



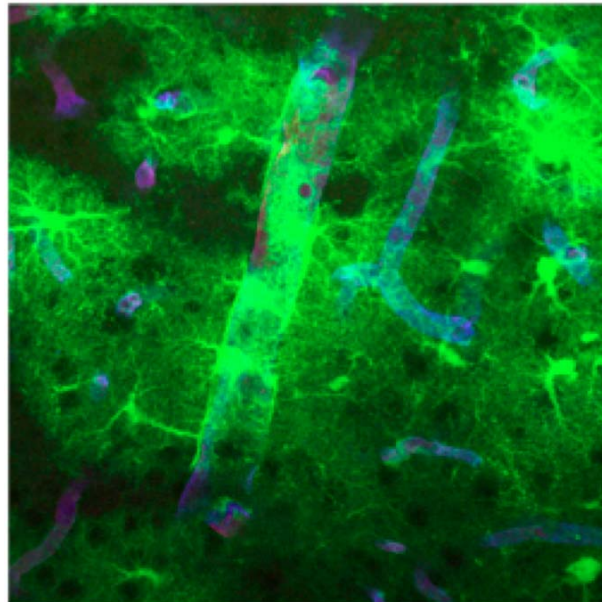
VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



LA CONEXINA 43 COMO MODULADOR
DE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN
ASTROCITOS

José Carlos Valle Casuso

TESIS DOCTORAL

2010

A mis Padres y
a Sandra

ABREVIATURAS

AGA	Ácido 18- α -glicerretínico
AA	Ácido araquidónico
AMPS	Persulfato amónico
BHE	Barrera hematoencefálica
CBX	Carbenoxolona
Cx43	Conexina43
DAPI	4'6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido dexosirribonucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EBSS	Solución de Earle
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ET-1	Endotelina-1
FCS	Suero fetal de ternero
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GFP	Proteína verde fluorescente.
GLUT	Transportador de glucosa
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
Hx	Hexoquinasa
kDa	Kilodaltons
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
NT-siRNA	<i>non-target</i> siRNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	Par de bases
PBS	Tampón sulfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PET	tomografía de emisión de positrones
PP2	4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-(<i>t</i> -butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina
PP3	4-Amino-7-Fenilpirazol[3,4-d]pirimidina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
siRNA	RNA de interferencia (<i>Small interfering RNA</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
TAE	Tampón Tris Acetato-EDTA

TBS-----Tampón Tris Salino
TEMED-----N,N,N',N'-tetrametilendiamino

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Los astrocitos y su función en el sistema nervioso central.	3
1.2. Las uniones comunicantes de los astrocitos.	4
1.2.1. Entorno lipídico de las uniones comunicantes.	5
1.2.2. La conexina 43 y otras proteínas componentes de las uniones comunicantes.	5
1.2.2.1 La conexina 43 y la formación de Hemicanales.	7
1.2.2.2 Síntesis y degradación de la conexina43.	7
1.2.2.3. Relación de la conexina 43 con otras proteínas.	9
1.2.3. Función de las uniones comunicantes en los astrocitos.	11
1.2.3.1. Amortiguación espacial de K ⁺ .	11
1.2.3.2. Equilibrio de la concentración de Na ⁺ intracelular.	11
1.2.3.3. “Ondas de Ca ²⁺ ”.	11
1.2.3.4. Protección neuronal.	12
1.2.3.5. Apoyo en la migración neuronal.	12
1.2.3.6. Proliferación celular.	13
1.2.3.7. Tráfico de metabolitos y captación de glucosa.	13
1.2.4. Regulación de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.	14
1.2.4.1. Endotelina-1	14
1.2.4.2. Carbenoxolona	16
1.3. Comunicación intercelular y captación de glucosa.	17
1.3.1. Transporte de glucosa y mecanismos de regulación.	19
1.3.2. Fosforilación de la glucosa y mecanismos de regulación.	23
1.4 El oncogen c-Src.	25
1.5 Papel de Hif-1 α como regulador de la captación de glucosa.	30
1.6 La gliosis reactiva.	34
2. PLAN DE TRABAJO	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. MATERIAL	43
3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario.	43
3.1.2. Medios instrumentales	43

3.1.3. Productos	45
3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares	45
3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección del mRNA	45
3.1.3.3 Productos utilizados en los experimentos para el análisis de proteínas	46
3.1.3.4. Productos empleados para el silenciamiento génico	48
3.1.3.5. Productos utilizados para los estudios de captación de glucosa.	49
3.1.3.6. Otros productos	49
3.2. MÉTODOS	49
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares	49
3.2.1.1. Composición de las disoluciones.	49
3.2.1.2. Preparación del cultivo primario de astrocitos	50
3.2.2. Tratamientos celulares en astrocitos	51
3.2.3. RT-PCR y q-PCR	52
I. Extracción del RNA total de los cultivos	52
II. Cuantificación del RNA	52
III. Retrotranscripción (RT)	
IV. Cuantificación del cDNA producto de la retrotranscripción.	53
V. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
VI. Análisis de datos	53
3.2.4. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA (<i>small interfering RNA</i>).	53
3.2.5. Determinación de la permeabilidad celular	55
3.2.6. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western	55
I Extracción de proteínas	56
II. Cuantificación de proteínas	56
III. Preparación de los geles	56
IV. Preparación de las muestras para la electroforesis	56
V. Electroforesis de proteínas	56
VI. Electrotransferencia	56
VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana	57
VIII. Inmunodetección	57
3.2.7. Experimentos realizados “in vivo” en ratones C57BL6 y hGFAP-eGFP	58
3.2.7.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6 y hGFAP-eGFP, y preparación del tejido.	58
3.2.8. Inmunohistoquímica	58
3.2.9. Determinación de la captación de 2-desoxi-D-glucosa.	59
3.2.10 Análisis estadístico	60

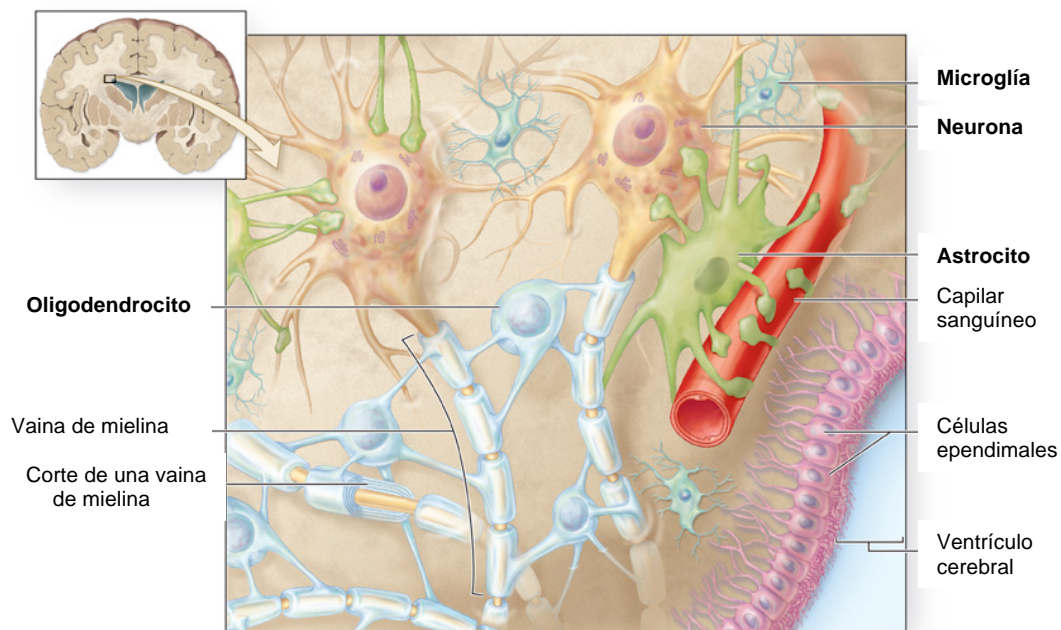
4.- RESULTADOS	63
4.1 Estudio de la relación entre la conexina43 y la captación de glucosa de los astrocitos en la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.	63
4.1.1 Estudio de la presencia de ET-1 tras la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.	64
4.1.2 Estudio de la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos tras una lesión cerebral.	65
4.2 Efecto de la pérdida de la Conexina43 y de su funcionalidad en la captación de glucosa en astrocitos.	67
4.2.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina 43 en astrocitos	67
4.2.2. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la velocidad de captación de glucosa en astrocitos.	68
4.2.3. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa.	69
4.3 Estudio de la participación de la conexina43 en el efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes sobre la captación de glucosa.	70
4.3.1. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre la expresión de la conexina 43 y la comunicación intercelular en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.	70
4.3.2. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre la captación de glucosa en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.	71
4.3.3. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre las proteínas implicadas en la captación de glucosa en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.	71
4.4 Estudio de la participación de HIF-1α en el efecto de la conexina 43 y la ET-1 sobre la captación de glucosa.	72
4.4.1 Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la expresión de HIF-1α	72
4.4.2 Efecto de la ET-1 sobre la expresión de HIF-1α en astrocitos.	72
4.4.3 Efecto del silenciamiento de HIF-1α. sobre la captación de glucosa.	73
4.4.4 Efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en astrocitos con HIF-1α. silenciado.	74
4.5 Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina 43 y la ET-1 sobre la captación de glucosa	74

4.5.1	Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la actividad de c-Src	75
4.5.2	Efecto de la ET-1 sobre la actividad de c-Src.	75
4.5.3	Efecto de la inhibición de c-Src sobre el aumento de HIF-1 α promovido por la ET-1.	75
4.5.4	Efecto de la inhibición de c-Src sobre el aumento de la captación de glucosa promovido por la ET-1.	76
4.6	ANEXO RESULTADOS (FIGURAS)	
5.	DISCUSIÓN	135
5.1	Expresión de las proteínas responsables de la captación de glucosa en los astrocitos reactivos.	135
5.2	Participación de la conexina 43 en el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa.	137
5.3	Participación de HIF-1 α en el efecto de la ET-1 y la conexina 43 sobre la captación de glucosa.	138
5.4	Participación de c-Src en el efecto de la ET-1 y la conexina 43 sobre la captación de glucosa.	139
6.	CONCLUSIONES.	145
7.	BIBLIOGRAFÍA.	149
8.	RESUMEN PARA LA OBTENCIÓN DEL DOCTORADO EUROPEO.	171

INTRODUCCIÓN

1.1. LOS ASTROCITOS Y SU FUNCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

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 (Esquema 1).



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

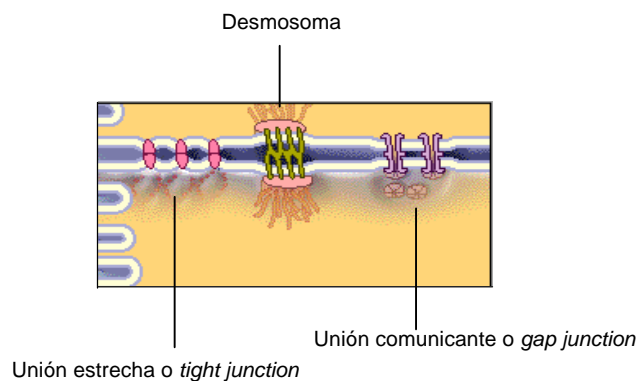
Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC. Ejercen importantes funciones en el cerebro tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto. Entre estas funciones podemos destacar:

1. Inducción de la barrera hematoencefálica (BHE) (Janzer and Raff, 1987, Abbott et al., 2006).
2. Apoyo a la migración y a la diferenciación neuronal durante el desarrollo (Stevens, 2008 278 , Cina et al., 2009, Kosodo and Huttner, 2009).
3. Soporte metabólico a las neuronas (Medina et al., 1999, Pellerin, 2003 331 , Rouach et al., 2008).

4. Mantenimiento de la homeostasis iónica neural (Mobbs et al., 1988, Philippi et al., 1996).
5. Recaptación de neurotransmisores (Schousboe and Waagepetersen, 2006, Seifert et al., 2006).
6. Función neuromoduladora (Araque, 2008).
7. Función neuroprotectora (Vega-Agapito et al., 2002).
8. Función de células madre (Gritti et al., 2002, Sanai et al., 2004).

1.2. LAS UNIONES COMUNICANTES DE LOS ASTROCITOS.

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

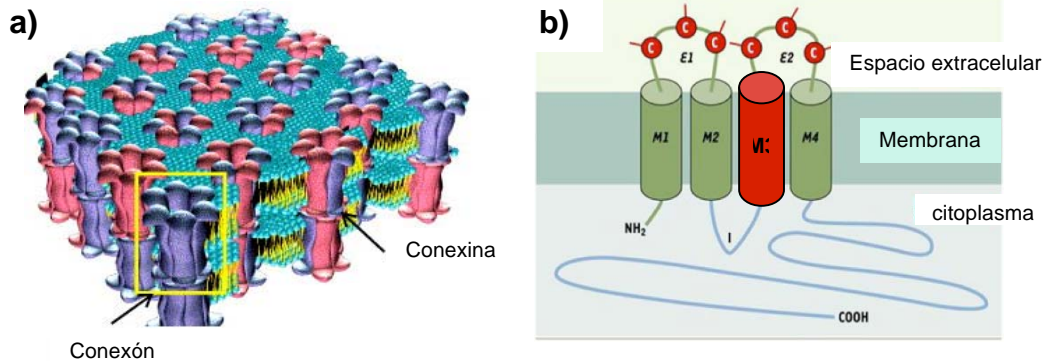
Los astrocitos se caracterizan por estar ampliamente comunicados por las uniones comunicantes; de hecho, para llevar a cabo muchas de las funciones mencionadas necesitan la comunicación de estos canales.

1.2.1. 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).

1.2.2. La conexina 43 y otras 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 1,2 KDa (para revisión, ver: Giaume et al., 1997, Trosko and Ruch, 1998).



Esquema 3. Estructura y topología de las uniones comunicantes

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, ver: (Segretain and Falk, 2004, Giaume and Theis, 2010). 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 conexina 26, o una proteína con secuencia homóloga, así como la conexina 30, pueden coexpresarse y colocalizarse junto con la Cx43 en algunos astrocitos (Nagy et al., 2001). Además, también se han detectado niveles de conexina 40, conexina 45 y conexina 46 en estas células (para revisión, ver: (Rouach et al., 2002).

Existe una estrecha relación entre la proteína que integra la unión comunicante y sus características electrofisiológicas. Cada tipo de conexina confiere diferente conductancia unitaria y distinta cooperación metabólica a través de las uniones comunicantes. Así, dependiendo del tipo de conexina 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 conexas demuestra que presentan cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana, un dominio citoplasmático de las terminaciones amino y carboxilo, dos dominios extracelulares y un tercer dominio citoplasmático (Kumar and Gilula, 1996, Chaytor et al., 1997) (Esquema 3b.). El tercer dominio transmembrana contiene una alta proporción de aminoácidos hidrofílicos, quedando éste hacia la luz de la unión comunicante (Trosko and Ruch, 1998).

1.2.2.1 La conexina 43 y la formación de Hemicanales.

Cuando un conexon, integrado en la membrana celular, no encuentra el conexón de la célula adyacente y no forma una unión comunicante, se denomina hemicanal. Estos hemicanales permiten la comunicación entre el citoplasma celular y el medio extracelular para dar un soporte autocrino y paracrino (Spray et al., 2006). En este sentido, se ha descrito que los hemicanales son responsables de la liberación de ATP al medio extracelular (Kang et al., 2008) o de la captación de glucosa (Retamal et al., 2007) y su permeabilidad se regula por diferentes agentes como (Orellana et al., 2009) Además los hemicanales también pueden estar formados por Panexinas, otra familia de proteínas de membrana, homologas a las conexinas (Scemes et al., 2007). Una de las características de las panexinas es que no forman uniones comunicantes (Giaume and Theis, 2010).

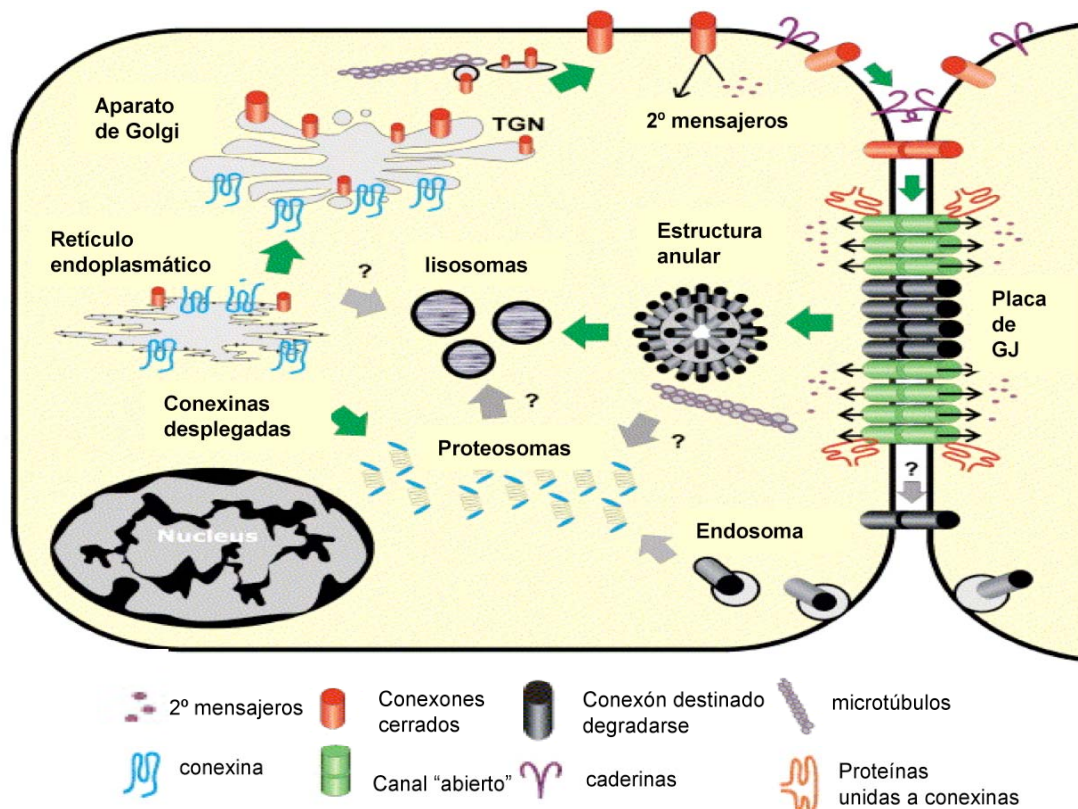
1.2.2.2 Síntesis y degradación de la conexina43.

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, ver: (Lampe and Lau, 2000)), donde permanecen en un estado cerrado hasta la formación de canales que conectan dos células (Trosko and Ruch, 1998 208, Vanslyke et al., 2009) (Esquema 4).

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 4). 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 ubiquitininas, 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).

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

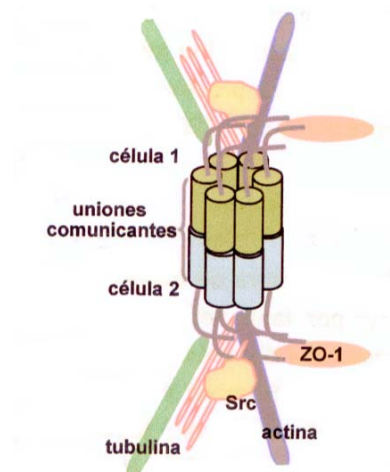


Esquema 4. Síntesis y degradación de la conexina 43.

Modificado de Laird (2005).

1.2.2.3. Relación de la conexina 43 con otras proteínas.

La conexina 43, 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 conexina 43 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 C-terminal de la conexina 43 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 *zonula occludens-1* (ZO-1) (Toyofuku et al., 1998) o la de la proteína tirosina quinasa c-Src (Giepmans et al., 2001a) (véase Esquema 5).

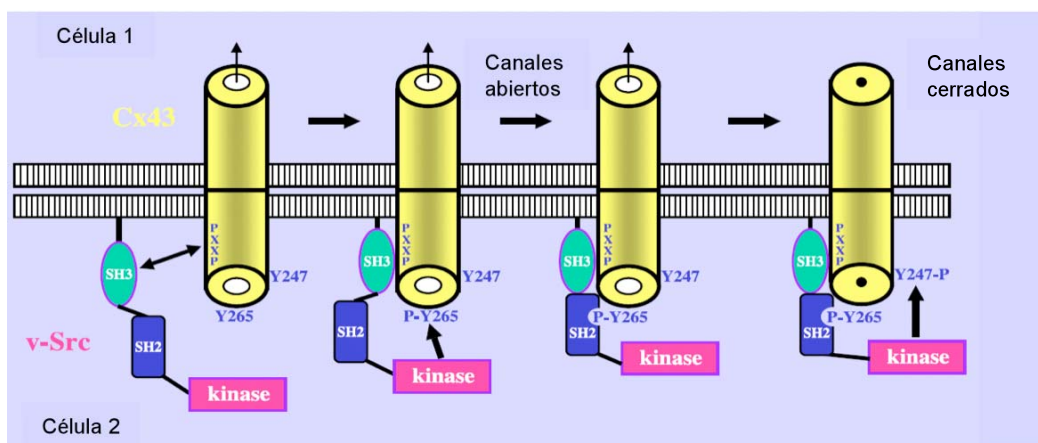


Esquema 5. Proteínas que interactúan con la conexina 43.

Al respecto se ha descrito que el extremo C-terminal de la conexina desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular (Moorby and Patel, 2001) (véase apartado 1.2.3.7). Este efecto se podría llevar a cabo a través de interacciones con la quinasa c-Src o con la ZO-1 puesto que ambas proteínas están implicadas en la regulación de la proliferación celular. De esta forma, la conexina 43 poder regular la transducción de señales mitogénicas (Bjorge et al., 2000, Frame, 2002). Por otro lado, la interacción de la conexina 43 con la ZO-1 a través de los dominios PDZ podría disminuir la proliferación, puesto que el dominio PDZ de la proteína ZO-1 libre en el citoplasma induce la malignización celular (Reichert et al., 2000).

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 (Toyofuku et al., 2001, Lampe and Lau, 2004 1171, Gilleron et al., 2008)).

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, Swenson et al., 1990, Kurata and Lau, 1994, Giepmans et al., 2001a, Lin et al., 2001) (Esquema 6). 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 interacciona inicialmente con la región rica en prolinas de la Cx43, consiguiendo la proximidad necesaria para la fosforilación de Y265 e Y247 de la Cx43 por el dominio kinasa de v-Src. Estos datos sugieren que la fosforilación en Y265 es necesaria para la interacción entre v-Src y la Cx43, y la fosforilación en Y247 se requiere para el cierre de las uniones comunicantes (para revisión, véase: (Lampe and Lau, 2004)).



Esquema 6. Regulación de las uniones comunicantes mediante la interacción con c-Src. Modificado de Warn-Cramer y Lau (2004).

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la Cx43 también regula la actividad de c-Src, al disminuir su forma fosforilada de esta proteína en su Y416 y aumenta la fosforilación en la Y527. De esta forma la Cx43 controla la actividad de la quinasa c-Src (Herrero-gonzález, en revisión).

1.2.3. 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 de astrocitos comunicados constituida por canales de intercambio intercelular de iones y metabolitos entre astrocitos adyacentes. Entre estas funciones podemos destacar:

1.2.3.1. 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^+ .

1.2.3.2. 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.

1.2.3.3. “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 et al., 1990, Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991). Así, en los astrocitos se expresan una amplia variedad de receptores funcionales para agentes neuroactivos (Dermietzel et al., 1991), como el glutamato (Cornell-Bell et al., 1990, Jensen and Chiu, 1990) y otros (Salm and McCarthy, 1990). Muchos de estos estudios han 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. (Dani et al., 1992, Araque et al., 2002) han demostrado que las invaciones aferentes de neuronas glutamatérgicas provocan la aparición de “ondas de Ca^{2+} ” en astrocitos. El hecho de que las señales de Ca^{2+} en los astrocitos se puedan propagar por ellos en respuesta a los neurotransmisores liberados durante la sinapsis, indica la existencia de comunicación entre neuronas y astrocitos (Perea and Araque, 2010).

1.2.3.4. 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, Zhang et al., 1993, Mark et al., 1997). 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).

1.2.3.5. Apoyo en la migración neuronal.

Durante el desarrollo cerebral, las neuronas se ayudan de la glia 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 conexina43 (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 defectos en la migración neuronal similares a los *knock-out* de Cx43 (Cina et al., 2009).

1.2.3.6. Proliferación celular.

La comunicación intercelular es también fundamental para controlar, 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). Estos mismos efectos se observan cuando se silencia la Cx43 por siRNA's específicos en los astrocitos (Herrero-Gonzalez et al., 2009). Por otro lado, el aumento de las uniones comunicantes en células de glioma C6 disminuye el grado de proliferación (Sánchez-Alvarez et al., 2001, Sanchez-Alvarez et al., 2006), lo que sugiere que existe una 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 Cx43, 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 (Mehta et al., 1991, Zhu et al., 1991, Mesnil et al., 1995, Hirschi et al., 1996, Huang et al., 1998b), como la estimulación farmacológica de la permeabilidad de las uniones comunicantes reducen la proliferación (Sánchez-Alvarez et al., 2001). Por todo ello, se considera a la Cx43 una proteína supresora de tumores. En cuanto a los mecanismos moleculares que relacionan la comunicación intercelular mediada por la Cx43 con la proliferación, recientemente en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la participación del oncogen c-Src en este efecto (Herrero-Gonzalez S, oncogen, en revision).

1.2.3.7. 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. Esta función será el objeto fundamental de este trabajo y se explicará detalladamente en el apartado 1.3 .

1.2.4. 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 asociada con los cambios en el número de canales que componen las uniones comunicantes, así como con cambios en la velocidad de internalización de las conexinas 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, Velasco et al., 2000, Sanchez-Alvarez et al., 2006, Taberner et al., 2006).

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.

1.2.4.1. 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, ver: (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).

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 Ca²⁺, 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, (Tabernero et al., 1996, Sánchez-Alvarez et al., 2004, Herrero-Gonzalez et al., 2009), promueve la proliferación celular (Tabernero et al., 2001, Herrero-Gonzalez et al., 2009), 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 (Rubanyi and Polokoff, 1994, Patel, 1996, Morga et al., 2000). 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 (Didier et al., 2002), la hemorragia subaracnoidea (Masaoka et al., 1989), la isquemia (Barone et al., 1995, Yamashita et al., 2000), la gliosis reactiva (MacCumber et al., 1990, Hama et al., 1997) 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 (Teixeira et al., 2000, Tabernero et al., 2006). 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, 2009, 222).

Respecto a la acción metabólica de la ET-1, en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que el tratamiento de las astrocitos en cultivo primario con ET-1 promueve un aumento de la captación de glucosa y de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 así como de las enzimas encargadas de la fosforilación de la glucosa Hx-1 y Hx-2. (Sánchez-Alvarez et al., 2004).

1.2.4.2. Carbenoxolona

La carbenoxolona (CBX) es un derivado soluble del ácido 18- α -glicirretínico (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).

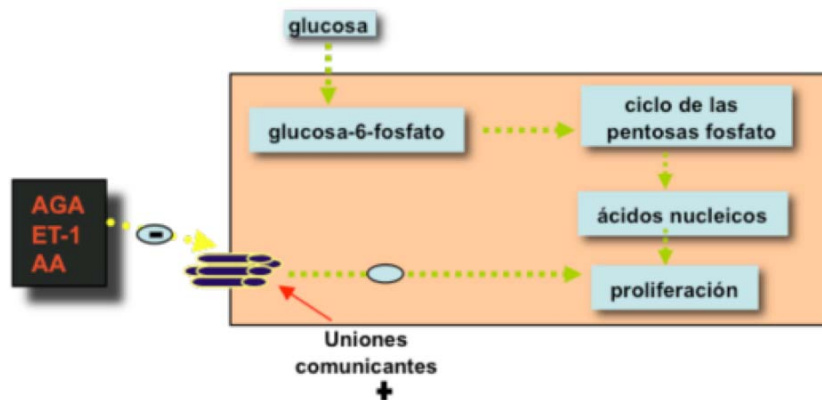
Los estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la CBX produce un aumento de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 y de las Hx-1 y Hx-2, lo que conlleva un incremento en la captación de glucosa por los astrocitos (Sánchez-Alvarez et al., 2004, Herrero-Gonzalez et al., 2009). 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 (Tabernero et al., 2006, Herrero-Gonzalez et al., 2009).

1.3. COMUNICACIÓN INTERCELULAR Y CAPTACIÓN DE GLUCOSA:

Tal y como muestra el esquema 1, los astrocitos rodean totalmente con sus ramificaciones los capilares cerebrales. 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.

En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la transferencia de los principales metabolitos a través de las uniones comunicantes de astrocitos. Así, la glucosa y su derivado fosforilado glucosa-6-fosfato, son capaces de atravesar las uniones comunicantes de los astrocitos (Tabernero et al., 1996). Además, el lactato, un sustrato esencial para el cerebro en desarrollo (Medina et al., 1992), es capaz de pasar de un astrocito a otro a través de las uniones comunicantes (Tabernero et al., 1996). Por último, el glutamato y la glutamina, implicados en la transferencia de carbonos entre neuronas y astrocitos, pueden difundir también a través de las uniones comunicantes (Giaume et al., 1997). 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 de los astrocitos comunicados a través de las uniones comunicantes. 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 (Tabernero et al., 1996, Sánchez-Alvarez et al., 2004, Herrero-Gonzalez et al., 2009). La inhibición de las uniones comunicantes estimula la captación de glucosa por los astrocitos en cultivo. Además, los inhibidores de las uniones comunicantes son capaces de estimular el ciclo de las pentosas fosfato (Tabernero et al., 1996). 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 7).



Esquema 7. Efecto de la inhibición de las uniones comunicantes sobre la captación de glucosa y la velocidad de proliferación en astrocitos.

(Modificado de Tabernero y col. 2001)

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 (Tabernero et al., 2001). 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).

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 Hx-1, 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 Hx-1, además de la inducción de GLUT-3 y de la Hx-2, dos proteínas normalmente ausentes en

astrocitos. Sin embargo, estas isoformas están presentes en células con alta capacidad glucolítica, siendo características del fenotipo tumoral (Sánchez-Alvarez et al., 2004).

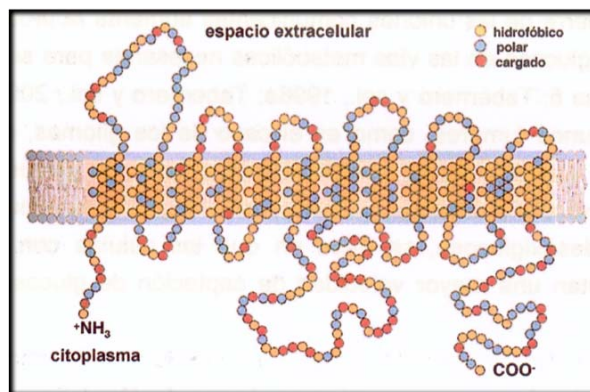
Como ya hemos mencionado, parece existir una relación inversa entre la comunicación intercelular y la captación de glucosa. A favor de esta hipótesis, las células de glioma presentan bajos niveles de comunicación (Naus et al., 1991, Zhu et al., 1991), a la vez que muestran una alta velocidad de captación de glucosa (Spence et al., 1998, Muzi et al., 2001). 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 Hx-1 y Hx-2, sino a la disminución de su asociación a las mitocondrias (Sánchez-Alvarez et al., 2004).

1.3.1. Transporte de glucosa y mecanismos de regulación.

La glucosa es considerada el principal nutriente para las células del sistema nervioso adulto. Aunque el peso del cerebro maduro constituye sólo entre el 2-3% del total del peso corporal, este órgano puede consumir una cuarta parte de la de glucosa suministrada al organismo (Clarke and Sokoloff, 1994). Sólo una pequeña porción de esta glucosa se utiliza para los procesos de biosíntesis y la mayor parte es consumida en el metabolismo energético.

El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por dos familias de transportadores. Así, se conoce la familia de los cotransportadores de Na^+ -glucosa, que se expresan principalmente en la membrana apical de las células epiteliales del intestino y del riñón y que transportan la glucosa en contra del gradiente de concentración, para lo cual utilizan ATP (para revisión, ver: (Ferraris, 2001)). Además, se ha identificado un sistema de transporte de glucosa (GLUT) facilitado e independiente de Na^+ , que se expresa en casi todas las células. En este sentido, se han caracterizado 5 isoformas funcionales, GLUT-1 al GLUT-5 (para revisión, ver: (Bell et al., 1990, Mueckler, 1994, Vannucci et al., 1997)). A su vez, recientemente se han identificado nuevos genes que codifican proteínas transportadoras de hexosas, GLUT-6 al GLUT-12 (para revisión, ver: (Joost and Thorens, 2001, Gorovits and Charron, 2003)). Aunque la caracterización funcional de estas nuevas isoformas requiere estudios más exhaustivos, se sabe que los miembros de esta familia difieren entre sí en su distribución tisular, sus propiedades cinéticas y su especificidad por el sustrato.

En general, los GLUTs presentan 12 dominios hidrofóbicos transmembrana con estructura secundaria de α hélice, conectados entre sí por bucles de naturaleza hidrofílica. El primero de estos dominios es exofacial y contiene sitios de N-glicosilación (Joost et al., 1994, Olson and Pessin, 1996). Tanto el extremo N- como el C-terminal de la proteína están orientados hacia el lado citoplasmático de la membrana celular (Thorens, 1996) (véase Esquema 8). Los diferentes modelos diseñados para los GLUTs sugieren que cinco de las hélices transmembrana forman un poro acuoso que actúa de canal para el paso de los sustratos (para revisión, ver: (Barrett et al., 1999)). En este sentido se sugiere que, tras la unión del transportador con el azúcar, se produce una reorientación de los GLUTs, de una conformación exofacial a una endofacial, seguido de la liberación del sustrato en el interior de la célula (para revisión, ver: (Barrett et al., 1999)).



Esquema 8. Estructura común de los transportadores GLUT.

Modificado de Nelson y Cox (2000).

Como hemos mencionado con anterioridad, los GLUTs difieren entre sí porque presentan distinta distribución celular. Así, el GLUT-1 es la isoforma de los transportadores de glucosa que se encuentra más ampliamente distribuida. De hecho, se expresa en casi todos los tipos de células (para revisión, ver: (Bell et al., 1990, Mueckler, 1994, Vannucci et al., 1997)). En este sentido, se ha descrito la expresión del GLUT-1 en los eritrocitos y en los cultivos primarios de todas las células neurales, incluyendo las neuronas y los astrocitos (para revisión, ver: (Maher et al., 1994, Vannucci et al., 1997)). El GLUT-1 se ha detectado en el cerebro con dos masas moleculares diferentes, 55 kDa y 45 kDa, las cuales son codificadas por el mismo gen pero difieren en el grado de glicosilación (Birnbaum et al., 1986, Kasaniki et al., 1987). Existen evidencias que demuestran que la forma de 55 kDa se localiza preferentemente en la corteza y en los capilares cerebrales (Pardridge and Boado, 1993). Sin embargo, la forma de

más bajo peso molecular, es decir, la de 45 kDa, se localiza principalmente en las células de la glía (Bondy et al., 1992, Lee and Bondy, 1993). Por otra parte, el GLUT-2 es la principal isoforma del transportador de glucosa en los hepatocitos, las células β pancreáticas y las células epiteliales de la mucosa intestinal y del riñón (Fukumoto et al., 1988, Thorens et al., 1988, Thorens, 1992). El GLUT-3 es la isoforma responsable del transporte de glucosa en las neuronas (Nagamatsu et al., 1993) (para revisión, ver: (Maher et al., 1994, Vannucci et al., 1997)), aunque también se han encontrado niveles detectables de este transportador en la placenta y en el riñón (Kayano et al., 1988) y se induce en respuesta a estímulos (Cidad et al., 2001, Sánchez-Alvarez et al., 2004). El GLUT-4 se localiza preferentemente en los tejidos sensibles a la insulina, como el músculo y el tejido adiposo (Birnbaum, 1989, Charron et al., 1989, Fukumoto et al., 1989, James et al., 1989, Kaestner et al., 1989). El GLUT-5 es un transportador de fructosa más que de glucosa y se expresa en niveles relativamente altos en la membrana apical de las células del intestino delgado (Kayano et al., 1990, Davidson et al., 1992, Mahraoui et al., 1992). El GLUT-5 también se expresa en el endotelio cerebral (Mantych et al., 1993) y en las células musculares y del tejido adiposo (Hundal et al., 1992, Shepherd et al., 1992), aunque su función fisiológica en estos tejidos no está del todo esclarecida (para revisión, ver: (Bell et al., 1990, Mueckler, 1994, Vannucci et al., 1997)).

El GLUT-1 y el GLUT-3, a diferencia del resto de las isoformas de esta familia, son los responsables de la captación de glucosa basal por los tejidos. La K_m de ambos transportadores para la glucosa es de aproximadamente 1 mM y, por tanto, significativamente menores que los niveles normales de glucosa sérica, que oscilan, en condiciones fisiológicas, entre 4 mM y 8 mM. Por consiguiente, el GLUT-1 y el GLUT-3 transportan glucosa continuamente al interior de la célula a una velocidad prácticamente constante (Stryer et al., 2003). Sin embargo, la presencia de más de una isoforma del transportador de glucosa en el cerebro parece estar relacionada no sólo con la expresión específica de cada célula y su regulación, sino también con las características intrínsecas de las diferentes isoformas y su concentración. Así, hay autores que indican una característica distintiva entre el GLUT-1 y el GLUT-3 en cuanto a la afinidad aparente por la glucosa y sus análogos, sugiriendo que el GLUT-3 presenta mayor capacidad para el transporte de glucosa que el GLUT-1 (para revisión, ver: (Bell et al., 1993, Maher et al., 1994, Vannucci et al., 1997)).

La expresión y la función de los transportadores de glucosa están reguladas por señales intra y extracelulares. Así, diferentes estudios demuestran un incremento del transporte de glucosa en respuesta a factores de crecimiento en fibroblastos (Bird et al., 1990), células epiteliales de la retina (Takagi et al., 1994), miocitos en desarrollo (Bilan et al., 1992a, Bilan et al., 1992b), células linfoides (Chakrabarti et al., 1994) y otras células hematopoiéticas (Whetton et al., 1984, 1985, Hamilton et al., 1988). En este sentido, la velocidad de captación de glucosa por los tejidos está sometida a una regulación tanto a corto como a largo plazo. Al respecto,

existen pruebas que ponen de manifiesto que, en respuesta a la insulina, se produce en pocos minutos un aumento del número de transportadores de glucosa GLUT-4 en la membrana plasmática (Douen et al., 1990, Mitsumoto and Klip, 1992, Zhou et al., 2000, Suarez et al., 2001) (para revisión, ver: (Mueckler, 1994)). El transporte de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina reviste gran interés dada la importancia de este proceso en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el organismo. Por otro lado, los trabajos realizados por Suárez y col. (Suarez et al., 2001) demuestran que las neurregulinas estimulan la translocación del GLUT-1 y del GLUT-3 desde el compartimento intracelular hacia la membrana plasmática en el músculo. En estas circunstancias se produce también, a largo plazo, un aumento de la expresión del GLUT-1 y del GLUT-3, mientras los niveles del GLUT-4 disminuyen drásticamente. Otros trabajos demuestran cambios similares en la distribución del transportador de glucosa GLUT-1 en respuesta a diferentes estímulos (Mitsumoto and Klip, 1992, Heijnen et al., 1997, Malide et al., 1998, Samih et al., 2000, Bentley et al., 2003), indicando que éste puede ser un mecanismo común utilizado por las células para garantizar el incremento rápido de la velocidad de captación de glucosa y responder así a los requerimientos metabólicos. Por otra parte, la expresión del GLUT-1 se puede modular también por cambios en el grado de glicosilación de la proteína (Samih et al., 2000).

Como hemos indicado, las células tumorales muestran un incremento en la velocidad de captación de glucosa, tanto *in vitro* como *in vivo* (Isselbacher, 1972b, a, Yonekura et al., 1982, Holm et al., 1995). De hecho, ésta es una de las características bioquímicas que caracteriza al fenotipo neoplásico (Warburg, 1956b). Los mecanismos por los cuales se mantiene un aumento sostenido en el metabolismo de la glucosa en este tipo de células no están del todo esclarecidos. Sin embargo, se ha demostrado que el GLUT-1 y el GLUT-3 se sobreexpresan en gran variedad de tumores humanos (Yamamoto et al., 1990, Nishioka et al., 1992, Boado et al., 1994, Younes et al., 1996, 1997b, Samih et al., 2003) y líneas celulares como las células de glioma C6 (Nagamatsu et al., 1996). Algunos trabajos concluyen que la sobreexpresión de estas isoformas se correlaciona con el grado de malignidad del tumor (Boado et al., 1994, Younes et al., 1997a). Así, se sugiere que el transporte de glucosa es un factor limitante en el metabolismo de la glucosa en las células con alta velocidad de proliferación. De hecho, la malignidad de algunos tumores, como es el caso de los gliomas, está directamente relacionada con el aumento de su capacidad de captación de glucosa. Al respecto, el método de diagnóstico y pronóstico, utilizando la tomografía de emisión de positrones (PET) con fluorodesoxiglucosa, se basa en que las células con mayor grado de malignidad presentan una mayor velocidad de captación de glucosa (Spence et al., 1998).

