

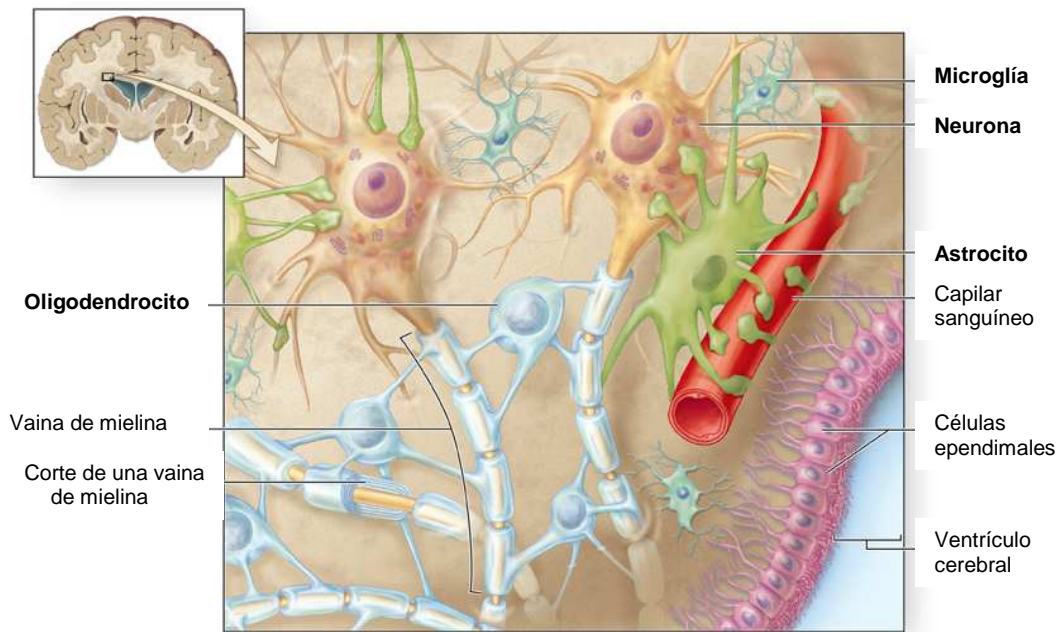
1.INTRODUCCIÓN

1.1. LAS UNIONES COMUNICANTES DE LOS ASTROCITOS

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

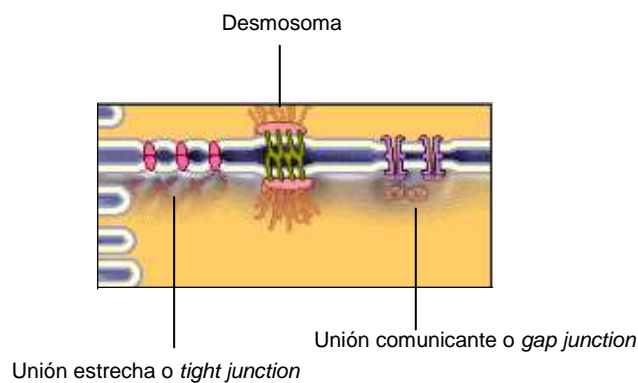
Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC (Esquema 1). Ejercen importantes funciones en el cerebro tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto. Entre estas funciones podemos destacar:

1. Inducción de la barrera hematoencefálica (BHE) (Abbott et al. 2006; Janzer and Raff 1987).
2. Apoyo a la migración y a la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Kosodo and Huttner 2009; para revisión, véase: Stevens 2008).
3. Soporte metabólico a las neuronas (Medina et al. 1999; para revisión, véase: 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 (para revisión, véase: Araque 2008).
7. Función neuroprotectora (Vega-Agapito et al. 2002).
8. Función de células madre. (Gritti et al. 2002; Sanai et al. 2004).



Esquema 1. Interacciones entre células gliales y neuronas en el sistema nervioso.

Globalmente podemos considerar la existencia de tres tipos de uniones intercelulares (Esquema 2): las uniones estrechas o *tight junctions*, los desmosomas y las uniones comunicantes o *gap junctions*.



Esquema 2. Uniones intercelulares

Las uniones estrechas son regiones diferenciadas de la membrana plasmática que sellan el espacio intercelular. Su función principal es impedir el transporte paracelular. Por otro lado, la adhesión mecánica entre célula y célula se mantiene, fundamentalmente, gracias a los desmosomas, confiriendo así, rigidez al tejido.

Las uniones comunicantes son especializaciones de membrana que contienen canales de comunicación intercelular, es decir, que median en el movimiento de iones y moléculas pequeñas entre células. Desde el punto de vista morfológico, la característica que diferencia a las uniones comunicantes de las uniones estrechas es que las células adyacentes unidas por *gap junctions* están separadas una distancia de dos o tres nanómetros (Musil et al. 2000).

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

Los astrocitos se caracterizan por estar ampliamente comunicados por las uniones comunicantes; de hecho, para llevar a cabo muchas de las funciones mencionadas necesitan la comunicación de estos canales.

1.1.1. Entorno lipídico de las uniones comunicantes.

Las uniones comunicantes son especializaciones de membrana y, como tales, están insertadas en la bicapa lipídica. En este sentido, el colesterol es un constituyente importante, tanto estructural como funcional, de la célula, especialmente porque regula la fluidez de la membrana, ya que previene la cristalización de los ácidos grasos por intercalarse entre sus cadenas (Papahadjopoulos 1974). Pues bien, se ha demostrado que las uniones comunicantes se caracterizan por estar rodeadas de gran cantidad de colesterol, lo cual confiere una mayor fluidez a la membrana en el entorno de la unión comunicante (Meijer et al. 1990). De hecho, se ha descrito que las proteínas componentes de las uniones comunicantes se localizan en las regiones de membrana llamadas *lipid rafts*. Los *lipid rafts* son regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos. En ellos se localizan 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).

1.1.2. Proteínas componentes de las uniones comunicantes.

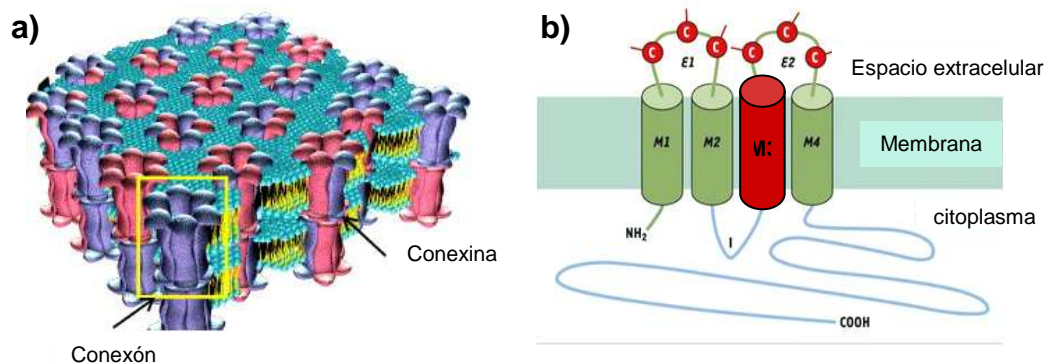
La unidad de la unión comunicante es el llamado conexón (Esquema 3a). El conexón es una estructura proteica que atraviesa la bicapa lipídica de cada una de las dos membranas celulares, así como el espacio que queda entre ellas, permitiendo el contacto del citoplasma de las células adyacentes. La comunicación 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; Trosko and Ruch 1998).

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 mamíferos, la proteína que integra las uniones comunicantes se denomina conexina (Cx) y, por el momento, se han caracterizado alrededor de 20 subtipos en humanos (para revisión, véase: Segretain and Falk 2004). En los astrocitos, la principal proteína que forma las uniones comunicantes es la Cx43 (Dermietzel et al. 1991; Giaume et al. 1991a). 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. 1991a).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de varias Cxs demuestra que presentan cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana, un dominio citoplasmático de las terminaciones amino y carboxilo, dos dominios extracelulares y un tercer dominio citoplasmático (Chaytor et al. 1997; Kumar and Gilula 1996) (Esquema 3b.). El tercer dominio transmembrana (M3) contiene una alta proporción de aminoácidos hidrofílicos, quedando éste hacia la luz de la unión comunicante (para revisión, véase: Trosko and Ruch 1998).



Esquema 3. Estructura y topología de las uniones comunicantes

1.1.3. Función de las uniones comunicantes en los astrocitos.

Para llevar a cabo muchas de las funciones de los astrocitos en el SNC, estas células aprovechan su acoplamiento a través de las uniones comunicantes, resultando una red sincitial constituida por canales de comunicación intercelular de iones y metabolitos entre astrocitos adyacentes. Entre estas funciones podemos destacar:

1.1.3.1. Amortiguación espacial de K^+ .

Los niveles de Na^+ y de K^+ deben estar regulados muy finamente en el espacio que rodea a las neuronas para que tengan lugar adecuadamente los potenciales de acción. Los astrocitos captan el K^+ debido a la alta permeabilidad que presentan a este ión (Kuffler et al. 1966) y lo transmiten de unos astrocitos a otros a través de las uniones comunicantes (Gardner-Medwin 1986). En este sentido, Mobbs (Mobbs et al. 1988) puso de manifiesto que el acoplamiento entre astrocitos a través de las uniones comunicantes aumentaba su capacidad de amortiguar espacialmente el K^+ .

1.1.3.2. Equilibrio de la concentración de Na^+ intracelular.

Las uniones comunicantes de los astrocitos participan en el intercambio de iones y pequeñas moléculas. Al respecto, Rose y col. (Rose and Ransom 1997) han investigado la influencia del acoplamiento de las uniones comunicantes de los astrocitos sobre la concentración de Na^+ intracelular. Cuando los astrocitos están acoplados, la concentración de Na^+ intracelular es similar en todos ellos; sin embargo, cuando los astrocitos se incuban con distintos agentes inhibidores de las uniones comunicantes, la concentración de Na^+ intracelular experimenta distintos comportamientos: en unos astrocitos no se modifica, en otros se incrementa y en otros disminuye. Así, el desacoplamiento de los astrocitos por el cierre de las uniones comunicantes produce un cambio en la distribución de Na^+ intracelular, que pasa de ser homogénea a heterogénea.

1.1.3.3. “Ondas de Ca^{2+} ”.

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 and Finkbeiner 1991; Cornell-Bell et al. 1990). Así, en los astrocitos se expresan una amplia variedad de receptores funcionales para agentes neuroactivos (Dermietzel et al. 1991), como el glutamato (Cornell-Bell et al. 1990; Jensen and Chiu 1990) y otros (Salm and McCarthy 1990). Muchos de estos estudios han establecido 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 trifosfato (IP3), los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y las uniones comunicantes, desempeñan un papel crítico (Venance et al. 1997). Dani y col. (Araque et al. 2002; Dani et al. 1992) han demostrado que las inervaciones aferentes de neuronas glutamatérgicas provocan la aparición de “ondas de 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.

1.1.3.4. Protección neuronal.

Cuando las neuronas se someten a agentes oxidativos, como el FeSO_4 y el 4-hidroxinonenal, se produce la muerte neuronal a causa del estrés oxidativo (Jesberger and Richardson 1991; Mark et al. 1997; Zhang et al. 1993). La presencia de los astrocitos previene la muerte neuronal provocada por estos agentes oxidativos. Esta función protectora de los astrocitos sólo se lleva a cabo cuando están acoplados entre sí a través de las uniones comunicantes. Al respecto, se ha demostrado que la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes en los astrocitos provoca la muerte neuronal en presencia de agentes oxidativos (Blanc et al. 1998) o de glutamato (Ozog et al. 2002). Estos autores proponen que el mecanismo por el cual se produce este efecto es una estabilización en la homeostasis del Ca^{2+} y disipación del estrés oxidativo (Blanc et al. 1998).

1.1.3.5. Tráfico de metabolitos y captación de glucosa.

Los astrocitos rodean totalmente con sus ramificaciones los capilares cerebrales (ver esquema 1). Por tanto, los sustratos han de atravesar estas terminaciones de astrocitos para acceder al resto del cerebro. Como ya hemos mencionado, los astrocitos *in vivo* están comunicados entre sí por las uniones comunicantes, lo cual puede suponer una canalización en el transporte de metabolitos entre la sangre y las células cerebrales, así como entre astrocitos adyacentes, permitiendo el transporte de iones y moléculas.

Como ya se indicó anteriormente, el tamaño límite de las moléculas que pueden pasar a través de estas uniones intercelulares oscila entre 1 y 1,5 kDa. Por consiguiente, a través de estas uniones cabría esperar que moléculas de bajo peso molecular, tales como segundos mensajeros o metabolitos energéticos, puedan ser intercambiados entre células adyacentes.

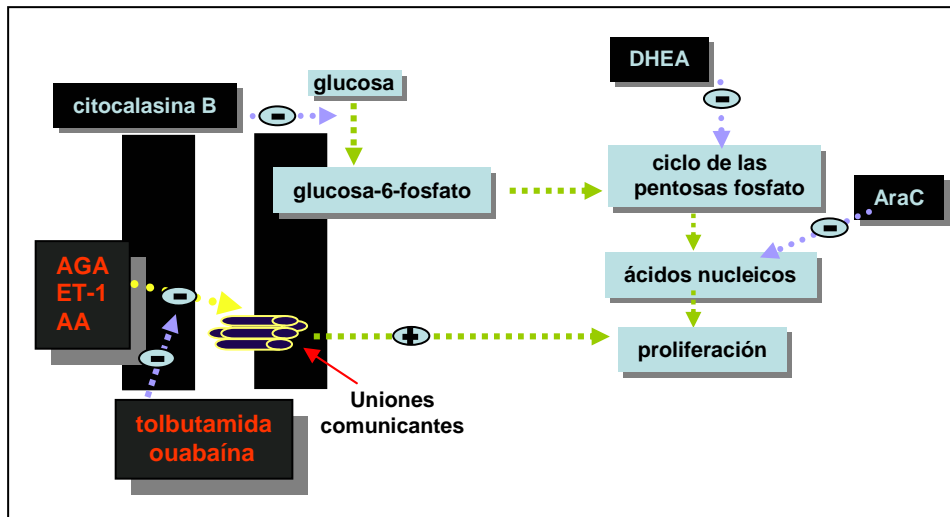
En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la transferencia de los principales metabolitos a través de las uniones comunicantes de astrocitos. Así, la glucosa y su derivado

fosforilado glucosa-6-fosfato, son capaces de atravesar las uniones comunicantes de los astrocitos (Tabernero et al. 1996a). Además, el lactato, un sustrato esencial para el cerebro en desarrollo (Medina et al. 1992), es capaz de pasar de un astrocito a otro a través de las uniones comunicantes (Tabernero et al. 1996a). 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). Estos resultados sugieren que los astrocitos, gracias al acoplamiento a través de las uniones comunicantes, se comportan como un sincitio metabólico. En este sentido, el paso de metabolitos a través de las uniones comunicantes puede resultar imprescindible en la cooperación sincitial de los astrocitos, permitiendo una distribución de la fuente de energía y esqueletos carbonados a través de todo el cerebro. De ser así, la regulación de la permeabilidad de estas uniones puede ser crucial en el metabolismo general del cerebro. En este sentido, estudios recientes muestran que las uniones comunicantes permiten el tráfico intercelular de glucosa y sus metabolitos entre las redes sincitiales de los astrocitos. Este tráfico de glucosa a través de las uniones comunicantes está regulado por la actividad sináptica glutamatérgica mediada por receptores AMPA. Además, en ausencia de glucosa en el espacio extracelular, los astrocitos obtienen este sustrato para mantener la actividad glutamatérgica, sólo cuando están conectados a través de las uniones comunicantes (Rouach et al. 2008).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que existe una relación entre la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes y el aumento en la captación de glucosa por los astrocitos (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Alvarez et al. 2004; Tabernero et al. 1996a). La inhibición de las uniones comunicantes estimula la captación de glucosa por los astrocitos acoplados en cultivo. Además, los inhibidores de las uniones comunicantes son capaces de estimular el ciclo de las pentosas fosfato (Tabernero et al. 1996a). En este sentido, la inhibición de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Gordon et al. 1995), previene el aumento de la captación de glucosa promovida por inhibidores de las uniones comunicantes. Dado que esta enzima participa en un paso limitante del ciclo de las pentosas fosfato, los resultados indican que el aumento en la actividad de esta vía metabólica es necesario para promover el incremento de la captación de glucosa que ocurre tras el cierre de las uniones comunicantes (Esquema 4).

Por otra parte, el ciclo de las pentosas fosfato suministra ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de los ácidos nucleicos. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la inhibición de las uniones comunicantes promueve un aumento en la síntesis de los ácidos nucleicos a partir de glucosa; este efecto se previene cuando se inhibe la actividad del ciclo de las pentosas fosfato. A su vez, la inhibición de la síntesis de DNA previene el aumento de la captación de glucosa promovido por los inhibidores de la comunicación intercelular, indicando que el propósito final del incremento de la captación de glucosa observado en estas circunstancias, es el aumento de la proliferación. De hecho, la velocidad de proliferación aumenta tras el

tratamiento con los inhibidores de las uniones comunicantes y este efecto se previene cuando se inhiben tanto la actividad del ciclo de las pentosas fosfato como la captación de glucosa. Cuando se previene el cierre de las uniones comunicantes se produce una disminución significativa de ambos procesos, lo que sugiere que el aumento de la velocidad de captación de glucosa y la velocidad de proliferación están relacionados con el cierre de las uniones comunicantes (Tabernero et al. 2001).



Esquema 4. Efecto de la inhibición de las uniones comunicantes sobre la captación de glucosa y la velocidad de proliferación en astrocitos.

AraC: citosina b arabinofuranósido. AA: ácido araquidónico. DHEA: dehidroepiandrosterona. AGA: ácido 18-a-glicirretínico. ET-1: endotelina-1. Modificado de Tabernero y col. (2001).

El aumento en la captación de glucosa se refleja en un importante aumento de la V_{max} y una disminución, de un orden de magnitud, de la K_m de este proceso. La inhibición de las uniones comunicantes en astrocitos produce un rápido cambio en la localización del principal transportador de glucosa en astrocitos, GLUT-1, desde el compartimento celular hasta la membrana plasmática. A su vez produce un rápido cambio en la localización de la hexokinasa tipo I, enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa, de las mitocondrias a los microtúbulos. Este proceso se consolida a largo plazo mediante el aumento de la expresión de GLUT-1 y de la hexokinasa tipo I, además de la inducción de GLUT-3 y de la hexokinasa tipo II, dos proteínas normalmente ausentes en astrocitos. Sin embargo, estas isoformas están presentes en células con alta capacidad glucolítica, siendo características del fenotipo tumoral (Sanchez-Alvarez et al. 2004).

Como ya hemos mencionado, parece existir una relación inversa entre la comunicación intercelular y la captación de glucosa. A favor de esta hipótesis, las células de glioma presentan bajos niveles de comunicación (Naus et al. 1991; Zhu et al. 1991), a la vez que muestran una alta velocidad de captación de glucosa (Muzi et al. 2001; Spence et al. 1998). Es más, el

aumento de la comunicación intercelular lleva consigo la disminución de la velocidad de captación de glucosa. Esta disminución que se observa tras la apertura de las uniones comunicantes, no es debida a cambios en los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3, dado que en estas circunstancias no se observan cambios en su localización ni en su expresión. Sin embargo, la actividad de la hexokinasa disminuye significativamente en las células de glioma C6 cuando se aumenta la permeabilidad de las uniones comunicantes. Este hecho no parece ser debido a los cambios en la expresión de las hexokinasa tipo I y tipo II, sino a la disminución de su asociación a las mitocondrias (Sanchez-Alvarez et al. 2004).

1.1.3.6. Apoyo en la migración neuronal.

Durante el desarrollo cerebral, las neuronas se ayudan de la glía radial para migrar desde la zona ventricular del cerebro hasta el neocórtex (Malatesta et al. 2003; Noctor et al. 2008). Las uniones comunicantes son necesarias para que la migración neuronal ocurra correctamente (Cina et al. 2007; Elias et al. 2007). Recientes estudios muestran que el extremo carboxilo de la Cx43 está implicado en la migración neuronal. Cina y col. han llevado a cabo estudios con ratones *knock-out* de Cx43 condicionados, en los que hay un silenciamiento selectivo de la Cx43 sólo en los progenitores de la glía radial. Se ha mostrado que en estos ratones la migración neuronal no ocurre correctamente. Cuando se han transfectado estos ratones con un plásmido que contenía la secuencia de la Cx43, la migración neuronal se ha restablecido. Además, en ratones modificados genéticamente a los que les falta el extremo carboxilo de la Cx43 aparecen efectos en la migración neuronal similares a los *knock-out* de Cx43 (Cina et al. 2009).

1.1.4. Regulación de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.

Las uniones comunicantes en el SNC, al igual que ocurre en otros tejidos, se pueden regular a corto y a largo plazo (Bruzzzone et al. 1996). La regulación a largo plazo ocurre en horas o días y opera a nivel transcripcional. Este tipo de regulación está asociado con los cambios en el número de canales que componen las uniones comunicantes, así como con cambios en la velocidad de internalización de las conexas y su degradación. Por otra parte, la regulación a corto plazo ocurre en cuestión de minutos y está relacionada con el paso rápido del estado abierto al cerrado y viceversa. La funcionalidad de las uniones comunicantes viene determinada, precisamente, por su estado abierto o cerrado, así como por la fracción de tiempo empleada en pasar de un estado al otro.

La permeabilidad de las uniones comunicantes puede estar controlada por distintas sustancias que podemos agrupar en reguladores “fisiológicos” y reguladores “no fisiológicos”.

En el grupo de los “no fisiológicos” se engloban sustancias como anestésicos volátiles (etomidato, propofol, halotano, enflurano) (Mantz et al. 1993), alcoholes (heptanol y octanol) (Bennett et al. 1991; Giaume et al. 1991b), el ácido 18- α -glicirretínico (AGA), la carbenoxolona (CBX) (Davidson et al. 1986; Guan et al. 1996), además de sulfonilureas como la tolbutamida y la glibenclamida (Granda et al. 1998; Sanchez-Alvarez et al. 2006; Tabernerero et al. 2006; Velasco et al. 2000).

En el grupo de los “fisiológicos” se encuentran diferentes agentes como la endotelina-1 (ET-1) (Giaume et al. 1992), el ácido oleico (Lavado et al. 1997), la noradrenalina (Giaume et al. 1991b), el isoproterenol (Giaume et al. 1991b) o la anandamida (Venance et al. 1995). Además, diversas señales intracelulares son capaces de regular la permeabilidad de las uniones comunicantes de los astrocitos, como son el ácido araquidónico (Sáez et al. 1990), los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Enkvist and McCarthy 1994; Granda et al. 1998), el óxido nítrico (Bolaños and Medina 1996) y el ATP intracelular (Vera et al. 1996). A continuación se detallan algunos aspectos referentes a los reguladores de las uniones comunicantes empleados en esta Memoria.

1.1.4.1. Endotelina-1

La ET-1 es un péptido de 21 aminoácidos, potente agente vasoconstrictor, que fue aislado por primera vez a partir del sobrenadante del cultivo de células endoteliales aórticas de cerdo (Yanagisawa et al. 1988). Constituye uno de los miembros de una familia compuesta por 3 péptidos con gran homología denominados ET-1, ET-2 y ET-3. Además de su acción vasoconstrictora, las ETs inducen un amplio espectro de efectos biológicos periféricos en tejidos no vasculares, tales como la constricción de las vías respiratorias y del músculo liso intestinal y uterino, acciones inotrópicas y cronotrópicas en el músculo cardíaco, efectos renales no vasculares y modulación de la secreción hormonal (para revisión, véase: Simonson and Dunn 1991). Ejercen su función fisiológica a través de dos receptores, ET_A y ET_B , los cuales son receptores transmembrana que están acoplados a proteínas G. El receptor ET_A se expresa principalmente en las células del músculo liso vascular de varios tejidos, mientras el receptor ET_B está más ampliamente distribuido, con una expresión predominante en las células gliales (Hori et al. 1992).

La ET-1 es la isoforma que más se ha estudiado (Yanagisawa et al. 1988; Yoshimoto et al. 1990; Zhang et al. 1994). Su implicación en el cáncer ha cobrado interés en las últimas décadas, a partir de los trabajos de Kusuhara y col. (Kusuhara et al. 1990) que demostraron la producción de ET-1 en varias líneas tumorales. En este sentido existen pruebas de que la ET-1 puede ser mitogénica y puede modular la apoptosis, la angiogénesis, la invasión del tumor y el desarrollo de la metástasis (para revisión, véase: Grant et al. 2003).

En el cerebro, las isoformas ET-1 y ET-3 son producidas por varios tipos de células, incluyendo los astrocitos (Ehrenreich et al. 1991; Giaume and Venance 1998), ciertas neuronas (Fuxe et al. 1991) y las células endoteliales (Yoshimoto et al. 1990), existiendo sitios de unión de alta afinidad para estos péptidos. En los astrocitos, las ETs inducen cambios en la concentración de varios segundos mensajeros, conocidos por su implicación en la regulación de los canales de las uniones comunicantes. En estos cambios se incluyen (Giaume et al. 1992):

1. Un rápido incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , seguido de una meseta duradera debida a la afluencia de este ión.
2. Un incremento en la producción de inositol fosfatos.
3. Una inhibición de la acumulación de cAMP debida a una acción β -adrenérgica.
4. Una liberación significativa de ácido araquidónico.

La ET-1 y la ET-3 inhiben la permeabilidad de las uniones comunicantes de los astrocitos "in vivo" e "in vitro" (Giaume et al. 1992). Además, la ET-1 produce, en los astrocitos, un aumento en la captación de glucosa, (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Alvarez et al. 2004; Tabernero et al. 1996a), promueve la proliferación celular (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Tabernero et al. 2001), induce la síntesis de proteínas, cambia la morfología de los astrocitos (Hasselblatt et al. 2003) y aumenta la liberación de glutamato (Sasaki et al. 1997), entre otros efectos. El significado de estas respuestas sobre la función de los astrocitos no está aún esclarecido del todo (Ehrenreich 1999), pero se conoce que durante la gliosis reactiva, los astrocitos liberan ETs que pueden participar en varias situaciones patológicas (Morga et al. 2000; Patel 1996; Rubanyi and Polokoff 1994). Así, los niveles de ETs están elevados en algunas enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Zhang et al. 1994), la inflamación cerebral (Nie and Olsson 1996), la infección por VIH (Chauhan et al. 2007; Didier et al. 2002), la hemorragia subaracnoidea (Masaoka et al. 1989), la isquemia (Barone et al. 1995; Yamashita et al. 2000), la gliosis reactiva (Hama et al. 1997; MacCumber et al. 1990) y los tumores astrocíticos (Stiles et al. 1997).

Respecto a la acción mitogénica de la ET-1 en los astrocitos, se ha demostrado que estimula la progresión del ciclo celular, ya que promueve un aumento del número de células que transitan de la fase G1 a la fase S (Tabernero et al. 2006; Teixeira et al. 2000). Así, la ET-1 produce un incremento en los niveles de Ki-67, una proteína que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular, pero ausente en las células que se encuentran en la fase G0 (para revisión, véase: Endl and Gerdes 2000) y un incremento de las ciclinas D1 y D3 (Tabernero et al. 2006; Herrero-González et al. 2009).

1.1.4.2. Carbenoxolona

La CBX es un derivado soluble del AGA, concretamente es la sal disódica del 3 β -O-hemisuccinato. Los derivados del AGA se han utilizado para estudiar el papel de las uniones comunicantes en el control del crecimiento de fibroblastos (Martin et al. 1991), la diferenciación de mioblastos (Mege et al. 1994) y la maduración de los oocitos (Downs 1995).

Algunos autores proponen que los derivados del ácido glicirretínico, como la CBX, inhiben las uniones comunicantes al unirse directamente a las conexinas e inducir, de este modo el cierre del canal (Davidson and Baumgarten 1988; Spray and Burt 1990). En este sentido, existen indicios que avalan la teoría de que estos compuestos se intercalan en la membrana plasmática y se unen a los conexones de las uniones comunicantes, induciendo un cambio conformacional que resulta en el cierre del canal (Davidson and Baumgarten 1988; Goldberg et al. 1996), sin afectar a la síntesis de proteínas ni a su localización (Goldberg et al. 1996).

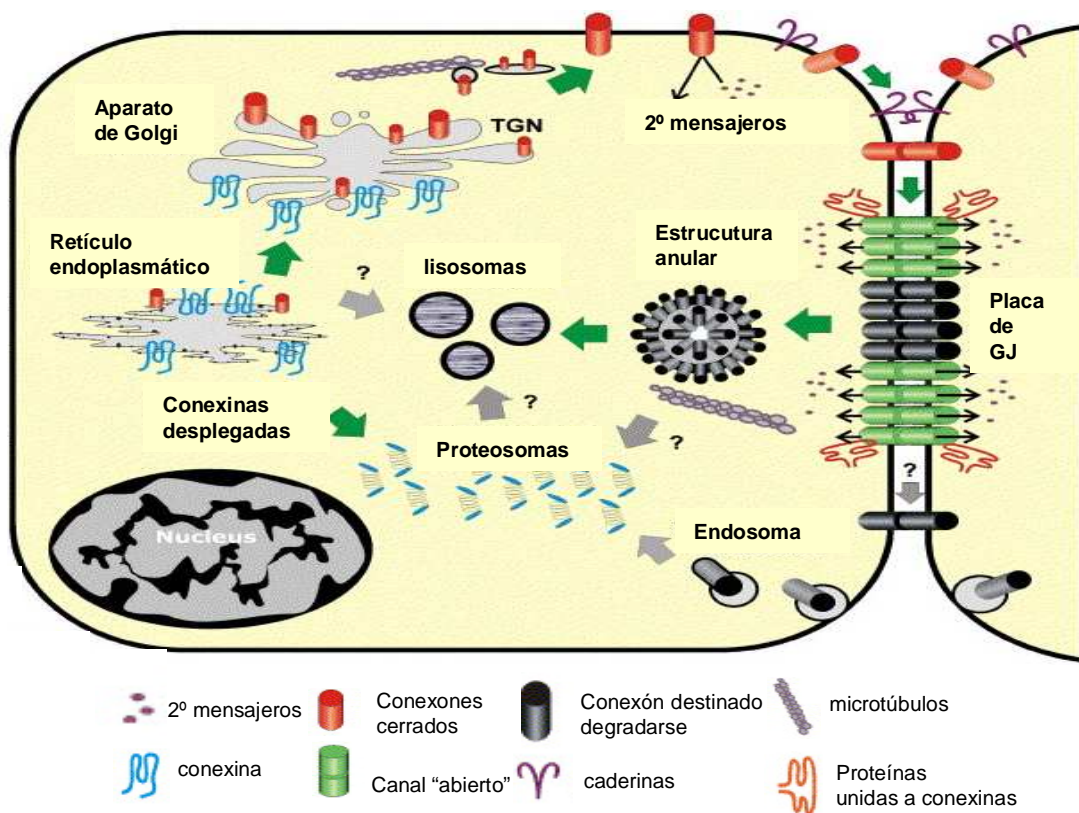
Los estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la CBX produce un aumento de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 y de la hexokinasa I y II, lo que conlleva un incremento en la captación de glucosa por los astrocitos (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Alvarez et al. 2004). Además, se ha demostrado que la CBX produce un aumento de la expresión de la proteína Ki-67 y de las ciclinas D1 y D3 (Herrero-Gonzalez et al. 2009; Tabernero et al. 2006).

1.1.5. Síntesis y degradación de la conexina43.

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 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) (Esquema 5).

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

Existen dos vías proteolíticas implicadas en el reciclaje de la conexina. 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 (Esquema 5). Diversos estudios han mostrado que los inhibidores del proteosoma disminuyen los niveles de degradación de la Cx43 en células en cultivo, lo que produce un incremento en el ensamblaje de las uniones comunicantes y en la comunicación intercelular (Musil et al. 2000). Recientes estudios han identificado y caracterizado una nueva proteína perteneciente a la familia de las ubiquitinas, CIP75, que interacciona con la Cx43 y parece estar implicada en la degradación de la Cx43 por la vía del proteosoma, reduciendo su vida media (Li et al. 2008).



Esquema 5. Síntesis de degradación de la conexina43

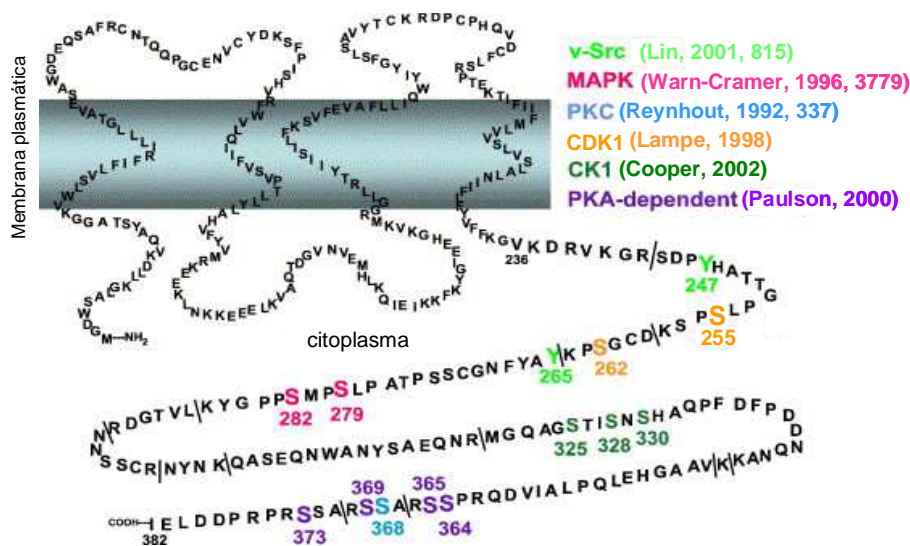
Modificado de Laird (2005)

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 visto vesículas de doble membrana semejantes a la estructura de las uniones comunicantes en el citoplasma de células en cultivo y en tejidos. Posteriormente se ha demostrado que estas estructuras son uniones comunicantes altamente empaquetadas. Esto sugiere que las estructuras anulares proceden de productos internalizados de uniones comunicantes por invaginación y son transportadas al interior del citoplasma para su posterior

degradación. Las clatrininas y los filamentos de actina podrían estar implicados en este proceso de internalización, que podría compararse a una endocitosis. 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).

1.1.6. Fosforilación de la conexina43.

La mayoría de las conexinas (Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 y Cx56) son fosforiladas en su extremo carboxilo terminal. Al analizar la expresión de la Cx43 mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se observa una banda correspondiente a la Cx43 no fosforilada (NP) y, al menos, dos bandas que presentan una velocidad de migración menor, debido a la fosforilación, denominadas comúnmente P1 y P2. Se ha demostrado que, en células transfectadas con la Cx43 sin su extremo carboxilo terminal, ésta no es capaz de formar uniones comunicantes funcionales, sugiriendo que la fosforilación de la Cx43 promueve la formación de las uniones comunicantes (para revisión, véase: Lampe and Lau 2000). En el esquema 6 se muestran las quinasas conocidas hasta el momento que fosforilan la Cx43 y los diferentes residuos que fosforilan. La activación de la proteína quinasa A (PKA) se ha relacionado con un incremento en el movimiento de la Cx43 en la membrana plasmática para la formación de los conexones. La caseína quinasa 1 (CK1) también parece estar implicada en el ensamblaje de la Cx43 para la formación de los conexones dentro de las uniones comunicantes. Otra quinasa que fosforila la Cx43 es la proteína quinasa C (PKC). Esta quinasa fosforila directamente la Cx43 en los residuos Ser²⁶² y Ser³⁶⁸. Estudios recientes realizados en cardiomiocitos que expresaban Cx43 con una mutación en la Ser²⁶² (S262A), presentan una disminución en la síntesis de DNA, indicando que el residuo Ser²⁶² sensible a la fosforilación de la PKC tiene un papel muy importante en la progresión del ciclo celular. La fosforilación en los residuos Ser²⁷⁹/Ser²⁸² debida a la MAP quinasa, tiene un papel importante en la disminución de la comunicación a través de las uniones comunicantes. El oncogen Src también fosforila directamente a la Cx43 en los residuos Tyr²⁴⁷ y Tyr²⁶⁵, disminuyendo la comunicación intercelular. Por último la quinasa dependiente de la ciclina B (CDK 1) fosforila la Cx43 en la Ser²⁵⁵ y en la Ser²⁶² durante la mitosis, lo que conlleva una fuerte disminución de la comunicación a través de las uniones comunicantes (para revisión, véase: Lampe and Lau 2004; Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009).



Esquema 6. Fosforilación de la conexina43

Modificado de Solan y Lampe (2005)

1.1.7. Modificaciones de la conexina43 durante el ciclo celular.

La fosforilación, localización y funcionalidad de la Cx43 se encuentran reguladas durante el ciclo celular. Estudios realizados en diferentes tipos celulares muestran que la expresión de la Cx43 aumenta durante las fases G1 y S y sus niveles de expresión afectan a la expresión de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular (Chen et al. 1995; Zhang et al. 2003a). 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 (NRK), se ha observado que, durante la fase G0/G1, la Cx43 expresada endógenamente 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 Ser³⁶⁸, residuo fosforilado por la PKC (Lampe et al. 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 ser que la PKC tiene un papel importante en estos efectos. Aunque durante la fase S se observa una acumulación de la Cx43 en el citoplasma, muchas placas permanecen en la membrana plasmática, sorprendiendo el hecho de que 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 (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 por la CDK1 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). 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 (Lampe et al. 1998; Xie et al. 1997).

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 (para revisión, véase: Solan and Lampe 2009).

1.2. COMUNICACIÓN INTERCELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR

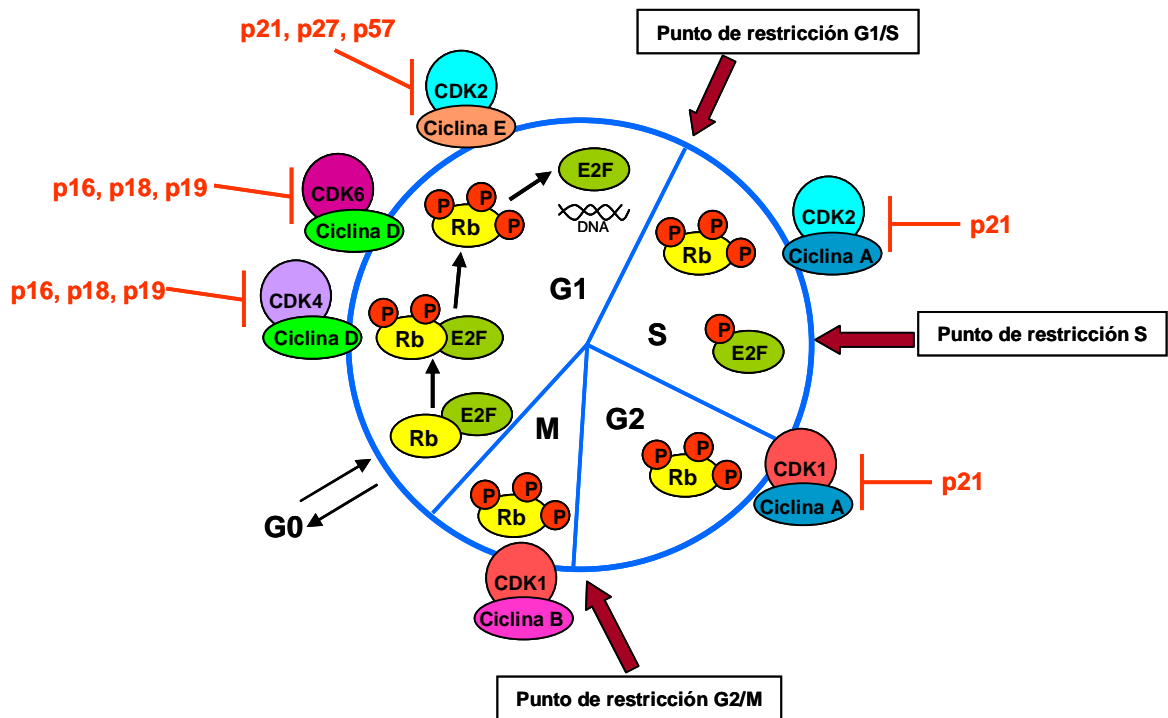
El ciclo celular en células eucariotas está dividido en en 4 fases: G1, S, G2 y M. En la fase G1 la célula prepara la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis del DNA y aumenta de tamaño. La fase S, o de síntesis, es el período de tiempo destinado a la síntesis de DNA, necesario para duplicar la información genética, de manera que cada célula hija recibirá una copia. En la fase G2, se condensan los cromosomas y la célula se prepara para el comienzo de la mitosis. Por último, la fase M, o mitosis, en la que la célula se divide en dos células hijas. Cuando la célula se encuentra en reposo o en estado quiescente se denomina G0.

Para asegurar una correcta progresión a través del ciclo celular, las células han desarrollado una serie de *puntos de restricción*, que previenen su entrada en una nueva fase del ciclo. En estos *puntos de restricción* la célula comprueba que no haya defectos durante la síntesis de DNA y la segregación de los cromosomas. La activación de estos *puntos de restricción* induce la parada del ciclo celular a través de la modulación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), de manera que la célula pueda reparar estos defectos y no transmitirlos a las células hijas (para revisión, véase: Malumbres and Barbacid 2001; Malumbres and Barbacid 2009).

Durante la fase G1 temprana, estímulos mitogénicos hacen que la célula se prepare para iniciar la síntesis de DNA. En este momento aumenta la expresión de las ciclinas D (D1, D2 y D3), que se unen a la CDK4 y la CDK6, activándolas. El complejo formado por las ciclinas D-CDK4/6 fosforila la proteína del retinoblastoma (pRb), inactivándola parcialmente. El pRb en células quiescentes se encuentra no fosforilado y en forma activa, atrapando al factor de transcripción E2F. Así, cuando el pRb se fosforila, se inactiva y libera E2F. E2F es un factor de transcripción de genes responsables de la transición de G1 a S (Sherr 1996), tales como la ciclina E. Por tanto, la inactivación parcial del pRb permite la expresión de la ciclina E, que se une y activa la CDK2. El complejo formado por la CDK2 y la ciclina E fosforila el pRb, permitiendo su completa inactivación y la liberación de E2F, necesaria para la transición de la fase G1 a la S. La ciclina A se une secuencialmente a CDK2, permitiendo el paso de la fase S a la fase G2. Finalmente, la CDK1 se activa mediante la ciclina A al final de la interfase, para facilitar la entrada en la mitosis. Siguiendo a la rotura de la membrana nuclear, la ciclina A se degrada y se forman los complejos CDK1-ciclina B, responsables del transcurso de la mitosis (Esquema 7) (Para revisión, véase: Malumbres and Barbacid 2001; Malumbres and Barbacid 2009).

La regulación de los complejos ciclinas-CDKs ocurre a diferentes niveles. Los inhibidores de las CDKs (CKIs) regulan la progresión del ciclo celular negativamente. Las CKIs están divididas en dos familias diferentes: INK4 y Cip/Kip. En la familia INK4 se incluyen las proteínas

p16, p18 y p19. Estas proteínas inhiben específicamente la actividad de CDK4 y CDK6, mientras que la familia Cip/Kip está formada por las proteínas p21, p27 y p57 que inhiben una amplia variabilidad de complejos ciclinas-CDKs (Esquema 7). En nuestro trabajo presenta especial interés la regulación de los complejos ciclinas-CDKs, debida a p27 y p21. Numerosos estudios indican que la sobreexpresión de p27 produce la parada del ciclo celular en la fase G1 en numerosos tipos celulares, debido a la formación de complejos entre p27 y las ciclinas D-CDK4 ó CDK6 y las ciclinas A ó E con CDK2. La parada del ciclo celular por contacto también está mediada, en parte, por p27. En células normales, los niveles de p27 son muy altos durante G0 y la fase G1 temprana y disminuyen en la fase G1 tardía y en la fase S. CDK2 fosforila p27, permitiendo su posterior reconocimiento por la proteína Skp2 y su consecuente degradación (Denicourt and Dowdy 2004 851; Montagnoli et al. 1999; Pagano et al. 1995; Sheaff et al. 1997). Respecto a p21, estudios en diferentes líneas celulares muestran que este inhibidor de CDKs tiene un papel muy importante en el punto de restricción G1/S, previniendo la entrada de células con poliploidía en la fase S (Stewart et al. 1999). Además, p21 bloquea la fosforilación que activa la CDK1 impidiendo la entrada de las células en mitosis (Smits et al. 2000).



Esquema 7. Regulación del ciclo celular

De acuerdo con el modelo clásico del ciclo celular, el complejo ciclina E-CDK2 es necesario para comenzar la fase S; los complejos formados entre la ciclina A-CDK2 y ciclina A-CDK1 son necesarios para la correcta continuación de la fase S y la entrada de la célula en mitosis y, por último, el complejo formado por la ciclina B-CDK1 es necesario para la progresión de la mitosis. Sin embargo, estudios realizados con ratones *knock-out* de cada una de las

CDKs y dobles *knock-out* de las CDKs muestran que no todas las CDKs son imprescindibles para la progresión del ciclo celular. La CDK2 en ratones *knock-out* sólo es necesaria para la meiosis y no se requiere para la interfase, aunque la disminución de la actividad o la completa inhibición de esta CDK en glioblastomas y osteosarcomas previene la proliferación de éstos (van den Heuvel and Harlow 1993). Además, estudios realizados con células en cultivo que tienen la actividad de la CDK2 disminuida, revelan que estas células aunque proliferan bien después de la parada el ciclo celular mediante la retirada del suero, entran en el ciclo celular con un retraso significativo (Ortega et al. 2003). Parece ser que la actividad de la CDK2 necesaria para la transición de la fase G1 a S puede ser sustituida por la CDK1 (Aleem et al. 2005; Krasinska et al. 2008). Los estudios realizados en *knock-out* revelan que la única CDK indispensable para la progresión del ciclo celular es la CDK1 (para revisión, véase: Hochegger et al. 2008).

En organismos multicelulares, la actividad celular coordinada es crítica para mantener la homeostasis de los distintos órganos. En este sentido, la comunicación intercelular es fundamental para procesos como el control de la proliferación y de la diferenciación (Loewenstein and Kanno 1966). De hecho, existen numerosos datos que indican que entre la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes y la regulación del ciclo celular existe una estrecha relación. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que relacionan la proliferación con la comunicación intercelular.

1.2.1. Efecto de los agentes promotores de tumores, oncogenes y factores de crecimiento en la comunicación a través de las uniones comunicantes.

Una de las primeras evidencias que relacionó la comunicación a través de las uniones comunicantes con la proliferación celular fue el hecho de que diversos agentes promotores de tumores, como los ésteres de forbol, producían una inhibición reversible de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Yotti et al. 1979). Además de los agentes promotores de tumores, varios oncogenes son capaces de inhibir la comunicación intercelular (Yamasaki and Naus 1996). Entre ellos se incluyen oncogenes retrovirales como: v-src, v-Ha-ras, v-raf, v-fps; oncogenes DNA virales como: SV-40 T, HPV 16-E5 y oncogenes celulares como: c-src, c-Ha-ras, c-erbB2 (para revisión, véase: Trosko et al. 1990). Concretamente, el producto de expresión del oncogén pp60src fosforila la Cx43 y, de esta forma, inhibe la comunicación intercelular. Se desconoce, por el momento, si el resto de los oncogenes inhibe, directa o indirectamente, la comunicación intercelular.

Entre los factores de crecimiento con capacidad de inhibir las uniones comunicantes se encuentran, además de la ET-1, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF inhibe la comunicación intercelular a través de la activación de MAP kinasas que fosforilan la

Cx43 (Warn-Cramer et al. 1998). Además, estudios recientes muestran que la esfingosina-1-fosfato (S1P), un potente modulador de la coagulación (para revisión, véase Marsolais and Rosen 2009), causa la inhibición de la comunicación intercelular a través de la inhibición de la proteína G y la Rho GTPasa (Rouach et al. 2006).

Por consiguiente, en todos los casos que se acaban de mencionar, la inducción de la proliferación se ve acompañada por una inhibición de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes.

1.2.2. Efecto de agentes diferenciadores y antineoplásicos sobre la comunicación a través de las uniones comunicantes.

En contraste a los efectos que producen los factores de crecimiento, los oncogenes y los promotores de tumores sobre las uniones comunicantes, existen inhibidores de la proliferación y agentes anticancerígenos que se caracterizan por aumentar la comunicación a través de las uniones comunicantes, así como la expresión de las conexinas en las células (Ren et al. 1994; Rogers et al. 1990; Ruch 1994; Zhang et al. 1992), lo que bloquea el efecto inhibitorio de los promotores de tumores sobre las uniones comunicantes (Chaumontet et al. 1994; Ruch et al. 1989). En este sentido, los retinoides, los carotenoides, ciertos flavonoides y glucocorticoides, así como los análogos y los agonistas del cAMP, inhiben la transformación neoplásica y/o el crecimiento tumoral en algunos tejidos aumentando la comunicación a través de las uniones comunicantes.

Además, ciertos genes supresores de tumores también inducen un aumento de la comunicación a través de las uniones comunicantes en las células neoplásicas. En este sentido, el cromosoma 11 humano posee uno o más genes supresores de tumores (Bystrom et al. 1990; Coleman et al. 1995; Hampton et al. 1994; Loh et al. 1992). La inducción de este cromosoma en las células neoplásicas restablece el crecimiento normal, reduce la tumorigénesis e incrementa la comunicación a través de las uniones comunicantes, efecto que es mediado por la Cx43 (de Feijter-Rupp et al. 1998), aunque el gen que codifica la Cx43 se localiza en un cromosoma diferente (Willecke et al. 1990). Esto sugiere que los genes supresores de tumores inhiben la transformación neoplásica y aumentan la comunicación intercelular, además de sus acciones conocidas sobre los genes del ciclo celular y los mecanismos de transducción de señales (Weinberg 1993).

1.2.3. Niveles de expresión de la conexina43 en los gliomas.

En los tumores en general y en los gliomas en particular, el nivel de comunicación intercelular se reduce considerablemente comparado con las células sanas. Los gliomas son tumores del sistema nervioso, de origen glial y mayoritariamente astrocítico. Constituyen los

tumores más abundantes del cerebro y, en términos generales, presentan muy mal pronóstico; además, son extremadamente diversos con respecto a su localización, morfología, diferenciación y respuesta a la terapia (para revisión, véase: Caskey et al. 2000). El grado de malignidad de los gliomas está inversamente relacionado con el nivel de expresión de la Cx43, siendo éste muy bajo en los astrocitomas anaplásicos (grado III) e indetectable en los glioblastomas multiformes (grado IV) (Huang et al. 1999; Soroceanu et al. 2001). Además, se ha determinado la funcionalidad de la comunicación intercelular con marcadores fluorescentes y se ha comprobado que a medida que aumenta el grado de malignidad de los tumores disminuye la difusión de moléculas entre células adyacentes (Soroceanu et al. 2001). Por tanto, se sugiere que la pérdida de comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la formación de estos tumores cerebrales malignos (Soroceanu et al. 2001).

1.2.4. La conexina43 como proteína supresora de tumores.

La Cx43 se considera una proteína supresora de tumores porque la expresión de este gen en las células tumorales y, por tanto, el establecimiento de la comunicación intercelular, trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Bond et al. 1994; Eghbali et al. 1991; Hirschi et al. 1996; Huang et al. 1998; Mesnil et al. 1995; Metha et al. 1991; Naus 2002; Yamasaki 1990; Yamasaki et al. 1999; Zhu et al. 1991). De hecho, en células de glioma C6 el aumento de la expresión de Cx43 por el tratamiento con tolbutamida o dbcAMP provoca la disminución de la proliferación (Sánchez-Alvarez et al. 2001).

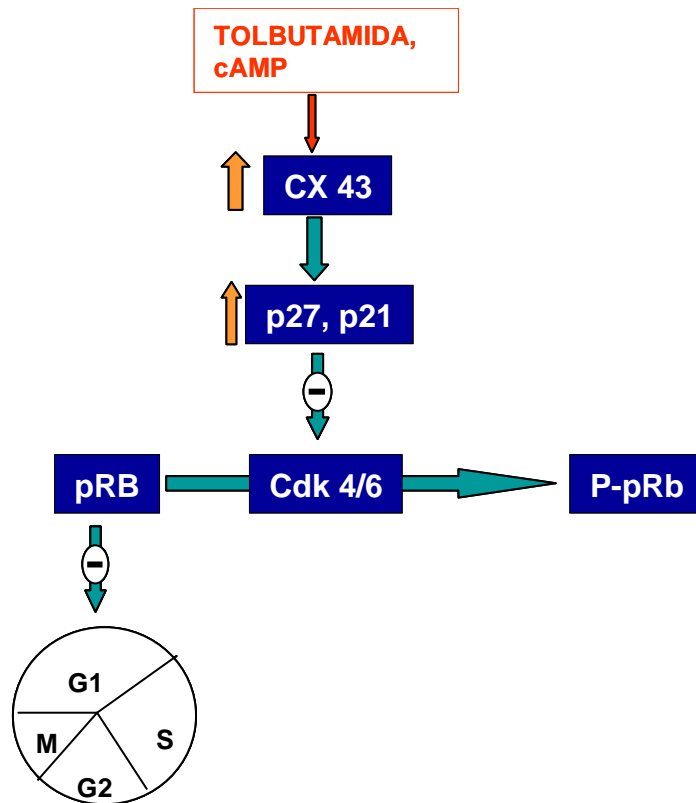
Así, cuando las células de glioma C6 se cocultivan con células de esta misma línea transfectadas con el cDNA de la Cx43, se inhibe la proliferación de la línea celular C6. Por consiguiente, Zhu y col (Zhu et al. 1992) sugieren que la inhibición de la proliferación se lleva a cabo por la secreción de factores inhibidores del crecimiento y que en esta secreción están directamente implicadas las uniones comunicantes. Otros trabajos demuestran que en las células epiteliales tumorales transfectadas con Cx43 se restablecen las uniones comunicantes y disminuye el contenido de ciclinas A, D1, D2, así como de CDKs 4 y 6 (Chen et al. 1995).

La Cx43, además de constituir los canales necesarios para la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes, se comporta como una proteína transmembrana capaz de participar en los mecanismos de señalización celular (Plotkin et al. 2002). De hecho, la Cx43 se localiza en regiones de la membrana plasmática denominadas *lipid rafts*, que están especializadas en la transducción de señales (Schubert et al. 2002). El extremo carboxilo terminal de la Cx43 parece ser el responsable de la señalización intracelular (Shin et al. 2001), ya que contiene varios residuos fosforilables 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), o la proteína tirosina quinasa c-Src (Giepmans

et al. 2001a). Al respecto, se ha descrito que el dominio carboxilo terminal de la conexina 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. Así, la Cx43 es capaz de regular la transducción de señales mitogénicas (Bjorge et al. 2000; Frame 2002). Por otro lado, la interacción de la Cx43 con ZO-1 a través de los dominios PDZ podría ralentizar la proliferación, puesto que el dominio PDZ de ZO-1 libre en el citoplasma induce la malignización celular (Reichert et al. 2000). Otra de las proteínas que interacciona con la Cx43, es CCN3 (NOV, *Nephroblastoma overexpressed*), una proteína de la familia CCN, con efecto antiproliferativo. Así, se ha observado que la Cx43 aumenta los niveles de expresión de CCN3, la cual, además, es capaz de unirse al extremo carboxilo terminal de la Cx43 (Fu et al. 2004; Gellhaus et al. 2004)

La Cx43 puede ejercer su función supresora de tumores modificando la expresión de los genes que caracterizan el fenotipo tumoral, probablemente a través de las vías de transducción de señales mencionadas anteriormente (Naus 2002). En este sentido, la sobreexpresión de la Cx43 en células de osteosarcoma humano (UO2S) induce cambios en los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular, como es el caso del inhibidor p27 o de la proteína asociada a quinasas de la fase S (Skp2) (Zhang et al. 2001; Zhang et al. 2003b). Al respecto, Skp2 regula la ubiquitinación de p27 y, por tanto, su degradación. En conjunto, la Cx43 provoca un aumento del p27 debido a la disminución de Skp2, inhibiendo la transición de la fase G1 a S y aumentando la cantidad de la proteína del retinoblastoma (pRb) no fosforilada. Además, en células de glioma C6 el aumento de expresión de la Cx43 por tolbutamida y dbcAMP provoca también un aumento de p27 y de p21, otra proteína inhibidora de CDKs y, por tanto, produciendo la disminución de la fosforilación del pRb concretamente en la serina 795. Como consecuencia 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 de estas células de glioma (Sanchez-Alvarez et al. 2006) (Esquema 8).

