido dexosirribonucléico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EBSS	Solución de Earle
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ET-1	Endotelina-1
FCS	Suero fetal de ternero
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glia
GLUT	Transportador de glucosa
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IP3	Inositol trifosfato
IRES	( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
kDa	Kilodaltons
LB	Medio Luria Bertani
MCS	Sitio de multiclonación
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NT-siRNA	<i>non-target</i> siRNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	Par de bases
PBS	Tampón sulfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PP2	4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-( <i>t</i> -butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina
PP3	4-Amino-7-phenilpirazol[3,4-d]pirimidina
pRb-NP	Proteína del retinoblastoma no fosforilada
pRB-P	Proteína de retinoblastoma fosforilada
PS	Fosfatidilserina
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcripción reversa
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SDS	Dodecil sulfato sódico
siRNA	RNA de interferencia ( <i>Small interfering RNA</i> )

Skp2----- Proteína asociada a kinasas de la fase S  
SNC----- Sistema Nervioso Central  
TAE----- Tampón Tris Acetato-EDTA  
TBS----- Tampón Tris Salino  
TEMED----- N,N,N',N'-tetrametilendiamino  
ZO-1----- Proteína *zonula occludens-1*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. LAS UNIONES COMUNICANTES DE LOS ASTROCITOS</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Entorno lipídico de las uniones comunicantes .....	5
1.1.2. Proteínas componentes de las uniones comunicantes .....	5
1.1.3. Función de las uniones comunicantes en los astrocitos. ....	7
1.1.3.1. Amortiguación espacial de K <sup>+</sup> .....	7
1.1.3.2. Equilibrio de la concentración de Na <sup>+</sup> intracelular.....	7
1.1.3.3. "Ondas de Ca <sup>2+</sup> " .....	7
1.1.3.4. Protección neuronal. ....	8
1.1.3.5. Tráfico de metabolitos y captación de glucosa. ....	8
1.1.3.6. Apoyo en la migración neuronal. ....	11
1.1.4. Regulación de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.....	11
1.1.4.1. Endotelina-1 .....	12
1.1.4.2. Carbenoxolona .....	14
1.1.5. Síntesis y degradación de la conexina43. ....	14
1.1.6. Fosforilación de la conexina43. ....	16
1.1.7. Modificaciones de la conexina43 durante el ciclo celular. ....	17
<b>1.2. COMUNICACIÓN INTERCELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	<b>19</b>
1.2.1. Efecto de los agentes promotores de tumores, oncogenes y factores de crecimiento en la comunicación a través de las uniones comunicantes. ....	21
1.2.2. Efecto de agentes diferenciadores y antineoplásicos sobre la comunicación a través de las uniones comunicantes. ....	22
1.2.3. Niveles de expresión de la conexina43 en los gliomas. ....	22
1.2.4. La conexina43 como proteína supresora de tumores. ....	23
1.2.5. Efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes sobre la proliferación de los astrocitos. ....	25
<b>1.3. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE c -Src</b> .....	<b>27</b>
1.3.1. Relación de la conexina43 con c-Src.....	30
<b>2. PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>33</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. MATERIAL</b> .....	<b>37</b>
3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario y línea celular utilizada .....	37
3.1.2. Medios instrumentales .....	37
3.1.3. Productos .....	41
3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares.....	41
3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección del Mrna .....	42
3.1.3.3. Productos utilizados en la construcción del plásmido pIres -Cx43 y pCx43Y247F/Y265F .....	42
3.1.3.4. Productos utilizados en los experimentos para el análisis de proteínas .....	44
3.1.3.5. Productos empleados para el silenciamiento génico .....	45
3.1.3.6. Productos utilizados para la cuantificación y parada del ciclo celular .....	45
3.1.3.7. Otros productos .....	45