Actualmente, la tendencia para explicar este efecto de metabolismo aumentado de manera sostenida en células tumorales, está unido al estudio del microambiente que existe en el interior del tumor. La razón más reconocida para alterar el metabolismo de los tumores es únicamente el estrés fisiológico que existe. El microambiente en el tumor, se caracteriza por

sufrir hipoxia, acidosis y un incremento de presión del fluido intersticial, durante tiempo prolongado y sobre todo en las capas celulares más profundas del tumor promueve la formación de nuevos vasos, para intentar nutrir esas células y retirar los desechos. La hipoxia, es probablemente el más penetrante de los efectos sufridos por la célula, ya que existen variaciones de oxigenación en la zona del tumor y la perfusión del oxígeno, no es suficiente para responder a la demanda de las células tumorales. Pero las células responden a este microambiente hipóxico activando el factor inducible de hipoxia, HIF-1 α un factor de transcripción para algunas proteínas relacionadas con la captación de glucosa ya que, promueve un aumento de expresión de los transportadores de glucosa para adaptar la célula a este ambiente (Ver apartado, 1.5).

1.3.2. Fosforilación de la glucosa y mecanismos de regulación.

Una vez que la glucosa entra en la célula, ha de fosforilarse para continuar su metabolismo. La hexoquinasa (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa, E.C.2.7.1.1) es la enzima que cataliza la fosforilación de hexosas (para revisión ver: (Wilson, 1995, 2003)). El paso de fosforilación es esencial para la completa utilización de la molécula de hexosa a través de las diversas rutas metabólicas; sólo la glucosa-6-fosfato puede continuar la ruta glucolítica, entrar en el ciclo de las pentosas fosfato o iniciar la síntesis de glucógeno. Estas rutas son necesarias para la supervivencia y replicación celulares, puesto que son responsables de la producción de energía y de la formación de precursores para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos, colesterol, etc. (Pedersen, 1978). Este paso asume especial importancia en el cerebro de los mamíferos, el cual, en condiciones fisiológicas, es totalmente dependiente de la glucosa como sustrato para generar la energía requerida en la función cerebral. No es de extrañar que, por gramo de tejido, el cerebro presente niveles mucho mayores de actividad de la hexoquinasa respecto a otros tejidos estudiados (Wilson and Felgner, 1977).

En los tejidos de mamíferos existen 4 isoformas conocidas de hexoquinasa, dependiendo de su movilidad electroforética (Katzen and Schimke, 1965) (para revisión, ver: (Wilson, 1995)). Las isoenzimas tipo I-III presentan una baja Km para la glucosa y consisten en una cadena polipeptídica de 100 kDa y exhiben un 70 % de identidad en su secuencia (para revisión, ver: (Wilson, 1995)). Así, los extremos N- y C-terminal son similares en secuencia y plegamiento, una consecuencia debida, probablemente, a la duplicación y fusión de un gen ancestral (Easterby and O'Brien, 1973, Holroyde and Trayer, 1976) (para revisión ver (Wilson, 1995, 2003)). En las isoenzimas I y III, el extremo C-terminal presenta actividad catalítica mientras el extremo N-terminal tiene funciones reguladoras (Tsai and Wilson, 1995, 1997). En cambio, en la Hx-2 ambos extremos conservan la actividad catalítica (Ardehali et al., 1996, Tsai and Wilson, 1996).

Una cuarta isoenzima presente en los tejidos de mamíferos es la hexoquinasa tipo IV, conocida también como glucoquinasa (para revisión, ver: (Wilson, 1995, Postic et al., 2001)), que tiene un peso molecular de 50 kDa y difiere de las otras isoenzimas en algunas

propiedades, incluyendo su menor afinidad por la glucosa y su carencia de sensibilidad a la inhibición por el producto, glucosa 6-fosfato.

Las isoenzimas de la hexoquinasa también difieren entre sí en su distribución tisular. Así, la Hx-1 se expresa preferentemente en el cerebro y en los eritrocitos, la Hx-2 en el músculo esquelético y en los adipocitos, la tipo III se localiza en el núcleo (Preller and Wilson, 1992) y la tipo IV en el hígado y en el páncreas (para revisión, ver: (Wilson, 1995, Postic et al., 2001, Wilson, 2003)).

Las células con elevado índice mitótico presentan un aumento significativo de la actividad de la hexoquinasa, en comparación con las células normales (Pedersen, 1978, Bustamante et al., 1981, Parry and Pedersen, 1983, Arora and Pedersen, 1988). En este sentido, un número considerable de estudios indican la existencia de un aumento de la actividad de esta enzima en líneas celulares derivadas de tumores humanos y animales (para revisión ver: (Smith, 2000)). Además, la expresión de la hexoquinasa en las células neoplásicas está directamente relacionada con el grado de malignidad (Burk et al., 1967, Pedersen, 1978). Al respecto, se han clonado y secuenciado las isoformas de la hexoquinasa presentes en este tipo de células (Thelen and Wilson, 1991, Mathupala and Pedersen, 1997) y, curiosamente, estas secuencias corresponden a la Hx-2. Por otra parte, la Hx-1 también está presente en algunos tumores con alta capacidad glucolítica (Shinohara et al., 1991, Rempel et al., 1994), aunque se sugiere que el desarrollo de la neoplasia se acompaña de cambios en el perfil isoenzimático de la hexoquinasa. De hecho, la Hx-2, se expresa en niveles significativamente altos en los gliomas (Muzi et al., 2001). Este mismo patrón de comportamiento se observa en otras células tumorales, donde el 45% de todas las muestras examinadas presentaron altos niveles de esta isoforma (Gudnason et al., 1984). En este sentido, aunque la Hx-1 es la isoforma predominante en la retina, los retinoblastomas expresan cantidades considerables de la Hx-1 (Beemer et al., 1982). Estas evidencias indican que pueden detectarse cantidades significativas de la Hx-2 en células altamente proliferativas, derivadas de tejidos en los que normalmente no se expresa esta isoforma. De hecho, numerosos trabajos indican que la Hx-2 es la principal isoforma que se expresa en una gran variedad de tumores, con un aumento significativo de su expresión, llegando a ser cien veces superior, en detrimento de la Hx-1 (para revisión, ver: (Pedersen et al., 2002)).

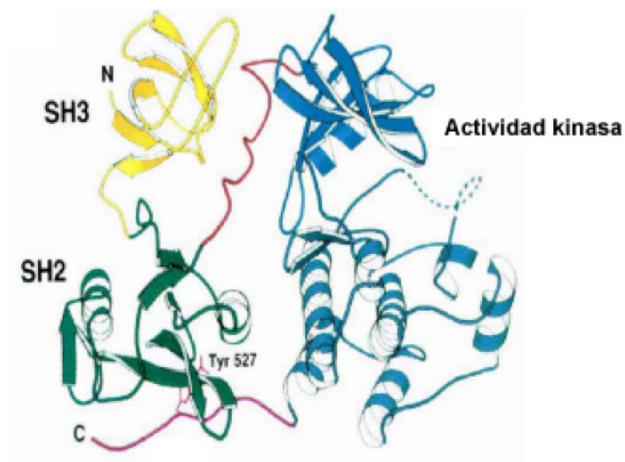
Aunque son necesarios estudios más exhaustivos, cabe cuestionarse qué ventajas metabólicas se derivan de la expresión de dos isoenzimas que pueden asociarse a las mitocondrias y, en segundo lugar, qué isoforma es la responsable de la alta actividad de la hexoquinasa observada en las células malignas. En este sentido, durante la progresión del fenotipo tumoral y, más concretamente, en los gliomas, se producen aberraciones cromosómicas. De hecho, se generan más copias del cromosoma 7 y tienen lugar alteraciones estructurales en los cromosomas 9 y 22. Además, se produce una disminución en el número de

copias del cromosoma 10, donde se localiza el gen que codifica la Hx-1 (Shows et al., 1989). Este hecho podría explicar por qué, a pesar de la alta capacidad glucolítica y el aumento de la actividad de la hexoquinasa observado en estas células, se detectan niveles bajos de la Hx-1, que pueden ser, incluso, inferiores a los detectados en el tejido normal (Oudard et al., 1995, Oudard et al., 1996a, Oudard et al., 1996b). En cambio, esto no sucede con la Hx-2, ya que el gen que codifica esta isoforma se localiza en un cromosoma diferente, concretamente en el cromosoma 2 (Letho et al., 1993).

Por otra parte, como hemos mencionado con anterioridad, la Hx-2 es la única isoenzima que presenta los extremos N- y C-terminal con actividad catalítica, mientras que en la Hx-1 esta función solo se conserva en el extremo C-terminal. Por tanto, es de esperar que las células cancerosas sobreexpresen la isoforma de la hexoquinasa que presenta mayor potencial catalítico. Al respecto, se ha demostrado que la Hx-2 es una característica de las células tumorales indiferenciadas y con alta velocidad de proliferación. En este sentido, son varios los eventos que parecen contribuir al aumento en la expresión de esta isoenzima y, consecuentemente, al aumento de su actividad. Éstos incluyen la duplicación génica, la amplificación y, quizás también, la desmetilación, así como la activación del promotor. Otros procesos que pueden estar implicados son la estabilidad del mensajero y la asociación de la enzima a las mitocondrias (para revisión, ver: (Pedersen et al., 2002)).

1.4 El oncogen c-Src.

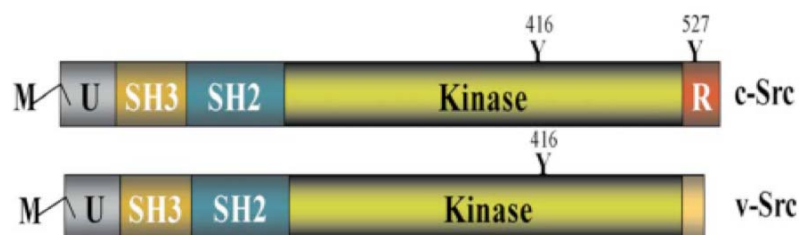
La proteína kinasa c-Src forma parte de una gran familia de proteínas tirosina kinasas (PTK) no receptoras, asociadas a membrana, de las cuales se han identificado 9 proteínas. La principal función de las PTK es la regulación de vías de señalización intracelular. Las PTK catalizan la transferencia de 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).

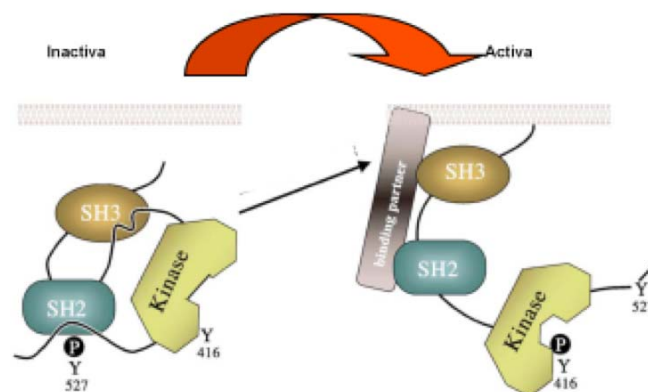
La proteína kinasa v-Src fue el primer retrovirus oncogénico identificado. v-Src difiere de c-Src en una sustitución de la secuencia en el carboxilo terminal, resultando en una pérdida de aminoácidos, como la tirosina 527 (Y527), que cuando se fosforila se une a los dominios SH y estabiliza la conformación 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 la forma activa de c-Src tiene un papel muy importante en la génesis y progresión de múltiples cánceres humanos, incluidos los gliomas (Du et al., 2009).



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

Modificado de Frame (2002).

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 defosforilación 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 (Xu et al., 1997, Frame, 2002 114).



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

Modificado de Frame (2002)

Existen moléculas que son capaces de modificar la actividad de c-Src. 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 (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).

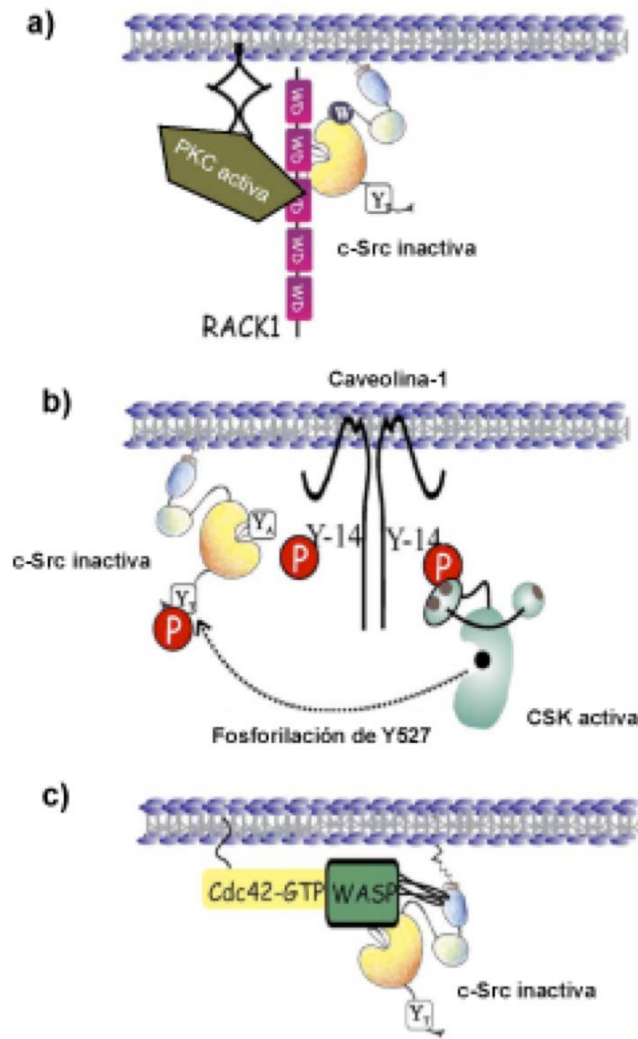
Entre las moléculas endógenas se encuentran RACK1, caveolina, WASP y Cx43. RACK1 es un receptor intracelular para la PKC activa. Se ha demostrado que RACK1 interacciona con c-Src, además de con la PKC. Así, estudios realizados con fibroblastos en los que se sobreexpresó RACK1 revelan que esta proteína 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. (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, a través de una región rica en prolina 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).

Recientemente en nuestro grupo se ha descrito que la Cx43 regula la actividad de c-Src al aumentar la fosforilación de c-Src en Y527 y la disminución de la fosforilación en Y416. Para ello, es necesaria la interacción de c-Src con la Cx43. La fosforilación de los residuos Y247 y Y265 de la Cx43 son necesarios para reducir la actividad de c-Src.

En este sentido, entre otras muchos efectos descritos, indica el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α en condiciones de normoxia (2002), induciendo la expresión de GLUT-1.



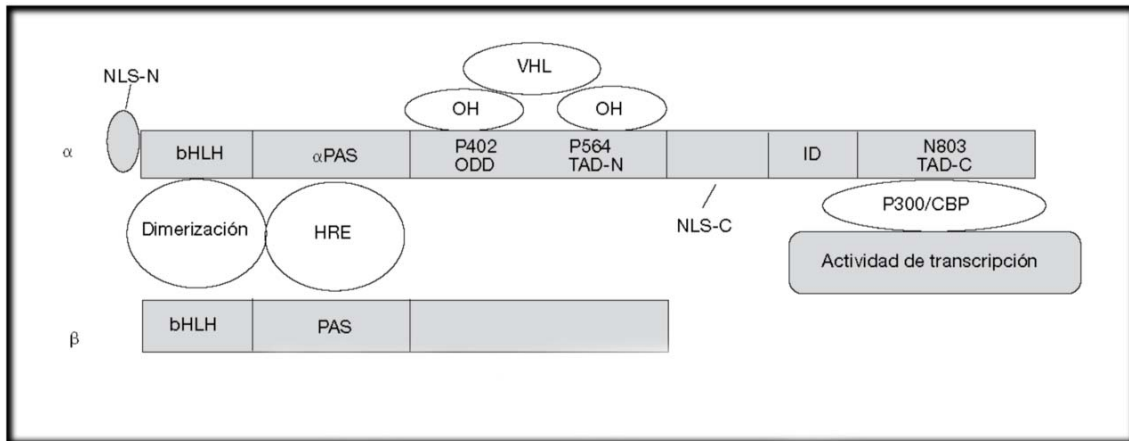
Esquema 12. Regulación de la actividad de c-Src mediante la interacción con RACK1, Caveolina-1 y WASP.

Modificado de Chong (2005)

1.5 Papel de Hif-1 α como regulador de la captación de glucosa.

El factor inducible por hipoxia Hif-1 α es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno (Kaelin, 2002). Hif-1 α , está involucrado en la respuesta a la hipoxia, en la homeostasis del oxígeno, en la respuesta a la isquemia del miocardio, isquemia cerebral, isquemia de la retina, hipertensión pulmonar, la preeclampsia, el retraso en el crecimiento intrauterino y el cáncer. Tiene un papel central tanto en los mecanismos fisiológicos homeostáticos, como en los etiopatológicos.

Molecularmente Hif-1 α es un heterodímero compuesto por cadenas alfa (reguladas por el O₂) y beta, dispuestas en doble hélice (bHLH); pertenece a una familia de factores de transcripción que consta de tres subunidades alfa (Hif-1 α , Hif-2 α , Hif-3 α) y a una subunidad beta (Hif-1 β), también llamada translocador nuclear aril hidrocarburos (ARNT) (Wang and Semenza, 1995). Hay 2 sitios de señalización nuclear (NLS), situados en el extremo carboxilo terminal (aminoácidos 718-721) y en el extremo amino terminal (aminoácidos 17-33), pero sólo el carboxilo terminal es el responsable por la acumulación nuclear del HIF-1 α (Vandromme et al., 1996). Además, se sabe que HIF contiene dos dominios de transactivación (TAD) en el C-terminal (aminoácidos 531-575 y 786-826), que están separados por una secuencia de aminoácidos (575-786) que inhiben la transactivación (Jiang et al., 1997) (Esquema 13). La parte N terminal de la molécula (aminoácidos 1-390) contiene el dominio bHLH-PAS, que es necesario para la dimerización y ligación al ADN (Jiang et al., 1996). Las interacciones entre los dominios bHLH de ambas subunidades regulan su dimerización (Michel et al., 2000). El dominio C-terminal tiene como función señalar la translocación del Hif-1 α al núcleo, la estabilización proteica y la interacción con el coactivador p300 (Jiang et al., 1997). En el dominio de la degradación oxígeno-dependiente (ODD) del Hif-1 α , los residuos de prolina en las posiciones 402 y 564 tienen un importante impacto en la estabilidad de la proteína en condiciones de normoxia, pues permiten, cuando están hidroxiladas, el reconocimiento por la proteína Von Hippel Lindau (pVHL) y la posterior activación de la vía de degradación de la ubiquitina (Huang et al., 1998a, Maxwell et al., 1999). La hidroxilación de los residuos de prolina en el ODD del Hif-1 α representa el punto crítico que regula la estabilidad de la proteína (Ohh et al., 2000, Tanimoto et al., 2000) (Esquema 14).



Esquema 13. Estructura molecular de HIF-1 α .

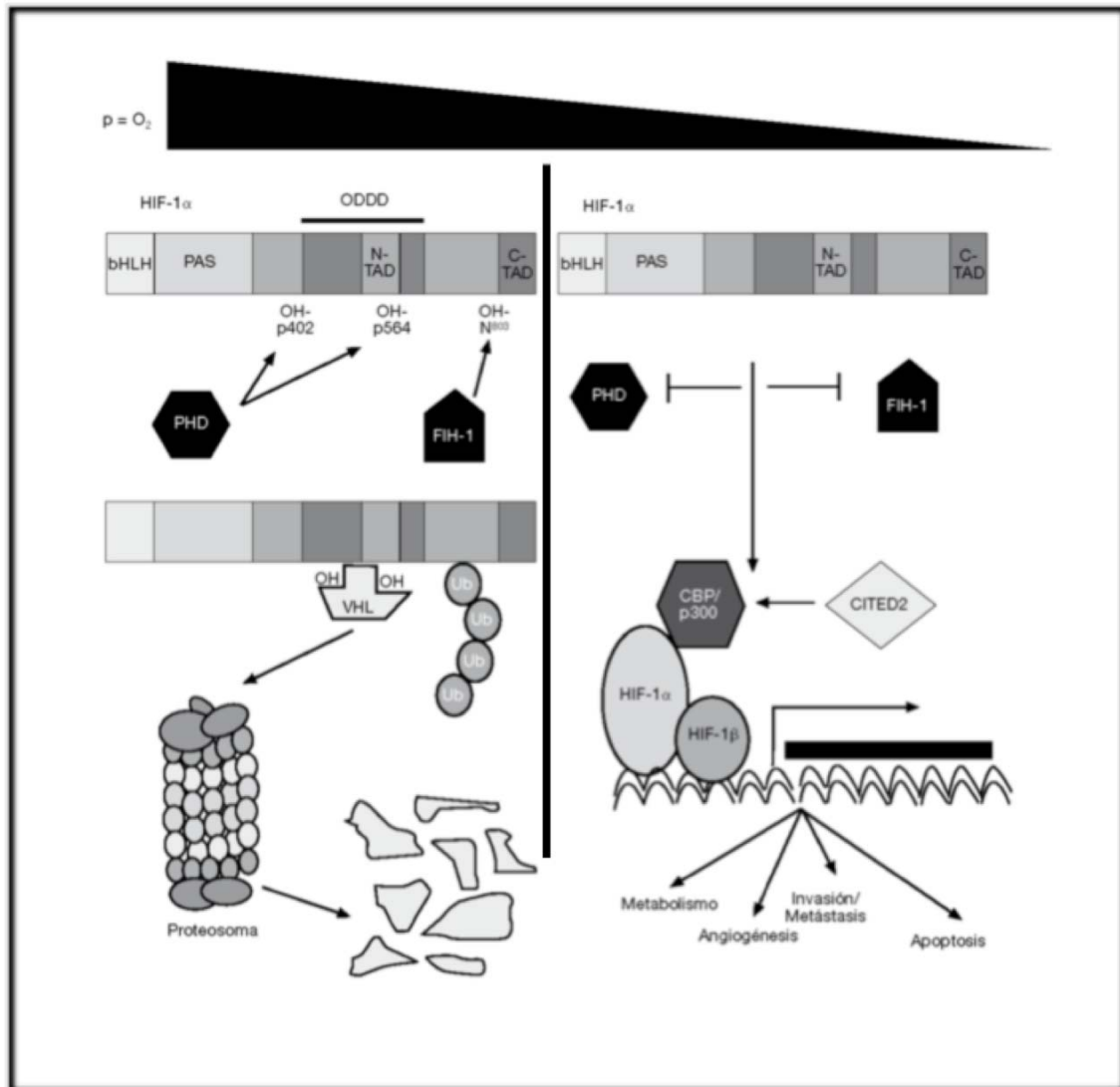
Modificado de Shi, YH (2004).

El principal mecanismo de regulación de Hif-1 α , es la tensión de oxígeno celular. La hipoxia es la reducción de la tensión de oxígeno, que se define en términos clínicos por la reducción de la disponibilidad de oxígeno hasta niveles críticos, es decir, los valores de tensión inferiores al 7% (Zander and Vaupel, 1985).

En condiciones de normoxia, los estudios de los mecanismos moleculares de la activación de Hif-1 α , muestran que en presencia de O₂, los dominios de hidroxilación de la prolina (PHD1, 2, 3) provocan la hidroxilación específica en dos residuos de prolina (P402 y P564) en el ODD del HIF-1 α , permitiendo el reconocimiento del Hif-1 α por la pVHL, formándose el complejo E3 ubiquitina, que transformará el Hif-1 α en un objetivo para la degradación (Masson et al., 2001, Min et al., 2002). Jaakkola y sus compañeros (Jaakkola et al., 2001) demostraron que la interacción entre la pVHL y el dominio específico del Hif-1 α están regulados por la hidroxilación del residuo de prolina (Hif-1 α P564) por una enzima denominada Hif-1 α protil hidroxilasa (HIF-PH), que requiere hierro y oxígeno. Otro sensor de O₂ es el factor inhibidor del Hif-1 α (FIH-1), que hidroxila el Hif-1 α en presencia de O₂, en el residuo de asparagina 803 en el dominio de la activación de la transcripción del C-terminal (C-TAD), y permanece inactivo en hipoxia, lo que permite la interacción con los coactivadores CBP/p300 (Jeong et al., 2002, Lando et al., 2002) (Esquema 14).

En condiciones de hipoxia, el O₂ molecular no está disponible y de esta forma las enzimas están inactivas, lo que implica un aumento de los valores del Hif-1 α (Boddy et al., 2005). El Hif-1 α no es hidroxilado y, por tanto, degradado, provocando su acumulación en la forma heterodimizada con la subunidad beta (Hif-1 β). Este heterodímero migra al núcleo, donde se unirá a las secuencias específicas del ADN, activando genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis, como, por ejemplo,

el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de transformación-alfa (TGF- α), el transportador 1 de glucosa (GLUT-1), o la anhidrasa carbónica IX (CA9), entre muchos otros, que sabemos están implicados en el desarrollo y la agresividad tumoral (Wykoff et al., 2004, Melillo, 2006) .



Esquema 14. Regulación de la estabilidad y la actividad del factor inducible por hipoxia, HIF-1 α . Modificado de Brahimi-Horn y Poys-segur (2005).

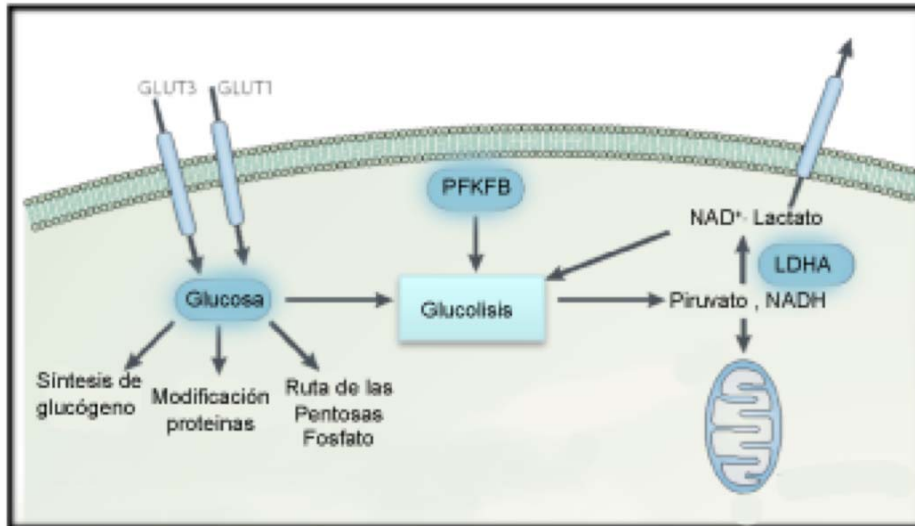
Aunque, el principal regulador del HIF es el oxígeno, existen otras vías para regular

HIF. Hif-1 α puede regularse por vías de señalización intracelular, tales como la proteína cinasa B (Akt) ó la 3- fosfatil-inositol-cinasa (PI3K). Por último, las especies reactivas de oxígeno (ROS) o citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la angiotensina (Gao et al., 2002), o vías de señalización, como RAS/RAF1/MEK1/ERK1/2 y/o p53/JNK, que se activan en respuesta a los oncogenes, factores de crecimiento, en condiciones de normoxia. En el caso de la activación por oncogenes, podemos señalar c-Src (v-Src) que es capaz de activar Hif-1 α inhibiendo la proil-hidroxilación, lo que implica estabilización del Hif-1 α (Blancher et al., 2001, Chan et al., 2002). Este hecho es de una gran importancia en este trabajo, pues siempre hemos trabajado en condiciones de normoxia.

La actividad de la transcripción de genes Hif-1 α se encuentra, de este modo, regulada por la tensión de oxígeno celular y por las diferentes vías descritas anteriormente.

Este factor de transcripción activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia de oxígeno, controlando la expresión de decenas de productos de los genes y proteínas implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la invasión, la apoptosis, el tono vascular, la regulación del pH, la homeostasis epitelial y la resistencia a los fármacos.

La mayoría de los estudios sobre el comportamiento de este factor de transcripción, se han realizado en tumores sólidos. El metabolismo en los tumores sólidos es significativamente diferente a tejido adyacente. Estos cambios fueron identificados a finales de los 70 por Otto Warburg (Warburg, 1956a). El encontró que los tejidos normales utilizan la glucólisis para generar aproximadamente el 10% del ATP de la célula, y el resto lo generan las mitocondrias. En cambio en las secciones de tumores, aproximadamente el 50% del ATP estaba generado por la glucólisis y el otro 50% por las mitocondrias. Sorprendentemente, esto ocurre cuando hay suficiente oxígeno para soportar la función de las mitocondrias. La explicación de este comportamiento esta todavía sin describir pero existen algunas ideas e hipótesis sobre como este perfil metabólico proporciona a los tumores una ventaja en su crecimiento. Una de estas explicaciones, plantea que la activación de HIF-1 α y de su programa transcripcional, tiene dos efectos mayoritarios sobre el metabolismo de la glucosa. Primero HIF-1 α estimula la producción de energía por vía glucolítica ya que puede, incrementar la velocidad de captación de glucosa induciendo los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 (Maxwell et al., 1997, Chen et al., 2001, Ozbudak et al., 2008) y que la glucosa una vez en su localización intracelular es rápidamente fosforilada por la hexoquinasa a glucosa-6-fosfato. Ambas hexoquinasas, Hx-1 y Hx-2 pueden ser inducidas por HIF-1 α , pero parece ser que Hx-2 tiene una modificación mas importante en condiciones de hipoxia (Denko, 2008). Posteriormente, la glucosa-6-fosfato, es usada en diferentes vías, como componente estructural en la síntesis de glicoproteínas, metabolizada en pentosa para generar ribosa, usada para sintetizar glucogeno o predominante utilizada para generar piruvato para la glicólisis (Esquema 15).



Esquema 15. Hipótesis propuesta para explicar como HIF-1 α regula el metabolismo en células tumorales.

Modificado de Nicolas C. Denko (2008).

1.6 La gliosis reactiva.

La gliosis reactiva es la respuesta de los astrocitos del SNC frente a un daño. Este daño puede ser ocasionado por diferentes patologías como por ejemplo una isquemia cerebral, un daño mecánico ó enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer, parkinson o tumores.

Cuando se ocasiona una lesión neuronal, las células del entorno reaccionan, y entre ellas se encuentran los astrocitos, estos proliferan y sufren cambios morfológicos como el aumento de tamaño. Estos cambios vienen marcados en su mayoría por cambios en la expresión de algunas de sus proteínas. El hecho mas representativo de esta reactividad es el incremento de la proteína acida fibrilar glial (GFAP). Esta proteína forma parte del las que componen el citoesqueleto de los astrocitos y aumenta su expresión como respuesta a los daños causados en el tejido cerebral.

Estudios recientes, han propuesto que animales sin capacidad una capacidad de respuesta ante el daño como la gliosis reactiva, tienen un area lesionada mucho mayor que animales que si tienen esta capacidad. Esto sugiere que la gliosis reactiva es un mecanismo de protección (Faulkner et al., 2004, Li, 2007)

Estudios recientes, han relacionado el daño neuronal provocado por una inyección de ácido kaínico que cursa con un aumento de la reactividad astrocitaria, y por tanto con un aumento de la expresión de GFAP, con la disminución de la Cx43 en los astrocitos de la zona de la lesión (Koulakoff et al., 2008). Esta relación ha sido puesta de manifiesto en el grupo de investigación del Dr. Christian Giaume, y este modelo de estudio ha sido puesto a nuestra disposición para poder realizar los experimentos "in vivo" que se mostrarán a lo largo de esta memoria.

PLAN DE TRABAJO

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la Introducción y con objeto de conocer el papel de la conexina 43 como modulador de la captación de glucosa en astrocitos, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

- 1.- Estudiar la expresión de las proteínas implicadas en la captación de la glucosa en los astrocitos en un modelo de pérdida de Cx43 "in vivo".
- 2.- Estudiar la expresión de las proteínas implicadas en la velocidad de captación de glucosa tras la pérdida de la conexina 43 por acción de los inhibidores de las uniones comunicantes, endotelina 1 y carbenoxolona, o por acción de un siRNA específico para la conexina 43.
- 3.- Estudiar de la implicación del factor de transcripción HIF-1 α en los cambios de la velocidad en la captación de glucosa, promovidos por la pérdida de comunicación intercelular en los astrocitos.
- 4.- Estudiar de la implicación de la tirosina quinasa c-Src en los cambios de la velocidad en la captación de glucosa, promovidos por la pérdida de comunicación intercelular en los astrocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Especie ensayada, condiciones del animalario.

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 y ratones transgenicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control del promotor de la proteína fibrilar ácida de la glla (GFAP) (hGFAP-eGFP) cedidos por el Dr. 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 y ratones de 6 semanas para los experimentos "in vivo".

Toda la experimentación con estos animales, se realizó siguiendo la normativa europea vigente para el uso de animales de experimentación.

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).
- Para la tripsinización de las células se ha utilizado un baño termostaticado 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), termostaticada a 170°C.
- El agua, el material de disección y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterilizaron por medio de calor húmedo en un autoclave modelo 437 (Selecta).
- 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 cuentaglóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- El espectrofotómetro utilizado para la cuantificación de proteínas y cuantificación de cDNA, es de la casa IMPLEN (Alemania), del laboratorio del Dr. Eduardo Weruaga, INCYL.
- 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 e ImageJ.
- 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 RT-qPCR se utilizó el servicio prestado por el NCBI en su página web.
- 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) y el transiluminador modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad), propiedad de la Dr. Raquel Rodríguez, del Instituto de Neurociencias de Castilla y León.
- Las imágenes se captaron 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.
- El contador de centelleo de la casa BECKMAN COULTER, propiedad del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Salamanca.

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 ditiotretol (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.
- La polimerasa de MaxterMix, utilizada en la qPCR, fue adquirida en Invitrogen.
- 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.

- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la qPCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Reino Unido).
- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la qPCR para hacer el control de carga, fueron adquiridos en la casa comercial Primerdesing (Reino Unido).

Tabla 1. Oligonucleotidos empleados para la qPCR.

Gen diana	Cadena sentido (5'→3')	Cadena antisentido (5'→3')
GLUT-3	CGAGAGTCCAAGGTTCTTGC	TCCTGGATCTCCTGGATCAC
Ubiquitina	COMERCIAL	COMERCIAL

3.1.3.3 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'-tetrametilendiamina (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).
- Los anticuerpos primarios que se utilizaron para la inmunodetección, tanto por western Blot como por inmunohistoquímica quedan descritos en la tabla 2

Tabla 2. Anticuerpos primarios para utilizados en inmunodetección para Western-Blot e inmunohistoquímica.

MARCADOR	DONADOR	TIPO	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
Cx43	Conejo	Policlonal	1:50	ZYMET
Cx43	Ratón	Monoclonal	1:100	CHEMICON
GLUT-1	Conejo	Policlonal	1:250	CHEMICON
GLUT-3	Conejo	Policlonal	1:250	CHEMICON
GLUT-3 (IHC)	Conejo	Policlonal	1:25	NOVUS BIOLOGICALS
Hx-1	Ratón	Monoclonal	1:250	CHEMICON
Hx-2	Conejo	Policlonal	1:250	CHEMICON
HIF-1 α	Conejo	Policlonal	1:500	NOVUS BIOLOGICALS
Y416-cSRC	Conejo	Policlonal	1:500	CELL SIGNALING
Total-cSRC	Conejo	Policlonal	1:500	CELL SIGNALING
GFAP	Ratón	Monoclonal	1:500	SIGMA
GFAP	Conejo	Policlonal	1:500	SIGMA
ET-1	Conejo	Policlonal	1:250	NOVUS BIOLOGICALS
NeuN	Ratón	Monoclonal	1:100	CHEMICON
GAPDH	Raton	Monoclonal	1:5000	BIONOVA

- Los anticuerpos secundarios que se utilizaron para la inmunodetección, tanto por western blot como por inmunohistoquímica quedan descritos en la tabla 3 y tabla 4.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa para utilizados en inmunodetección para Western-Blot

MARCADOR	DONADOR	MARCA	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
α -Ratón	Cabra	Peroxidasa	1:5000	Santa Cruz
α -Conejo	Cabra	Peroxidasa	1:10000	Santa Cruz

Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo utilizados en inmunodetección para inmunohistoquímica.

MARCADOR	DONADOR	FLUOROCROMO	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
α -Ratón	Cabra	Alexa 488	1:5000	Invitrogen
α -Ratón	Cabra	Alexa 594	1:5000	Invitrogen
α -Ratón	Cabra	Alexa 648	1:5000	Invitrogen
α -Conejo	Cabra	Alexa 488	1:5000	Invitrogen
α -Conejo	Cabra	Alexa 594	1:5000	Invitrogen
α -Conejo	Cabra	Alexa 648	1:5000	Invitrogen

- 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).

3.1.3.4. 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 las proteínas de estudio, procedieron de BioNova científica S.L. (Madrid, España).

Tabla 5. siRNA utilizados para el silenciamiento de diferentes proteínas.

TARGET	SENSE (5'-3')	ANTISENSE (5'-3')	PROCEDENCIA
Cx43	GCUGGUUACUGGUGACAGATT	UCUGUCACCAGUAACCAGCTT	BioNova
HIF-1 α 1	CAUUGAAGAUGAAAUGAAATT	TTGUAACUUCUACUUUACUUU	BioNova
HIF-1 α 2	CUGAUAACGUGAACAAAUATT	TTGACUAUUGCACUUGUUUUAU	BioNova
HIF-1 α 3	CUGUUGAUCUUAUAAUGAUTT	TTGACAACUAGAAUAAUUACUA	BioNova

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

3.1.3.5. Productos utilizados para los estudios de captación de glucosa.

- La 2-desoxi-D[1-¹⁴C]glucosa fue suministrada por la casa Amersham Pharmacia Biotech.
- El líquido de centelleo empleado en las mediciones de radiactividad fue de la casa Beckman Instruments.

3.1.3.6. 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 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) procedió de Sigma.
- 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.
- El Cloruro de Cobalto (CoCl₂), utilizado para promover la acumulación de HIF-1 α , procedió de la casa MERCK.

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 μ m), procedentes de la casa millipore.

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
estreptomicina	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 Tabernerero y col. (Tabernerero 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, estreptomicina 37,5 U/mL, pH 7,2), en placas petri recubiertas con poli-L-lisina ($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/ cm^2 y se colocaron en un incubador a 37°C, con un 5% CO_2 . 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)] [andr ].

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, con Cx43-siRNA o con HIF-1 α -siRNA tal y como se explica en el apartado 3.2.4. 48 h después de la transfección, los astrocitos se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ET-1 0,1 μM o de CBX 50 μM durante 24 horas. Estos agentes se mantuvieron a la misma concentración durante el resto del experimento.

En los experimentos realizados con el inhibidor de c-Src, PP2 o su homólogo estructural PP3 no activo, utilizado como control, se adiccionaron al DMEM libre de suero 1 h antes del tratamiento con ET-1 0,1 μM o de CBX 50 μM y se mantuvieron presentes a la misma concentración durante el resto del experimento.

3.2.3. RT-PCR Y q-PCR:

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. A posteriori, se trató con DNAsa, para eliminar el posible DNA que se haya podido arrastrar en el proceso, durante 2h a 37°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. Cuantificación del cDNA producto de la retrotranscripción.

Para realizar la cuantificación del cDNA obtenido de la reacción de retrotranscripción, se midió la concentración por espectrofotometría, con el programa específico para medidas de concentración de cDNA.

V. 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 oligonucleótidos utilizados para las diferentes PCR's, están descritos en la Tabla 1

Para llevar a cabo la PCR, se preparó, por cada tubo, una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos:

- 12,5 µl de MasterMix. (SYBR Green)
- 0,5 µl de Rox
- 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 mM).
- 5 ng de cDNA de la muestra de Cl₂Mg.
- c.s.p 20 µl de H₂O ultrapura estéril.