Por otra parte, la transfección de células tumorales humanas de cáncer de mama con la Cx43 inhibe la expresión del FGF y de su receptor, dos importantes factores angiogénicos (Qin et al. 2002). La inhibición de la angiogénesis tiene una consecuencia antitumoral importante, ya que impide el suministro de sustratos para el exacerbado crecimiento tumoral. Shao y col. observaron, en células mamarias, que el silenciamiento de la Cx43 estaba acompañado del desarrollo de un fenotipo tumoral altamente agresivo, caracterizado por una mayor capacidad de proliferación y migración, así como del aumento en la expresión de moléculas angiogénicas (Shao et al. 2005).



Esquema 8. Mecanismo por el cual la tolbutamida y el cAMP regulan la proliferación celular.

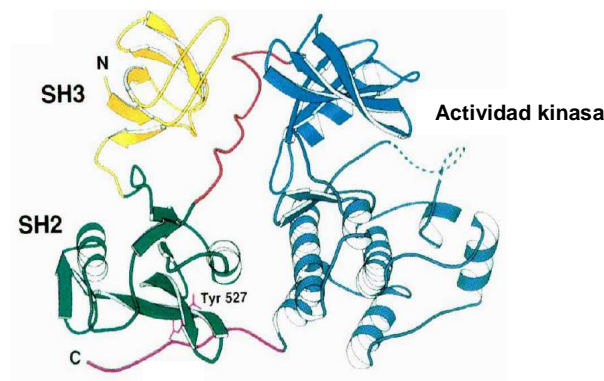
Modificado de Sánchez-Alvarez y col. (2006).

1.2.5. Efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes sobre la proliferación de los astrocitos.

Los inhibidores de las uniones comunicantes en astrocitos provocan un aumento de la proliferación que se refleja en un aumento de la Ki-67 y en un aumento del número de células en la fase S y en las fases G2/M, lo que indica que el cierre de las uniones comunicantes aumenta el porcentaje de células que entran en el ciclo celular. Asimismo, la expresión de las ciclinas D1 y D3, proteínas que promueven el paso de las células por el punto de restricción, es decir el punto de “no retorno” en la fase G1 del ciclo celular (Sherr 1994a), aumenta muy significativamente tras el tratamiento de las células con los inhibidores de las uniones comunicantes. Es más, la apertura de éstas previene el aumento de dichas proteínas, lo que sugiere que el proceso de entrada en el ciclo está relacionado con la inhibición de las uniones comunicantes (Taberner et al. 2006).

1.3. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE c-Src

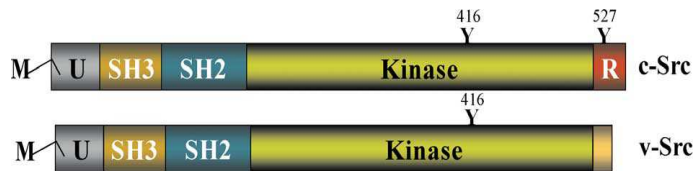
La proteína kinasa c-Src forma parte de una gran familia de proteínas tirosina kinasas (PTK) no receptoras, asociadas a membrana, de las cuales se han identificado 9 proteínas. La principal función de las PTK es la regulación de vías de señalización intracelular. Las PTK catalizan la transferencia de un fosfato desde el ATP a residuos de tirosina pertenecientes a sustratos celulares. Las PTK tienen un segmento homólogo que se ha denominado SH. El extremo amino terminal de c-Src tiene una región, denominada SH4, que se miristoila. A continuación se encuentran las regiones SH3, SH2 y la región catalítica SH1, seguida del extremo carboxilo terminal que incluye un residuo de tirosina que se fosforila inactivando c-Src. Las regiones SH2 y SH3 permiten las interacciones proteína-proteína en las cascadas de señalización celular (Esquema 9) (Xu et al. 1997).



Esquema 9. Estructura de c-Src.

Modificado de Xu (1997).

La proteína kinasa v-Src fue el primer retrovirus oncogénico identificado. v-Src difiere de c-Src en una sustitución de la secuencia en el carboxilo terminal, resultando en una pérdida de aminoácidos, como la tirosina 527 (Y527), que cuando se fosforila se une a los dominios SH y estabiliza la conformación cerrada o inactiva de la molécula (Esquema 10). Es decir, v-Src siempre se encuentra activo, mientras que c-Src tiene regulada su actividad. Numerosos estudios muestran que c-Src tiene un papel muy importante en la génesis y progresión de múltiples cánceres humanos, incluidos los gliomas (Du et al. 2009). Las células transfectadas con v-Src sufren modificaciones en el control del ciclo celular, encontrándose una disminución de p27, una elevada expresión de las ciclina D, A y E, un aumento en la actividad de los complejos D1, D3/CDK4/6, E/CDK2 y A/CDK2, hiperfosforilación de pRb y una estimulación de la progresión a través de la fase G1 a S (para revisión, véase: Frame, 2004). Estudios recientes realizados en diferentes líneas tumorales de cáncer de mama muestran que c-Src fosforila p27 en las tirosinas 74 y 88, disminuyendo el efecto inhibitorio de p27 sobre el complejo ciclina E-CDK2 y, por tanto, facilitando la progresión de la fase G1 del ciclo celular a la fase S (Chu et al. 2007).



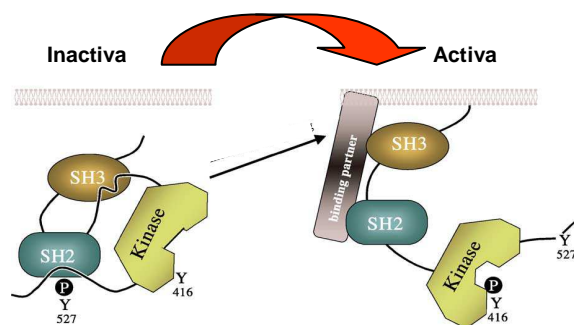
Esquema 10. Dominios estructurales de c-Src y v-Src.

Modificado de Frame (2002).

Por otro lado, se ha visto que c-Src está involucrado en la formación de podosomas, estructuras de adhesión ricas en actina, formadas en la membrana plasmática en contacto con la matriz extracelular. Estas estructuras están implicadas en la migración de las células tumorales por la matriz extracelular (Oikawa et al. 2008; Spinardi and Marchisio 2006).

La miristoilación del extremo amino terminal es necesaria para la asociación de c-Src con la membrana celular y es esencial para la función oncogénica de c-Src. En este sentido, los estudios realizados por David-Pfeuty y col. revelan que durante las fases G1 y S, c-Src se encuentra en la membrana plasmática y en el centrosoma, mientras que si se previene la miristoilación de c-Src, ésta se encuentra predominantemente en el citoplasma y una pequeña cantidad en el núcleo. Durante la fase G2, c-Src abandona la membrana plasmática y se redistribuye por todo el citoplasma alrededor de los centriolos. Por el contrario, al prevenir la miristoilación de c-Src, ésta va al núcleo durante la fase G2. Por último, durante la mitosis, la prevención de la miristoilación, hace que c-Src se encuentre asociado a estructuras necesarias para la mitosis, mientras que si c-Src se miristoila continúa en el citoplasma (David-Pfeuty et al. 1993).

Una óptima actividad de c-Src requiere la autofosforilación de la tirosina 416 (Y416). Estudios de cristalografía y determinación de la estructura revelan que la actividad de esta proteína, además de estar regulada por autofosforilación, está regulada por interacciones intramoleculares. La fosforilación en Y527, próxima al carboxilo terminal, permite interaccionar este extremo de la proteína con la región SH2 y pasar a la conformación cerrada o inactiva (Esquema 11). La fosforilación de Y527 es debida a otra tirosina kinasa llamada Csk. La desfosforilación de Y527 por tirosinas fosfatasas, la delección o la mutación de Y527 o el desplazamiento de SH2 y SH3 por interacciones intramoleculares o con ligandos de alta afinidad, conllevan también a la activación de c-Src en células tumorales (Frame 2002; Xu et al. 1997).



Esquema 11. Regulación de la actividad de c-Src.

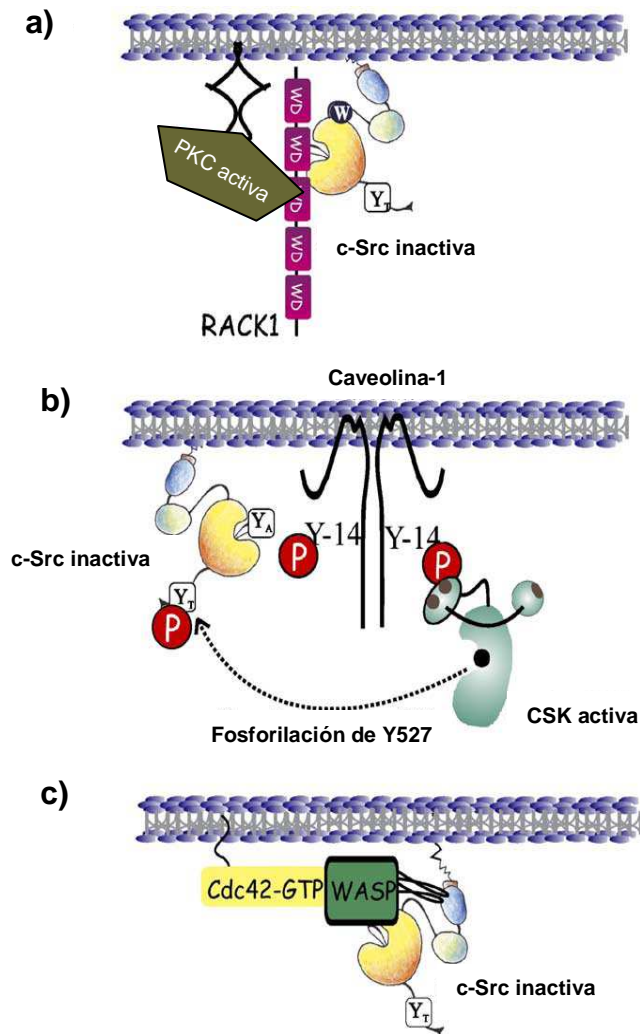
Modificado de Frame (2002).

La actividad de c-Src también se regula mediante interacciones con moléculas endógenas o moléculas “no endógenas”. Entre las moléculas endógenas se encuentran RACK1, la caveolina-1 y WASP. RACK1 es un receptor intracelular para la PKC activa. Se ha demostrado que RACK1 también interacciona con c-Src, además de con la PKC. Así, estudios realizados con fibroblastos en los que se sobreexpresó RACK1 revelan que esta proteína inhibe la actividad de c-Src y, como consecuencia disminuye la expresión de la ciclina D1, la actividad de CDK4 y CDK2, aumentando la expresión de p27 y la actividad del pRb que mantiene secuestrado E2F, lo que conlleva el retraso de la transición de la fase G1 a S (Mamidipudi et al. 2004; para revisión, véase: Chong et al. 2005) (Esquema 12a).

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

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

Entre las moléculas “no endógenas” que regulan la actividad de la c-Src se encuentran PP1 y PP2. Son compuestos pirazolo-pirimidil-amino, ampliamente utilizados como inhibidores de c-Src para estudiar las vías de señalización celular de esta proteína. Tanto PP1, como PP2 bloquean los sitios de unión para el ATP de c-Src (Para revisión, véase: Chong et al. 2005). En este grupo también se encuentran inhibidores con actividad farmacológica utilizados en ensayos clínicos, tales como el *dasatinib* (Du et al. 2009).



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

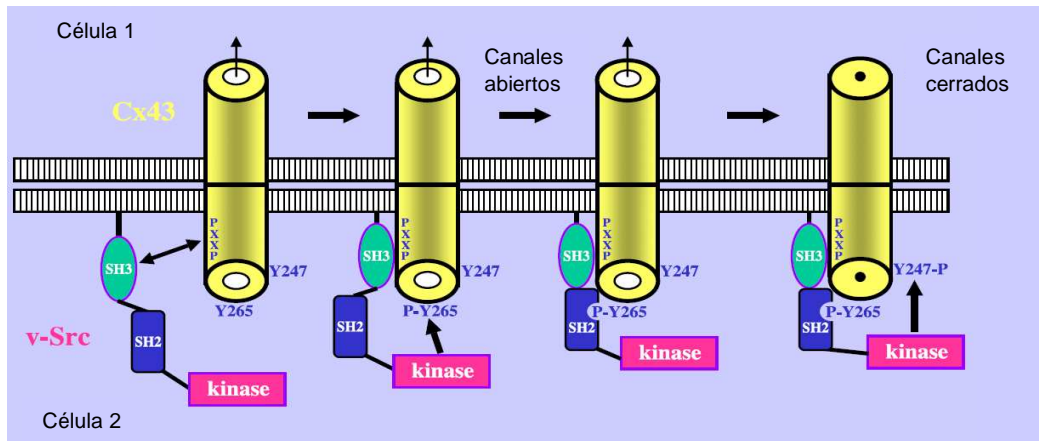
Modificado de Chong (2005).

1.3.1. Relación de la conexina43 con c-Src

Numerosos estudios muestran que v-Src, la forma activa de c-Src, fosforila la Cx43 en residuos de tirosina, lo que conlleva una inhibición de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Crow et al. 1990; Giepmans et al. 2001a; Kurata and Lau 1994; Lin et al. 2001; Swenson et al. 1990) (Esquema 13). v-Src fosforila directamente la Cx43, tanto *in vitro* como *in vivo* (Loo et al. 1995), en el residuo de tirosina 265 (Y265) del extremo carboxilo terminal de la Cx43 (Kanemitsu et al. 1997). La transfección de diferentes líneas celulares con la Cx43 en la que se había mutado Y265 por una fenilalanina, muestra que c-Src, también fosforila la Cx43 en Y265 (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 interactúa 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 la fosforilación en Y247 se requiere para el cierre de las uniones comunicantes (para revisión, véase: Lampe and Lau 2004).

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 con ZO-1 (Gilleron et al. 2008; Lampe and Lau 2004; Toyofuku et al. 2001).



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

Modificado de Warn-Cramer y Lau (2004).

2.PLAN DE TRABAJO

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la Introducción y con objeto de conocer el papel de la conexina43 en la proliferación de los astrocitos y de las células de glioma, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

1. Estudio del efecto de la pérdida de la conexina43 sobre la proliferación de astrocitos y del mecanismo molecular implicado.
2. Estudio del efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la proliferación de células de glioma y del mecanismo molecular implicado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario y línea celular utilizada

Se han empleado ratas albinas Wistar de distintas edades, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Se emplearon también ratones C57BL6 cedidos por el Prof. Christian Giaume, del Collège de France, París, Francia

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 controló entre los 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.

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).

3.1.2. Medios instrumentales

- El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo milli-RO plus 10 y una unidad de agua ultrapura milli-Q plus 185 (Millipore Ibérica, Madrid, España).
- Las pesadas se realizaron en una balanza modelo 1207 MP2 y en un granatario modelo 1216 MP (Sartorius GmbH, Göttingen, Alemania).
- El pH se determinó con un medidor de protones, marca Crison (Selecta, Barcelona, España).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, U.S.A.) modelo J2-21M, una centrífuga Beckman de mesa modelo TJ-6, una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5702.
- La cabina de flujo laminar utilizada es un modelo TC 48 (Gelaire Flow Laboratories, McLean, U.S.A.).
- Los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore Ibérica). Para pequeños volúmenes de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (AcrodiscPall Gelman Laboratory, Michigan, U.S.A.).

- Para la tripsinización de las células se ha utilizado un baño termostático a 37°C, modelo Precistern (Selecta). Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se ha utilizado un baño modelo Haake Fisons GH con termostato acoplado, modelo Haake Fisons D8 (Haake, Berlín, Alemania) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).
- El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa marca Selecta (modelo S-20), termostática a 170°C.
- El agua, el material de disección y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterizaron por medio de calor húmedo en un autoclave modelo 437 (Selecta).
- Las células se sembraron en placas estériles procedentes de las casas comerciales Nunc (Nuncion, Roskilde, Dinamarca) y TPP (Trasadingen, Suiza).
- Las células se mantuvieron en cultivo en el incubador de CO₂ modelo Galaxy (RS Biotech, Northants, Reino Unido).
- Se utilizaron botellas de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono suministradas por la Sociedad Castellana de Oxígeno (Valladolid, España).
- Las células se observaron periódicamente con un microscopio de contraste de fases, modelo Willovert II pH (Leica, Wetzlar, Alemania) y se contaron con la ayuda de una cámara cuentaglobos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- El espectrofotómetro que se ha utilizado es de la marca Shimadzu, Modelo UV 120-02 (Shimadzu Co, Kyoto, Japón). Las cubetas utilizadas son de plástico, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Elkay, Boston, U.S.A.) o de cuarzo, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Hellma, Mulheim, Alemania).
- Para los análisis de transferencia tipo "Western" se utilizó un sistema de electroforesis vertical modelo "SE 600 Ruby" (Amersham Biosciences) y un sistema de electrotransferencia modelo "Trans-Blot Transfer Cell" conectado a una fuente de alimentación modelo "PowerPac 300" de Bio-Rad (Hercules, U.S.A.). Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un *Navigator* (Fredericton, Canada).
- Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizó la máquina de revelado *Kodak Medical X-Ray processor 102* (Rochester, New York, U.S.A.)
- El programa de análisis de imagen utilizado fue Scion Image.
- Para llevar a cabo la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT y PCR, respectivamente) se utilizó un termociclador modelo GeneCycler (Bio-Rad).
- Para la selección de los oligonucleótidos empleados en la PCR y RT-PCR se utilizó el programa informático Oligo™ 4.0.
- Los viales de plástico de 0,2 mL para PCR se adquirieron en Biotools (Biotools-B&M Labs S.A., Madrid, España).
- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad), propiedad del Instituto de Microbiología Bioquímica (IMB/Universidad de Salamanca, España).

- La secuenciación del inserto correspondiente al cDNA de la conexina43 se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España).
- Las imágenes se capturaron utilizando cámaras de video digitales, modelos Leica DC 100 y Leica DC 350 F (Leica Microsystems).
- Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio confocal modelo TCS SP5 (Leica), propiedad del Centro de Investigación del Cáncer (CIC/Universidad de Salamanca, España). Las imágenes se analizaron empleando el programa informático de análisis de imagen LAS AF (Leica).
- Para los experimentos con moléculas fluorescentes se empleó un microscopio invertido de fluorescencia, modelo Eclipse T2000 (Nikon Europe B.V., Badhoevedrop, Holanda) y un microscopio Nikon, modelo LWD 0,52.
- Para la cuantificación del ciclo celular se utilizó un citómetro de flujo, modelo FACSCalibur (BD Biosciencias, Madrid, España), perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Universidad de Salamanca).
- Para la realización del ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se utilizó un fotómetro de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EEUU) y un fotómetro de microplacas Appliskan (Thermo Electro Corporation).

3.1.3. Productos

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

3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares

- El medio de cultivo de astrocitos procedía de la casa Sigma y es del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).
- El suero fetal bovino (FBS) procedía de la casa Gibco (Invitrogen, Barcelona, España).
- La DNAsa I, la tripsina y la albúmina (fracción V) que se utilizaron en la realización de los cultivos celulares, 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 empleada en los cultivos de astrocitos procedía de Sigma.

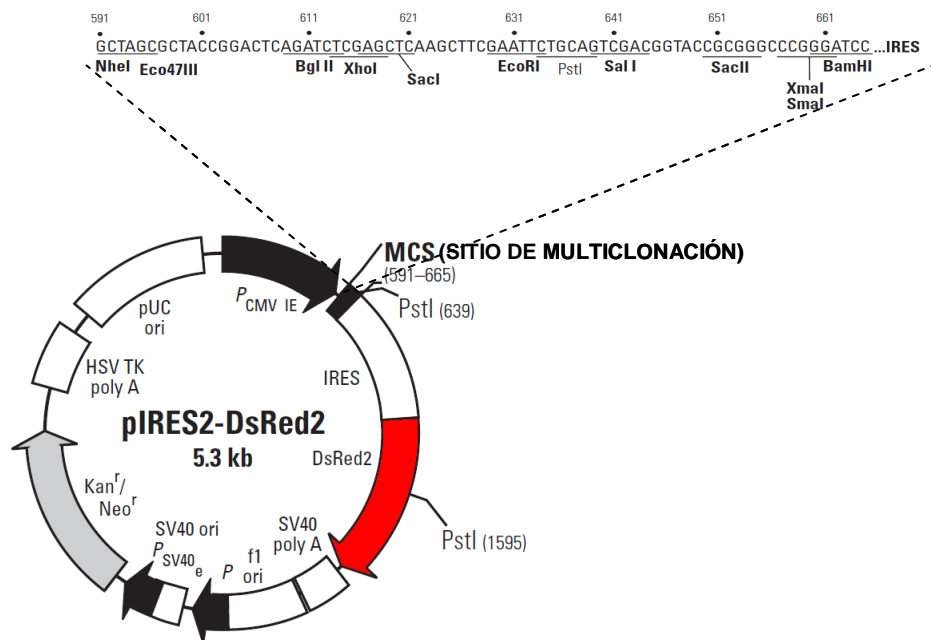
3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección del mRNA

- El reactivo para la extracción del RNA (Trizol Reagent), así como los hexanucleótidos empleados como cebadores (*random hexamer primers*), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el ditioneitol (DTT) y la enzima transcriptasa inversa (SuperScriptII Reverse Transcriptase), utilizados en la RT, procedían de Invitrogen.
- El inhibidor de RNAsas fue suministrado por Ambion (Cambridgeshire, Reino Unido).
- El dietilpirocarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas fue adquirido a Sigma.
- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Reino Unido).
- La polimerasa de DNA Taq, utilizada en la PCR, fue adquirida en Biotools.
- Los reactivos y productos utilizados en la preparación de soluciones y tampones para biología molecular estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa Sigma.
- La agarosa utilizada en las electroforesis procedió de la casa Pronadisa (Madrid, España).
- Como marcadores de tamaño de DNA, se utilizaron el marcador de 100 pb de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU) y el marcador de alto peso molecular de Invitrogen.

3.1.3.3. Productos utilizados en la construcción del plásmido pIres-Cx43 y pCx43Y247F/Y265F

- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR se adquirieron en Sigma-Genosys. En apartados posteriores se indican sus secuencias.
- Para la amplificación del DNA se utilizó la polimerasa Triple Master[®], procedente de la casa Eppendorf, que permite amplificar la secuencia de interés con alta fidelidad.
- Para la purificación del DNA lineal se utilizó el kit *GenElute Gel Extraction*[®], procedente de la casa comercial Invitrogen.
- La triptona y el extracto de levadura para la elaboración del medio de bacterias procedieron de la casa Scharlau (Chemie, S.A. Barcelona, España). La kanamicina, utilizada para la selección de *E. coli*, procedió de la casa Sigma-Aldrich. El antibiótico G418, utilizado para la selección de las células eucariotas, procedió de Promega (Madison, WI, EEUU).
- Las enzimas de restricción *Bam*HI, *Xho*I, se adquirieron en la casa comercial Promega. La ligasa T4 procedió de Roche Diagnostics (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).
- Los productos utilizados para la purificación del DNA plasmídico fueron de las casas Promega o MOBIO (Solana Beach, CA. U.S.A.).
- El vector pIRES2-DsRed2 (véase esquema 14) procedió de Clontech (Palo Alto, CA, U.S.A.). Presenta, entre otras, las siguientes características:

- El promotor del citomegalovirus (CMV) humano.
- Un sitio de multiclonación (MCS), con sitios de restricción para diferentes enzimas.
- Una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*).
- El gen de la proteína roja fluorescente (RFP), DsRed2.
- La señal de poliadenilación SV40.
- Un origen de replicación para células eucariotas (SV40 *ori*) y otro para células eucariotas (pUC *ori*).
- Un gen de resistencia a neomicina que permite la selección en células eucariotas utilizando el antibiótico geneticina. También posee el gen de resistencia a kanamicina que permite la selección en células procariontas.
- Tiene un tamaño de 5,3 Kb.



Esquema 14. Estructura del plásmido pIRES2-DsRed2

- El bromuro de etidio, los dNTPs, la agarosa, los marcadores de tamaño de DNA así como los reactivos y productos utilizados para preparar las distintas soluciones y tampones fueron los mismos que se indican en el apartado 3.1.3.2.
- El kit “QuikChange[®] Site-directed mutagenesis” utilizado para realizar la doble mutación Y247F/Y265F de la Cxc43 fue suministrado por Stratagene.

3.1.3.4 Productos utilizados en los experimentos para el análisis de proteínas

- Los inhibidores de proteasas: antipaína, pepstatina, amastatina, aprotinina, leupeptina, bestatina, inhibidor de tripsina y PMSF procedieron de la casa Sigma.
- El reactivo Bradford para la determinación de proteínas, la solución de 30% acrilamida/Bis (29:1) para la preparación de geles para la electroforesis de proteínas y los marcadores de peso molecular de proteínas procedían de Bio-Rad.
- El N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato amónico (AMPS) utilizados en la preparación de los geles procedieron de la casa Sigma.
- Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PDVF de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore).
- El metanol utilizado en la preparación del tampón de transferencia tipo Western y para la activación de las membranas de PDVF procedió de la casa comercial Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra la ciclina D1, el anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki-67 y el anticuerpo monoclonal de ratón contra pRb fosforilado en la serina 795 se adquirieron en Sigma.
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra la conexina43, el anticuerpo monoclonal de ratón contra la ciclina D3, el anticuerpo monoclonal de ratón contra p21, el anticuerpo monoclonal de ratón contra el pRb total fueron suministrados por BD Transduction Laboratories (Becton Dickinson)
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se adquirió en Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- El anticuerpo policlonal de conejo contra Src total y el anticuerpo policlonal de conejo contra Src fosforilado en la tirosina 416 se adquirieron en Cell Signaling Technology (Boston, EEUU).
- El anticuerpo policlonal de conejo contra el pRB fosforilado en la serina 780, el anticuerpo monoclonal de ratón contra p27, el anticuerpo policlonal de conejo contra la ciclina E, los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón, conejo u oveja, conjugados con peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente luminol provinieron de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, U.S.A.).
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra Src fosforilado en la tirosina 416 y conjugado con Alexa Fluor 555 han sido adquiridos en Upstate cell signalig (Millipore).
- El anticuerpo policlonal de conejo contra la conexina43 fue suministrado por Zymed Laboratories Inc (San Francisco, EEUU).
- Los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor488 o AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón y el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de oveja fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

- El anticuerpo policlonal de rata contra 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y el anticuerpo secundario conjugado con cianina (Cy3) contra inmunoglobulina de rata fueron cedidos por el Prof. Christian Giaume del Collège de France, París, Francia.
- La proteína A inmovilizada en Sefarosa CL-4B (*Protein A Sepharose CL-4B*) fue suministrada por Amersham Biosciences (GE Healthcare, Barcelona, España).
- Las películas de autorradiografía para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la marca Fujifilm (Madrid, España).
- El paraformaldehído y el metanol utilizado para fijar las células procedían de la casa Merck.
- El medio de montaje para observaciones al microscopio *SlowFade Gold antifade reagent* y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente del DNA, fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

3.1.3.5. 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 la conexina 43 (Cx43) procedieron de la casa comercial BioNova científica S.L. (Madrid, España) y tienen las siguientes secuencias:

cadena sentido: 5'-GCUGGUUACUGGUGACAGATT-3'

cadena antisentido: 5'-UCUGUCACCAGUAACCAGCTT-3'

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

3.1.3.6. Productos utilizados para la cuantificación y parada del ciclo celular

- El yoduro de propidio utilizado para marcar el DNA fue suministrado por Fluka Biochemika
- La RNasa utilizada para degradar el RNA procedió de ROCHE.
- La afidicolina, timidina y nocodazol utilizados para parar el ciclo celular han sido adquiridos en Sigma.

3.1.3.7. Otros productos

- Los agentes que actúan sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes: endotelina-1 (ET-1) y carbenoxolona procedieron de la casa sigma.
- El kit de anexina-V, utilizado para medir apoptosis, procedió de Molecular Probes (Eugene, OR, USA) o de Immunostep (Salamanca, España).

- El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) procedieron de Sigma-Aldrich.
- El amarillo de Lucifer, utilizado para medir la comunicación intercelular procedió de la casa Sigma.
- El agente inhibidor de Src, PP2, y el agente utilizado como control PP3 fueron suministrados por Calbiochem (Nottingham, Reino Unido).
- El antibiótico G-418, utilizado para la selección de clones ha sido adquirido en Promega.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparación de los cultivos celulares

3.2.1.1. Composición de las disoluciones.

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con H₂O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2, excepto en los casos en que se indique otro pH, y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

solución de Earle (EBSS)

NaCl	116 mM
KCl	5,4 mM
NaH ₂ PO ₄	1,0 mM
MgSO ₄	1,5 mM
NaHCO ₃	26 mM
rojo fenol	10 mg/l
D-glucosa	14 mM

solución de disgregación (solución A)

albúmina (Fracción V)	3 µg/ml
DNAsa tipo I	20 µg/ml
EBSS	50 ml

solución de tripsinización (solución B)

tripsina	0,25 µg/ml
DNAsa tipo I	60 µg/ml
albúmina (Fracción V)	3 µg/ml
EBSS	20 ml

medio de cultivo

DMEM + FCS al 10% (v/v)

penicilina G	50 U/ml
estreptomina	37,5 U/ml

3.2.1.2. Preparación del cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al. 1993). 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, estreptomina 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% 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 *in vitro* (21 DIV).

3.2.1.3. Preparación del cultivo de células de glioma C6.

Las células de glioma C6 se cultivaron según el método descrito previamente por Tabernero y col. (Tabernero et al. 1996a). Las células se obtuvieron a partir de alícuotas congeladas que contenían $1,0 \times 10^6$ células/ml y se resembraron en placas petri recubiertas con poli-L-lisina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), en medio de cultivo suplementado con FCS al 10% (v/v), a pH 7,2, con dos cambios de medio por semana. Se mantuvieron en un incubador a 37°C , con un 5% de CO_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 de glioma, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina/EDTA durante 1 minuto a 37°C . Se recogieron en DMEM + FCS 10% (v/v), para finalizar la tripsinización y se centrifugaron durante 5 minutos a $500 \times g$. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de cultivo. Se cuantificó el número de células empleando una cámara de Neubauer y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada según el tipo de experimento.

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

3.2.2. Tratamientos celulares en astrocitos

En todos los casos se utilizaron astrocitos de 21 días de cultivo. Las células se incubaron con DMEM en ausencia de suero, al menos 4 horas antes de cada experimento. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se añadió medio fresco, en ausencia de suero, que contenía los diferentes tratamientos celulares. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante el tiempo que se indica en cada caso.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA tal y como se explica en el apartado 3.2.8. 48 h después de la transfección, los astrocitos se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ET-1 $0,1 \mu\text{M}$ o de CBX $50 \mu\text{M}$ durante 24 horas. Estos agentes se mantuvieron a la misma concentración durante el resto del experimento.

3.2.3. RT-PCR

Para la construcción del plásmido bicistrónico, que codificase el cDNA de la Cx43 y el gen de la proteína DsRed2, una proteína roja fluorescente, se utilizaron los siguientes métodos.

La secuencia del cDNA que codifica la conexina43 en rata procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), nº de identificación:

NM_012567. Para la síntesis del cDNA de la conexina 43 se utilizó como molde RNA total de astrocitos y se realizó una retrotranscripción para pasar de RNA total a cDNA.

I. Extracción del RNA total de los cultivos

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

II. Cuantificación del RNA

La calidad del RNA se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), comprobándose la presencia de las bandas de RNA ribosómico (18 S y 28 S). Además, el RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 nm.

III. Retrotranscripción (RT)

Para realizar la transcripción del RNA total a DNA complementario (cDNA) se utilizó la enzima transcriptasa SuperScriptII, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total se mezcló con 200ng de cebadores hexaméricos aleatorios (*random hexamer primers*) en un volumen total de 11 µL de H₂O-DEPC. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 70°C y seguidamente en baño de hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 9 µL de una mezcla compuesta por 5 µL del tampón de la transcriptasa, 1 µL de la transcriptasa SuperScriptII, 1 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1µL de inhibidor de RNasas y 1µL de ditioneitol (DTT). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador y consistió en un paso inicial de anillamiento (10 minutos a 20°C), seguido de elongación (45 minutos a 42°C) y desnaturalización (5 minutos a 99°C). Al final de la reacción, la temperatura se mantuvo a 7°C. Finalizada la reacción, el volumen se completó hasta 50 µL con H₂O-DEPC.

IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

Los nucleótidos seleccionados para amplificar el gen de la proteína Dsred2 fueron:

Cadena sentido: 5'- ATGGCCTCCTCCGAGAACG-3'

Cadena antisentido: 5'- CTACAGGAACAGGTGGTG-3'

Los nucleótidos seleccionados para amplificar el cDNA de la conexina43 fueron:

Cadena sentido: 5'- ATGGGTGACTGGAGTGCCTTGGGG-3'

Cadena antisentido: 5'- TTAATCTCCAGGTCATCAGGCCGAG-3'

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

- 1-2 µl de cDNA molde.
- 5 µl de tampón libre de Mg²⁺.
- 1 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM).
- 2 µl de Cl₂Mg.
- 2 µl de cada oligonucleótido.
- 1 µl de DNA polimerasa (1U)
- 35-36 µl de H₂O ultrapura estéril.

En el caso de la amplificación del gen de la proteína Dsred2 se utilizó la *Taq* polimerasa de Biotools. Para amplificar el cDNA de la conexina43 se utilizó la polimerasa TripleMaster de Eppendorf.

Una vez preparada la mezcla, los tubos se llevaron al termociclador para amplificar el gen deseado. En ambos casos se utilizaron 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: Dsred2 (94 °C 45", 55 °C 30", 72 °C 1'), conexina43 (94 °C 20", 65 °C 40", 72 °C 1min 30").

Una vez obtenido del cDNA de la Cx43 se amplificó mediante una segunda PCR con cebadores que contenían secuencias de restricción (los extremos subrayados) para las enzimas Xho I y BamH I, para su posterior inserción en el plásmido plres2-DsRed2.

Cadena sentido: 5'- CGC'TCGAGCGATGGGTGACTGGAGTG-3'

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

Las condiciones de esta segunda PCR fueron 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 94°C 20", 59,5°C 20", 72°C 1 min 30"

V. Electroforesis de DNA

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

3.2.4. Construcción del plásmido plres-Cx43 y pCx43Y247F/Y265F

Una vez obtenido el cDNA de la conexina43 con las secuencias de restricción adecuadas para la inserción en el plásmido plres2-DsRed2, se llevó a cabo la construcción plres-Cx43, para el cual se llevaron a cabo los siguientes métodos:

3.2.4.1. Purificación de DNA.

La electroforesis del DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE, en presencia de bromuro de etidio al 0,005% (v/v). Con la ayuda de una lámpara de luz UV se visualizó y se cortó el fragmento de DNA deseado con un bisturí. El DNA se purificó de la agarosa en una columna (Concert Gel Extraction Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante y se recuperó en H₂O ultrapura estéril. Una pequeña alícuota se separó en un gel de agarosa para determinar el contenido y la calidad del DNA, por comparación con un marcador de tamaño de DNA de concentración conocida.

3.2.4.2. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción.

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

- 100-150 ng de DNA.
- 1 U de enzima de restricción.
- 1 µl de tampón.
- 1 µl de albúmina (0,1 mg/mL).
- H₂O ultrapura estéril hasta 10 µl.

La mezcla se incubó a 37 °C, durante toda la noche. A continuación, se purificó el DNA resultante de la digestión, según se indica en el apartado anterior.

3.2.4.3. Ligación del cDNA de la conexina43 en el vector pIRES2-DsRed2.

La ligación del cDNA de la Cx43 en el vector pIRES2-DsRed2 se llevó a cabo utilizando la enzima ligasa T4. Las condiciones de la ligación fueron las siguientes:

- 20-25 ng del cDNA de la Cx43.
- 100 ng del vector pIRES2-DsRed2.
- 1 µl de ligasa (1 U).
- 1 µl de tampón.
- H₂O ultrapura estéril hasta 10 µl.

Se mezclaron suavemente y se incubaron a 4°C durante 12 horas. El producto de la ligación se utilizó para la transformación bacteriana (apartado 3.2.4.5.) y posterior selección de los clones apropiados.

3.2.4.4. Doble mutagénesis del plásmido plresCx43

Para cambiar los residuos de tirosina 247 y 265 del extremo carboxilo terminal de la Cx43 por fenilalaninas se llevaron a cabo dos mutagénesis en el plásmido construido plres-Cx43. Para ello se utilizó el kit “QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis”. Este kit permite realizar mutaciones específicas en un plásmido de doble cadena. Para ello se diseñaron unos oligonucleótidos específicos complementarios al DNA del plásmido que contuviesen las mutaciones deseadas:

Para la mutación Y247F, los oligonucleótidos fueron los siguientes:

cadena sentido: 5'-GAAGAAGCGATCCTTTCCACGCCACCACTGG-3'
cadena antisentido: 5'-CCAGTGGTGGCGTGGAAAGGATCGCTTCTTC-3'

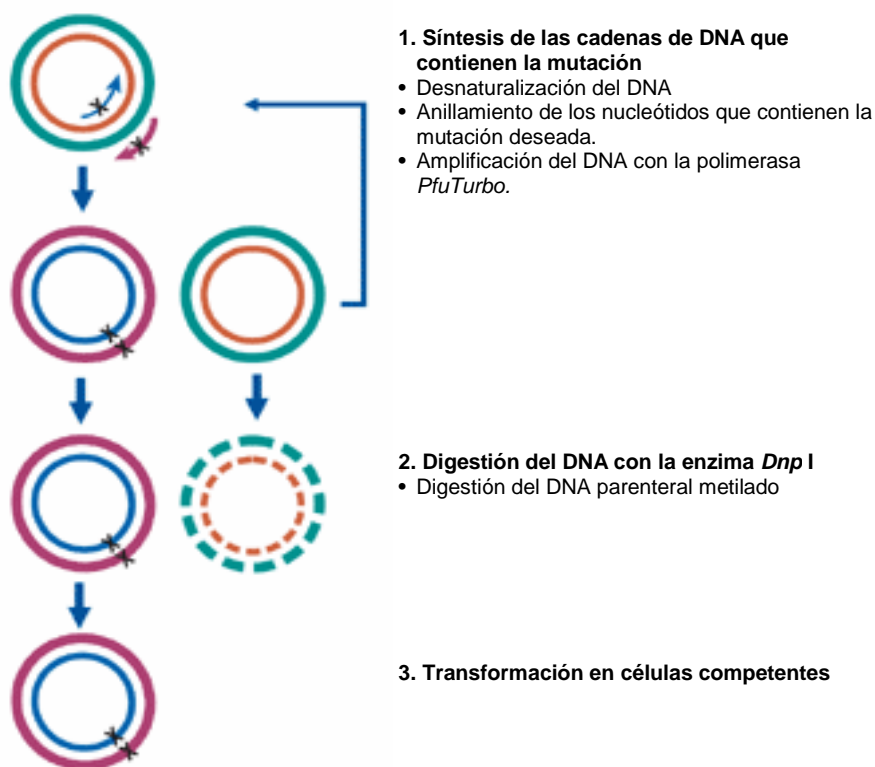
Para la mutación Y265F, los oligonucleótidos fueron los siguientes:

cadena sentido: 5'-TGCGGATCTCCAAAATTTCGCCTACTTCAATGG-3'
cadena antisentido: 5'-CCATTGAAGTAGGCGAATTTTGGAGATCCGCAC-3'

Los nucleótidos subrayados son los correspondientes a la mutación.

Este kit contiene una DNA polimerasa llamada *PfuTurbo*, con una fidelidad de síntesis del DNA 6 veces mayor que la *Taq* polimerasa, y una endonucleasa denominada *Dnp I*. La *Dnp I* es específica para el DNA metilado, por lo que digiere el DNA parental dejando el DNA recién

construido que contiene la mutación. El plásmido que se utiliza para realizar la mutación tiene que haber sido amplificado previamente en bacterias *dam* + que metilan el DNA, para su reconocimiento por la *Dnp* I. El esquema 15 muestra como se lleva a cabo la mutagénesis. En primer lugar, se desnatura el plásmido y se anillan los oligos que contienen la mutación deseada. A continuación la polimerasa *PfuTurbo* amplifica el DNA. Posteriormente, la *Dnp* I digiere el DNA parental y por último se amplifica en células competentes.



Esquema 15. Técnica de la mutagénesis

Se realizó una primera mutación, en la que se cambió la tirosina 247 por una fenilalanina (Y247F). Para llevar a cabo la mutagénesis se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla que contenía:

- 5 μ l de tampón de la reacción
- 20 ng del plásmido plres-Cx43
- 125ng de cada oligonucleótido
- 1 μ l de dNTPs
- H₂O ultrapura hasta un volumen final de 50 μ L
- 1 μ l de polimerasa *PfuTurbo* (2,5 U/ μ L)

Una vez preparada la mezcla, se llevó al termociclador, donde se sometieron a 16 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 95 °C 30'', 55 °C 1', 68 °C 7'.

A continuación se amplificó la construcción obtenida se amplificó en células competentes, tal y como se describe en el apartado 3.2.4.5.

Para la segunda mutagénesis se utilizó el plásmido resultante de la primera. Se cambió la tirosina 265 de la Cx43 por una fenilalanina (Y265F). El proceso seguido para esta segunda mutación fue igual al anterior. Una vez obtenido el plásmido pCx43Y247F/Y265F se amplificó en células competentes y se extrajo el DNA con el kit Wizard *Plus* Midipreps DNA Purification System.

3.2.4.5. Transformación bacteriana y extracción del DNA plasmídico

El medio utilizado para crecer *E. coli*, cepa DH5 α , fue LB (Luria Bertani), preparado utilizando 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. Estos compuestos se resuspendieron en 900 ml de agua ultrapura, se ajustó el pH a 7,5 y se completó con agua ultrapura hasta 1 litro. En caso de requerir medio sólido, se añadió agar al 1,5 % (p/v).

El proceso de transformación consistió en mezclar 100 μ l de células competentes (cepa DH5 α de *E. coli*) con el DNA (20 ng/ml), con agitación suave. Se incubó la mezcla durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se incubó a 42°C durante 1,5 minutos y de nuevo a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 μ l de LB y se incubó a 37°C durante 2 horas. Finalmente, se sembraron diferentes cantidades de las células transformadas en placas de medio selectivo (LB con el antibiótico adecuado). Al cabo de 24 horas, se recogieron diferentes colonias que crecieron en LB más el antibiótico adecuado.

Para la extracción del DNA plasmídico, en el caso de bacterias crecidas en un volumen de LB inferior a 5 ml se utilizó el kit comercial UltraClean Mini Plasmid Pred Kit (MOBIO) y en el caso de bacterias crecidas en un volumen de LB entre 100 y 200 ml se utilizó el kit Wizard *Plus* Midipreps DNA Purification System (Promega). En ambas situaciones, el procedimiento realizado para la extracción del DNA plasmídico fue el que se aconsejaba en las instrucciones del fabricante.

3.2.4.6. Secuenciación del cDNA de la Cx43.

La secuenciación del cDNA de la Cx43 a partir de la construcción plasmídica pCx43 y pCx43Y247F/Y265F se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España). Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

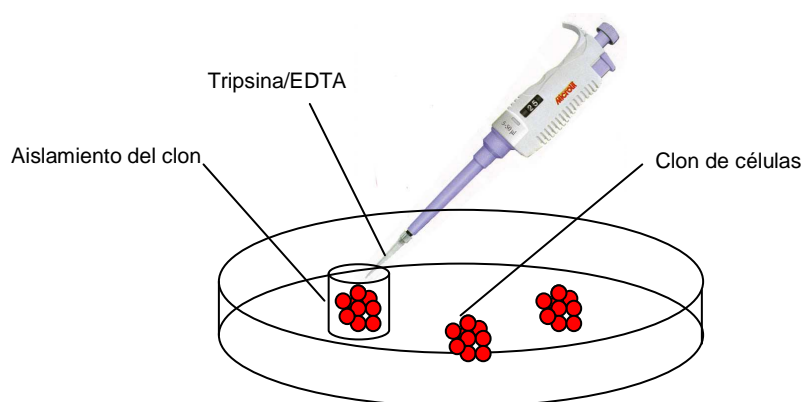
Cadena sentido: 5'- ATGGCTTCGTACCCCGGC-3'

Cadena sentido: 5'-GCCTGATGACCTGGAGATTT-3'

Cadena antisentido: 5'-CTACAGGAACAGGTGGTG-3'

3.2.4.7 Transfección de las células de glioma y selección de clones.

La transfección de las células de glioma de rata C6 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 tomaron 2 µl de DNA plasmídico (10 ng/µl) y se diluyeron en 100 µl de Opti-MEM[®]. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se diluyeron 3 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 DNA 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, después de 6 horas.



Esquema 16. Técnica de la microtripsinización para la selección de clones

Los plásmidos utilizados poseen un gen de resistencia a geneticina/neomicina, que permite la selección de las células transfectadas. Una vez comprobado que al cabo de 48 horas post-transfección algunas células habían incorporado el plásmido, puesto que emitían fluorescencia, y con el fin de obtener clones de células establemente transfectadas, 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 + geneticina 0,5 mg/ml. En el momento en el que las células control murieron debido al

tratamiento con genética, se procedió al aislamiento de los clones establemente transfectados mediante microtripsinización, tal y como se muestra en el esquema 16.

3.2.5. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.

El método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) fue propuesto por Mosmann (Mosmann 1983) como un método para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de dichos cristales en DMSO, se obtiene un medio de color violeta cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT, se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con 300 µl de PBS que contenía MTT (0,5 mg/ml), durante 75 minutos, en oscuridad, a 37°C, en un incubador de CO₂. Posteriormente se aspiró el medio, se añadieron 500 µl de DMSO y se incubaron las células en agitación y en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm.

3.2.6. Estudio de la apoptosis mediante tinción con anexina-V.

La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido de membrana que se localiza en las células sanas en la cara citoplasmática de la membrana; sin embargo, en las células apoptóticas la PS se transloca desde el interior hasta el exterior de la membrana, quedando así expuesta al medio extracelular. La anexina-V es capaz de unirse a la PS cuando ésta se localiza en la cara externa de la membrana. Por tanto, cuando la anexina-V está marcada con algún tipo de fluorocromo permite identificar las células apoptóticas.

En nuestro modelo de sobreexpresión de la Cx43 se empleó anexina-V marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 488, que emite fluorescencia en color verde. Así, las células se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con *Binding Buffer* (buffer incluido en el kit comercial, que contiene el Ca²⁺ necesario para la unión anexina-V-PS). Posteriormente, se incubaron con anexina-V-Alexa Fluor 488 diluida en *Binding Buffer* (5:100) durante 15 minutos con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con DAPI (1,25 µg/ml) durante 5 minutos, para marcar los núcleos celulares. Después se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS y se montaron las placas con el medio *SlowFade Gold antifade reagent*. Una vez realizada la tinción, las placas se observaron con un microscopio de fluorescencia con los filtros

adecuados, tomándose varias imágenes de cada tratamiento. Finalmente se contaron, en cada caso, el número de células marcadas con anexina-V, frente al total marcadas con DAPI.

3.2.7. Cuantificación del ciclo celular por citometría de flujo.

Con objeto de estudiar el ciclo celular, se cuantificó el DNA por célula mediante citometría de flujo, Para ello, las células se tripsinizaron y se recogieron en PBS en tubos de citómetro. Seguidamente, la suspensión celular se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos. A continuación se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% previamente enfriado a -20°C. Esta suspensión celular se incubó durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, los tubos de precipitado se centrifugaron a 500 x g, se aspiró el sobrenadante y se añadió PBS. Este paso se repitió 3 veces para eliminar los restos de etanol. A continuación, se adicionó al precipitado una mezcla que contenía yoduro de propidio 1mg/mL (p/v), RNAsa 10 mg/mL disueltas en PBS. Los tubos de citómetro se incubación en movimiento a temperatura ambiente durante 1h. El contenido de yoduro de propidio por célula se analizó mediante citometría de flujo en, al menos, 20000 células por experimento.

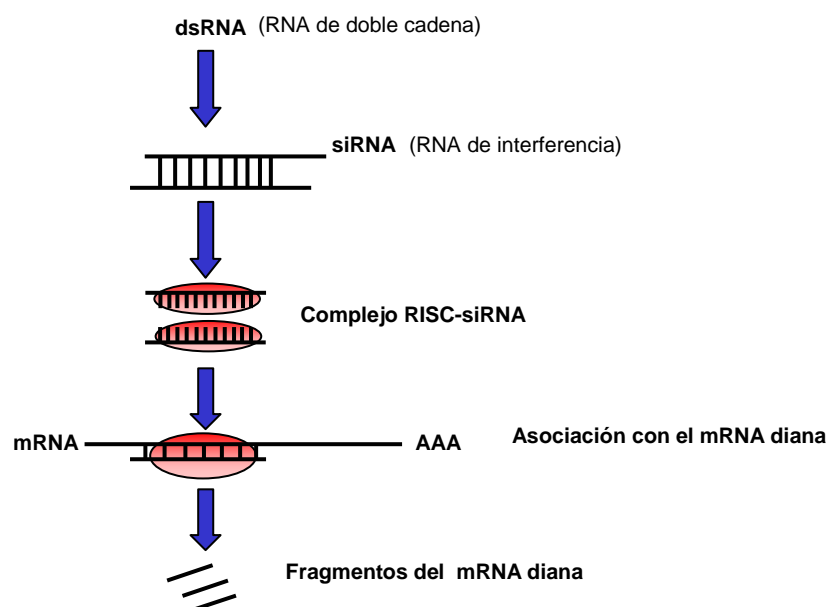
Para el cálculo de la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular se utilizó el programa de análisis Paint a gate.

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

El mecanismo del RNA de interferencia (RNAi), que consiste en el bloqueo de la expresión de un gen específico, se ha observado en todos los tipos de células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Se cree que este mecanismo está implicado en la protección del genoma frente a las infecciones víricas, además de jugar un papel en la regulación de la proliferación, muerte y diferenciación celulares, e incluso, en oncogénesis. Actualmente, el RNAi es una herramienta útil para llevar a cabo el silenciamiento de un gen específico. El mecanismo de actuación del RNAi se explica en el esquema 17. En primer lugar, el RNA de doble cadena (*doubled stranded RNA*, ds RNA) es digerido por una enzima llamada Dicer, similar a la RNAsa III. Así se obtienen dobles fragmentos de doble cadena de RNA, de entre 20-25 nucleótidos, denominado siRNA (*small interfering RNA*). Éstos se ensamblan en un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) que contiene una endorribonucleasa, la cual separa una doble cadena de siRNA. Finalmente la monocadena de siRNA se une a una cadena complementaria en el mRNA de la células y el complejo RISC digiere el mRNA diana.

Para llevar a cabo el silenciamiento del mRNA de la Cx43, se cambió el medio de cultivo por DMEM + FCS 10%, sin antibióticos. Posteriormente, se diluyó el siRNA de la Cx43 (Cx43-

siRNA) o el siRNA sin diana (non target-siRNA, NT-siRNA), ambos a una concentración 2 μ M, en el medio comercial Opti-MEM y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Por otro lado, se diluyó la Lipofectamina 2000[®] en Opti-MEM (0,03 μ L/ μ L), incubándose también esta mezcla durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron los medios que contenían el siRNA y la Lipofectamina 2000[®] (1:1) y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Después de este tiempo, la mezcla se añadió al cultivo de células de glioma (200 μ L/mL de medio de cultivo). Al cabo de 8-12 h de la transfección se cambió el medio de cultivo. Las células se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ el tiempo necesario para ser procesadas para los siguientes experimentos.

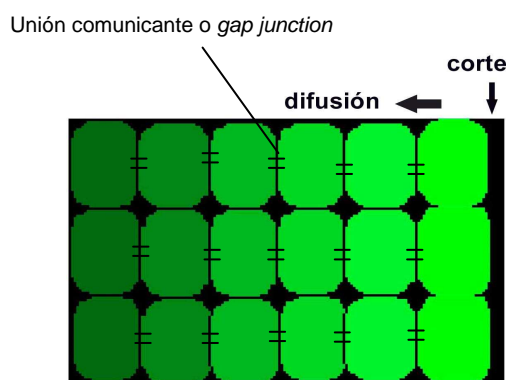


Esquema 17. Fundamento de la técnica del siRNA

3.2.9. 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 col. (El-Fouly et al. 1987), con algunas modificaciones (Tabernero 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), incubando las células con el medio del último lavado durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con solución sin-Ca²⁺ (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⁺ (1 mg/ml) durante 2 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

viene 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 (véase esquema 18).



Esquema 18. Fundamento de la técnica de *Scrape Loading*

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).

I. Extracción de proteínas

Las proteínas procedentes de las células en cultivo se recogieron en solución de extracción de proteínas (Tris 5 mM, SDS 2%, EDTA 2 mM y EGTA 2 mM), que contenía PMSF 1 mM, antipaína 0,5 µg/ml, amastatina 0,5 µg/ml, leupeptina 0,5 µg/ml, bestatina 0,5 µg/ml, inhibidor de tripsina 0,5 µg/ml y aprotinina 3 U/ml. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 20800 x g durante 15 minutos.

II. Cuantificación de proteínas

Se siguió el método de Bradford (Bradford 1976). Una pequeña alícuota de la muestra de proteínas se diluyó 1000 veces en agua ultrapura. De esa dilución se tomó un volumen de 800 µL y se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford (BioRad). Se agitó la mezcla en el vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas se determinó extrapolando en una recta patrón, realizada simultáneamente con disoluciones entre 1 y 25 µg/mL de albúmina sérica bovina.

III. Preparación de los geles

Los geles utilizados para la electroforesis fueron de poliacrilamida, de un grosor de 0,75 mm, compuestos por un gel de separación (10% de poliacrilamida para la Cx43, la ciclina D1, la ciclina D3, la ciclina E, c-Src total, c-SrcY416; 12% de poliacrilamida para p21 y p27; 7,5% de poliacrilamida para el pRb total, pRb Ser-780, pRb Ser-795 y Ki-67) y por 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 10% (p/v) (ó 5%), 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).