<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares .....	47
3.2.1.1. Composición de las disoluciones. ....	47
3.2.1.2. Preparación del cultivo primario de astrocitos .....	48
3.2.1.3. Preparación del cultivo de células de glioma C6. ....	49
3.2.2. Tratamientos celulares en astrocitos .....	49
3.2.3. RT-PCR .....	49
I. Extracción del RNA total de los cultivos .....	50
II. Cuantificación del RNA .....	50
III. Retrotranscripción (RT) .....	50
IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	51
V. Electroforesis de DNA .....	52
3.2.4. Construcción del plásmido plres-Cx43 y pCx43Y247F/Y265F .....	52
3.2.4.1. Purificación de DNA. ....	52
3.2.4.2. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción. ....	52
3.2.4.3. Ligación del cDNA de la conexina43 en el vector pIRES2 -DsRed2. ....	53
3.2.4.4. Doble mutagénesis del plásmido plresCx43 .....	53
3.2.4.5. Transformación bacteriana y extracción del DN A plasmídico .....	55
3.2.4.6. Secuenciación del cDNA de la Cx43. ....	55
3.2.4.7. Transfección de las células de glioma y selección de clones. ....	56
3.2.5. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT. .	57
3.2.6. Estudio de la apoptosis mediante tinción con anexina-V. ....	57
3.2.7. Cuantificación del ciclo celular por citometría de flujo. ....	58
3.2.8. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA ( <i>small interfering RNA</i> ). ....	59
3.2.9. Determinación de la permeabilidad celular .....	59
3.2.10. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western .....	60
I. Extracción de proteínas .....	60
II. Cuantificación de proteínas .....	60
III. Preparación de los geles .....	61
IV. Preparación de las muestras para la electroforesis .....	61
V. Electroforesis de proteínas .....	61
VI. Electrotransferencia .....	61
VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana .....	61
VIII. Inmunodetección .....	62
3.2.11. Inmunocitoquímica .....	63
3.2.12. Determinación inmunocitoquímica de la incorporación de BrdU. ....	64
3.2.13. Inmunoprecipitación .....	64
3.2.14. Experimentos realizados "in vivo" en ratones C57BL6 .....	65
3.2.14.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6 y preparación del tejido. ..	65
3.2.14.2 Inyección de BrdU en ratones C57BL6 .....	65
3.2.14.3. Inmunohistoquímica .....	65
3.2.14.4. Determinación inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU .....	66
3.2.15 Análisis estadístico .....	67
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1. EFECTO DE LA PÉRDIDA DE LA CONEXINA43 EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS</b> .....	<b>71</b>
4.1.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina43 en astrocitos .....	71
4.1.2. Efecto del silenciamiento de la conexina43 sobre la proliferación de los astrocitos .....	73
4.1.3. Estudio de la participación de la conexina43 en el efecto mitogénico de los inhibidores de las uniones comunicantes. ....	77
4.1.3.1. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona en la comunicación intercelular en los astrocitos con la conexina43 silenciada. ....	78

4.1.3.2. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona en la proliferación de los astrocitos con la conexina43 silenciada. ....	82
4.1.4. Estudio de la relación entre la conexina43 y la proliferación de los astrocitos en la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral .....	84
<b>4.2. SOBREENPRESIÓN DE LA CONEXINA43 EN CÉLULAS DE GLIOMA C6.....</b>	<b>89</b>
4.2.1. Diseño de un modelo experimental de sobreexpresión de la conexina43 en células de glioma de rata C6. ....	89
I. Construcción del plásmido pIres-Cx43, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones. ....	90
IA. Clonación del cDNA de la Cx43. ....	90
IB. Clonación del vector pIRES2-DsRed2.....	91
IC. Inserción de la secuencia del cDNA codificador de la Cx43 en el vector pIRES2-DsRed2. ....	92
ID. Transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones. ....	95
II. Sobreexpresión y localización de la Cx43 en las células C6-Cx43. ....	95
III. Estudio de la funcionalidad de la conexina43. ....	98
IV. Estudio de la velocidad de proliferación en las células que sobreexpresan la conexina43. ....	99
4.2.2. Estudio de las fases del ciclo celular afectadas por la sobreexpresión de la conexina43. ....	101
4.2.2.1. Puesta a punto de la sincronización del ciclo celular en células de glioma C6 en las fases G0/G1 y G2/M. ....	102
4.2.2.2. Estudio de la evolución del ciclo celular en las células C6 -Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1 . ....	105
4.2.2.3. Estudio de la evolución del ciclo celular en las células C6 -Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G2/M .....	108
4.2.3. Modificaciones de la Conexina43 durante las fases del ciclo celular. ....	110
4.2.3.2. Modificación de la expresión y fosforilación de la Cx43 durante el ciclo celular. ....	113
4.2.3.3. Modificación de la localización de la Cx43 durante el ciclo celular. ....	115
4.2.4. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular en células de glioma C6. ....	119
4.2.4.1. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre la expresión de las ciclinas D1, D3 y E en células de glioma C6. ....	119
4.2.4.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre la expresión de p21 y p27 en células de glioma C6. ....	126
4.2.4.3. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la fosforilación del retinoblastoma en células de glioma C6. ....	131
4.2.5. Relación de la conexina43 con c-Src.....	134
4.2.5.1. Efecto de la Inhibición de c-Src en la proliferación de las células C6 -Ires y las C6-Cx43.....	134
4.2.5.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre la expresión y la activación de c-Src. ....	137
4.2.5.3. Interacción de c-Src y conexina43. ....	143
4.2.5.4. Construcción del plásmido pIres-Cx43Y247F/Y265F, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones. ....	145
4.2.5.5. Efecto de la mutación de las tirosinas 247 y 265 de la conexina43 sobre la actividad de c-Src, la proliferación y la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular. ....	148
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>153</b>
5.1. Efecto de la disminución de la expresión de la conexina43 en los astrocitos .....	153
5.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 en células de glioma C6. ....	157
5.2.1. Relación de la conexina43 con la actividad de c-Src.....	159
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>165</b>

7. BIBLIOGRAFÍA.....	169
----------------------	-----