Una vez preparada la mezcla, los tubos se llevaron al termociclador para amplificar el gen deseado. En ambos casos se utilizaron 45 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos:

GLUT-3	(94 °C 20", 65 °C 40", 72 °C 1min 30").
Ubiquitina	(94 °C 20", 65 °C 40", 72 °C 1min 30").

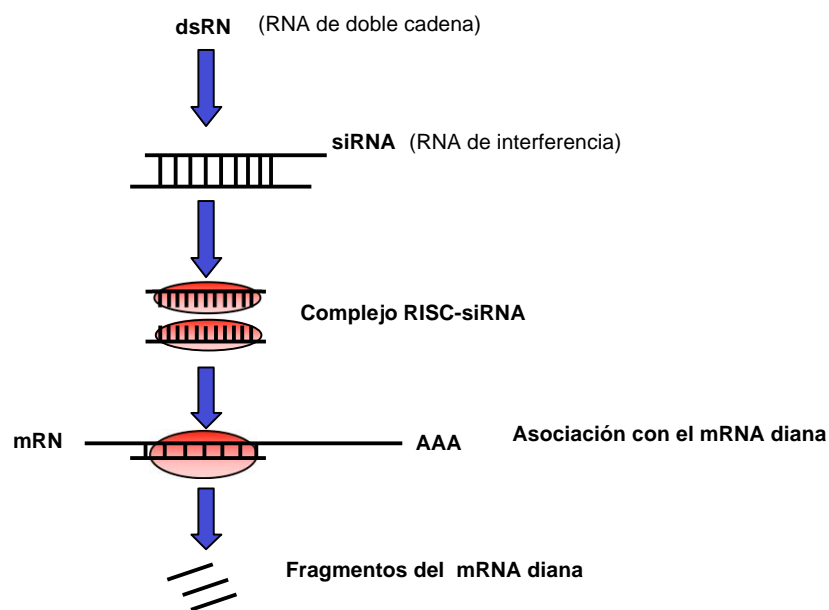
VI. Análisis de datos

El análisis de los resultados, se llevo a cabo en el programa informático acoplado al termociclador, mediante cuantificación relativa. Los resultados se expresan como numero de copias de GLUT-3, por numero de copias del gen control, en nuestro caso Ubiquitina.

3.2.4. 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 16. En primer lugar, el RNA de doble cadena (*doubled stranded RNA*, dsRNA) 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.



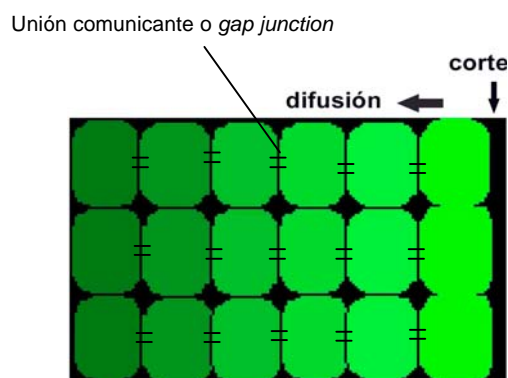
Esquema 16. Fundamento de la técnica del siRNA

Para llevar a cabo el silenciamiento del mRNA de la Cx43 y de HIF-1 α , las células se transfectaron con siRNA específico para cada mRNA o con siRNA sin diana (NT) empleando lipofectamina para ello. Antes de la transfección 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 entre 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.

3.2.5. 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 (Taberero 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 17).



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

3.2.6. 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, antipaina 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, aprotinina 3 U/ml e inhibidores de fosfatasa como NaF y Ortovanadato. 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 (7,5% de poliacrilamida para la Cx43, c-Src total, c-SrcY416, GLUT-1, GLUT-3, Hx 1, Hx 2, HIF-1 α y GAPDH) 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 7,5% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), persulfato de amonio (AMPS) al 0,05% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED) al 0,05% (p/v). El gel de concentración estaba compuesto por Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), acrilamida/Bis al 4% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), AMPS al 0,05% (p/v) y TEMED al 0,05% (p/v).

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 carga (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 400 mA, durante el tiempo que las proteínas tardaron en abandonar el gel de concentración. A continuación, se aplicó un amperaje constante de 400 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, están descritos en la Tabla 1. 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. Los anticuerpos secundarios utilizados están descritos en la Tabla 2. Estos anticuerpos fueron preparados en TTBS. En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína

presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía mediante el programa de análisis de imagen IMAGEJ. Los resultados se normalizaron frente a los valores de GAPDH que fue empleado como control de carga.

3.2.7. Experimentos realizados “in vivo” en ratones C57BL6 y hGFAP-eGFP

3.2.7.1. Inyección de ácido kaínico en los ratones C57BL6 y hGFAP-eGFP, y preparación del tejido.

Se realizaron inyecciones intracraneales de ácido kaínico en ratones adultos C57BL6 y hGFAP-eGFP, 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 profundieron transcárdialmente 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 profundieron transcárdialmente 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 en secciones frontales de 20 μ M de grosor en un criostato recogiéndose en porta-objetos adherentes. Los porta-objetos con los cortes se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.8. 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 y en los cortes flotantes, están descritos en la Tabla 2. 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, están descritos en la Tabla 4. Después de varios lavados, los porta-objetos con los cortes se montaron en una solución que mantenía la fluorescencia, Fluoromount.

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, respectivamente.

3.2.9. Determinación de la captación de 2-desoxi-D-glucosa.

Los experimentos de captación de 2-desoxi-D-glucosa se realizaron según el método descrito previamente por Taberero y col. (Taberero et al., 1996a). Estudios previos realizados en el laboratorio demuestran que el proceso de captación de 2-desoxi-D-glucosa es lineal con respecto al tiempo, en nuestras condiciones experimentales, al menos durante la primera hora de incubación (Taberero et al., 1996a).

Las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos en DMEM (que contiene 5,55 mM de glucosa) con 2-deoxi-D[1-¹⁴C]glucosa (0,15 µCi; 750 dpm por pmol). La 2-deoxi-D-glucosa es un derivado de la D-glucosa que es transportado al interior celular utilizando el mismo transportador que la D-glucosa. Una vez en el interior de la célula, la 2-desoxi-D-glucosa es fosforilada por las hexoquinas celulares, pero no continúa su metabolismo, por lo que permanece en el citoplasma. Consecuentemente, la medida de la cantidad de 2-desoxi-D-glucosa encontrada en la célula es una medida de la captación de D-glucosa. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se aspiró rápidamente y las células se lavaron tres veces con 2 ml de PBS frío.

Posteriormente, las células se lisaron por la adición de 500 µl de una solución de NaOH 10 mM que contenía Triton X-100 al 0,1%. Del lisado resultante se tomaron 450µl para el conteo de la radiactividad que se trasvasaron a un vial de centelleo de 6 ml de capacidad y se completó el volumen con líquido de centelleo. Los otros 50 µl se utilizaron para cuantificar la cantidad de proteína por condición estudiada.

Después de 12h, desde la preparación de la mezcla de lisado con líquido de centelleo se cuantifico, la radioactividad incorporada al interior celular mediante la utilización de un contador de centelleo líquido. La radiactividad específica de la 2-desoxi-D-glucosa, determinada en el medio de incubación, fue utilizada para la realización de los cálculos.

3.2.10 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 análisis de varianza (ANOVA) seguido del test Tukey, Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

Resultados

4.1 Estudio de la relación entre la conexina43 y la captación de glucosa de los astrocitos en la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.

Los astrocitos se encuentran ampliamente comunicados a través de canales intermembranas conocidos como uniones comunicantes (véase Introducción) (Mugnaini, 1986, Yamamoto et al., 1990a, Binmoeller and Muller, 1992). Estos canales intercelulares permiten el paso de una célula a otra de iones y moléculas pequeñas, como segundos mensajeros y diferentes metabolitos (Sáez et al., 1989, Tabernero et al., 1996) (para revisión, ver: (Loewenstein, 1987, Kumar and Gilula, 1996, Giaume et al., 1997). La permeabilidad de las uniones comunicantes es un proceso que se encuentra regulado por diferentes factores fisiológicos (para revisión, ver: (Giaume and Venance, 1995, Rouach et al., 2002). Estudios previos han demostrado que las uniones comunicantes de los astrocitos permiten el paso de glucosa (Tabernero et al., 1996, Tabernero et al., 2006), sugiriendo que los astrocitos pueden operar como una red de comunicación (Rouach et al., 2008). Además, los inhibidores de las uniones comunicantes ensayados hasta el momento, como ET-1 y CBX , promueven un aumento, rápido y significativo, en la velocidad de captación de glucosa así como de las proteínas implicadas en este proceso (Tabernero et al., 2006, Herrero-Gonzalez et al., 2009). Esto sugiere que la permeabilidad de las uniones comunicantes formadas por Cx43, isoforma predominante en los astrocitos (Giaume et al., 1991, Giaume and Theis, 2010), puede desempeñar un papel importante en la regulación de la utilización de glucosa por los astrocitos.

Al producirse una lesión cerebral, las células gliales sufren un proceso reactivo que afecta entre otros 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) (Jiang et al., 1993, Zhang et al., 1994, Hasselblatt et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que en el modelo de lesión cerebral provocado por la inyección de ácido kaínico se produce una fuerte gliosis reactiva, caracterizada en los astrocitos por el aumento de la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y la pérdida de la expresión de la Cx43 (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 expresión de las proteínas responsables de la captación de glucosa como GLUT-1, GLUT-3 y Hexoquinasa 2 (Hx-2), como había observado con el tratamiento de ET-1 en los astrocitos en cultivo (Sánchez-Alvarez et al., 2004).

Para ello, a ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranealmente PBS como control o ácido kaínico (1mg/mL), 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 mm con el criostato para analizar la expresión de Cx43 tal y como se describe en materiales y métodos.

La figura 1 muestra la fuerte gliosis producida por la inyección de PBS y aún mas con ácido kaínico, caracterizada por una alta expresión de GFAP, al mismo tiempo que se produjo una fuerte disminución de la Cx43 en los astrocitos reactivos. Se puede observar que la zona de gliosis coincide con la zona de la pérdida de expresión de la Cx43. Esta pérdida de Cx43 no se produjo cuando la inyección se realizó con PBS.

Cuando se analizó la viabilidad de las neuronas en estas condiciones, mediante marcaje con NeuN, se observó que las inyecciones de ácido kaínico reducían considerablemente la población neuronal, fenómeno que no se observó con la inyección de PBS (Fig. 1).

4.1.1 Estudio de la presencia de ET-1 tras la gliosis reactiva provocada por una lesión cerebral.

La ET-1 es un péptido endógeno que se libera en respuesta a diferentes estímulos (Jiang et al., 1993, Zhang et al., 1994, Hasselblatt et al., 2001). Por ello, estudiamos su

presencia en la zona de la lesión cerebral provocada por PBS y ácido kaínico. Este péptido es de especial interés para nuestros estudios ya que inhibe las uniones comunicantes (Blomstrand et al., 2004), disminuye la expresión de la Cx43 y aumenta la captación de glucosa y la expresión de las proteínas responsables en astrocitos en cultivo (Sánchez-Alvarez et al., 2004).

Para estudiar la presencia de ET-1, se utilizaron ratones transgénicos de 6 semanas de vida postnatal que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la GFAP, de esta manera los astrocitos muy reactivos presentan fluorescencia verde por el aumento de expresión de GFAP. A estos ratones se les inyectó intracranealmente PBS o ácido kaínico (1mg/mL), mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Después de una semana se perfundieron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se extrajo el cerebro para después analizar mediante inmunohistoquímica, la presencia de ET-1.

La figura 2a-c muestra que en el hemisferio contralateral a la lesión no se observaron astrocitos reactivos (GFP+) ni presencia del péptido ET-1. Por otro lado, en la figura 2d-e, se observa que en el hemisferio lesionado con PBS existe reactividad astrocítica, caracterizada por un aumento de astrocitos GFP+. Además se observó un aumento de la presencia de ET-1. Tras la lesión con ácido kaínico, también se observa un aumento de la reactividad astrocítica y de la presencia de ET-1.

4.1.2 Estudio de la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos tras una lesión cerebral.

El transporte de glucosa hacia el interior de las células está mediado, fundamentalmente, por una familia de glicoproteínas homólogas (GLUTs) asociadas a la membrana, que transfieren la glucosa a través de la bicapa lipídica mediante un transporte facilitado independiente de energía. Los miembros de esta familia se distinguen por tener distribución y propiedades bioquímicas diferentes (para revisión, ver: (Bell et al., 1990, Mueckler, 1994, Vannucci et al., 1997)); véase Introducción.

Resultados anteriores en nuestro laboratorio realizados en cultivo de astrocitos con inhibidores de las uniones comunicantes, como la ET-1 o la CBX, indicaban que la inhibición de estas uniones promovía una pérdida de la expresión de la Cx43 y un aumento de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3. Por ello, decidimos estudiar la expresión de estas proteínas tras la lesión en el córtex cerebral de ratón con ácido kaínico, que cursa con la disminución de la Cx43 y el aumento de la ET-1.

Para estos estudios, se utilizaron ratones transgénicos de 6 semanas de vida postnatal que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la GFAP. A estos ratones se les inyectó intracranealmente PBS o ácido kaínico (1mg/mL), 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. Después de una semana 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 40mm con el microtomo, para después analizar mediante inmunohistoquímica las diferentes proteínas.

En la figura 3 se puede observar como tras la lesión producida por ácido kaínico, ocurre una fuerte gliosis en la zona afectada, caracterizada por una alta fluorescencia de GFP. Nuestros resultados indican que la lesión no modificó la expresión de GLUT-1 como muestran las imágenes de inmunohistoquímica (Fig. 3 b y e). De hecho, GLUT-1 muestra un patrón similar al obtenido con el anticuerpo PCAM, marcador específico de vasos sanguíneos.

A continuación analizamos la expresión de GLUT-3, un transportador de glucosa que no se expresa en condiciones normales en astrocitos. Esta isoforma está presente en células con alta capacidad glucolítica, como los tumores y, más concretamente, los gliomas (Yamamoto et al., 1990b, Nishioka et al., 1992, Boado et al., 1994, Nagamatsu et al., 1996, Younes et al., 1996, 1997, Samih et al., 2003). Además puede inducirse en respuesta a determinados estímulos (Nagamatsu et al., 1993, Ciudad et al., 2001) incluido el tratamiento con inhibidores de las uniones comunicantes como la ET-1 (Sánchez-Alvarez et al., 2004). En la figura 4 se observa como la lesión producida con PBS y en mayor medida con ácido kaínico, promueve una gliosis en la zona afectada secundada en el caso del ácido kaínico, por un aumento en la expresión de GLUT-3. GLUT-3 se expresa en los astrocitos reactivos, a juzgar por la colocalización de los marcajes de GFP y GLUT-3 (Fig. 4f). De hecho, la figura 5 muestra que en los ratones lesionados con PBS, la expresión de GLUT-3 se localiza, entre otras células en las neuronas a juzgar por la colocalización con el marcador neuronal (NeuN). Además, no se observa expresión de GLUT-3 en los astrocitos reactivos (GFP+). Mientras que en los ratones lesionados con ácido kaínico, GLUT-3 colocaliza con los astrocitos reactivos (GFP+) pero no con las neuronas ausentes como consecuencia de la lesión provocada con ácido kaínico.

Uno de los efectos de la ET-1 en los astrocitos es la inducción de la hexoquinasa tipo II (Sánchez-Alvarez et al., 2004), una isoforma que no se expresa en condiciones normales en el astrocito y puede contribuir al incremento en la captación de glucosa. Por ello, decidimos analizar la expresión de esta isoforma en los astrocitos tras la lesión con ácido kaínico.

En la figura 6 se observa como tras la lesión producida por ácido kaínico pero no con PBS, la gliosis esta acompañada por un aumento en la expresión de Hx-2. En la figura 7c se observa como con la inyección de PBS la Hx-2 colocaliza con el marcador neuronal NeuN pero

no con los astrocitos reactivos. Sin embargo en los ratones dañados con ácido kaínico, la Hx-2 se localiza fundamentalmente en los astrocitos reactivos marcados con GFP+ (Fig. 7I).

4.2 Efecto de la pérdida de la Conexina43 y de su funcionalidad en la captación de glucosa en astrocitos.

Tal y como se ha descrito en la introducción, existe una estrecha relación entre la comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes y la captación de glucosa en astrocitos. Por ello nos propusimos investigar la relación entre la proteína que forma las uniones comunicantes, la conexina 43 (Cx43), con la captación de glucosa en astrocitos, así como de las proteínas responsables de este proceso. Para ello, silenciemos la expresión de C43 mediante siRNA en astrocitos en cultivo.

4.2.1. Puesta a punto del silenciamiento de la conexina 43 en astrocitos

Para silenciar la Cx43, los astrocitos se transfectaron con un siRNA específico para la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 8 muestra que, pasadas 72 horas desde la transfección con Cx43-siRNA, el nivel de expresión de la Cx43 disminuyó un 80%, comparado con el nivel de la Cx43 que muestran los astrocitos transfectados con NT-siRNA y 95% con los astrocitos sin transfectar.

Una vez silenciada la Cx43, se determinó el efecto de la pérdida de la Cx43 sobre la comunicación intercelular de los astrocitos (Fig. 9). Para ello, se empleó la técnica conocida como “scrape loading” que permite determinar el grado de comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes. 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 9a se observa que en los astrocitos control y NT-siRNA, 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 9b muestra la cuantificación de estos resultados y se puede comprobar que la disminución de la permeabilidad de los astrocitos transfectados con Cx43-siRNA se redujo en torno al 80% con respecto a la situación control y un 95% con respecto a los astrocitos transfectados con NT-siRNA.

4.2.2. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la velocidad de captación de glucosa en astrocitos.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se comprobó que el cierre de las uniones comunicantes provoca un aumento rápido en la velocidad de captación de glucosa (Taberero et al., 1996, Taberero et al., 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar el efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la velocidad de captación de glucosa.

Para ello, los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA. A continuación, las células se incubaron con DMEM que contenía 2-desoxi-D[1-¹⁴C]glucosa (0,15 µCi; 750 dpm/pmol), durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la determinación de la captación de glucosa se realizó tal y como se describe en Material y Métodos.

La figura 10, muestra que no existen diferencias significativas entre la velocidad de la captación de glucosa del grupo control y los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Sin embargo, la transfección con Cx43-siRNA produjo un aumento significativo de un 35% en la velocidad de captación de glucosa.

4.2.3. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa.

El GLUT-1 es el más abundante de las isoformas del transportador de glucosa que se conocen hasta el momento. Además, es la isoforma responsable del transporte de glucosa en los astrocitos (Maher, 1995) (para revisión, ver: (Maher et al., 1994, Vannucci et al., 1997)). Por ello, se investigó si GLUT-1 estaría implicado en el aumento de la velocidad de captación de glucosa en los astrocitos con la Cx43 silenciada.

Para ello, los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA. A las 72h después de la transfección se extrajeron las proteínas tal y como se describe en Material y Métodos. Posteriormente, se analizó la expresión de GLUT-1 por Western Blot. Nuestros resultados muestran que la pérdida de Cx43 en los astrocitos promueve un aumento significativo de aproximadamente un 70% de la expresión de GLUT-1 (figura 11a).

Aunque GLUT-1 es el principal transportador de glucosa en los astrocitos (Maher, 1995) (para revisión, ver: (Maher et al., 1994, Vannucci et al., 1997)), en respuesta a determinados estímulos se pueden inducir otras isoformas, como GLUT-3 (Nagamatsu et al., 1993, Ciudad et al., 2001, Sánchez-Alvarez et al., 2004). Por tanto, nos propusimos estudiar la posible participación de esta isoforma en el aumento de la captación de glucosa, causado por la pérdida de la Cx43 en astrocitos.

Para ello, los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA. A las 72h después de la transfección se extrajo el RNA tal y como se describe en Material y Métodos. Posteriormente, se analizó la expresión de RNA mensajero de GLUT-3 por PCR cuantitativa. Nuestros resultados muestran que la pérdida de Cx43 en los astrocitos promueve un aumento del mRNA de GLUT-3 de aproximadamente un 45% (figura 11b).

La captación de 2-desoxiglucosa (2-DG-glucosa) no sólo implica el transporte hacia el interior de la célula, incluye también el primer paso de su metabolismo, es decir, la fosforilación de la glucosa en el carbono 6 para formar 2-deoxiglucosa-6-fosfato, reacción que es catalizada por la hexoquinasa (para revisión ver: (Wilson, 1995, 2003). En los astrocitos la isoforma predominante es la Hexoquinasa 1 (Hx-1). Por tanto, nos propusimos estudiar la posible implicación de esta enzima en el aumento de la captación de glucosa observado por la pérdida de la Cx43 en los astrocitos.

Para ello, los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA. A las 72h después de la transfección se extrajeron las proteínas tal y como se describe en Material y Métodos. Posteriormente, analizó la expresión de Hx-1. Nuestros resultados muestran que la pérdida de Cx43 en los astrocitos promueve un aumento de la expresión de Hx-1 cercano al 30% (figura 11c).

Los inhibidores de las uniones comunicantes como la ET-1 promueven el aumento de Hx-1 y además inducen la expresión de una isoforma característica del fenotipo tumoral como la Hx-2 (Pedersen, 1978) (para revisión ver: (Smith, 2000, Pedersen et al., 2002, Sánchez-Alvarez et al., 2004, Herrero-Gonzalez et al., 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar si pérdida de Cx43 en astrocitos induce la expresión de la hexoquinasa tipo 2 (Hx-2) .

Para ello, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, se analizó la expresión de Hx-2 por Western Blot. Nuestros resultados muestran que la pérdida de Cx43 duplica la expresión de Hx-2 en astrocitos (figura 11d).

4.3 Estudio de la participación de la conexina43 en el efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes sobre la captación de glucosa.

Estudios previos del laboratorio demostraron que los inhibidores de las uniones comunicantes promueven un aumento de la velocidad de captación de glucosa en astrocitos caracterizado por un incremento de la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 (Sánchez-Alvarez et al., 2004). Sin embargo, por el momento se desconocía si estos efectos eran debidos a la inhibición de las uniones comunicantes o a otros efectos provocados por estos

inhibidores en la célula. Por ello, quisimos conocer el efecto de los inhibidores de las uniones comunicantes en astrocitos sin comunicación a través de las uniones comunicantes.

Para 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 1.2.4). La ET-1 tiene especial relevancia ya que su secreción aumenta en diferentes patologías, tales como en los tumores astrocíticos (Stiles et al., 1997) y lesiones cerebrales como la producida por el ácido kaínico (Fig. 2). Por tanto, para conocer la participación de la Cx43 en el aumento de velocidad de captación de glucosa promovido por los inhibidores de las uniones comunicantes, decidimos estudiar el efecto de la ET-1 y la CBX en los astrocitos con la Cx43 silenciada.

4.3.1. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre la expresión de la conexina 43 y la comunicación intercelular en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.

Para este estudio, 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. 12), decidimos iniciar los tratamientos en este momento. Así, 48 h después de la transfección con los 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.

El Western blot de la Cx43 (Fig. 12a) muestra que, en los astrocitos control y los transfectados con NT-siRNA, la ET-1 y la CBX redujeron la expresión de la Cx43 en un 75%. El silenciamiento de la Cx43 redujo los niveles de la Cx43 en más de un 90%, y por tanto la ET-1 y CBX no pudieron reducir más la expresión de la Cx43, en estas circunstancias.

En la figura 12b se observa que en los astrocitos transfectados con 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. Indicando que la permeabilidad de las uniones comunicantes se había inhibido. Por otro lado se observa que 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, indicando la ausencia de una comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes en estas circunstancias.

4.3.2. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre la captación de glucosa en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.

Para estudiar el efecto de la CBX y ET-1 sobre la velocidad de captación de glucosa, en astrocitos que tuvieran la Cx43 silenciada, los astrocitos se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA, tal y como se describe en Material y Métodos. A las 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. A continuación, las células se incubaron con DMEM que contenía 2-desoxi-D[1- 14 C]glucosa (0,15 μ Ci; 750 dpm/pmol), durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la determinación de la captación de glucosa se realizó tal y como se describe en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos (figura 13) indican que tanto la ET-1 como la CBX, promueve un aumento en la velocidad de captación de glucosa de aproximadamente un 38% y 40% respectivamente, en los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Sin embargo ni la ET-1, ni la CBX fueron capaces de aumentar la captación de glucosa en los astrocitos con la Cx43 silenciada cuando se compara con su control.

4.3.3. Efecto de la endotelina-1 y la carbenoxolona sobre las proteínas implicadas en la captación de glucosa en los astrocitos con la conexina 43 silenciada.

Tanto los inhibidores de las uniones comunicantes, como el silenciamiento de la Cx43 aumenta la captación de glucosa debido al incremento en la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2. Por tanto, decidimos investigar si el aumento de la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 promovido por la ET-1 y la CBX estaban mediados por la Cx43.

Los astrocitos se transfectaron con Cx43-siRNA o con NT-siRNA, a las 48 h después de la transfección 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. Posteriormente se extrajeron las proteínas para analizarlas por Western Blot.

Nuestros resultados indican que en los astrocitos transfectados con NT-siRNA y el tratamiento con ET-1 y CBX aumento la expresión de GLUT-1 (Fig. 14a) un 50% y un 70% respectivamente, la expresión de GLUT-3 (Fig. 14b) un 50% y un 45% respectivamente, la expresión de Hx-1 (Fig. 14c) un 20% y un 30% respectivamente, y la expresión de Hx-2 (Fig. 14d) en un 85% y un 90% respectivamente.

Sin embargo, en los astrocitos con la Cx43 silenciada, ni la ET-1 y ni la CBX fueron capaces de incrementar los niveles de expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2, comparado con su control (Fig. 14).

4.4 Estudio de la participación de HIF-1 α en el efecto de la conexina 43 y la ET-1 sobre la captación de glucosa.

Aunque los trabajos previos de nuestro laboratorio muestran, que la Cx43 y la ET-1 modifican la captación de glucosa en astrocitos, se desconoce el mecanismo molecular implicado. Dado que HIF-1 α es un factor de transcripción responsable de regular la expresión de genes implicados en la captación de glucosa (Ver introducción), quisimos averiguar si participaba en este proceso. Este factor de transcripción se activa en condiciones de hipoxia para adaptar a la célula a este nuevo estado, pero también puede ser activado en condiciones de normoxia en respuesta a diferentes factores, por ejemplo distintos oncogenes (Blancher et al.).

4.4.1 Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la expresión de HIF-1 α

En primer lugar quisimos conocer si el silenciamiento de la Cx43 modificaba la expresión de HIF-1 α . Para ello, los astrocitos se transfectaron con un siRNA específico para el silenciamiento de la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 15 muestra que, la expresión de la Cx43 disminuyó un 30% al cabo de 8h de la transfección con Cx43-siRNA y entre el 50-60% a las 24h y 48h. Los astrocitos transfectados con NT-siRNA mantuvieron un nivel constante de expresión de la Cx43 a lo largo del tiempo ensayado.

En estas mismas circunstancias se analizó el nivel de expresión de HIF-1 α por Western Blot. Los resultados muestran que a partir de las 8h de la transfección con Cx43-siRNA, el nivel de expresión de HIF-1 α aumentó aproximadamente un 65%, y esta expresión se mantuvo durante al menos 48h después de la transfección con Cx43-siRNA. (figura 16). Mientras que los astrocitos transfectados con NT-siRNA no modificaron los niveles de expresión de HIF-1 α a lo largo del tiempo.

4.4.2 Efecto de la ET-1 sobre la expresión de HIF-1 α en astrocitos.

Con objeto de averiguar si la ET-1 modificaba la expresión de HIF-1 α , los astrocitos se trataron con 0,1 μ M ET-1 y se analizó la expresión de HIF-1 α a distintos tiempos.

Los resultados obtenidos (Fig. 16) muestran que el tratamiento con ET-1 promueve un aumento de la expresión de HIF-1 α de aproximadamente un 90% a las 2h de tratamiento incrementando ligeramente hasta las 48h. Este aumento se ve acompañado de una

disminución en la expresión de Cx43 que se reduce aproximadamente un 60% a las 2h valor que se mantuvo hasta las 48h.

4.4.3 Efecto del silenciamiento de HIF-1 α sobre la captación de glucosa.

Con objeto de averiguar si HIF-1 α estaba implicado en el aumento de la captación de glucosa y la expresión de las proteínas implicadas en el proceso, silenciamos la expresión de HIF-1 α , en astrocitos y se analizó la velocidad de captación de glucosa y la expresión de las proteínas implicadas en este proceso.

Para silenciar HIF-1 α , los astrocitos se transfectaron con 3 secuencias de siRNAs específicas para el silenciamiento de HIF-1 α (HIF-1 α -siRNA 1, 2 y 3) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA). La figura 17 muestra que, pasadas 48 horas desde la transfección con las 3 secuencias de HIF-1 α -siRNA, el nivel de expresión de HIF-1 α disminuyó. El efecto fue mayor con las secuencias 2 y 3, que obtuvieron una disminución cercana al 50% si se compara con el nivel de HIF-1 α mostrado por los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El silenciamiento se mantuvo hasta las 72h, aunque se observa un ligero incremento de la expresión de HIF-1 α .

Para estudiar las modificaciones que el silenciamiento de HIF-1 α puede ejercer sobre la velocidad de captación de glucosa, los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con las secuencias 2 y 3 de HIF-1 α -siRNA o con un siRNA sin diana (NT-siRNA). A las 72h después de la transfección, las células se incubaron con DMEM que contenía 2-desoxi-D[1-¹⁴C]glucosa (0,15 μ Ci; 750 dpm/pmol), durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la determinación de la captación de glucosa se realizó tal y como se describe en Material y Métodos.

Los resultados (Fig. 18) muestran que el silenciamiento de HIF-1 α por las secuencias 2 y 3 de HIF-1 α -siRNA disminuyó un 20% la velocidad de captación de glucosa en los astrocitos.

A continuación, se estudió la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa, GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 por Western Blot. Para este estudio se empleó la secuencia 3 de HIF-1 α -siRNA. Nuestros resultados muestran una reducción de un 50% en la expresión de HIF-1 α (Fig. 19a). Dicha reducción se acompaña de una disminución significativa de la expresión de GLUT-1 (aproximadamente un 50%; figura 19b), GLUT-3 (aproximadamente un 20%; figura 19c), Hx-1 (aproximadamente un 22%; figura 19d) y Hx-2 (aproximadamente un 60%; figura 19e).

4.4.4 Efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en astrocitos con HIF-1 α silenciado.

Dado que la ET-1 aumenta la expresión de HIF-1 α , la captación de glucosa y la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa y que el silenciamiento de HIF-1 α disminuye la captación de glucosa y la expresión de las proteínas implicadas en este proceso, nos propusimos investigar la participación de HIF-1 α en el efecto de ET-1.

Para ello, los astrocitos se transfectaron con la secuencia 3 de HIF-1 α -siRNA o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) y se trataron con 0,1 μ M de ET-1 durante 24h (Fig. 20). Nuestros resultados muestran un aumento de un 80% en la expresión de HIF-1 α tras el tratamiento con ET-1 en los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Sin embargo en los astrocitos transfectados con HIF-1 α -siRNA la expresión de HIF-1 α se redujo en un 50% y en un 75% en los astrocitos tratados con ET-1 respecto a los astrocitos transfectados con NT-siRNA.

Para realizar los experimentos de captación de glucosa, 48h después de la transfección con la secuencia 3 de HIF-1 α -siRNA o con NT-siRNA, las células se trataron con 0,1 μ M de ET-1 y a las 72h de la transfección se incubaron con DMEM que contenía 2-desoxi-D[1-¹⁴C]glucosa (0,15 μ Ci; 750 dpm/pmol) y 0,1 μ M de ET-1 durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la determinación de la captación de glucosa se realizó tal y como se describe en Material y Métodos.

En los astrocitos transfectados con NT-siRNA la ET-1 promovió un aumento de un 40% en la velocidad de captación de glucosa. Sin embargo, en los astrocitos con HIF-1 α silenciado la ET-1 apenas modificó la velocidad de captación de glucosa (Fig. 20). En este sentido, cuando se analizó la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 se observó que la ET-1 promovió un aumento de la expresión de GLUT-1 en un 60%, GLUT-3 en un 100%, Hx-1 en un 20% y Hx-2 en un 80%, en los astrocitos tratados con NT-siRNA. Sin embargo en los astrocitos tratados con HIF-1 α -siRNA este efecto de la ET-1 se vio considerablemente reducido (Fig. 21).

4.5 Estudio de la participación de c-Src en el efecto de la conexina 43 y la ET-1 sobre la captación de glucosa

La proteína kinasa c-Src forma parte de una gran familia de proteínas tirosina kinasas (PTK) no receptoras, asociadas a membrana y una de sus características es su capacidad oncogénica. Para una óptima actividad de este oncogen se requiere la autofosforilación de la tirosina 416 (Y416). En trabajos recientes en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la participación de c-Src en el efecto de la Cx43 sobre la regulación de la proliferación celular.

(Herrero-González et al, Oncogen, en revision). Dada la relación entre la Cx43 y la proliferación celular propuesta en nuestro laboratorio (ver apartado 1.2.3.6 introducción). En este trabajo quisimos conocer si c-Src también participa en el efecto de la Cx43 sobre la captación de glucosa.

4.5.1 Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la actividad de c-Src

Dado que la Cx43 tiene la capacidad de interactuar con c-Src en células de glioma (Herrero-González et al, Oncogen, en revision), quisimos investigar si el silenciamiento de la Cx43 en los astrocitos modificaba la actividad de c-Src.

Para ello, los astrocitos se transfectaron con un siRNA específico para la Cx43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. La figura 22 muestra que, pasadas 48 horas de la transfección con Cx43-siRNA, el nivel de actividad de c-Src (Y416 c-Src) aumentó un 20%, comparado con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Por otro lado, la expresión total de c-Src no se modificó, tras la transfección con Cx43-siRNA comparada con la transfección con NT-siRNA.

4.5.2 Efecto de la ET-1 sobre la actividad de c-Src.

Una vez conocido que el silenciamiento de la Cx43 aumenta la actividad de c-Src, quisimos estudiar el efecto de la ET-1 sobre la actividad de c-Src.

Para ello los astrocitos se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 durante 4', 6', 10', 2h, 4h, 8h, 24h, 48h y 72h. A estos tiempos se lisaron las células para la extracción de proteínas y su análisis por Western Blot.

Nuestros resultados muestran (Fig. 23), que la ET-1 promueve un aumento de la actividad de c-Src (Y416 c-Src), que comienza a los 6 minutos y se mantiene hasta las 2 horas para luego disminuir progresivamente hasta las 72h. Sin embargo la expresión total de c-Src (Total c-Src) se mantiene estable durante todo el tratamiento con ET-1.

4.5.3 Efecto de la inhibición de c-Src sobre el aumento de HIF-1 α promovido por la ET-1.

Dado que la ET-1 activa c-Src quisimos averiguar si este oncogen participa en el efecto de la ET-1 sobre la expresión de HIF-1 α . Para ello, analizamos el efecto de la ET-1 inhibiendo la actividad de c-Src.

Para inhibir c-Src, utilizamos un clásico inhibidor de c-Src, denominado PP2 (4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazol[3,4-d]pirimidina) y como control su análogo estructural no inhibidor, denominado PP3 (4-Amino-7-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina) [Rangnath M, 2005, 2049].

Así los astrocitos, se preincubaron durante una hora en presencia de PP3 ó PP2 , para posteriormente incubarse con estos mismos agentes y en presencia o ausencia de de 0,1 μ M de ET-1 durante 4,6 y 10 min. A estos tiempos se extrajeron las proteínas para realizar posteriormente un análisis por Western Blot.

Los resultados (Fig. 24) indican que la ET-1 en los astrocitos preincubados en presencia de PP3 provocó un aumento significativo, de aproximadamente un 40% en la actividad de c-Src (Y416 c-Src) desde los 4 hasta los 10 minutos. Sin embargo en los astrocitos tratados con el inhibidor de c-Src, PP2, la ET-1 no aumentó la actividad de c-Src (Y416 c-Src) en los tiempos ensayados. Los resultados muestran como los tratamientos con PP3 y PP2 no afectaron a los valores de expresión total de c-Src, que se mantuvo en un nivel constante durante todo el tiempo analizado.

Dado que PP2 inhibe el aumento de la actividad de c-Src provocado por la ET-1, quisimos averiguar si en estas circunstancias, la ET-1 era capaz de modificar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α . Para ello, siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, se analizó la expresión de HIF-1 α por Western Blot.

Nuestros resultados, muestran que tal y como ocurría en la situación control la ET-1 provocó un aumento en la expresión de HIF-1 α al cabo de 24h. Este aumento fue de un 80% en los astrocitos tratados con PP3 (Fig. 25). Sin embargo, cuando se inhibe la actividad de c-Src con PP2 la ET-1 no aumentó la expresión de HIF-1 α , sino que la redujo en un 50% (Fig. 25)

4.5.4 Efecto de la inhibición de c-Src sobre el aumento de la captación de glucosa promovido por la ET-1

Dado que la inhibición de c-Src por PP2 impidió el efecto de la ET-1 sobre la expresión del factor de transcripción HIF-1 α , analizamos el efecto de PP2 sobre el aumento en la captación de glucosa promovido por la ET-1.

Para ello, los astrocitos se preincubaron con PP3 y PP2 durante 1h. Después las células se incubaron con los mismos agentes y con 0,1 μ M de ET-1. A las 24h del tratamiento se incubaron con DMEM que contenía 2-desoxi-D[1-¹⁴C]glucosa (0,15 μ Ci; 750 dpm/pmol) y 0,1

μM de ET-1, durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la determinación de la captación de glucosa se realizó tal y como se describe en Material y Métodos.

Los resultados muestran que el tratamiento con PP3 no modificó la velocidad de captación de glucosa. Así, la ET-1 provocó un aumento de un 35% en la velocidad de captación de glucosa (Fig. 26) tanto en los astrocitos sin tratamiento como en los tratados con PP3. Sin embargo, en los astrocitos tratados con el inhibidor de c-Src PP2, la ET-1 no modificó significativamente la velocidad de captación de glucosa.

Anexo

Resultados

Anexo

Resultados

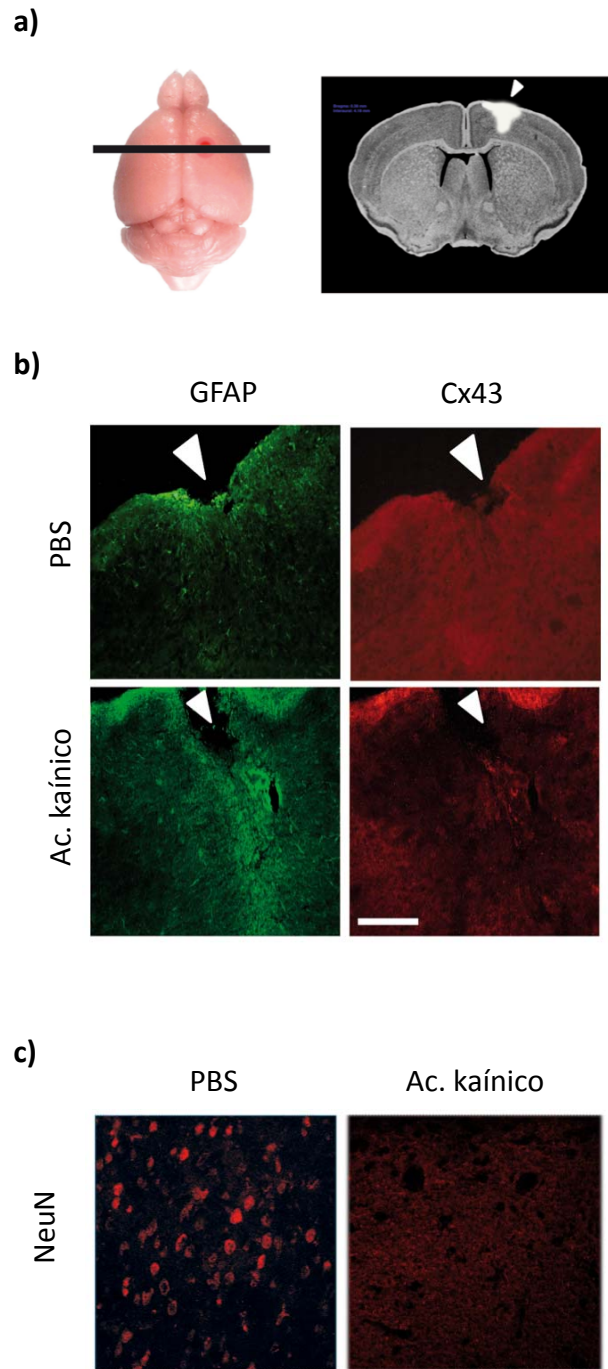


Figura 1. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre la expresión de Cx43 en astrocitos “in vivo”.

a) A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranalmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis 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. **b)** Inmunohistoquímica de la Cx43 y de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) tras la inyección con PBS o tras la inyección con ácido kaínico. **c)** Inmunohistoquímica de NeuN tras la inyección con PBS o tras la inyección con ácido kaínico. Barra= $250\ \mu\text{m}$. La zona de la lesión se marca con una cabeza de flecha blanca.