IV. Preparación de las muestras para la electroforesis

Una vez calculada la concentración de proteínas en las muestras, entre 50-90 µg, de proteína se resuspendieron en un volumen equivalente de tampón de (Tris-HCl 40 mM (pH 6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol al 20% (p/v), azul de bromofenol 0,01% y DTT 3 mM). Se hirvió la mezcla durante 5 minutos, y tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo.

V. Electroforesis de proteínas

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

Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a un amperaje constante de 40 mA, durante el tiempo que las proteínas tardaron en abandonar el gel de concentración. A continuación, se aplicó un amperaje constante de 40 mA.

VI. Electrotransferencia

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 amperaje constante de 400 mA durante toda la noche 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.

VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

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

VIII. Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra Cx43 (1:250), anticuerpo monoclonal de ratón contra la ciclina D1 (1:500), anticuerpo monoclonal de ratón contra la ciclina D3 (1:100), anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (1:3000), anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki-67 (1:400), anticuerpo monoclonal de ratón contra p27 (1:100), anticuerpo monoclonal de ratón contra p21 (1:100), anticuerpo monoclonal de ratón contra el pRb fosforilado en la serina 795 (1:500), anticuerpo monoclonal de ratón contra el pRb total (1:100), anticuerpo policlonal de conejo contra la ciclina E (1:500), anticuerpo policlonal de conejo contra c-Src total (1:500), anticuerpo policlonal de conejo contra c-SrcY416 (1:500) y anticuerpo policlonal de conejo contra el pRb fosforilado en la serina 780 (1:250).

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución compuesta por albúmina al 2% (p/v) y azida sódica 0,02% (p/v) en TTBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 1:1000 pH 7,5), exceptuando el anticuerpo monoclonal de ratón contra Cx43 en el que se sustituyó la albúmina al 2% por leche en polvo al 5%.

A continuación, se incubó con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón o conejo, conjugado con peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de ratón se utilizó a una concentración de 1:2500 y el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de conejo se utilizó a una concentración de 1:1000 preparados en TTBS. En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía mediante un programa de análisis de imagen.

3.2.11. Inmunocitoquímica

Las células se fijaron con formaldehído al 4% (p/v) en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 8,8 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4), durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol a -20°C, durante 10 minutos. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C, durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki-67 (1:200), anticuerpo policlonal de conejo contra Cx43 (1:200), anticuerpo policlonal de conejo contra Src total (1:500), anticuerpo policlonal de rata contra BrdU (1:400) y anticuerpo monoclonal de ratón contra Src fosforilado en la tirosina 416 (1:100) conjugado con el anticuerpo secundario AlexaFluor555.

A continuación, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave, a excepción del anticuerpo monoclonal de ratón contra Src fosforilado en la tirosina 416. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor488 o con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón (1:1000), anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de conejo y el anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (1:200) contra inmunoglobulina de rata.

Todos los anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica se diluyeron en una solución de anticuerpos que contenía Triton X-100 al 0,1%. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

solución de anticuerpos

FCS	10% (v/v)
azida sódica	0,02% (p/v)
lisina	0,1 M

Finalmente, el DNA nuclear se tiñó con DAPI (2,5 µg/mL en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia. Entre cada paso de la inmunocitoquímica las células se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia.

3.2.12. Determinación inmunocitoquímica de la incorporación de BrdU.

La incorporación de BrdU se determinó mediante inmunocitoquímica, según el método descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al. 2001), con algunas modificaciones. Las células de glioma C6-Ires y C6-IresCx43 se incubaron con BrdU 10 μ M, un análogo de la timidina que se incorpora selectivamente al DNA en la fase S del ciclo celular. Transcurridas 5 horas, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron 2 veces con PBS. A continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 20 minutos. Tras varios lavados con el mismo tampón, se realizó una incubación con ácido clorhídrico 2 M durante 20 minutos. Las células se sometieron a sucesivas incubaciones durante 1h con la solución de anticuerpos descrita en el apartado 3.2.11. Primeramente se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de rata contra la BrdU (1:400) durante 12 horas. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de rata, conjugado con Cy3 (1:200), durante 2 horas. Ambos anticuerpos se diluyeron en la solución que contenía Triton X-100 al 0,1%.

Una vez realizada la determinación inmunocitoquímica, las células se mantuvieron en PBS y se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia con un objetivo 20X. A continuación se captaron imágenes de fluorescencia y de contraste de fases de 5 campos tomados al azar, procedentes de 3 experimentos diferentes. Para ello se utilizó una cámara de vídeo digital acoplada al microscopio.

3.2.13. Inmunoprecipitación

Las proteínas de las células de glioma C6 fueron extraídas como se describe en el apartado 3.2.10 I. Los lisados fueron centrifugados a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes (800 μ g de proteína) incubados a 4°C durante 4 horas, con agitación (rotación) suave, en presencia del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra Cx43 (2 μ g/800 μ g proteína) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra hexokinasa I (2 μ g/800 μ g proteína), utilizado como control negativo. Los inmunocomplejos (complejo proteína-anticuerpo) fueron secuestrados con 50 μ L de la matriz Proteína-A Sefarosa, durante 30 minutos a 4°C, con rotación suave. La matriz fue previamente saturada con albúmina al 10% durante 2 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 5 veces con tampón de extracción y las proteínas eluidas con 30 μ L de tampón de carga durante 5 minutos a 95°C. Finalmente, los sobrenadantes se aplicaron en un gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas fueron analizadas mediante transferencia tipo Western, descrita en 3.2.11.

3.2.14. Experimentos realizados “in vivo” en ratones C57BL6

3.2.14.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6 y preparación del tejido.

Se realizaron inyecciones intracraneales de ácido kaínico en ratones adultos C57BL6 según el método descrito por Koulakoff y col. (Koulakoff et al. 2008) con pequeñas modificaciones. Brevemente, los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de avertina al 2% (p/v). A continuación, se colocó al animal en un aparato de estereotaxis y se le inyectó intracranealmente 1 nmol de ácido kaínico en 1 μ L de suero salino siguiendo las coordenadas: -1 mm anteroposterior, 1,5 mm mediolateral y 0,6 mm dorsoventral en bregma. La inyección se realizó en la corteza cerebral en la parte derecha del cerebro.

A excepción de los animales que se utilizarían para ver la expresión de Cx43, los ratones se perfundieron transcardialmente con paraformaldehído al 4% (p/v) en una solución de PBS, una semana después de la inyección. Los cerebros se sacaron y se volvieron a fijar en la misma solución de paraformaldehído durante 2 h, seguido de una crioprotección en sacarosa al 30% en PBS a 4°C durante toda la noche. A continuación los cerebros se cortaron en secciones frontales de 50 μ M de grosor en un microtomo a una temperatura de -20°C. Los cortes se recogieron en placas multipocillo que contenían tampón fosfato, al 0,24 M (Na_2HPO_4 0,24 M, NaH_2PO_4 0,24 M, pH 7,2) y se guardaron a 4°C hasta su posterior uso. A estos cortes se les denominó cortes flotantes.

Para poder observar mediante inmunohistoquímica la Cx43, parte de los animales se perfundieron transcardialmente con PBS 1 semana después de la inyección. Rápidamente se sacaron los cerebros y se congelaron en una solución de isopentano a -30°C. Posteriormente, los cerebros se cortaron se secciones frontales de 20 μ M de grosor en un criostato recogiendo en porta-objetos adherentes. Los porta-objetos con los cortes se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.14.2 Inyección de BrdU en ratones C57BL6

El BrdU se usó para marcar las células en división. Cada animal recibió 50 μ g/g peso corporal de BrdU, que fue inyectado intraperitonealmente 12 h antes de la perfusión y recibió una segunda inyección 4 h antes de la perfusión con paraformaldehído al 4% (p/v).

3.2.14.3. Inmunohistoquímica

Los porta-objetos que contenían los cortes cerebrales cortados en el criostato se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS a 4°C. A continuación, tanto los cortes en los porta-objetos

como los cortes flotantes cortados en el microtomo se preincubaron a temperatura ambiente en PBS que contenía 2g/L de gelatina y Triton-X100 al 0,25% (esta mezcla se denominó solución C) durante una hora. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en la solución C. Los anticuerpos primarios utilizados en los cortes en porta-objetos, fueron el anticuerpo policlonal de conejo contra la conexina43 (1:500), y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la GFAP (1:500) en los cortes en porta-objetos. Los cortes flotantes se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón contra ciclina D1(1:500), el anticuerpo monoclonal de ratón contra la ciclina D3 (1:500), y el anticuerpo policlonal de conejo contra la GFAP (1:500). Después de 3 lavados con la solución C, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 488 contra inmunoglobina de conejo (1:4000) y el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 594 contra inmunoglobulina de ratón (1:4000). Después de varios lavados, los porta-objetos con los cortes se montaron en una solución que mantenía la fluorescencia.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia.

3.2.14.4. Determinación inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU

Los cortes flotantes se preincubaron durante 10 minutos en solución C. A continuación, se incubaron en HCl 2M a 37°C durante 30 minutos. Tras dos lavados con PBS* se incubaron de nuevo con solución C durante 1 h. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de rata contra BrdU (1:400) durante toda la noche a 4°C. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de rata, conjugado con Cy3 (1:200) durante 2 h. Ambos anticuerpos se diluyeron en la solución C. Después de sucesivos lavados con la solución C, los cortes flotantes se montaron en porta-objetos con una solución que mantenía la fluorescencia.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia.

3.2.15 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student, cuando se comparaban dos variables, o mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test Bonferroni, cuando se comparaban más de dos variables. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE LA PÉRDIDA DE LA CONEXINA43 EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS

Los astrocitos se encuentran ampliamente comunicados a través de canales que atraviesan la membrana, conocidos como uniones comunicantes o *gap junctions*, (véase Introducción) (Binmoeller and Muller 1992; Mugnaini 1986; Yamamoto et al. 1990) siendo la conexina43 (Cx43) la proteína mayoritaria de estos canales (Giaume et al. 1991a). Las uniones comunicantes permiten el paso de una célula a otra de iones y moléculas pequeñas, como segundos mensajeros y diferentes metabolitos (Tabernero et al. 1996a); para revisión, ver: (Giaume et al. 1997; Kumar and Gilula 1996; Loewenstein 1987). Como se ha descrito en la Introducción, en los gliomas la expresión de la Cx43 y la permeabilidad de las uniones comunicantes se encuentra reducida, existiendo una relación inversa entre el grado de malignidad de los tumores y la expresión de la Cx43 (Huang et al. 1999; Soroceanu et al. 2001). Por tanto, esto sugiere que la pérdida de comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la evolución de los tumores cerebrales malignos (Soroceanu et al. 2001). Además, la sobreexpresión de la Cx43 en las células de glioma disminuye la velocidad de proliferación (Huang et al. 1998; Zhu et al. 1991), lo que indica que la Cx43 es una proteína supresora de tumores. Sin embargo, resultados obtenidos con astrocitos de ratones *knock-out* de la Cx43, muestran que la falta de esta proteína disminuye la proliferación de los astrocitos (Dermietzel et al. 2000; Naus et al. 1997). Es necesario mencionar que este modelo conlleva la pérdida total de la Cx43 a largo plazo, lo que provoca que numerosos genes modifiquen su expresión para compensar la pérdida de esta proteína. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de la pérdida aguda de la Cx43 en la proliferación de los astrocitos, silenciando su expresión mediante la tecnología del siRNA.

4.1.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina43 en astrocitos

Para silenciar la Cx43, los astrocitos se transfectaron con un siRNA específico para el silenciamiento de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), que empleamos como control, tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 1a muestra que, pasadas 24 horas desde la transfección con Cx43-siRNA, el nivel de expresión de la Cx43 disminuyó drásticamente, comparado con el nivel de la Cx43 que muestran los astrocitos transfectados con NT-siRNA, aunque esta reducción fue todavía más evidente pasadas las 48h y se mantuvo hasta al menos las 96h. En la figura 1b, se observa, mediante inmunocitoquímica, la fuerte reducción de la expresión de la Cx43, después de 72 h de transfectar con siRNA.

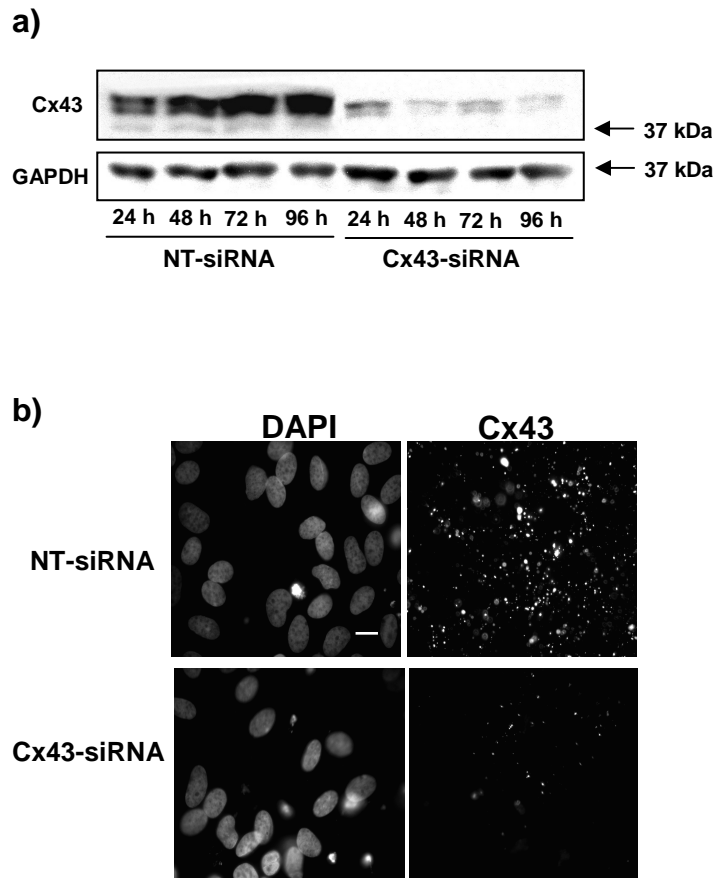


Figura 1. Silenciamiento de la conexina43 (Cx43) en astrocitos en cultivo primario.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas a las 24, 48, 72 y 96h después de la transfección. **a)** Western blot de la Cx43 a lo largo del tiempo después de la transfección con siRNAs. Se utilizó GAPDH como control de carga. **b)** Inmunocitoquímica de la Cx43 y tinción de los núcleos con DAPI del mismo campo 72 h después de la transfección con siRNAs. Barra = 6 μ m.

Una vez silenciada la Cx43, se quiso determinar el efecto de la pérdida de la Cx43 sobre la comunicación intercelular de los astrocitos. 72 h después del silenciamiento con siRNA, se empleó la técnica conocida como "scrape loading" para evaluar la comunicación intercelular. Posteriormente, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia provisto de los filtros adecuados.

Consecuentemente con la reducción de la expresión de la Cx43, la permeabilidad de las uniones comunicantes se redujo en los astrocitos silenciados con Cx43-siRNA. En la figura 2a se observa que en los astrocitos NT-siRNA (control), el amarillo de Lucifer difundió de la primera fila de células a las siguientes, mientras que en los astrocitos transfectados con Cx43-siRNA, el amarillo de Lucifer no fue capaz de pasar de la primera fila de células. De hecho, la figura 2b muestra la cuantificación de estos resultados y se puede comprobar que la

disminución de la permeabilidad promovida por la transfección con Cx43-siRNA estuvo en torno al 80% con respecto a la situación control NT-siRNA.

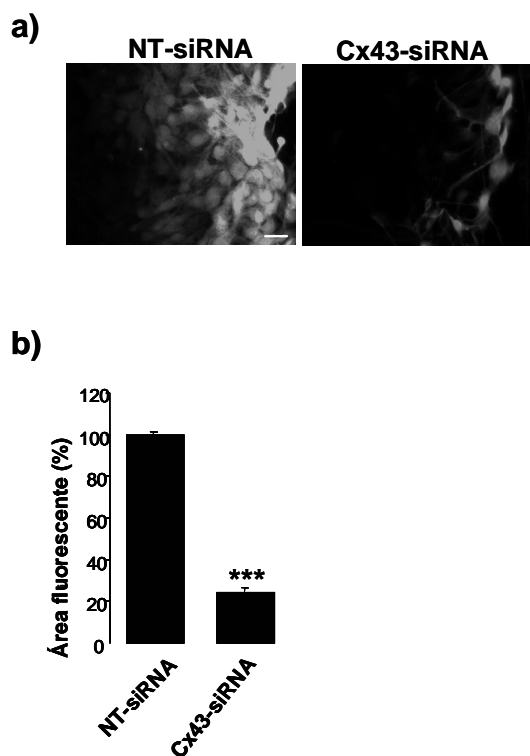


Figura 2. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. **a)** 72 h después, se determinó la permeabilidad de las uniones comunicantes mediante la técnica del “scrape loading”, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra = 30 μ m. **b)** Cuantificación del área de fluorescencia. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** $p < 0,001$ (test *t* de Student).

4.1.2. Efecto del silenciamiento de la conexina43 sobre la proliferación de los astrocitos

Una vez reducida la expresión de la Cx43, de forma aguda mediante el empleo de siRNA, decidimos analizar la velocidad de proliferación en estas circunstancias. Para ello, los astrocitos se transfectaron con el siRNA de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) y se determinó el número de células vivas por placa desde las 3 h hasta los 6 días después de la transfección, mediante el ensayo de la absorbancia del MTT.

En la figura 3 se observa que en los astrocitos transfectados con NT-siRNA el número de células experimentó una disminución aproximada del 20%, entre las 24 y 72 h después de la transfección, que se mantuvo constante hasta el día 6. La transfección de los astrocitos con Cx43-siRNA promovió un aumento en el número de células. Así, el número de astrocitos aumentó, aproximadamente, un 25%, 24 h después de la transfección y se mantuvo constante hasta el día 6. De manera que entre los días 3 y 6 de cultivo el número de astrocitos transfectados con Cx43-siRNA fue un 55%, aproximadamente, superior al número de astrocitos transfectados con NT-siRNA.

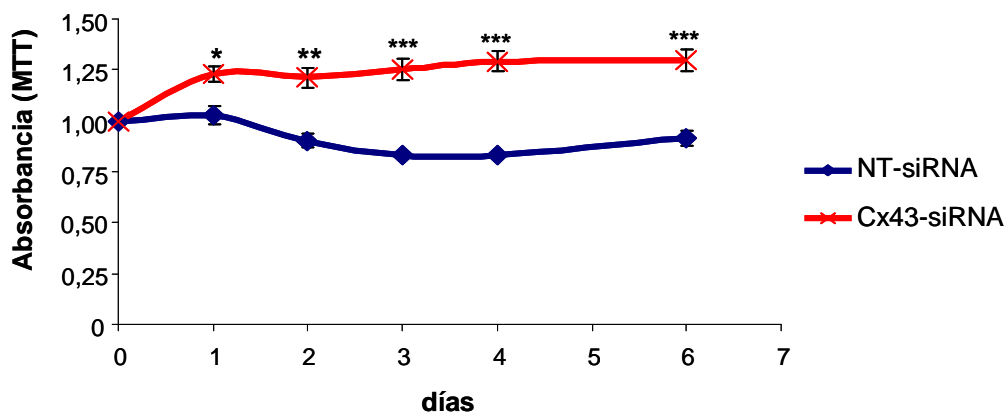


Figura 3. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la proliferación de los astrocitos.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. A partir de 0 h después de la transfección y durante 6 días se hicieron medidas del número de células viables por placa, mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el valor de absorbancia a 570nm asociada al MTT y son medias \pm SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a las situación control se expresa como *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 (test *t* de Student).

Con objeto de averiguar si el aumento de células observado en los astrocitos cuya Cx43 estaba silenciada se debía a un aumento de la velocidad de la proliferación, se analizó la expresión de la proteína Ki-67. Así, esta proteína se expresa en las células en cualquier fase del ciclo celular (G1, S, G2 ó M) y está ausente en aquellas que se encuentran en fase G0. Por tanto, la determinación de la expresión de la Ki-67 constituye un buen marcador del estudio de la proliferación celular. (Scholzen and Gerdes 2000).

Para ello, 72 h tras la transfección con siRNA, la expresión de la Ki-67 se determinó por Western blot (Fig. 4a). Esta proteína presenta dos isoformas, de 345 y 395 kDa (Gerdes et al. 1991). Las figuras 4a y 4b muestran que la transfección con Cx43-siRNA incrementó la expresión de la Ki-67 alrededor del 60%. Estos resultados fueron confirmados mediante inmunocitoquímica (Fig. 4c). Así, la figura 4c muestra que el porcentaje de núcleos que expresan Ki-67 fue muy superior en los astrocitos cuya Cx43 estaba silenciada.

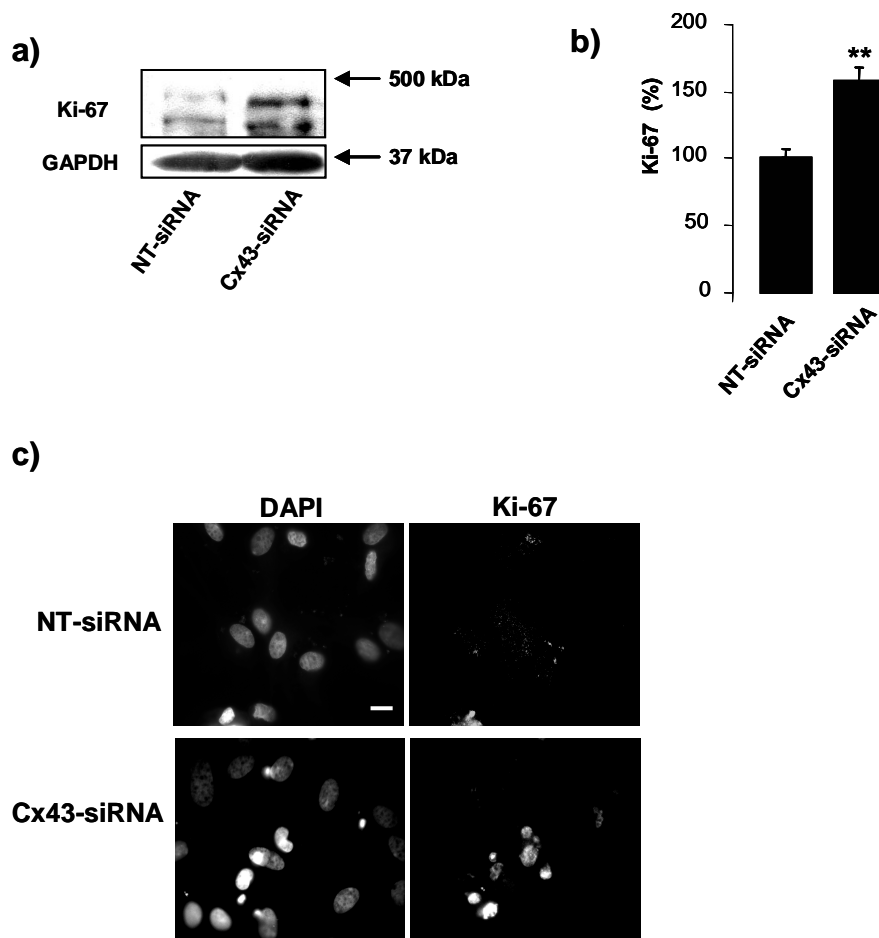


Figura 4. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la expresión de Ki-67 en astrocitos.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. **a)** Western blot de Ki-67 y GAPDH 72 h después de la transfección con los siRNAs. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de Ki-67 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ** p < 0,01. (test t de Student). **c)** Inmunocitoquímica de Ki-67 y tinción de los núcleos con DAPI del mismo campo, 72 h después de la transfección. Barra = 6 μ m.

La progresión del ciclo celular desde la fase G1 hacia la fase S requiere un cierto grado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) por parte de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Bartek et al. 1996; Sherr 1996; Weinberg 1995). Así, la fosforilación de pRb es necesaria para el paso de la célula por el punto de restricción de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (para revisión, véase: Bartek et al. 1996; Nevins 2001; Sherr 1996; Weinberg 1995). Por tanto, nos propusimos estudiar si el silenciamiento de la Cx43 tiene algún efecto sobre la fosforilación de pRb. Para ello, 72 h después de la transfección con siRNA se determinó la fosforilación de pRb en la serina 780 (Ser780), mediante Western blot (Fig. 5a). Nuestros resultados indican que el silenciamiento de la Cx43 en los astrocitos aumentó un 60%, aproximadamente, la fosforilación de pRb en la Ser780 (Fig. 5b).

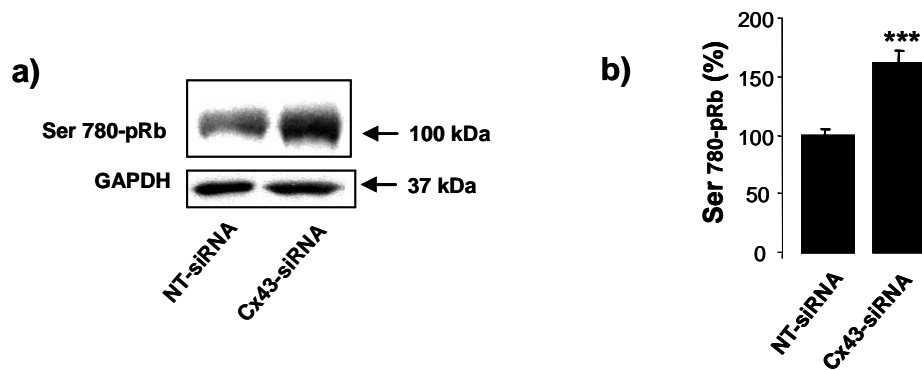


Figura 5. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la fosforilación de la serina 780.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA **a)** Western blot del pRb fosforilado en la serina 780 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la fosforilación del pRb en la serina 780 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** $p < 0,001$. (test *t* de Student). Abreviaturas: Cx43, conexina43; pRb, proteína del retinoblastoma.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación de pRb depende de la actividad de las CDKs que, a su vez, se activan por la presencia de las ciclinas. Entre las ciclinas cuya expresión se incrementa en la fase G1 del ciclo celular, se distinguen las de tipo D (incluyendo D1, D2 y D3), que responden a diversos factores de crecimiento. Las ciclinas D1 y D3 se expresan en una gran variedad de células y son, junto con las ciclinas A y E, las principales ciclinas responsables de la progresión del ciclo celular en astrocitos, mientras que la ciclina D2 tiene una expresión restringida a algunas líneas celulares de astrocitos (Bartkova et al. 1998). Por tanto, nos propusimos investigar las variaciones de las ciclinas D1 y D3 en los astrocitos cuya Cx43 se silenció con siRNA. Para ello, 72 h tras la transfección con siRNA, se determinó la expresión de las ciclinas D1 y D3 mediante Western blot (Fig. 6a y 6c). Las figuras 6a y 6b muestran que la expresión de la ciclina D1 no se modificó debido al silenciamiento de la Cx43. Sin embargo, la expresión de la ciclina D3 aumentó más del 60% en los astrocitos transfectados con Cx43-siRNA, cuando se comparan con los astrocitos control (Fig. 6c y 6d).

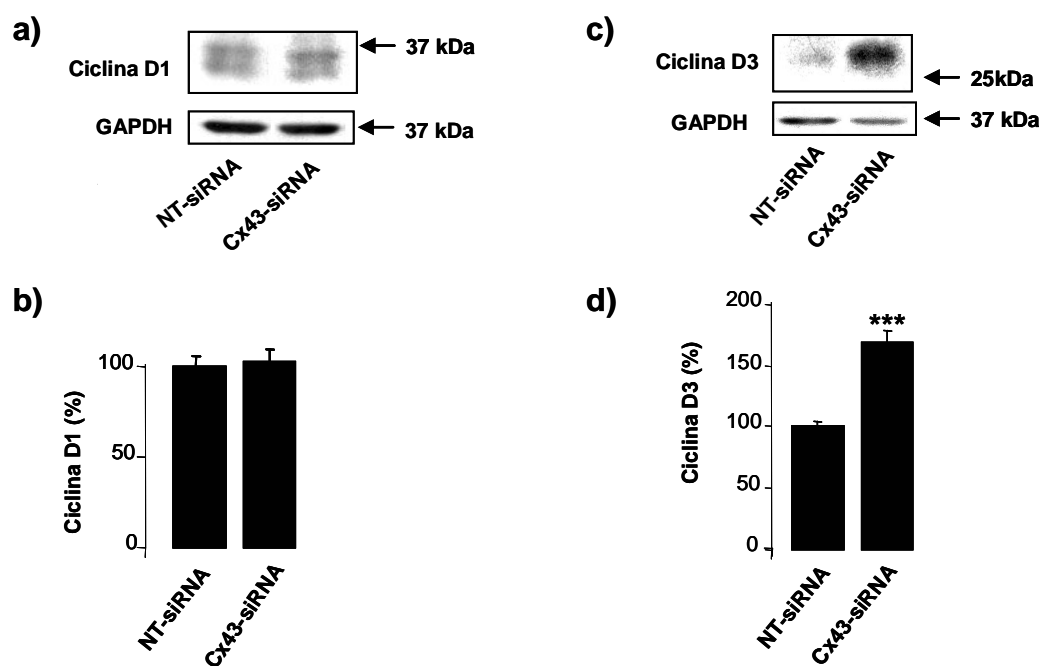


Figura 6. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la expresión de la ciclina D1 y la ciclina D3 en astrocitos.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. **a)** Western blot de la ciclina D1 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D1 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). **c)** Western blot de la ciclina D3 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **d)** Los valores de la ciclina D3 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** $p < 0,001$ (test *t* de Student).

4.1.3. Estudio de la participación de la conexina43 en el efecto mitogénico de los inhibidores de las uniones comunicantes.

Estudios previos en el laboratorio han demostrado que los inhibidores de las uniones comunicantes promueven la proliferación de los astrocitos (Taberero et al. 2006), caracterizada por un aumento de la expresión de Ki-67, de la fosforilación de pRb en la serina 780 y 795 y de la expresión de las ciclinas D1 y D3. Sin embargo, se desconoce si estos efectos son debidos a la inhibición de las uniones comunicantes o a otros efectos provocados por estos agentes en la célula.

En este estudio utilizamos la endotelina-1 (ET-1) y la carbenoxolona (CBX). La ET-1 es un péptido endógeno, mientras que la CBX es un compuesto de síntesis. Tienen una estructura y un mecanismo de acción diferentes y ambos son ampliamente utilizados como inhibidores de las uniones comunicantes (ver Introducción, apartado 1.1.4).

La ET-1 tiene especial relevancia ya que su secreción aumenta en diferentes patologías, tales como en los tumores astrocíticos (Stiles et al. 1997). Existen pruebas de que la ET-1 puede ser mitogénica y puede modular la apoptosis, la angiogénesis y el desarrollo de las metástasis (para revisión, véase: Grant et al. 2003). Respecto a la acción mitogénica en los astrocitos, se ha demostrado que la ET-1 estimula la progresión del ciclo celular, ya que promueve un aumento del número de células que transitan de la fase G1 a la fase S (Teixeira et al. 2000). En este sentido, la ET-1 produce un incremento de la expresión de las ciclinas D1 y D3.

Para conocer la participación de la Cx43 en el efecto mitogénico de los inhibidores de las uniones comunicantes, decidimos estudiar el efecto mitogénico de la ET-1 y la CBX en los astrocitos con la Cx43 silenciada.

Para ello, los astrocitos se transfectaron con el siRNA de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. Debido a que a las 48 h después de la transfección con siRNA la disminución de la expresión de la Cx43 ya es elevada (Fig. 1a), decidimos iniciar los tratamientos en este momento. Así, 48 h después de la transfección con siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (Control, C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. En este momento las células se procesaron para los distintos estudios.

4.1.3.1. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona en la comunicación intercelular en los astrocitos con la conexina43 silenciada.

El Western blot de la Cx43 (Fig. 7a y 7b) muestra que, en los astrocitos transfectados con NT-siRNA, la ET-1 y la CXB redujeron la expresión de la Cx43 un 60% y un 40%, respectivamente. El silenciamiento de la Cx43 redujo los niveles de la Cx43 un 80%, aproximadamente y, a su vez, la ET-1 y la CBX redujeron la expresión de la Cx43 un 90% y un 40%, respectivamente, en los astrocitos cuya Cx43 estaba silenciada. Los análisis inmunocitoquímicos (Fig. 7c) corroboraron estos resultados. Así, prácticamente, sólo se observa la expresión de la Cx43 en las células control NT-siRNA.

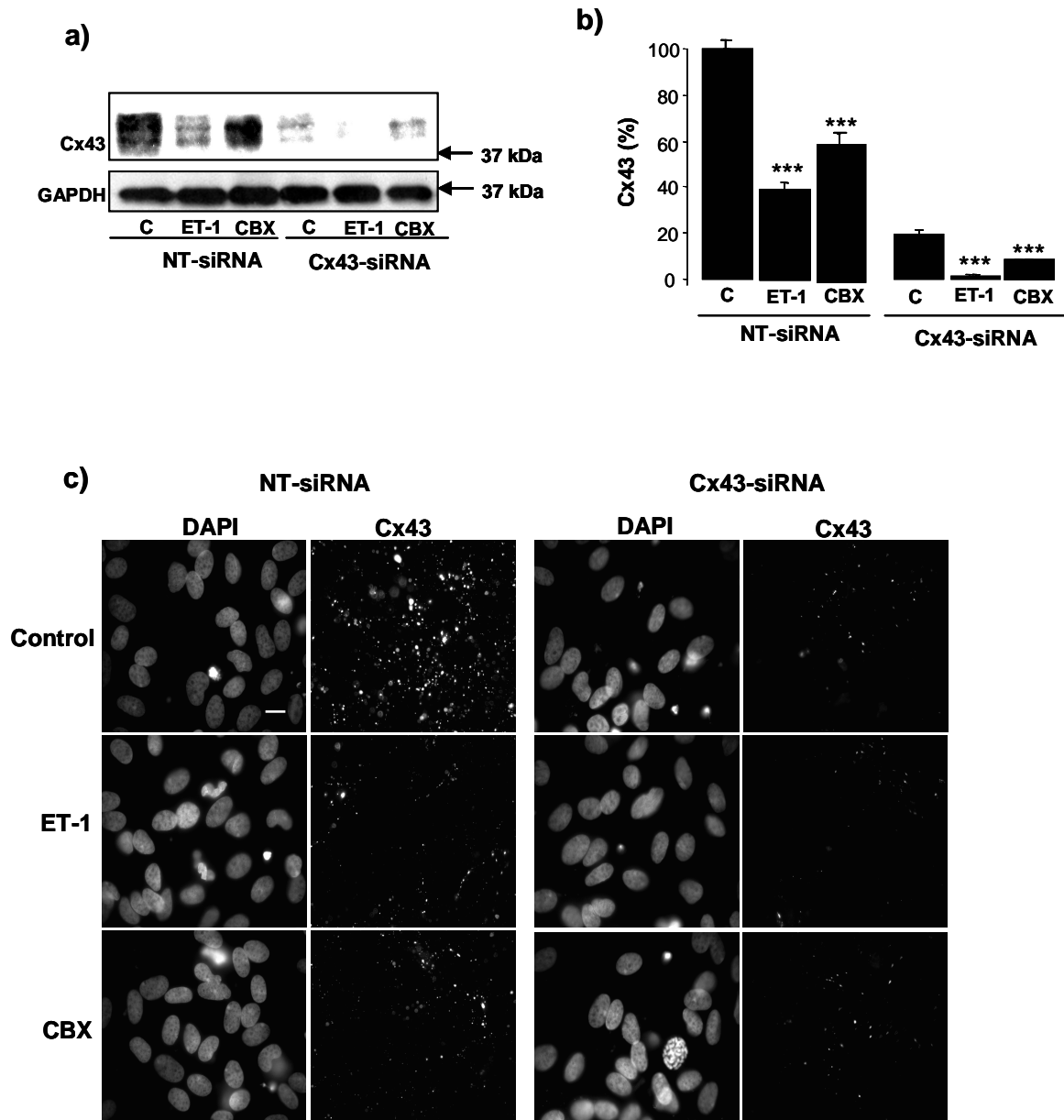


Figura 7. Efecto de la ET-1 y CBX sobre la expresión de la Cx43 en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. **a)** 48 h después de la transfección con siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. Western blot de Cx43 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de Cx43 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** $p < 0,001$. (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). **c)** Inmunocitoquímica de Cx43 y tinción de los núcleos con DAPI del mismo campo después de los tratamientos indicados. Barra = 6 μ m. Abreviaturas: Cx43, conexina43; ET-1, endotelina-1; CBX, carbenoxolona.

Consecuentemente con la reducción de la expresión de la Cx43, la permeabilidad de las uniones comunicantes se redujo, debido a la presencia de la ET-1 y de la CBX, tanto en los astrocitos silenciados con NT-siRNA como en los astrocitos silenciados con Cx43-siRNA. En la figura 8a se observa que en el control de los astrocitos, NT-siRNA, el amarillo de Lucifer difundió de la primera fila de células a las siguientes, mientras que con los tratamientos con ET-1 y CBX, el amarillo de Lucifer quedó restringido a la primera fila de células. Además, en los astrocitos transfectados con Cx43-siRNA el amarillo de Lucifer no fue capaz de difundir desde la primera fila de células en ninguna de las condiciones experimentales. De hecho, si se observa la cuantificación de las áreas fluorescentes (Fig. 8b), se comprueba que la disminución de la permeabilidad, promovida tanto por los tratamientos con ET-1 y CBX como por la transfección con Cx43-siRNA, estuvo en torno al 80% con respecto a la situación control NT-siRNA.

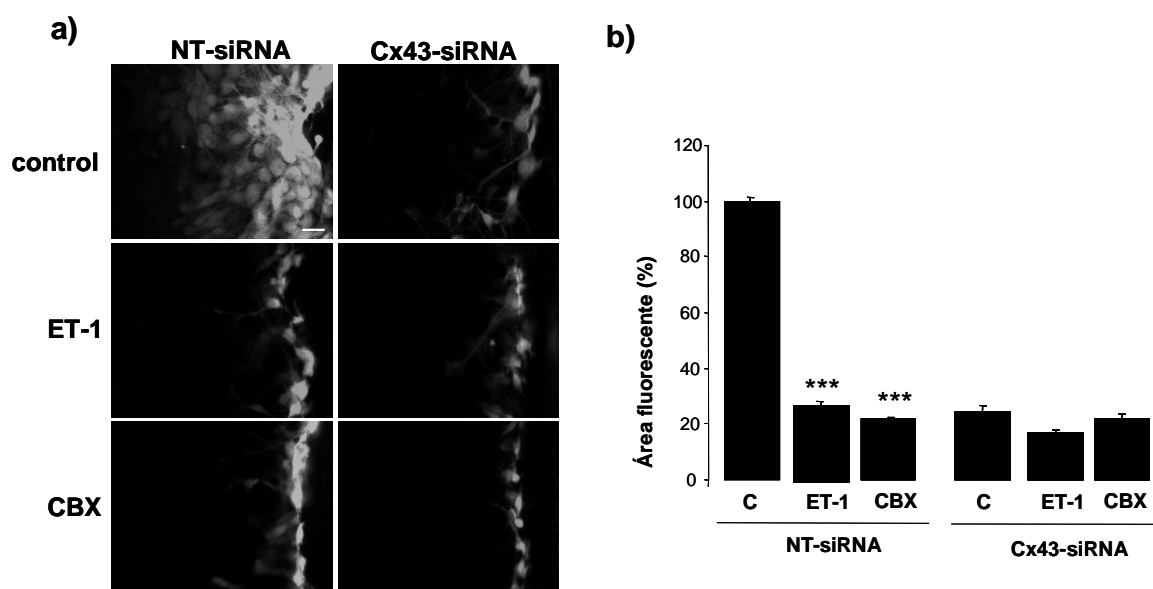


Figura 8. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. **a)** La permeabilidad de las uniones comunicantes se determinó mediante la técnica del "scrape loading", tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra = 30 μ m. **b)** Cuantificación del área de fluorescencia. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** p<0,001. (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). Abreviaturas: Cx43, conexina43; ET-1, endotelina-1; CBX, carbenoxolona.

4.1.3.2. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona en la proliferación de los astrocitos con la conexina43 silenciada.

Para conocer el efecto de la ET-1 y la CBX sobre la proliferación de los astrocitos con la Cx43 silenciada, analizamos la expresión de Ki-67, el grado de fosforilación de pRb y la expresión de las ciclinas D1 y D3, ya que estos últimos participan en el efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes en astrocitos (Taberero et al. 2006).

Las figuras 9a y 9b muestran que el tratamiento con ET-1 o con CBX incrementó la expresión de la Ki-67 en astrocitos transfectados con NT-siRNA alrededor del 100% y del 80%, respectivamente. Sin embargo, en astrocitos transfectados con Cx43-siRNA, la ET-1 sólo aumentó un 28% la expresión de la Ki-67, comparada con su control, mientras que la presencia de la CBX no produjo cambios significativos. Estos resultados se confirmaron mediante ensayos inmunocitoquímicos (Fig 9c), observándose que la cantidad de núcleos que expresaban Ki-67 aumentó tras el tratamiento con ET-1 ó CBX, respecto a la situación control. Sin embargo, ni la ET-1 ni la CBX aumentaron la cantidad de núcleos positivos para Ki-67 en las células silenciadas con Cx43-siRNA.

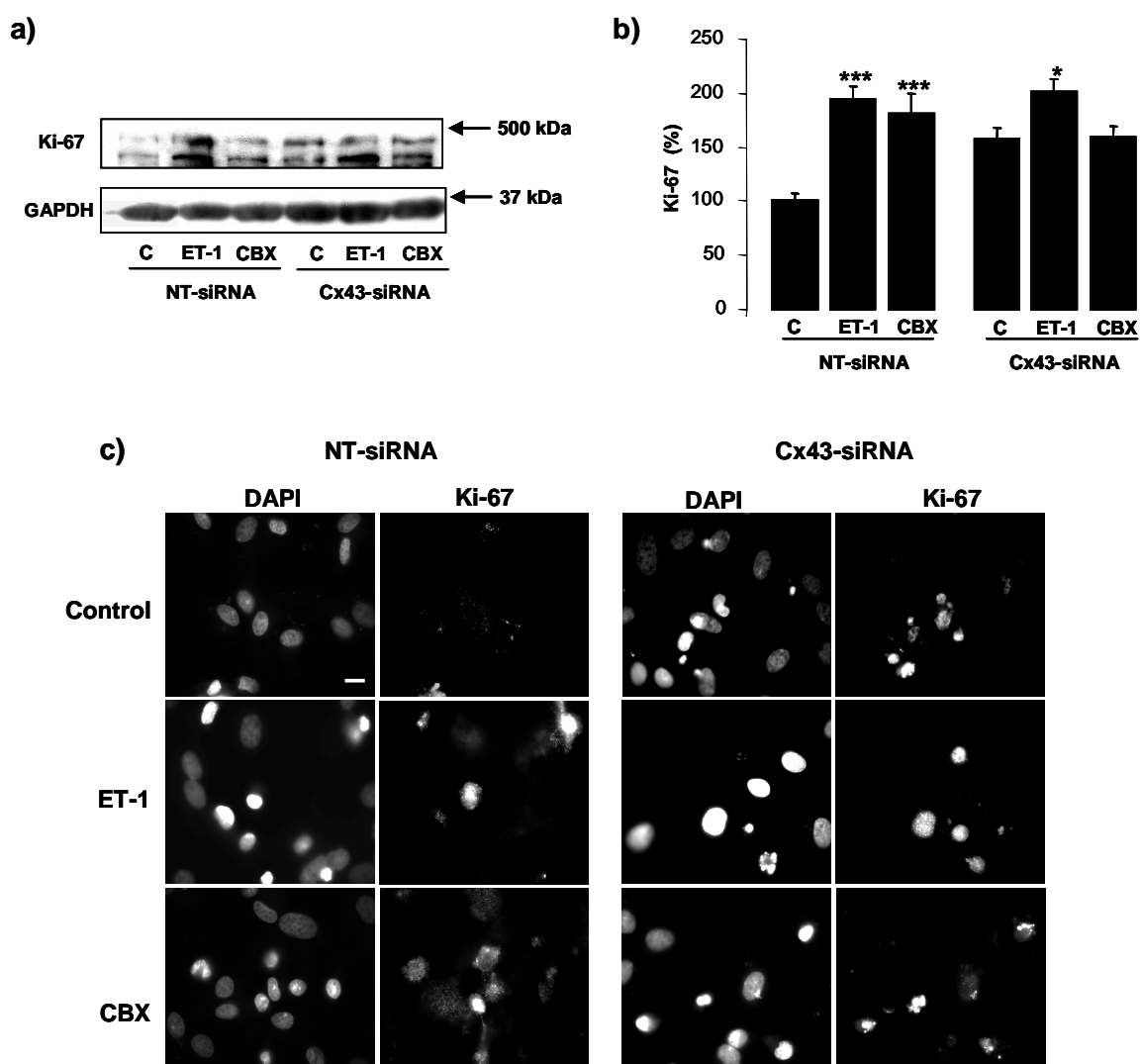


Figura 9. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la expresión de Ki-67 en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. **a)** Western blot de Ki-67 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de Ki-67 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** p<0,001; * p<0,05. (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). **c)** Inmunocitoquímica de Ki-67 y tinción de los núcleos con DAPI del mismo campo después de los tratamientos indicados. Barra = 6 μ m. Abreviaturas: Cx43, conexina43; ET-1, endotelina-1; CBX, carbenoxolona.

Nuestros resultados indican que, en los astrocitos transfectados con NT-siRNA, la ET-1 promovió la fosforilación del pRb en las serinas 795 y 780 (Fig. 10a-d), mientras que la CBX promovió solamente la fosforilación en la serina 780 (Fig. 10c y 10d). Cuando los astrocitos se transfectaron con Cx43-siRNA, la ET-1 fue capaz de promover la fosforilación de la Ser795 (Fig. 10a y 10b) pero no de la 780 (Fig. 10c y 10d). A su vez, la CBX no modificó los niveles de fosforilación de la Ser780 ni de la Ser795 (Fig 10a-d).

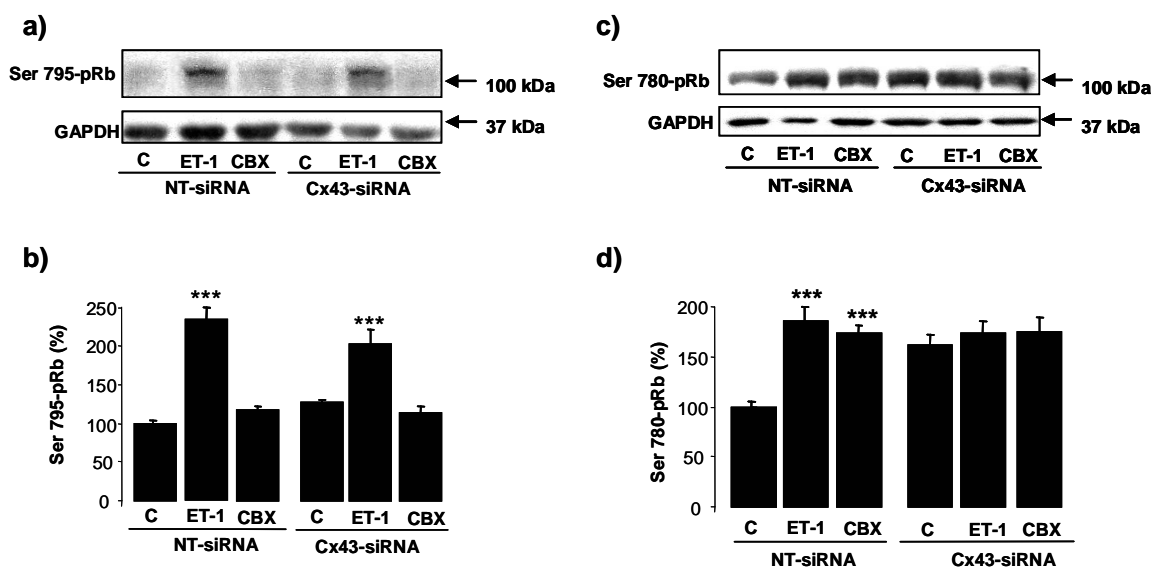


Figura 10. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la fosforilación del pRb en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. **a)** Western blot del pRb fosforilado en la serina 795 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la fosforilación del pRb en la serina 795 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** p < 0,001. **c)** Western blot del pRb fosforilado en serina 780 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **d)** Los valores de la fosforilación del pRb en la serina 780 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** p<0,001 (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). Abreviaturas: Cx43, conexina43; ET-1, endotelina-1; CBX, carbenoxolona; pRb, proteína del retinoblastoma.

Las figuras 11a y 11b muestran que, tanto el tratamiento con ET-1 como con CBX, incrementaron la expresión de la ciclina D1 alrededor del 75% y el 40%, respectivamente, en los astrocitos transfectados con NT-siRNA. En los astrocitos transfectados con Cx43-siRNA, el efecto de la ET-1 sobre la expresión de la ciclina D1 se redujo un 40%, y el efecto de la CBX no fue significativo.

Así mismo, los tratamientos con ET-1 y CBX produjeron un aumento de la expresión de la ciclina D3 (Fig. 11c y 11d) de más del 75%, en los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Sin embargo, en los astrocitos con la Cx43 silenciada, ni la ET-1 ni la CBX modificaron los niveles de expresión de la ciclina D3.

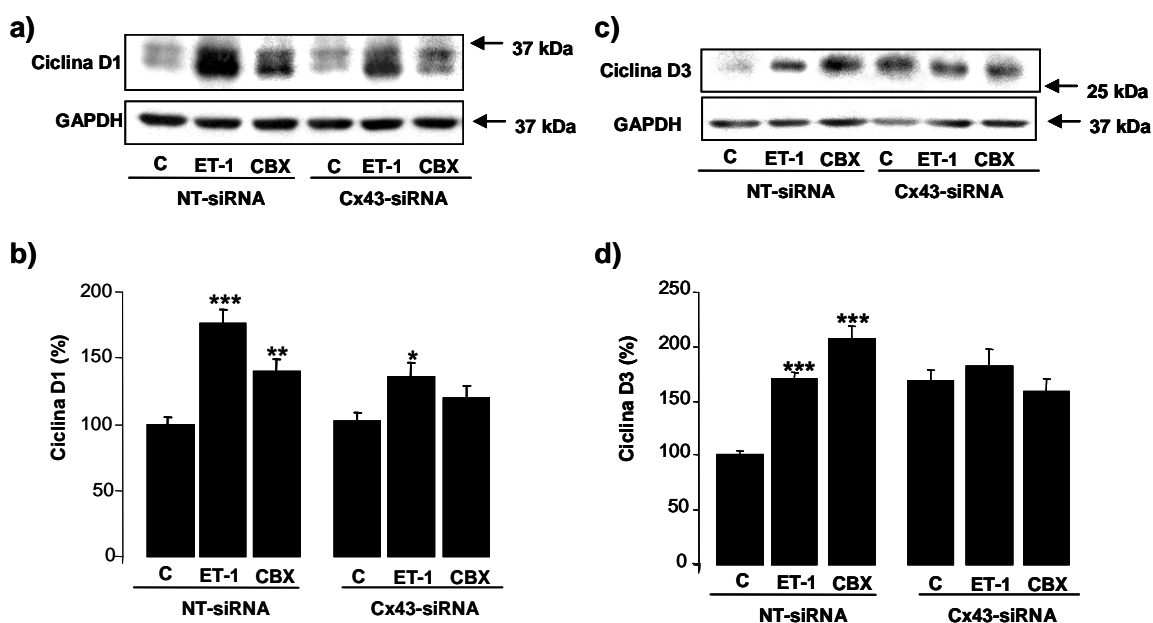


Figura 11. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la expresión de la ciclina D1 y la ciclina D3 en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (C) o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. **a)** Western blot de la ciclina D1 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D1 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. **c)** Western blot de la ciclina D3 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **d)** Los valores de la ciclina D3 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). Abreviaturas: Cx43, conexina43; ET-1, endotelina-1; CBX, carbenoxolona.

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

Al producirse una lesión cerebral, las células gliales supervivientes sufren un proceso reactivo que afecta principalmente a los astrocitos. Este proceso se denomina “gliosis reactiva” y provoca la liberación de una gran cantidad de factores de crecimiento, citoquinas y neuropéptidos como la endotelina-1 (ET-1) (Hasselblatt et al. 2001; Jiang et al. 1993; Zhang et al. 1994).

Recientemente se ha demostrado que la lesión cerebral provocada por la inyección de ácido kaínico produce una fuerte gliosis reactiva, caracterizada por el aumento de la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en los astrocitos, seguido de la pérdida de la expresión de la Cx43, una semana después de la inyección (Koulakoff et al. 2008). Por ello, decidimos investigar si en este modelo “in vivo”, en el que los astrocitos pierden la expresión de la Cx43 como consecuencia de la lesión cerebral, se produce un aumento de la proliferación de los astrocitos así como de la expresión de las ciclinas D1 y D3, tal y como habíamos observado en nuestro modelo “in vivo” tras el silenciamiento de la Cx43.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente ácido kaínico (1µg/µL), mediante estereotaxis en las coordenadas: -1mm anteroposterior, 1,5 mm mediolateral y 0,6 mm dorsoventral del bregma, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección. Se extrajo el cerebro, se congeló en isopentano a -30°C y se hicieron cortes coronales de 20 µm con el criostato.

La figura 12a muestra la fuerte gliosis producida por la inyección de ácido kaínico caracterizada por una alta expresión de GFAP. La zona de gliosis reactiva está delimitada por la línea blanca punteada. Al mismo tiempo se produjo una fuerte disminución de la Cx43 en los astrocitos reactivos (Fig. 12b), coincidiendo la zona de la gliosis con la zona de la pérdida de la expresión de la Cx43.

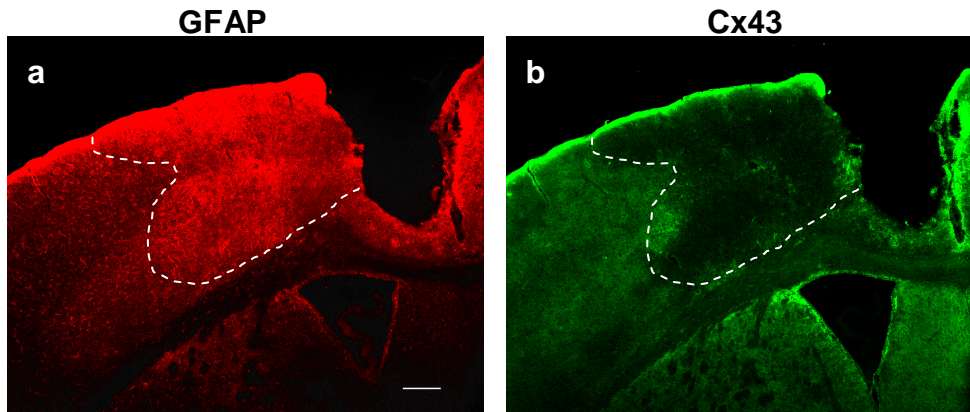


Figura 12. La gliosis producida por el ácido kaínico disminuye la expresión de la Cx43 en astrocitos “in vivo”.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) mediante estereotaxis en las coordenadas: -1mm anteroposterior, $1,5\text{ mm}$ mediolateral y $0,6\text{ mm}$ dorsoventral del bregma, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección. Se extrajo el cerebro, se congeló en isopentano a -30°C y se hicieron cortes coronales de $20\mu\text{m}$ con el criostato. **a)** Inmunohistoquímica de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). La zona de la gliosis, caracterizada por la sobreexpresión de la GFAP, se señala con la línea punteada. **b)** Inmunohistoquímica de la Cx43. Se muestra la misma zona de gliosis señalada en la figura a. Barra= $250\mu\text{m}$.