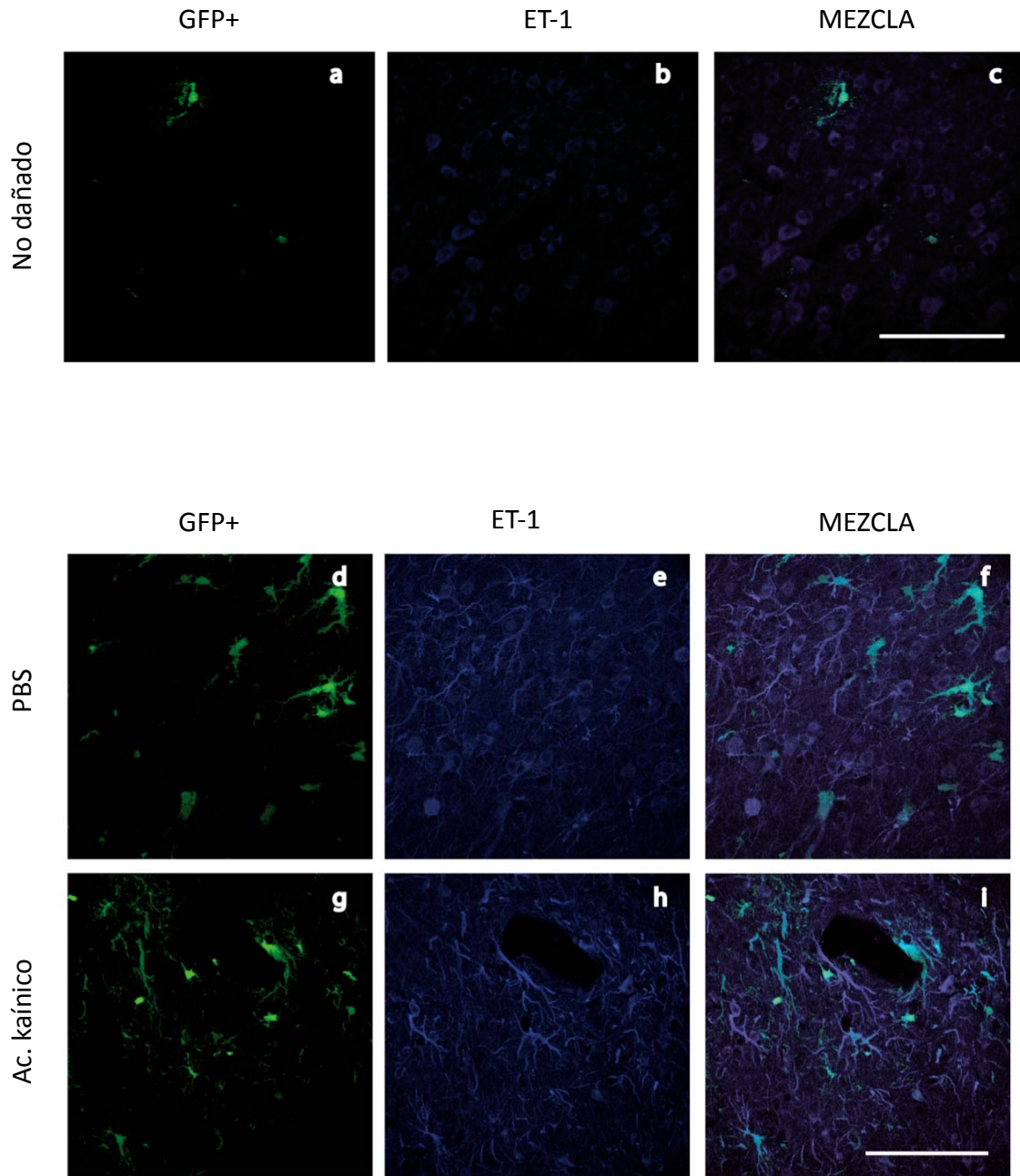


Figura 2. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre la presencia de ET-1, en el hemisferio lesionado “in vivo”.

A ratones de 6 semanas de vida postnatal se les inyectó intracranalmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Se hicieron cortes coronales de 40 μ m con el microtomo. **a)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) en la zona contralateral de la lesión, Inmunohistoquímica de ET-1 en la zona contralateral de la lesión, Colocalización de GFP+ y Et- 1 en la zona contralateral de la lesión. **b)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) y de ET-1 tras la inyección con PBS y tras la inyección de ácido kaínico. La zona de la gliosis, está caracterizada por la sobreexpresión de la GFP+. Barra= 250 μ m.

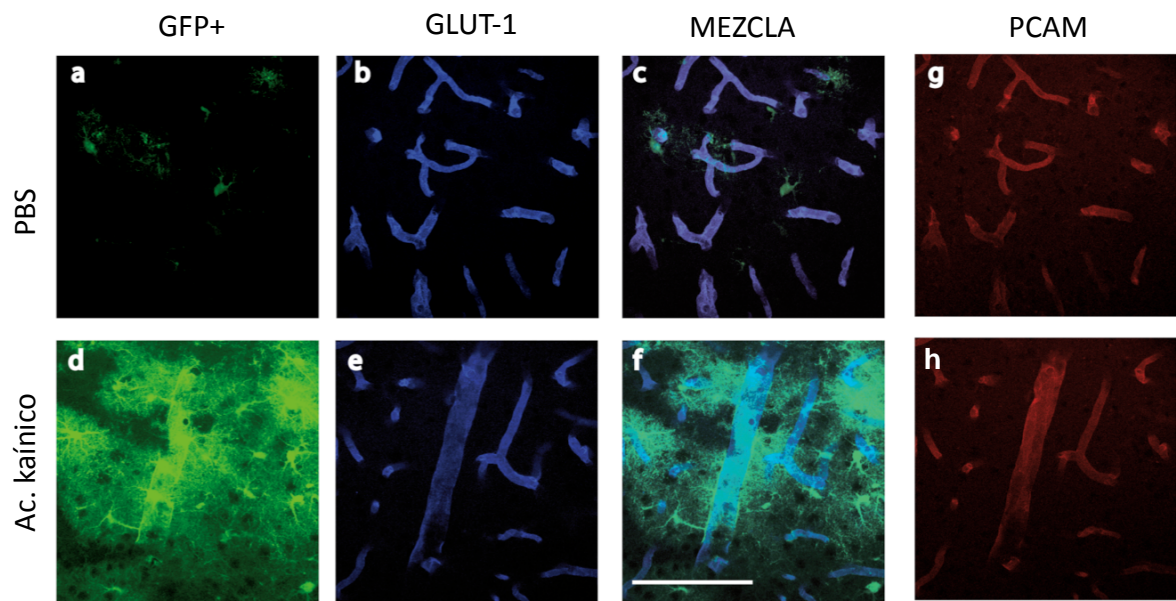


Figura 3. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre la expresión de GLUT-1 .

A ratones se les inyectó intracranealmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección y se hicieron cortes coronales de 40 μm con el microtomo. **a)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con PBS. **b)** Inmunohistoquímica de GLUT-1 tras la inyección con PBS. **c)** Colocalización de GFP+ y GLUT-1 tras la inyección de PBS. **d)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras inyección de ácido kaínico. La zona de la gliosis, está caracterizada por la sobreexpresión de la GFP+. **e)** Inmunohistoquímica de GLUT-1 tras la inyección con ácido kaínico. **f)** Colocalización de GFP+ y GLUT-1 tras la inyección con ácido kaínico. **g,h)** Inmunohistoquímica de PCAM, marcador de los vasos sanguíneos. Barra= 250 μm .

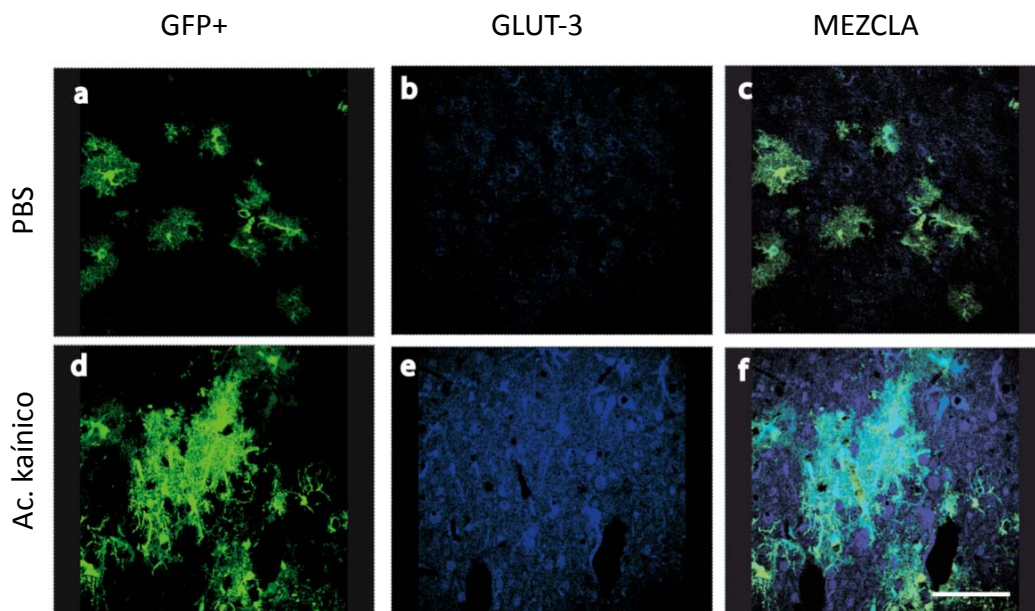


Figura 4. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre la expresión de GLUT-3 . A ratones se les inyectó intracranalmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección y se hicieron cortes coronales de 40 μ m con el microtomo. **a)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con PBS. **b)** Inmunohistoquímica de GLUT-3 tras la inyección con PBS. **c)** Colocalización de GFP+ y GLUT-3 tras la inyección de PBS. **d)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras inyección de ácido kaínico. La zona de la gliosis, está caracterizada por la sobreexpresión de la GFP+. **e)** Inmunohistoquímica de GLUT-3 tras la inyección con ácido kaínico. **f)** Colocalización de GFP+ y GLUT-3 tras la inyección con ácido kaínico. Barra= 250 μ m.

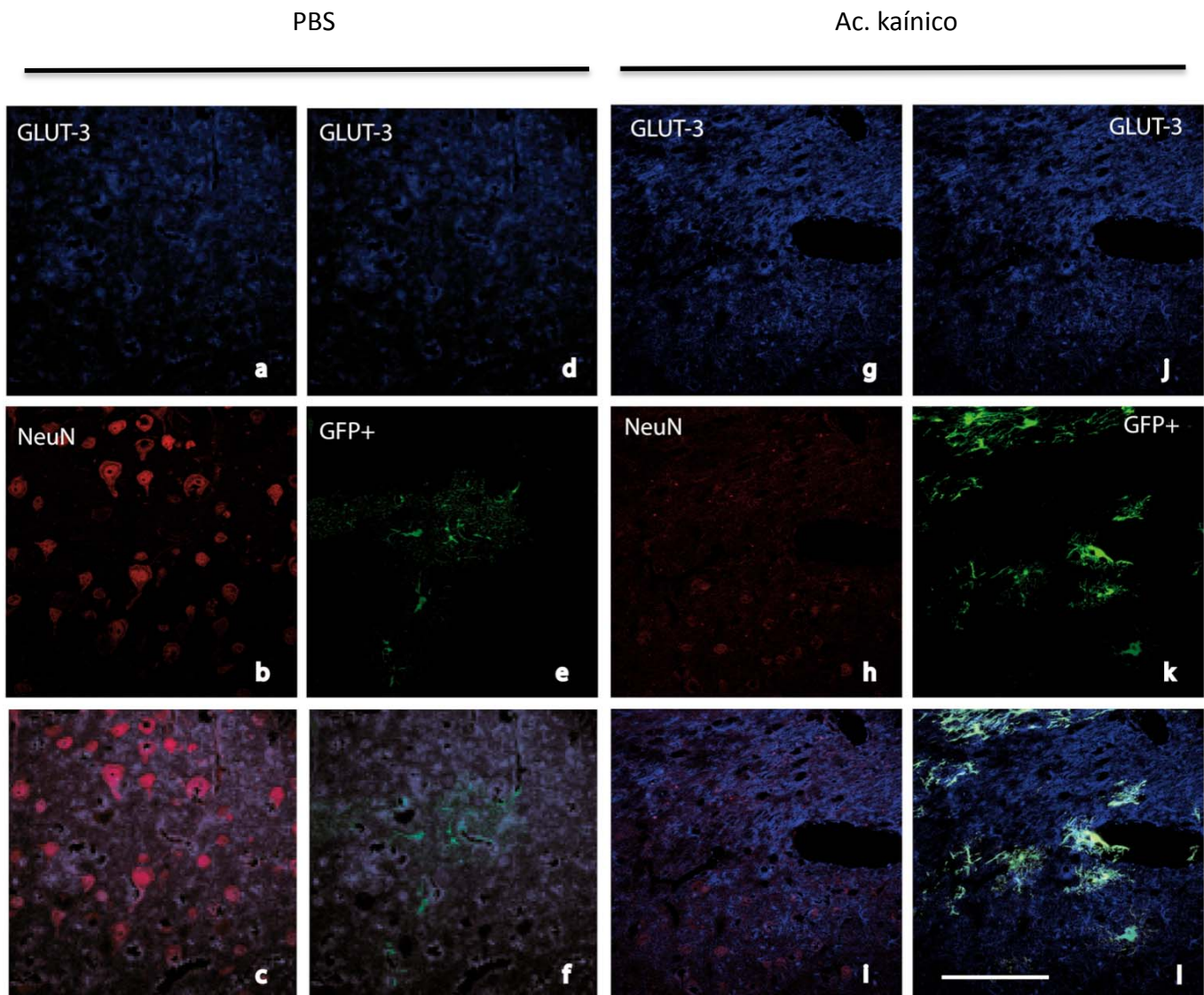


Figura 5. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre localización de GLUT-3.

A ratones se les inyectó intracranealmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección y se hicieron cortes coronales de 40 μm con el microtomo. **a)** Inmunohistoquímica de GLUT-3 tras la inyección con PBS. **b)** Inmunohistoquímica de la proteína NeuN, marcadora de neuronas tras la inyección con PBS. **c)** Colocalización de GLUT-3 y NeuN tras la inyección de PBS. **d)** Inmunohistoquímica de la GLUT-3 tras la inyección con PBS **e)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con PBS. **f)** Colocalización de GLUT-3 y GFP+ tras la inyección de ácido kaínico. **g)** Inmunohistoquímica de GLUT-3 tras la inyección con PBS. **h)** Inmunohistoquímica de la proteína NeuN, marcadora de neuronas tras la inyección con ácido kaínico. **i)** Colocalización de GLUT-3 y NeuN tras la inyección de ácido kaínico. **j)** Inmunohistoquímica de la GLUT-3 tras la inyección con ácido kaínico **k)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con ácido kaínico. **l)** Colocalización de GLUT-3 y GFP+ tras la inyección de ácido kaínico. Barra= 250 μm .

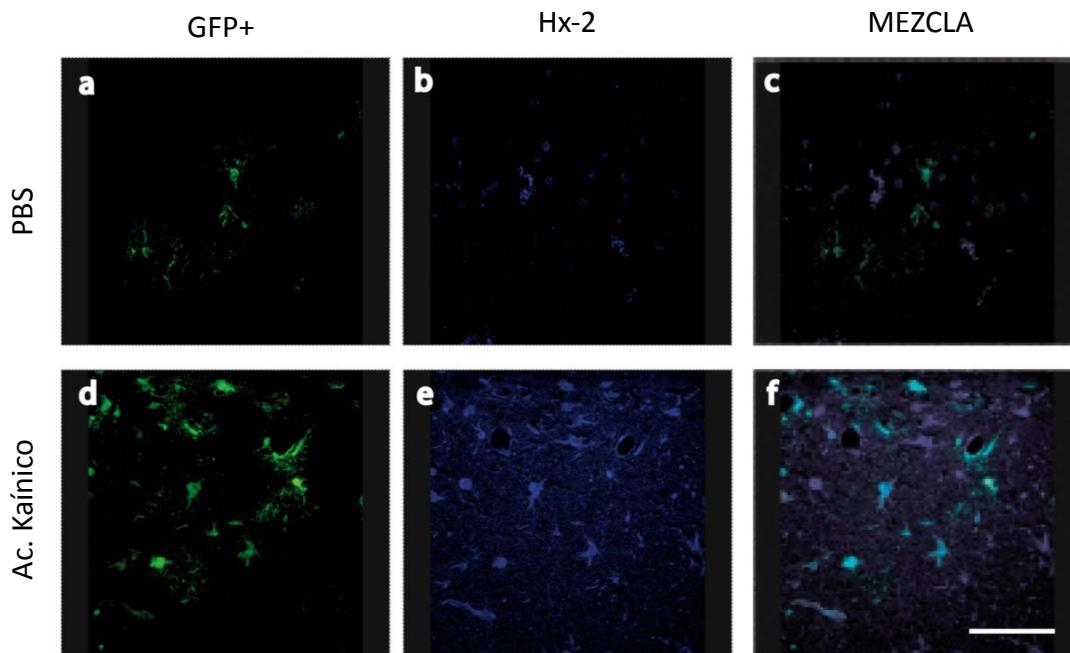


Figura 6. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico modifica la expresión de Hx-2 . A ratones se les inyectó intracranealmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección y se hicieron cortes coronales de 40 μ m con el microtomo. **a)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con PBS. **b)** Inmunohistoquímica de Hx-2 tras la inyección con PBS. **c)** Colocalización de GFP+ y Hx-2 tras la inyección de PBS. **d)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras inyección de ácido kaínico. La zona de la gliosis, está caracterizada por la sobreexpresión de la GFP+. **e)** Inmunohistoquímica de Hx-2 tras la inyección con ácido kaínico. **f)** Colocalización de GFP+ y Hx-2 tras la inyección con ácido kaínico. Barra= 250 μ m.

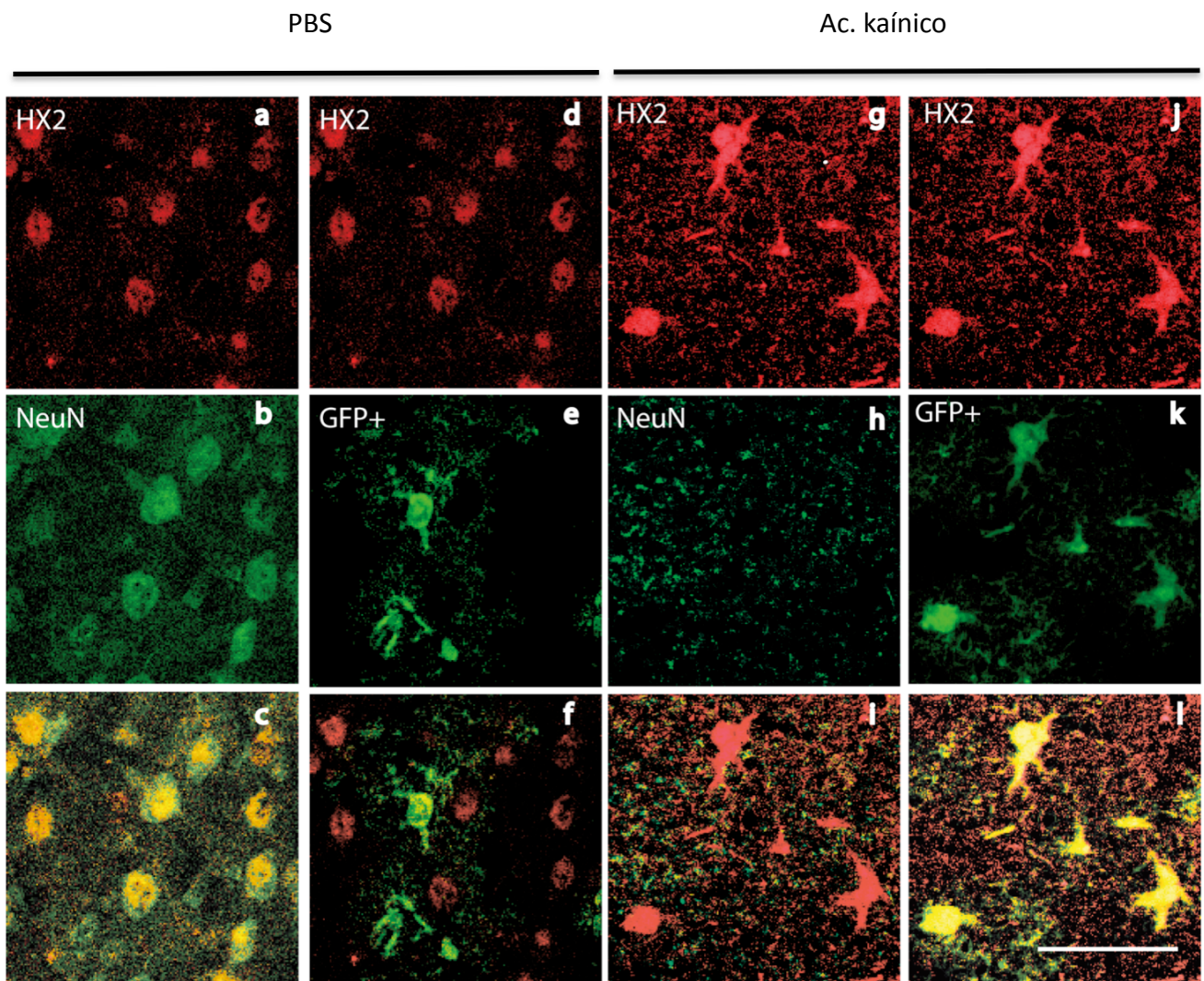


Figura 7. Efecto de la gliosis producida por el ácido kaínico sobre la localización de Hx-2.

A ratones se les inyectó intracranealmente ácido kaínico (1mg/mL) o PBS mediante estereotaxis, tal y como se describe en Material y Métodos. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inyección y se hicieron cortes coronales de 40 μ m con el microtomo. **a)** Inmunohistoquímica de Hx-2 tras la inyección con PBS. **b)** Inmunohistoquímica de la proteína NeuN, marcadora de neuronas tras la inyección con PBS. **c)** Colocalización de Hx-2 y NeuN tras la inyección de PBS. **d)** Inmunohistoquímica de la Hx-2 tras la inyección con PBS **e)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con PBS. **f)** Colocalización de Hx-2 y GFP+ tras la inyección de ácido kaínico. **g)** Inmunohistoquímica de Hx-2 tras la inyección con PBS. **h)** Inmunohistoquímica de la proteína NeuN, marcadora de neuronas tras la inyección con ácido kaínico. **i)** Colocalización de Hx-2 y NeuN tras la inyección de ácido kaínico. **j)** Inmunohistoquímica de la Hx-2 tras la inyección con ácido kaínico **k)** Fluorescencia correspondiente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFP+) tras la inyección con ácido kaínico. **l)** Colocalización de Hx-2 y GFP+ tras la inyección de ácido kaínico. Barra= 200 μ m.

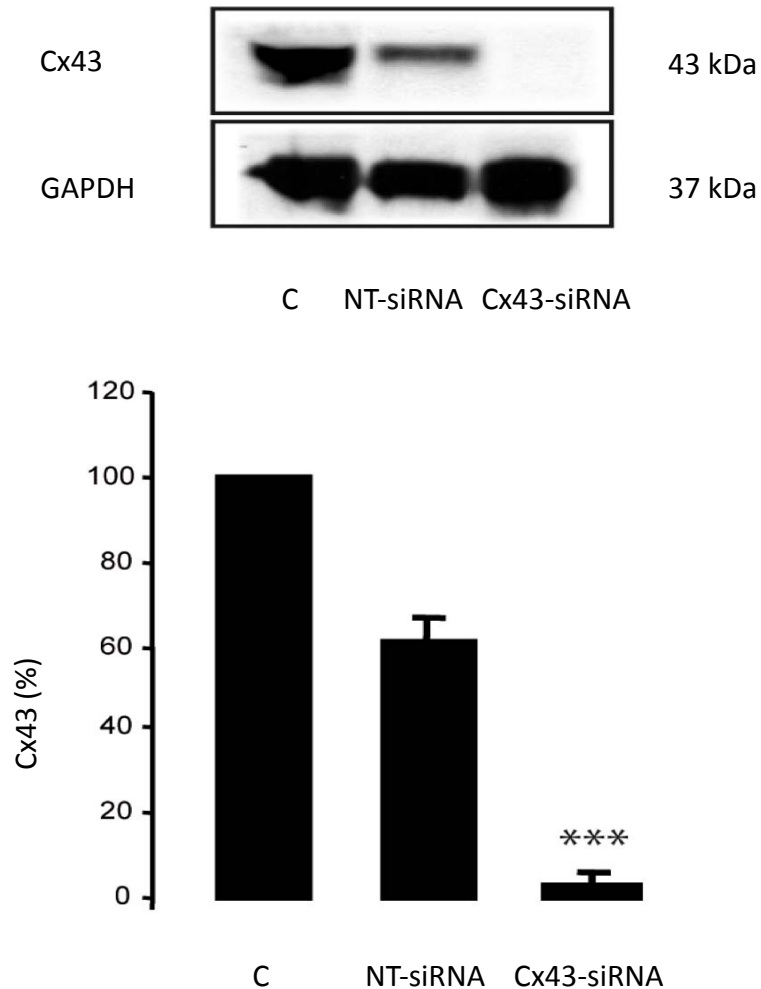


Figura 8. Silenciamiento de la conexina43 (Cx43) en astrocitos en cultivo primario.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas a las 72 h después de la transfección. Western blot y cuantificación de la Cx43. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control 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 Tukey Post-test).

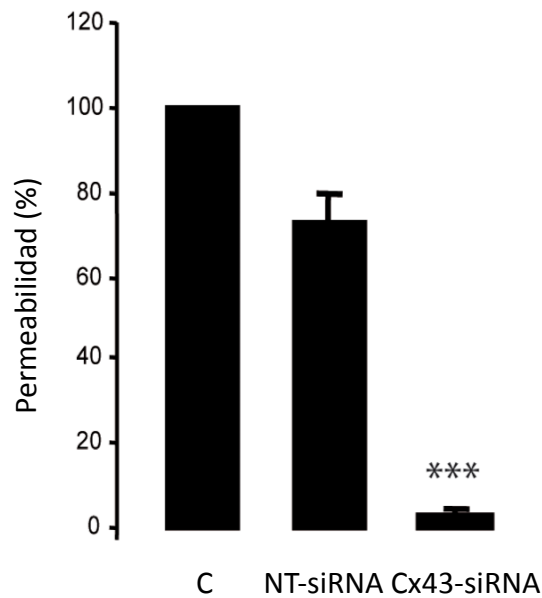
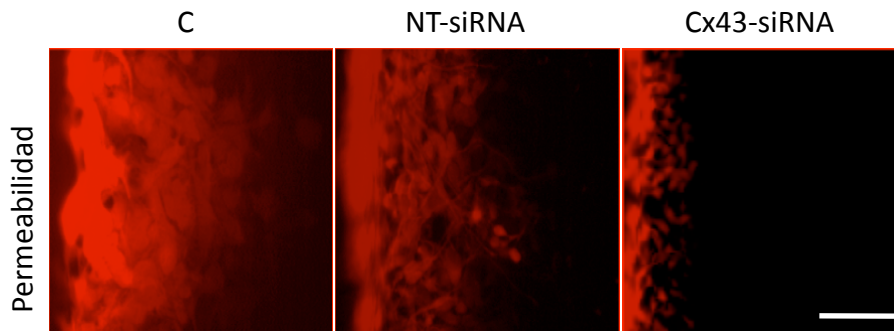


Figura 9. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.

Los astrocitos 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 y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ***p<0,001 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

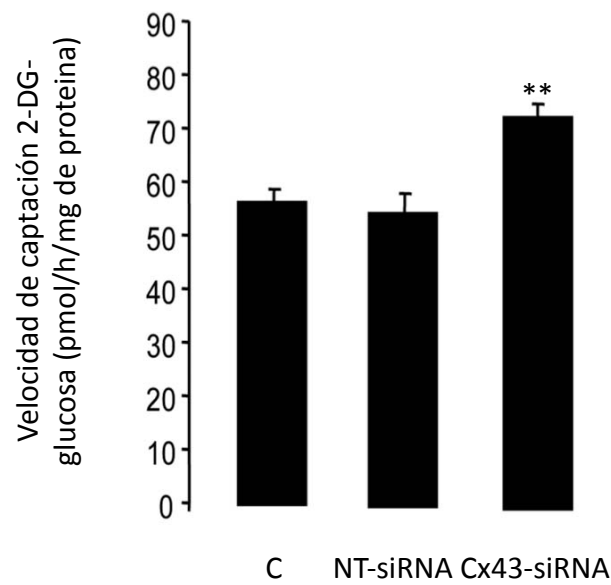
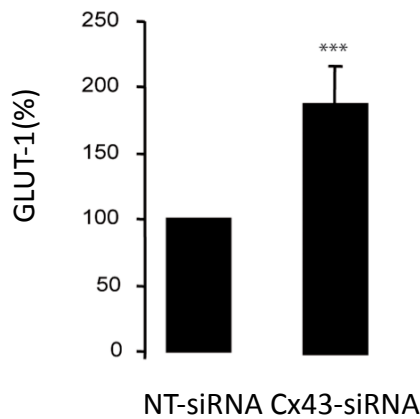
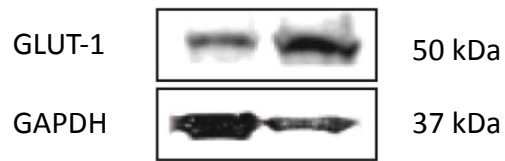


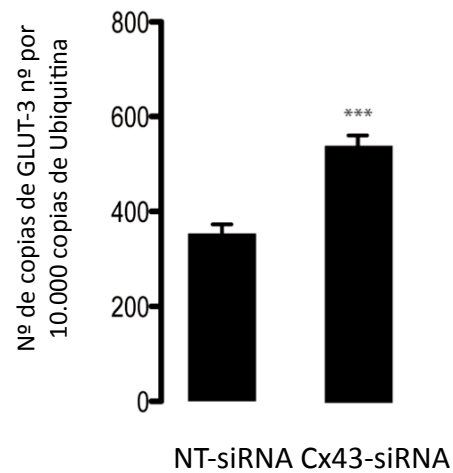
Figura 10. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la captación de glucosa en astrocitos

Los astrocitos de 21 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. a) 72 h después, se determinó la velocidad de captación de glucosa, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol/h/mg de proteína y son medias \pm SEM (n=9). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ** p<0,01 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

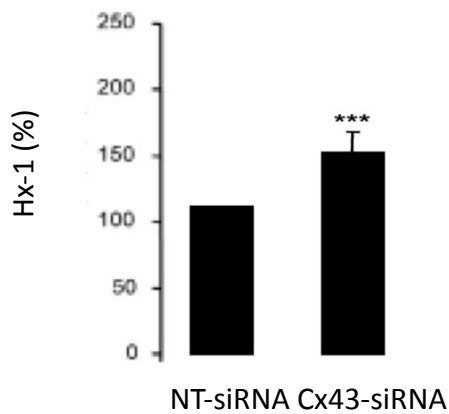
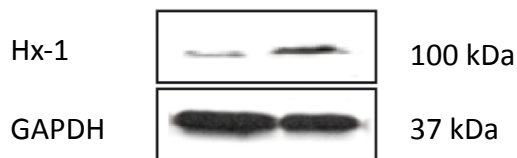
a)



b)



c)



d)

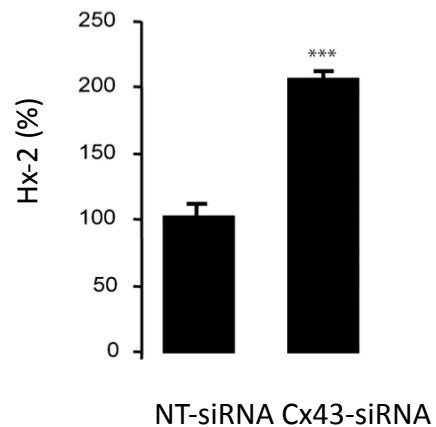


Figura 11. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. Se recogieron las proteínas el RNA a las 72 h después de la transfección tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Western blot y cuantificación de GLUT-1. **b)** qRT-PCR de GLUT-3. **c)** Western blot y cuantificación de Hx-1. **d)** Western blot de Hx-2. Se utilizó GAPDH como control de carga para los Western blot y Ubiquitina como control de carga en la RT-qPCR. 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 la situación control se expresa como ***p<0,001. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

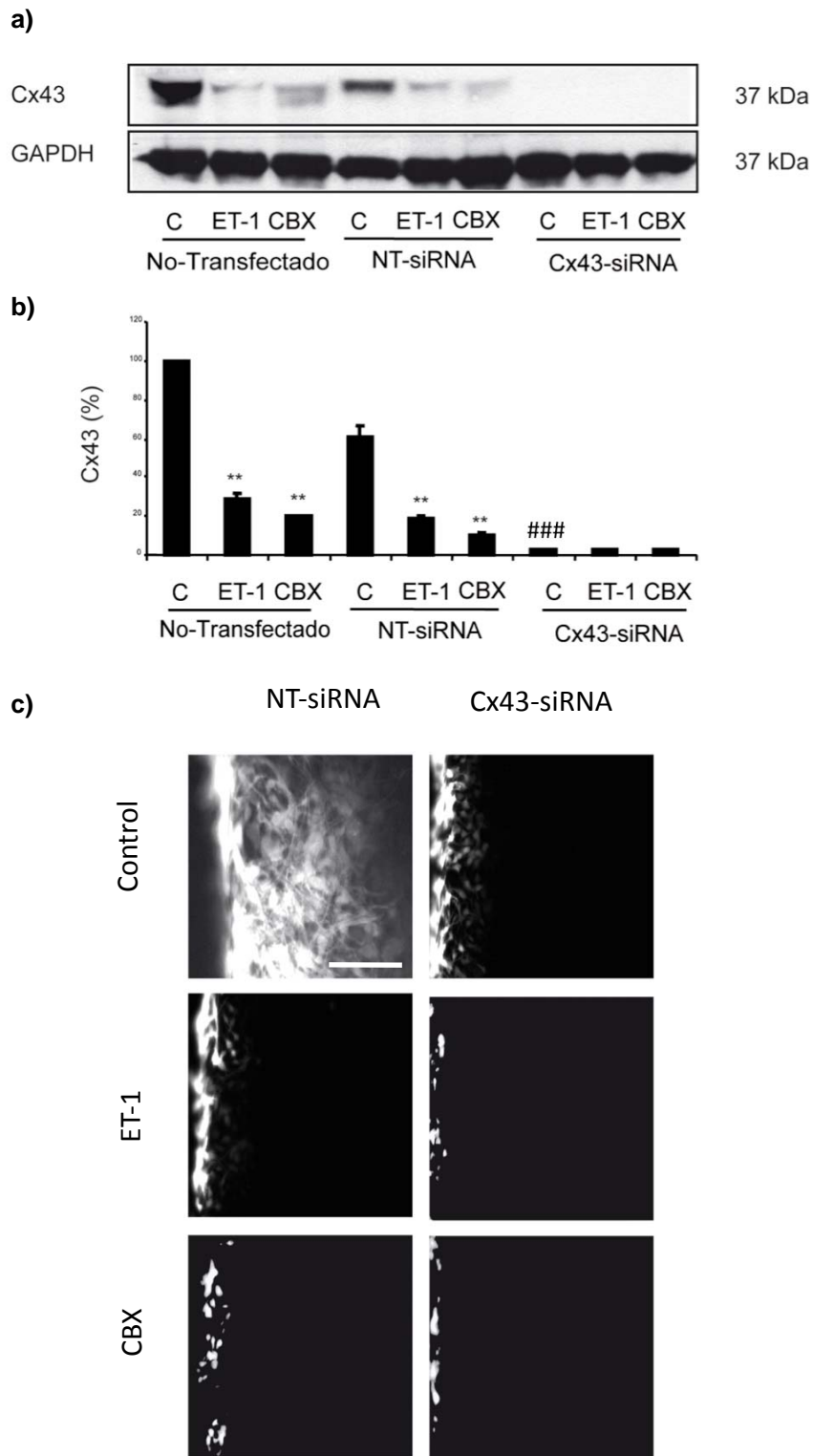


Figura 12. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia (control, C) o en presencia de 0,1 μ M de Endotelina-1 (ET-1) ó 50 μ M de Carbenoxolona (CBX) durante 24 h. **a)** Western blot y cuantificación de la Cx43 y GAPDH. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias \pm SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control de cada grupo se expresa como ***p<0,001; **p<0,01 y respecto a las diferencias entre diferentes grupos se expresa como ###p<0,01; (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test). **b)** La permeabilidad de las uniones comunicantes se determinó mediante la técnica del "scrape loading". Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra = 30 μ m.

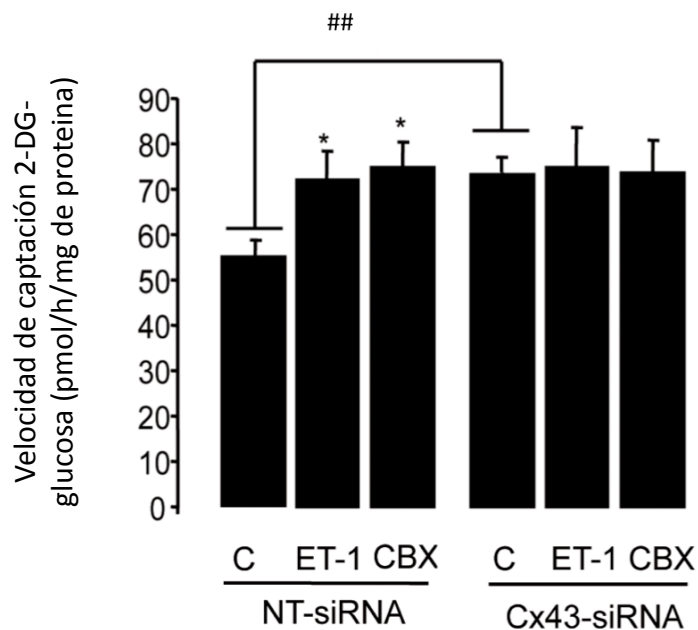


Figura 13. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la captación de glucosa en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección con los siRNAs, los astrocitos se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h. a) A las 72 h después, se determinó la velocidad de captación de glucosa, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol/h/mg de proteína y son medias \pm SEM (n=9). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como * p <0,05 y la significatividad respecto de las diferencias entre los astrocitos transfectados con NT-siRNA y con Cx43-siRNA, se expresan como ## p <0,01. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

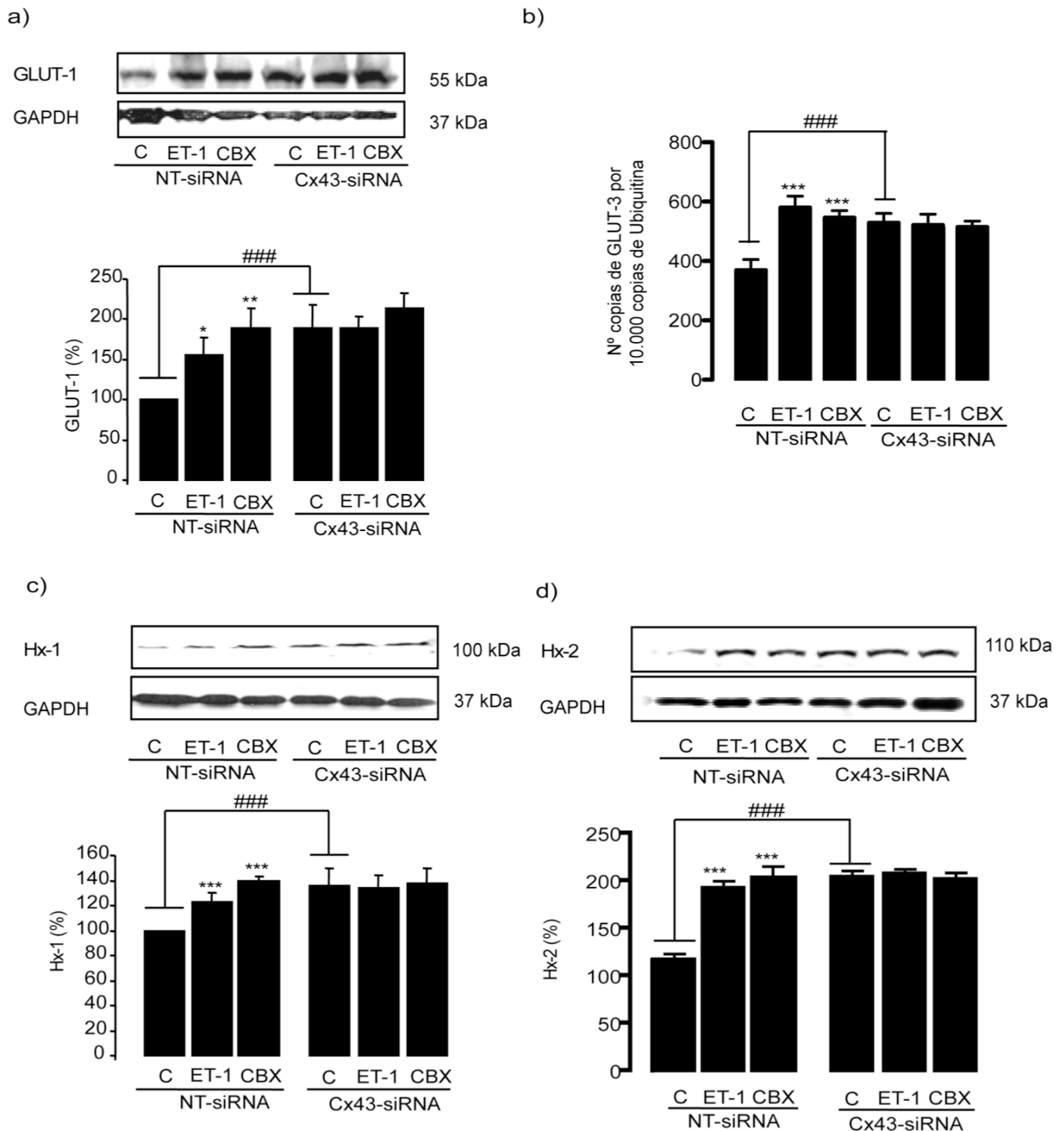


Figura 14. Efecto de la ET-1 y la CBX sobre la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos con la Cx43 silenciada.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA. 48 h después de la transfección, los astrocitos se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 ó 50 μ M de CBX durante 24 h, después se recogieron las proteínas y el RNA a las 72 h después de la transfección tal y como se describe en Material y Métodos. **a)** Western blot de GLUT-1 **b)** Western blot de Hx-1. **c)** qPCR GLUT-3. **d)** Western blot de Hx-2. Se utilizó GAPDH como control de carga para los Western blot y Ubiquitina como control de carga en RT-qPCR. 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. y la significatividad respecto de las diferencias entre los astrocitos transfectados con NT-siRNA y con Cx43-siRNA, se expresan como ###p<0,001. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

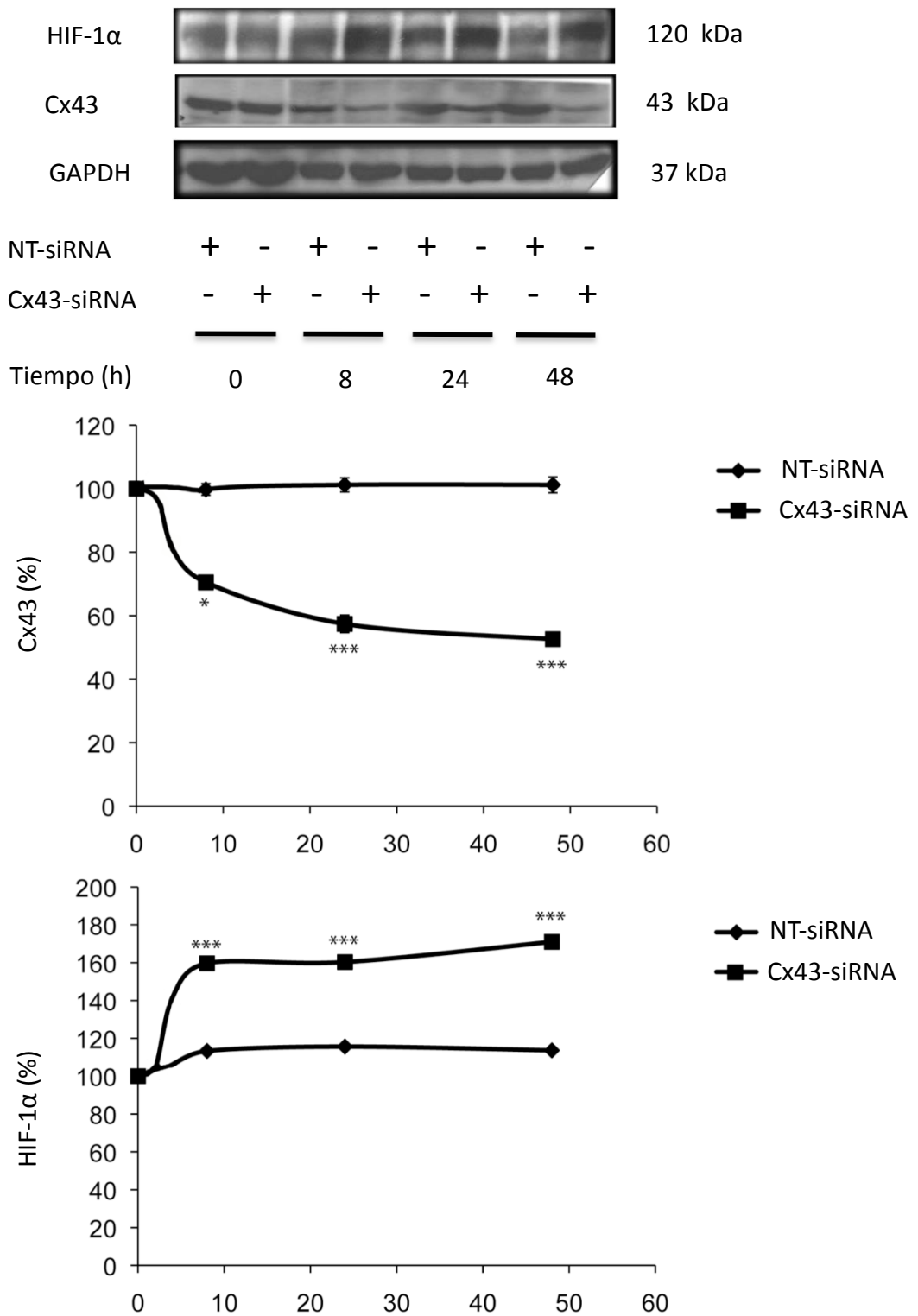


Figura 15. Efecto del silenciamiento de la Cx43 sobre la evolución de la expresión de HIF-1α en astrocitos

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas a las 0, 8, 24 y 48h, después de la transfección. **a)** Western Blot de HIF-1α y Cx43 de las muestras recogidas a distintos tiempos después de la transfección con siRNAs. Se utilizó GAPDH como control de carga. **b)** Cuantificación de HIF-1α, se expresa como porcentaje respecto al tiempo 0 del tratamiento con NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). **c)** Cuantificación de Cx43, se expresa como porcentaje respecto al tiempo 0 del tratamiento con 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<0,05 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

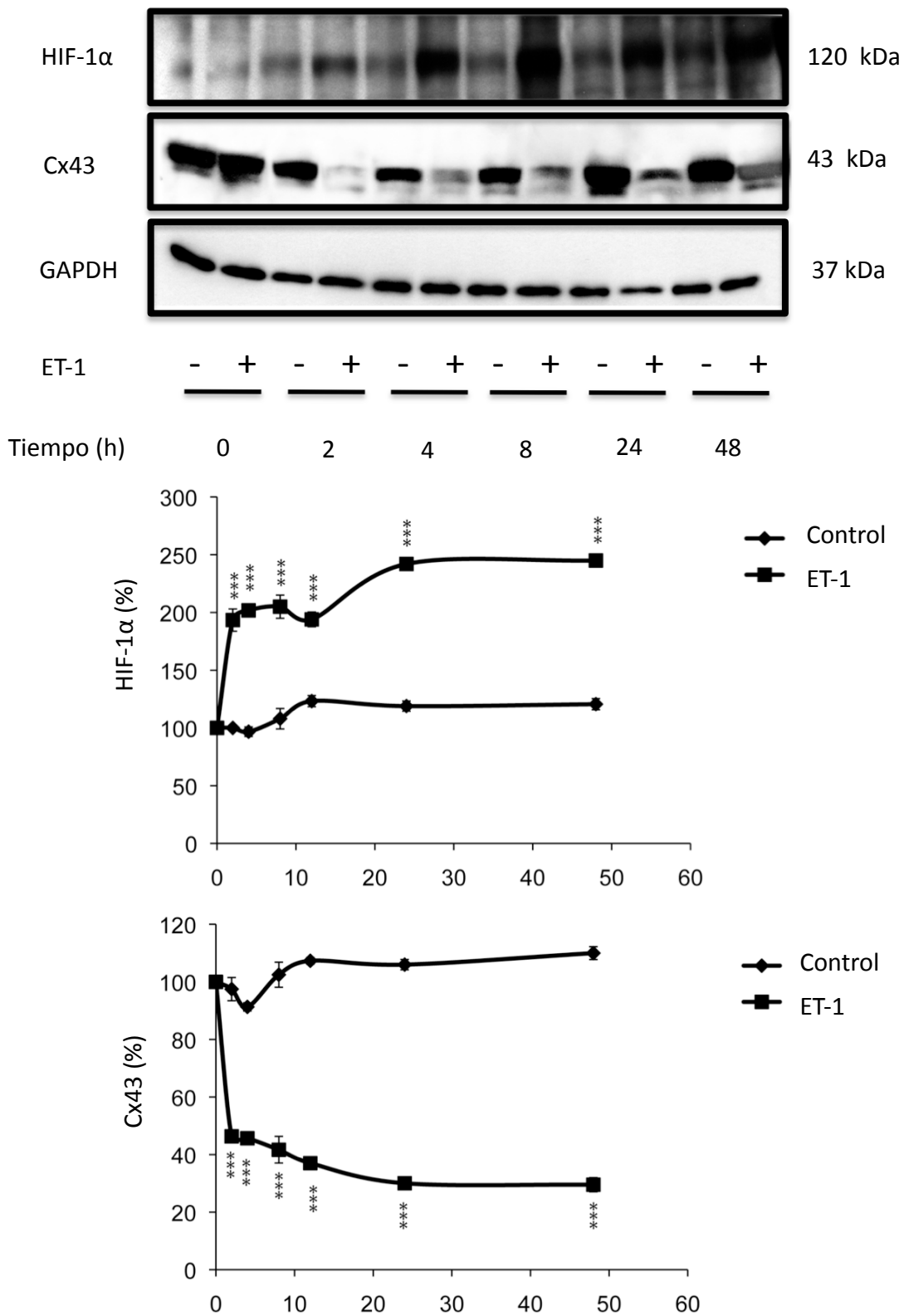


Figura 16. Efecto de la ET-1 sobre la expresión de HIF-1 α en astrocitos

Los astrocitos se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 y se recogieron las proteínas a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48h. a) Western Blot de HIF-1 α y Cx43 de las muestras recogidas a distintos tiempos después del tratamiento. Se utilizó GAPDH como control de carga. b) Cuantificación de HIF-1 α , se expresa como porcentaje respecto al control y son medias \pm SEM (n=4). c) Cuantificación de Cx43, se expresa como porcentaje respecto al control 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 Tukey Post-test).

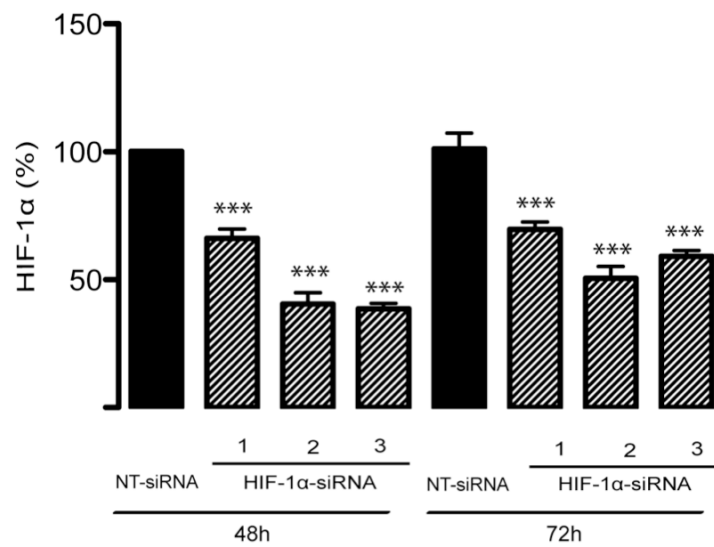
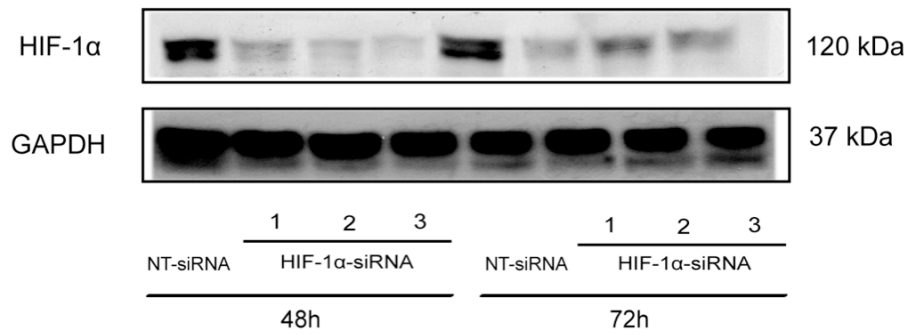


Figura 17. Silenciamiento de HIF-1α en astrocitos en cultivo primario.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con 3 secuencias diferentes de siRNA-HIF-1α. Se recogieron las proteínas a las 48 y 72 h después de la transfección. **a)** Western blot de HIF-1α después de la transfección con siRNAs. Se utilizó GAPDH como control de carga. **b)** Cuantificación de HIF-1α, se expresa como porcentaje respecto al tiempo 0 del tratamiento con 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 Tukey Post-test).

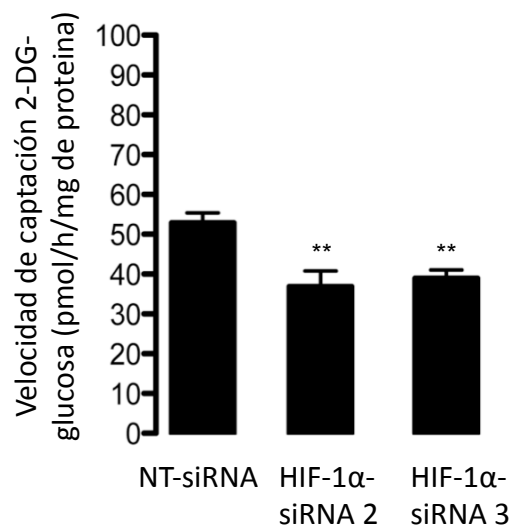


Figura 18. Efecto del silenciamiento de HIF-1 α sobre la captación de glucosa en astrocitos

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA y con la secuencia 3 de siRNA-HIF-1 α . 72 h después, se determinó la velocidad de captación de glucosa, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol/h/mg de proteína y son medias \pm SEM (n=9). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como ** p<0,01. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

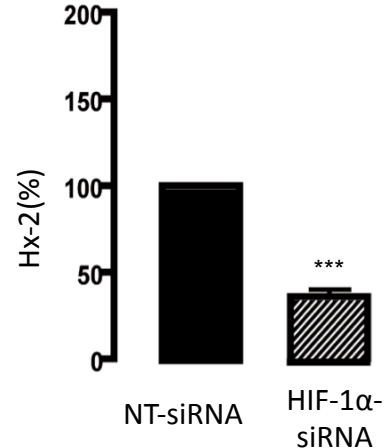
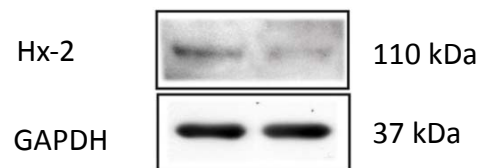
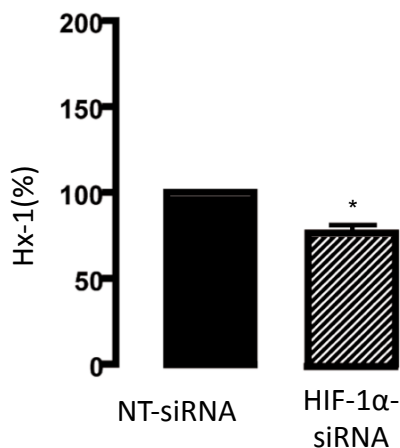
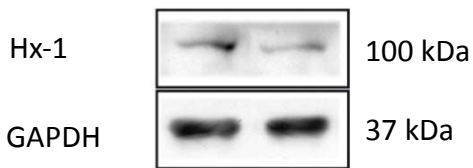
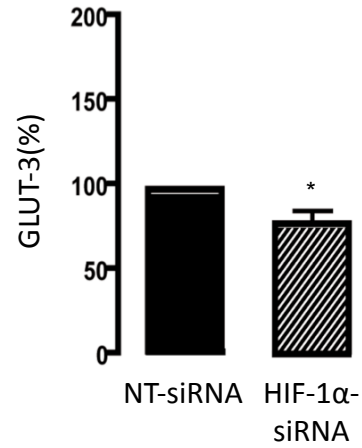
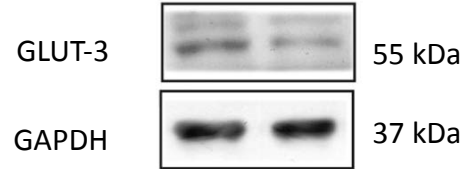
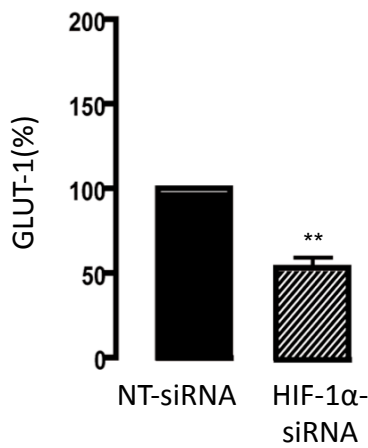
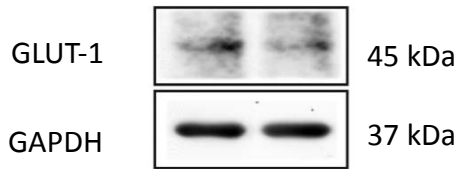
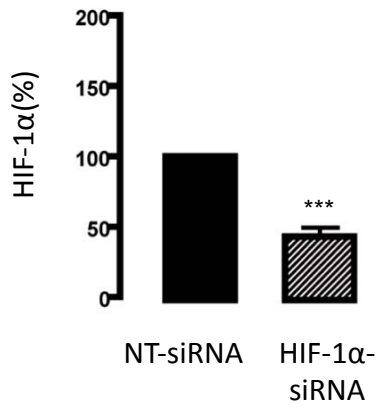
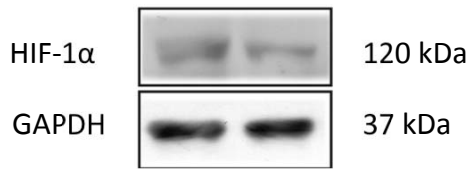


Figura 19. Efecto del silenciamiento HIF-1α sobre las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con la secuencias 3 de siRNA-HIF-1α y se recogieron las proteínas 72 h después de la transfección tal y como se describe en Material y Métodos. a) Western blot de HIF-1α b) Western blot de GLUT-1 c) Western blot GLUT-3 d) Western blot de Hx-1 e) Western blot de Hx-2. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al 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<0,01; * p<0,05. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

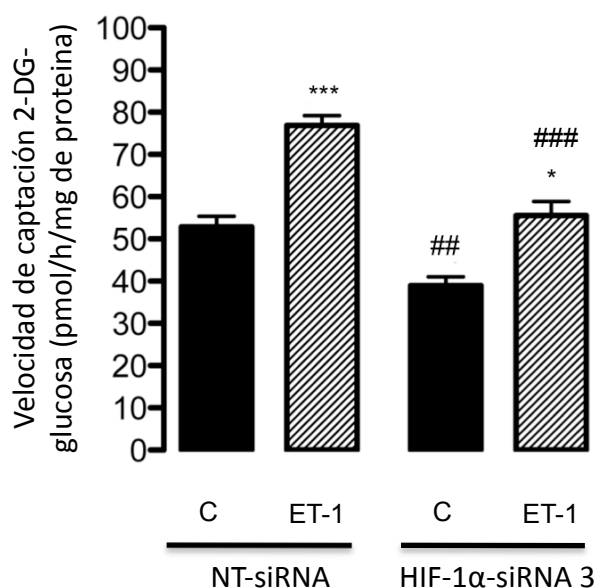
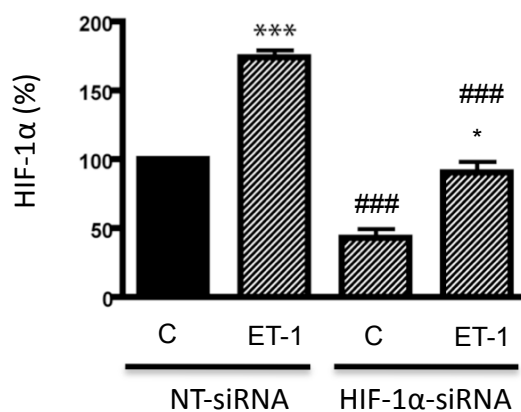
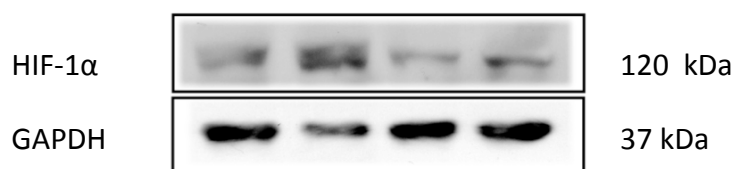


Figura 20. Efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en astrocitos que tienen silenciado HIF-1α.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con la secuencia 3 de siRNA-HIF-1α y se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μM de ET-1. A las 24h se recogieron las proteínas para su análisis por Western Blot o se analizó la velocidad de captación de glucosa tal y como se describe en material y métodos. a) Western Blot de HIF-1α. b) Velocidad de captación de glucosa. Los resultados se expresan como pmol/h/mg de proteína y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control de cada grupo se expresa como *** p<0,001; * p<0,05 y la significatividad de las diferencias frente al NT-siRNA se expresa como ###p<0,001; ##p<0,01 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

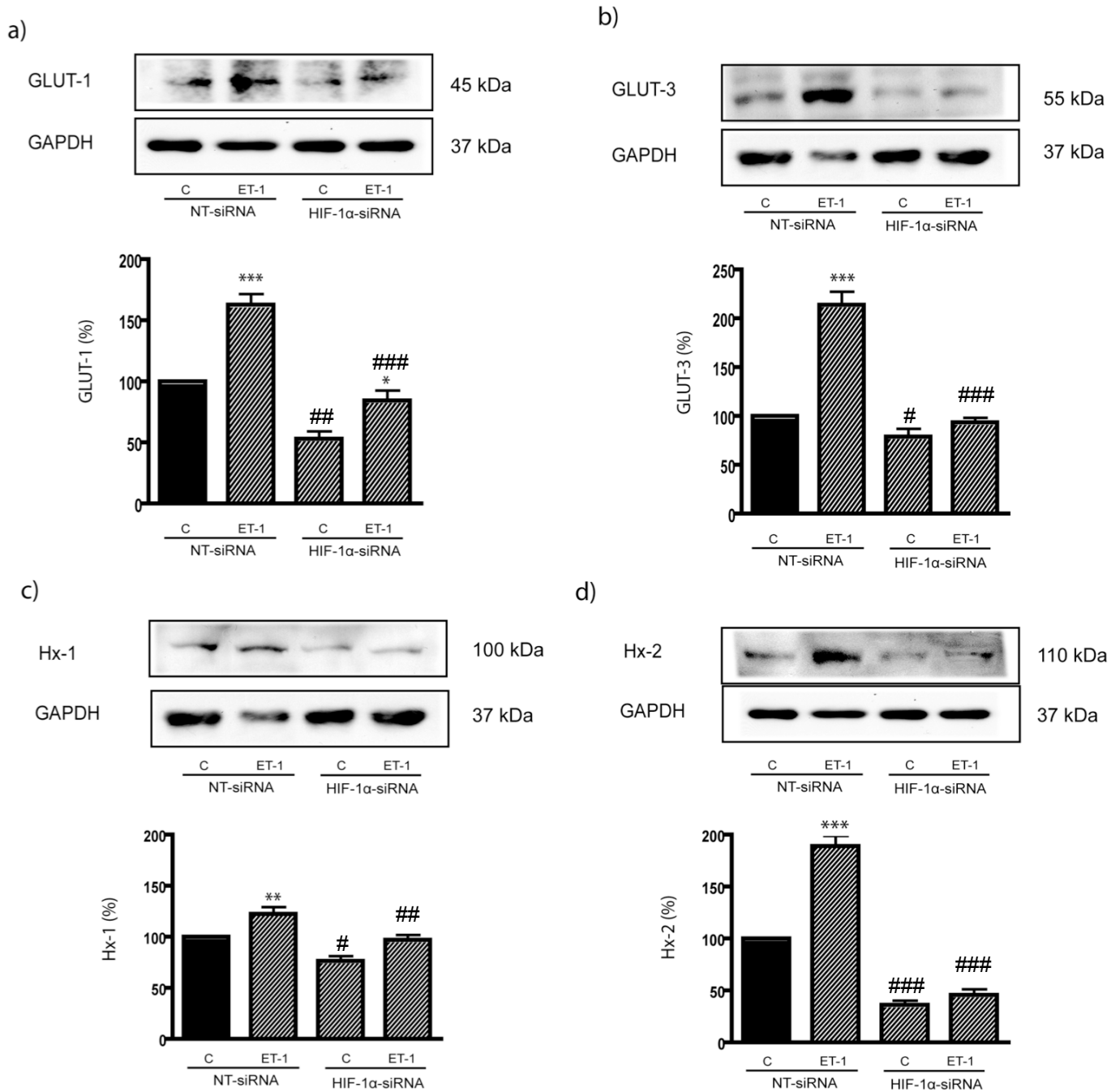


Figura 21. Efecto de la ET-1 sobre las proteínas implicadas en la captación de glucosa en astrocitos que tienen silenciado HIF-1 α .

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con la secuencias 3 de siRNA-HIF-1 α a las 48h se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 μ M de ET-1 durante 24h y se recogieron las proteínas 72h después de la transfección tal y como se describe en Material y Métodos. a) Western blot de GLUT-1 b) Western blot GLUT-3 c) Western blot de Hx-1 d) Western blot de Hx-2. Se utilizó GAPDH como control de carga para los Western blot. 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 de cada grupo se expresa como *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 y la significatividad de las diferencias frente al NT-siRNA se expresa como ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

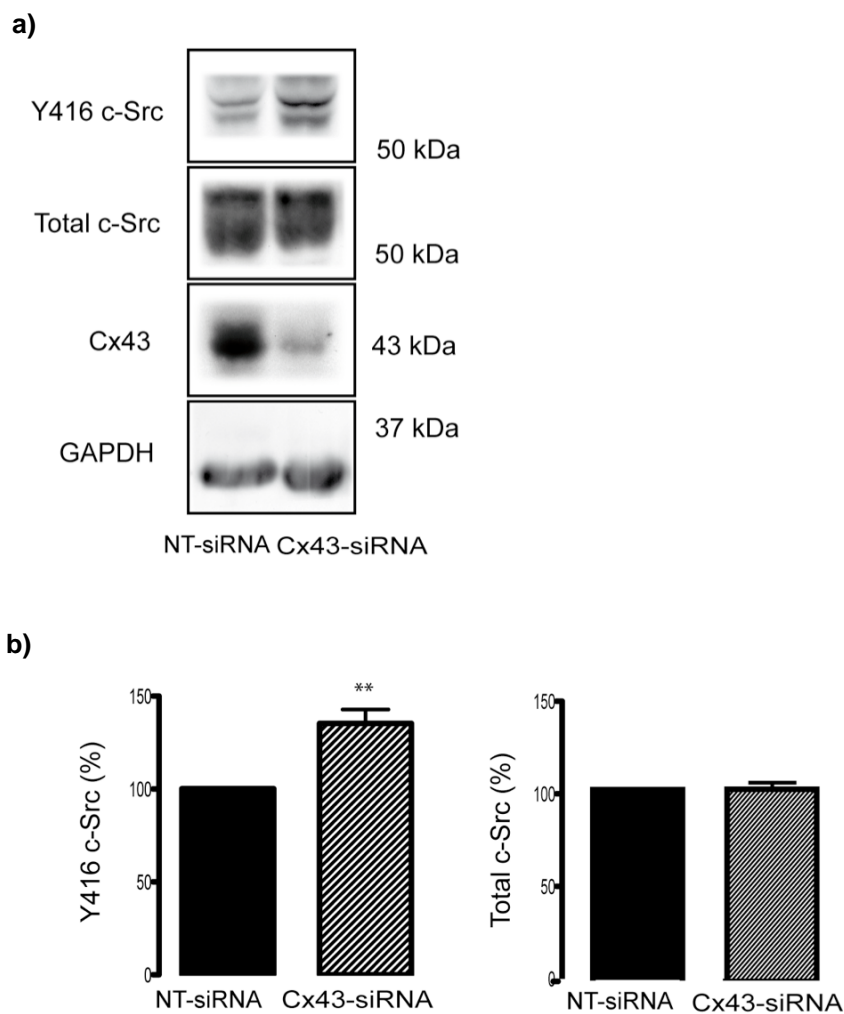


Figura 22. Efecto del silenciamiento de la Conexina 43 sobre la actividad de c-Src.

Los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA o con Cx43-siRNA y se recogieron las proteínas a las 48h, después de la transfección. **a)** Western Blot de Y416 c-Src y c-Src total. Se utilizó GAPDH como control de carga **b)** Los resultados se expresan como porcentaje respecto al NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a las situaciones control se expresa como ** p<0,01 (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

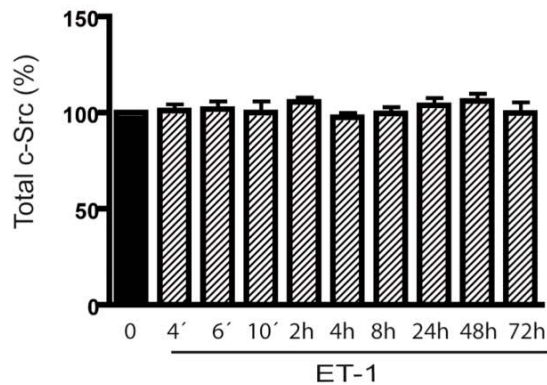
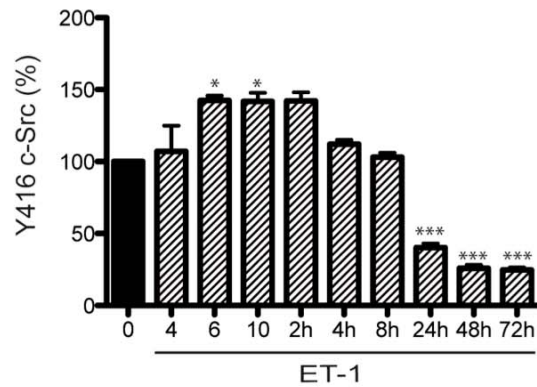
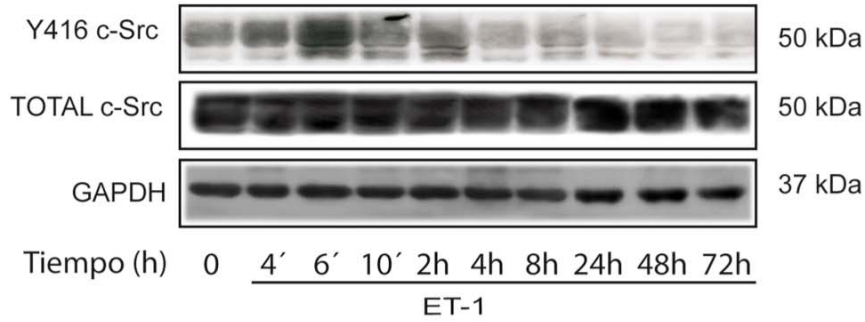


Figura 23. Efecto de la ET-1 sobre la actividad de c-Src.

Los astrocitos se incubaron en presencia de 0,1 μ M de ET-1 y se recogieron las proteínas a diferentes tiempos. a) Western blot de Y416 c-Src y c-Src total. Se utilizó GAPDH como control de carga b) Los resultados se expresan como porcentaje respecto al NT-siRNA y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación NT-siRNA se expresa como *** p<0,001; * p<0,05. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

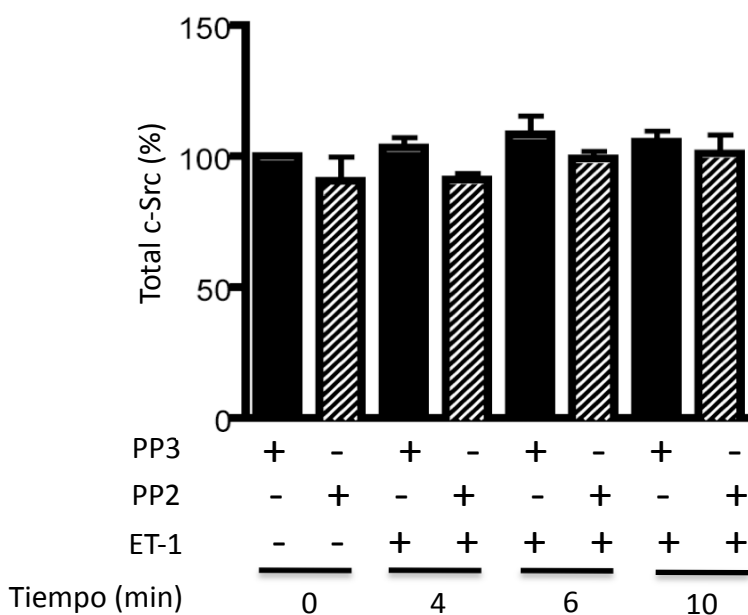
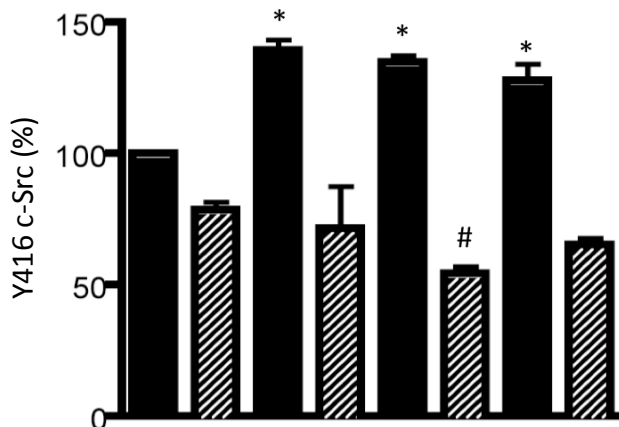
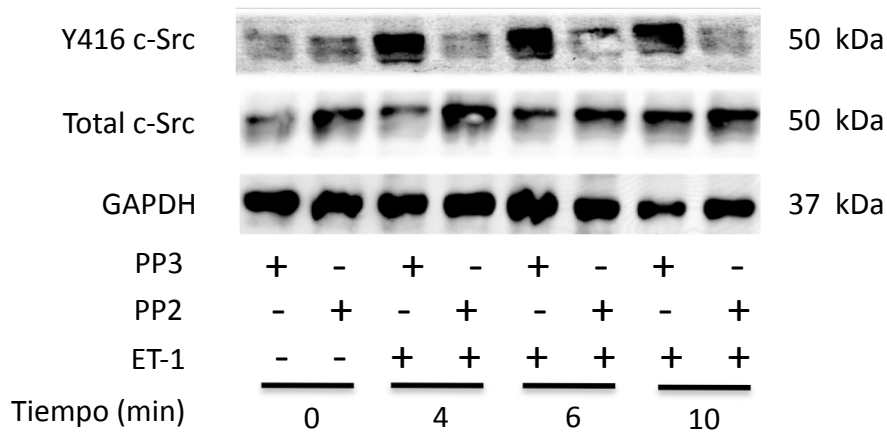


Figura 24. Efecto de la ET-1 sobre la actividad de c-Src en presencia del inhibidor de c-Src, PP2. Los astrocytes se preincubaron en presencia del inhibidor de la forma activa de c-Src PP2 y de su análogo estructural no activo PP3, durante una hora antes del tratamiento con 0,1 μ M de ET-1. Después se recogieron las proteínas a diferentes tiempos 0, 4', 6', 10' y 24h **a)** Western blot de Y416 c-Src y c-Src total. Se utilizó GAPDH como control de carga. **b)** Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación NT-siRNA se expresa como * $p < 0,05$, para las condiciones tratadas con el PP3, y como # $p < 0,05$, para las condiciones tratadas con PP2. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

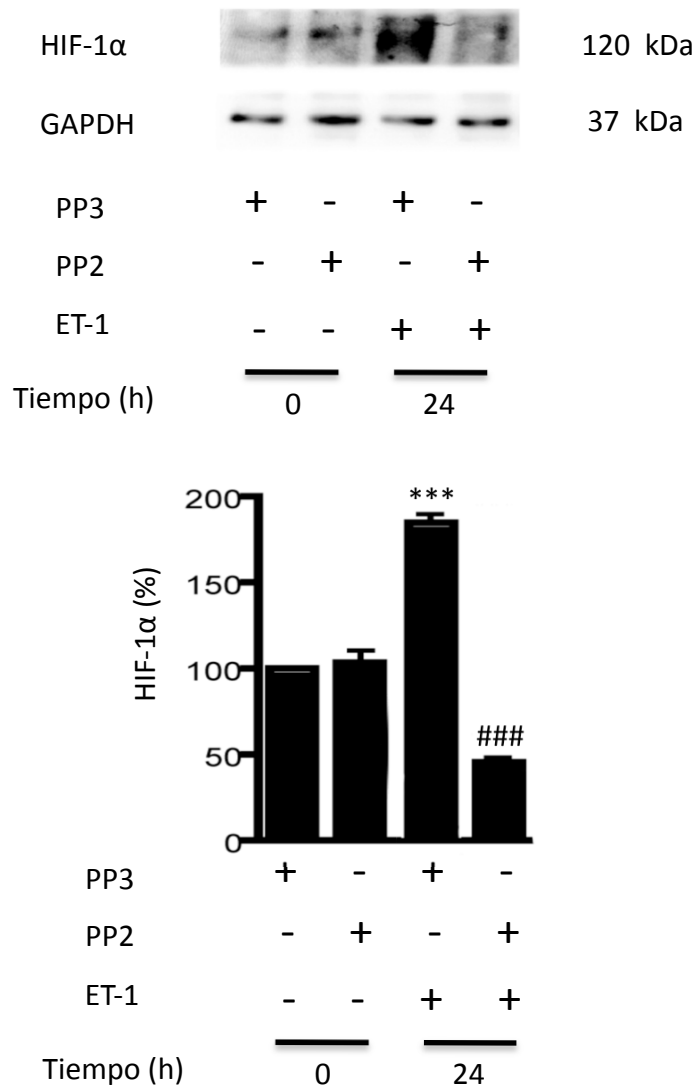


Figura 25. Efecto de la ET-1 sobre la expresión de HIF-1 α en presencia del inhibidor de c-Src, PP2.