Una vez confirmada la pérdida de expresión de la Cx43 como consecuencia de la lesión cerebral, nos propusimos investigar el posible aumento de la incorporación de 5-bromo-2'-dexoxiuridina (BrdU) en los astrocitos, lo que indicaría un aumento en la proliferación de éstos. Para ello, se administraron 2 inyecciones intraperitoneales de BrdU ($1\text{mg}/20\text{g}$ de peso corporal) 12h y 4h, respectivamente, antes de sacrificar al animal. Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro. El cerebro se fijó de nuevo con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h y a continuación se incubaron en sacarosa 30% (p/v) toda la noche. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano a -25°C y se hicieron cortes coronales de $40\mu\text{m}$ con el microtomo.

En la figura 13a se muestra la fuerte gliosis producida por la inyección de ácido kaínico, caracterizada por una alta expresión de GFAP en la corteza cerebral (delimitada por la línea blanca punteada). Coincidiendo con la gliosis reactiva de los astrocitos, en la figura 13b se observa un aumento en la incorporación de BrdU. Las figuras 13c y 13d muestran una ampliación de los insertos de las figuras 13a y 13b, respectivamente. Los resultados muestran la existencia de astrocitos reactivos que expresaban GFAP y que incorporaron BrdU (Fig. 13e), indicando que los astrocitos reactivos estaban proliferando.

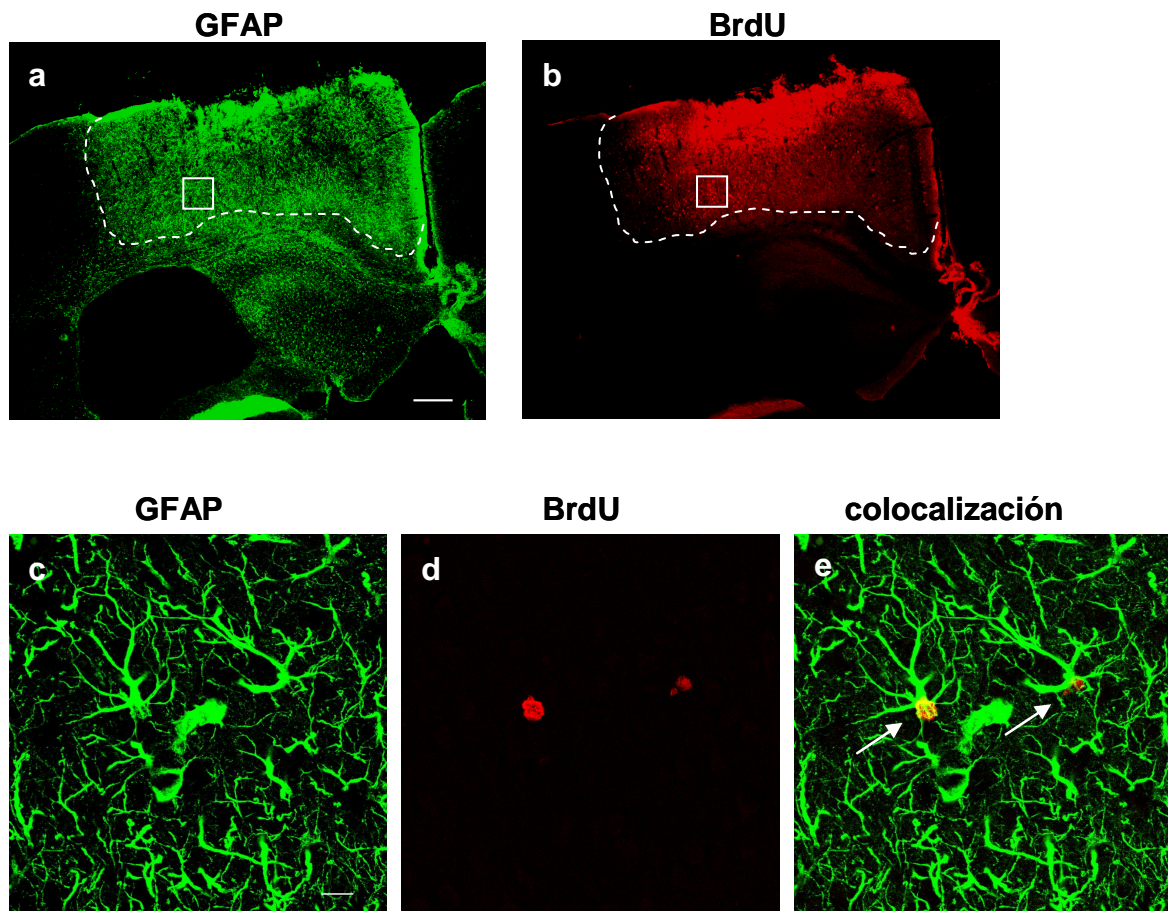


Figura 13. La gliosis producida por el ácido kaínico aumenta la incorporación de BrdU en astrocitos “in vivo”.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) mediante estereotaxis en las coordenadas: -1mm anteroposterior, $1,5\text{ mm}$ mediolateral y $0,6\text{ mm}$ dorsoventral del bregma, tal y como se describe en Material y Métodos. Se administraron 2 inyecciones intraperitoneales de BrdU ($1\text{mg}/20\text{g}$ de peso corporal) 12 h y 4 h, respectivamente, antes de sacrificar al animal. Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro. El cerebro se fijó de nuevo con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h y, a continuación, se incubaron en sacarosa 30% (p/v) toda la noche. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano a -25°C y se hicieron cortes de $40\mu\text{m}$ con el microtomo. **a)** Inmunohistoquímica de la GFAP. La zona de la gliosis de la corteza, caracterizada por la sobreexpresión de la GFAP, se señala con la línea punteada. **b)** Inmunohistoquímica de BrdU. Se muestra la misma zona de gliosis señalada en la figura a. **c)** Ampliación del inserto señalado en la figura a mostrando la GFAP. **d)** Ampliación del inserto señalado en la figura b mostrando la incorporación de BrdU. **e)** Colocalización de la GFAP y BrdU. Las flechas indican la expresión de BrdU en células GFAP+. Barra= $250\mu\text{m}$ en las figuras a y b, $20\mu\text{m}$ en las figuras c-e.

Una vez conocido que existe un aumento en la proliferación de los astrocitos reactivos en este modelo de pérdida de la Cx43, nos propusimos estudiar el posible aumento de las ciclinas D1 y D3 en la zona de la gliosis reactiva. Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro. El cerebro se fijó de nuevo con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h y, a continuación, se incubaron en sacarosa 30% (p/v) toda la noche. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano a -25°C y se hicieron cortes coronales de $40\mu\text{m}$ con el microtomo.

La figura 14a muestra la fuerte gliosis producida por la inyección de ácido kaínico, caracterizada por una alta expresión de GFAP en la corteza cerebral (delimitada por la línea blanca punteada). Coincidiendo con la gliosis reactiva de los astrocitos, en la figura 14b se observa un aumento en la expresión de la ciclina D1. Las figuras 14c y 14d muestran una ampliación de los insertos de las figuras 14a y 14b, respectivamente. La figura 14e muestra la colocalización de GFAP con la ciclina D1, indicando que en los astrocitos reactivos se indujo la expresión de la ciclina D1.

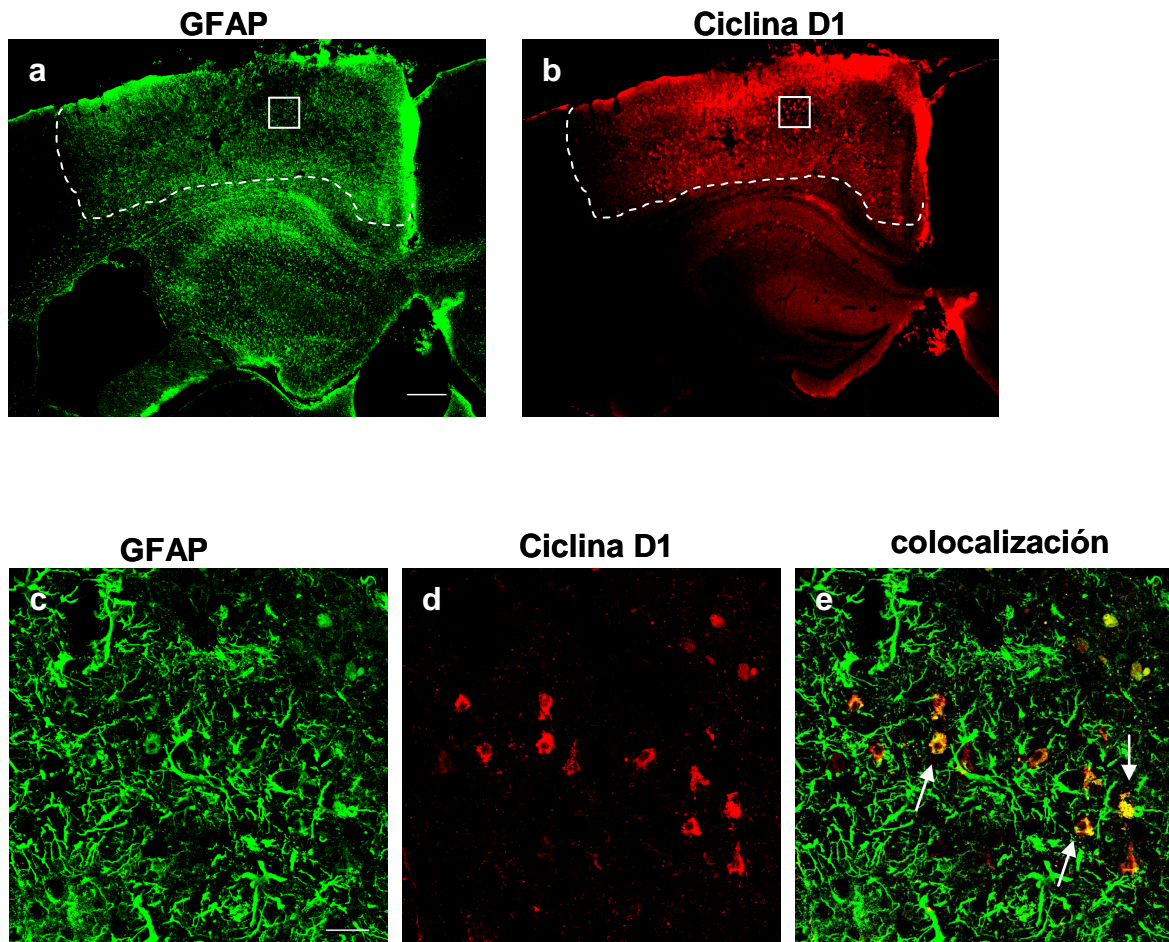


Figura 14. La gliosis producida por el ácido kaínico aumenta la expresión de la ciclina D1 en astrocitos “in vivo”.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) mediante estereotaxis en las coordenadas: -1mm anteroposterior, $1,5\text{ mm}$ mediolateral y $0,6\text{ mm}$ dorsoventral del bregma, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro. El cerebro se fijó de nuevo con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h y a continuación se incubaron en sacarosa 30% (p/v) toda la noche. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano a -25°C y se hicieron cortes de $40\mu\text{m}$ con el microtomo. **a)** Inmunohistoquímica de la GFAP. La zona de la gliosis de la corteza, caracterizada por la sobreexpresión de la GFAP, se señala con la línea punteada. **b)** Inmunohistoquímica de la ciclina D1. Se muestra la misma zona de gliosis señalada en la figura a. **c)** Ampliación del inserto señalado en la figura a mostrando la GFAP. **d)** Ampliación del inserto señalado en la figura b mostrando la ciclina D1. **e)** Colocalización de la GFAP y la ciclina D1. Las flechas indican la expresión de la ciclina D1 en células GFAP +. Barra= $250\mu\text{m}$ en las figuras a y b, $25\mu\text{m}$ en las figuras c-e.

La figura 15a muestra la fuerte gliosis producida por la inyección de ácido kaínico, caracterizada por una alta expresión de GFAP en la corteza cerebral (delimitada por la línea blanca punteada). Coincidiendo con la gliosis reactiva de los astrocitos, en la figura 15b se observó un aumento en la expresión de la ciclina D3. Las figuras 15c y 15d muestran una ampliación de los insertos de las figuras 15a y b, respectivamente. La figura 15e muestra la colocalización de GFAP con la ciclina D3, indicando que, tras una lesión de este tipo, se indujo la expresión de la ciclina D3 en astrocitos.

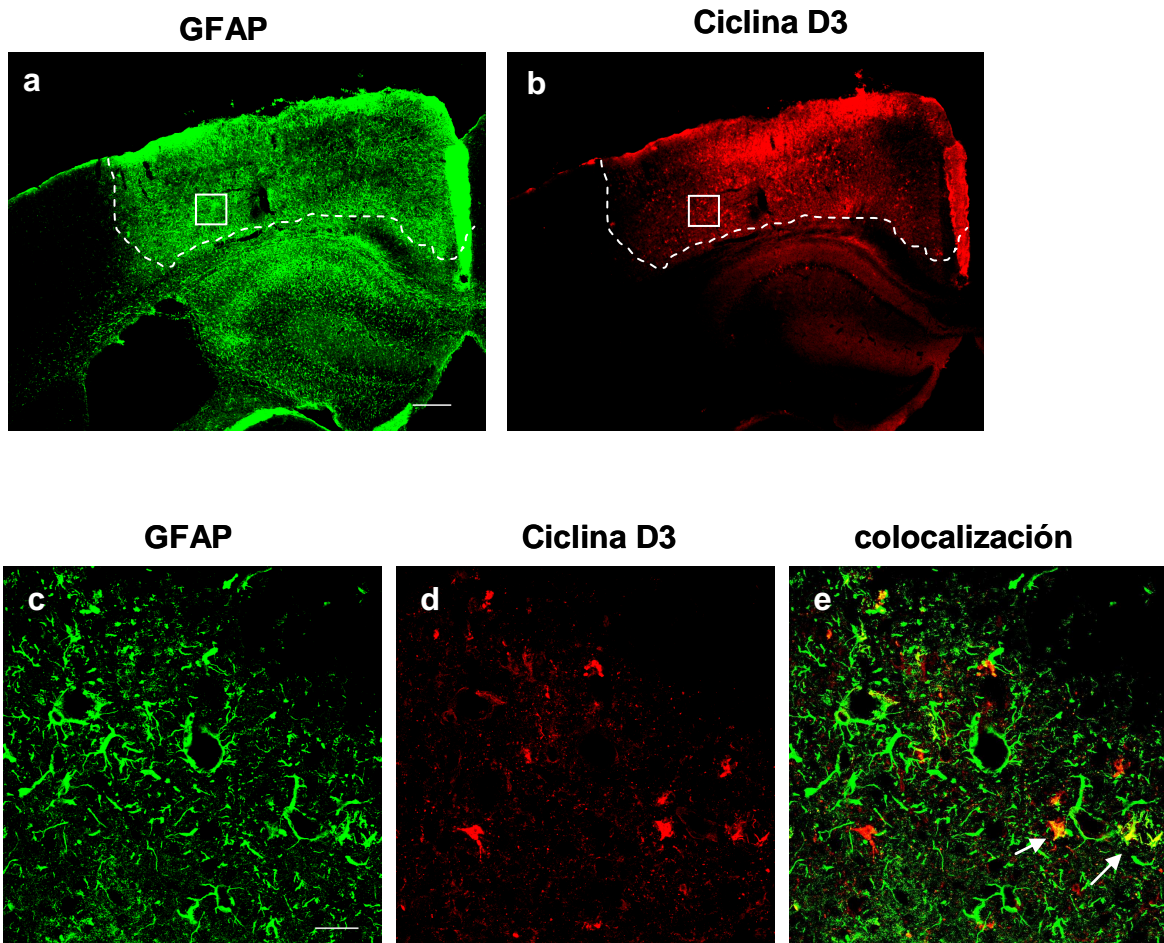


Figura 15. La gliosis producida por el ácido kaínico aumenta la expresión de la ciclina D3 en astrocitos “in vivo”.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) mediante estereotaxis en las coordenadas: -1mm anteroposterior, $1,5\text{ mm}$ mediolateral y $0,6\text{ mm}$ dorsoventral del bregma, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro. El cerebro se fijó de nuevo con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h y, a continuación se incubaron en sacarosa 30% (p/v) toda la noche. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano a -25°C y se hicieron cortes de $40\mu\text{m}$ con el microtomo. **a)** Inmunohistoquímica de la GFAP. La zona de la gliosis de la corteza, caracterizada por la sobreexpresión de la GFAP se señala con la línea punteada. **b)** Inmunohistoquímica de la ciclina D3. Se muestra la misma zona de gliosis señalada en la figura a. **c)** Ampliación del inserto señalado en la figura a mostrando la GFAP. **d)** Ampliación del inserto señalado en la figura b mostrando la ciclina D3. **e)** Colocalización de GFAP y la ciclina D3. Las flechas indican la expresión de la ciclina D3 en células GFAP+. Barra= $250\mu\text{m}$ en las figuras a y b, $25\mu\text{m}$ en las figuras c-e.

4.2. SOBREENPRESIÓN DE LA CONEXINA43 EN CÉLULAS DE GLIOMA C6

Los gliomas son tumores del sistema nervioso de origen glial y mayoritariamente astrocítico. Constituyen los tumores más abundantes del cerebro y, en términos generales, presentan muy mal pronóstico (para revisión, véase: Caskey et al. 2000). El grado de malignidad de los gliomas está inversamente relacionado con el nivel de expresión de la conexina43 (Cx43), siendo éste muy bajo en los astrocitomas anaplásicos (grado III) e indetectable en los glioblastomas multiformes (grado IV) (Huang et al. 1999; 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).

La Cx43 se considera una proteína supresora de tumores porque la expresión de su gen en las células tumorales y, por tanto, el establecimiento de la comunicación intercelular trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Bond et al. 1994; Eghbali et al. 1991; Hirschi et al. 1996; Huang et al. 1998; Mesnil et al. 1995; Metha et al. 1991; Naus 2002; Yamasaki 1990; Yamasaki et al. 1999; Zhu et al. 1991). De hecho, cuando las células de glioma de rata C6 se cocultivan con células de esta misma línea transfectadas con el cDNA de la Cx43, se inhibe la proliferación de la línea celular C6 (Zhu et al. 1992). Los mecanismos que explican la acción de la Cx43 como proteína supresora de tumores 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 uniones comunicantes (Loewenstein 1992; Mehta et al. 1986; Sánchez-Alvarez et al. 2001), mientras que otros consideran que dicho efecto es independiente de la comunicación (Dang et al. 2006; Huang et al. 1998; Moorby and Patel 2001; Zhang et al. 2003a) y está relacionado con la fosforilación de la Cx43 y con su capacidad para interactuar con otras proteínas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el segundo objetivo de este trabajo es determinar el mecanismo por el cual la Cx43 es capaz de disminuir la velocidad de proliferación celular en células prácticamente carentes de esta proteína, como son las células de glioma de rata C6.

4.2.1. Diseño de un modelo experimental de sobreexpresión de la conexina43 en células de glioma de rata C6.

Para diseñar un modelo experimental de sobreexpresión de la Cx43 en las células de glioma de rata C6 se construyó, en primer lugar, un plásmido bicistrónico que codificase nuestra proteína de interés, es decir, la Cx43, y una proteína reportera, Dsred2. Posteriormente, se transfectaron las células de glioma de rata C6 con dicho plásmido y se

seleccionaron clones transfectados establemente, evaluándose en los mismos la expresión de la Cx43 y la comunicación intercelular.

I. Construcción del plásmido pIres-Cx43, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.

IA. Clonación del cDNA de la Cx43.

Para la obtención del cDNA de la Cx43 se buscó el mRNA de la Cx43 de rata en la base de datos del *GenBank* del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI), obteniéndose la secuencia que aparece en la figura 16a, con el número de identificación: NM_012567. La zona en color azul corresponde a la región codificadora del mRNA. A continuación seleccionamos oligonucleótidos específicos flanqueando la región codificadora, que actuaron de cebadores en la reacción de RT-PCR (Fig.16b). Para la síntesis del cDNA codificador de la Cx43 se utilizó como molde el RNA total de astrocitos. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo tal y como se describe en Material y Métodos, sección 3.2.3. El resultado de la RT-PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez obtenido el cDNA codificador de la Cx43, se purificó y se diseñaron nuevos oligonucleótidos específicos que contuvieran secuencias de restricción para las enzimas Xho I y BamH I (Fig. 16c). Se llevó a cabo una segunda PCR y el producto resultante se analizó en una electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose una banda de DNA ligeramente superior a 1 Kb, que se corresponde con el tamaño de la región codificadora de la Cx43, de 1149 pb. Este fragmento se purificó, obteniéndose el cDNA codificador de la Cx43, cuyos extremos contenían secuencias de restricción para las enzimas Xho I y BamH I (Fig. 17).

a)

```

1  acgaggatc agcacttttc tttcattggg ggaaggcgt gaggaaagta ccaaacagca
61  gcagactttt aaactttaaa cagacaggtc tgagagcctg aactctcatt tttccttga
121 cttcagcctc caaggagttc caccaacttt ggcgcgccgg cttcactttc attaatgtaa
181 agagagggtc ccagacatgg gtgactggag tgccttgggg aagcttctgg acaagggtcca
241 agcctactcc accgctggag ggaagggtgt gctgtcagt gctctcatat tcagaatcct
301 gctcctgggg acagctgttg agtcagcttg gggatgatgaa cagtctgcct ttcgctgtaa
361 cactcaacaa cctggctgcg aaaacgtctg ctatgacaag tccttcccca tctctcaggt
421 gcgcttctgg gtccttcaga tcatattcgt gtctgtgccc accctcctgt acttgcccca
481 tgtgttctat gtgatgagga aggaagagaa gctaaacaag aaagaagagg agctcaaggt
541 ggcccagact gacggggtca acgtggagat gcactgaa gacattgaaa tcaagaagtt
601 caagtacggg attgaagagc acggcaaggt gaaaatgagg ggcggcttgc tgagaaccta
661 catcatcagc atcctcttca agtctgtctt cgagggtggc ttctgtctca tccagtggtg
721 catctatggg ttcagcttga gcgcggtcta cactgcaag agagatccct gccccacca
781 ggtagactgc ttctctcac gtcccacgga gaaaaccatc ttcattcatc tcatgctggt
841 ggtgtccttg gtgtctctcg ctttgaacat cattgagctc ttctacgtct tcttcaaggg
901 cgttaaggat cgcgtgaagg gaagaagcga tccttaccac gccaccactg gccactgag
961 cccatcaaaa gactgcggat ctccaaaata cgctacttc aatggctgct cctcaccaac
1021 ggctccactc tcgcctatgt ctctcctcgt gtacaagctg gttactggtg acagaacaaa
1081 ttctctgtgc cgcaattaca acaagcaagc tagcgagcaa aactgggcga actacagcgc
1141 agagcaaaaat cgcattggggc aggcgggaag caccatctcc aactcgcaag cccagccgtt
1201 cgatttcccc gacgacaacc agaatgcca aaaagttgct gctggacatg aactccagcc
1261 attagccatc gtggaccaac gaccttccag cagagccagc agccgcgcca gcagcagcc
1321 tcggcctgat gacctggaga tttaaaccgg cttgagcatc gagctgtcga ttatggagga
-----3148

```

- b) 5'-ATGGGTGACTGGAGTGTGCCTTGGGG-3'
5'-TTAAATCTCCAGGTCATCAGGCCGAG-3'
- c) 5'-CGC'TCGAGCGATGGGTGACTGGAGTGTG-3'
Xho I
5'-CGG'GATCCCGTTAAATCTCCAGGTCATCA-3'
BamH I

Figura 16. Secuencia del cDNA de la conexina43 y oligonucleótidos diseñados para su amplificación.

a) En el cDNA de la conexina43 (Cx43) de rata obtenido de la base de datos del NCBI con número identificador NM 012567, se localizó la secuencia codificadora del mRNA de 1149 pb, señalada en azul y rojo. En color rojo están los oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de la secuencia codificadora de la Cx43. b) Cebadores empleados para la amplificación de la secuencia codificadora del mRNA mensajero de la Cx43. c) Cebadores con las secuencias que contienen los sitios de restricción (en rojo) de las enzimas Xho I y BamH I, diseñados para la clonación en el vector pIRES2-DsRed2.

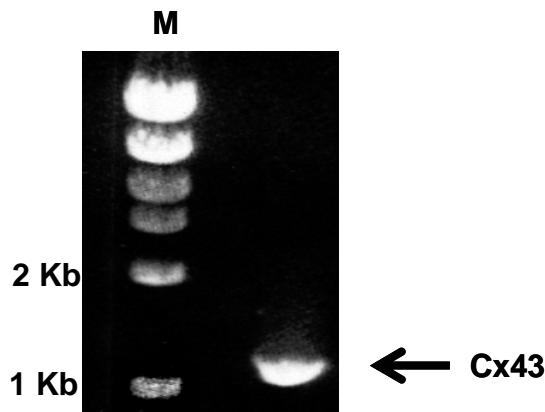


Figura 17. Amplificación de la secuencia de la conexina43.

Para la amplificación del cDNA de la Cx43 se realizó una RT-PCR empleando los cebadores descritos en la figura 16b y como molde el RNA de astrocitos. El resultado de la RT-PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo una banda ligeramente superior a 1Kb, que corresponde al tamaño del cDNA de la secuencia codificadora de la Cx43 (1149 pb). M: marcador de tamaño de DNA.

IB. Clonación del vector pIRES2-DsRed2.

El vector pIRES2-DsRed2 (véase esquema 14 de la sección Material y Métodos) fue clonado utilizando la cepa DH5α de *E. coli*. La cepa transformada creció en medio LB más kanamicina (50 µg/ml). Después de purificar el DNA plasmídico, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 18 se muestra el resultado de dicha electroforesis, observándose una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb.

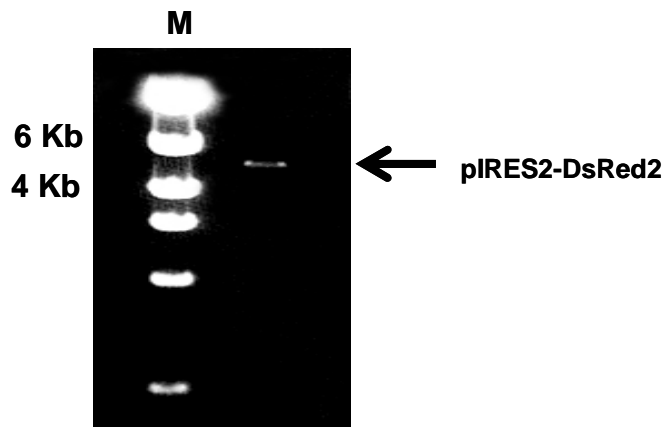


Figura 18. Clonación del vector pIRES2-DsRed2.

El vector pIRES2-DsRed2 fue clonado mediante transformación bacteriana. Posteriormente, se purificó y se tomó una alícuota que se digirió con la enzima NcoI, observándose una banda entre 4 y 6 Kb, que corresponde con el tamaño del plásmido pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb. M: marcador de tamaño de DNA.

IC. Inserción de la secuencia del cDNA codificador de la Cx43 en el vector pIRES2-DsRed2.

Para llevar a cabo la inserción de la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43 en el vector pIRES2-DsRed2, se realizó una digestión enzimática, con las enzimas de restricción Xho I y BamH I, del cDNA de la Cx43 clonado con los extremos de restricción para estas enzimas, y del vector pIRES2-DsRed2, que posee un sitio de restricción para cada una de estas enzimas en su sitio de multiclonación (MCS) (véase esquema 14, Material y Métodos). Tras la digestión, el DNA se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, observándose el resultado en la figura 19. En el carril 1 se observa una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb. Asimismo, se observa en el carril 2 una banda ligeramente superior a 1 Kb, que se corresponde con el tamaño de la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43, que es de 1,149 Kb. Ambos fragmentos se purificaron para proceder a su ligación.

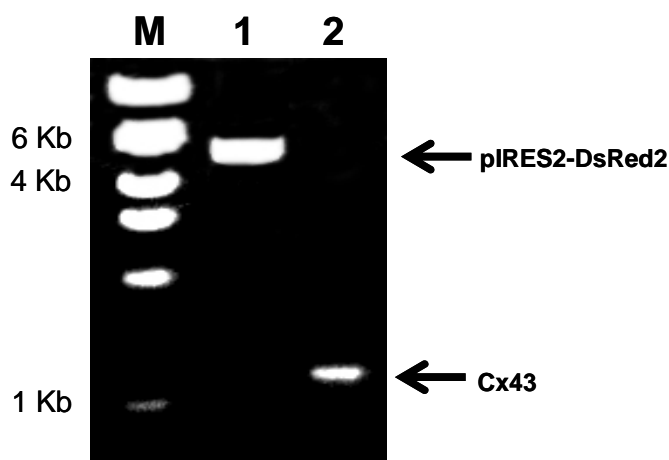


Figura 19. Digestión enzimática del cDNA de la conexina43 y del vector pIRES2-DsRed2 previamente amplificados.

El cDNA de la Cx43, amplificado según se describe en la figura 17, y el vector pIRES2-DsRed2, se digirieron con las enzimas de restricción Xho I y BamH I. En el carril 1 se observa una banda entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del plásmido pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb. En el carril 2 se observa una banda ligeramente superior a 1 Kb, que corresponde al tamaño del cDNA de la Cx43 de 1,149 Kb. M: marcador de tamaño de DNA.

Para la ligación, los fragmentos del cDNA codificador de la Cx43 y del vector pIRES2-DsRed2, obtenidos tras la digestión con Xho I y BamH I, se incubaron en presencia de la ligasa T4, tal y como se describe en Material y Métodos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana utilizando la cepa DH5 α de *E. coli*. Las bacterias se sembraron en placas de agar con medio LB más kanamicina (50 μ g/ml). Al cabo de 24 horas se recogieron 20 colonias y se incubaron en medio LB más kanamicina (50 μ g/ml). Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico de cada una de estas colonias y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, digiriéndolo previamente con XhoI. En la figura 20 se observa la electroforesis correspondiente a 5 de las 20 colonias seleccionadas. Así, se comprueba que la colonia 1 incorporó la construcción plres-Cx43, ya que se sitúa a una altura más próxima a las 6 Kb que el resto de las colonias, siendo su tamaño teórico 6,4 Kb, aproximadamente.

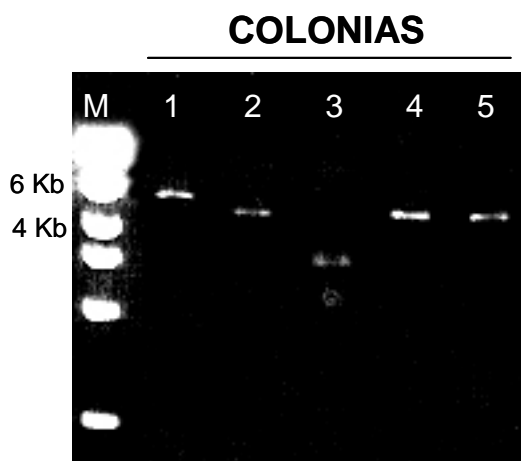


Figura 20. Resultado de la ligación entre el cDNA de la conexina43 y el vector pIRES2-DsRed2.

A partir de los productos de la digestión con Xho I y BamH I del cDNA de la Cx43 y del vector pIRES2-DsRed2, se llevó a cabo la ligación de los mismos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana, se seleccionaron las colonias que crecieron en medio selectivo y se purificó el DNA plasmídico. Éste se digirió con la enzima Xho I y se separó en un gel de agarosa. En la imagen se observa el resultado obtenido en 5 de estas colonias. Obsérvese que la colonia 1 tiene el tamaño esperado de 6,4 Kb. M: marcador de tamaño de DNA.

Una vez seleccionada la colonia número 1, que contenía la construcción plres-Cx43, se amplificó con el fin de incrementar la cantidad de plásmido. Esta colonia creció en medio LB más kanamicina (50 μ g/ml) durante 24 horas y después se extrajo el DNA plasmídico. Posteriormente se determinó la concentración de plásmido obtenida y, a continuación, se secuenció en dicho plásmido el inserto correspondiente a la Cx43, en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca, utilizando los oligonucleótidos especificados en la sección Material y Métodos (apartado 3.2.4.6.). La secuencia obtenida (R.S., Resultado de la Secuenciación) se alineó con la secuencia codificadora del cDNA de la Cx43 contenida en el plásmido plres-Cx43 (S.C., Secuencia de la Cx43), utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>), obteniéndose un 100 % de homología. El resultado del alineamiento se observa en la figura 21.

```

S.C. 1 atgggtgactggagtgcttggggaagctctggacaaggtccaagcctactccaccgct 60
      |||
R.S. 1 atgggtgactggagtgcttggggaagctctggacaaggtccaagcctactccaccgct 60
      |||
S.C. 61 ggaggaaggtgtggctgtcagtgctcttcattcagaatcctgctcctgggacagct 120
      |||
R.S. 61 ggaggaaggtgtggctgtcagtgctcttcattcagaatcctgctcctgggacagct 120
      |||
S.C. 121 gttgagtacagctggggtgatgaacagctctgctcttcgctgtaaacactcaacaacctggc 180
      |||
R.S. 121 gttgagtacagctggggtgatgaacagctctgctcttcgctgtaaacactcaacaacctggc 180
      |||
S.C. 181 tgcgaaaacgtctgctatgacaagctctcccatctctcacgtgcgcttctgggtcctt 240
      |||
R.S. 181 tgcgaaaacgtctgctatgacaagctctcccatctctcacgtgcgcttctgggtcctt 240
      |||
S.C. 241 cagatcatattcgtgtctgtgccaccctcctgtaactggcccatgtgttctatgtgatg 300
      |||
R.S. 241 cagatcatattcgtgtctgtgccaccctcctgtaactggcccatgtgttctatgtgatg 300
      |||
S.C. 301 aggaaggaagagaagctaaacaagaagaaggagctcaaatggccagactgacggg 360
      |||
R.S. 301 aggaaggaagagaagctaaacaagaagaaggagctcaaatggccagactgacggg 360
      |||
S.C. 361 gtcaactggagatgacactgaagcagattgaaatcaagaagtcaagtacgggatgaa 420
      |||
R.S. 361 gtcaactggagatgacactgaagcagattgaaatcaagaagtcaagtacgggatgaa 420
      |||
S.C. 421 gagcaccgcaaggtgaaatgagggcggttgctgagaacctacatcatcagcatcctc 480
      |||
R.S. 421 gagcaccgcaaggtgaaatgagggcggttgctgagaacctacatcatcagcatcctc 480
      |||
S.C. 481 ttcaagtctgtcttcgaggtggccttctgctcatccagtggtacatctatgggttcagc 540
      |||
R.S. 481 ttcaagtctgtcttcgaggtggccttctgctcatccagtggtacatctatgggttcagc 540
      |||
S.C. 541 ttgagcgcggtctacacctgcaagagagatccctgccccaccaggtagactgcttctc 600
      |||
R.S. 541 ttgagcgcggtctacacctgcaagagagatccctgccccaccaggtagactgcttctc 600
      |||
S.C. 601 tcacgtcccacggagaaaaacatcttcatcatcttcatgctggtggtgctcctgggtgtc 660
      |||
R.S. 601 tcacgtcccacggagaaaaacatcttcatcatcttcatgctggtggtgctcctgggtgtc 660
      |||
S.C. 661 ctgctttgaacatcattgagctcttctacgtcttcttcaaaggcgttaaggatcgcctg 720
      |||
R.S. 661 ctgctttgaacatcattgagctcttctacgtcttcttcaaaggcgttaaggatcgcctg 720
      |||
S.C. 721 aaggaagaagcgatccttaccacgcccactggcccactgagcccatcaaaagactgc 780
      |||
R.S. 721 aaggaagaagcgatccttaccacgcccactggcccactgagcccatcaaaagactgc 780
      |||
S.C. 781 ggatctccaaaatacgcctacttcaatggctgctcctcaccacggctccactctcgct 840
      |||
R.S. 781 ggatctccaaaatacgcctacttcaatggctgctcctcaccacggctccactctcgct 840
      |||
S.C. 841 atgtctcctcctgggtacaagctggttactggtgacagaaacaattcctcgtgccgcaat 900
      |||
R.S. 841 atgtctcctcctgggtacaagctggttactggtgacagaaacaattcctcgtgccgcaat 900
      |||
S.C. 901 tacacaagcaagctagcgagcaaaactggcggaactacagcgcagagcaaaatcgcatg 960
      |||
R.S. 901 tacacaagcaagctagcgagcaaaactggcggaactacagcgcagagcaaaatcgcatg 960
      |||
S.C. 961 gggcaggccggaagcaccatctccaactcgcacgcccagccgttcgatttcccgcagac 1020
      |||
R.S. 961 gggcaggccggaagcaccatctccaactcgcacgcccagccgttcgatttcccgcagac 1020
      |||
S.C. 1021 aaccagaatgccaaaaagtgtgctgctggacatgaactccagccattagccatcgtggac 1080
      |||
R.S. 1021 aaccagaatgccaaaaagtgtgctgctggacatgaactccagccattagccatcgtggac 1080
      |||
S.C. 1081 caacgaccttccagcagagccagcagccgcgcccagcagcagcctcgccctgatgacctg 1140
      |||
R.S. 1081 caacgaccttccagcagagccagcagccgcgcccagcagcagcctcgccctgatgacctg 1140
      |||

S.C. 1141 gagatttaa 1149
      |||
R.S. 1141 gagatttaa 1149

```

Figura 21. Resultado del alineamiento de la secuencia clonada, obtenida por secuenciación automática, con la secuencia del mRNA de la conexina43.

La secuencia del cDNA de la Cx43 obtenida mediante secuenciación automática a partir de la construcción plasmídica pRes-Cx43 (R.S.: Resultado de la secuenciación) se alineó frente a la secuencia del cDNA de la proteína Cx43 de rata, con número de identificación NM 012567 (S.C.: Secuencia de la Cx43) utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). El resultado del alineamiento fue un 100% de homología.

ID. Transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.

Una vez obtenida la construcción plasmídica plres-Cx43, se transfectaron las células de glioma de rata C6 con este plásmido así como con el plásmido pIRES2-DsRed2. Una vez transfectadas las células, se seleccionaron clones transfectados establemente, tal y como se describe en Material y Métodos. A los clones transfectados con pIRES2-DsRed2 se les denominó C6-Ires 1 y C6-Ires 2 y a aquéllos transfectados con plres-Cx43 se les denominó C6-Cx43 seguidos de un número del 1 al 9. Es importante señalar que, a pesar de que inicialmente las células transfectadas emitían fluorescencia, como se puede observar en la figura 22, ésta resultó ser muy débil y se perdió al cabo de varios días.

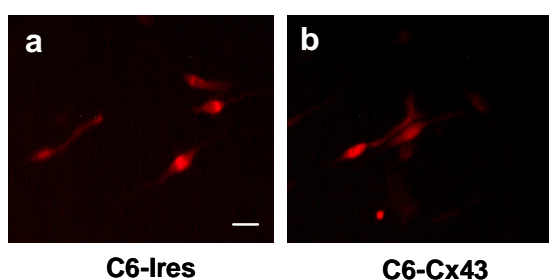


Figura 22. Transfección de células C6 de glioma de rata con el vector pIRES2-DsRed2 y con la nueva construcción plres-Cx43.

Las células de glioma C6 se resembraron en placas de 35 mm, a una densidad de 50000 células/cm² en DMEM+FCS al 10% (v/v). 24 h después, se transfectaron con el plásmido correspondiente. Al cabo de 24 h se añadió al medio de cultivo el antibiótico geneticina (0,5mg/mL), con el objetivo de seleccionar las células que incorporaron el plásmido, localizadas

por la fluorescencia emitida por la proteína DsRed2. Cabe destacar que dicha fluorescencia tanto en las células C6-Ires (a) como en las células C6-Cx43 (b), se perdió al cabo de varios días. Barra= 30 μ m.

II. Sobreexpresión y localización de la Cx43 en las células C6-Cx43.

Una vez seleccionados los clones transfectados establemente, se recogieron las proteínas y se realizó una transferencia tipo Western blot para determinar la expresión de la Cx43. En la figura 23a se observa que los clones 4, 9 y, sobre todo, el 7, son los que expresan mayor cantidad de Cx43, a juzgar por la aparición de dos bandas por encima de 37 kDa. Así, se eligieron los clones 4, 7 y 9 para procesarlos para los distintos estudios. A su vez, se determinó qué clones de las células transfectadas con el plásmido pIRES2-DsRed2 expresaban la proteína DsRed2. Para ello, se extrajo el RNA total de las células de glioma C6 y C6-Ires, se trató con DNAsa y llevó a cabo una RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos correspondientes descritos en la sección Material y Métodos. En la figura 23b se observa que los clones 1, 2 y 3 expresan la DsRed2, como muestra la aparición de una banda ligeramente superior a 600 pb, que se corresponde con el RNA mensajero de esta proteína, de 677 pb. Seleccionamos el clon 1 para futuros experimentos, a partir de aquí denominado C6-IRes. Por otro lado, en las células de glioma de rata C6 sin transfectar no se detectó expresión de la DsRed2.

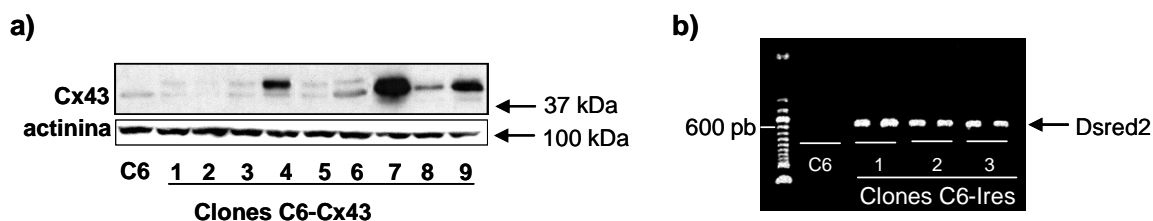


Figura 23. Expresión de la conexina43 y de la proteína DsRed2 en las células de glioma C6 transfectadas.

Los clones seleccionados de células C6 transfectados con la construcción pIres-Cx43, numerados del 1 al 9, se resembraron a una densidad de 50.000 células/cm². a) Pasadas 48 h, la expresión de la Cx43 se determinó mediante transferencia tipo Western. Como control de carga se utilizó la actinina. b) El RNA de las células de glioma de rata C6 y de los clones seleccionados C6-Ires, numerados del 1 al 3, se extrajo 48 h después de la resiembra. Mediante una RT-PCR se determinó la presencia del mRNA de DsRed2. Las bandas presentan un tamaño aproximado de 600 pb, correspondiente al cDNA del mRNA de DsRed2, que tiene 677 pb.

Dado que la Cx43 se expresa mayoritariamente en la membrana celular formando placas (Laird, 1996, 311), decidimos comprobar su distribución en la célula. Para ello, las células de glioma C6, C6-Ires y los clones elegidos de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se resembraron a una densidad de 15.000 células/cm². Pasadas 48 h, se fijaron las células con paraformaldehído al 4%. La localización de la Cx43 se determinó mediante inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos. Nuestros resultados indican que el clon con mayor contenido en Cx43 es el 7, como se observa en la figura 24a, corroborando así, los resultados obtenidos mediante Western blot. Además, la figura 24b muestra la localización de la Cx43, que se encuentra predominantemente en la membrana, formando las placas características de esta proteína.

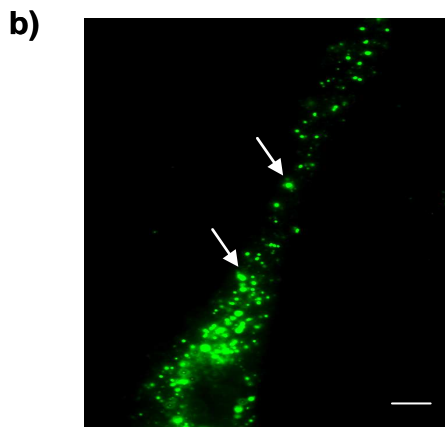
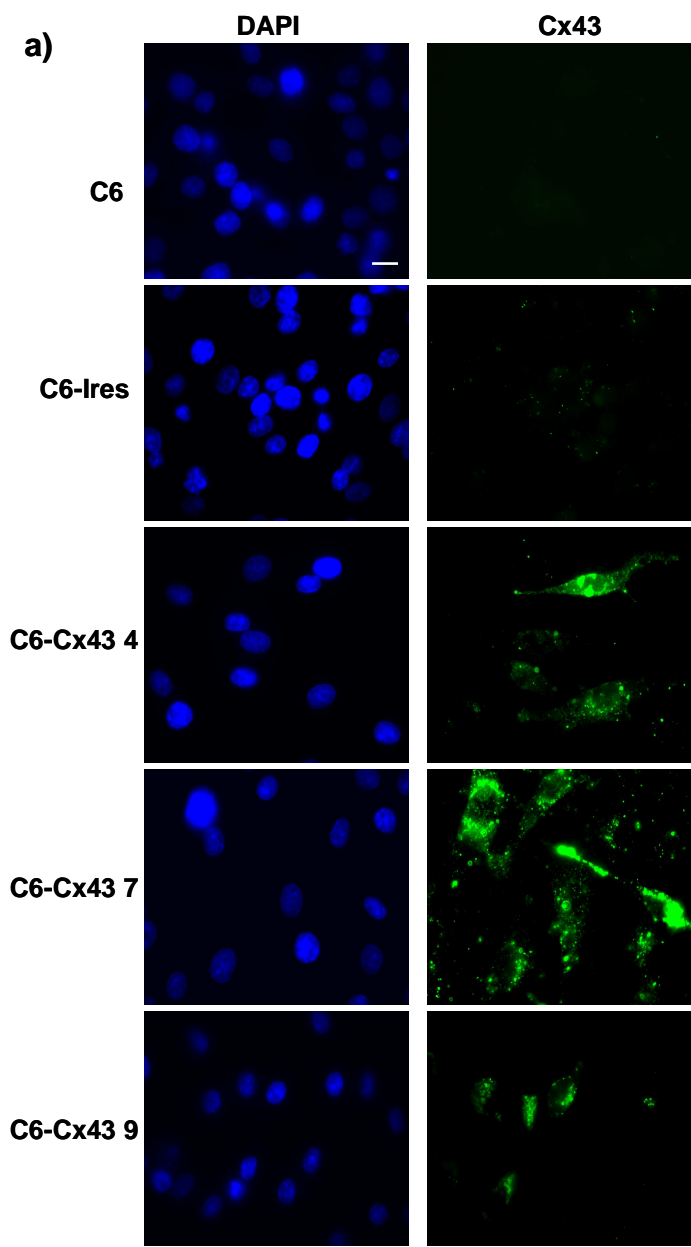


Figura 24. Localización de la conexina43 en las células de glioma C6-Cx43.

Las células de glioma C6, C6-Ires y los clones seleccionados de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se sembraron a una densidad de 15.000 células/cm². a) Inmunocitoquímica de la Cx43 y tinción de los núcleos con DAPI del mismo campo, 48 h después de la resiembra. Barra= 15 µm. b) Ampliación de una célula C6-Cx43, clon 7, donde se observa la localización de la Cx43 formando placas. Las flechas indican ejemplos de las placas formadas por la Cx43. Barra= 10 µm.

III. Estudio de la funcionalidad de la conexina43.

Una vez confirmada la correcta localización de la Cx43 en las células C6-Cx43, nos propusimos estudiar la funcionalidad de la Cx43 sobreexpresada en las células de glioma C6. Como se ha descrito previamente, la Cx43 es la proteína mayoritaria en las uniones comunicantes de los astrocitos, permitiendo la comunicación intercelular entre estas células. Para evaluar el efecto del aumento de los niveles de Cx43 en células de glioma C6 sobre la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes, una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia, se empleó la técnica conocida como *scrape loading*.

La figura 25 muestra la permeabilidad que presentan las células de glioma C6, C6-Ires y los clones elegidos de las células C6-Cx43 (4, 7, 9). Como se puede observar, en las células C6 y C6-Ires, la permeabilidad es baja puesto que, prácticamente, está restringida a la primera fila de células. Por el contrario, en las células C6-Cx43 la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes aumentó, ya que el colorante difundió desde la primera fila de células hasta las células adyacentes. De nuevo la permeabilidad fue más alta en el clon número 7.

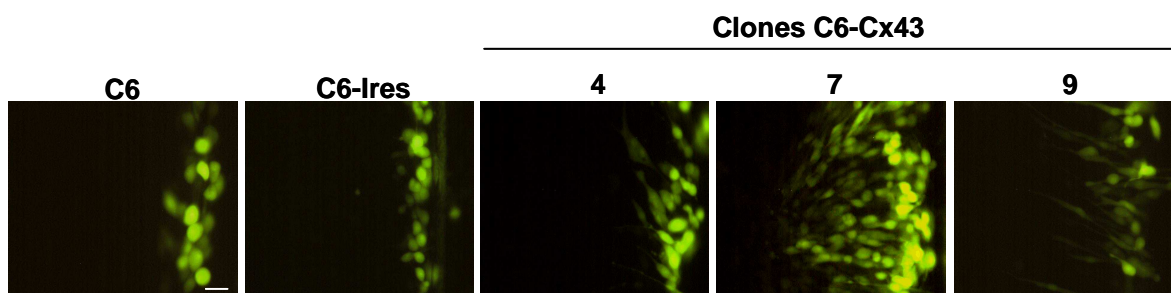


Figura 25. Permeabilidad en las células de glioma C6, C6-Ires y C6-Cx43.

Las células de glioma C6, C6-Ires y los clones seleccionados de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm². Cuando las células llegaron a la confluencia, la permeabilidad se determinó mediante la técnica del *scrape loading*, tal y como se describe en Material y Métodos. El corte para cargar el colorante se realizó en la parte derecha de las imágenes. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra= 30 µm.

IV. Estudio de la velocidad de proliferación en las células que sobreexpresan la conexina43.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la transfección de la Cx43 en las células de glioma C6 disminuye considerablemente la velocidad de proliferación de estas células (Zhu, 1992, 10218). Por ello, una vez comprobado que la Cx43 sobreexpresada en las células de glioma C6 permitía la formación de uniones comunicantes, decidimos estudiar la velocidad de proliferación en estas condiciones experimentales. Para ello, las células de glioma C6, C6-Ires y los clones elegidos de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm² y se determinó la curva de crecimiento siguiendo el número de células vivas a lo largo del tiempo analizado mediante el ensayo del MTT.

En la figura 26a se observa que las curvas de crecimiento de las células de glioma C6 y las células C6-Ires (clones 1 y 2) son prácticamente iguales. Sin embargo, la curva de crecimiento muestra que la proliferación de las células transfectadas con Cx43 (clones 4, 7 y 9) se redujo considerablemente. Así, la figura 26b muestra que en el día 5 hay un 75% menos de células vivas en el clon 4, un 85% menos en el clon 7 y un 30% menos en el clon 9, cuando se comparan con los cultivos de C6, C6-Ires 1 y C6-Ires 2.

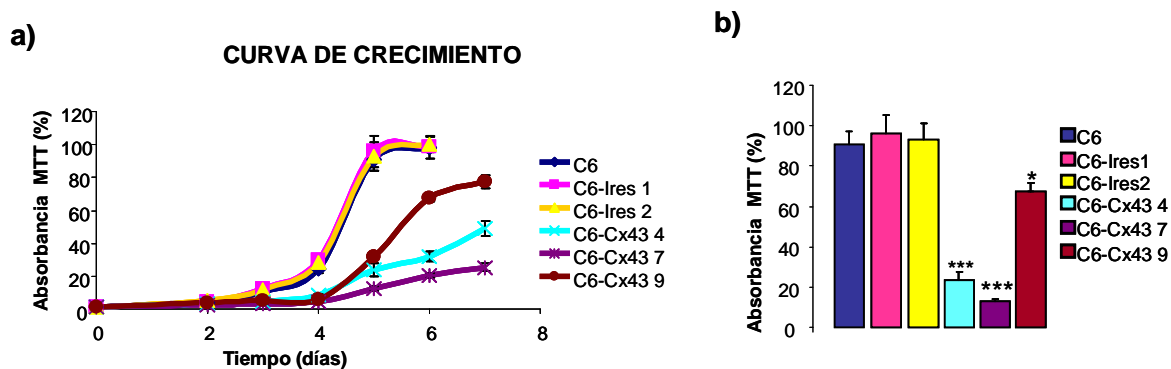


Figura 26. Velocidad de crecimiento en las células de glioma C6, C6-Ires y C6-Cx43.

Las células de glioma C6, C6-Ires (clones 1 y 2) y los clones seleccionados de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm². **a)** A partir del momento de la transfección, y durante 7 días, se hicieron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de la absorbancia encontrada respecto a la condición que mostró mayor absorbancia y son medias \pm SEM (n=9). **b)** Porcentaje de la absorbancia encontrada el 5º día después de la resiembra. La significatividad de las diferencias respecto al control (C6) se expresa como ***p < 0,001. (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test).

Para saber si el menor número de células encontradas como consecuencia de la sobreexpresión de la Cx43 se debía a un aumento de la apoptosis, se determinó el porcentaje de células anexina V positivas. La figura 27a muestra que, en todos los casos, el porcentaje de células Anexina V positivas fue muy bajo, no superando el 8% en ningún caso. No obstante, el porcentaje de células apoptóticas en los clones 4 y 7 fue significativamente superior (4 y 7%, respectivamente) al encontrado en el resto de las condiciones ensayadas. En la figura 27b se muestran imágenes de los núcleos teñidos con DAPI y la tinción de anexina V en los clones de C6-Ires, y las células C6-Cx43 7. Aunque no se observan muchas diferencias en el porcentaje de células Anexina V positivas, sí se aprecia que el número de núcleos por campo fue inferior en el clon C6-Cx43 7.

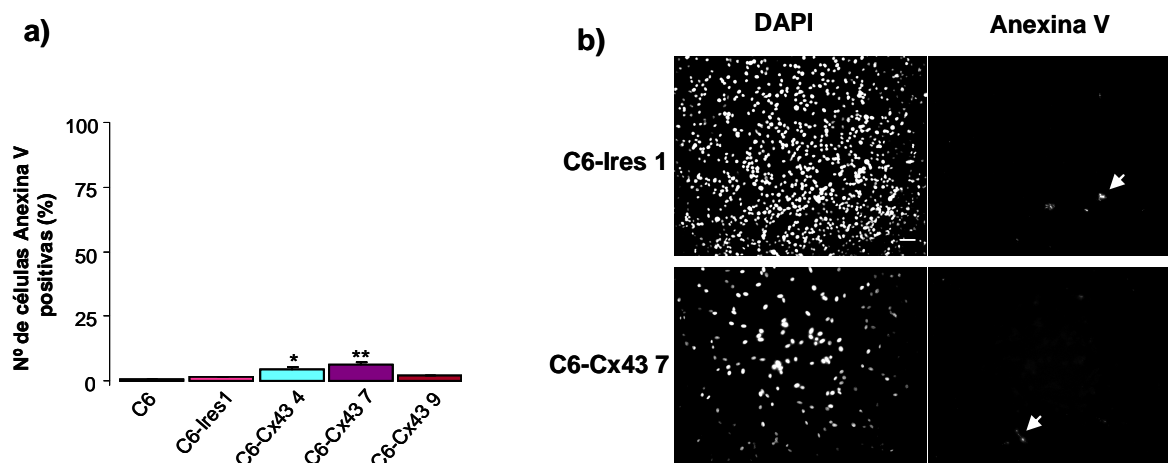


Figura 27. Apoptosis en las células de glioma C6, C6-Ires y C6-Cx43.