Los astrocitos se preincubaron en presencia del inhibidor de la forma activa de c-Src PP2 y de su análogo estructural no activo PP3, durante una hora antes del tratamiento con 0,1 μ M de ET-1. Después se recogieron las proteínas a diferentes tiempos 0, y 24h **a)** Western blot de HIF-1 α . Se utilizó GAPDH como control de carga. **b)** Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias \pm SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación NT-siRNA se expresa como *** p<0,001; para las condiciones tratadas con el inhibidor PP3, y como ### p<0,001, para las condiciones tratadas con el análogo estructural PP2. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

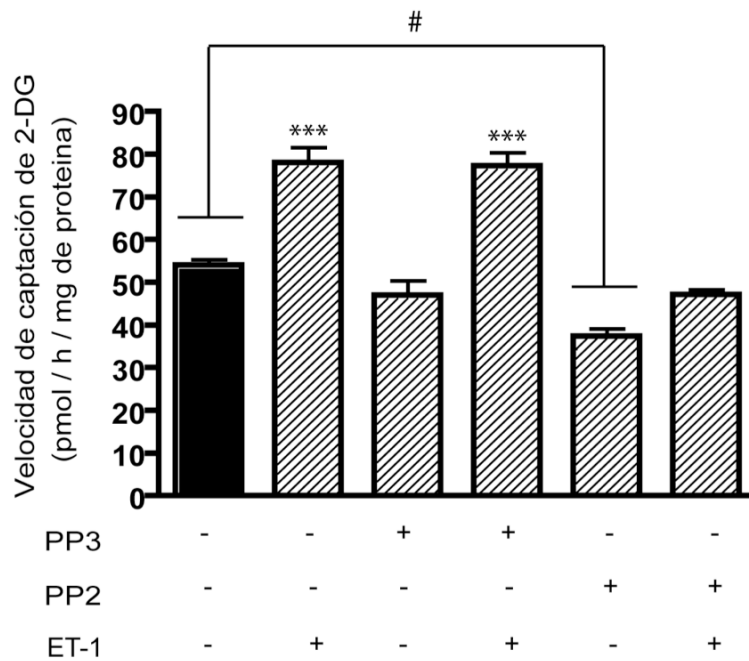


Figura 26. Efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en presencia del inhibidor de c-Src, PP2.

Los astrocitos se preincubaron en presencia del inhibidor de la forma activa de c-Src PP2 y de su análogo estructural no activo PP3, durante una hora antes del tratamiento con 0,1 μ M de ET-1. 24h después, se determinó la velocidad de captación de glucosa, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol/h/mg de proteína y son medias \pm SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la situación NT-siRNA se expresa como *** p<0,001; para las condiciones no tratadas y tratadas con PP3, y como # p<0,05, para las condiciones tratadas con PP2. (One-way ANOVA seguido de Tukey Post-test).

DISCUSIÓN

En el Sistema Nervioso Central (SNC), los astrocitos se encuentran comunicados a través de las uniones comunicantes, estas uniones permiten el paso de diferentes moléculas, entre ellas, importantes sustratos metabólicos como la glucosa, el lactato o el glutamato (Giaume et al., 1997, Tabernero et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que el tráfico de glucosa a través de estos canales constituye una red de comunicación necesaria para mantener la actividad sináptica en el sistema nervioso central (Rouach et al., 2008). Además, la inhibición de la comunicación a través de las estas uniones promueve un incremento rápido en la velocidad de captación de glucosa en los astrocitos en cultivo (Tabernero et al., 1996, Tabernero et al., 2001) (para revisión, ver: (Medina et al., 1999)). Así, la inhibición de las uniones comunicantes por agentes como la endotelina (ET-1) promueven una disminución en la expresión de la conexina 43 (Cx43), la proteína mayoritaria en las uniones comunicantes de los astrocitos. Este efecto se acompaña de un incremento en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 y de las enzimas responsables de la fosforilación de la glucosa, las hexoquinasas, tipo I (Hx-1) y tipo II (Hx-2). Este efecto es ostensible con independencia de la estructura molecular del agente inhibidor indicando que el aumento de la captación de glucosa está relacionado con la pérdida de comunicación intercelular a través de las uniones comunicantes. En este trabajo quisimos confirmar la participación de las uniones comunicantes en el aumento de la captación de glucosa en los astrocitos, así como profundizar en el estudio del mecanismo molecular implicado en este proceso importante para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central.

5.1 Expresión de las proteínas responsables de la captación de glucosa en los astrocitos reactivos.

En un gran número de patologías del SNC que cursan con lesiones neuronales, como la isquemia o la enfermedad de Alzheimer se produce un proceso reactivo que afecta a las células gliales, entre ellas 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 ET-1 (Jiang et al., 1993, Zhang et al., 1994, Hasselblatt et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que en el modelo experimental de lesión neuronal provocado por la inyección de ácido kaínico se produce una fuerte gliosis reactiva, caracterizada por el aumento de la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), seguido de la pérdida de la expresión de la Cx43 en los astrocitos (Koulakoff et al., 2008). Por ello, elegimos este modelo para investigar si la pérdida de Cx43 en los astrocitos "in vivo" provocaba cambios en la expresión de las proteínas responsables de la captación de glucosa en los astrocitos.

Los resultados obtenidos muestran que tras la lesión del cortex cerebral de ratón con ácido kaínico, se produce la muerte neuronal acompañada de un aumento de los niveles de ET-1. En la zona lesionada, se promueve una fuerte gliosis reactiva caracterizada por un aumento en la expresión de GFAP y una pérdida de la expresión de la Cx43 en los astrocitos reactivos. Por otro lado, cuando se inyecta solamente el vehículo (PBS), observamos que apenas hay muerte neuronal, aunque sí se incrementan los niveles de ET-1. En este caso, la gliosis reactiva es moderada y se caracteriza por un menor aumento en la expresión de la GFAP y la no modificación de los niveles de Cx43 en los astrocitos. Llama la atención que tanto con ácido kaínico como con PBS se produzca un aumento en los niveles de ET-1, aunque solo disminuya la expresión de la Cx43 en los astrocitos tras la lesión promovida con ácido kaínico. Esto puede deberse a que la lesión con PBS no promueve la muerte neuronal y parte de la ET-1 podría estar unida a los receptores de ET-1 presentes en las neuronas, limitando la cantidad de ET-1 unida a los receptores de los astrocitos. Como consecuencia, no se observarían algunos efectos de la ET-1 en los astrocitos como es la disminución de la expresión de la Cx43. No podemos descartar que con la muerte neuronal se provoque también la liberación de otros agentes al medio extracelular que contribuyan a la disminución en la expresión de la Cx43 en los astrocitos.

En definitiva, la lesión neuronal con ácido kaínico representa un modelo interesante para nuestro objetivo, ya que se trata de un modelo "in vivo" en el que se reduce la expresión de la Cx43 en los astrocitos. Por consiguiente, decidimos investigar la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa en estas circunstancias.

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica del transportador GLUT-1, no nos permitieron determinar cambios en la expresión de este transportador en los astrocitos. De hecho, la expresión de GLUT-1 es tan alta en los vasos sanguíneos que no permite identificar su localización ni en los astrocitos ni en las neuronas. Aunque GLUT-1 es el transportador mayoritario de glucosa en astrocitos, su alta expresión en las células del endotelio vascular está muy bien descrita, siendo empleado como marcador de este tipo de células del SNC (Harik et al., 1993)

Sin embargo, la expresión de GLUT-3, si se modificó tras la lesión con ácido kaínico, comparado con la lesión provocada con PBS. Nuestros resultados indican claramente un aumento en la expresión de GLUT-3 en la zona lesionada con ácido kaínico. En condiciones normales GLUT-3 se expresa en las neuronas, pero no en los astrocitos. Nuestros resultados muestran que tras la lesión con ácido kaínico existe un aumento en la expresión de GLUT-3 en los astrocitos que rodean la lesión. Es necesario mencionar que algunos de los estímulos que inducen la expresión de GLUT-3 en astrocitos en cultivo, son la ET-1 (Sánchez-Alvarez et al., 2004) ó el óxido nítrico (Cidad et al.). Curiosamente tanto el óxido nítrico como la ET-1, inhiben las uniones comunicantes de los astrocitos (Giaume et al., Bolaños and Medina), apoyando la idea de que la inhibición de las uniones comunicantes aumenta la expresión de GLUT-3. De

hecho, tras la lesión con ácido kaínico, aumentan los niveles de ET-1, disminuye la expresión de la Cx43 y aumenta la expresión de GLUT-3 en los astrocitos.

Por lo que se refiere a la expresión de la Hx-2, enzima responsable de la fosforilación de la glucosa, nuestros resultados muestran que la lesión neuronal provocada por el ácido kaínico provoca un aumento en la expresión de la Hx-2 en los astrocitos presentes en la zona de la lesión. Es necesario mencionar que al igual que GLUT-3 esta isoforma no está presente en los astrocitos, pero se induce en respuesta a determinados estímulos como la ET-1 (Sanchez-Alvarez et al.).

Recientes trabajos muestran que los astrocitos reactivos ejercen una función neuroprotectora ya que ayudan a reducir el tamaño de la zona lesionada (Li)(Li). De ser así, la regulación de la Cx43 y de las proteínas implicadas en la captación de glucosa, podrían tener un papel importante en este efecto neuroprotector.

En conjunto los resultados obtenidos tras la lesión con ácido kaínico, junto con los obtenidos previamente en cultivo de astrocitos, sugieren que la disminución de la Cx43, provocada entre otros por la ET-1, promueve un aumento en la expresión de GLUT-3 y Hx-2, en los astrocitos reactivos. Por consiguiente, decidimos confirmar la participación de la Cx43 en el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en astrocitos.

5.2 Participación de la conexina 43 en el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa.

Con objeto de conocer si la Cx43 es necesaria para que la ET-1, actúe como moduladora de la captación de glucosa, se empleó la tecnología de silenciamiento de proteínas por siRNA, para reducir la expresión de la Cx43 en los astrocitos en cultivo y analizar la velocidad de captación de glucosa en estas circunstancias.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la Cx43 promueve una significativa disminución en la funcionalidad de las uniones comunicantes de los astrocitos como se puede observar en los estudios de permeabilidad con amarillo de lucifer. Esta disminución de funcionalidad se debe probablemente a una disminución de la expresión de la Cx43 como muestran los análisis de expresión de proteína por Western Blot.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la Cx43 en los astrocitos en cultivo, promueve un aumento significativo de la velocidad de captación de glucosa. Además, el silenciamiento de la Cx43 promueve un aumento en la expresión de GLUT-1, y en la cantidad del mRNA de GLUT-3. Puesto que la captación de glucosa se determinó con 2-desoxy-glucosa, su aumento implica no solo un mayor transporte, sino que también una mayor fosforilación de la glucosa. En efecto, el silenciamiento de la Cx43 provocó un aumento en la expresión de la Hx-1, isoforma predominante en astrocitos y de la Hx-2, isoforma inducible.

Tomando en conjunto estos resultados podemos indicar que el silenciamiento de Cx43 en los astrocitos promueve un aumento en la velocidad de captación de glucosa y en la expresión de las proteínas implicadas en la captación de glucosa.

A continuación analizámos el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa en astrocitos en cultivo, con la Cx43 silenciada. En paralelo estudiamos los efectos de otro inhibidor de las uniones comunicantes, como es la carbenoxolona (CBX) cuya estructura y mecanismo de acción es diferente al de la ET-1 (Sánchez-Alvarez et al.).

El tratamiento de los astrocitos con estos inhibidores promueve una disminución de la expresión de la Cx43 y un aumento en la velocidad captación de glucosa en los astrocitos control y en los astrocitos transfectados con un siRNA sin diana (NT-siRNA). Sin embargo en los astrocitos con la Cx43 silenciada, el tratamiento con ET-1 o con CBX no modifica la velocidad de captación, respecto a su control. Del mismo modo, los niveles de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 no se vieron modificados ni por la ET-1 ni por la CBX en los astrocitos con la Cx43 silenciada cuando se comparan con su control.

Por tanto, la Cx43 es necesaria para que la ET-1 aumente la velocidad de captación de glucosa en los astrocitos. Más concretamente, la disminución de la expresión de la Cx43 provocada por la ET-1 puede estar mediando este proceso. El hecho de que los resultados con CBX sean muy similares a los obtenidos con ET-1 sugieren que un mecanismo similar puede ocurrir con otros inhibidores de las uniones comunicantes.

5.3 Participación de HIF-1 α en el efecto de la ET-1 y la conexina 43 sobre la captación de glucosa.

Una vez conocido que la pérdida de la Cx43 y por tanto de la comunicación a través de las uniones comunicantes en los astrocitos, promueve un aumento de la velocidad de captación de glucosa, quisimos identificar la vía de señalización implicada. Como se ha descrito en la introducción, en los tumores sólidos existe un microambiente que condiciona a las células tumorales para adaptarse y sobrevivir en este ambiente. Uno de los mecanismos de adaptación que estas células pueden activar es el aumento de expresión del factor inducible de hipoxia, HIF-1 α como consecuencia en estas células, entre otros mecanismos aumenta la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 (Denko). Por ello, decidimos estudiar si HIF-1 α estaba implicado en el efecto de la ET-1 y la Cx43 en la captación de glucosa en astrocitos.

HIF-1 α es un factor de transcripción de numerosos genes implicados en el metabolismo de la glucosa entre los que se encuentran GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2. Aunque tiene una regulación dependiente de oxígeno, en ciertas ocasiones existen otras vías de regulación, entre las que se encuentra la activación por oncogenes, o por agentes como la ET-1, que pueden provocar un aumento de la expresión de HIF-1 α (Denko).

Hasta el momento se ha mostrado que el cierre de las uniones comunicantes por agentes como la ET-1 y la pérdida de la Cx43 en los astrocitos provocan un aumento de la velocidad de la captación de glucosa. Por ello, investigamos si la ET-1 y la pérdida de Cx43 pudiera estar regulando de alguna manera la expresión de HIF-1 α en los astrocitos y promoviendo así un aumento de la transcripción en los genes que controlan la captación de glucosa.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la Cx43, promueve un aumento de la expresión de HIF-1 α . De hecho los niveles de expresión de HIF-1 α se correlacionan inversamente con los de la Cx43. Además, existe un comportamiento similar tras el tratamiento de los astrocitos con ET-1, pues la disminución en la expresión de Cx43 provocada por la ET-1 se traduce en una acumulación de HIF-1 α en el astrocito. Por tanto, nuestros resultados muestran que tanto el silenciamiento de la Cx43 como el tratamiento con ET-1 promueven un aumento de la expresión de HIF-1 α en los astrocitos.

Para confirmar la participación de HIF-1 α en el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa, silenciamos HIF-1 α con diferentes siRNA's y analizamos la velocidad de captación de glucosa en estas circunstancias.

Pues bien, en los astrocitos que tienen silenciado HIF-1 α la ET-1 no modificó la velocidad de captación de glucosa ni la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2, indicando que HIF-1 α es un factor de transcripción necesario para que se produzca el aumento en la velocidad de captación de glucosa observado, tras el tratamiento con ET-1 en los astrocitos.

5.4 Participación de c-Src en el efecto de la ET-1 y la conexina 43 sobre la captación de glucosa.

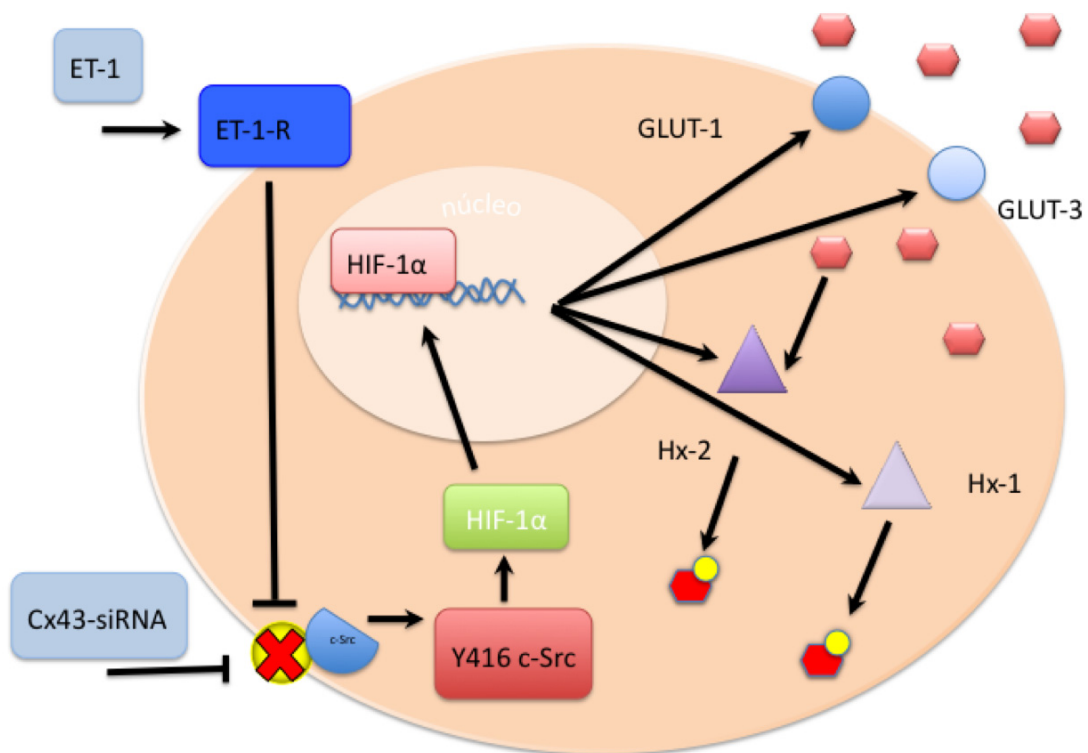
Hasta el momento, aparte de los resultados presentados en esta memoria, no ha sido descrita ninguna relación entre la Cx43 y el factor de transcripción HIF-1 α . Por ello, quisimos investigar la relación entre estas dos proteínas. Tal y como se ha descrito previamente, existen distintas vías de regulación de la expresión de HIF-1 α , una de estas vías es a través de algunos oncogenes, como c-Src (Blancher et al.). En este sentido, es necesario mencionar que c-Src puede unirse a la Cx43 en su extremo carboxilo terminal y de esta manera regular la funcionalidad de las uniones comunicantes (Warn-Cramer and Lau). Además recientemente se ha propuesto en nuestro laboratorio que la Cx43 también puede regular la actividad de c-Src a través de esta interacción. Así cuando c-Src está unido a la Cx43 mantiene su conformación inactiva, mientras que cuando c-Src está libre en el citoplasma, se autofosforila y se convierte en la forma activa de la proteína llevando a cabo las diversas funciones celulares que tiene este oncogen.

Dado que una de las funciones de c-Src es la activación del factor de transcripción HIF-1 α . (Blancher et al.), nos planteamos la posibilidad de que c-Src fuera un intermediario en esta vía de señalización que relaciona la Cx43 con HIF-1 α y la captación de glucosa.

Nuestros resultados muestran que en los astrocitos con la Cx43 silenciada se produce un aumento de la actividad de c-Src. Además, el tratamiento con ET-1 provoca una rápida y transitoria activación de c-Src.

Para investigar la participación de c-Src en la vía que relaciona la Cx43 con el aumento de la velocidad de la captación de glucosa, inhibimos la actividad de c-Src con PP2, un inhibidor específico de la forma activa de c-Src. Los resultados muestran que cuando se inhibe c-Src, la ET-1 no modifica los niveles de expresión de HIF-1 α ni la velocidad de captación de glucosa, indicando que la ET-1 aumenta los niveles de HIF-1 α y como consecuencia la captación de glucosa a través de la activación de c-Src.

En conjunto los resultados presentados en esta memoria nos permiten proponer que la inhibición de las uniones comunicantes, por diferentes agentes, como la ET-1 o el silenciamiento con Cx43-siRNA, promueve la activación de c-Src. Esta activación provoca a su vez la acumulación de HIF-1 α en la célula. La acumulación del factor de transcripción HIF-1 α en el citoplasma origina la formación de un heterodímero que migra al núcleo donde activa la expresión de los transportadores de glucosa, GLUT-1 y GLUT-3 y de las enzimas encargadas de la fosforilación de la glucosa Hx-1 y Hx-2. La presencia en la célula de las formas inducibles GLUT-3 y Hx-2, ayudan a GLUT-1 y Hx-1 en el proceso de captación y fosforilación de la glucosa, facilitando el aumento de la velocidad de captación de glucosa por el astrocito. (Esquema 16)



Esquema 16. Propuesta del mecanismo por el cual la expresión de la Cx43, puede modificar la velocidad de captación de glucosa en astrocitos.

CONCLUSIONES

- 1.- La lesión neuronal provocada por el ácido kaínico en el cortex de ratón adulto, induce una gliosis reactiva que se acompaña de la disminución en la expresión de la conexina 43 en los astrocitos circundantes. Así mismo se observa un aumento en los niveles de ET-1 en la zona lesionada.
- 2.- En los astrocitos que rodean la lesión neuronal se observa un aumento en la expresión de proteínas implicadas en la captación de glucosa, fundamentalmente de GLUT-3 y Hx-2, isoformas que no se expresan normalmente en los astrocitos y que son características de células en proliferación.
- 3.- La pérdida de conexina 43 en los astrocitos en cultivo provoca un aumento de la velocidad de captación de glucosa, así como de la expresión de las proteínas implicadas en este proceso: GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2.
- 4.- El aumento de la velocidad de captación de glucosa y de la expresión de GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 y Hx-2 promovido por la ET-1, no se observa cuando se silencia la Cx43 indicando que el efecto de la ET-1 sobre la captación de glucosa esta mediado por la disminución en la expresión de la conexina 43 en los astrocitos.
- 5.- Tanto el silenciamiento de la Cx43 como el tratamiento con ET-1 promueven un aumento en la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en astrocitos.
- 6.- El aumento en la velocidad de captación de glucosa promovido por la ET-1 no se observa cuando se silencia el factor de transcripción HIF-1 α en los astrocitos. Estos resultados sugieren que HIF-1 α participa en el efecto de la ET-1 sobre la velocidad de captación de glucosa.
- 7.- Tanto el silenciamiento de la Cx43 como el tratamiento con ET-1 provocan la activación del oncogén c-Src en astrocitos.
- 8.- La tirosina quinasa c-Src es necesaria para que la ET-1 aumente los niveles de HIF-1 α y como consecuencia la velocidad de captación de glucosa en los astrocitos.

CONCLUSIÓN FINAL:

Nuestros resultados tomados en su conjunto, confirman la relación entre la conexina 43 y la captación de glucosa en los astrocitos. En este sentido la tirosina quinasa c-Src que interacciona con la conexina 43 está implicada en la activación del factor de transcripción HIF-1 α , responsable de la inducción de GLUT-1, GLUT-3, Hexoquinasa 1 y Hexoquinasa 2; y por lo tanto del aumento de la velocidad de captación de glucosa observado tras la disminución de la Cx43 por agentes como la ET-1.

- 1.- The reactive gliosis induced by the neuronal lesion promoted by kainic acid in mice cortex, decreases connexin 43 expression in astrocytes. Likewise, there is an increase in ET-1 levels at the injury zone.
- 2.- There is an increase in the expression of proteins involved in glucose uptake in astrocytes around the lesion, mainly GLUT-3 and Hx-2, two isoforms characteristic at proliferation cells that are not usually present in astrocytes.
- 3.- Down-regulation of Cx43 in astrocytes promotes an increase in the rate of glucose uptake and in the expression of proteins involved in this process, such as GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2.
- 4.- The increase on the rate of glucose uptake and the upregulation of GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2 promoted by the ET-1, is not shown when connexin 43 is silenced in astrocytes. Therefore our results suggest that the effect of ET-1 on glucose uptake mediated by the decrease in connexin 43 expression in astrocytes.
- 5.- Silencing Connexin 43 and ET-1 treatment promote an increase in the expression of HIF-1 α expression in astrocytes
- 6.- The increase on the rate of glucose uptake promoted by the ET-1 is not observed when HIF-1 α is silenced in astrocytes. These results suggest that HIF-1 α is involved in the effect of connexin 43 and ET-1 on glucose uptake.
- 7.- Silencing connexin 43 silencing and ET-1 promote the activation of c-Src in astrocytes.
- 8.- The activation of c-Src is involved in the effect of ET-1 on the upregulation of HIF-1 α and the increase in the rate of glucose uptake.

FINAL CONCLUSION:

Our results confirm the relationship between connexin 43 and glucose uptake in astrocytes. This, c-Src, a protein that interact with connexin 43, is responsible for the activation of HIF-1 α , which induces the expression of GLUT-1, GLUT-3, hexokinase 1 and hexokinase 2, and consequently increases the rate of glucose uptake promoted by the downregulation of connexin 43 induced by ET-1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.2006).
- Araque A (Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4:3-10.2008).
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.2002).
- Ardehali H, Yano Y, Printz RL, Koch S, Whitesell RR, May JM, Granner DK (Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH₂- and COOH-terminal halves. *J Biol Chem* 271:1849-1852.1996).
- Arora KK, Pedersen PL (Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem* 263:17422-17428.1988).
- Barone FC, Globus MYT, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH (Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:337-342.1995).
- Barrett MP, Walmsley AR, Gould GW (Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol* 11:496-502.1999).
- Beemer FA, Vlug AM, Rijksen G, Hamburg A, Staal GE (Characterization of some glycolytic enzymes from human retina and retinoblastoma. *Cancer Res* 42:4228-4232.1982).
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW (Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268:19161-19164.1993).
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S (Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13:198-208.1990).
- Bennett MVL, Barrio TA, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC (Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305-320.1991).
- Bentley J, Itchayanan D, Barnes K, McIntosh E, Tang X, Downes CP, Holman GD, Whetton AD, Owen-Lynch PJ, Baldwin SA (Interleukin-3-mediated cell survival signals include phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of the glucose transporter GLUT1 to the cell surface. *J Biol Chem* 278:39337-39348.2003).
- Beyer EC, Steinberg TH (Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J Biol Chem* 266:7971-7974.1991).
- Bilan PJ, Mitsumoto Y, Maher F, Simpson IA, Klip A (Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1129-1137.1992a).
- Bilan PJ, Mitsumoto Y, Ramlal T, Klip A (Acute and long-term effects of insulin-like growth factor I on glucose transporters in muscle cells. Translocation and biosynthesis. *FEBS Lett* 298:285-290.1992b).

- Bird TA, Davies A, Baldwin SA, Saklatvala J (Interleukin-1 stimulates hexose transport in fibroblasts by the increasing expression of glucose transport. *J Biol Chem* 265:13578-13583.1990).
- Birnbaum MJ (Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57:305-315.1989).
- Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM (Cloning and characterization of cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proceedings of the Academy of Science of USA* 83:5784-5788.1986).
- Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ (Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19:5620-5635.2000).
- Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP (Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca^{2+} homeostasis and cell death. *J Neurochem* 70:958-970.1998).
- Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL (Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* 61:7349-7355.2001).
- Boado RJ, Black KL, Pardridge WM (Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Brain Res Mol Brain Res* 27:51-57.1994).
- Boddy JL, Fox SB, Han C, Campo L, Turley H, Kanga S, Malone PR, Harris AL (The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a, and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11:7658-7663.2005).
- Bolaños JP, Medina JM (Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 66:2091-2099.1996).
- Bondy CA, Lee W-H, Zhou J (Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 3:305-314.1992).
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signalling. *Europ J Biochem* 238:1-27.1996).
- Burk D, Wood M, Hunter J (On the significance of glycolysis for cancer growth, with special reference to Morris rat hepatomas. *J Natl Cancer Inst* 38:839-863.1967).
- Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL (Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256:8699-8704.1981).
- Chakrabarti R, Jung CY, Lee TP, Liu H, Mookerjee BK (Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J Immunol* 152:2660-2668.1994).

- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ (Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 277:40112-40117.2002).
- Charron MJ, Brosius FC, 3rd, Alper SL, Lodish HF (A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2535-2539.1989).
- Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM (Peptides homologous to extracellular loop of motifs connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J Physiol* 503.1:99-110.1997).
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276:9519-9525.2001).
- Chong YP, Ia KK, Mulhern TD, Cheng HC (Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1754:210-220.2005).
- Cidad P, Garcia-Nogales P, Almeida A, Bolanos JP (Expression of glucose transporter GLUT3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 79:17-24.2001).
- Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CC (Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J Comp Neurol* 504:298-313.2007).
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC (Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci* 29:2009-2021.2009).
- Clarke DD, Sokoloff L (1994) Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic Neurochemistry*(Siegel, G. J. et al., eds), pp 645-680 New York: Raven Press.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM (Calcium waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12:185-204.1991).
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signalling. *Science* 247:470-473.1990).
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF (Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10:1754-1763.1990).
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.1992).
- Davidson JS, Baumgarten IM (Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 246:1104-1107.1988).
- Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH (Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Comm* 134:29-36.1986).

- Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, Bell GI (Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am J Physiol* 262:C795-800.1992).
- Denko NC (Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8:705-713.2008).
- Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC (Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.1991).
- Didier N, Banks WA, Creminon C, Dereuddre-Bosquet N, Mabondzo A (HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Neuroreport* 13:1179-1183.2002).
- Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, Klip A (Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem* 265:13427-13430.1990).
- Downs SM (The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol* 167:502-512.1995).
- Du J, Bernasconi P, Clauser KR, Mani DR, Finn SP, Beroukhim R, Burns M, Julian B, Peng XP, Hieronymus H, Maglathlin RL, Lewis TA, Liao LM, Nghiemphu P, Mellinghoff IK, Louis DN, Loda M, Carr SA, Kung AL, Golub TR (Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat Biotechnol* 27:77-83.2009).
- Easterby JS, O'Brien MJ (Purification and properties of pig-heart hexokinase. *Eur J Biochem* 38:201-211.1973).
- Ehrenreich H (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:C614-615.1999).
- Ehrenreich H, Kehrl JH, Anderson RW, Rieckmann P, Vitkovic L, Coligan JE, Fauci AS (A vasoactive peptide, endothelin-3, is produced by and specifically binds to primary astrocytes. *Brain Res* 538:54-58.1991).
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-907.2007).
- Endl E, Gerdes J (The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257:231-237.2000).
- Enkvist MOK, McCarthy KD (Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentrations. *J Neurochem* 62:489-495.1994).
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.2004).

- Ferraris RP (Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* 360:265-276.2001).
- Frame MC (Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602:114-130.2002).
- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S (Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264:7776-7779.1989).
- Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Bell GI (Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5434-5438.1988).
- Fuxe K, Tinner B, Staines W, Hemsén A, Hersh L, Lundberg J (Demonstration and nature of endothelin-3-like immunoreactivity in somatostatin and choline acetyltransferase-immunoreactive nerve cells of the neostriatum of the rat. *Neurosci Lett* 123:107-111.1991).
- Gao N, Ding M, Zheng JZ, Zhang Z, Leonard SS, Liu KJ, Shi X, Jiang BH (Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 277:31963-31971.2002).
- Gardner-Medwin AR (A new framework for assessment of potassium-buffering mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 481:287-302.1986).
- Giaume C, Cordier J, Glowinski J (Endothelins inhibit junctional permeability in cultured mouse astrocytes. *Eur J Neurosci* 4:877-881.1992).
- Giaume C, Fromaget C, El Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D (Gap junction in cultured astrocytes: single channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.1991a).
- Giaume C, Marin P, Cordier J, Glowinski J, Premont J (Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5577-5581.1991b).
- Giaume C, Tabernero A, Medina JM (Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 21:114-123.1997).
- Giaume C, Theis M (Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* 63:160-176.2010).
- Giaume C, Venance L (Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24:50-64.1998).
- Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH (Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276:8544-8549.2001a).

- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11:1364-1368.2001b).
- Gilleron J, Fiorini C, Carette D, Avondet C, Falk MM, Segretain D, Pointis G (Molecular reorganization of Cx43, Zo-1 and Src complexes during the endocytosis of gap junction plaques in response to a non-genomic carcinogen. *J Cell Sci* 121:4069-4078.2008).
- Goldberg G, Moreno A, Bechberger J, Hearn S, Shivers R, MacPhee D, Zhang Y-C, Naus C (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* 222:48-53.1996).
- Gordon G, Mackow M, Lay H (On the mechanism of interaction of steroids with human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 318:25-29.1995).
- Gorovits N, Charron MJ (What we know about facilitative glucose transporters Lessons from cultured cells, animal models, and human studies. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31:163-172.2003).
- Granda B, Tabernero A, Sánchez-Abarca LI, Medina JM (The K-ATP channel regulates the effect of Ca²⁺ on gap junction permeability in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 427:41-45.1998).
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.2002).
- Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ (Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol Carcinog* 16:157-164.1996).
- Gudnason V, Ingvarsson S, Jonasdottir A, Andresdottir V, Egilsson V (Isoenzyme pattern and subcellular localization of hexokinases in human breast cancer and nonpathological breast tissue. *Int J Cancer* 34:63-66.1984).
- Hama H, Kasuya Y, Sakurai T, Yamada G, Suzuki N, Masaki T, Goto K (Role of endothelin-1 in astrocyte responses after acute brain damage. *J Neurosci Res* 47:590-602.1997).
- Hamilton JA, Vairo G, Lingelbach SR (Activation and proliferation signals in murine macrophages: stimulation of glucose uptake by hemopoietic growth factors and other agents. *J Cell Physiol* 134:405-412.1988).
- Hasselblatt M, Bunte M, Dringen R, Tabernero A, Medina JM, Giaume C, Siren AL, Ehrenreich H (Effect of endothelin-1 on astrocytic protein content. *Glia* 42:390-397.2003).
- Heijnen HF, Oorschot V, Sixma JJ, Slot JW, James DE (Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol* 138:323-330.1997).
- Herrero-Gonzalez S, Valle-Casuso JC, Sanchez-Alvarez R, Giaume C, Medina JM, Tabernero A (Connexin43 is involved in the effect of endothelin-1 on astrocyte proliferation and glucose uptake. *Glia* 57:222-233.2009).

- Hirschi K, Xu C, Tsukamoto T, Sager R (Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff* 7:861-870.1996).
- Holden PR, McGuire B, Stoler A, Balmain A, Pitts JD (Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:15-21.1997).
- Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB (Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* 55:1373-1378.1995).
- Holroyde MJ, Trayer IP (Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. *FEBS Lett* 62:215-219.1976).
- Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* 130:1885-1895.1992).
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-7992.1998a).
- Huang R, Fan Y, Hossain M, Peng A, Zeng Z, Boynton A (Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58:5089-5096.1998b).
- Huang R-P, Hossain M, Sehgal A, Boynton A (Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70:21-24.1999).
- Hundal HS, Ahmed A, Guma A, Mitsumoto Y, Marette A, Rennie MJ, Klip A (Biochemical and immunocytochemical localization of the 'GLUT5 glucose transporter' in human skeletal muscle. *Biochem J* 286 (Pt 2):339-343.1992).
- Isselbacher KJ (Increased uptake of amino acids and 2-deoxy-D-glucose by virus-transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:585-589.1972a).
- Isselbacher KJ (Sugar and amino acid transport by cells in culture--differences between normal and malignant cells. *N Engl J Med* 286:929-933.1972b).
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-472.2001).
- James DE, Strube M, Mueckler M (Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338:83-87.1989).
- Janzer RC, Raff MC (Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-256.1987).

- Jensen AM, Chiu SY (Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci* 10:1165-1175.1990).
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111:709-720.2002).
- Jesberger JA, Richardson JS (Oxygen free radicals and brain dysfunction. *International Journal of Neuroscience* 57:1-17.1991).
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771-17778.1996).
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL (Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272:19253-19260.1997).
- Joost HG, Thorens B (The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18:247-256.2001).
- Joost HG, Wandel S, Schurmann A (Structure-function relationship of glucose transporters catalyzing facilitated diffusion. *Exp Clin Endocrinol* 102:434-438.1994).
- Kaelin WG, Jr. (Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-682.2002).
- Kaestner KH, Christy RJ, McLenithan JC, Braiterman LT, Cornelius P, Pekala PH, Lane MD (Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3150-3154.1989).
- Kanemitsu MY, Loo LW, Simon S, Lau AF, Eckhart W (Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J Biol Chem* 272:22824-22831.1997).
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M (Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28:4702-4711.2008).
- Kasaniki MA, Cairns MT, Davies A, Gardiner RM, Baldwin SA (Identification and characterization of the glucose transport protein of the bovine blood-brain barrier. *Biochem J* 247:101-108.1987).
- Katzen HM, Schimke RT (Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54:1218-1225.1965).
- Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI (Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 265:13276-13282.1990).

- Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI (Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263:15245-15248.1988).
- Kosodo Y, Huttner WB (Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ* 51:251-261.2009).
- Koulakoff A, Ezan P, Giaume C (Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56:1299-1311.2008).
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.1966).
- Kumar NM, Gilula NB (The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.1996).
- Kurata WE, Lau AF (p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src. *Oncogene* 9:329-335.1994).
- Laird D, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh H, Carystinos G, Alaoui-Jamali M (Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 59:4104-4110.1999).
- Lampe PD, Lau AF (Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384:205-215.2000).
- Lampe PD, Lau AF (The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1171-1186.2004).
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295:858-861.2002).
- Lavado E, Sánchez-Abarca LI, Tabernero A, Bolaños JP, Medina JM (Oleic acid inhibits gap junction permeability and increases glucose uptake in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 69:721-728.1997).
- Lee WH, Bondy CA (Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression. *Endocrinology* 133:2540-2544.1993).
- Letho M, Xiang K, Stoffel R, R. E, Groop LC, Le Beau MM, Bell GI (*Diabetologia* 36:1299-1302.1993).
- Li L (Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. 1-14.2007).
- Li S, Couet J, Lisanti MP (Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:29182-29190.1996).

- Li X, Su V, Kurata WE, Jin C, Lau AF (A novel connexin43-interacting protein, CIP75, which belongs to the UbL-UBA protein family, regulates the turnover of connexin43. *J Biol Chem* 283:5748-5759.2008).
- Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF (v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol* 154:815-827.2001).
- Loewenstein W (Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61:829-913.1981).
- Loewenstein WR, Kanno Y (Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209:1248-1249.1966).
- Loo LW, Berestecky JM, Kanemitsu MY, Lau AF (pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J Biol Chem* 270:12751-12761.1995).
- MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH (Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2359-2363.1990).
- Maher F, Vannucci SJ, Simson IA (Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8:1003-1011.1994).
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E (Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am J Physiol* 263:G312-318.1992).
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.2003).
- Malide D, Davies-Hill TM, Levine M, Simpson IA (Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *Am J Physiol* 274:E516-526.1998).
- Mantych GJ, James DE, Devaskar SU (Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132:35-40.1993).
- Mantz J, Cordier J, Giaume C (Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Lab Invest* 78:892-901.1993).
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (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* 68:255-264.1997).
- Martin W, Zempel G, Hulser D, Willecke K (Growth inhibition of oncogene-transformed rat fibroblasts by cocultured normal cells: relevance of metabolic cooperation mediated by gap junctions. *Cancer Res* 51:5348-5351.1991).
- Masaoka H, Suzuki R, Hirata Y, Emori T, Marumo F, Hirakawa K (Raised plasma endothelin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 2:1402.1989).

- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J* 20:5197-5206.2001).
- Mathupala SP, Pedersen PL (Type II AS-30D Hepatoma Hexokinase. GenBank Accession Number AF027179.1997).
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ (Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8104-8109.1997).
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271-275.1999).
- Medina JM, Giaume C, Tabernero A (1999) Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*, vol. 468 (Matsas, R. and Tsacopoulos, M., eds), pp 361-371 New York: Plenum Publishers.
- Medina JM, Vicario C, Juanes M, Fernández E (1992) Biochemical adaptations to early extrauterine life. In: *Perinatal Biochemistry*(Herrera, E. and Knopp, R., eds), pp 233-258 Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mege RM, Goudou D, Giaume C, Nicolet M, Rieger F (Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion? *Cell Adhes Commun* 2:329-343.1994).
- Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR (Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 124:207-225.1991).
- Meijer R, Malewicz B, Baumann WJ, Johnson RG (Increased gap junction assembly between cultured cell upon cholesterol supplementation. *J Cell Sci* 96:231-237.1990).
- Melillo G (Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 4:601-605.2006).
- Mesnil M, Piccoli C, Krutovskikh V, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H (Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin-species specificity. *Cancer Res* 55:629-639.1995).
- Michel G, Minet E, Ernest I, Roland I, Durant F, Remacle J, Michiels C (A model for the complex between the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its consensus DNA sequence. *J Biomol Struct Dyn* 18:169-179.2000).
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP (Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296:1886-1889.2002).
- Mitsumoto Y, Klip A (Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem* 267:4957-4962.1992).