Las células de glioma C6, C6-Ires y los clones seleccionados de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm². Se realizó la tinción de las células con anexina V, tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Porcentaje de células anexina V positivas el día 5 después de la resiembra. Las células se tiñeron con anexina V y se cuantificó el porcentaje de células positivas con respecto al número total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias \pm SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como **p< 0,01; *p< 0,05. (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test). **b)** Fotomicrografías representativas correspondientes al día 5 de la tinción con DAPI y la tinción con anexina V para las células C6-Ires clon 1 y las células C6-Cx43 clon 7. Se indica con una flecha un ejemplo de anexina V positiva para cada condición. Barra= 50 μ m.

Para corroborar que el menor número de células C6-Cx43 vivas se debía a una disminución en la proliferación, decidimos estudiar la incorporación de BrdU en estas condiciones, tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 28a muestra que el porcentaje de células que incorporaron BrdU fue un 50% inferior en el caso de las células de glioma que sobreexpresan la Cx43, comparado con las células C6-Ires. En la figura 28b se muestra cómo el número de núcleos positivos para BrdU es mayor en las células C6-Ires que en las células C6-Cx43.

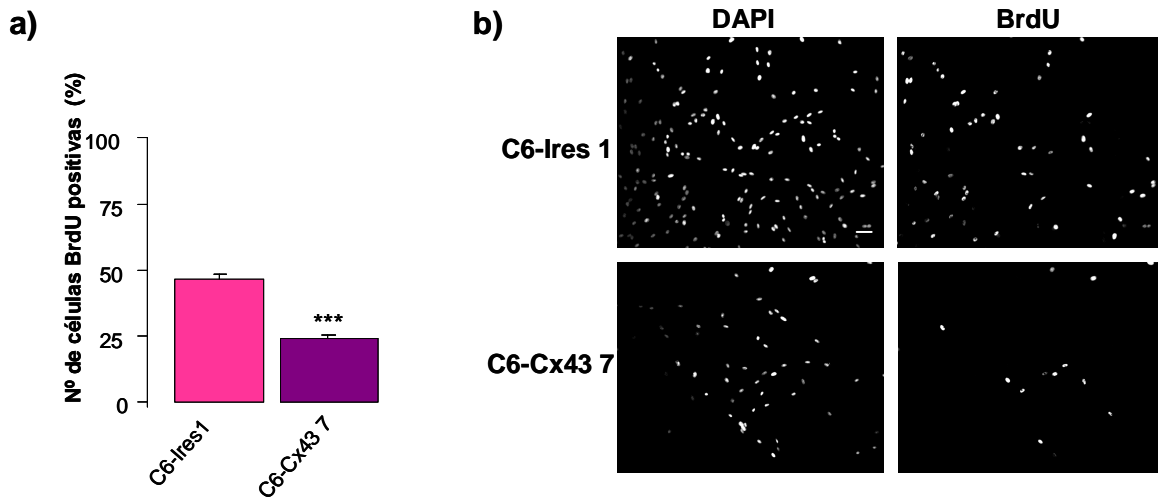


Figura 28. Incorporación de BrdU en las células de glioma C6-Ires y C6-Cx43.

Las células de glioma C6, C6-Ires y los clones seleccionados de las células C6-Cx43 (4, 7, 9) se resembraron a una densidad de 15.000 células/ cm². 48 h después de la resiembra, las células se incubaron con BrdU 10 μM durante 5 h. La incorporación de BrdU se determinó mediante inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Porcentaje de células BrdU positivas. Los resultados se expresan como número de células BrdU positivas frente al total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias ± SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como ***p< 0,001. (test *t* de Student). **b)** Fotomicrografías representativas de la tinción con DAPI y la tinción con anexina V para las células C6-Ires clon 1 y las células C6-Cx43 clon 7. Barra= 50μm.

4.2.2. Estudio de las fases del ciclo celular afectadas por la sobreexpresión de la conexina43.

Una vez puesto a punto el modelo de sobreexpresión de la conexina43 (Cx43) en células de glioma C6 y comprobado que se reducía la proliferación, decidimos estudiar qué fase del ciclo celular estaba afectada por la sobreexpresión de la Cx43.

Para ello, cuando las células llegaron a la confluencia, se resuspendieron y se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio, tal y como se describe en Material y Métodos. A continuación, se analizó el ciclo celular por citometría de flujo, tomando como muestra 20.000 células. Los resultados obtenidos se muestran como porcentajes de las células encontradas en cada fase del ciclo celular.

La figura 29 muestra la distribución de las células C6-Ires y C6-Cx43 en las diferentes fases del ciclo celular. La cuantificación de estas imágenes (Fig. 29b) muestra que, en las células C6-Cx43, el porcentaje de células en fase G0/G1 fue un 10% superior, aunque no significativo. De la misma forma se observa que la fase S y G2/M fue un 6% y un 4%, respectivamente, inferior en las células C6-Cx43. Con objeto de profundizar en este estudio decidimos sincronizar las células C6-Ires y C6-Cx43 en las fases G0/G1 y G2/M y estudiar su evolución a lo largo del ciclo celular.

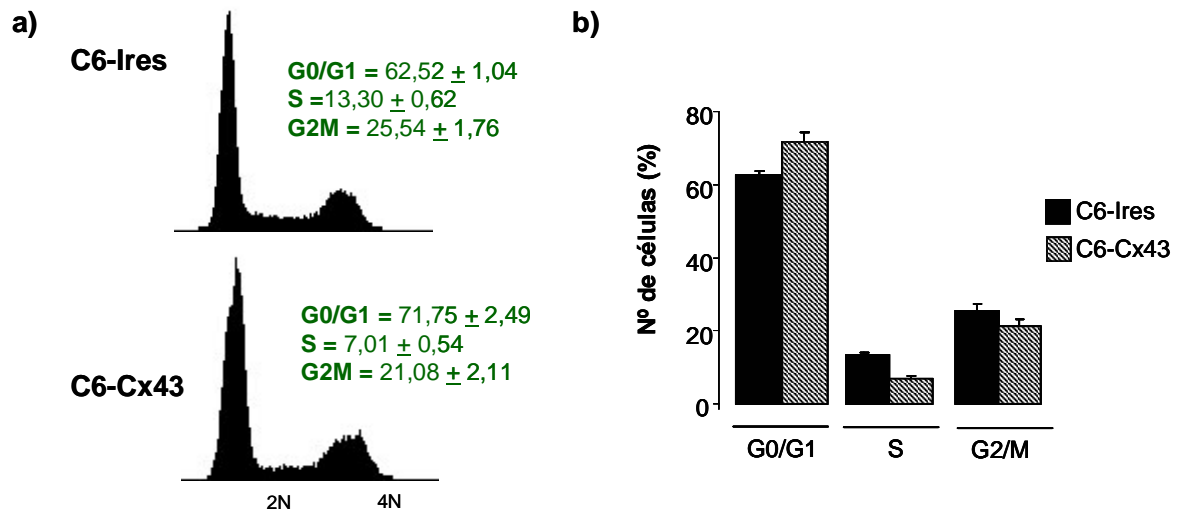


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre las diferentes fases del ciclo celular en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. **a)** Cuando las células llegaron a la confluencia se resuspendieron y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo, tomando como muestra 20.000 células. **b)** Se analizaron las áreas correspondientes a cada fase del ciclo celular mediante el programa "Paint a gate". Los resultados se expresan como porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y son medias ± SEM (n=3).

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.

La sincronización celular es un excelente sistema para examinar muchos aspectos de la proliferación celular y del metabolismo. Utilizando esta técnica se pueden abordar cuestiones como el análisis del ciclo celular, la expresión de enzimas implicadas en la replicación y la reparación del DNA, la diferenciación y la muerte celular. Para sincronizar las células existen varios compuestos que bloquean el ciclo celular en una determinada fase. Así, la timidina impide el paso de las células desde la fase G1 a la fase S. Para ello, la timidina inhibe la síntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato (Harper 2005), impidiendo la síntesis de DNA. Al igual que la timidina, la afidicolina bloquea al paso de las células desde la fase G1 a la fase S, aunque su mecanismo de acción es diferente. Este compuesto es capaz de bloquear el ciclo celular debido a su capacidad de inhibir la síntesis de DNA mediante la inhibición de las polimerasas α y δ , pero no la β y la γ (Kolman et al. 2002). Por último, otro método muy utilizado para sincronizar las células en fase G0/G1 es la retirada del suero del medio de cultivo (Guarguaglini et al. 1997; Kamei et al. 2003; Khammanit et al. 2008).

Así, hemos utilizado las tres estrategias mencionadas anteriormente para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G0/G1 del ciclo celular. La tabla 1 muestra los diferentes protocolos empleados para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G0/G1. Se observan ndicanlos porcentajes de células encontradas en cada una de las fases del ciclo celular con cada uno de los protocolos. El protocolo número 10 fue el que mostró mayor porcentaje de células en la fase G0/G1 (90,39%) y, además, mostró un menor porcentaje de células en las

fases S y G2/M, con un 2,52% y 7,09%, respectivamente, en comparación con el resto de los protocolos utilizados. De manera que la retirada del suero del medio de cultivo durante 60h fue el método elegido para sincronizar las células C6-Ires y C6-Cx43 en los posteriores estudios.

PARADA DEL CICLO CELULAR DE LAS CELULAS DE GLIOMA C6 EN LA FASE G₀G₁					
Nº	AGENTE	TIEMPO	% G₀G₁	% S	% G₂M
1	Timidina Timidina Afidicolina	15 h 15 h 15 h	72,43	7,25	20,31
2	Timidina	2 h	78,09	4,56	17,37
3	Timidina	4 h	77,05	3,09	19,86
4	Timidina	6 h	81,40	3,41	15,19
5	Timidna	15 h	83,54	3,98	12,48
6	Afidicolina	4 h	75,51	3,66	20,83
7	Afidicolina	4 h	76,64	3,31	20,05
8	Afidicolina	6 h	79,14	3,57	17,33
9	Afidicolina	15 h	84,08	5,81	10,11
10	Retirada del suero	60 h	90,39	2,52	7,09

Tabla 1. Protocolos para la puesta a punto la parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁ en las células de glioma C6.

En la columna de la izquierda se enumeran los protocolos que se han utilizado para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. Las células se trataron con timidina (10 mM) o con afidicolina (1µg/mL) durante los tiempos indicados. En el protocolo número 10 se retiró el medio de cultivo (DMEM + suero (10%)) y se añadió DMEM en ausencia de suero durante 60 h. Las células se recogieron y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo.

Una vez puesto a punto el método para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G₀/G₁, nos propusimos poner a punto un método para sincronizar estas células en la fase G₂/M. Para ello, empleamos nocodazol, compuesto utilizado ampliamente para bloquear la mitosis celular, debido a que causa la pérdida selectiva de los microtúbulos no asociados al cinetocoro (Zieve et al. 1980). La tabla 2 muestra los diferentes protocolos empleados para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G₂/M. Se indican los porcentajes de células encontradas en cada una de las fases del ciclo celular con cada uno de los protocolos. En los protocolos numerados del 1 al 11 se bloquearon las células previamente con timidina para sincronizar las células en G₀/G₁ y permitir que todas avanzaran hacia G₂/M. Sin embargo el protocolo número 12 fue el que mostró mayor porcentaje de células en la fase G₂/M (82,78%) y un menor porcentaje de células en la fase G₀/G₁, con un 10,23%. De manera que la incubación con nocodazol (100ng/mL) durante 24 h fue el método elegido para sincronizar las células C6-Ires y C6-Cx43 en los posteriores estudios.

PARADA DEL CICLO CELULAR DE LAS CELULAS DE GLIOMA C6 EN LA FASE G ₂ M						
Nº	AGENTE	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	% G ₀ G ₁	% S	% G ₂ M
1	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	15 h 15 h	69,21	9,76	21,02
2	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	18 h 15 h	73,44	8,53	18,03
3	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	15 h 16 h	67,28	10,70	22,02
4	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	18 h 16 h	70,97	6,05	22,98
5	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	15 h 17 h	58,98	7,97	33,05
6	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	18 h 17 h	71,44	7,98	20,58
7	Timidina Nocodazol	10 mM 100 ng/mL	15 h 20 h	49,38	4,27	46,35
8	Timidina Nocodazol	10 mM 200 ng/mL	15 h 20 h	48,06	5,81	46,13
9	Timidina Timidina Nocodazol	5 mM 5 mM 100 ng/mL	15 h 15 h 20 h	32,76	5,57	61,67
10	Timidina Timidina Nocodazol	10 mM 10 mM 100 ng/mL	15 h 15 h 20 h	49,76	5,53	43,71
11	Nocodazol	100 ng/mL	15 h	32,42	5,57	59,01
12	Nocodazol	100 ng/mL	24 h	10,23	6,98	82,78

Tabla 2. Protocolos para la puesta a punto la parada del ciclo celular en la fase G₂/M en las células de glioma C6.

En la columna de la izquierda se enumeran los protocolos que se han utilizado para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G₂/M del ciclo celular. Las células se trataron con timidina y/o con nocodazol a las concentraciones y durante los tiempos indicados. Las células se recogieron y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo.

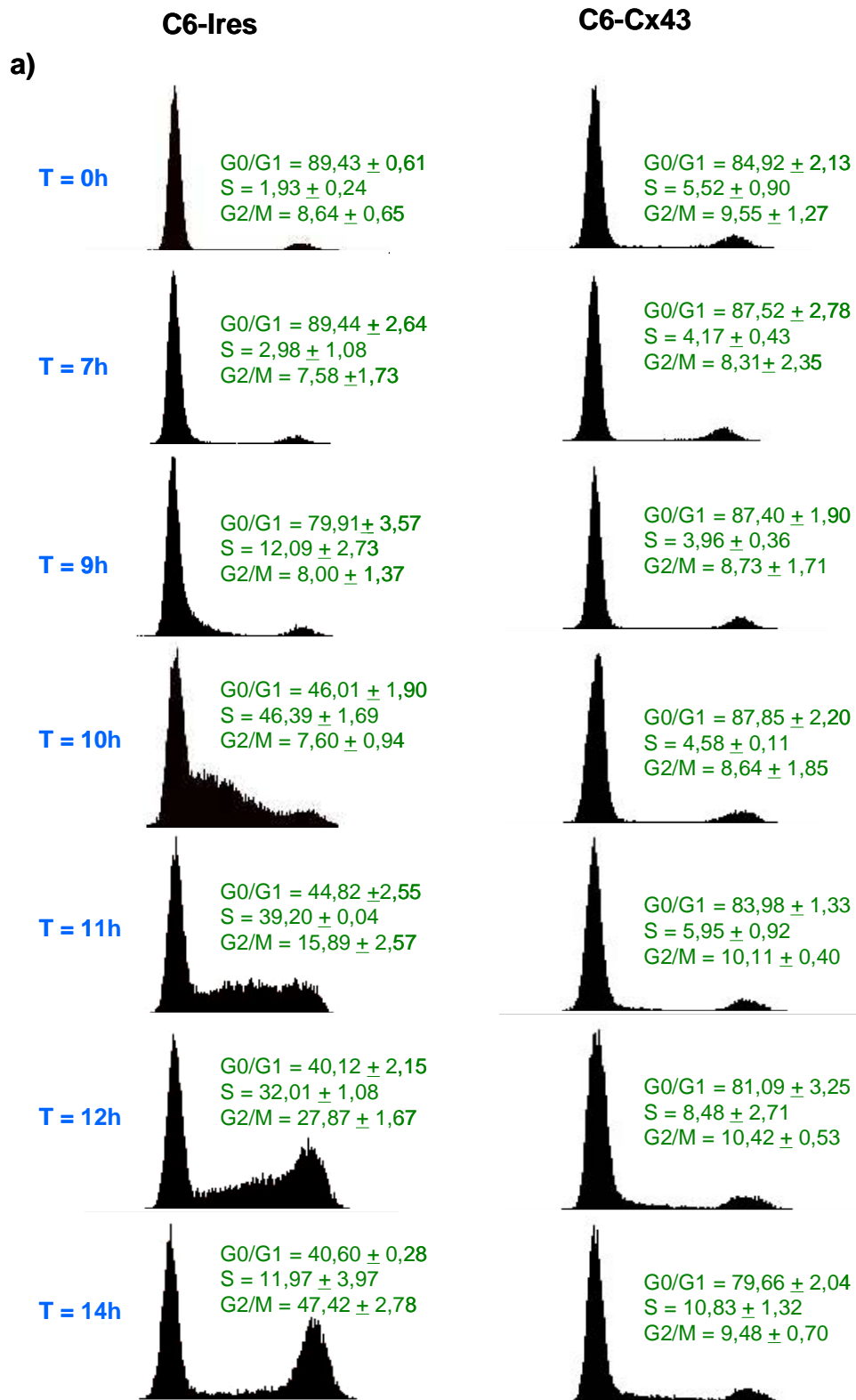
4.2.2.2. Estudio de la evolución del ciclo celular en las células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Una vez puesto a punto el método para sincronizar las células de glioma C6 en la fase G0/G1, se añadió DMEM + suero(10%) para permitir que evolucionaran a lo largo del ciclo y determinar con exactitud qué fase de éste está alterada debido a la sobreexpresión de la Cx43.

Para ello, las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron en DMEM + suero al 10%. A las 24 h se cambió el medio y se añadió DMEM sin suero. Para sincronizar las células en la fase G0/G1 (Tabla 1), las células se mantuvieron sin suero durante 60h. Este punto se consideró t=0. Posteriormente, se cambió el medio y se añadió DMEM + suero al 10%, para permitir que las células evolucionaran en las diferentes fases del ciclo. Las células se recogieron cada hora durante 34 h después de la adición de suero y se examinó el ciclo celular por citometría de flujo.

La figura 30 muestra la evolución del ciclo celular de las células C6-Ires y C6-Cx43, tras la sincronización en la fase G0/G1. En primer lugar, en la figura 30a se observa que a tiempo 0h se observa que había un 90% y un 85% de células C6-Ires y de células C6-Cx43, respectivamente, sincronizadas en la fase G0/G1. 9 h después de añadir el suero, las células C6-Ires comenzaron a entrar en fase S, encontrándose a las 10 h el máximo porcentaje de células C6-Ires en la fase S (46,39%). Entre las 12 y 14 h se observa cómo las células C6-Ires pasaban desde la fase S a la fase G2/M y cómo, a las 14 h se encontró el máximo porcentaje de células C6-Ires en la fase G2/M (47,42%). A partir de las 16 h las células C6-Ires completan el ciclo, ya que comenzaba a aumentar el porcentaje de células en las fases G0/G1 (Fig. 30b).

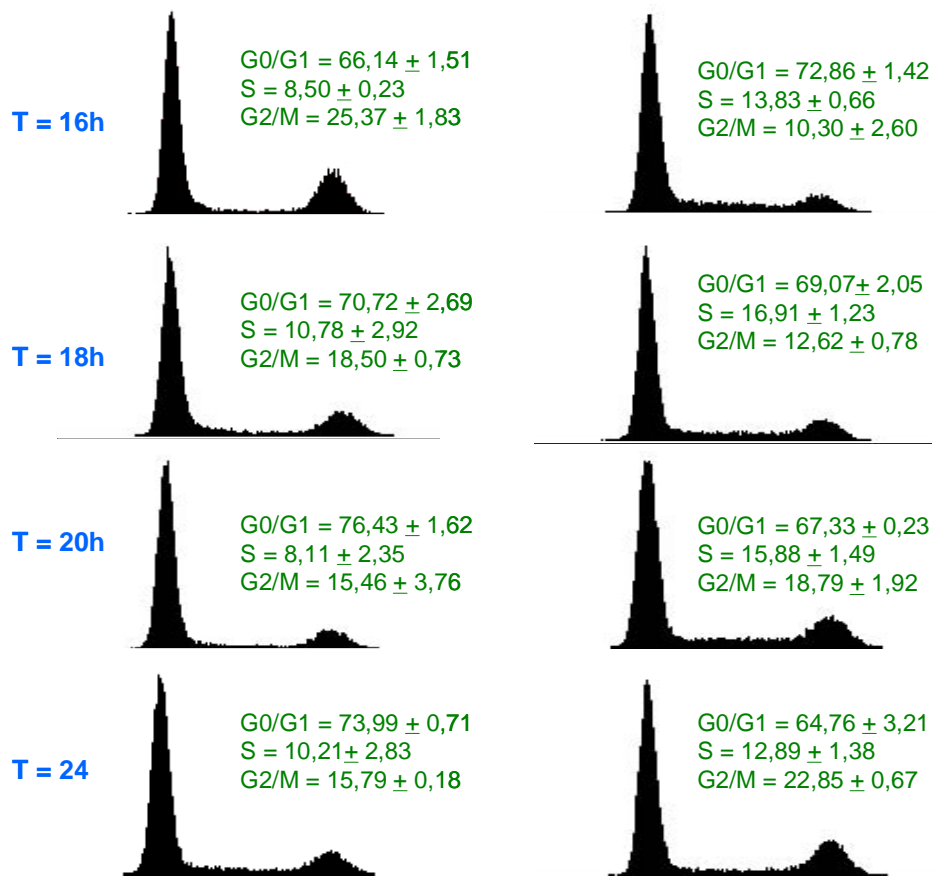
Sin embargo, en las células que sobreexpresan Cx43 no se observaron cambios significativos hasta las 12 h. A partir de ese momento, un pequeño porcentaje de células C6-Cx43 comenzó a pasar desde la fase G0/G1 a la fase S (Fig. 30a), encontrándose a las 18 h un 16,91% de células en la fase S (Fig. 30b). Entre las 18 y 24 h, el porcentaje de células en la fase G2/M aumentó hasta llegar a un 22,85%, aproximadamente, siendo éste el porcentaje máximo encontrado en la fase G2/M a lo largo del ciclo celular en las células C6-Cx43. La figura 30c muestra la evolución del ciclo en las células C6-Cx43 entre las 28 y las 34 h, observándose que el porcentaje de células en la fase G2/M disminuyó en favor del aumento del de la fase G0/G1.



b)

C6-Ires

C6-Cx43



c)

C6-Cx43

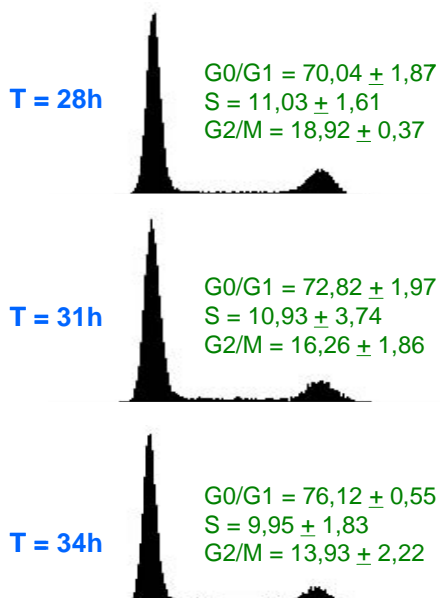


Figura 30. Sincronización del ciclo celular en la fase G0/G1 en las células C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se paró el ciclo celular en las fases G0/G1, retirando el suero del medio de cultivo. Después de 60 h se volvió a añadir FCS al 10%. Las células se resuspendieron y se analizó el ciclo celular cada hora durante 34 h. **a)** Evolución del ciclo celular de las células C6-Ires y C6-Cx43 durante 14 h. **b)** Evolución del ciclo celular de las células C6-Ires y C6-Cx43 entre las 16 y las 24 h. **c)** Evolución del ciclo celular de las células C6-Cx43 entre las 28 y 34h.

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

Una vez estudiadas las diferencias en la evolución del ciclo celular entre las células C6-Ires y C6-Cx43 tras la sincronización en la fase G0/G1, decidimos sincronizar las células en la fase G2/M, para determinar si las células que sobreexpresan Cx43 presentan diferencias en la transición de la fase G2/M a la fase G0/G1.

Una vez puesto a punto el método para la sincronización de las células C6 en la fase G2/M (Tabla 2), cuando las células llegaron al 70% de confluencia se incubaron en presencia de nocodazol (100ng/mL) durante 24h. Pasado este tiempo, se retiró el nocodazol y se recogieron las células cada 2 horas y durante 10h, para analizar el ciclo celular por citometría de flujo.

La figura 31 muestra la evolución del ciclo celular de las células C6-Ires y C6-Cx43 después de la sincronización en la fase G2/M del ciclo celular. En primer lugar se observa que tras el proceso de sincronización con nocodazol había un 81,83% y 68,68% de células C6-Ires y C6-Cx43, respectivamente, sincronizadas en la fase G2/M. Después de 2 h el porcentaje de células que salen de G2/M fue del 6% y del 11% en las células C6-Ires y C6-Cx43, respectivamente. Entre las 2 y las 4 h abandonaron la fase G2/M un 2% de células, tanto C6-Ires como C6-Cx43. A las 6h salieron un 2% y un 5% de células C6-Ires y C6-Cx43, respectivamente. Entre las 6 y 8 h pasaron de G2/M a G0/G1 un 2% de células C6-Ires, mientras que de C6-Cx43 no salieron apenas células. Finalmente, entre las 8 y 10 h después de la retirada del nocodazol, salieron de G2/M un 4% y un 6% de C6-Ires y C6-Cx43, respectivamente, habiendo pasado de la fase G2/M a la fase G0/G1 un 15% de C6-Ires y un 24% de C6-Cx43 en 10 h. Es necesario mencionar que mientras que las células C6-Ires se van acumulando en la fase S progresivamente, en las células C6-Cx43, la fase S se mantiene estable a lo largo de las 10 horas analizadas.

C6-Ires 1

C6-CX43 7

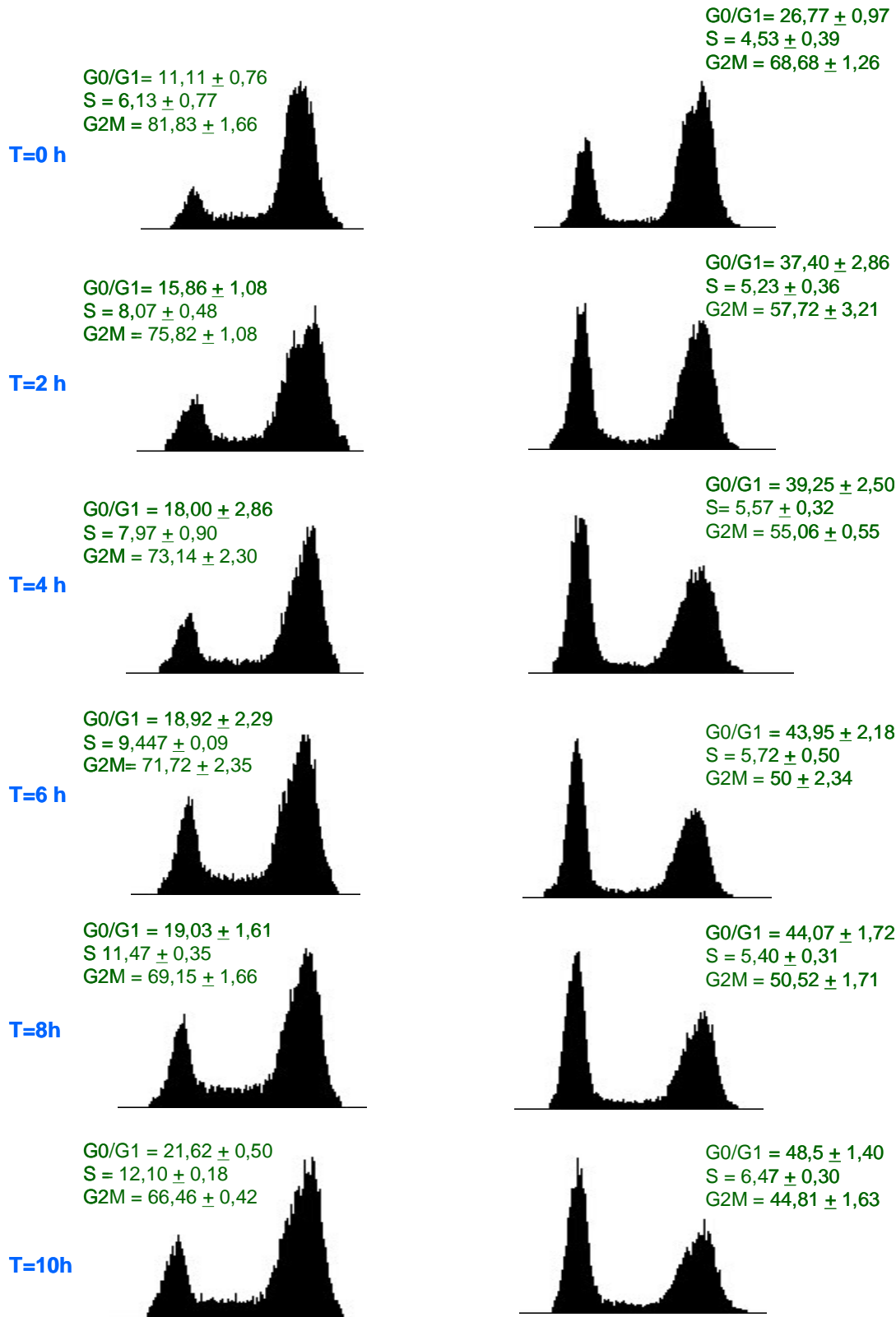


Figura 31. Sincronización del ciclo celular en la fase G2/M en las células C6-Ires y C6-Cx43.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron al 70% de confluencia se incubaron en presencia de nocodazol (100 ng/mL) durante 24 h. Posteriormente, se hicieron varios lavados con PBS y se añadió DMEM + suero (10%). Las células se resuspendieron y se analizó el ciclo cada 2 h durante 10 h.

4.2.3. Modificaciones de la Conexina43 durante las fases del ciclo celular.

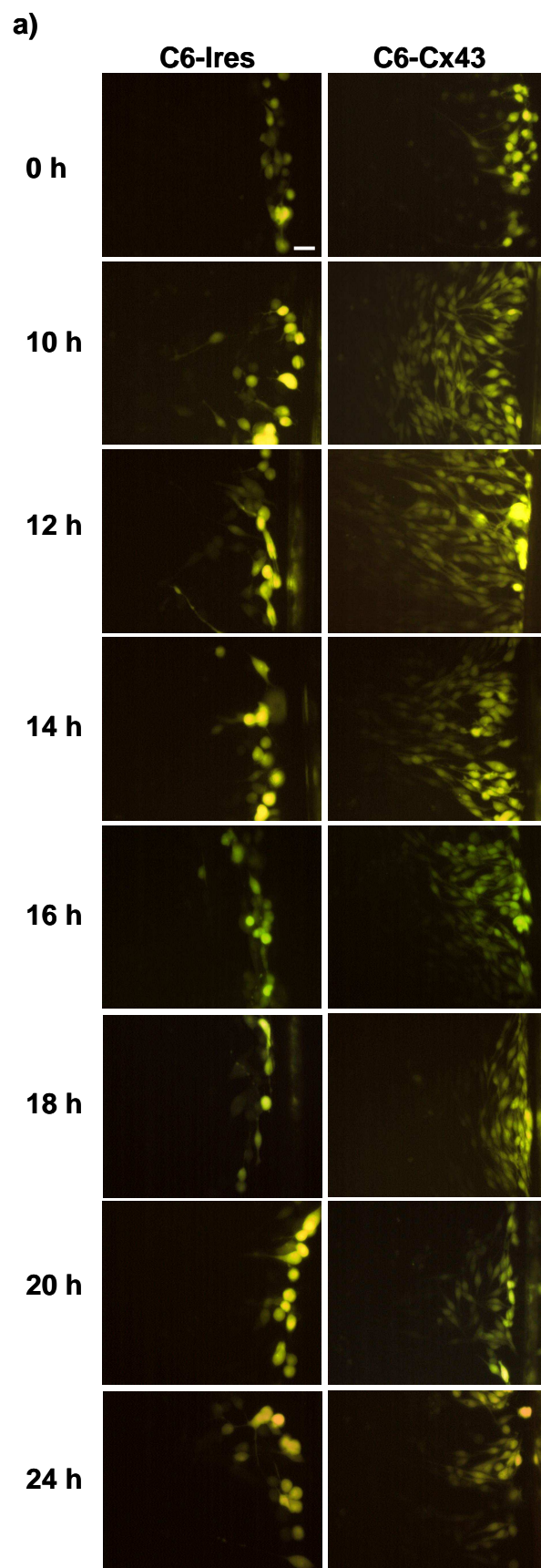
Como ya se ha descrito en la Introducción (apartado 1.1.7), la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes, los niveles de expresión y fosforilación de la conexina43 (Cx43) y la localización de esta proteína varían durante las diferentes fases del ciclo celular (Para revisión, véase: Solan and Lampe 2009). Dado que estos datos se refieren a la Cx43 expresada endógenamente en diferentes tipos celulares, nos propusimos investigar si en nuestro modelo de sobreexpresión de la Cx43 en las células de glioma, esta proteína se modifica durante el ciclo celular de forma similar a la Cx43 expresada de manera endógena.

4.2.3.1. Modificación de la permeabilidad intercelular durante el ciclo celular.

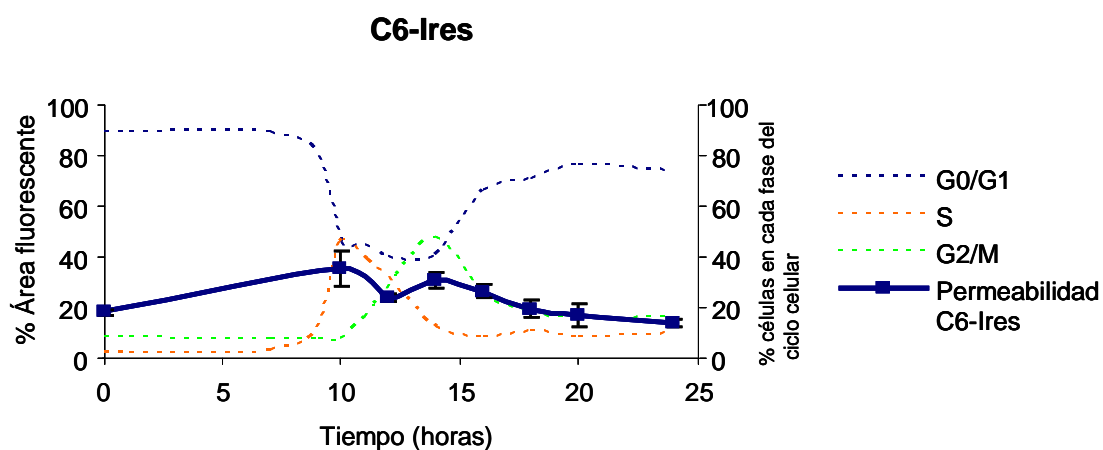
Se ha descrito que la permeabilidad intercelular debida a la comunicación a través de las uniones comunicantes se modifica en las diferentes fases del ciclo celular, sugiriendo que las funciones de las uniones comunicantes están reguladas por el ciclo celular (Solan and Lampe 2005; Soo et al. 1997).

Con objeto de conocer si la permeabilidad intercelular a través de las uniones comunicantes varía a lo largo de las fases del ciclo celular en nuestro modelo de sobreexpresión de Cx43, las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Posteriormente, se añadió DMEM más suero al 10% y se determinó la permeabilidad a diferentes tiempos mediante *scrape loading*, tal y como se describe en Material y Métodos. En la figura 32a se observa cómo en las células de C6-Ires la permeabilidad era muy reducida y apenas variaba a lo largo del ciclo celular, mientras que en las células que sobreexpresaban la Cx43 la permeabilidad aumentó a las 10h y volvió a disminuir a las 14h, siendo cada vez menor en los tiempos sucesivos. La figura 32b muestra la cuantificación de la permeabilidad en las células C6-Ires (línea azul continua) y la evolución de las distintas fases del ciclo celular (líneas discontinuas), observándose un ligero incremento de la permeabilidad a las 10h coincidiendo con el aumento de la fase S, y una ligera disminución a las 12h, coincidiendo con la disminución del porcentaje de células en fase S. La figura 32c muestra la cuantificación de la permeabilidad en las células C6-Cx43 (línea rosa continua) y la evolución de las distintas fases del ciclo celular (líneas discontinuas) en estas células. Se observa un aumento de la permeabilidad desde las 0h hasta las 12 h del 75%, aproximadamente y, a continuación esta

permeabilidad disminuyó un 60%, aproximadamente. Esta disminución de la permeabilidad coincide con el ligero aumento de la fase S y la ligera disminución de la fase G0/G1.



b)



c)

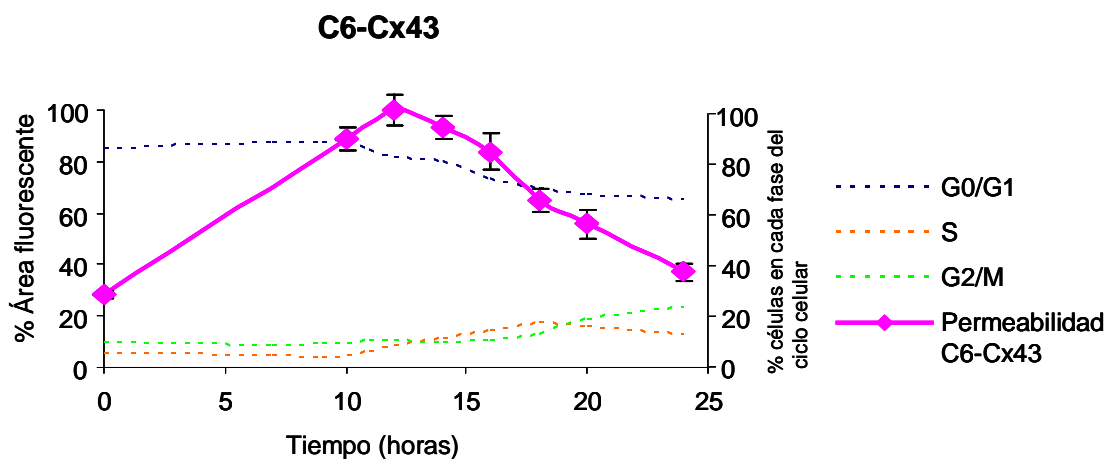


Figura 32. Evolución de la permeabilidad a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1, se añadió DMEM + suero (10%) y se determinó la permeabilidad mediante “scrape loading” a diferentes tiempos. a) Fotomicrografías mostrando la difusión del colorante. El corte para cargar el colorante se realizó en la parte derecha de las imágenes. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra= 30 μ m. b) Cuantificación del área de fluorescencia en las células C6-Ires (línea azul continua). Se muestra la evolución de las diferentes fases del ciclo celular (líneas discontinuas). c) Cuantificación del área de fluorescencia en las células C6-Cx43 (línea rosa continua). Se muestra la evolución de las diferentes fases del ciclo (líneas discontinuas). Los resultados de la permeabilidad se expresan como porcentaje respecto al valor más alto encontrado y son medias \pm SEM (n=3).

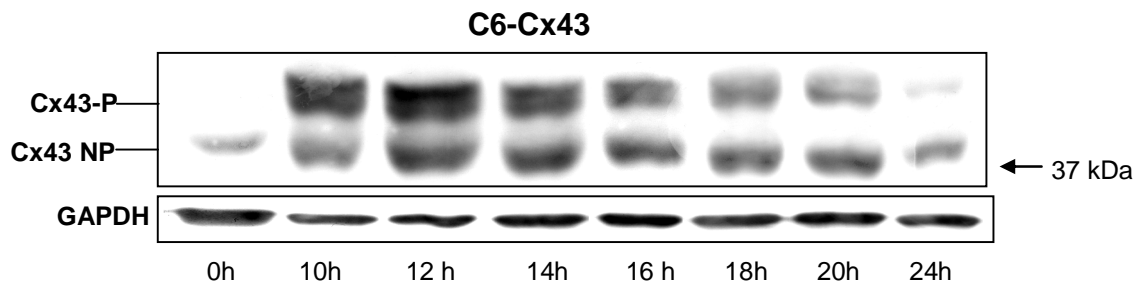
4.2.3.2. Modificación de la expresión y fosforilación de la Cx43 durante el ciclo celular.

Estudios realizados en varios tipos celulares en las diferentes fases del ciclo celular indican que los niveles de fosforilación de la Cx43 aumentan durante el paso de la fase G0/G1 a la fase S y durante la mitosis debido a la fosforilación de la Cx43 por diferentes kinasas (Kanemitsu et al. 1998; Koo et al. 1997; Lampe et al. 1998; Lampe et al. 2000).

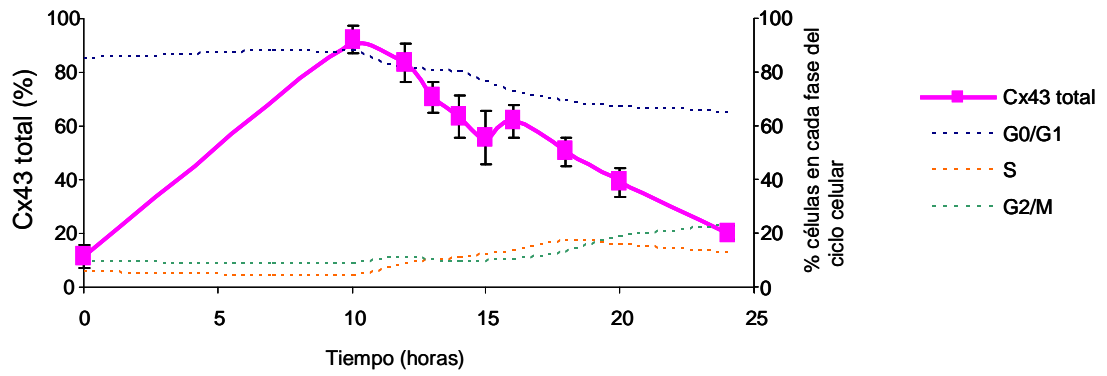
Una vez conocido que la permeabilidad intercelular en las células C6-Ires y, sobre todo en las células C6-Cx43, varía a lo largo del ciclo, quisimos conocer si la expresión y la fosforilación de la Cx43 en estas células también se modificaban. Para ello, las células C6-Ires y las células C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Se añadió DMEM más suero al 10%, se recogieron las proteínas a diferentes tiempos y se determinó la expresión de la Cx43 mediante un análisis de transferencia tipo Western. La expresión de la Cx43 en las células C6-Ires no se muestra ya que fue muy baja y no se modificó a lo largo del ciclo celular. El Western blot de la Cx43 en las células C6-Cx43 muestra la banda correspondiente a la Cx43 no fosforilada (Cx43-NP) y un conjunto de bandas con una velocidad de migración menor debido a la fosforilación, denominadas en su conjunto Cx43-P (Fig. 33a). Se cuantificaron las bandas correspondientes a la Cx43 NP y a las bandas correspondientes a la Cx43 fosforilada denominada Cx43-P. La figura 33b muestra que la expresión de la Cx43 aumentó aproximadamente desde las 0h hasta las 10h un 70%, y que a continuación comenzó a disminuir. Esta disminución coincide con una ligera disminución del número de células en la fase G0/G1 y un ligero aumento de las que están en la fase S. La fosforilación de la Cx43-P aumentó un 60%, aproximadamente, desde las 0h hasta las 10h y, a continuación bajó hasta las 24h, coincidiendo con una ligera disminución del porcentaje de células en la fase G0/G1 y un ligero aumento de la fase S (Fig. 33c). La figura 33d muestra que la Cx43-NP aumentó desde las 0h hasta las 10h un 30%, aproximadamente, y se mantuvo en el tiempo hasta las 18h, momento en el que comenzó a bajar.

En la figura 33e se representa la relación Cx43-P frente a la Cx43-NP y se observa que esta relación aumentó desde las 0h hasta las 10h y comenzó a disminuir a partir de este punto, coincidiendo con la ligera disminución de la fase G0/G1. A partir de las 13 h esta relación Cx43-P/Cx43-NP se mantuvo más o menos estable.

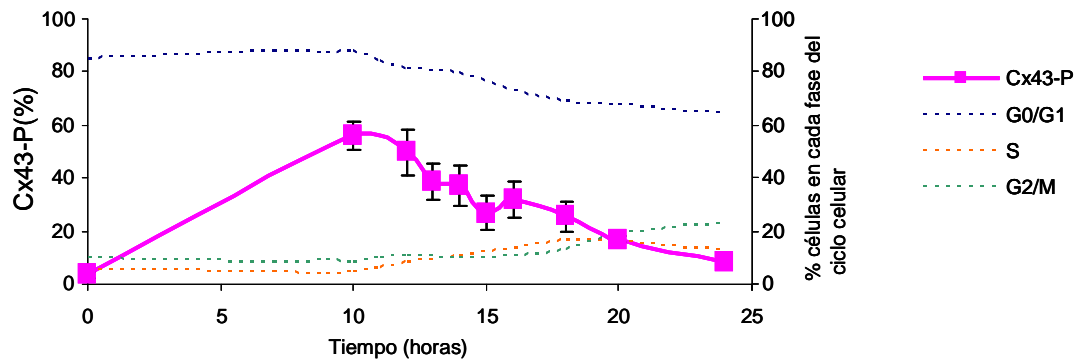
a)



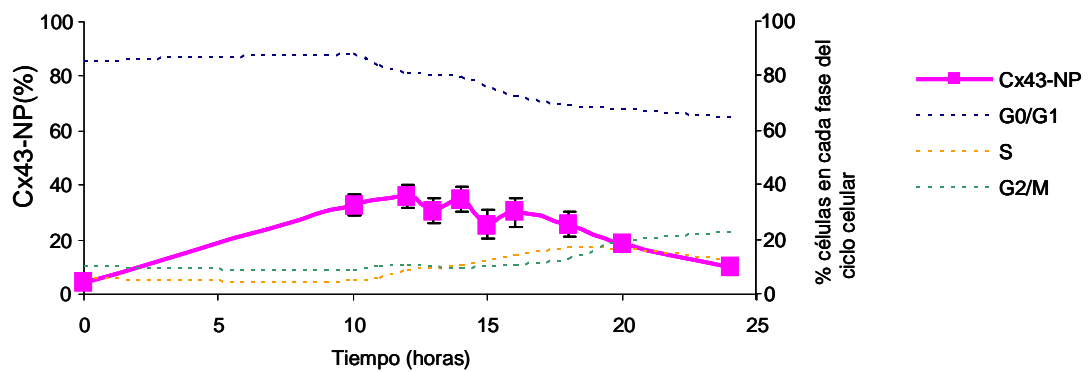
b)



c)



d)



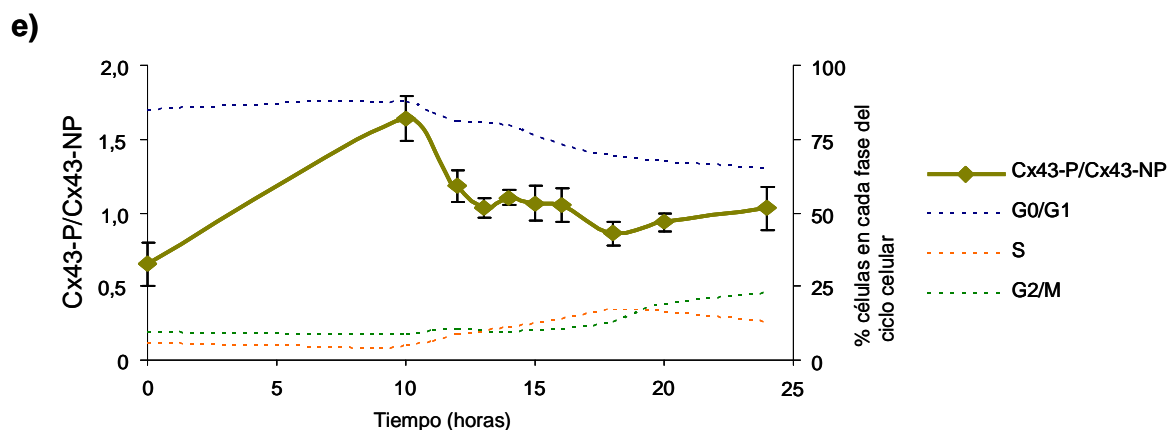


Figura 33. Evolución de la expresión de la Cx43 a lo largo del ciclo celular en células C6-Cx43 sincronizadas en G0/G1.

Las células C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de la Cx43 mediante análisis de transferencia tipo Western a diferentes tiempos. **a)** Western blot de la Cx43 y GAPDH. El Western blot de la Cx43 muestra una banda correspondiente a la Cx43 no fosforilada (Cx43-NP) y dos bandas correspondientes a la Cx43 fosforilada, C43-P1 y Cx43-P2 (Cx43-P). Las películas se escanearon y se cuantificaron las diferentes bandas. **b)** Los valores de la Cx43 total se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de Cx43 total (línea rosa continua) y son medias \pm SEM (n=7). **c)** Los valores de la Cx43 fosforilada (Cx43-P) se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de Cx43 total (línea rosa continua) y son medias \pm SEM (n=7). **d)** Los valores de la Cx43 no fosforilada (Cx43-NP) se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de Cx43 total (línea rosa continua) y son medias \pm SEM (n=7). **e)** Relación entre la evolución de la Cx43-P y la Cx43-NP (línea verde continua). En todas las imágenes se muestra la evolución de las diferentes fases del ciclo celular (líneas discontinuas).

4.2.3.3. Modificación de la localización de la Cx43 durante el ciclo celular.

En trabajos previos se ha mostrado que durante la fase G0/G1, la Cx43 se encuentra predominantemente en la membrana plasmática, formando las placas características de las uniones comunicantes. A medida que las células progresan en el ciclo celular hacia la fase S, la presencia de uniones comunicantes en la membrana celular disminuye (Solan et al. 2003) y aumenta la Cx43 en el citoplasma (Lampe et al. 2000). Finalmente, durante la mitosis, la Cx43, se localiza principalmente en el citoplasma, donde aparece formando vesículas (Lampe et al. 1998; Xie et al. 1997) reduciéndose la comunicación a través de las uniones comunicantes (Stein et al. 1992).

Nuestro siguiente objetivo fue conocer si en nuestro modelo de sobreexpresión, la Cx43 también cambiaba de localización durante el ciclo celular. Para ello, las células C6-Ires y las células C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Se añadió DMEM más suero al 10% y se fijaron las células a diferentes tiempos con paraformaldehído al 4% (p/v). La localización de la Cx43 se analizó mediante inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 34a muestra la localización de la Cx43 en las células C6-Ires, observándose una leve señal predominantemente en el núcleo, en todos los tiempos analizados.

C6-Ires

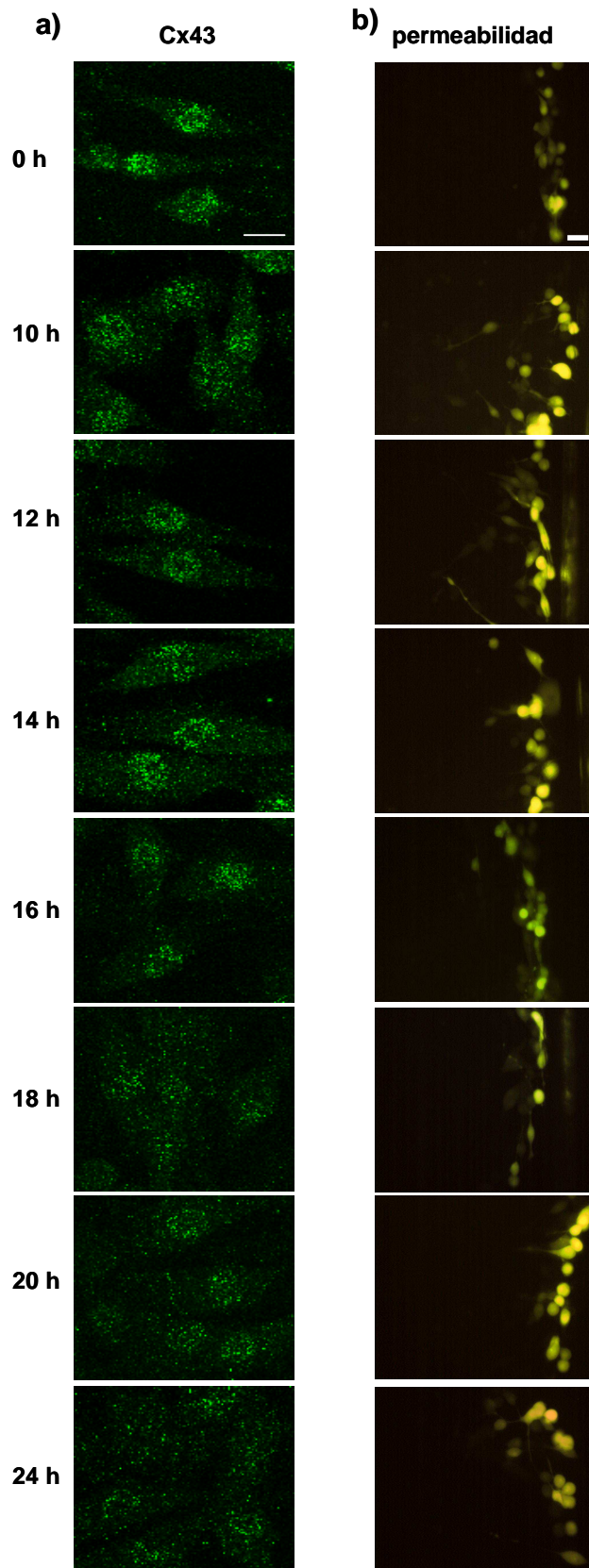


Figura 34. Localización de la Cx43 en células C6-Ires

Las células C6-Ires se sincronizaron en las fases G0/G1, y, entonces, se añadió DMEM + suero (10%). **a)** Inmunocitoquímica de la Cx43 a diferentes tiempos. Barra= 10 μm . **b)** Se muestra la permeabilidad a través de las uniones comunicantes a estos mismos tiempos. Barra= 30 μm

La figura 35a muestra la localización de la Cx43 en las células C6-Cx43. Se observa que los niveles de Cx43 a tiempo 0 eran muy bajos, encontrándose mayoritariamente en el núcleo. A las 10 y 12h se produjo un fuerte aumento de los niveles de Cx43, localizados predominantemente en la membrana plasmática, formando las placas características de las uniones comunicantes, como se indica con las flechas blancas. Este fuerte aumento de la Cx43 y su localización en la membrana plasmática coincide con un fuerte aumento en la permeabilidad celular, como se observa en la figura 35b, y con la ligera disminución de la fase G0/G1 y el aumento de la fase S. Desde las 14h, la Cx43, aunque también se encuentra en placas en la membrana plasmática, comienza a internalizarse y se aprecia claramente en el interior de la célula. A las 24h, la expresión de la Cx43 disminuyó notablemente.

C6-Cx43

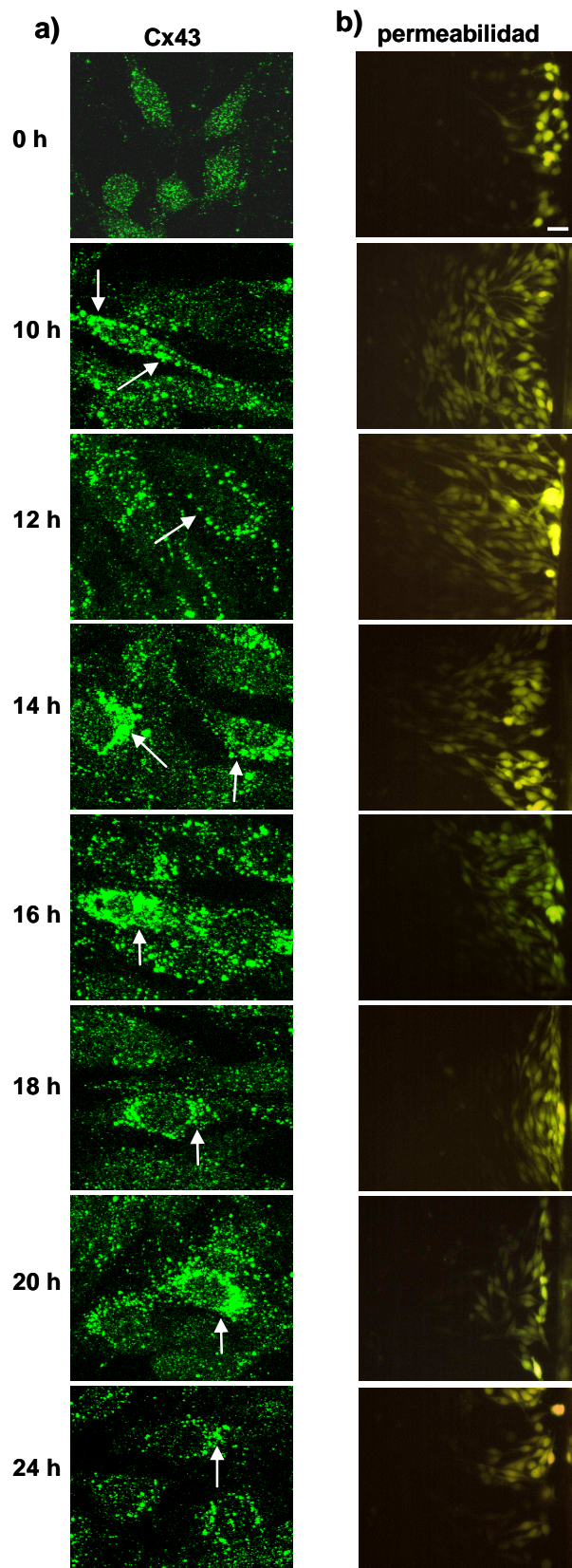


Figura 35. Localización de la Cx43 en células C6-Cx43

Las células C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1, y se añadió DMEM + suero (10%). **a)** Inmunocitoquímica de la Cx43 a diferentes tiempos. Barra= 10 μ m. **b)** Se muestra la permeabilidad a través de las uniones comunicantes a estos mismos tiempos. Barra= 30 μ m.

4.2.4. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular en células de glioma C6.

Algunos trabajos previos indican que la sobreexpresión de la conexina43 (Cx43) está asociada con cambios en las proteínas reguladoras del ciclo celular, provocando un aumento en la expresión de p27 (Zhang et al. 2001). Así mismo se produce una disminución en la expresión de Skp2, una proteína que regula la degradación de p27 (Zhang et al. 2003b) y un aumento de la ciclina D1 (Chen et al. 1995; Koffler et al. 2000), así como una acumulación de la proteína del retinoblastoma (pRb) hiposfosforilada (Zhang et al. 2001). Por otro lado, la disminución de la Cx43 provoca cambios en la expresión de las ciclinas D1 y D3 en astrocitos (ver Fig. 11) y un aumento en la fosforilación de la serina 780 del pRb (ver Fig. 5 y 10b) (Herrero-Gonzalez et al. 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y una vez conocido que las células que sobreexpresan la Cx43 tienen dificultades en el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S, nos planteamos como objetivo conocer si existían cambios en las moléculas reguladoras del ciclo celular responsables del paso de la fase G0/G1 a la fase S en las células de glioma C6 que sobreexpresan la Cx43.

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.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las ciclinas D1 y D3 se expresan en una gran variedad de células y son, junto con las A, E y B, las principales ciclinas responsables de la progresión del ciclo celular. Las ciclinas D1 y D3 se expresan durante la fase G1 temprana del ciclo celular, donde las células se preparan para iniciar la síntesis del DNA, mientras que la ciclina E tiene su pico de expresión en el inicio de la síntesis del DNA (Para revisión, véase: Malumbres and Barbacid 2009). Dado que nuestros resultados muestran que las células C6-Cx43 tienen dificultades en el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S, quisimos conocer la expresión de las ciclinas D1, D3 y E en estas células.

Para ello, se recogieron proteínas de las células C6-lres y C6-Cx43 y se analizó la expresión de las ciclinas D1, D3 y E. Además, se analizó la expresión de estas proteínas en las

diferentes fases del ciclo celular. Para ello, las células C6-Ires y las células C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Se añadió DMEM más suero al 10%, se recogieron las proteínas a diferentes tiempos y se determinó la expresión de las ciclinas D1, D3 y E mediante un análisis de transferencia tipo Western.

Las figuras 36a y 36b muestran la expresión de la ciclina D1 en células C6-Ires y C6-Cx43 asincrónicas, observándose que la expresión de esta proteína está aumentada un 75%, aproximadamente, en las células que sobreexpresan la Cx43. La figura 37a muestra el Western blot de la ciclina D1 a diferentes tiempos, después de la sincronización en G0/G1. A continuación se cuantificaron las bandas y se expresaron como porcentaje de la expresión más alta de ciclina D1 (C6-Cx43, 18h). En la figura 37b se observa que la expresión de la ciclina D1 en células C6-Ires era muy baja a tiempo 0 y aumentó hasta alcanzar el 70%, aproximadamente a las 10h, coincidiendo con la entrada de las células en fase S. Posteriormente bajó ligeramente, al entrar las células en la fase G2/M.

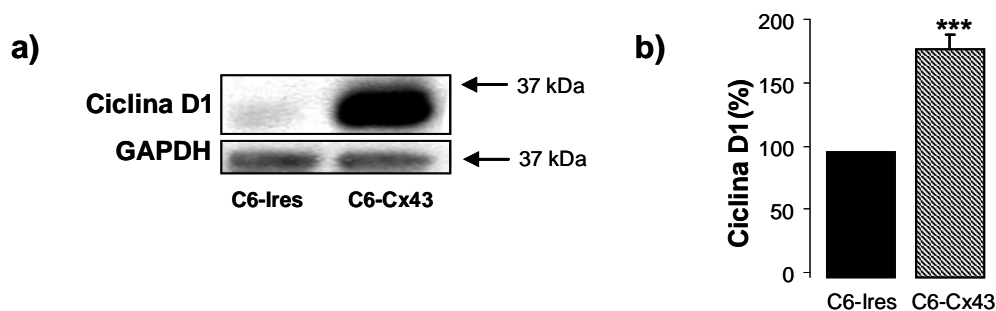


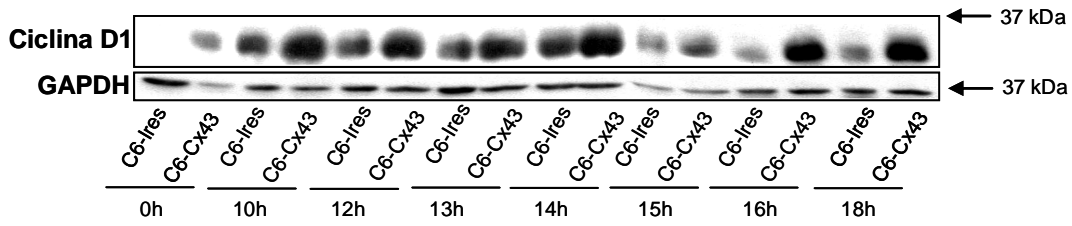
Figura 36. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de la ciclina D1 en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de la ciclina D1 mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina D1 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D1 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** p < 0,001 (test t de Student).

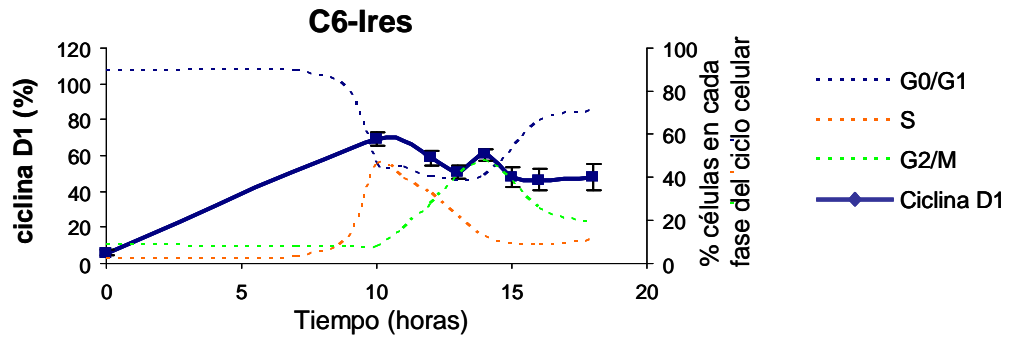
La figura 37c muestra que la expresión de la ciclina D1 en las células C6-Cx43 fue del 85%, aproximadamente, a tiempo 0 y, aunque sufrió algunas fluctuaciones a lo largo del ciclo, se mantuvo en los valores iniciales, aumentando ligeramente en el tiempo 18, coincidiendo con el mayor porcentaje de células C6-Cx43 en la fase S.

Al comparar los cambios de expresión de la ciclina D1 en las células C6-Ires y C6-Cx43 a lo largo del tiempo (Fig. 37d), observamos que, a pesar de que en las células C6-Ires la ciclina D1 aumentó a lo largo del ciclo, la expresión de esta proteína siempre fue más alta en las células C6-Cx43.

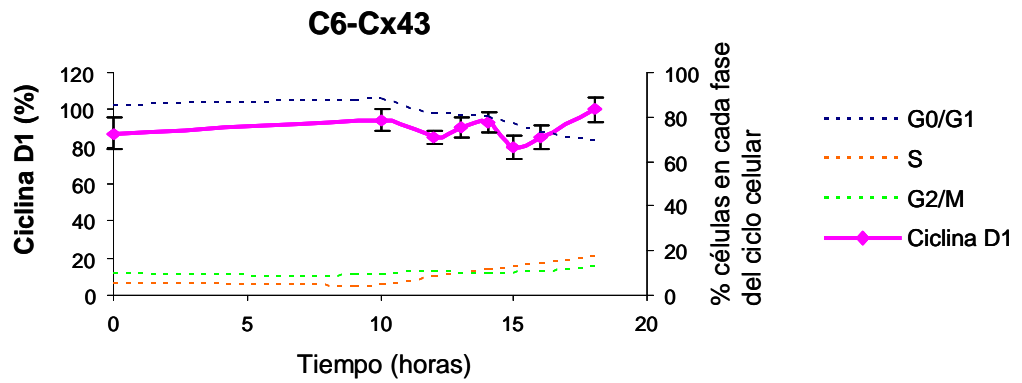
a)



b)



c)



d)

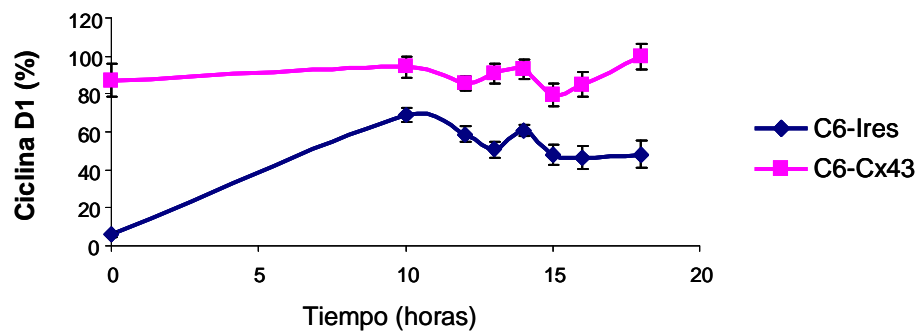


Figura 37. Expresión de la ciclina D1 a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de la ciclina D1 a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina D1 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D1 (línea azul continua) en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina D1 (C6-Cx43, 18h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de la ciclina D1 (línea rosa continua) en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina D1 (C6-Cx43, 18h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de la ciclina D1 en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

El Western blot y la cuantificación de la ciclina D3 (Fig. 38a y 38b) en células C6-Ires y C6-Cx43 asíncronas, muestran que la expresión de esta proteína fue dos veces mayor en las células C6-Cx43 que en las células C6-Ires (Fig. 38b). La figura 39a muestra el Western blot de la ciclina D3 en las células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en G0/G1. Se cuantificaron las bandas y los resultados se expresaron como porcentaje de la expresión más alta de ciclina D3 (C6-Cx43, 16h). La figura 39b muestra los cambios de expresión de la ciclina D3 en las células C6-Ires a lo largo del tiempo, indicando que la expresión de esta ciclina aumentó hasta el 80%, aproximadamente, entre las 0 y 10h, coincidiendo a la hora 10 con la disminución de la fase G0/G1 y el aumento de la fase S. La expresión de la ciclina D3 se mantuvo hasta las 15 horas y, finalmente, su expresión bajó a la vez que bajó el porcentaje de células en la fase G2/M.

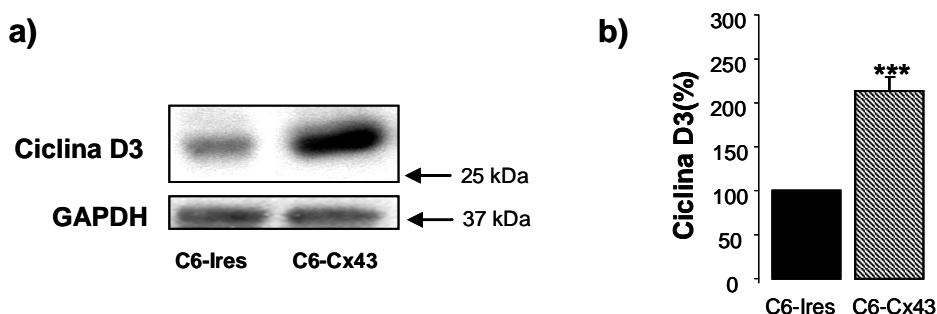


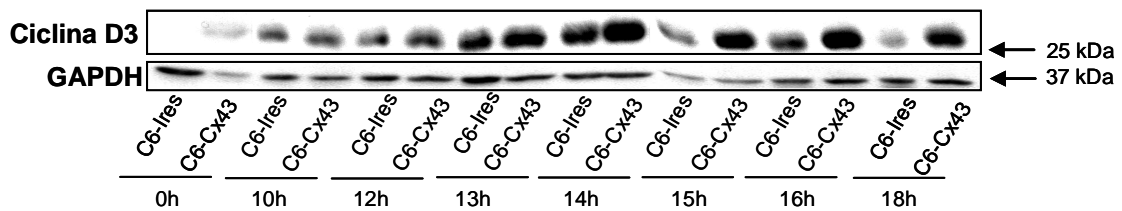
Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de la ciclina D3 en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de la ciclina D3 mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina D3 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D3 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** p < 0,001 (test t de Student).

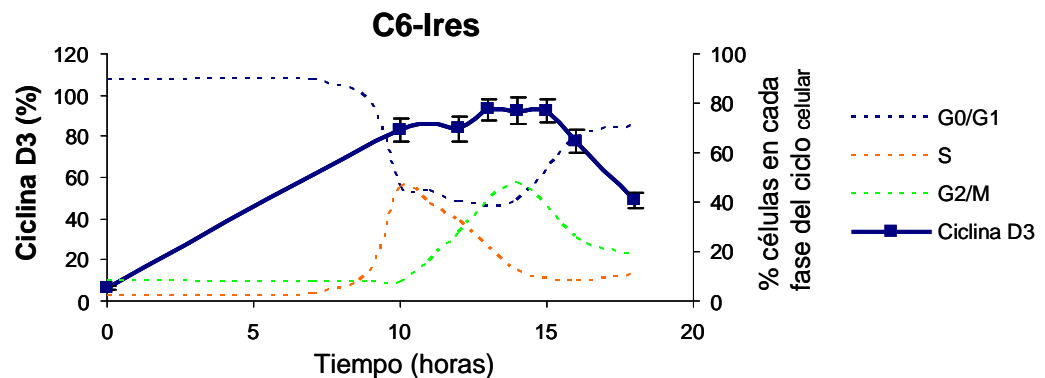
Por otro lado, la expresión de la ciclina D3 en células C6-Cx43 a lo largo del tiempo (Fig. 39c) indica que los niveles de expresión de la ciclina D3 a tiempo 0 se encontraban en torno al 60%, existiendo una subida a las 10 h hasta el 75%, aproximadamente. Estos valores se mantuvieron más o menos constantes hasta las 18h, con ligera tendencia a ascender.

Al comparar las expresiones de la ciclina D3 en células C6-Ires y C6-Cx43 (Fig. 39d), se observa que los niveles de expresión de la ciclina D3 a tiempo 0 fueron 5 veces más altos en las células que sobreexpresan Cx43, igualándose entre las 10 y 15h en ambos tipos celulares. Finalmente, la expresión de ciclina D3 a tiempo 16 disminuyó en las células C6-Ires y permaneció constante en las células C6-Cx43.

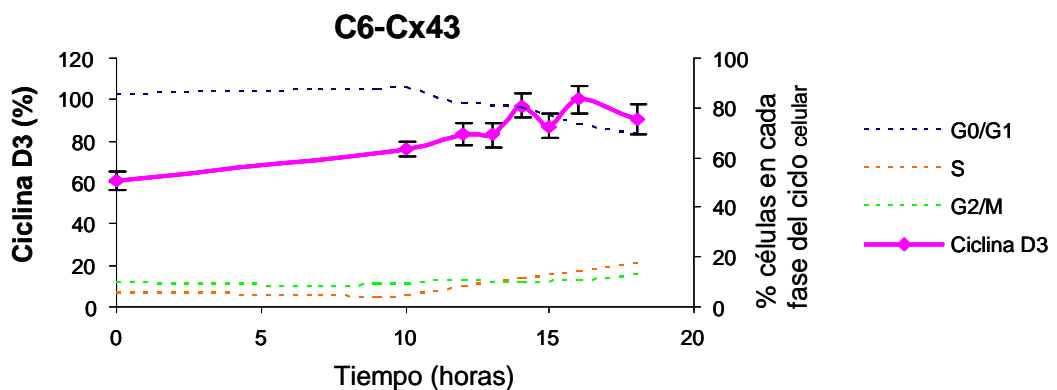
a)



b)



c)



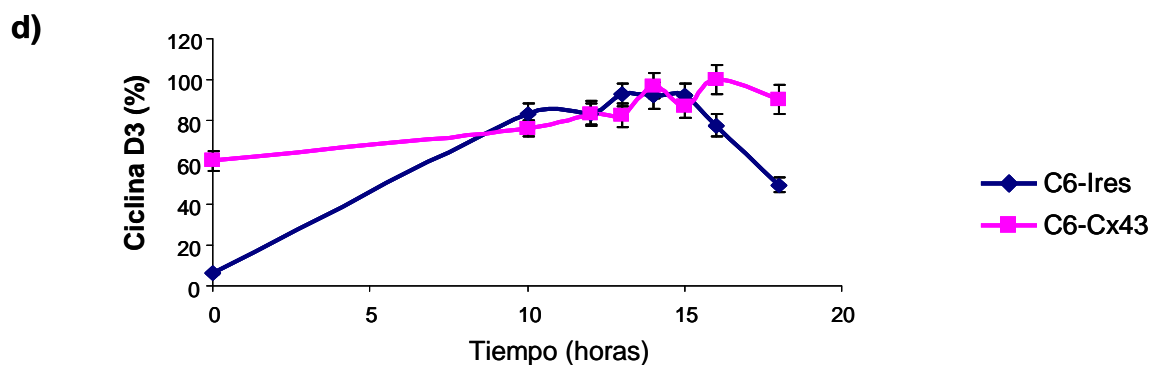


Figura 39. Expresión de la ciclina D3 a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de la ciclina D3 a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina D3 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D3 (línea azul continua) en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina D3 (C6-Cx43, 16h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de la ciclina D3 (línea rosa continua) en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina D3 (C6-Cx43, 16h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de la ciclina D3 en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

Las figuras 40a y 40b muestran que la expresión de la ciclina E en células C6-Ires y C6-Cx43 asíncronas fue muy similar. El Western blot de la expresión de la ciclina E en células sincronizadas en G0/G1 se muestra en la figura 41a. Se cuantificaron las bandas y se expresaron como porcentaje de la expresión más alta de ciclina E (C6-Ires, 13h).

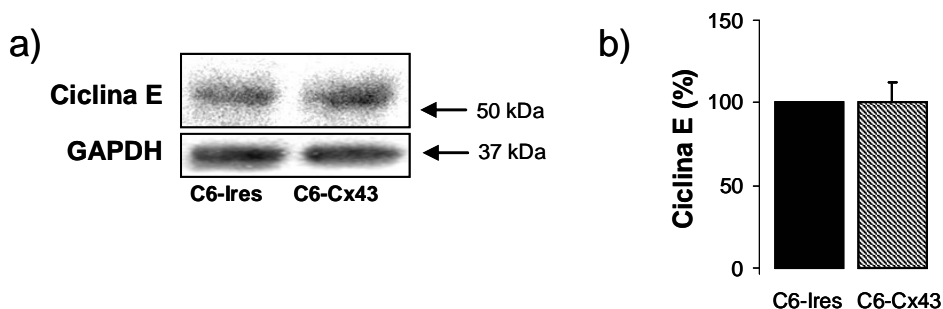


Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de la ciclina E en células de glioma C6.

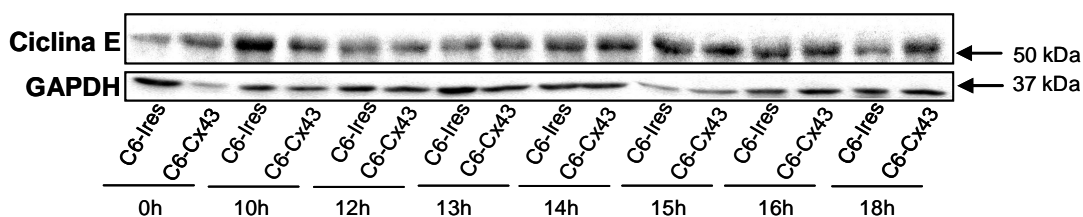
Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de la ciclina E mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina E y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina E se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6).

La figura 41b muestra la expresión de la ciclina E en células C6-Ires a lo largo del tiempo, observándose que aumentó un 70%, aproximadamente entre las 0 y 10h, coincidiendo con la disminución del porcentaje de células en la fase G0/G1 y la subida de la fase S. Estos niveles se mantuvieron hasta las 14h, momento en el comenzó a disminuir coincidiendo con la bajada en la fase G2/M.

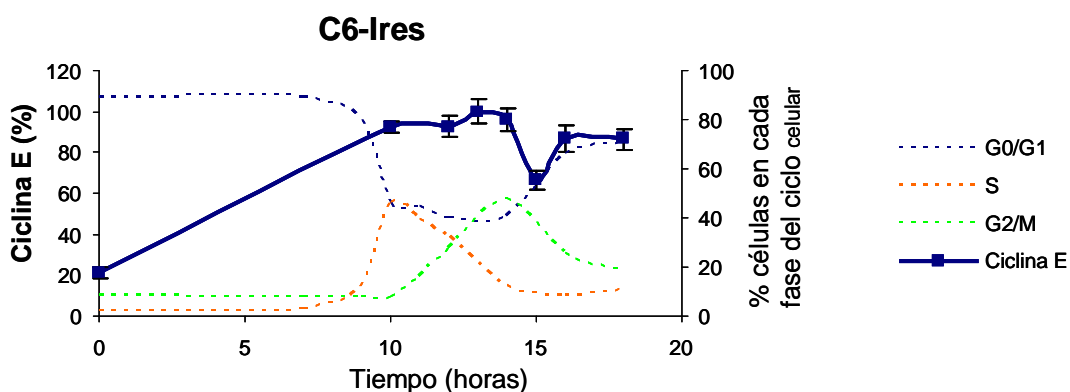
La figura 41c muestra que la expresión de la ciclina E en células C6-Cx43 a tiempo 0 fue del 40%, aproximadamente, manteniendo estos valores hasta las 10h. A partir de este momento, aumentó su expresión hasta las 14h, donde alcanzó su valor máximo (80%, aproximadamente). Entre las 14 y 15h, la expresión de la ciclina E bajó un 25%, aproximadamente, valor que se mantuvo hasta las 18h.

La comparación de las expresiones de la ciclina E en células C6-Ires y células C6-Cx43 (Fig. 41d), muestra que los niveles de expresión de esta ciclina a tiempo 0 fueron más altos en las células C6-Cx43. Sin embargo, el aumento de la expresión de la ciclina E fue más rápido en las células C6-Ires, llegando a ser el doble, aproximadamente, a las 10h. A partir de las 14h, los niveles de la ciclina E fueron similares en ambos tipos celulares.

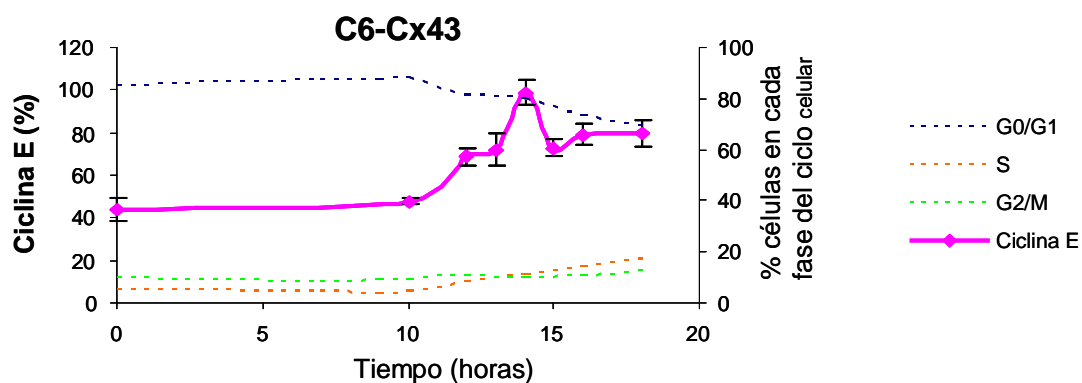
a)



b)



c)



d)

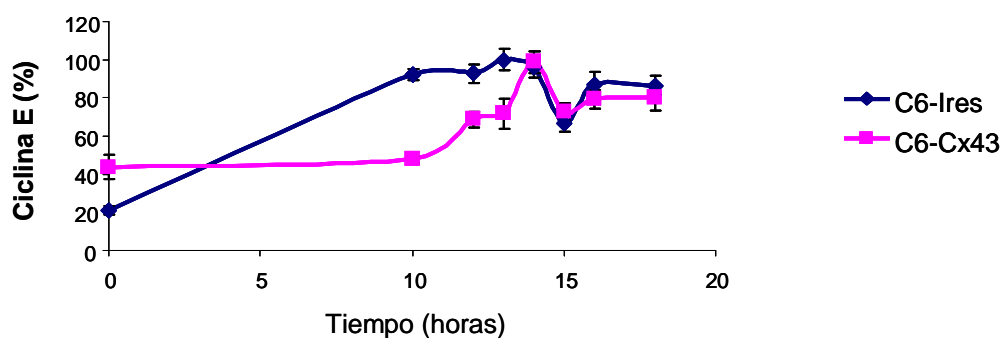


Figura 41. Expresión de la ciclina E a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de la ciclina E a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de la ciclina E y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina E (línea azul continua) en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina E (C6-Ires, 13h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de la ciclina E (línea rosa continua) en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de la ciclina E (C6-Ires, 13h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de la ciclina E en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

4.2.4.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre la expresión de p21 y p27 en células de glioma C6.

Dado que las ciclinas D1 y D3 se encuentran aumentadas en las células que sobreexpresan la Cx43 y, sin embargo, tienen dificultades en pasar de la fase G0/G1 a la fase S, nos planteamos estudiar el efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre algunos de los inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), tales como las proteínas p21 y p27.

Para ello, se recogieron proteínas de las células C6-Ires y C6-Cx43 y se analizó la expresión de p21 y p27. Además, se analizó la expresión de estas proteínas en las diferentes fases del ciclo celular. Para ello, las células C6-Ires y las células C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Se añadió DMEM más suero al 10%, se recogieron las proteínas a diferentes tiempos y se determinó la expresión de p21 y p27 mediante un análisis de transferencia tipo Western.

Las figuras 42a y 42b muestran que la expresión de p21 en células asincrónicas fue más alta en las células C6-Cx43, aproximadamente un 70%. La figura 43a muestra el Western blot de p21 a diferentes tiempos después de la sincronización en G0/G1. Se cuantificaron las bandas y se expresaron como porcentaje de la expresión más alta de p21 (C6-Cx43, 10h). La cuantificación de la expresión de p21 en células C6-Ires a lo largo del tiempo (Fig. 43b) muestra que la expresión de p21 aumentó el 65% entre las 0 y 10h. Después, se mantuvo más o menos constante hasta las 16h, momento en el que comenzó a disminuir.

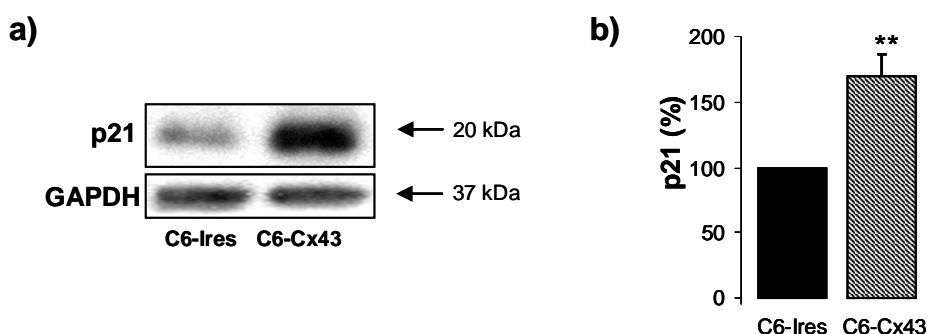


Figura 42. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de p21 en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de p21 mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de p21 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de p21 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** $p < 0,001$ (test *t* de Student).

Por otro lado, la expresión de p21 en células C6-Cx43 (Fig. 43c) a tiempo 0 fue del 60%, aproximadamente, y llegó hasta valores del 100% a las 10h, momento en el que comenzaron a bajar sus niveles de expresión lentamente.

La comparación de la expresión de p21 a lo largo del tiempo en células C6-Ires y C6-Cx43 revela que la expresión de p21 fue más alta en las células C6-Cx43, prácticamente durante todos los tiempos estudiados (Fig. 43d).

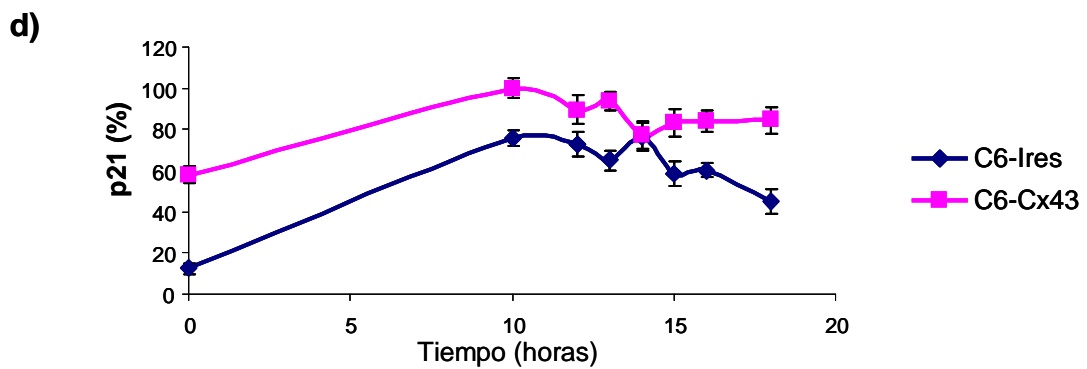
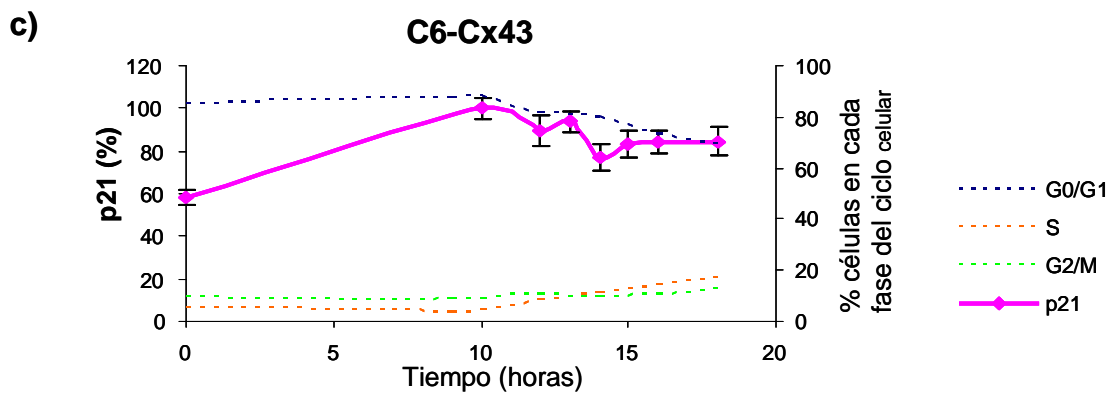
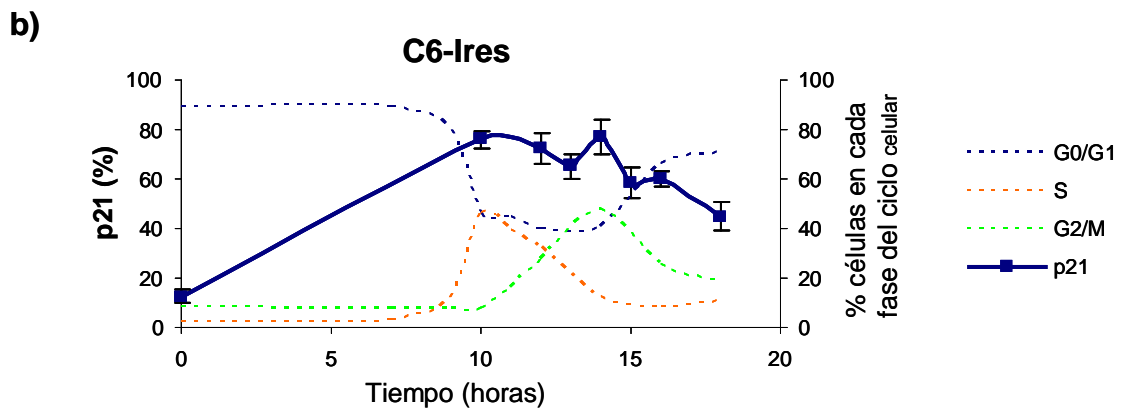
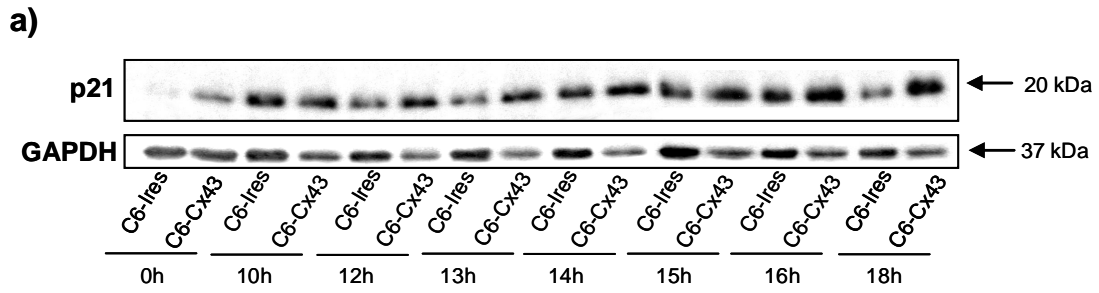


Figura 43. Expresión de p21 a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de p21 a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de p21 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de p21 (línea azul continua) en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de p21 (C6-Cx43, 10h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de p21 (línea rosa continua) en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de p21 (C6-Cx43, 10h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de p21 en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

Además, la sobreexpresión de Cx43 aumenta la expresión de p27, alrededor de un 70% (Fig. 44a y 44b). En la figura 45a se muestra el Western blot de la evolución de la expresión de p27 en células C6-Ires y C6-Cx43, sincronizadas en G0/G1. Se cuantificaron las bandas y se expresaron como porcentaje de la expresión más alta de p21 (C6-Cx43, 0h)

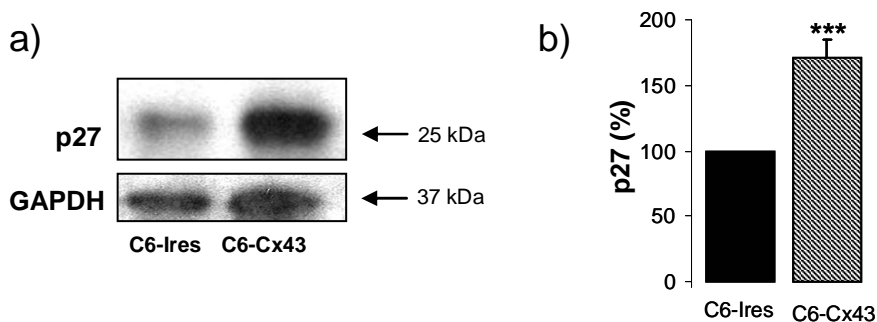


Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de p27 en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se resembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de p27 mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de p27 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de p27 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ** p < 0,01 (test t de Student).

La evolución de la expresión de p27 en células C6-Ires (Fig. 45b), muestra que a tiempo 0 ya existían unos niveles de expresión de esta proteína del 50%, aproximadamente, manteniéndose más o menos constantes hasta las 12h. A continuación, la expresión de p27 en estas células descendió ligeramente hasta las 15h y después comenzó a subir, cuando las células volvían a entrar en fase G0/G1.

La figura 45c muestra la evolución de la expresión de p27 a lo largo del tiempo en las células C6-Cx43. Se observa que, a tiempo 0, existía un 75% de expresión de p27 en estas células, descendiendo ligeramente hasta las 15h, para después volver a subir.

La comparación de la expresión de p27 en ambos tipos celulares a lo largo del tiempo indica que la expresión de p27 fue más alta en las células C6-Cx43 en todos los tiempos estudiados (Fig 45d).

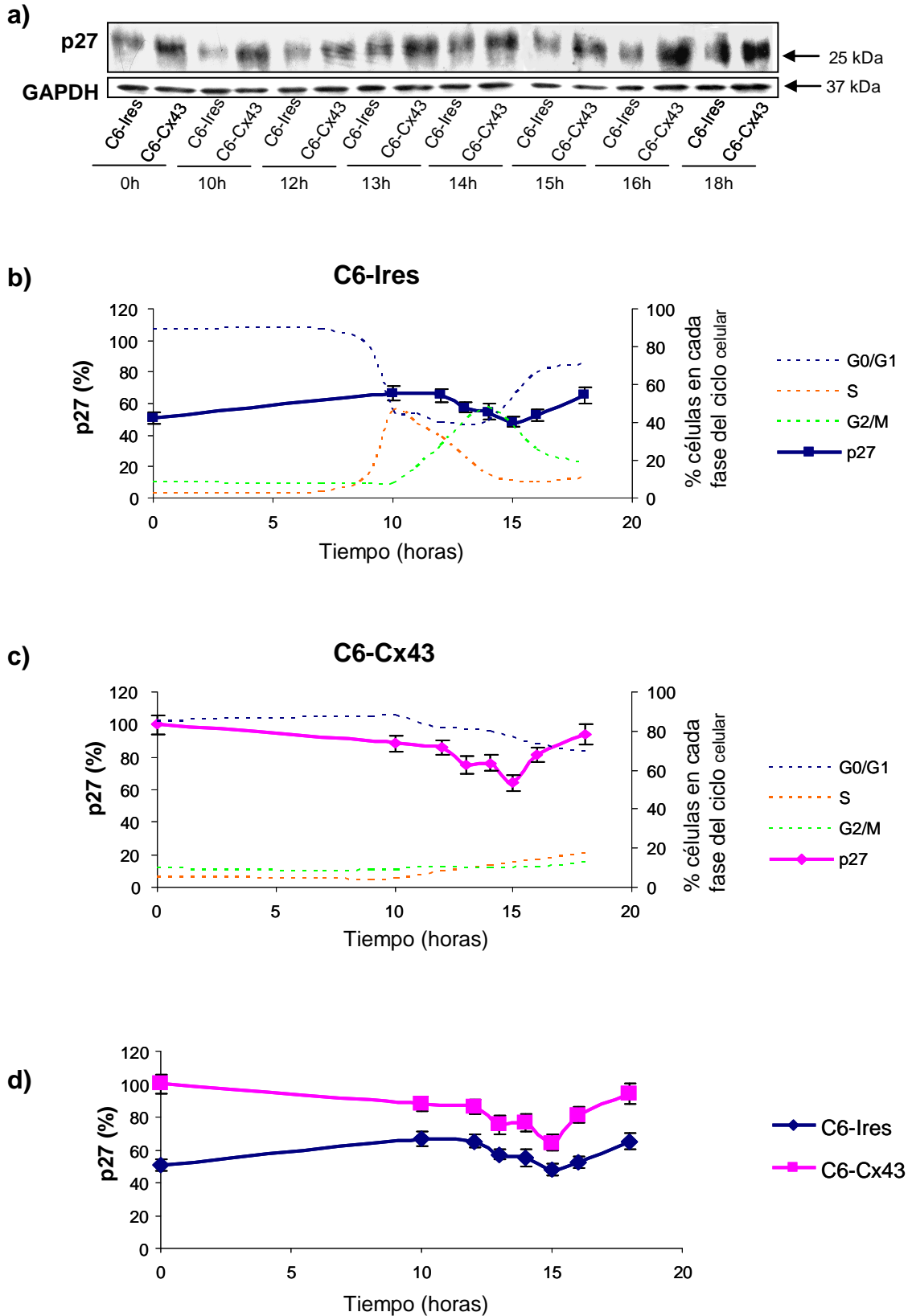


Figura 45. Expresión de p27 a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de p27 a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de p27 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de p27 (línea azul continua) en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de p27 (C6-Cx43, 0h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de p27 (línea rosa continua) en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de p27 (C6-Cx43, 0h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de p27 en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

4.2.4.3. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la fosforilación del retinoblastoma en células de glioma C6.

La progresión del ciclo celular desde la fase G0/G1 hacia la fase S requiere la fosforilación del pRb y la subsecuente liberación del factor de transcripción E2F, responsable del control de la expresión de los genes responsables de la transición de G1 a S (Sherr 1996). Cuando el pRb no está fosforilado, éste forma un complejo con E2F, parando el ciclo celular en la fase G1. La fosforilación de pRb depende de la actividad de las CDKs que se regulan, a su vez, por los inhibidores de las CDKs (CKIs), p27 y p21. Una vez conocido el efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre las ciclinas y los CKIs en las células de glioma C6, nos propusimos conocer el grado de fosforilación del pRb en las células que sobreexpresan Cx43.

Para ello, se recogieron proteínas de las células C6-Ires y C6-Cx43 y se analizó la expresión del pRb, así como la cantidad de pRb no fosforilado (Rb-NP). Además, se analizó la fosforilación de esta proteína en las diferentes fases del ciclo celular. Para ello, las células C6-Ires y las células C6-Cx43 se sincronizaron en la fase G0/G1. Se añadió DMEM más suero al 10%, se recogieron las proteínas a diferentes tiempos y se determinó la expresión del pRb mediante un análisis de transferencia tipo Western y se cuantificaron las bandas de pRb fosforilado (Rb-P) y Rb-NP.

Las figuras 46a y 46b muestran que la expresión del pRb fue, aproximadamente, un 140% más alta en las células C6-Cx43 que en las células C6-Ires. Además, tanto el pRb-NP como el Rb-P estaban también aumentados, al doble, en las células que sobreexpresan la Cx43.

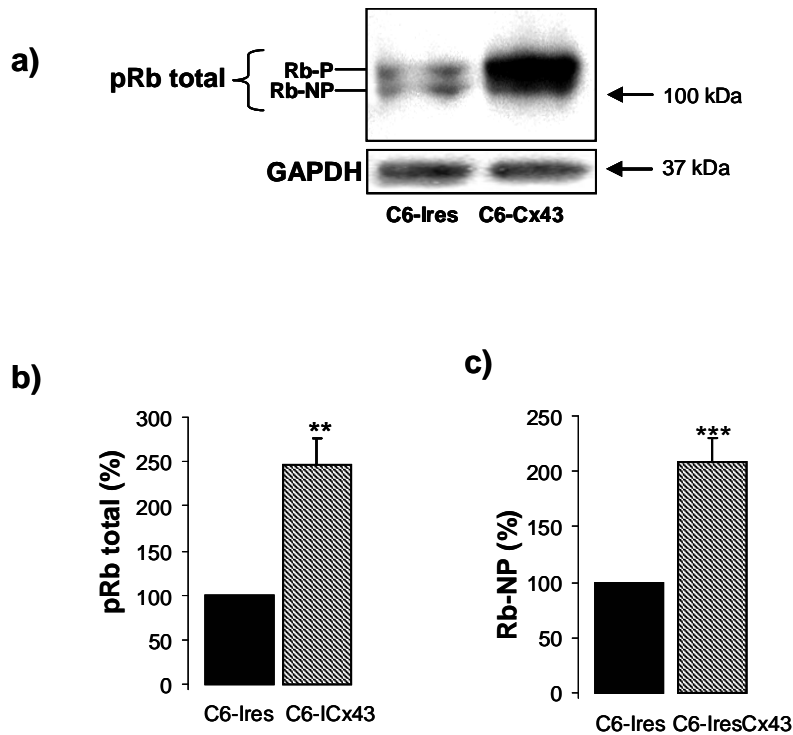


Figura 46. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre la expresión de la proteína del retinoblastoma en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de la proteína del retinoblastoma (pRb) mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de pRb y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas del pRb no fosforilado (Rb-NP) y del pRb fosforilado (Rb-P). **b)** Los valores del pRb total se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control C6-Ires y son medias \pm SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como * $p < 0,05$ (test *t* de Student). **c)** Los valores de Rb-NP se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor del C6-Ires y son medias \pm SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ** $p < 0,01$ (test *t* de Student).

En figura 47a se observa que, en las células sincronizadas en G0/G1, la expresión del pRb a lo largo del tiempo fue siempre más alta en las células C6-Cx43 que en las células C6-Ires. Sin embargo, se puede apreciar que la relación del pRb fosforilado con respecto al no fosforilado (Rb-P/Rb-NP) variaba a lo largo del tiempo. La cuantificación de la relación Rb-P/Rb-NP revela que en las células C6-Ires el pRb aumentó su fosforilación a medida que progresaba el ciclo celular (Fig. 47b), mientras que en las células C6-Cx43 la fosforilación del pRb no variaba a lo largo del tiempo (Fig. 47c). La figura 47d muestra la comparación de la relación Rb-P/Rb-NP en ambos tipos celulares. Se puede apreciar que, a partir de las 10h, esta relación fue superior en las células C6-Ires que en las C6-Cx43.

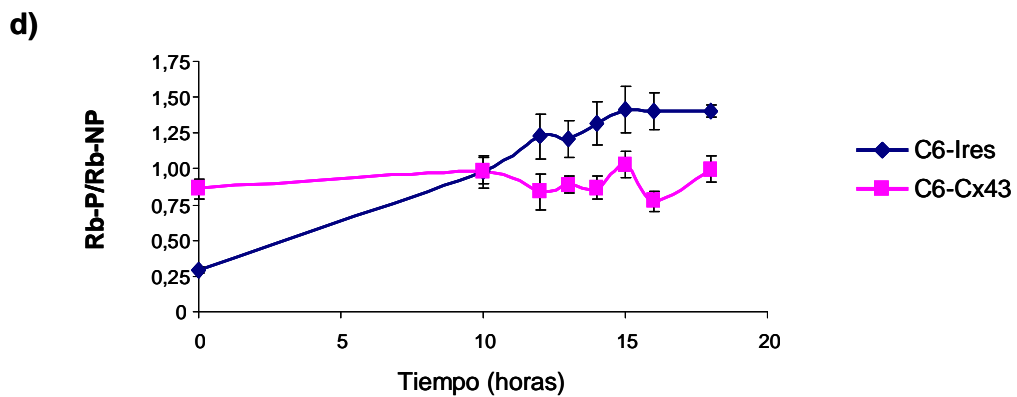
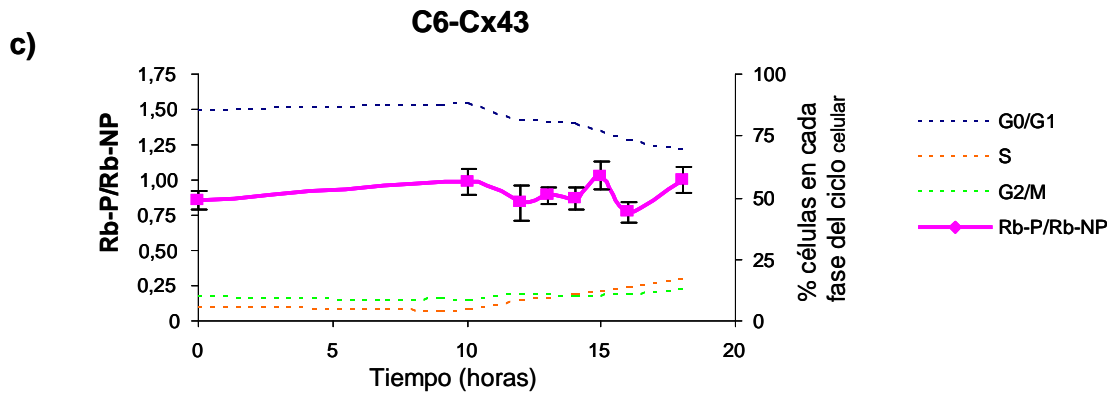
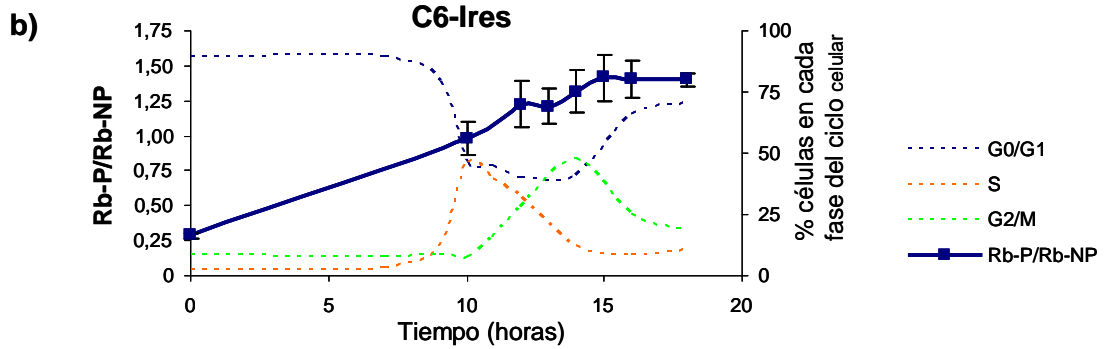
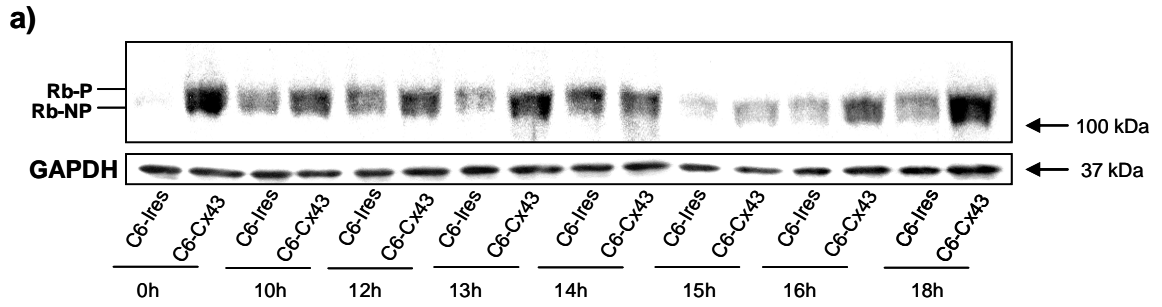


Figura 47. Relación Rb-P/Rb-NP a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó la expresión de la proteína del retinoblastoma (pRb) a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de pRb y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de pRb-P y pRb-NP en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH, se representó la relación Rb-P/Rb-NP (línea azul continua) y los valores son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de pRb-P y pRb-NP en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH, se representó la relación Rb-P/Rb-NP (línea rosa continua) y los valores son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la relación Rb-P/Rb-NP en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

4.2.5. Relación de la conexina43 con c-Src.

La conexina43 (Cx43) tiene 13 residuos en el extremo carboxilo terminal susceptibles de ser fosforilados por 6 kinasas diferentes (Para revisión, véase: Lampe and Lau 2004; Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009). Entre estas kinasas se encuentra v-Src, que es la homóloga viral de c-Src, que está siempre activa. Así, como se ha mencionado en el apartado 1.3.1. de la Introducción, numerosos estudios muestran que v-Src y c-Src fosforilan la Cx43 en el residuo de tirosina 265 (Y265). Además Lin y col. han mostrado que v-Src también fosforila la Cx43 en el residuo de tirosina 247 (Y247). La fosforilación en ambos residuos de la Cx43 conlleva a una inhibición de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Crow et al. 1990; Giepmans et al. 2001a; Kurata and Lau 1994; Lin et al. 2001; Swenson et al. 1990).

Por otro lado, la transfección de células con v-Src provoca modificaciones en el control del ciclo celular encontrándose una estimulación de la progresión a través de la fase G1 a S (para revisión, véase: Frame, 2004, 989)].

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos investigar si c-Src estaba implicada en la vía de señalización utilizada por la Cx43 para ejercer su efecto antiproliferativo.

4.2.5.1. Efecto de la Inhibición de c-Src en la proliferación de las células C6-Ires y las C6-Cx43

Para conocer si c-Src estaba implicada en la vía de señalización que utiliza la Cx43 para ejercer su efecto antiproliferativo decidimos en primer lugar, conocer los efectos de la inhibición de la actividad de c-Src en la proliferación de las células C6-Ires y C6-Cx43. Para ello, analizamos la velocidad de crecimiento de las células C6-Ires y C6-Cx43 en presencia de un inhibidor de c-Src ampliamente utilizado, PP2, y a su vez utilizamos como control un compuesto análogo que no tiene efectos sobre la actividad de c-Src, PP3.

Así, las células C6-Ires y C6-Cx43 se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm² en presencia de PP2 o PP3 y se determinó la curva de crecimiento siguiendo el número de células vivas a lo largo del tiempo analizado mediante el ensayo del MTT (Fig. 48). Los resultados se expresaron como porcentaje del valor más alto de absorbancia (C6-Ires PP3, 7días). Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de c-Src con PP2 produce una fuerte reducción de la velocidad de crecimiento en las células C6-Ires y C6-Cx43.