- Mobbs P, Brew H, Attwell DA (A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axotolol (*Ambystoma mexicanum*). Brain Res 460:235-245.1988).
- Moorby C, Patel M (Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. Exp Cell Res 271:238-248.2001).
- Morga E, Faber C, Heuschling P (Stimulation of endothelin B receptor modulates the inflammatory activation of rat astrocytes. J Neurochem 74:603-612.2000).
- Mueckler M (Facilitative glucose transporters. Eur J Biochem 219:713-725.1994).
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM (Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. J Biol Chem 275:25207-25215.2000).
- Muzi M, Freeman SD, Burrows RC, Wiseman RW, Link JM, Krohn KA, Graham MM, Spence AM (Kinetic characterization of hexokinase isoenzymes from glioma cells: implications for FDG imaging of human brain tumors. Nucl Med Biol 28:107-116.2001).
- Nagamatsu S, Nakamichi Y, Inoue N, Inoue M, Nishino H, Sawa H (Rat C6 glioma cell growth is related to glucose transport and metabolism. BIOCHEMICAL JOURNAL 319:477-482.1996).
- Nagamatsu S, Sawa H, Kamada K, Nakamichi Y, Yoshimoto K, Hoshino T (Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. FEBS Lett 334:289-295.1993).
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE (Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. J Comp Neurol 441:302-323.2001).
- Naus CCG, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX (Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. Neurosci Lett 126:33-36.1991).
- Nie XJ, Olsson Y (Endothelin peptides in brain diseases. Rev Neurosci 7:177-186.1996).
- Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, Imura H, Shigemoto R, Kikuchi H (Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. Cancer Res 52:3972-3979.1992).
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J Comp Neurol 508:28-44.2008).
- Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. Nat Cell Biol 2:423-427.2000).
- Olson AL, Pessin JE (Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu Rev Nutr 16:235-256.1996).
- Orellana JA, Saez PJ, Shoji KF, Schalper KA, Palacios-Prado N, Velarde V, Giaume C, Bennett MV, Saez JC (Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-

- inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11:369-399.2009).
- Oudard S, Arvelo F, Miccoli L (High glycolysis in gliomas despite new hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss. *Br J Cancer* 74:839-845.1996a).
- Oudard S, Miccoli L, Guthauser B, Vassault A, Magdeléna H, Dutrillaux B, Poupon MF (Glycolytic profile in normal brain tissue and gliomas determined by a micro-method analysis. *Oncology Reports* 3:165-170.1996b).
- Oudard S, Poirson F, Miccoli L, Bourgeois Y, Vassault A, Poisson M, Magdelénat H, Dutrillaux B, Poupon MF (Mitochondria-bound hexokinase as target for therapy of malignant gliomas. *Int J Cancer* 62:216-222.1995).
- Ozbudak IH, Karaveli S, Simsek T, Erdogan G, Pestereli E (Neoangiogenesis and expression of hypoxia-inducible factor 1 α , vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 in endometrioid type endometrium adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 108:603-608.2008).
- Ozog MA, Siushansian R, Naus CC (Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:132-141.2002).
- Papahadjopoulos D (Cholesterol and cell membrane function: a hypothesis concerning the etiology of atherosclerosis. *J Theor Biol* 43:329-333.1974).
- Pardridge WM, Boado RJ (1993) Molecular cloning and gene expression of the blood-brain barrier glucose transporter. In: *The Blood-Brain Barrier*(Pardridge, W. M., ed), pp 395-440 New York: Raven Press.
- Parry DM, Pedersen PL (Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location. *J Biol Chem* 258:10904-10912.1983).
- Patel TR (Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cerebrovascular disease. *CNS Drugs* 5:293-310.1996).
- Pedersen PL (Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* 22:190-274.1978).
- Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH (Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 1555:14-20.2002).
- Pellerin L (Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 43:331-338.2003).
- Perea G, Araque A (GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63:93-102.2010).
- Philippi M, Vyklicky L, Orkand RK (Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia* 17:72-82.1996).

- Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T (Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 277:8648-8657.2002).
- Postic C, Shiota M, Magnuson MA (Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 56:195-217.2001).
- Preller A, Wilson JE (Localization of the Type-III Isozyme of Hexokinase at the Nuclear Periphery. *Arch Biochem Biophys* Archives of Biochemistry and Biophysics 294:482-492.1992).
- Reichert M, Muller T, Hunziker W (The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem* 275:9492-9500.2000).
- Rempel A, Bannasch P, Mayer D (Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages. *Biochim Biophys Acta* 1219:660-668.1994).
- Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C (Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 27:13781-13792.2007).
- Rose CR, Ransom BR (Gap junction equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia* 20:299-307.1997).
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-475.2002).
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551-1555.2008).
- Rubanyi GM, Polokoff MA (Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325-415.1994).
- Sáez JC, Spray DC, Hertzberg EL (Gap junctions: biochemical properties and functional regulation under physiological and toxicological conditions. *In Vitro Toxicol* 3:69-86.1990).
- Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H (Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int J Cancer* 93:317-323.2001).
- Salm AK, McCarthy KD (Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia. *Glia* 3:529-538.1990).
- Samih N, Hovsepian S, Aouani A, Lombardo D, Fayet G (Glut-1 translocation in FRTL-5 thyroid cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase and N-glycosylation. *Endocrinology* 141:4146-4155.2000).

- Samih N, Hovsepian S, Notel F, Prorok M, Zattara-Cannoni H, Mathieu S, Lombardo D, Fayet G, El-Battari A (The impact of N- and O-glycosylation on the functions of Glut-1 transporter in human thyroid anaplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1621:92-101.2003).
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.2004).
- Sanchez-Alvarez R, Paino T, Herrero-Gonzalez S, Medina JM, Tabernero A (Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. *Glia* 54:125-134.2006).
- Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Medina JM (Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication. *J Neurochem* 89:703-714.2004).
- Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Sanchez-Abarca LI, Orfao A, Giaume C, Medina JM (Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS Lett* 509:202-206.2001).
- Sasaki Y, Takimoto M, Oda K, Fruh T, Takai M, Okada T, Hori S (Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 68:2194-2200.1997).
- Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC (Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 3:199-208.2007).
- Schousboe A, Waagepetersen HS (Glial modulation of GABAergic and glutamate ergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem* 6:929-934.2006).
- Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP (Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41:5754-5764.2002).
- Schulte RJ, Sefton BM (Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* 42:9424-9430.2003).
- Segretain D, Falk MM (Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662:3-21.2004).
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.2006).
- Shepherd PR, Gibbs EM, Wesslau C, Gould GW, Kahn BB (Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* 41:1360-1365.1992).
- Shin JL, Solan JL, Lampe PD (The regulatory role of the C-terminal domain of connexin43. *Cell Commun Adhes* 8:271-275.2001).

- Shinohara Y, Ichihara J, Terada H (Remarkably enhanced expression of the type II hexokinase in rat hepatoma cell line AH130. *FEBS Lett* 291:55-57.1991).
- Shows TB, Eddy RL, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Nishi S, Bell GI (Localization of the human hexokinase-I gene (HX1) to chromosome 10q22. *Cytogenet Cell Genet* 51:1079.1989).
- Simonson MS, Dunn MJ (Endothelins: a family of regulatory peptides. State-of-the-art lecture. *Hypertension* 17:856-863.1991).
- Smith TA (Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* 57:170-178.2000).
- Soroceanu L, Manning T, Sontheimer H (Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33:107-117.2001).
- Spence AM, Muzi M, Graham MM, O'Sullivan F, Krohn KA, Link JM, Lewellen TK, Lewellen B, Freeman SD, Berger MS, Ojemann GA (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* 39:440-448.1998).
- Spray D, Burt J (Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 258:195-205.1990).
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR (Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54:758-773.2006).
- Stevens B (Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 16:278-288.2008).
- Stiles J, Ostrow P, Balos L, Greenberg S, Plunkett R, Grand W, Heffner R (Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta-1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:435-439.1997).
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) *Bioquímica*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Suarez E, Bach D, Cadefau J, Palacin M, Zorzano A, Guma A (A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J Biol Chem* 276:18257-18264.2001).
- Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, Paul DL (Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regul* 1:989-1002.1990).
- Taberner A, Giaume C, Medina JM (Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16:187-195.1996).
- Taberner A, Jimenez C, Velasco A, Giaume C, Medina JM (The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J Neurochem* 78:890-898.2001).

- Tabernero A, Sanchez-Alvarez R, Medina JM (Increased levels of cyclins D1 and D3 after inhibition of gap junctional communication in astrocytes. *J Neurochem* 96:973-982.2006).
- Takagi H, Tanihara H, Seino Y, Yoshimura N (Characterization of glucose transporter in cultured human retinal pigment epithelial cells: gene expression and effect of growth factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:170-177.1994).
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 19:4298-4309.2000).
- Teixeira A, Chaverot N, Strosberg A, Cazaubon S (Differential regulation of cyclin D1 and D3 expression in the control of astrocyte proliferation induced by endothelin-1. *J Neurochem* 74:1034-1040.2000).
- Thelen AP, Wilson JE (Complete amino acid sequence of the type II isozyme of rat hexokinase, deduced from the cloned cDNA: comparison with a hexokinase from novikoff ascites tumor. *Arch Biochem Biophys* 286:645-651.1991).
- Thorens B (Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 137:209-238.1992).
- Thorens B (Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 270:G541-553.1996).
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF (Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55:281-290.1988).
- Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, Hori M (c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276:1780-1788.2001).
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M (Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725-12731.1998).
- Trosko JE, Ruch RJ (Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 3:D208-236.1998).
- Tsai HJ, Wilson JE (Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal domains of the rat type I and type II isozymes. *Arch Biochem Biophys* 316:206-214.1995).
- Tsai HJ, Wilson JE (Functional organization of mammalian hexokinases: both N- and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites. *Arch Biochem Biophys* 329:17-23.1996).
- Tsai HJ, Wilson JE (Functional organization of mammalian hexokinases. Characterization of the rat type III isozyme and its chimeric forms, constructed with N- and C- terminal halves of the Type I and Type II isozymes. *Arch Biochem Biophys* 338:183-192.1997).

- Vandromme M, Gauthier-Rouviere C, Lamb N, Fernandez A (Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem Sci* 21:59-64.1996).
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21.1997).
- Vanslyke JK, Naus CC, Musil LS (Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins. *Mol Biol Cell* 20:2451-2463.2009).
- Vega-Agapito V, Almeida A, Hatzoglou M, Bolanos JP (Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system $\gamma(+)$ in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J Biol Chem* 277:29753-29759.2002).
- Velasco A, Tabernero A, Granda B, Medina JM (ATP-sensitive potassium channel regulates astrocytic gap junction permeability by a Ca^{2+} independent mechanism. *J Neurochem* 74:1249-1256.2000).
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C (Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376:590-594.1995).
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C (Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signalling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.1997).
- Vera B, Sánchez-Abarca LI, Bolaños JP, Medina JM (Inhibition of astrocyte gap junctional communication by ATP depletion is reversed by calcium sequestration. *FEBS Lett* 392:225-228.1996).
- Wang GL, Semenza GL (Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230-1237.1995).
- Warburg O (On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269-270.1956a).
- Warburg O (On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314.1956b).
- Whetton AD, Bazill GW, Dexter TM (Haemopoietic cell growth factor mediates cell survival via its action on glucose transport. *Embo J* 3:409-413.1984).
- Whetton AD, Bazill GW, Dexter TM (Stimulation of hexose uptake by haemopoietic cell growth factor occurs in WEHI-3B myelomonocytic leukaemia cells: a possible mechanism for loss of growth control. *J Cell Physiol* 123:73-78.1985).
- Wilson JE (Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 126:65-198.1995).
- Wilson JE (Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 206:2049-2057.2003).
- Wilson JE, Felgner PL (An inverse relation between mitochondrial hexokinase content and phosphoglucomutase activity of rat tissues. *Mol Cell Biochem* 18:39-47.1977).

- Wykoff CC, Sotiriou C, Cockman ME, Ratcliffe PJ, Maxwell P, Liu E, Harris AL (Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hypoxia-induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene. *Br J Cancer* 90:1235-1243.2004).
- Xu W, Harrison SC, Eck MJ (Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602.1997).
- Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H (Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 170:223-230.1990).
- Yamashita K, Kataoka Y, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Himeno A, Niwa M, Taniyama K (Involvement of glial endothelin/nitric oxide in delayed neuronal death of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 20:541-551.2000).
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322:411-415.1988).
- Yonekura Y, S. BR, Brill AB (Increased accumulation of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose in liver metastases from colon carcinoma. *J Nucl Med* 23.1982).
- Yoshimoto S, Ishizaki Y, Kurihara H, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaki T, Takakura K, Murota-S (Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 508: 283-285.1990).
- Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT (Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80:1046-1051.1997a).
- Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J (Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 56:1164-1167.1996).
- Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J (Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res* 17:2747-2750.1997b).
- Zander R, Vaupel P (Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv Exp Med Biol* 191:965-970.1985).
- Zhang WW, Badonic T, Hoog A, Jiang MH, Ma KC, Nie XJ, Olsson Y (Astrocytes in Alzheimer's disease express immunoreactivity to the vaso-constrictor endothelin-1. *J Neurol Sci* 122:90-96.1994).
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney J, Mattason MP (Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:378-388.1993).
- Zhou M, Vallega G, Kandror KV, Pilch PF (Insulin-mediated translocation of GLUT-4-containing vesicles is preserved in denervated muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1019-1026.2000).

Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CCG (Transfection of C6 glioma-cells with connexin-43 cDNA - analysis of expression, intercellular coupling, and cell-proliferation. Proc Natl Acad Sci USA 88:1883-1887.1991).

ENGLISH SUMMARY



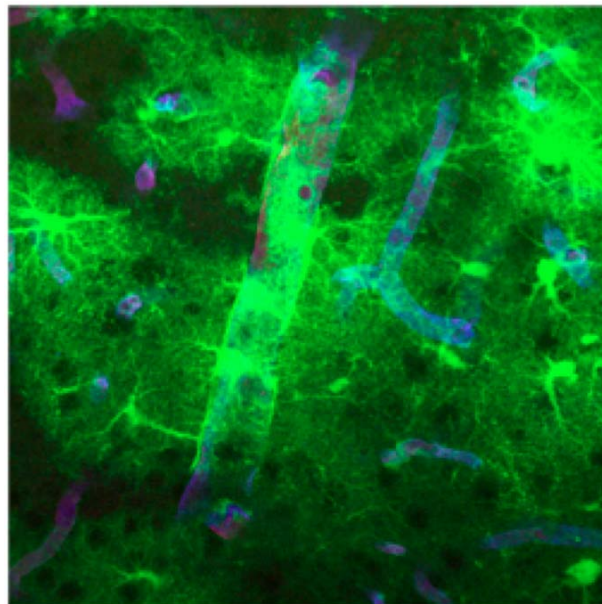
VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



THE CONNEXIN 43 AS MODULATOR
OF THE GLUCOSE UPTAKE IN
ASTROCYTES

José Carlos Valle Casuso

TESIS DOCTORAL

2010

1.- INTRODUCTION

1.1.- Central Nervous System and the Astrocytes

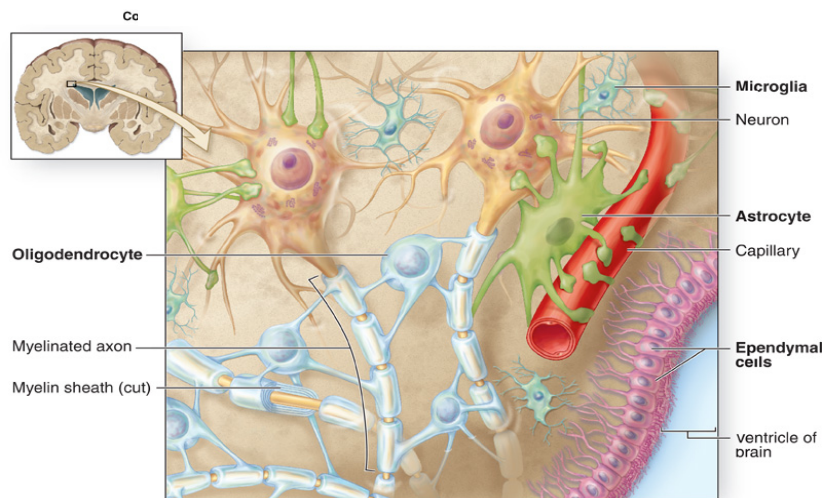
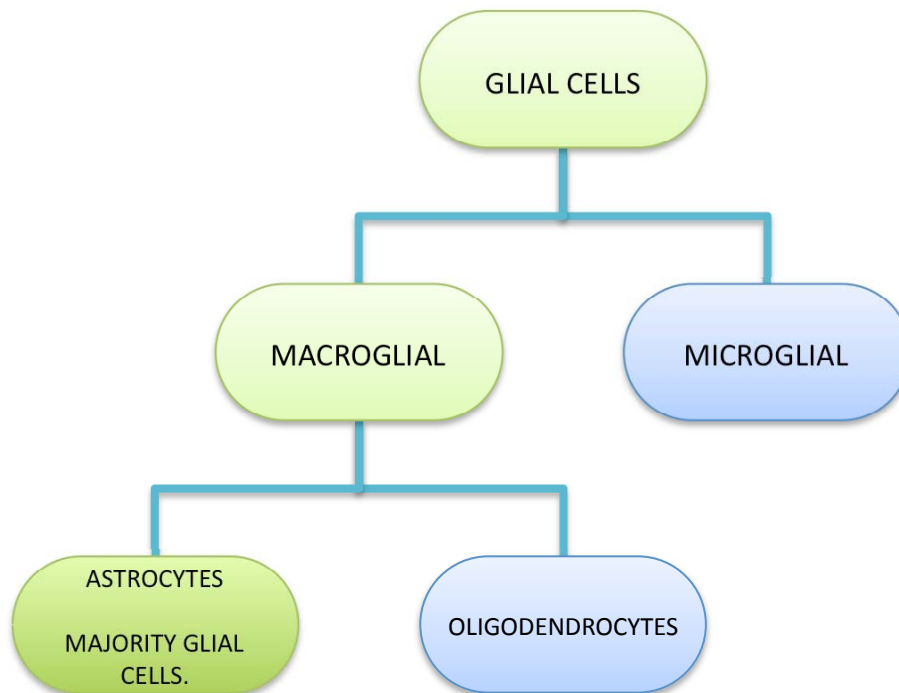


FIGURE 1.- Central Nervous System diagram.

In the Central Nervous System, (CNS), we found several type of cells. The most studied cells are Neurons and Astrocytes and in this work we will study the astrocytes.



Astrocytes are a sub-type of glial cells in the central nervous system. Star-shaped, their many processes envelope synapses made by neurons. Astrocytes are classically identified using histological analysis; many of these cells express the intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP).

1.2- The Astrocytes

Previously in medical science, the neuronal network was considered the only important one, and astrocytes were looked upon as gap fillers. More recently, the function of astrocytes has been reconsidered and are now thought to play a number of active roles in the brain.

- 1.- Neuronal differentiation [Kosodo, 2009, 251; Stevens, 2008, 278 ; Cina, 2009, 21].
- 2.- Support the homeostasis. [Orkand, 1996, 788; Mobbs, 1988, 235].
- 3.- Promotes the Blood Brain Barrier [Janzer, 1987, 253; Abbott, 2006, 41].
- 4.- Neurotransmitter recaptation [Seifert, 2006,194; Schousboe, 2006, 929].
- 5.- Neuromodulator Function [Araque, 2008, 3].
- 6.- Neuroprotection Function [Vega-Agapito, 2002, 29753].
- 7.- Support metabolic for the neurons [Medina, 1999, 361; Pellerin, 2003, 331 ; Rouach, 2008, 322].

Astrocytes have several functions, but to do these functions is required that the astrocytes are communicate between them.

1.3.- The Connexin 43 and the Gap Junctions

This mode of intercellular communications is based on membrane channels made by a family of multigenic proteins named connexins. Indeed, at the plasma membrane, Cxs are organized as hexamers (Connexons) forming a ring around a central pore, and when two connexons are face-to-face, they constitute an intercellular channel. These intercellular channels aggregate at areas of close apposition between cells and form junctional plaques called gap junctions.

In fact, connexin channels provide the structural basis for two types of intercellular communication: Gap junction channels, that allow direct cell-to-cell exchanges with a molecular weight up to 1-1.2 kDa

Hemichannel, connexons can also function as hemichannels, that enable, under well-defined conditions, the exchange of molecules and ions between the cytoplasm and the external medium and thus support autocrine and paracrine actions.

Gap junctions in astrocytes are mainly composed of the channel proteins connexin 43 (Cx43) and connexin 30, Cx43 being predominant [Nagy, 2003, 205]. Furthermore, Cx43 is known to be involved in cell proliferation, migration and differentiation of cells [Cheng, 2004, 203] and it has been shown to be involved in resistance to various types of cells.

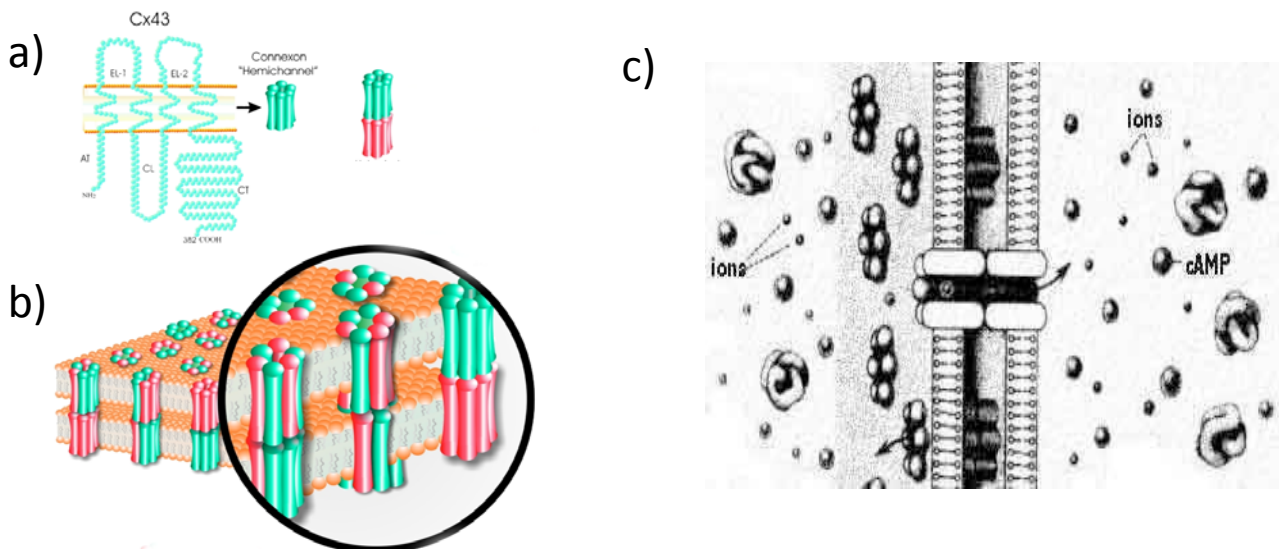


FIGURE 2.- Structure of gap junctions.

- a) Structure of Connexin 43
- b) Structure of Gap Junctions
- c) Gap Junctions permeability. (substances < 1.2 kDa)

1.4 Conformational changes in the Gap Junctions

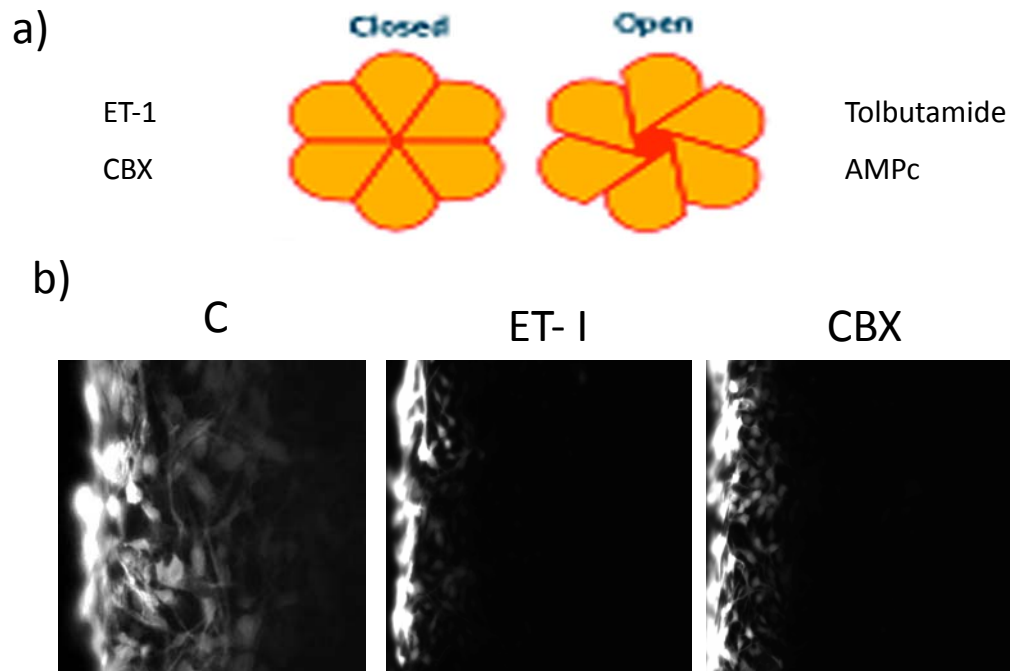


FIGURE 3.- The conformation of gap junctions can be modulated for different substances.

- a) Substances that modulate the gap junctions conformation.
- b) Permeability assay with different treatment, ET-1 and CBX in the astrocytes

We have talked about the structure of the gap junctions channel, and we know that these channels have a central pore that is used to interchange different substances. One property of these channels is that they can change the conformation and the channels can be open and closed. That means that these channels can be modified with different agents. To close the channels you can use endogenous substances, such as ET-1, NO, or exogenous substances, such as CBX. We also open the channel with other substances such as Tolbutamide or AMPc.

In the figure 3, we can see an example of this change of conformation and we can see how the ET-1 and CBX close the channel and inhibit the communications across the gap junctions for Lucifer Yellow.

In this moment, we know that the gap junctions channels can be modulated by different substances. But what happens with the astrocytic behaviour and with their functions when the channels are closed.

Previous studies in our laboratory indicate that the inhibition of this communication between astrocytes promotes an increase in glucose uptake and proliferation in astrocytes.

For all of that, in this work we will study the role of the inhibition of these channels over the changes that are promoted at the glucose uptake in the astrocytes.

1.5 The Gap Junctions inhibition increase the glucose uptake

To study the role of the inhibition of gap junctions over the glucose uptake in astrocytes, we start with an experiment that block the gap junctions. We treated the astrocytes with an treatment with endothelin-1 (ET-1) and carbenoxolone (CBX), during 24h and after we study the 2-deoxy-glucose uptake.

2-DEOXY-GLUCOSE UPTAKE

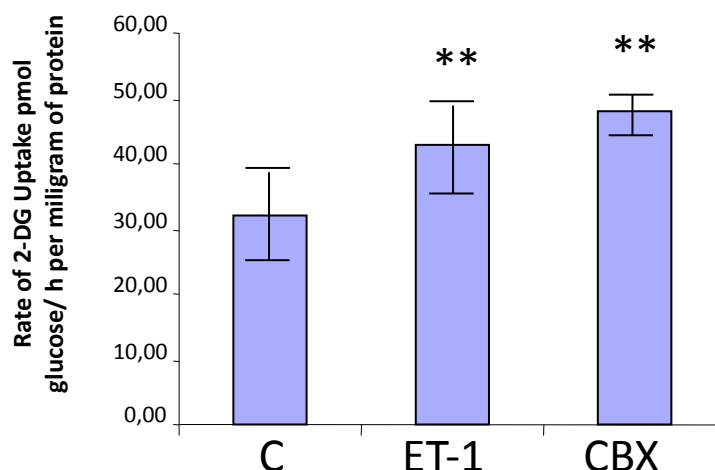


FIGURE 4.- 2-deoxy-glucose uptake in astrocytes treated with gap junctions inhibitors.

In the figure 4, our result shown that the glucose uptake is increase by the treatment on the astrocytes with substances that block of the gap junctions.

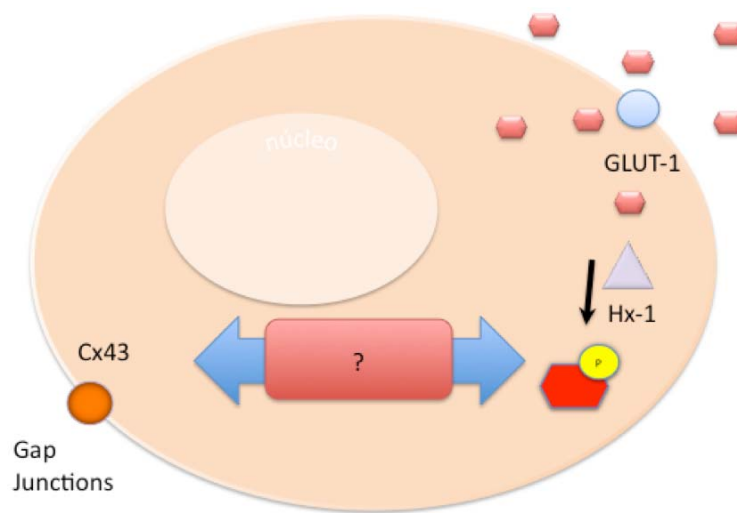
If we study this glucose uptake at the molecular level, this increase in glucose uptake is characterized by the induction of protein isoforms not normally expressed in astrocytes but being characteristic of highly proliferative cells, such as the glucose transporter GLUT-3 and Hx-2, the first enzyme involved in glucose metabolism, suggesting that these changes are specifically designed to increase glucose metabolism and allow a higher rate of astrocyte proliferation. Furthermore, previous result in our laboratory show that ET-1 promotes a rapid translocation of GLUT-1, the main glucose transporter in astrocytes, from an intercellular pool to the plasma membrane. In addition to this, the level of GLUT-1 is increased after 24h of treatment with ET-1 indicating that ET-1 is also triggering a long-term regulation of glucose transport. Besides, ET-1 promoted a rapid detachment of a significant proportion of Hx-1 from mitochondria. Also, is important to explain that this glucose is used by the astrocyte to support the proliferation process promoted by the gap junctions inhibitor.

With this background, we decided study the role of the connexin 43 as modulator of glucose uptake in astrocytes and the mechanism how modulates this response.

2.- OBJECTIVES

To study the role of the connexin 43 as modulator of glucose uptake in astrocytes, we suggest the next objectives.

- 1.- Study the expression of the proteins involved in the glucose uptake in the astrocytes, in a in “vivo model” that lack the connexin 43 expression.
- 2.- Study the expression of the proteins involved in the glucose uptake, after the lacked of connexin 43 in an culture of astrocytes promotes by the treatments with ET-1, CBX or Cx43-siRNA.
- 3.- Study the implication of HIF-1 α on the changes on the rate of glucose uptake, promotes by the lack of intercellular communication.
- 4.- Study the implication of c-Src on the changes on the rate of glucose uptake, promotes by the lack of intercellular communication.



3.- RESULTS

3.1 Study the expression of the protein involved in the glucose uptake in an “in vivo” model, that lack the Cx43

To study the expression of the proteins involved in the glucose uptake in the astrocytes, in a in “vivo model” that lack the connexin 43 expression.

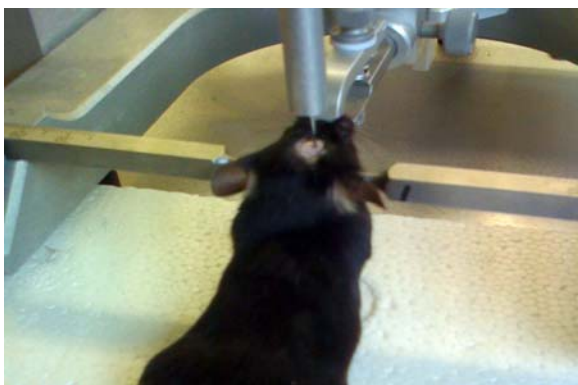
We used a mice model. This model consist in an stereotaxic injection in the mice cortex and inject different substances. We inject two substances. The PBS is used as a control of injury but if does not promote neuronal dead; an injection with Kaïnic acid promotes the neuronal dead and the lack of Cx43 in reactive astrocytes around the lesion, one week after the injury .

This mice model, was provided by the lab of Dr. Christian Giaume.

This model is a very good tool for study the proteins involved at the glucose uptake “in vivo”.

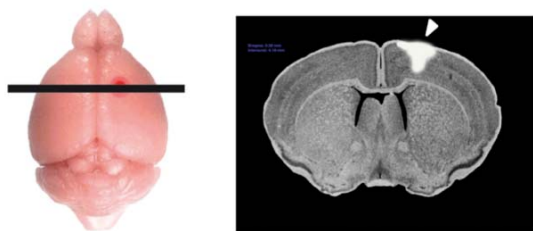
This model is a very good tool because you can promotes an injury in the cortex with PBS an not promotes changes at the Cx43 expression or promotes an injury in the cortex with kaïnic acid an promotes the lack of Cx43 at the reactive astrocytes in the lesion.

a)



- 1,5 - 2 mm Injection in the cortex.
- .- Perfusion 2 min of PBS or kaïnic acid.
- .- Waiting for a week, to carry out the experiment.

b)



- One week after the lesion.
 - Perfusion with PBS to study the Cx43 expression
 - Perfusion with PFA 4% to study GLUT-1, GLUT-3, Hx-2, GFP and NeuN.
- To study Cx43 we cut at criostat.
- To study the others proteins we cut at the microtom.

FIGURE 5.- “In vivo” model of neuronal injury.

- a) Stereotaxic injection.
- b) Lesion zone.

3.1.2 Study the lack of connexin 43 after the injection with kainic acid.

The experiments coming in the “in vivo” model studying the Cx43 expression after the injure with PBS or kaïníc acid.

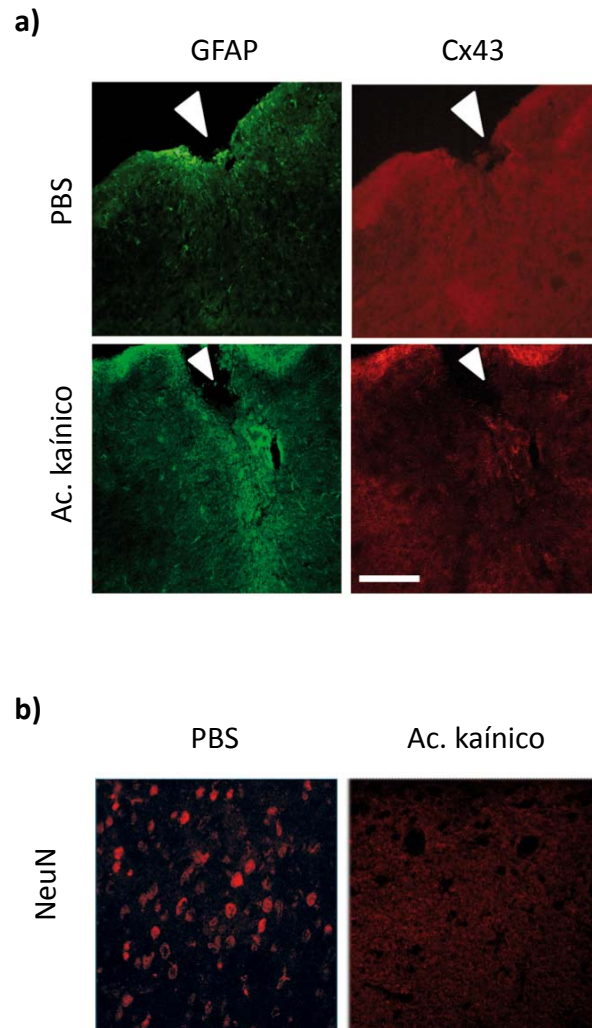


FIGURE 6.- Reactive gliosis and neuronal dead.

- a) Reactive gliosis and Cx43 expression
- b) Neuronal dead

At the figure 6, we can see that the injection with kaïníc acid promotes the lack of Cx43 at the lesion zone, and also promotes a great gliosis at the same zone. By other hand, the injection with PBS can't promotes the lack of Cx43 and the gliosis reactivity is less intensive.

Also, we can see at b) that the injection with kaïníc acid in the mice cortex promotes the neuronal dead at the lesion zone.

This results are very interesting, and show that this model is a great tool to study the proteins involves at the rate of glucose uptake in an “in vivo” model of lacked Cx43.

3.1.3 Study of ET-1 expression at the injury zone

In the introduction, we said that the gap junctions can be open or closed, and we shown substances that can close this channels, some of this are endogenous. One of these substances is ET-1.

The ET-1, is a neuropeptide that can be when there are any lesion or illness in the brain.

For all of that, is interesting study if in our experimental conditions at the “in vivo” model of injury, the ET-1 are expressed in the lesion zone.

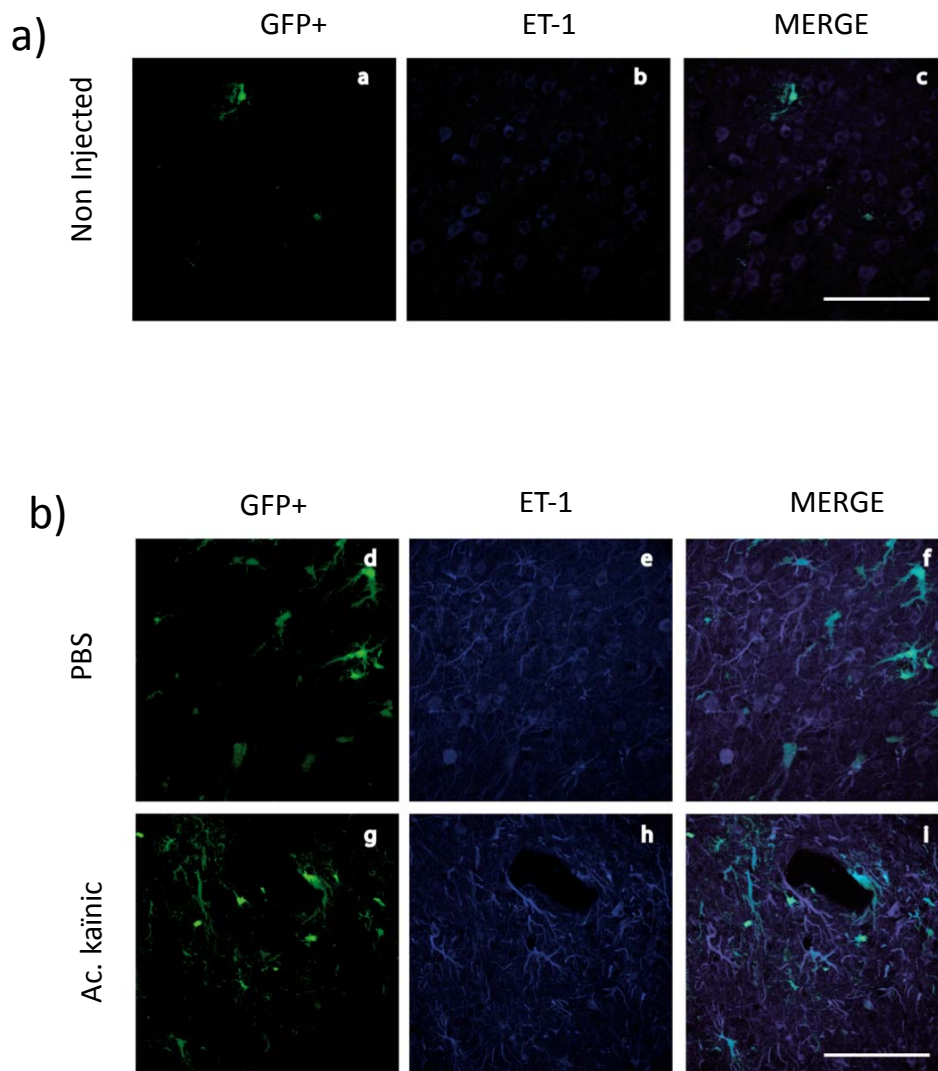


FIGURE 7.- ET-1 is expressed at the lesion zone.

- a) Contralateral hemisphere ET-1 expression
- b) Lesion hemisphere, ET-1 expression

in the figure 7, our result shown that ET-1 are present at the lesion zone after the injection with the kainic acid or PBS. But when we study the contralateral cortex, we can find that ET-1 is not present at the brain cortex.

This result is very interesting, because we have a model that have some similarity with our “in vitro” studies, when the gap junctions are closed with ET-1, the Cx43 expression decrease, the rate of 2-deoxy-glucose uptake increases and the proteins involved in this process increase their expression.

For all of that, our next objective is study the expression on the proteins involved on the glucose uptake such us GLUT-1, GLUT-3 and Hx-2 by immunohistochemistry in this “in vivo” model.