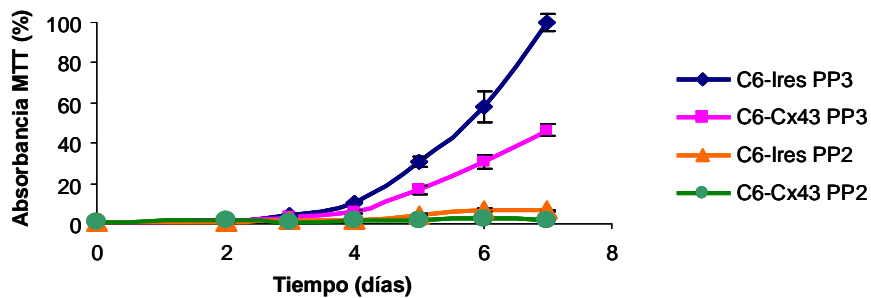


Figura 48. Efecto de la inhibición de la actividad de c-Src sobre la proliferación celular.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm² en presencia de PP3 (100ng/μL) y PP2 (100ng/μL). A partir de 0 h después de la transfección y durante 7 días se hicieron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de la absorbancia encontrada respecto a la condición que mostró mayor absorbancia (C6-Ires PP3, 7días) y son medias ± SEM (n=8).

El siguiente paso fue conocer el efecto de la inhibición de c-Src sobre las moléculas reguladoras del ciclo celular. Concretamente, analizamos la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de los inhibidores de las CDKs p21 y p27. Para ello, las células C6-Ires y C6-Cx43 se resembraron a una densidad de 50000 células/ cm² y 100000 células/cm², respectivamente, en presencia de PP2 o PP3. Una vez que llegaron a la confluencia, se recogieron las proteínas y se analizó la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de los inhibidores de las CDKs p21 y p27.

La figura 49 muestra el Western blot y las cuantificaciones de la expresión de la ciclina D1 y D3 y de p21 y p27. En todos los casos la inhibición de c-Src aumenta la expresión de estas proteínas de forma muy similar al efecto encontrado con la sobreexpresión de la Cx43. A excepción de la ciclina D1 en la que el efecto de la inhibición de c-Src es un 40%, aproximadamente, inferior al encontrado con la sobreexpresión de la Cx43.

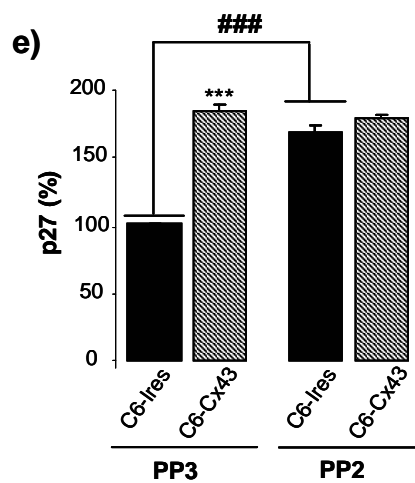
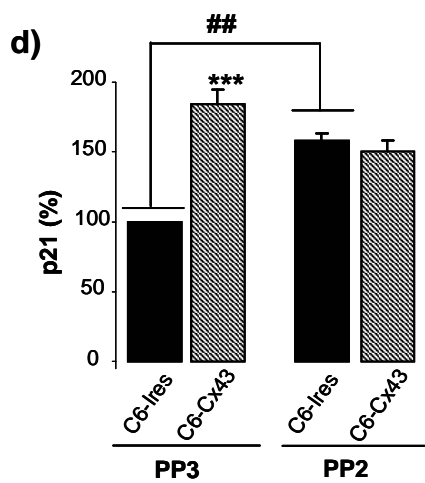
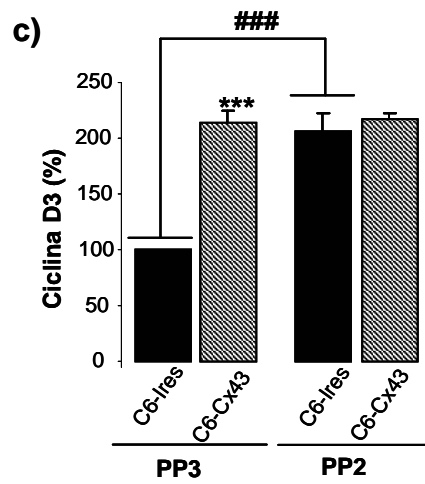
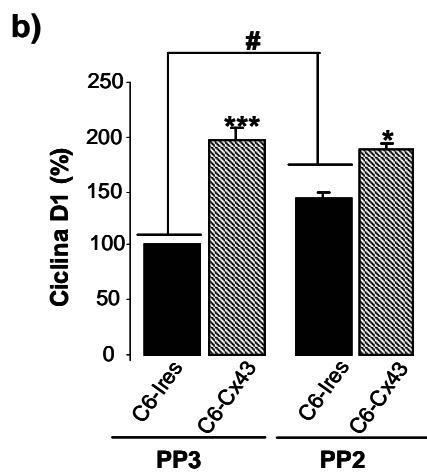
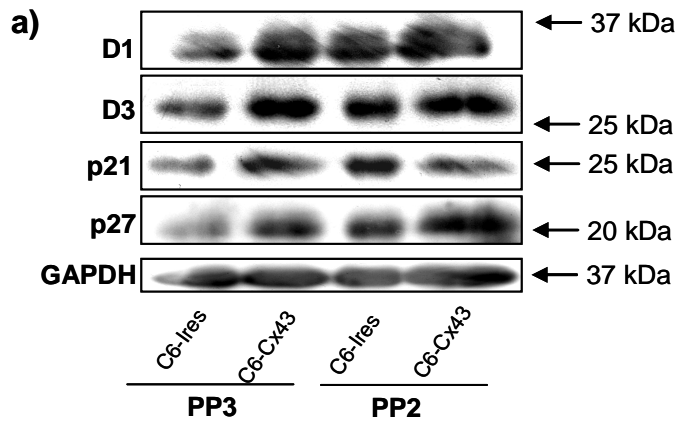


Figura 49. Efecto de la inhibición de la actividad de c-Src sobre la expresión de las ciclinas D1 y D3 y sobre p21 y p27.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente, en presencia de PP3 (100ng/μL) y PP2 (100ng/μL). Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de p21 y p27 mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot la ciclina D1, la ciclina D3, p21, p27 y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de la ciclina D1 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires PP3 y son medias \pm SEM (n=3). **c)** Los valores de la ciclina D3 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires PP3 y son medias \pm SEM (n=3). **d)** Los valores de p21 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires PP3 y son medias \pm SEM (n=3). **e)** Los valores de p27 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires PP3 y son medias \pm SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** p<0,001; * p<0,5. La significatividad de las diferencias C6-Ires PP3 vs C6-Ires PP2 se expresa como ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,5 (One-way ANOVA seguido de Bonferroni Post-test).

4.2.5.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 sobre la expresión y la activación de c-Src.

Una vez conocido el efecto de la inhibición de la actividad de c-Src en las células C6-Ires y C6-Cx43, quisimos investigar si la sobreexpresión de la Cx43 modificaba los niveles o la actividad de c-Src.

Para que c-Src se active se requiere la autofosforilación de la tirosina 416 (Y416). Por tanto, para conocer la actividad de c-Src utilizamos un anticuerpo específico que reconociera c-Src fosforilada en Y416 y un anticuerpo que reconociera c-Src, independientemente de su estado de fosforilación. Se recogieron proteínas de las células C6-Ires y C6-Cx43 y se analizó la expresión de la forma activa de c-Src y de c-Src total. Las figuras 50a, 50b y 50c muestran el Western blot y las cuantificaciones de c-SrcY416 y de c-Src total, observándose que la cantidad de la forma activa de c-Src en las células que sobreexpresan la Cx43 está disminuída un 60%. Sin embargo la cantidad total de c-Src no varía entre ambos tipos celulares. Quisimos corroborar estos resultados por ensayos de inmunocitoquímica. En la figura 50d observamos que claramente hay más cantidad de c-SrcY416 en las células C6-Ires que en las C6-Cx43, localizándose predominantemente en el núcleo. Por otro lado el nivel de expresión de c-Src total no varía (Fig. 50e). Sin embargo, es interesante destacar que en las células C6-Ires parece que c-Src se acumula en estructuras celulares del tipo podosoma, hecho que no se observa en las células C6-Cx43.

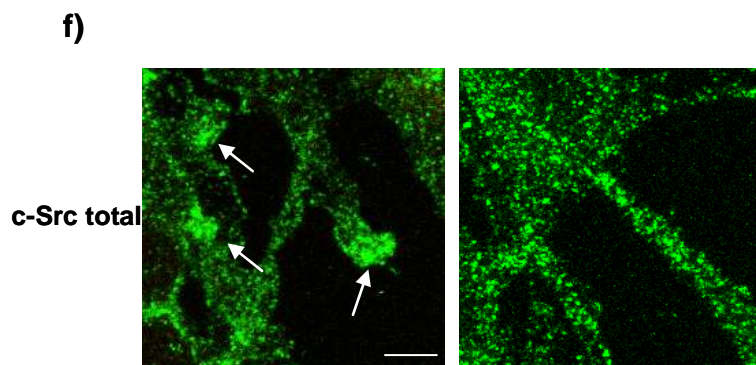
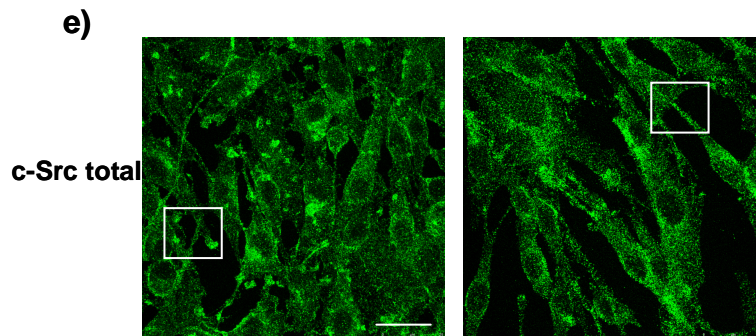
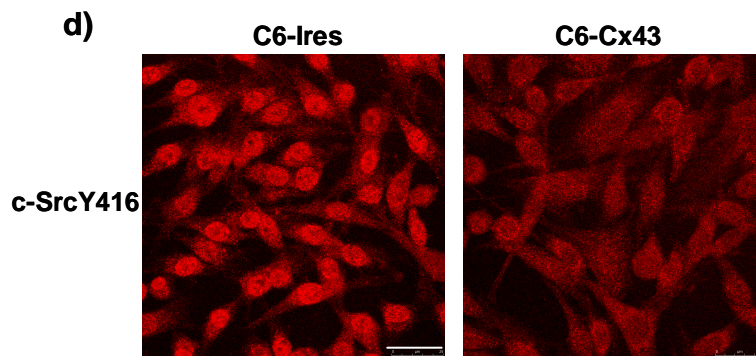
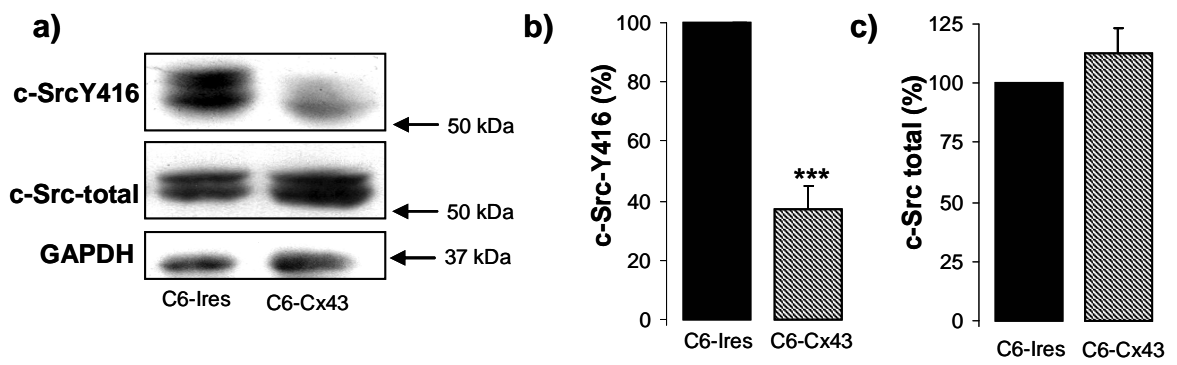


Figura 50. Efecto de la sobreexpresión de la Cx43 sobre actividad y la expresión de c-Src en células de glioma C6.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de c-SrcY416 y de c-Src total mediante análisis de transferencia tipo Western e inmunocitoquímica. **a)** Western blot de c-SrcY416, c-Src total y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de c-SrcY416 se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como *** $p < 0,001$ (test *t* de Student). **c)** Los valores de c-Src total se normalizaron con GAPDH y los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor de C6-Ires y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Inmunocitoquímica de c-SrcY416 total en las células C6-Ires y C6-Cx43. Barra = 25 μ m. **e)** Inmunocitoquímica de c-Src total en las células C6-Ires y C6-Cx43. Barra = 25 μ m. **f)** Ampliación de los insertos señalados en la figura e. Las flechas blancas señalan las estructuras en forma de podosoma. Barra= 5 μ m.

Una vez conocido que la sobreexpresión de la Cx43 afecta a la actividad de c-Src, quisimos estudiar las modificaciones de esta actividad a lo largo del ciclo celular. Para ello sincronizamos las células en la fase G0/G1 y posteriormente añadimos suero al 10%, se recogieron las proteínas a diferentes tiempos y se determinó la expresión de c-SrcY416 y c-Src total mediante un análisis de transferencia tipo Western.

La figura 51a muestra el Western blot de la c-SrcY416 y c-Src total a diferentes tiempos después de la sincronización en G0/G1. A continuación se cuantificaron las bandas de c-Src total y c-SrcY416. La cuantificación de c-Src total no se muestra, ya que no hubo variaciones a lo largo del tiempo ni en C6-Ires ni en C6-Cx43. La cuantificación de c-SrcY416 se expresa como porcentaje de la expresión más alta de c-SrcY416 (C6-Ires, 16h). En la figura 51b se observa que la forma activa de c-Src en las células C6-Ires no varía entre las 0 h y las 10 h. En este momento c-SrcY416 aumenta hasta las 16 h, punto en el que su expresión es máxima. A partir de este momento la expresión de la forma activa de c-Src disminuye, coincidiendo con la salida del ciclo celular de estas células.

La figura 51c muestra que la forma activa de c-Src en las células C6-Cx43 es del 80%, aproximadamente, a tiempo 0 y que comienza a disminuir hasta las 12 h después de la sincronización en G0/G1. En este momento la cantidad de c-SrcY416 sube ligeramente hasta las 24 h, punto en que alcanza su valor más alto y momento en el que hay un mayor porcentaje de células C6-Cx43 en la fase G2/M. A partir de este momento su expresión comienza a disminuir.

Al comparar los cambios de la forma activa de c-Src en las células C6-Ires y C6-Cx43 a lo largo del tiempo (Fig. 51d), observamos que entre las 10 y 20 h ésta es mayor en las células C6-Ires. A partir de las 24 h, c-SrcY416 en las células C6-Ires disminuye mientras que en las células C6-Cx43 aumenta, aunque sin llegar a los valores más altos alcanzados en las células C6-Ires.

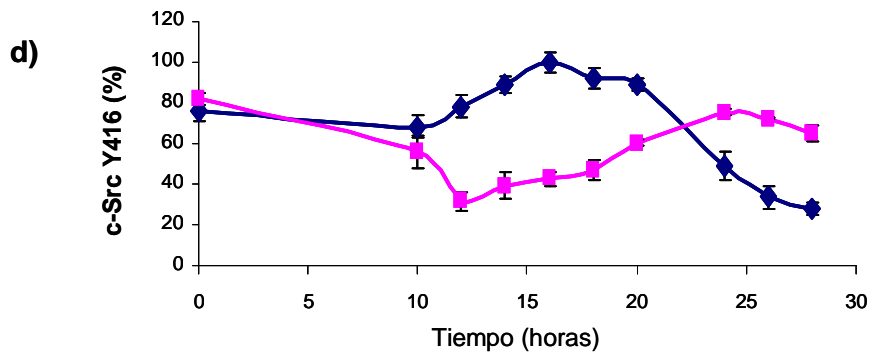
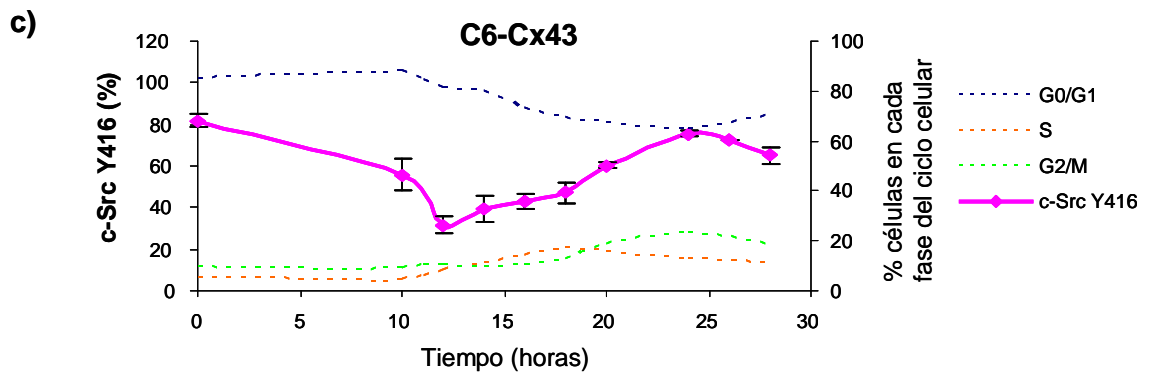
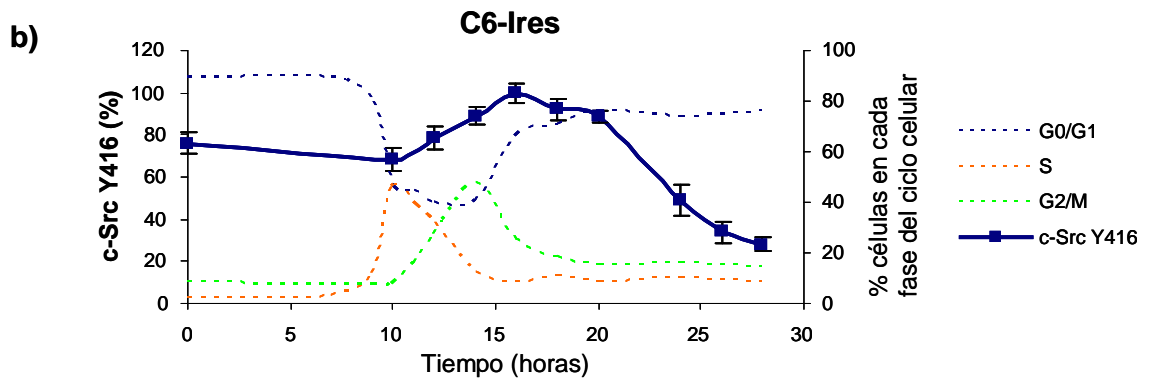
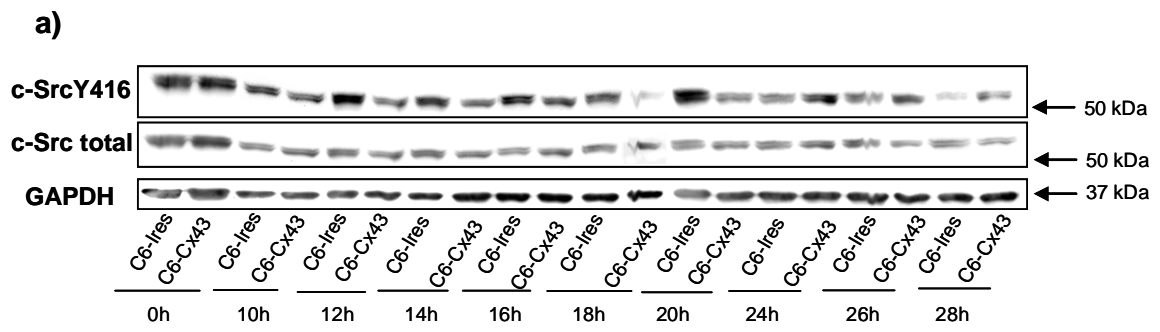


Figura 51. Actividad de c-Src a lo largo del ciclo celular en células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas y se determinó actividad y la expresión de c-Src a diferentes tiempos mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de c-SrcY416, c-Src total y GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas. **b)** Los valores de c-SrcY416 en las células C6-Ires se normalizaron con GAPDH (línea azul continua). Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de c-Src-Y416 (C6-Ires, 16h) y son medias \pm SEM (n=6). **c)** Los valores de c-SrcY416 en las células C6-Cx43 se normalizaron con GAPDH (línea rosa continua). Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto de c-SrcY416 (C6-Cx43, 18h) y son medias \pm SEM (n=6). **d)** Comparación de la evolución de c-SrcY416 en las células C6-Ires (línea azul) y C6-Cx43 (línea rosa).

Una vez estudiada las modificaciones de la forma activa de c-Src a lo largo del tiempo, quisimos corroborar estos resultados y estudiar la localización de c-Src activa a lo largo del tiempo mediante ensayos de inmunocitoquímica. La figura 52a muestra la localización de c-Src activa en las células C6-Ires, a las horas en las que los cambios de localización son más evidentes. Se observa que a las 0 h, c-SrcY416 se encuentra predominantemente en el núcleo. A las 10 h apenas se detecta c-SrcY416. A las 14 h y 16 h hay un fuerte aumento de c-SrcY416 en el citoplasma, alrededor del núcleo, siendo mayor a las 16 h. A las 18 h, c-SrcY416 se encuentra totalmente en el núcleo. A las 24 h, la localización de C-SrcY416 continúa en el núcleo aunque su cantidad es inferior.

En la figura 52b se observa la localización de c-SrcY416 en las células C6-Cx43, que apenas es detectable mediante inmunocitoquímica hasta las 24 h, cuya localización es predominantemente citoplasmática. A partir de las 26 h se encuentra en el núcleo y su expresión disminuye.

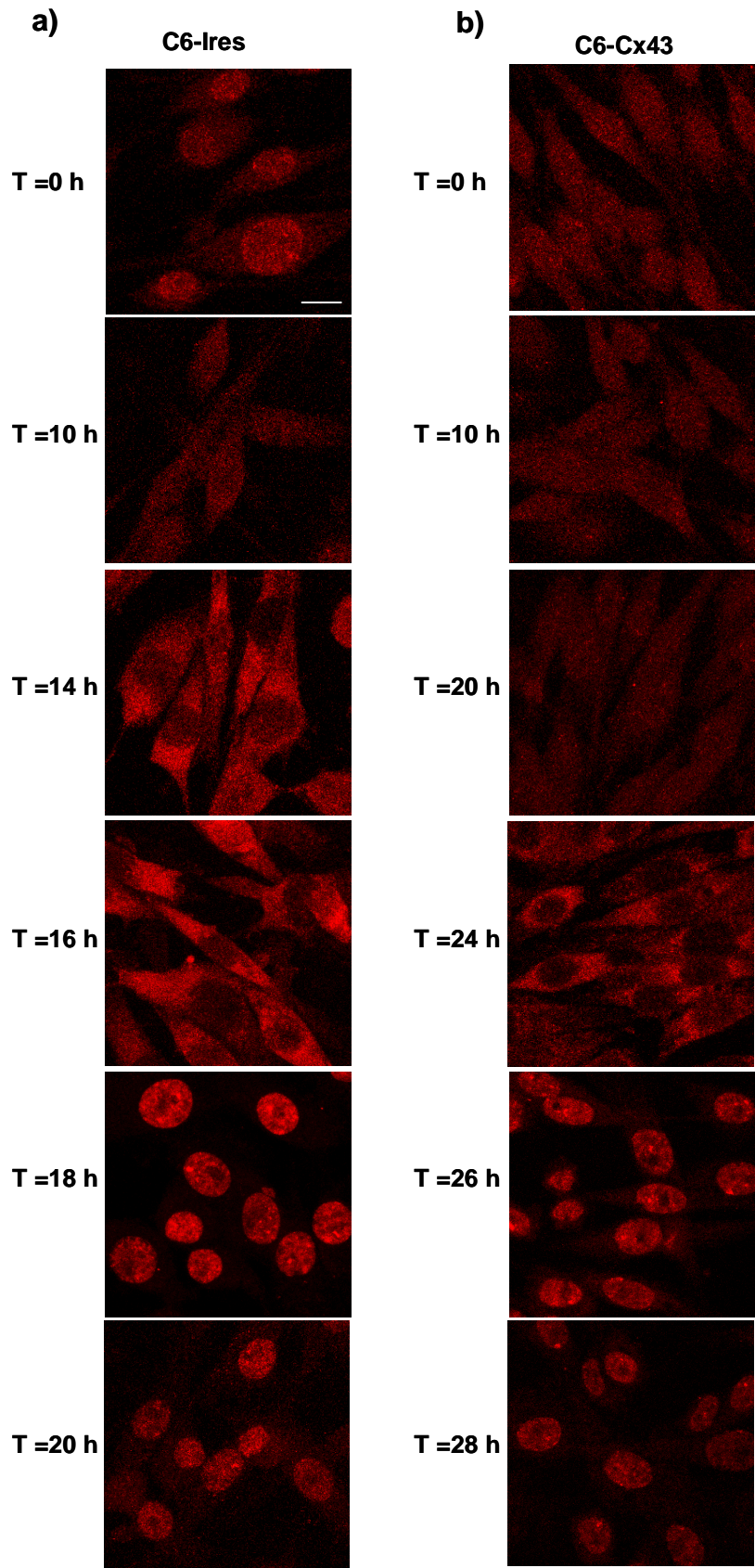


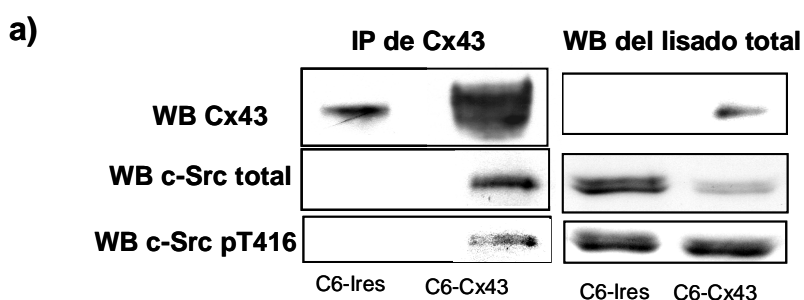
Figura 52. Localización de c-SrcY416 a lo largo del ciclo celular en las células C6-Ires y C6-Cx43 sincronizadas en la fase G0/G1.

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica de c-SrcY416 a diferentes tiempos. **a)** Inmunocitoquímica de c-SrcY416 en células C6-Ires a diferentes tiempos. **b)** Inmunocitoquímica de c-SrcY416 en células C6-Cx43 a diferentes tiempos. Barra =10 μ m.

4.2.5.3. Interacción de c-Src y conexina43.

Se ha descrito que c-Src fosforila directamente la Cx43 (Crow et al. 1990; Giepmans et al. 2001a; Kurata and Lau 1994; Lin et al. 2001; Swenson et al. 1990). Para comprobar si en nuestro modelo de sobreexpresión de la Cx43, c-Src interaccionaba con la Cx43, se inmunoprecipitó la Cx43 en las células C6-Ires y C6-Cx43 y se determinó c-Src total y c-SrcY416 en el inmunocomplejo. La figura 53a muestra el Western blot de la Cx43, c-Src total y c-SrcY416 en el inmunocomplejo obtenido con Cx43, indicando que tanto c-Src total y c-SrcY416, aunque ésta última en menor medida, se encuentran unidas a la Cx43 en las células C6-Cx43. En las células C6-Ires, como era de esperar, los niveles de Cx43 son inferiores y no se recupera ni c-Src ni c-Src activa en el inmunocomplejo. A su vez se muestran los Western blot del lisado total en las células C6-Ires y C6-Cx43 de estas mismas proteínas utilizados como control.

Para corroborar estos resultados se hicieron estudios de colocalización mediante ensayos inmunocitoquímicos. Las figuras 53b y 53c muestran que la Cx43 colocaliza tanto con c-Src como con c-SrcY416, aunque con ésta última en menor medida.



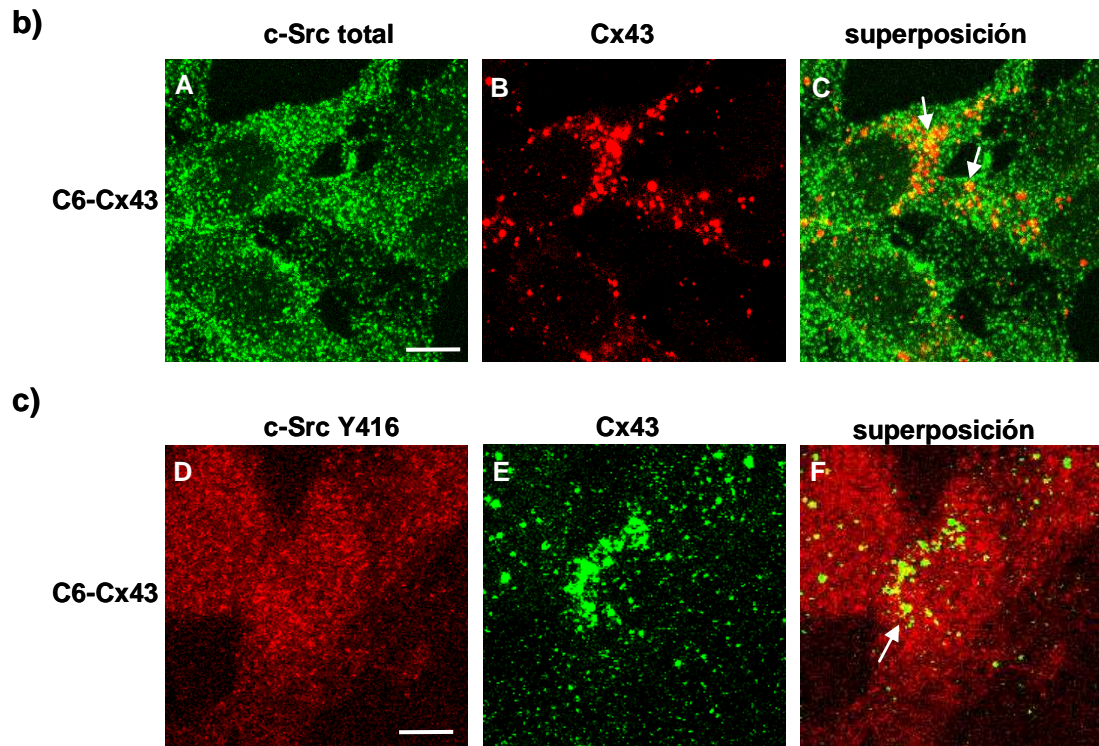


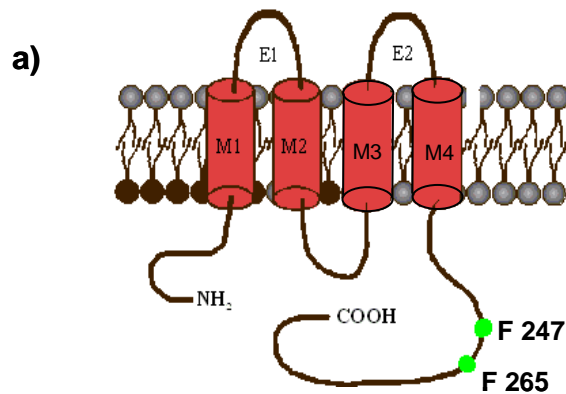
Figura 53. Interacción de c-Src y Cx43

Las células C6-Ires y C6-Cx43 se sembraron a una densidad de 50.000 células/ cm² y 100.000 células/cm², respectivamente. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la colocalización de la Cx43 con c-Src total y con c-SrcY416 mediante inmunoprecipitación e inmunocitoquímica. **a)** Inmunoprecipitación de la Cx43 y Western blot de c-Src total y c-SrcY416 en células C6-Ires y C6-Cx43. Se muestran los Western blot de Cx43, c-Src total y c-SrcY416 de lisados totales, que se utilizaron como control positivo, en las células C6-Ires y C6-Cx43. **b)** Inmunocitoquímica de c-Src total, de la Cx43 y la superposición de ambas en células C6-Cx43. Barra= 5μm. **c)** Inmunocitoquímica de c-SrcY416, de la Cx43 y la superposición de ambas en células C6-Cx43. Barra= 5μm.

4.2.5.4. Construcción del plásmido pIres-Cx43Y247F/Y265F, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.

Trabajos previos muestran que la Cx43 es sustrato de c-Src. Concretamente, v-Src fosforila la Cx43 en los residuos de tirosina 247 y 265, lo que conlleva a una inhibición de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes (Crow et al. 1990; Giepmans et al. 2001a; Kurata and Lau 1994; Lin et al. 2001; Swenson et al. 1990). Para saber si estas fosforilaciones estaban implicadas en la vía de señalización utilizada por la Cx43 para ejercer sus efectos antiproliferativos decidimos sobreexpresar la Cx43 mutada en los residuos de tirosina 247 y 265 del extremo carboxilo terminal. Así sustituimos las tirosinas por fenilalaninas, de manera que c-Src no pudiera fosforilar la Cx43. En la figura 54a se muestra la estructura de la Cx43 y se señalan con dos puntos verdes el cambio de tirosinas por fenilalaninas.

Para ello, se buscaron los aminoácidos que codifican las tirosinas 247 y 265 y se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para la obtención de fenilalaninas en su lugar. A partir de la construcción pIres-Cx43 se obtuvo la nueva construcción pIres-Cx43Y247F/Y265F tal y como se describe en Material y Métodos, que se secuenció obteniéndose un 100% de homología con la secuencia esperada. El resultado del alineamiento se muestra en la figura 54b.



b)

```
S.C. 1 atgggtgactggagtgacctggggaagcttctggacaaggtccaagcctactccaccgct 60
      |||
R.S. 1 atgggtgactggagtgacctggggaagcttctggacaaggtccaagcctactccaccgct 60

S.C. 61 ggagggaaaggtgtggctgtcagtgctcttcatattcagaatcctgctcctggggacagct 120
      |||
R.S. 61 ggagggaaaggtgtggctgtcagtgctcttcatattcagaatcctgctcctggggacagct 120

S.C. 121 gttgagtcagcttggggtgatgaacagctctgcttctcgctgtaaacactcaacaacctggc 180
      |||
R.S. 121 gttgagtcagcttggggtgatgaacagctctgcttctcgctgtaaacactcaacaacctggc 180

S.C. 181 tgcgaaaaagctctgctatgacaagctcctcccatctctcacgtgcgcttctgggctcct 240
      |||
R.S. 181 tgcgaaaaagctctgctatgacaagctcctcccatctctcacgtgcgcttctgggctcct 240

S.C. 241 cagatcatattcgtgtctgtgccaccctcctgtaactggccatgtgttctatgtgatg 300
      |||
R.S. 241 cagatcatattcgtgtctgtgccaccctcctgtaactggccatgtgttctatgtgatg 300

S.C. 301 aggaaggaagagaagctaaacaagaaagaagaggagctcaaagtggcccagactgacggg 360
      |||
R.S. 301 aggaaggaagagaagctaaacaagaaagaagaggagctcaaagtggcccagactgacggg 360

S.C. 361 gtcaacgtggagatgcacctgaagcagattgaaatcaagaagtccaagtacgggatgaa 420
      |||
R.S. 361 gtcaacgtggagatgcacctgaagcagattgaaatcaagaagtccaagtacgggatgaa 420

S.C. 421 gagcacggcaaggtgaaaatgagggcggttctgctgagaacctacatcatcagcatcctc 480
      |||
R.S. 421 gagcacggcaaggtgaaaatgagggcggttctgctgagaacctacatcatcagcatcctc 480

S.C. 481 ttcaagtctgtcttcgaggtggccttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc 540
      |||
R.S. 481 ttcaagtctgtcttcgaggtggccttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc 540

S.C. 541 ttgagcgcggtctacacctgcaagagagatccctgccccaccaggtagactgcttctcctc 600
      |||
R.S. 541 ttgagcgcggtctacacctgcaagagagatccctgccccaccaggtagactgcttctcctc 600

S.C. 601 tcacgtcccacggagaaaaaccatcttcatcatcttcatgctggtggtgctccttggtgct 660
      |||
R.S. 601 tcacgtcccacggagaaaaaccatcttcatcatcttcatgctggtggtgctccttggtgct 660

S.C. 661 ctcgcttgaacatcattgagctcttctacgtcttcttcaaggcggttaaggatcgcggtg 720
      |||
R.S. 661 ctcgcttgaacatcattgagctcttctacgtcttcttcaaggcggttaaggatcgcggtg 720

S.C. 721 aagggaagaagcgatccttaccacgccaccactggcccactgagcccatcaaaagactgc 780
      |||
R.S. 721 aagggaagaagcgatccttaccacgccaccactggcccactgagcccatcaaaagactgc 780

S.C. 781 ggatctccaaaataccgcctacttcaatggctgctcctcaccaacggctccactctcgctc 840
      |||
R.S. 781 ggatctccaaaataccgcctacttcaatggctgctcctcaccaacggctccactctcgctc 840

S.C. 841 atgtctcctcctgggtacaagctggttactggtgacagaaacaattcctcgtgccgcaat 900
      |||
R.S. 841 atgtctcctcctgggtacaagctggttactggtgacagaaacaattcctcgtgccgcaat 900

S.C. 901 tacaacaagcaagctagcagcaaaaactggcgaaactacagcgcagagcaaaaatcgcatg 960
      |||
R.S. 901 tacaacaagcaagctagcagcaaaaactggcgaaactacagcgcagagcaaaaatcgcatg 960

S.C. 961 gggcaggccggaagcaccatctccaactcgacgcccagccgcttcgatttcccgcagcac 1020
      |||
R.S. 961 gggcaggccggaagcaccatctccaactcgacgcccagccgcttcgatttcccgcagcac 1020

S.C. 1021 aaccagaatgccaaaaagtgtgctgctggacatgaactccagccattagccatcgtggac 1080
      |||
R.S. 1021 aaccagaatgccaaaaagtgtgctgctggacatgaactccagccattagccatcgtggac 1080

S.C. 1081 caacgaccttccagcagagccagcagccgcccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 1140
      |||
R.S. 1081 caacgaccttccagcagagccagcagccgcccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 1140

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

Figura 54. Esquema y resultado del alineamiento de la secuenciación de la conexina43 mutada en los residuos Y247 e Y265 con la secuencia del mRNA de la conexina43.

a) Esquema de la Cx43 que ha sido mutada en los residuos Y247 e Y265 del extremo carboxilo terminal por fenilalaninas. b) La secuencia del cDNA de la Cx43 obtenida mediante secuenciación automática a partir de la construcción plasmídica pIres-Cx43Y247F/Y265F (R.S.: Resultado de la secuenciación) se alineó frente a la secuencia del cDNA de la proteína Cx43 de rata, con número de identificación NM 012567 (S.C.: Secuencia de la Cx43) utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). El resultado del alineamiento muestra un 100% de homología, exceptuando los dos residuos mutados. Los nucleótidos mutados se resaltan en rojo y rodeados por un cuadro verde.

Las células C6 de glioma se tranfectaron con la nueva construcción pIres-Cx43Y247F/Y265F y se seleccionaron clones que se denominaron C6-Cx43Y247F/Y265F. Se sembraron y una vez llegaron a la confluencia se recogieron las proteínas para analizar la expresión de la Cx43 mediante una transferencia tipo Western y se analizó la permeabilidad mediante la técnica del *scrape loading*.

En la figura 55a se muestra el Western blot de la Cx43 de las células C6-Cx43Y247F/Y265F (clones 1 y 2) y se compara con la expresión de la Cx43 en las células C6-Ires y C6-Cx43. Aunque no se han conseguido clones con niveles de expresión de Cx43 similares a los niveles expresados por las células C6-Cx43, sí tienen más expresión de Cx43 que las células C6-Ires. No obstante, no podemos descartar que la mutación afecte al reconocimiento del anticuerpo empleado.

La permeabilidad de los clones de las células C6-Cx43Y247F/Y265F se muestra en la figura 55b, observándose que tienen una permeabilidad más alta que las células C6-Ires, aunque no llegan a tener tanta como las células C6-Cx43. Los niveles de permeabilidad de los clones C6-Cx43Y247F/Y265F son proporcionales al nivel de expresión de la Cx43.

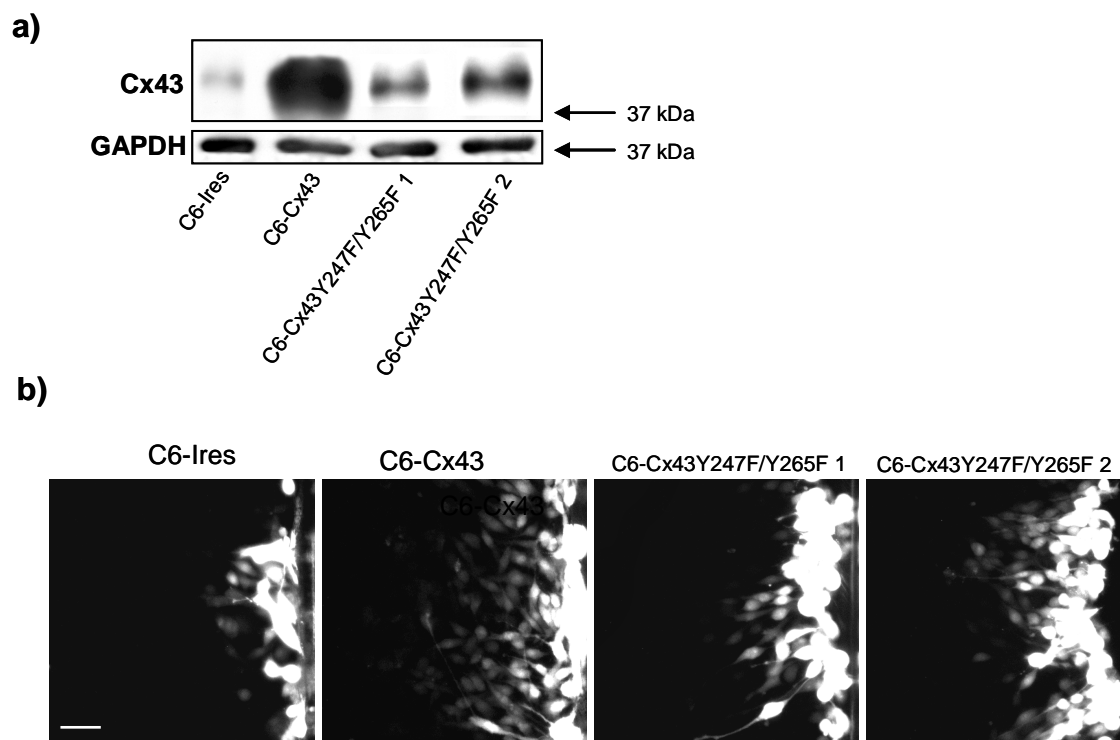


Figura 55. Expresión de la conexina43 y determinación de la permeabilidad en las células de glioma C6 transfectadas.

Las células C6-Ires, C6-Cx43 y 2 de los clones seleccionados de células C6 transfectados con la construcción pIres-Cx43Y247F/Y265F, numerados 1 y 2, se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm². Una vez llegaron a la confluencia se procesaron para su análisis. **a)** Western blot de la expresión de la Cx43. Como control de carga se utilizó GAPDH. **b)** Permeabilidad intercelular. El corte para cargar el colorante se realizó en la parte derecha de las imágenes. Barra= 40 μ m.

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.

Una vez seleccionados los clones establemente transfectados, se analizó la expresión de la forma activa de c-Src y c-Src total mediante una transferencia tipo Western. En la figura 56a se muestra el Western blot de c-SrcY416 observándose que la actividad de c-Src es claramente más alta en las células C6-Cx43Y247F/Y265F que en las células C6-Cx43, e incluso es ligeramente superior que la encontrada en las células C6-Ires. Sin embargo la expresión de c-Src total no varía en ninguno de los tipos celulares (Fig. 56b).

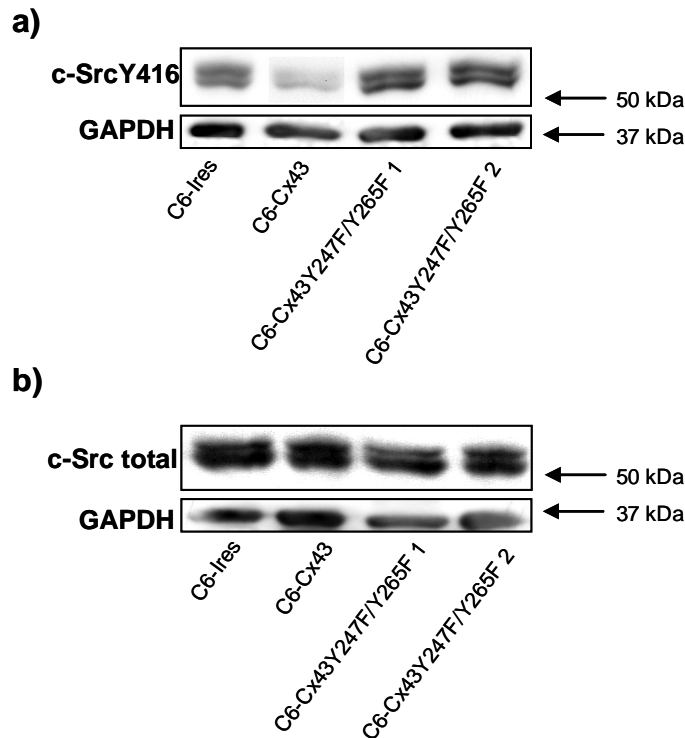


Figura 56. Expresión y actividad de c-Src en las células C6-Cx43Y247F/Y265F.

Las células C6-Ires, C6-Cx43 y los clones seleccionados de las células C6-Cx43Y247F/Y265F (1 y 2) se resembraron. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de la forma activa de c-Src y de c-Src total mediante análisis de transferencia tipo Western. **a)** Western blot de c-SrcY416. Como control de carga se utilizó GAPDH. **b)** Western blot de c-Src total. Como control de carga se utilizó GAPDH.

Una vez conocido que la actividad de c-Src no disminuye al transfectar las células de glioma C6 con la Cx43 mutada en los residuos que son fosforilados por c-Src, decidimos analizar la velocidad de proliferación de los clones C6-Cx43Y247F/Y265F mediante ensayos de MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Para ello, las células C6-Ires, C6-Cx43 y C6-Cx43Y247F/Y265F (clones 1 y 2) se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm² y se determinó la curva de crecimiento siguiendo el número de células vivas a lo largo del tiempo analizado mediante el ensayo del MTT (Fig. 57). Los resultados se expresaron como porcentaje de la absorbancia más alta de MTT (C6-Cx43Y247F/Y265F, 6 días). Los resultados obtenidos muestran que ambos clones de células C6-Cx43Y247F/Y265F tienen una velocidad de proliferación mayor que las células C6-Cx43 y sorprendentemente mayor que las células C6-Ires. Además, la velocidad de proliferación en los clones de las células C6-Cx43Y247F/Y265F es mayor cuanto más alta es la expresión de la Cx43 mutada en los residuos Y247 e Y245.

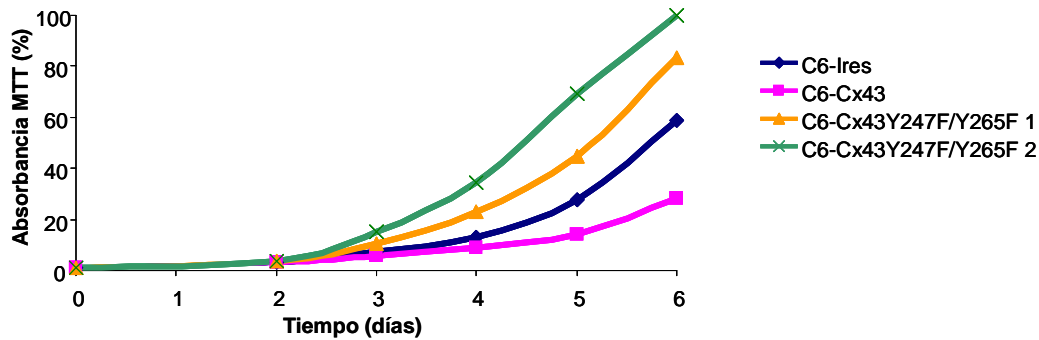


Figura 57. Velocidad de crecimiento en las células de glioma C6, C6-Ires y C6-Cx43.

Las células de glioma, C6-Ires, C6-Cx43 y los clones seleccionados de las células C6-Cx43Y247F/Y265F (1 y 2) se resembraron a una densidad de 2.000 células/ cm². a) A partir de 0 h después de la transfección y durante 6 días se hicieron medidas del número de células viables por placa mediante el método del MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de la absorbancia encontrada respecto a la condición que mostró mayor absorbancia (C6-Cx43Y247F/Y265F 2, 6 días).

Una vez conocido el nivel de expresión de la Cx43, la permeabilidad y la velocidad de proliferación de los clones de las células C6-Cx43Y247F/Y265F elegimos el clon número 2 para analizar la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular, ya que este clon es el que mayor expresión de Cx43 mutada tiene y mayor permeabilidad.

Así, analizamos los niveles de expresión de las ciclinas D1, D3 y E y de los CKIs p21 y p27. Para ello, se resembraron las células C6-Ires, C6-Cx43 y C6-Cx43Y247F/Y265F. Cuando las células llegaron a la confluencia se recogieron proteínas y se analizó la expresión de las proteínas anteriormente mencionadas mediante un análisis de transferencia tipo Western.

La figura 58 muestra los Western blot de las ciclinas D1, D3 y E y de p21 y p27. Como control de carga se utilizó GAPDH. En ella se observa que, a excepción de la ciclina E, los niveles de expresión de estas proteínas en las células C6-Cx43Y247F/Y265F son menores que los encontrados en las células C6-Cx43 y muy similares a los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D3 y de p21 y p27 en las células C6-Ires. La expresión de la ciclina E no varía en ninguno de los tres tipos celulares.

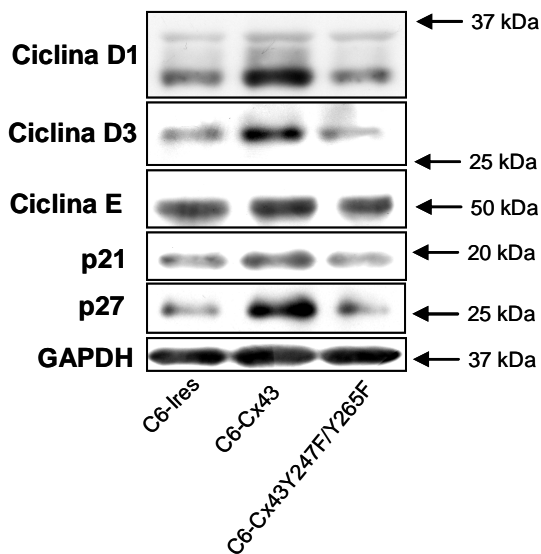


Figura 58. Expresión de las ciclinas D1, D3 y E y de los CKIs p21 y p27 en las células C6-Cx43Y247F/Y265F.

Las células C6-Ires, C6-Cx43 y C6-Cx43Y247F/Y265F se sembraron. Cuando las células llegaron a la confluencia se determinó la expresión de las ciclinas D1, D3, E y de los CKIs p21 y p27 mediante análisis de transferencia tipo Western. Como control de carga se utilizó GAPDH.

Como ya se ha mostrado en el apartado 4.2.5.1 de resultados, la expresión de la ciclina E no varía en las C6-Cx43 asíncronas respecto a las células C6-Ires (véase figura 40). Sin embargo su expresión es muy inferior en las células C6-Cx43 10 h después de su sincronización en la fase G0/G1 cuando se compara con las C6-Ires (véase figura 41). Por ello, decidimos sincronizar los tres tipos celulares en la fase G0/G1 y recoger las proteínas 10 h después para analizar la expresión de la ciclina E mediante una transferencia tipo Western. Además decidimos analizar, también, la expresión de p27, ya que es el principal inhibidor de las CDKs.

Nuestros resultados muestran que la expresión de la ciclina E en las células C6-Cx43Y247F/Y265F 10 h después de sincronizarlas en las fase G0/G1 del ciclo celular es más alta que la encontrada en las células C6-Cx43 en sus mismas condiciones, mientras que la expresión de p27 es más baja, siendo las expresiones de estas proteínas muy similares a los niveles de ciclina E y p27 encontrados en las células C6-Ires 10 h después de su sincronización en la fase G0/G1 (Fig. 59).

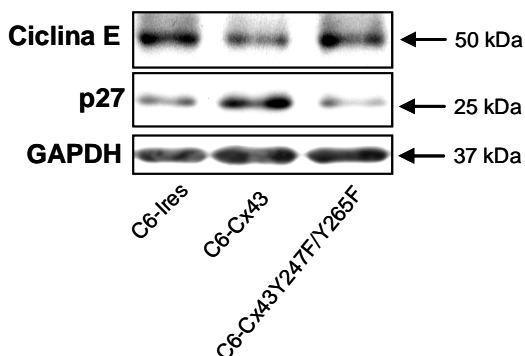


Figura 59. Expresión de la ciclina E y p27 a las 10h después de sincronizar el ciclo celular en la fase G0/G1 en las células C6-Cx43Y247F/Y265F.

Las células C6-Ires, C6-Cx43 y C6-Cx43Y247F/Y265F se sincronizaron en las fases G0/G1 y se añadió DMEM + suero (10%). Se recogieron las proteínas 10h después de la sincronización y se determinó la expresión de la ciclina E y p27 mediante análisis de transferencia tipo Western. Como control de carga se utilizó GAPDH.

5. DISCUSIÓN

En el Sistema Nervioso Central (SNC), los astrocitos se encuentran comunicados a través de las uniones comunicantes, formando una red sincitial que mantiene la homeostasis iónica, metabólica y funcional. La comunicación intercelular es fundamental para controlar, entre otros, procesos como la proliferación y la diferenciación de las células (Loewenstein and Kanno 1966). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que la inhibición de las uniones comunicantes en astrocitos provoca un aumento de la proliferación que se refleja en un aumento de las ciclinas D1 y D3, de la proteína Ki-67 y del número de células en la fase S y G2/M del ciclo celular (Taberner et al. 2006). Por otro lado, la apertura de las uniones comunicantes en células de glioma C6 disminuye el grado de proliferación (Sanchez-Alvarez et al. 2006; Sánchez-Alvarez et al. 2001), lo que sugiere que existe una clara relación entre la comunicación intercelular y el grado de proliferación. En este sentido en los gliomas, los tumores más frecuentes del SNC, los niveles de comunicación intercelular y la expresión de la conexina 43 (Cx43), la proteína mayoritaria de las uniones comunicantes en astrocitos (Dermietzel et al. 1991; Giaume et al. 1991a), son muy bajos (Holden et al. 1997; Laird et al. 1999; Saito et al. 2001) y se correlacionan inversamente con el grado de malignidad (Huang et al. 1999; Soroceanu et al. 2001). Asimismo, se ha observado en células altamente proliferativas que, tanto la introducción directa del gen de la Cx43 (Hirschi et al. 1996; Huang et al. 1998; Mehta et al. 1991; Mesnil et al. 1995; Zhu et al. 1991), como la estimulación farmacológica de la permeabilidad de las uniones comunicantes reducen la proliferación. Por todo ello, se considera a la Cx43 una proteína supresora de tumores. No obstante, los mecanismos moleculares que relacionan la comunicación intercelular mediada por la Cx43 con la proliferación, no están todavía claros. Por ello, en este trabajo hemos abordado el estudio del mecanismo que relaciona la Cx43 con la proliferación en las células gliales. Para ello, hemos utilizado dos estrategias; una de pérdida y otra de ganancia de función de la Cx43.

5.1. Efecto de la disminución de la expresión de la conexina43 en los astrocitos

Como estrategia de pérdida de función de la Cx43, empleamos astrocitos, que expresan unos altos niveles de Cx43, y evaluamos la proliferación en estas células tras el silenciamiento de la Cx43 por siRNA. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la proliferación en los astrocitos en los que se silenció la Cx43, a juzgar por el mayor número de células y el aumento en la expresión de Ki-67, una proteína presente durante todas las fases activas del ciclo celular (Endl and Gerdes 2000). Nuestros resultados indican que este aumento en la proliferación está mediado por la ciclina D3, pero no por la ciclina D1. Las ciclinas D son las primeras que se activan en el ciclo celular y funcionan como sensores de factores de crecimiento (Sherr 1994b). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la ciclina D3, además de ser un sensor de factores de crecimiento actúa como un sensor de la pérdida de la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes. Como consecuencia del aumento en la expresión de la ciclina D3, se activa CDK4 y se observa un aumento en la fosforilación de la serina780 de la proteína del retinoblastoma (pRb). La serina780 del pRb se ha identificado como uno de los

primeros residuos del pRb en fosforilarse en la fase G1 (Kitagawa et al. 1996). En resumen, la pérdida de la Cx43 en los astrocitos es una señal proliferativa mediada por la ciclina D3.

Las endotelinas (ETs) constituyen una familia de péptidos formada al menos por 3 isoformas: ET-1, ET-2 y ET-3. La ET-1 se ha identificado como un potente péptido vasoconstrictor producido por las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Yanagisawa et al. 1988), también se encuentra en las células endoteliales del SNC (Yoshimoto et al. 1990), en las neuronas (Fuxe et al. 1991) y en los astrocitos (MacCumber et al. 1990). La secreción de la ET-1 aumenta en numerosas patologías del SNC, entre las que se encuentran los gliomas (Stiles et al. 1997). Este péptido se comporta como factor de crecimiento en los astrocitos produciendo importantes efectos biológicos, como la inducción de la proliferación (Gadea et al. 2008; Supattapone et al. 1989; Tabernero et al. 2001; Teixeira et al. 2000). Dado que la ET-1 disminuye la expresión de la Cx43 (Giaume et al. 1992; Herrero-Gonzalez et al. 2009; Tabernero et al. 2006), nos planteamos si el efecto mitogénico de la ET-1 en los astrocitos estaba mediado por la reducción de la Cx43, ya que como se ha visto, la disminución de la Cx43 es una señal mitogénica. En efecto, nuestros resultados muestran que la disminución de la expresión de la Cx43 es necesaria para el efecto mitogénico de la ET-1, ya que en ausencia de la Cx43 el efecto proliferativo de la ET-1 es menor, a juzgar por la expresión de Ki-67, la fosforilación del pRb en la serina780, y en la expresión de la ciclina D3. Sin embargo, la ET-1 ejerce, también, un efecto mitogénico independiente de la Cx43, ya que en ausencia de la Cx43, la ET-1 consigue fosforilar la serina 795 del pRb y aumentar la expresión de la ciclina D1 aunque en menor medida que presencia de la Cx43.

Con objeto de averiguar si *in vivo* la reducción de la Cx43 en los astrocitos está relacionada con un aumento de la proliferación de estas células, elegimos un modelo de lesión cerebral caracterizado por una gliosis reactiva que se acompaña de una disminución de la Cx43 en los astrocitos (Koulakoff et al. 2008). Analizamos la proliferación de los astrocitos en este modelo experimental y comprobamos que se produce la incorporación del BrdU, acompañada de un aumento de las ciclinas D1 y D3, sugiriendo que estas dos proteínas están implicadas en la inducción de la proliferación en este modelo experimental. En resumen, la disminución de la Cx43 en los astrocitos *in vivo*, se acompaña de un aumento de la proliferación causado por el aumento de las ciclinas D1 y D3. Hay que destacar el interés de conocer la participación de la Cx43 en la gliosis reactiva ya que este proceso tiene un papel protector del sistema nervioso ante una lesión. Así, en ausencia de gliosis reactiva la muerte neuronal que se produce es mucho mayor (Chvatal et al. 2008; Faulkner et al. 2004; Gordon et al. 2008).

5.2. Efecto de la sobreexpresión de la conexina43 en células de glioma C6.

Una vez establecida la relación entre la pérdida de la comunicación y el aumento de la proliferación en astrocitos, así como la participación de las ciclinas D, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de la Cx43 en células de glioma C6 como estrategia de ganancia de función. Elegimos estas células por presentar bajos niveles de Cx43 y una escasa comunicación intercelular. Tras transfectar con el cDNA de la Cx43 y seleccionar diferentes clones con diferentes niveles de Cx43 confirmamos que a mayores niveles de expresión de la Cx43 hay una mayor comunicación intercelular y una menor proliferación celular.

Nuestro siguiente objetivo fue conocer la fase o fases del ciclo celular que estaban modificadas por la sobreexpresión de la Cx43 en las células de glioma C6. Los resultados obtenidos, tanto en las células asíncronas como en las células sincronizadas en la fase G0/G1, muestran que la Cx43 reduce el paso de células desde las fases G0/G1 a la fase S. Por otro lado, la transición de la fase S a G2/M ó G2/M a G0/G1 no se vio modificada por la presencia de la Cx43. En conclusión, la presencia de la Cx43 en las células de glioma C6 frena específicamente el paso de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular.

En trabajos previos se ha descrito que la Cx43 expresada endógenamente experimenta modificaciones en la fosforilación, localización y funcionalidad a lo largo del ciclo celular (Para revisión, véase: Solan and Lampe 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro siguiente objetivo fue conocer si la Cx43 sobreexpresada en células de glioma C6 sufría las modificaciones descritas para la Cx43 expresada endógenamente en otras células durante el ciclo celular. Los resultados obtenidos indican que la comunicación intercelular en las células de glioma C6 que sobreexpresan la Cx43 se modifica a lo largo del ciclo celular, encontrándose un incremento de la comunicación entre las 10 y 12h después de la sincronización del ciclo en las fases G0/G1. Este incremento coincide con el paso de las células de la fase G0/G1 a S, que es ligera en las células que sobreexpresan la Cx43, sin embargo muy acentuada en las células sin comunicación. Estos resultados sugieren que el aumento de la comunicación podría estar implicado en el retraso de la entrada a la fase S de las células de glioma C6-Cx43. Estos cambios en la comunicación intercelular se ven acompañados por cambios postraduccionales de la Cx43, concretamente, se observa una elevada fosforilación de la Cx43 y un cambio en la localización hacia la membrana plasmática para formar las placas características de las uniones comunicantes. En resumen, la Cx43 exógena experimenta las mismas modificaciones que la Cx43 endógena a lo largo del ciclo celular, aumentando su función, fosforilación y localización en la membrana plasmática en el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S.

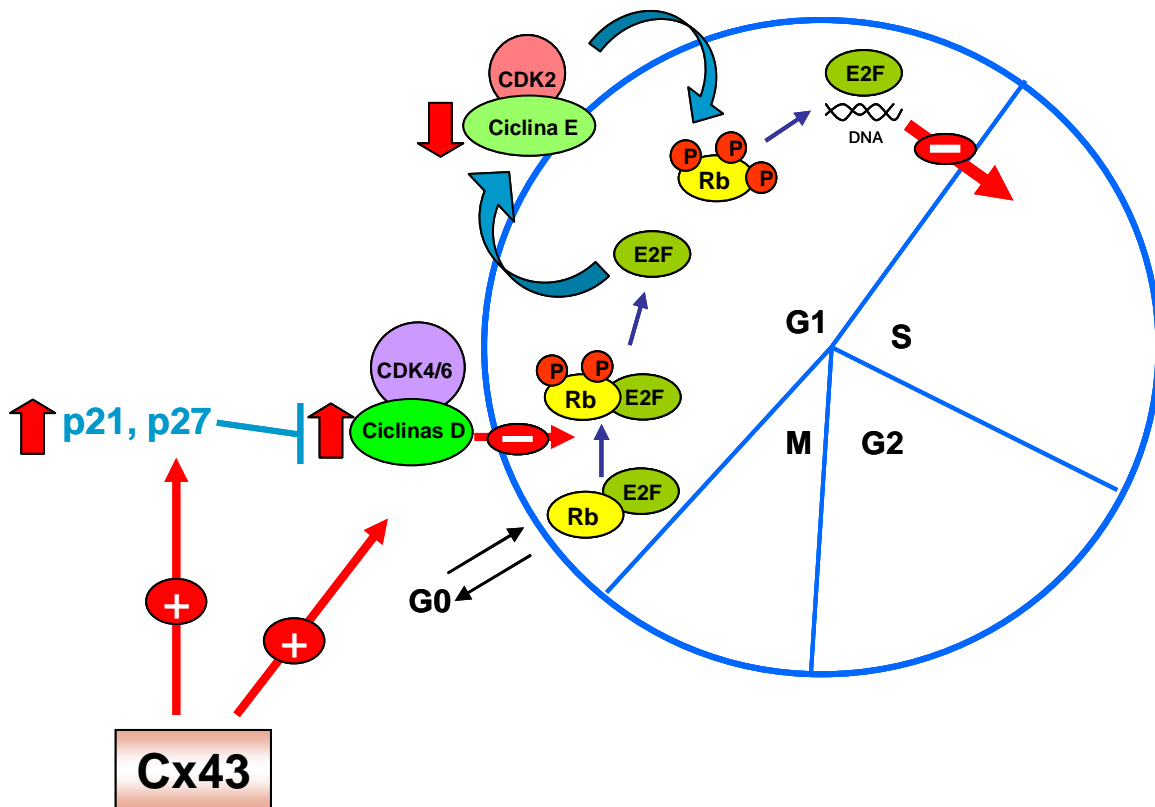
Una vez conocido que la Cx43 ralentiza el tránsito de las fases G0/G1 a la fase S quisimos averiguar qué proteínas reguladoras del ciclo celular estaban implicadas en este efecto. En este sentido la sobreexpresión de la Cx43 en células de osteosarcoma humano

(UO2S) produce un incremento del inhibidor de CDKs, p27 (Zhang et al. 2001; Zhang et al. 2003c). Además, en células de glioma C6 el aumento de expresión de la Cx43 por tolbutamida y dbcAMP provoca también, un aumento de p27 y de p21, otra proteína inhibidora de CDKs (Sanchez-Alvarez et al. 2006). En efecto, nuestros resultados confirman que la sobreexpresión de la Cx43 aumenta la expresión de p27 y p21. De hecho, los niveles de estos dos inhibidores se mantienen altos a lo largo del ciclo celular. Probablemente, como consecuencia, los niveles de fosforilación del pRb no se modifican en las células C6 que sobreexpresan la Cx43, mientras que en las células de glioma C6 la fosforilación aumenta cuando las células comienzan la entrada en la fase S del ciclo celular.

La expresión de la ciclina E depende del factor de transcripción E2F, que se libera del pRb cuando éste alcanza un cierto nivel de fosforilación (Para revisión, véase: Malumbres and Barbacid 2001; Malumbres and Barbacid 2009). En las células que sobreexpresan la Cx43, el aumento de la expresión de la ciclina E está muy retrasado y es muy corto en el tiempo. Puesto que la ciclina E promueve la fosforilación del pRb necesaria para continuar el ciclo celular, esta disminución en los niveles de ciclina E en las células que sobreexpresan la Cx43 en el momento de la transición de G1 a S, puede ser la responsable de la parada de estas células en G0/G1.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en astrocitos, analizamos la expresión de las ciclinas D1 y D3, ya que son las principales ciclinas reguladoras del tránsito de la fase G0/G1 a la fase S. Sorprendentemente, ambas ciclinas tienen una expresión elevada y apenas experimentan modificaciones en su expresión a lo largo del ciclo celular en las células que sobreexpresan la Cx43. Sin embargo en las células de glioma C6 aumentan su expresión entre las 0 y 10 h después de la sincronización celular, coincidiendo con el tránsito de G0/G1 a la fase S y disminuyéndola su expresión cuando las células terminan el ciclo celular.

Estos resultados tomados en su conjunto indican (esquema 19) que la Cx43 provoca un aumento en la expresión de las ciclinas D1 y D3, responsables de la activación de CDK4/6, así como de los inhibidores de estas kinasas p21 y p27. El balance neto parece ser una menor fosforilación del pRb por CDK4/6 y como consecuencia una menor expresión de la ciclina E. La disminución de la ciclina E podría ser la responsable del retraso en la entrada en la fase S del ciclo celular en las células de glioma C6. Aunque las ciclinas D pueden considerarse factores promitóticos o indicadores de la malignidad celular en los gliomas (Sherr 1994b), nuestros resultados indican que un aumento de p27 ó p21 pueden contrarrestar el efecto del aumento de las ciclinas D sobre la proliferación. Así la Cx43 aumenta los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D3 pero como también aumenta p21 y p27 consigue disminuir la proliferación. Por tanto los inhibidores de las CDKs p21 y p27 parecen ser una excelente diana terapéutica en gliomas puesto que consiguen contrarrestar el efecto proliferativo de las ciclinas D1 y D3.



Esquema 19. Mecanismo propuesto para la regulación del ciclo celular por la Cx43

5.2.1. Relación de la conexina43 con la actividad de c-Src.

Una vez conocida la participación de las proteínas reguladoras del ciclo celular en el efecto antiproliferativo de la Cx43, quisimos investigar la vía de señalización que emplea la Cx43. En este sentido, el extremo carboxilo terminal de la Cx43 interacciona con numerosas proteínas y muchas de ellas están relacionadas con la proliferación celular. Nuestra hipótesis es que la interacción de la Cx43 con alguna de estas proteínas desencadena la vía de señalización que reduce la proliferación. En este trabajo nos hemos centrado en la proteína c-Src por su conocida capacidad oncogénica. De hecho la sobreexpresión de v-Src, la forma activa de c-Src, en fibroblastos provoca los cambios opuestos en la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular a los encontrados al sobreexpresar la Cx43 (Chu et al. 2007; Frame 2004; Riley et al. 2001). En efecto, nuestros resultados muestran que un inhibidor clásico de c-Src, como es PP2 disminuye de forma muy importante la proliferación de las células de glioma. De hecho esta inhibición se acompaña de un aumento en la expresión de los inhibidores de CDKs p21 y p27. Sorprendentemente, la inhibición de c-Src también aumenta los niveles de las ciclinas D1 y D3 de forma similar a los resultados obtenidos con la sobreexpresión de Cx43, apuntando a la implicación de c-Src en el efecto antiproliferativo de la Cx43.

Por tanto nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de la sobreexpresión de la Cx43 en la actividad de c-Src. Nuestros resultados muestran claramente que la Cx43 disminuye drásticamente la actividad de c-Src determinada por la fosforilación de c-SrcY416. Por otro lado, cuando analizamos la actividad de c-Src a lo largo del ciclo celular, encontramos que en las células de glioma C6 la actividad de c-Src aumenta en paralelo a la fase G2/M. De acuerdo con estos resultados se ha sugerido que c-Src participa en la fase G2/M (Bromann et al. 2004). Así, las inmunocitoquímicas muestran que la forma activa de c-Src, durante la fase G2/M, se aproxima al núcleo, probablemente incluyéndose en el centrosoma. En este sentido, David-Pfeuty y col. han mostrado que c-Src se localiza rodeando los centriolos durante la fase G2 (David-Pfeuty et al. 1993). Nuestros resultados muestran el cambio de distribución de c-Src activo de una forma compatible a los cambios que experimenta el centrosoma en la fase G2/M. Finalmente, hemos podido comprobar que c-Src activo se localiza en el núcleo de las células recién divididas.

La sobreexpresión de la Cx43 provoca una disminución de la actividad de c-Src a lo largo del ciclo celular que alcanza su nivel mínimo en el momento en que las células deberían comenzar a entrar en G2/M. En estas células c-Src activo se localiza también en una estructura relacionada posiblemente con el centrosoma pero en un porcentaje menor de células y a tiempos posteriores a los observados en las células de glioma C6. Además, los niveles de actividad de c-Src están inversamente relacionados con la cantidad de Cx43 presente en la célula, que como ya hemos mencionado, sufre importantes variaciones a lo largo del ciclo celular. De esta manera, en el momento en el que la célula comenzaría su paso de G1 a S, aumenta la expresión de Cx43 y disminuye la actividad de c-Src, sugiriendo que un fenómeno es consecuencia del otro.

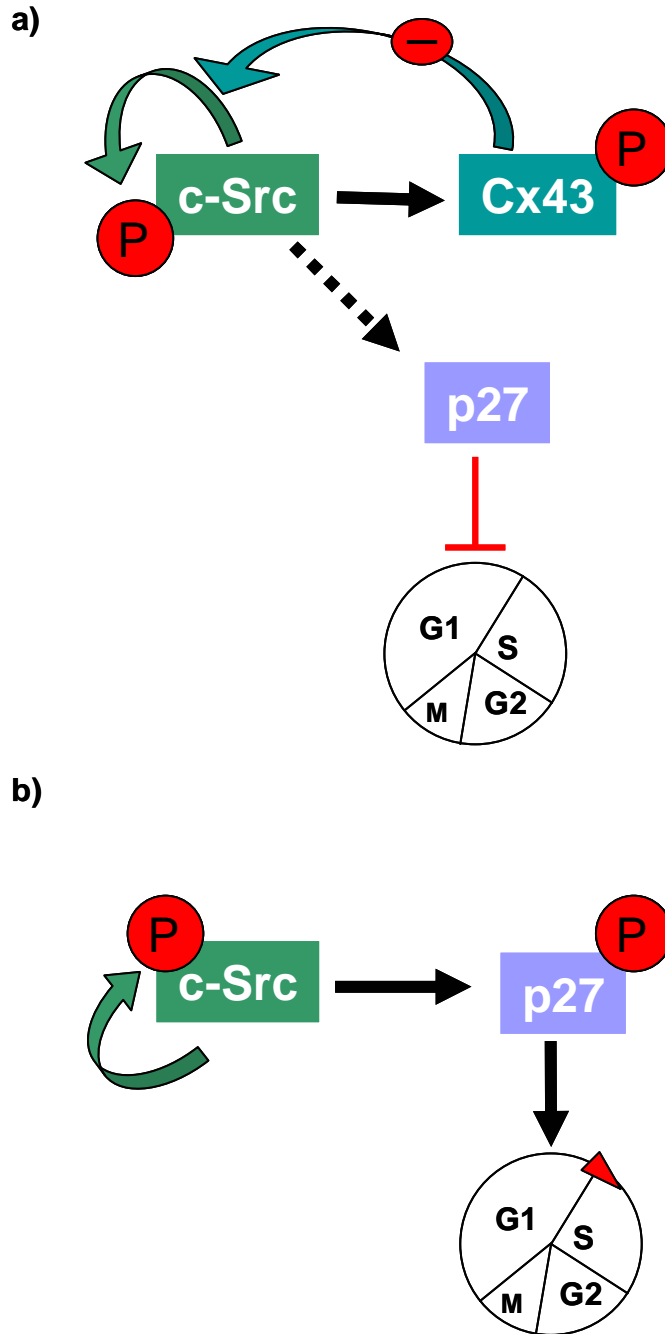
Se ha visto que c-Src está involucrado en la formación de podosomas, estructuras de adhesión ricas en actina formadas en la membrana plasmática en contacto con la matriz extracelular. Estas estructuras están implicadas en la migración de las células tumorales por la matriz extracelular (Oikawa et al. 2008; Spinardi and Marchisio 2006). En este sentido, las inmunocitoquímicas de c-Src total muestran que esta proteína se localiza en estructuras tipo podosomas en las células de glioma C6, mientras que en las células que sobreexpresan la Cx43 se observan muy pocas estructuras de este tipo, sugiriendo que la sobreexpresión de la Cx43 podría reducir la formación de los podosomas que permiten la migración de las células tumorales. En este sentido, el efecto de la Cx43 sobre la migración celular es un área ampliamente estudiada (Cina et al. 2007; Cina et al. 2009; Elias et al. 2007). Los resultados presentados en esta memoria sugieren que cuando las células tienen una alta actividad de c-Src, la Cx43 puede inhibir su localización en los podosomas, y por tanto, probablemente se regula la migración, aunque este fenómeno no ha sido objetivo de estudio en este trabajo.

Con objeto de profundizar en la relación entre la Cx43 y c-Src, inmunoprecitamos la Cx43 y encontramos que c-Src total y la forma activa de c-Src interactúan en la célula. Los análisis de inmunocitoquímica confirman la colocalización entre estas dos proteínas. Trabajos previos de diversos autores muestran que la Cx43 es un sustrato de c-Src, concretamente, c-Src fosforila el extremo carboxilo de la Cx43 en el residuo Y265 y en el Y247, provocando el cierre de las uniones comunicantes (Giepmans et al. 2001a; Kanemitsu et al. 1997; Lin et al. 2001). Aunque es bien conocido el efecto de c-Src sobre la Cx43 y su función, hasta el momento se desconocía que la Cx43 también pudiera modificar la función de c-Src. Así, los resultados recogidos en esta memoria describen claramente que la Cx43 inhibe la actividad de c-Src. Puesto que se ha propuesto que la interacción máxima entre c-Src y Cx43 se establece cuando la Cx43 está fosforilada en los residuos Y247 e Y265 pensamos que esta fosforilación podría ser importante para el efecto de la Cx43 sobre la proliferación celular. Por ello, decidimos investigar el efecto de la Cx43 mutada en estos dos residuos sobre la actividad de c-Src y la proliferación de las células de glioma. Esta mutación consistió en la sustitución de la Y247 e Y265 por fenilalaninas para impedir que c-Src fosforilara la Cx43.

Nuestros resultados muestran que cuando la Cx43 no puede ser fosforilada por c-Src en los residuos Y247 e Y265 pierde su capacidad de inhibir la actividad oncogénica de c-Src. De hecho no solamente no consigue disminuir la proliferación de las células de glioma sino que incluso la aumenta. La sobreexpresión de la Cx43 mutada no modifica la expresión de las ciclinas D1, D3 y E, ni de los inhibidores de CDKs p21 y p27. En conclusión, la Cx43 inhibe la actividad oncogénica de c-Src gracias a su capacidad de ser fosforilada por esta kinasa en la Y247 e Y265. En cuanto al motivo por el que la fosforilación de la Cx43 por c-Src es crítica en el control de la proliferación, podemos proponer varios mecanismos, no excluyentes entre sí. En primer lugar la fosforilación de la Cx43 por c-Src provoca cambios en la capacidad de la Cx43 de interacción con otras proteínas como ZO-1 (Gilleron et al. 2008; Sorgen et al. 2004; Toyofuku et al. 2001). ZO-1 es una proteína de andamiaje que mantiene a la Cx43 estabilizada en la membrana plasmática y que participe en la regulación de la proliferación (Sourisseau et al. 2006).

Además, Chu y col. han mostrado que c-Src fosforila p27 en las tirosinas 74 y 88. Estas fosforilaciones reducen la vida media de p27, acelerando su proteólisis y como consecuencia los niveles de p27 en la célula son menores. A su vez, p27 fosforilado por c-Src tiene menor capacidad de inhibir el complejo ciclina E-CDK2. Todo ello, en su conjunto, implica un aumento en la velocidad del ciclo celular (Chu et al. 2007). Los resultados recogidos en la presente memoria apoyan este mecanismo (Esquema 20), ya que en las células con una alta actividad de c-Src, como las células de glioma, la sobreexpresión de la Cx43 podría actuar como un sustrato de c-Src que compite con p27 reduciendo la fosforilación de este inhibidor de CDKs, lo que conlleva a un aumento de la expresión de p27 en las células de glioma C6. Como consecuencia se reduce la liberación de E2F del pRb y disminuye la transcripción de la ciclina

E. De hecho nuestros resultados muestran que la Cx43 mutada en los residuos Y247 e Y265 no es capaz de aumentar los niveles de p27 ni disminuir los niveles de la ciclina E en el momento en que las células pasan de la fase G1 a la fase S.



Esquema 20. Modelo propuesto para explicar la regulación de la actividad de c-Src por la Cx43.
a) En presencia de Cx43. b) en ausencia de Cx43.

Finalmente, el hecho de que la Cx43 sea un sustrato de c-Src implica, como ya se ha mencionado, la competencia con otro sustrato de c-Src. En este sentido, no hay que olvidar que c-Src se autofosforila en la tirosina 416 (Frame 2002; Xu et al. 1997). Por tanto, no sería descabellado pensar que la Cx43 al actuar de sustrato de c-Src inhiba la autofosforilación y por tanto la actividad de esta tirosina kinasa. De hecho, nuestros resultados muestran que la Cx43 disminuye la c-SrcY416, pero cuando la Cx43 está mutada en los residuos fosforilables por c-Src no modifica los niveles de c-SrcY416.

Aunque la cantidad de c-Src no se modifica en gliomas, recientemente se ha descubierto que su actividad sí está directamente relacionada con este tipo de tumores (Du et al. 2009 77). Dado que la expresión de la Cx43 disminuye en gliomas de forma inversamente proporcional a la malignidad de los tumores, podría sugerirse, en base a los resultados recogidos en la presente memoria, que existe una relación entre la disminución de la Cx43 y el aumento de la actividad de c-Src en gliomas y por tanto, que la Cx43 podría representar una excelente diana terapéutica por su capacidad de inhibir este oncogén.

6. CONCLUSIONES

1. El silenciamiento de la conexina43 en los astrocitos provoca un aumento de la proliferación celular mediada por la ciclina D3 con la consiguiente fosforilación de la proteína del retinoblastoma en la serina 780. Lo que sugiere que la pérdida de la Cx43 en astrocitos podría ser una señal de proliferación.
2. En ausencia de la conexina43 disminuye el efecto de la ET-1 sobre la expresión de las ciclinas D1 y D3, y sobre la fosforilación de la proteína del retinoblastoma en la serina 780, indicando que el efecto mitogénico de la ET-1 en los astrocitos está mediado por la conexina43.
3. En el modelo de lesión cerebral causado con el ácido kaínico, la disminución de la conexina43 en los astrocitos reactivos, se acompaña de un aumento en la proliferación causado por las ciclinas D1 y D3. Estos resultados sugieren la participación de la conexina43 en la gliosis reactiva provocada por algunas lesiones cerebrales.
4. La sobreexpresión de la conexina43 en las células de glioma C6 reduce la proliferación al disminuir el tránsito de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular. En este sentido, la conexina43 aumenta la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de p21 y p27. El balance neto es una menor fosforilación de la proteína del retinoblastoma, y como consecuencia una disminución de la ciclina E, responsable del retraso en la entrada a la fase S del ciclo celular.
5. La conexina43 sobreexpresada aumenta su función, fosforilación y localización en la membrana plasmática en el tránsito de la fase G1 a S. Estos datos sugieren que las modificaciones de la conexina43 podrían estar implicadas en el retraso de la entrada a la fase S de las células de glioma que sobreexpresan la conexina43.
6. La inhibición de c-Src en las células de glioma C6 reduce drásticamente la proliferación, aumentando los niveles de las ciclinas D1 y D3 y de p21 y p27, de forma similar a los resultados obtenidos tras la sobreexpresión de la conexina43.
7. La conexina43 disminuye de forma muy importante la actividad oncogénica de c-Src en las células de glioma, modificando así mismo la translocación que experimenta este oncogén en las diferentes fases del ciclo celular.

8. La sobreexpresión de la conexina43 mutada en los residuos Y247 e Y265 no solamente no inhibe la actividad de cSrc y la proliferación, sino que las aumenta. Este efecto se debe a su incapacidad de modificar la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de p21 y p27. Lo que sugiere que cuando se impide la fosforilación de la conexina43 por c-Src se suprime totalmente el comportamiento de la conexina43 como proteína supresora de tumores en las células de glioma C6.

Conclusión final

Estos resultados tomados en su conjunto confirman el importante papel que ejerce la conexina43 en la regulación de la proliferación de los astrocitos y las células de glioma. En este sentido el papel de la conexina43 como sustrato de c-Src es crítico a la hora de regular la actividad de este oncogén y por tanto la expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott JD, Kip KE, Vlachos HA, Sawhney N, Srinivas VS, Jacobs AK, Holmes DR, Williams DO. 2006.** Recent trends in the percutaneous treatment of chronic total coronary occlusions. *Am J Cardiol* 97(12):1691-6.
- Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P. 2005.** Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 7(8):831-6.
- Araque A. 2008.** Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4(1):3-10.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W. 2002.** Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22(7):2443-50.
- Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. 1981.** A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8(4):325-31.
- Barone FC, Globus MYT, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. 1995.** Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:337-342.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. 1996.** The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8(6):805-14.
- Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. 1998.** Cyclin D3: Requirements for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17:1027-1037.
- Bennett MVL, Barrio TA, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. 1991.** Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305-320.
- Beyer EC, Steinberg TH. 1991.** Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J Biol Chem* 266(13):7971-4.
- Binmoeller FJ, Muller CM. 1992.** Postnatal-development of dye-coupling among astrocytes in rat visual-cortex. *Glia* 6(2):127-137.
- Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. 2000.** Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19(49):5620-35.
- Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. 1998.** Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem* 70:958-970.
- Bolaños JP, Medina JM. 1996.** Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 66:2091-2099.
- Bond S, Bechberger J, Khoo N, Naus C. 1994.** Transfection of C6 glioma cells with connexin 32: the effects of expression of a nonendogenous gap junction protein. *Cell Growth Differ* 5:179-186.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. 2004.** The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23(48):7957-68.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. 1996.** Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signalling. *Europ J Biochem* 238:1-27.
- Bystrom C, Larsson C, Blomberg C, Sandelin K, Falkmer U, Skogseid B, Oberg K, Werner S, Nordenskjold M. 1990.** Localization of the MEN1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5):1968-72.
- 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(3):971-81.
- Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CC. 2007.** Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J Comp Neurol* 504(3):298-313.
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. 2009.** Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci* 29(7):2009-21.
- Coleman WB, McCullough KD, Esch GL, Civalier CJ, Livanos E, Weissman BE, Grisham JW, Smith GJ. 1995.** Suppression of the tumorigenic phenotype of a rat liver epithelial tumor cell line by the p11.2-p12 region of human chromosome 11. *Mol Carcinog* 13(4):220-32.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM. 1991.** Calcium waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12:185-204.

- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990.** Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signalling. *Science* 247:470-473.
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF. 1990.** Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10(4):1754-63.
- Chauhan A, Hahn S, Gartner S, Pardo CA, Netesan SK, McArthur J, Nath A. 2007.** Molecular programming of endothelin-1 in HIV-infected brain: role of Tat in up-regulation of ET-1 and its inhibition by statins. *Faseb J* 21(3):777-89.
- Chaumontet C, Bex V, Gaillard-Sanchez I, Seillan-Heberden C, Suschetet M, Martel P. 1994.** Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 15(10):2325-30.
- Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. 1997.** Peptides homologous to extracellular loop of motifs connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J Physiol* 503.1:99-110.
- Chen SC, Pelletier DB, Ao P, Boynton AL. 1995.** Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. *Cell Growth Differ* 6(6):681-90.
- Chong YP, la KK, Mulhern TD, Cheng HC. 2005.** Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1754(1-2):210-20.
- Chu I, 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.
- Chvatal A, Anderova M, Neprasova H, Prajerova I, Benesova J, Butenko O, Verkhatsky A. 2008.** Pathological potential of astroglia. *Physiol Res* 57 Suppl 3:S101-10.
- Dang X, Jeyaraman M, Kardami E. 2006.** Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Mol Cell Biochem* 289(1-2):201-7.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ. 1992.** Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8(3):429-440.
- David-Pfeuty T, Bagrodia S, Shalloway D. 1993.** Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src overexpresser cells. *J Cell Sci* 105 (Pt 3):613-28.
- Davidson JS, Baumgarten IM. 1988.** Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 246(3):1104-7.
- Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. 1986.** Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Comm* 134:29-36.
- de Feijter-Rupp HL, Hayashi T, Kalimi GH, Edwards P, Redpath JL, Chang CC, Stanbridge EJ, Trosko JE. 1998.** Restored gap junctional communication in non-tumorigenic HeLa-normal human fibroblast hybrids. *Carcinogenesis* 19(5):747-754.
- Denicourt C, Dowdy SF. 2004.** Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev* 18(8):851-5.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC. 2000.** Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):45-56.
- Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC. 1991.** Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Didier N, Banks WA, Creminon C, Dereuddre-Bosquet N, Mabondzo A. 2002.** HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Neuroreport* 13(9):1179-83.
- Downs SM. 1995.** The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol* 167:502-512.
- 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(1):77-83.
- Eghbali B, Kessler J, Reid L, Roy C, Spray D. 1991.** Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfections of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10701-10705.

- Ehrenreich H. 1999.** The astrocytic endothelin system: toward solving a mystery focus on "distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling". *Am J Physiol* 277(4 Pt 1):C614-5.
- Ehrenreich H, Kehrl JH, Anderson RW, Rieckmann P, Vitkovic L, Coligan JE, Fauci AS. 1991.** A vasoactive peptide, endothelin-3, is produced by and specifically binds to primary astrocytes. *Brain Res* 538(1):54-8.
- El-Fouly MH, Trosko JE, Chang C-C. 1987.** A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 168:422-430.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. 2007.** Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448(7156):901-7.
- Endl E, Gerdes J. 2000.** The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257(2):231-7.
- Enkvist MOK, McCarthy KD. 1994.** Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentrations. *J Neurochem* 62(2):489-495.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. 2004.** Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24(9):2143-55.
- Frame MC. 2002.** Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602(2):114-30.
- Frame MC. 2004.** Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117(Pt 7):989-98.
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC. 2004.** CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279(35):36943-50.
- Fuxe K, Tinner B, Staines W, Hemsén A, Hersh L, Lundberg J. 1991.** Demonstration and nature of endothelin-3-like immunoreactivity in somatostatin and choline acetyltransferase-immunoreactive nerve cells of the neostriatum of the rat. *Neurosci Lett* 123:107-111.
- Gadea A, Schinelli S, Gallo V. 2008.** Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 28(10):2394-408.
- Gardner-Medwin AR. 1986.** A new framework for assessment of potassium-buffering mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 481:287-302.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ and others. 2004.** Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 279(35):36931-42.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. 1991.** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138(4):867-73.
- Giaume C, Cordier J, Glowinski J. 1992.** Endothelins inhibit junctional permeability in cultured mouse astrocytes. *Eur J Neurosci* 4:877-881.
- Giaume C, Fromaget C, El Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. 1991a.** Gap junction in cultured astrocytes: single channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.
- Giaume C, Marin P, Cordier J, Glowinski J, Premont J. 1991b.** Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5577-5581.
- Giaume C, Taberner A, Medina JM. 1997.** Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 21:114-123.
- Giaume C, Venance L. 1998.** Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24(1):50-64.
- 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(11):8544-9.
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. 2001b.** Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11(17):1364-8.
- Gilleron J, Fiorini C, Carette D, Avondet C, Falk MM, Segretain D, Pointis G. 2008.** Molecular reorganization of Cx43, Zo-1 and Src complexes during the endocytosis of

- gap junction plaques in response to a non-genomic carcinogen. *J Cell Sci* 121(Pt 24):4069-78.
- Goldberg G, Moreno A, Bechberger J, Hearn S, Shivers R, MacPhee D, Zhang Y-C, Naus C. 1996.** Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Exp Cell Res* 222:48-53.
- Gordon G, Mackow M, Lay H. 1995.** On the mechanism of interaction of steroids with human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 318:25-29.
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. 2008.** Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456(7223):745-9.
- Granda B, Tabernero A, Sánchez-Abarca LI, Medina JM. 1998.** The K-ATP channel regulates the effect of Ca²⁺ on gap junction permeability in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 427:41-45.
- Grant K, Loizidou M, Taylor I. 2003.** Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *British Journal of Cancer* 88:163-166.
- 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(2):437-45.
- Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ. 1996.** Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol Carcinog* 16(3):157-64.
- Guarguaglini G, Battistoni A, Pittoggi C, Di Matteo G, Di Fiore B, Lavia P. 1997.** Expression of the murine RanBP1 and Htf9-c genes is regulated from a shared bidirectional promoter during cell cycle progression. *Biochem J* 325 (Pt 1):277-86.
- Hama H, Kasuya Y, Sakurai T, Yamada G, Suzuki N, Masaki T, Goto K. 1997.** Role of endothelin-1 in astrocyte responses after acute brain damage. *J Neurosci Res* 47(6):590-602.
- Hampton GM, Penny LA, Baergen RN, Larson A, Brewer C, Liao S, Busby-Earle RM, Williams AW, Steel CM, Bird CC. 1994.** Loss of heterozygosity in cervical carcinoma: subchromosomal localization of a putative tumor-suppressor gene to chromosome 11q22-q24. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15):6953-6957.
- Harper JV. 2005.** Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. *Methods Mol Biol* 296:157-66.
- Hasselblatt M, Bunte M, Dringen R, Tabernero A, Medina JM, Giaume C, Siren AL, Ehrenreich H. 2003.** Effect of endothelin-1 on astrocytic protein content. *Glia* 42(4):390-7.
- Hasselblatt M, Lewczuk P, Loffler BM, Kamrowski-Kruck H, von Ahsen N, Siren AL, Ehrenreich H. 2001.** Role of the astrocytic ET(B) receptor in the regulation of extracellular endothelin-1 during hypoxia. *Glia* 34(1):18-26.
- Herrero-Gonzalez S, Valle-Casuso JC, Sanchez-Alvarez R, Giaume C, Medina JM, Tabernero A. 2009.** Connexin43 is involved in the effect of endothelin-1 on astrocyte proliferation and glucose uptake. *Glia* 57(2):222-33.
- Hirschi K, Xu C, Tsukamoto T, Sager R. 1996.** Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff* 7:861-870.
- Hochegger H, Takeda S, Hunt T. 2008.** Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11):910-6.
- Holden PR, McGuire B, Stoler A, Balmain A, Pitts JD. 1997.** Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18(1):15-21.
- Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1992.** Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* 130(4):1885-95.
- Huang R-P, Hossain M, Sehgal A, Boynton A. 1999.** Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70:21-24.
- 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.
- Janzer RC, Raff MC. 1987.** Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325(6101):253-256.

- Jensen AM, Chiu SY. 1990.** Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci* 10:1165-1175.
- Jesberger JA, Richardson JS. 1991.** Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci* 57:1-17.
- Jiang MH, Hoog A, Ma KC, Nie XJ, Olsson Y, Zhang WW. 1993.** Endothelin-1-like immunoreactivity is expressed in human reactive astrocytes. *Neuroreport* 4(7):935-7.
- Kamei J, Toyofuku T, Hori M. 2003.** Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 312(2):380-7.
- Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. 1998.** Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ* 9(1):13-21.
- 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(36):22824-31.
- Khammanit R, Chantakru S, Kitiyanant Y, Saikhun J. 2008.** Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology* 70(1):27-34.
- Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S and others. 1996.** The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *Embo J* 15(24):7060-9.
- Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ. 2000.** Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem* 79(3):347-54.
- Kolman A, Kotova N, Grawe J. 2002.** Aphidicolin induces 6-thioguanine resistant mutants in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 499(2):227-33.
- Koo SK, Kim DY, Park SD, Kang KW, Joe CO. 1997.** PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells. *Mol Cell Biochem* 167(1-2):41-9.
- Kosodo Y, Huttner WB. 2009.** Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ* 51(3):251-61.
- Koulakoff A, Ezan P, Giaume C. 2008.** Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56(12):1299-311.
- Krasinska L, Besnard E, Cot E, Dohet C, Mechali M, Lemaitre JM, Fisher D. 2008.** Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in *Xenopus*. *Embo J* 27(5):758-69.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. 1966.** Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996.** The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Kurata WE, Lau AF. 1994.** p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src. *Oncogene* 9(1):329-35.
- Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. 1990.** Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 50(11):3257-61.
- Laird D, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh H, Carystinos G, Alaoui-Jamali M. 1999.** Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 59:4104-4110.
- Lampe PD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, Lau AF. 1998.** Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J Cell Sci* 111 (Pt 6):833-41.
- Lampe PD, Lau AF. 2000.** Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384(2):205-15.
- Lampe PD, Lau AF. 2004.** The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36(7):1171-86.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. 2000.** Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149(7):1503-12.

- Lavado E, Sánchez-Abarca LI, Tabernero A, Bolaños JP, Medina JM. 1997.** Oleic acid inhibits gap junction permeability and increases glucose uptake in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 69:721-728.
- Li S, Couet J, Lisanti MP. 1996.** Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271(46):29182-90.
- Li X, Su V, Kurata WE, Jin C, Lau AF. 2008.** A novel connexin43-interacting protein, CIP75, which belongs to the UBL-UBA protein family, regulates the turnover of connexin43. *J Biol Chem* 283(9):5748-59.
- 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(4):815-27.
- Loewenstein W. 1981.** Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61:829-913.
- Loewenstein W. 1992.** The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* 3:59-79.
- Loewenstein WR. 1987.** The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 48:725-726.
- Loewenstein WR, Kanno Y. 1966.** Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209:1248-1249.
- Loh WE, Scrabble HJ, Livanos E, Arboleda MJ, Cavenee WK, Oshimura M, Weissman BE. 1992.** Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1755-1759.
- Loo LW, Berestecky JM, Kanemitsu MY, Lau AF. 1995.** pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J Biol Chem* 270(21):12751-61.
- MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH. 1990.** Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2359-63.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M. 2003.** Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37(5):751-64.
- Malumbres M, Barbacid M. 2001.** To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1(3):222-31.
- Malumbres M, Barbacid M. 2009.** Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153-66.
- Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA. 2004.** RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol* 24(15):6788-98.
- Mantz J, Cordier J, Giaume C. 1993.** Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Lab Invest* 78:892-901.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. 1997.** A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid β -peptide. *J Neurochem* 68:255-264.
- Marsolais D, Rosen H. 2009.** Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nat Rev Drug Discov* 8(4):297-307.
- Martin W, Zempel G, Hulser D, Willecke K. 1991.** Growth inhibition of oncogene-transformed rat fibroblasts by cocultured normal cells: relevance of metabolic cooperation mediated by gap junctions. *Cancer Res* 51(19):5348-51.
- Masaoka H, Suzuki R, Hirata Y, Emori T, Marumo F, Hirakawa K. 1989.** Raised plasma endothelin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 2(8676):1402.
- Medina JM, Giaume C, Tabernero A. 1999.** Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. In: Matsas R, Tsacopoulos M, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*. New York: Plenum Publishers. p 361-371.
- Medina JM, Vicario C, Juanes M, Fernández E. 1992.** Biochemical adaptations to early extrauterine life. In: Herrera E, Knopp R, editors. *Perinatal Biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 233-258.
- Mege RM, Goudou D, Giaume C, Nicolet M, Rieger F. 1994.** Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion? *Cell Adhes Commun* 2(4):329-43.
- Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. 1986.** Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 44(1):187-96.

- Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR. 1991.** Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 124(3):207-25.
- Meijer R, Malewicz B, Baumann WJ, Johnson RG. 1990.** Increased gap junction assembly between cultured cell upon cholesterol supplementation. *J Cell Sci* 96:231-237.
- Mesnil M, Piccoli C, Krutovskikh V, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H. 1995.** Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin-species specificity. *Cancer Res* 55:629-639.
- Metha PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR. 1991.** Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 124:207-225.
- Mobbs P, Brew H, Attwell DA. 1988.** A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axotolol (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res* 460:235-245.
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. 1999.** Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13(9):1181-9.
- Moorby C, Patel M. 2001.** Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271(2):238-48.
- Morga E, Faber C, Heuschling P. 2000.** Stimulation of endothelin B receptor modulates the inflammatory activation of rat astrocytes. *J Neurochem* 74(2):603-12.
- Mosmann T. 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Mugnaini E. 1986.** Cell junctions of astrocytes, ependyma and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. In: Fedoroff S, Vernadakis A, editors. *Astrocytes*. New York: Academic Press, Inc. p 329-371.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. 2000.** Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 275(33):25207-15.
- Muzi M, Freeman SD, Burrows RC, Wiseman RW, Link JM, Krohn KA, Graham MM, Spence AM. 2001.** Kinetic characterization of hexokinase isoenzymes from glioma cells: implications for FDG imaging of human brain tumors. *Nucl Med Biol* 28(2):107-16.
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE. 2001.** Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441(4):302-23.
- Naus CC. 2002.** Gap junctions and tumour progression. *Can J Physiol Pharmacol* 80(2):136-41.
- Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, Juneja SC, Kidder GM, Giaume C. 1997.** Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin 43. *J Neurosci Res* 49:528-540.
- Naus CCG, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX. 1991.** Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 126:33-36.
- Nevins JR. 2001.** The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10(7):699-703.
- Nie XJ, Olsson Y. 1996.** Endothelin peptides in brain diseases. *Rev Neurosci* 7(3):177-86.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR. 2008.** Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508(1):28-44.
- Oikawa T, Itoh T, Takenawa T. 2008.** Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J Cell Biol* 182(1):157-69.
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. 2003.** Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35(1):25-31.
- Ozog MA, Siushansian R, Naus CC. 2002.** Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(2):132-41.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. 1995.** Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269(5224):682-5.
- Papahadjopoulos D. 1974.** Cholesterol and cell membrane function: a hypothesis concerning the etiology of atherosclerosis. *J Theor Biol* 43:329-333.

- Patel TR. 1996.** Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cerebrovascular disease. *CNS Drugs* 5:293-310.
- Pellerin L. 2003.** Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 43(4-5):331-8.
- Philippi M, Vyklicky L, Orkand RK. 1996.** Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia* 17(1):72-82.
- Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. 2002.** Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 277(10):8648-57.
- Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T, Alaoui-Jamali MA, Laird DW. 2002.** Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J Biol Chem* 277(32):29132-8.
- 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(13):9492-500.
- Ren P, de Feijter AW, Paul DL, Ruch RJ. 1994.** Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis* 15(9):1807-13.
- Riley D, Carragher NO, Frame MC, Wyke JA. 2001.** The mechanism of cell cycle regulation by v-Src. *Oncogene* 20(42):5941-50.
- Rogers M, Berestecky JM, Hossain MZ, Guo HM, Kadle R, Nicholson BJ, Bertram JS. 1990.** Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Mol Carcinog* 3(6):335-43.
- Rose CR, Ransom BR. 1997.** Gap junction equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia* 20:299-307.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C. 2002.** Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94(7-8):457-75.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008.** Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322(5907):1551-5.
- Rouach N, Pebay A, Meme W, Cordier J, Ezan P, Etienne E, Giaume C, Tence M. 2006.** S1P inhibits gap junctions in astrocytes: involvement of G and Rho GTPase/ROCK. *Eur J Neurosci* 23(6):1453-64.
- Rubanyi GM, Polokoff MA. 1994.** Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46(3):325-415.
- Ruch RJ. 1994.** The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 24(3):216-31.
- Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. 1989.** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10(6):1003-8.
- Sáez JC, Spray DC, Hertzberg EL. 1990.** Gap junctions: biochemical properties and functional regulation under physiological and toxicological conditions. *In Vitro Toxicol* 3:69-86.
- Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H. 2001.** Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int J Cancer* 93(3):317-23.
- Salm AK, McCarthy KD. 1990.** Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia. *Glia* 3:529-538.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J and others. 2004.** Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427(6976):740-4.
- Sanchez-Alvarez R, Paino T, Herrero-Gonzalez S, Medina JM, Tabernero A. 2006.** Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. *Glia* 54(2):125-34.
- Sanchez-Alvarez R, Tabernero A, Medina JM. 2004.** Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication. *J Neurochem* 89(3):703-714.
- Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Sanchez-Abarca LI, Orfao A, Giaume C, Medina JM. 2001.** Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS Lett* 509(2):202-6.

- Sasaki Y, Takimoto M, Oda K, Fruh T, Takai M, Okada T, Hori S. 1997.** Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 68(5):2194-200.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000.** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3):311-22.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. 2006.** Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem* 6(10):929-34.
- Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. 2002.** Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41(18):5754-64.
- Schulte RJ, Sefton BM. 2003.** Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* 42(31):9424-30.
- Segretain D, Falk MM. 2004.** Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662(1-2):3-21.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006.** Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7(3):194-206.
- Shao Q, Wang H, McLachlan E, Veitch GI, Laird DW. 2005.** Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* 65(7):2705-11.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. 1997.** Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11(11):1464-78.
- Sherr CJ. 1994a.** G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79(4):551-5.
- Sherr CJ. 1994b.** Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells* 12 Suppl 1:47-55; discussion 55-7.
- Sherr CJ. 1996.** Cancer cell cycles. *Science* 274(5293):1672-7.
- Shin JL, Solan JL, Lampe PD. 2001.** The regulatory role of the C-terminal domain of connexin43. *Cell Commun Adhes* 8(4-6):271-5.
- Simonson MS, Dunn MJ. 1991.** Endothelins: a family of regulatory peptides. State-of-the-art lecture. *Hypertension* 17(6 Pt 2):856-63.
- Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD. 2005.** Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem* 280(34):30416-21.
- Smits VA, Klompmaaker R, Vallenius T, Rijkssen G, Makela TP, Medema RH. 2000.** p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 275(39):30638-43.
- Solan JL, Fry MD, TenBroek EM, Lampe PD. 2003.** Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J Cell Sci* 116(Pt 11):2203-11.
- Solan JL, Lampe PD. 2005.** Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711(2):154-63.
- Solan JL, Lampe PD. 2009.** Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419(2):261-72.
- Soo MY, Tran-Dinh HD, Dorsch NW, Quach T, Downey J, Pohlmann S. 1997.** Cervical spine degenerative diseases: an evaluation of clinical and imaging features in surgical decisions. *Australas Radiol* 41(4):351-6.
- 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(52):54695-701.
- Soroceanu L, Manning T, Sontheimer H. 2001.** Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33:107-117.
- Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS. 2006.** Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26(6):2387-98.
- Spence AM, Muzi M, Graham MM, O'Sullivan F, Krohn KA, Link JM, Lewellen TK, Lewellen B, Freeman SD, Berger MS and others. 1998.** Glucose metabolism in human malignant gliomas measured quantitatively with PET, 1-[C-11]glucose and FDG: analysis of the FDG lumped constant. *J Nucl Med* 39:440-448.
- Spinardi L, Marchisio PC. 2006.** Podosomes as smart regulators of cellular adhesion. *Eur J Cell Biol* 85(3-4):191-4.
- Spray DC, Burt JM. 1990.** Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 258(2 Pt 1):C195-205.

- Stein LS, Boonstra J, Burghardt RC. 1992.** Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. *Exp Cell Res* 198(1):1-7.
- Stevens B. 2008.** Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 16(4):278-88.
- Stewart ZA, Leach SD, Pietenpol JA. 1999.** p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol Cell Biol* 19(1):205-15.
- Stiles J, Ostrow P, Balos L, Greenberg S, Plunkett R, Grand W, Heffner R. 1997.** Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta-1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:435-439.
- Supattapone S, Simpson AWM, Ashley CC. 1989.** Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Comm* 165:1115-1122.
- 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(13):989-1002.
- Taberero A, Bolaños JP, Medina JM. 1993.** Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 294:635-638.
- Taberero A, Giaume C, Medina JM. 1996a.** Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16:187-195.
- Taberero A, Jimenez C, Velasco A, Giaume C, Medina JM. 2001.** The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J Neurochem* 78(4):890-8.
- Taberero A, Orfao A, Medina JM. 1996b.** Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry. *Neurosci Res* 24:131-138.
- Taberero A, Sanchez-Alvarez R, Medina JM. 2006.** Increased levels of cyclins D1 and D3 after inhibition of gap junctional communication in astrocytes. *J Neurochem* 96(4):973-82.
- Teixeira A, Chaverot N, Strosberg A, Cazaubon S. 2000.** Differential regulation of cyclin D1 and D3 expression in the control of astrocyte proliferation induced by endothelin-1. *J Neurochem* 74:1034-1040.
- 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(3):1780-8.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. 1998.** Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725-12731.
- Trosko JE, Chang CC, Madhukar BV, Klaunig JE. 1990.** Chemical, oncogene and growth factor inhibition gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology* 58(5):265-78.
- Trosko JE, Ruch RJ. 1998.** Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 3:D208-36.
- van den Heuvel S, Harlow E. 1993.** Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262(5142):2050-4.
- Vanslyke JK, Naus CC, Musil LS. 2009.** Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins. *Mol Biol Cell* 20(9):2451-63.
- 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(33):29753-9.
- Velasco A, Taberero A, Granda B, Medina JM. 2000.** ATP-sensitive potassium channel regulates astrocytic gap junction permeability by a Ca²⁺ independent mechanism. *J Neurochem* 74:1249-1256.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. 1995.** Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376:590-594.
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C. 1997.** Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signalling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.
- Vera B, Sánchez-Abarca LI, Bolaños JP, Medina JM. 1996.** Inhibition of astrocyte gap junctional communication by ATP depletion is reversed by calcium sequestration. *FEBS Lett* 392:225-228.

- Warn-Cramer B, Cottrell G, Burt J, Lau A. 1998.** Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:9188-9196.
- Weinberg R. 1993.** Tumor suppressor genes. *Neuron* 11(2):191-6.
- Weinberg RA. 1995.** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- Willecke K, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, Grzeschik KH. 1990.** Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur J Cell Biol* 53(2):275-80.
- Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW. 1997.** A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *J Cell Biol* 137(1):203-10.
- Xu W, Harrison SC, Eck MJ. 1997.** Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385(6617):595-602.
- Yamamoto T, Ochalski A, Hertzberg EL, Nagy JI. 1990.** On the organization of astrocytic gap-junctions in rat-brain as suggested by LM-immunohistochemistry and EM-immunohistochemistry of connexin-43 expression. *J Comp Neurol* 302(4):853-883.
- Yamasaki H. 1990.** Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11:1051-1058.
- Yamasaki H, Naus C. 1996.** Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 17:1199-1213.
- Yamasaki H, Omori Y, Krutovskikh V, Zhu W, Mironov N, Yamakage K, Mesnil M. 1999.** Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found Symp* 219:241-54.
- Yamashita K, Kataoka Y, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Himeno A, Niwa M, Taniyama K. 2000.** Involvement of glial endothelin/nitric oxide in delayed neuronal death of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 20(5):541-51.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322:411-415.
- Yoshimoto S, Ishizaki Y, Kurihara H, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaki T, Takakura K, Murota-S. 1990.** Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 508: 283-285.
- Yotti L, CC C, Trosko J. 1979.** Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206:1089-1091.
- Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. 1992.** Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52(20):5707-12.
- Zhang WW, Badonic T, Hoog A, Jiang MH, Ma KC, Nie XJ, Olsson Y. 1994.** Astrocytes in Alzheimer's disease express immunoreactivity to the vaso-constrictor endothelin-1. *J Neurol Sci* 122(1):90-6.
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney J, Mattason MP. 1993.** Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:378-388.
- Zhang YW, Kaneda M, Morita I. 2003a.** The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 278(45):44852-6.
- Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. 2001.** Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20(31):4138-49.
- Zhang YW, Nakayama K, Morita I. 2003b.** A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63(7):1623-30.
- Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CCG. 1991.** Transfection of C6 glioma-cells with connexin-43 cDNA - analysis of expression, intercellular coupling, and cell-proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5):1883-1887.
- Zhu DG, Kidder GM, Caveney S, Naus CCG. 1992.** Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21):10218-10221.

Zieve GW, Turnbull D, Mullins JM, McIntosh JR. 1980. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res* 126(2):397-405.