3.1.4 Proteins involved at the glucose uptake

3.1.4.1 GLUT-1

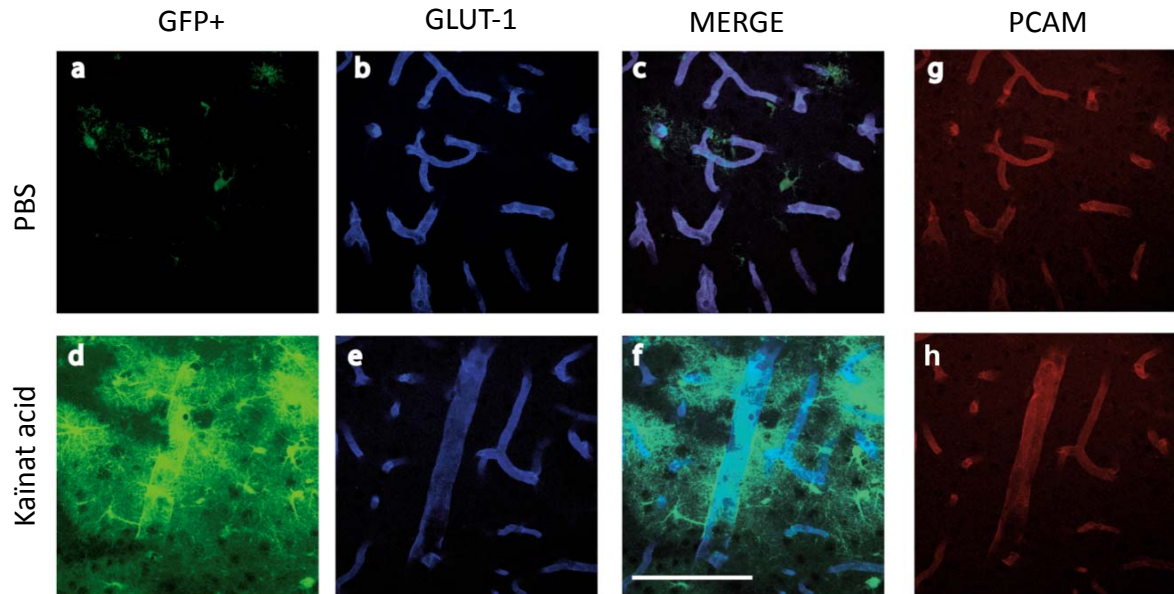


FIGURE 8.- GLUT-1 not change his expression after the injection with kaïnic acid.

In the figure 8, Our result shown that GLUT-1 not change his expression after the injection with kaïnic acid, but also after the injection with PBS. After this result we think that GLUT-1 is not the glucose transporter that promotes the glucose uptake at the “in vivo” model when the Cx43 is lacked.

For all of that, we want to know what happens with GLUT-3 expression after the injection with kaïnic acid or PBS, because this glucose transporter is induced by treatment with ET-1 in our culture cell.

3.1.4.2 GLUT-3

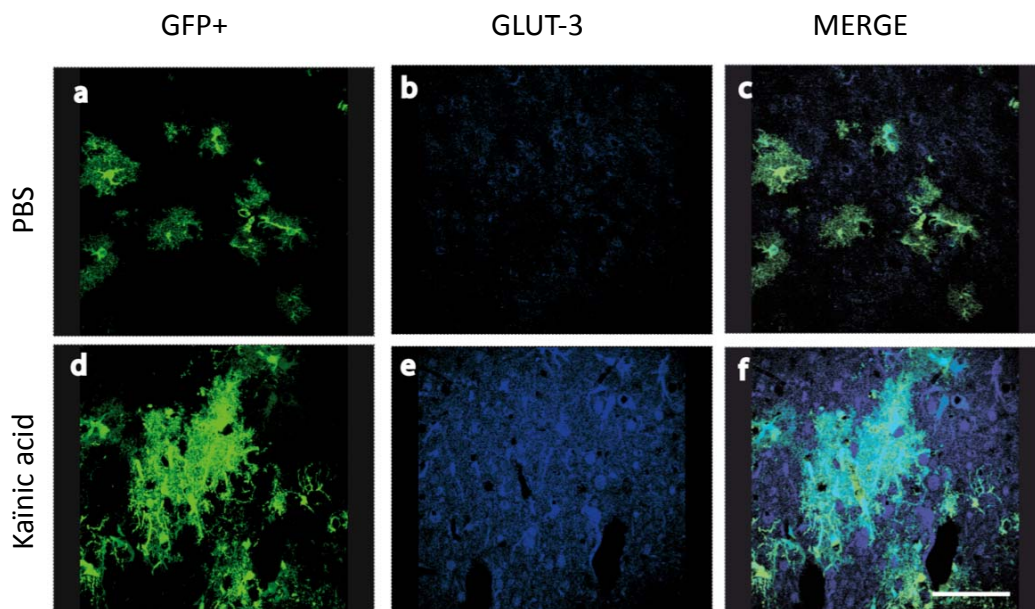


FIGURE 9.- GLUT-3 increase his expression after the injection with kaïnic acid in the lesion zone.

In the figure 9, our results shown that GLUT-3, increases the expression after the kaïnic acid injection, at the lesion zone, but the injection with PBS can not increase this glucose transporter.

This result is interesting because, GLUT-3 only increase his levels after the injection with kaïnic acid, and this is the model that lacked the Cx43. For all of that this result suggest that the lack of Cx43 in this model can promotes the upregulation of GLUT-3 in the lesion zone.

It the last experiment our results suggest, that GLUT-3 increase his levels after the injection with kaïnic acid, but now we want to know the type of cells that increase the GLUT-3 expression. To know this, we did an immunohistochemistry with NeuN, that is an neuronal marker, GLUT-3 and GFP+.

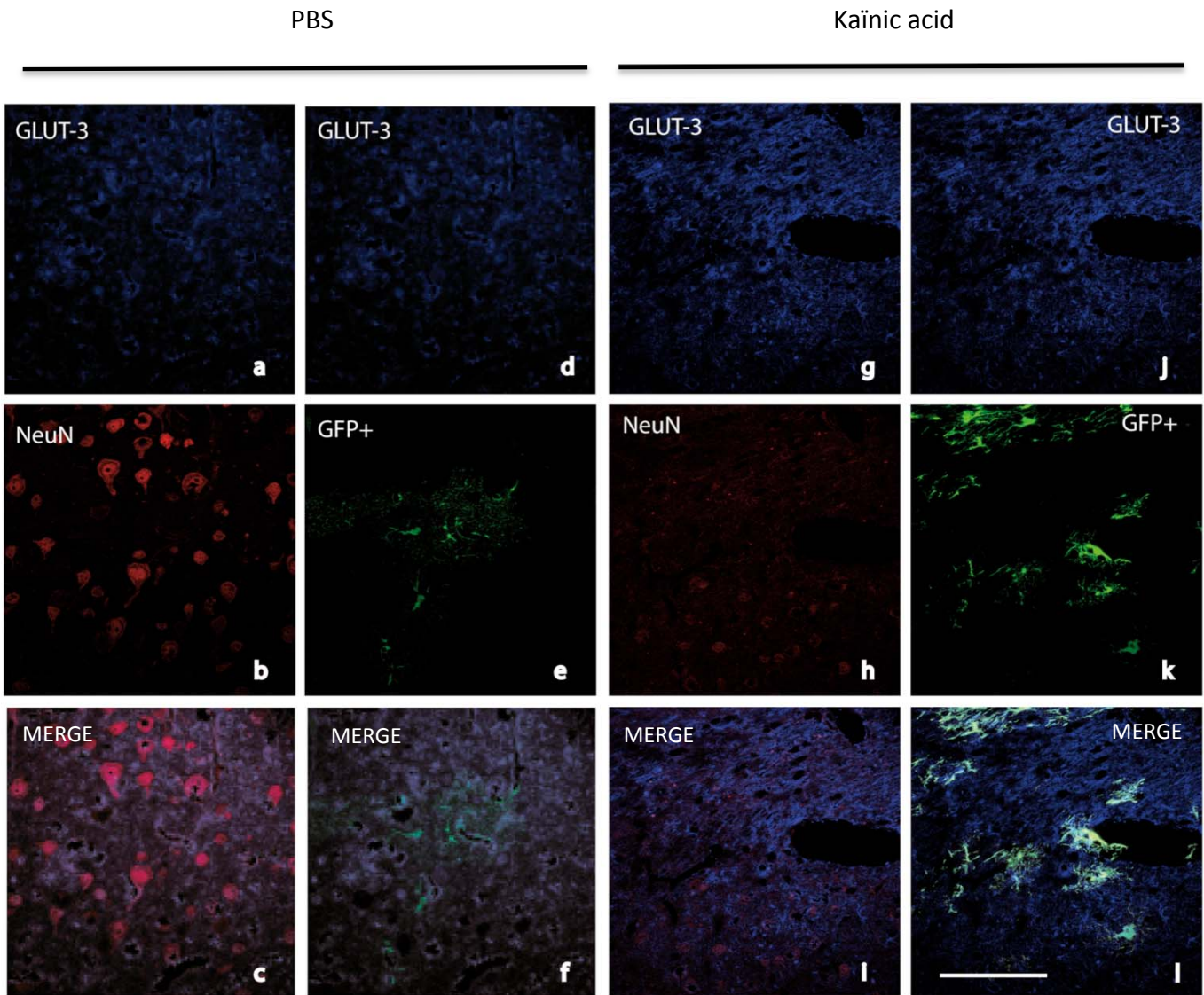


FIGURE 10.- GLUT-3 increase his expression in astrocytes after the injection with kaïnic acid.

In the figure 9, our result suggest, that the greater increase of GLUT-3 when we inject with kaïnic acid was found in the astrocytes, and this result relates the lack of Cx43 in the astrocytes with the increase of the expression of GLUT-3. In other conditions when we inject PBS, GLUT-3 have a little expression at the neurons, but not in the astrocytes.

3.1.4.3 HEXOKINASE-2

At this moment we know that GLUT-3, can increase his expression in the astrocytes after the injection with kainic acid. With this glucose transporter present in the astrocyte probably the astrocyte can uptake more glucose. We talked that this glucose can be used to help in the proliferation of the astrocytes and the glucose to continue the way to the proliferation need to be phosphorylated. But this glucose, need to be phosphorylated.

For all of that we want to know what happened with hexokinases at the reactive astrocytes.

The Hx-2 is not present in the astrocytes, but after a stimulus can be expressed. In cell culture one of this stimulus is the treatment with ET-1 and we want to know if in this model the Cx43 downregulation promotes the expression of Hx-2.

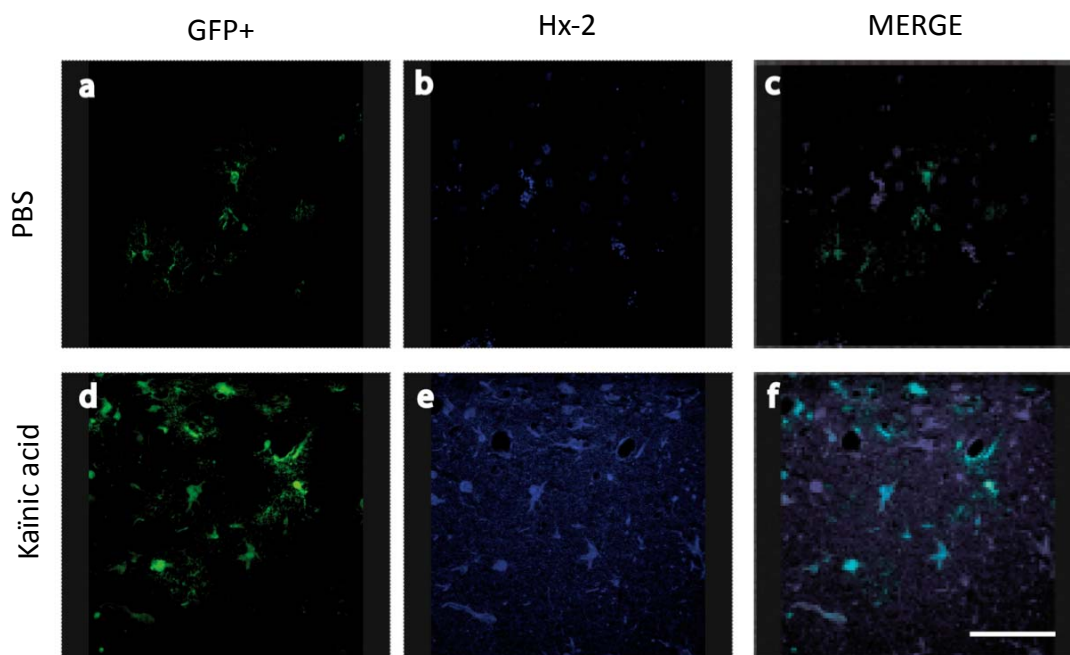


FIGURE 12.- Hx-2 increase his expression after the injection with kainic acid in the lesion zone.

In the picture, we can see that Hx-2, increase the expression after the kainic acid injection, at the lesion zone, but the injection with PBS can increase this level. This result is interesting because, the Hx-2 only increase his levels after the injection with kainic acid that is the model that lacked the Cx43.

In the figure 12, our results shown that Hx-2, increases the expression after the kainic acid injection, at the lesion zone, but the injection with PBS can not increase this glucose transporter.

This result is interesting because, Hx-2 only increase his levels after the injection with kainic acid, and this is the model that lacked the Cx43. For all of that this result suggest that the lack of Cx43 in this model can promotes the upregulation of Hx-2 in the lesion zone.

It the last experiment our results suggest, that Hx-2 increase his levels after the injection with kaïnic acid, but now we want to know the type of cells that increase the Hx-2 expression. To know this, we did an immunohistochemistry with NeuN, that is an neuronal marker, Hx-2 and GFP+.

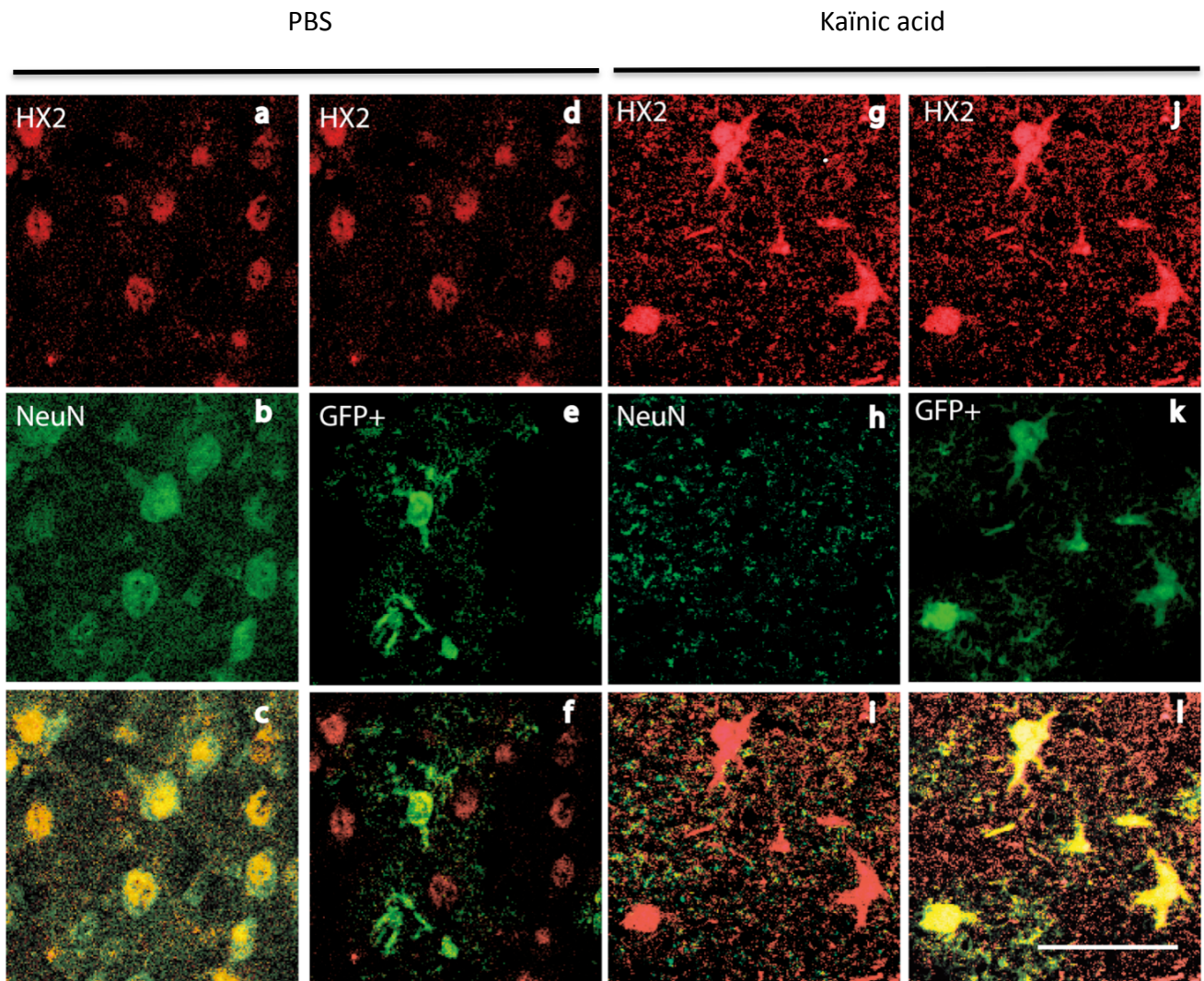


FIGURE 13.- Hx-2 increase his expression in astrocytes after the injection with kaïnic acid.

In the figure 13, our result suggest, that the greater increase of Hx-2 when we inject with kaïnic acid was found in the astrocytes, and this result relates the lack of Cx43 in the astrocytes with the increase of the expression of Hx-2. In other conditions when we inject PBS, Hx-2 have a little expression at the neurons, but not in the astrocytes.

3.2 study the expression of the proteins involved in the glucose uptake, after the lacked of connexin 43 in an culture of astrocytes promotes by the treatments with ET-1, CBX or Cx43-siRNA

Our first experiment is downregulate the Cx43 expression by siRNA technology.

3.2.1 Silencing Connexin 43

To study, the silencing of Cx43 by siRNA we used the next protocol.

21 days after the culture, the astrocytes, were transfected by complex Cx43-siRNA-lipofectamin or NT-siRNA-lipofectamin, after that at 8h we remove the medium and put a medium with antibiotics. 72h after transfection, remove the medium and extract the proteins to do a Western Blot.

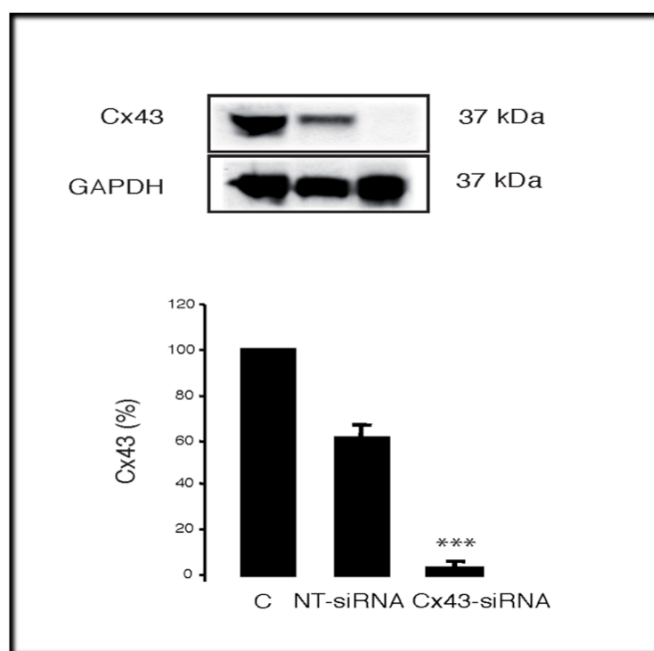


FIGURE 14.- Silencing Cx43 in a primary culture of astrocytes

In the figure 14, our result suggest that, that the connexin 43 is downregulated by the siRNA Cx43

In this grafic we have 3 groups of samples.

The first one, is a group of samples similar a previous to those previous studied.

The second group were transfected with a NT-siRNA (siRNA without target gene).

The third group were transfected with a siRNA Cx43.

Actually we know that the siRNA technology can decrease the expression of Cx43, but we want to study what happens with the gap junction permeability. To study this functionality, we did a permeability study with Lucifer yellow that is a substance that can diffuse through the gap junctions and show us the level of connection between the astrocytes.

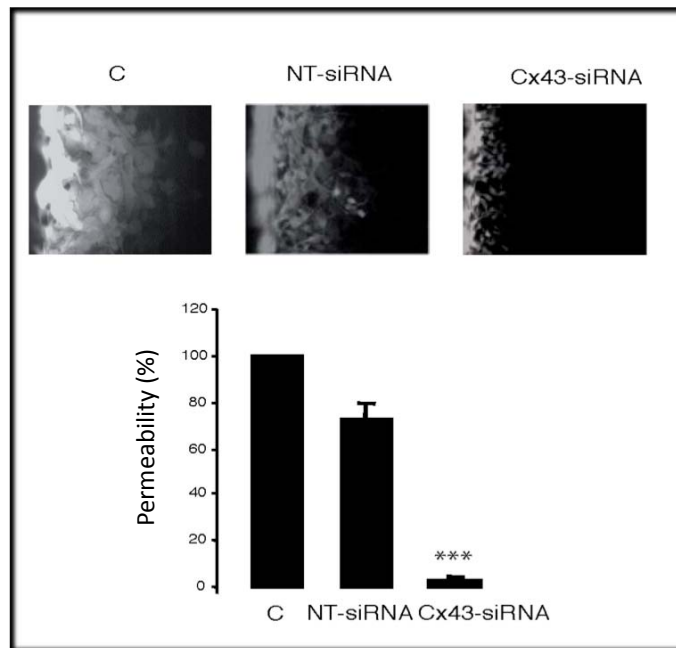


FIGURE 15.- The Cx43 silencing in a primary culture of astrocytes, decrease the astrocytes permeability.

In the figure 15, our result suggest that the lack of Cx43 after transfection with cx43-siRNA, promotes a great decrease at the permeability of the astrocytes. This result show us that the Cx43 is necessary for good connexion between the astrocytes.

3.2.2 Effect of the ET-1 and CBX on the connexin 43 expression and gap junctions permeability in the Cx43-silenced astrocytes

In our previous studies, when the channels are closed, there are some important changes in the glucose metabolism in astrocytes. Before use the Cx43-siRNA technology we used some substances that can close the gap junctions channels such us ET-1 or CBX. For all of that, we want to know if the lack of Cx43 by siRNA induces changes in the effect that the ET-1 or CBX promotes in the astrocytes.

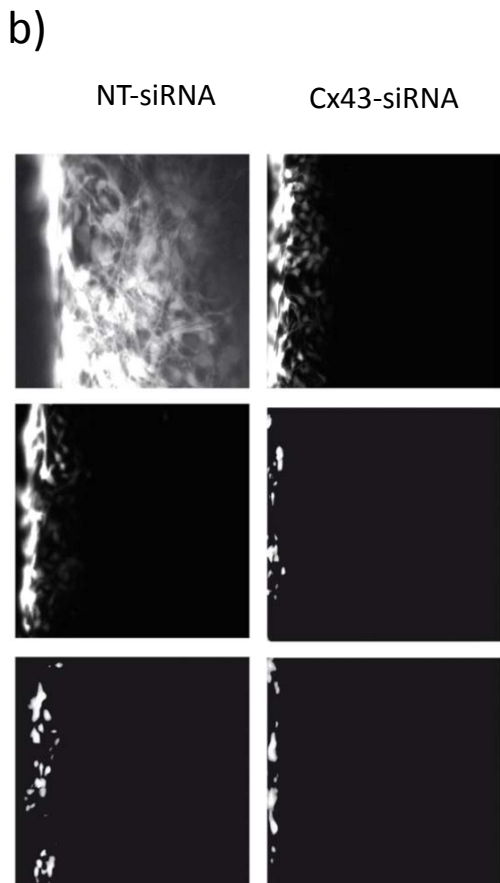
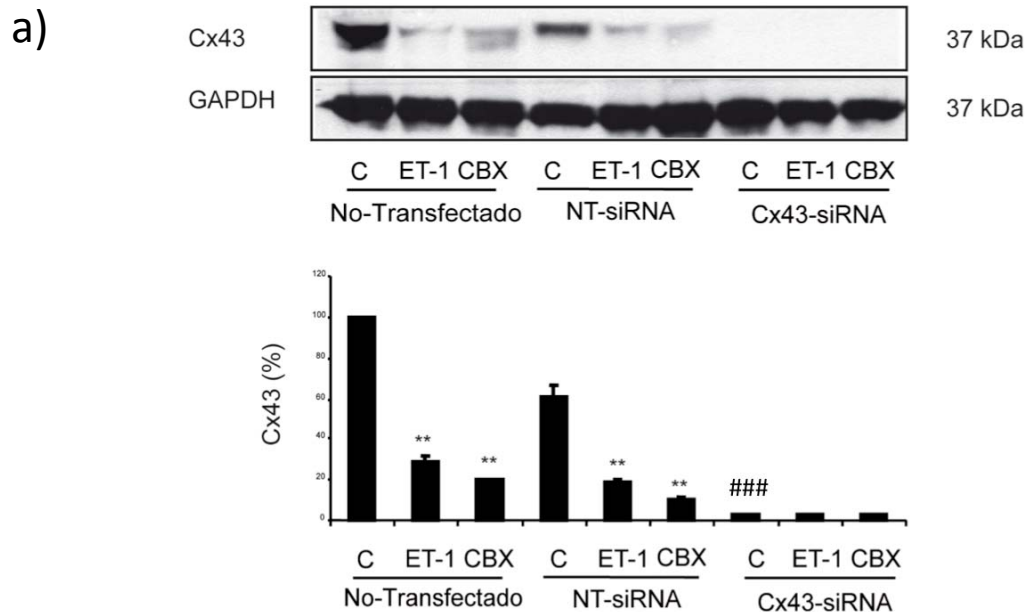


FIGURE 16.- Effect of the ET-1 or CBX over the gap junctions permeability in astrocytes with the Cx43 silenced.

In this figure, a) Our result shown three groups of samples. The Non-transfected group, the NT-siRNA group and the Cx43-siRNA group.

The results showed that the astrocytes with the Cx43 silenced, have a high downregulation and the treatment with ET-1 or CBX can decrease more this expression of Cx43. Although, at the other groups the treatment with ET-1 or the CBX decrease the Cx43 expression.

On the other hand in the part b) our result show that the Cx43 downregulation decrease the level of permeability between the astrocytes.

This result is interesting because, probably this downregulation at the communication promotes changes at the rate of glucose uptake. For all of that, we want to know if the lack of Cx43 by siRNA promotes changes in the glucose uptake.

3.2.3 Effect of the ET-1 and CBX on the glucose uptake in the Cx43-silenced astrocytes

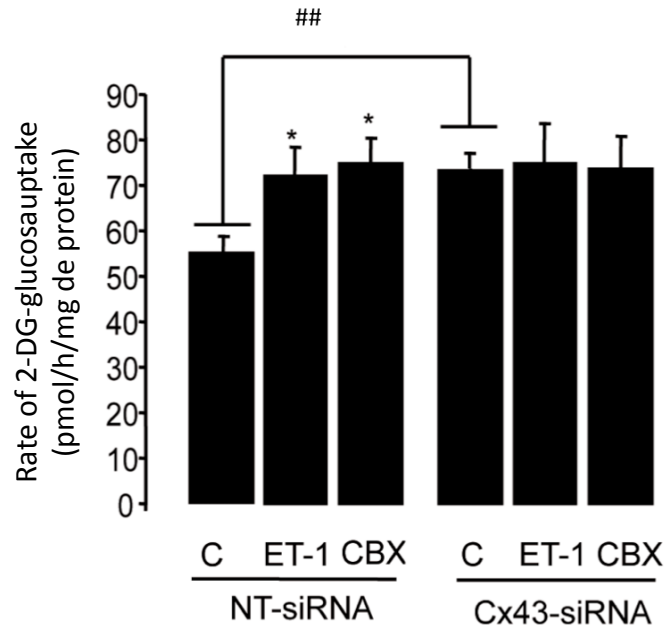


FIGURE 17.- Effect of the ET-1 or CBX over the glucose uptake in astrocytes with the Cx43 silenced.

In the figure 17, our result shown two groups of samples. The NT-siRNA group and the Cx43-siRNA group.

The results showed that the astrocytes with the Cx43 silenced, have a significant increase on the rate of glucose uptake. on the other hand, our result also show that in the astrocytes with Cx43, the treatments with ET-1 or CBX can increase the rate of glucose uptake, but these treatment can increase the rate of glucose uptake more that the effect promotes by the lack of Cx43 by siRNA.

This result is important because it suggests that ET-1 and CBX need the Cx43 to increase the rate of 2-deoxy-glucose uptake.

Actually, we kwon that the lack of Cx43 by siRNA in astrocytes promotes the increase of the rate of glucose uptake, but we think that is interesting to know what happend with the expression of the proteins involved in the glucose uptake, when the Cx43 are silenced in the astrocytes and the cells are treated with the inhibitor of gap junctions.

3.2.1 Effect of the ET-1 and CBX on the expression of proteins involved at the glucose uptake in the Cx43-silenced astrocytes

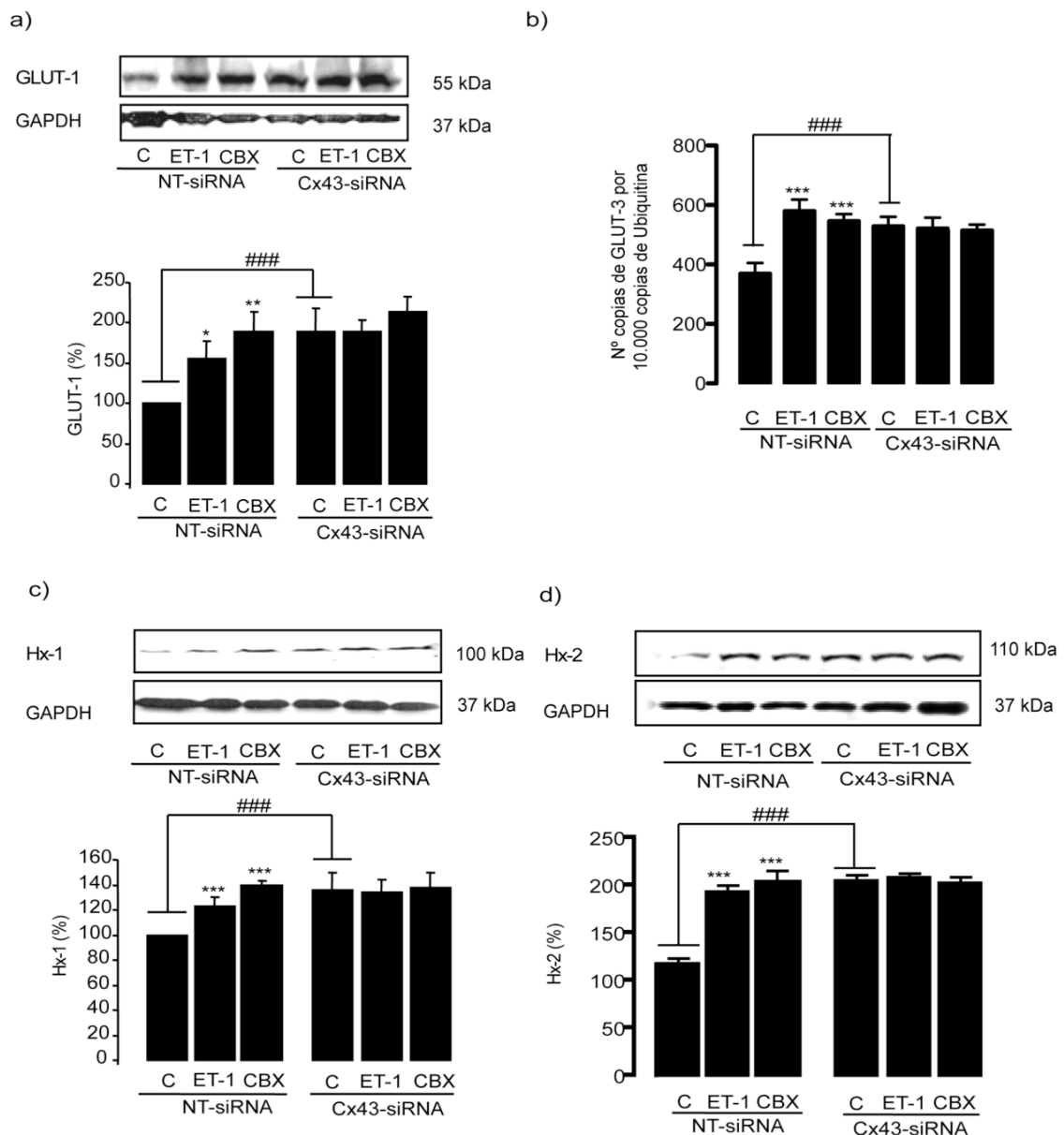


FIGURE 18.- Effect of the ET-1 or CBX over the expression of the proteins involved on the glucose uptake, in astrocytes with the Cx43 silenced.

In the figure 18, our result shown two groups.

In the first group treated with NT-siRNA we can see how the ET-1 and CBX promotes an increase the GLUT-1, Hx-1 and Hx-2 expression and GLUT-3 mRNA expression.

In the second group treated with Cx43-siRNA we can see that the ET-1 and the CBX can not increase the GLUT-1, Hx-1 and Hx-2 expression and GLUT-3 mRNA expression, more than the effect promoted by the lack of Cx43 by siRNA.

These result suggests that ET-1 and CBX need the Cx43 to increase the protein expression.

3.3 Study the implication of HIF-1 α on the changes on the rate of glucose uptake, promotes by the lack of intercellular communication.

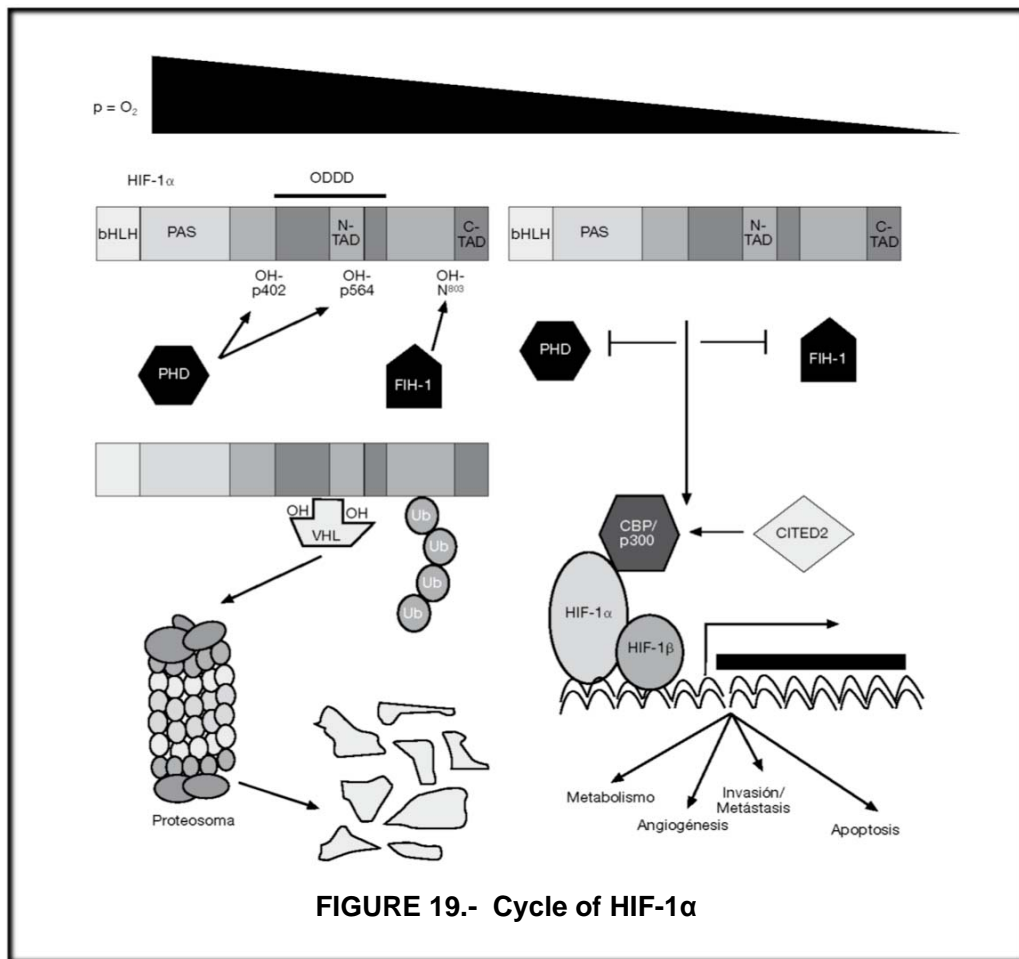
To study the implication of HIF-1 α on the changes on the rate of glucose uptake, promotes by the lack of intercellular communication.

3.3.1 HIF-1 α .

HIF-1 α is an transcription factor inducible for hypoxia.

HIF-1 α is the transcription factor for several proteins related with the glucose metabolism and some of these proteins are GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2.

Normally HIF-1 α is induced when the cells are in an hypoxic situation, but this transcription factor can be activated by other pathways in a normoxic conditions.



3.3 Effect of the connexin 43 silencing over the expression of HIF-1 α in astrocytes

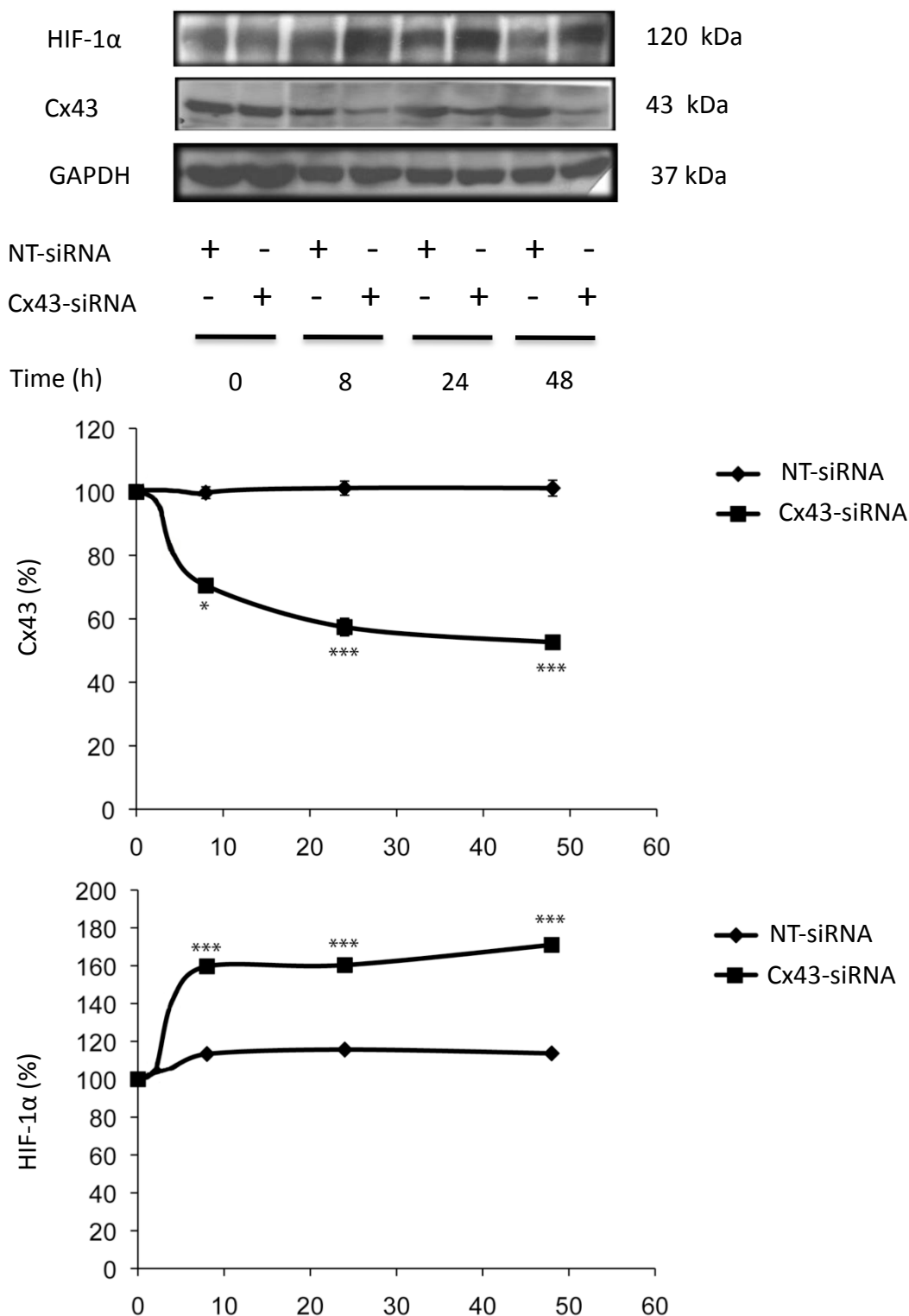


FIGURE 19.- Effect of the Cx43 silencing over the expression of HIF-1 α in astrocytes.

In the figure 19, our result show a time-course, after the treatment with the Cx43-siRNA. This result shown that the cx43 is decrease by action of the treatment with cx43-siRNA and this decrease promotes and increase of HIF-1 α at the astrocytes.

3.3.3 Effect of the ET-1 treatment in the expression of HIF-1 α in astrocytes

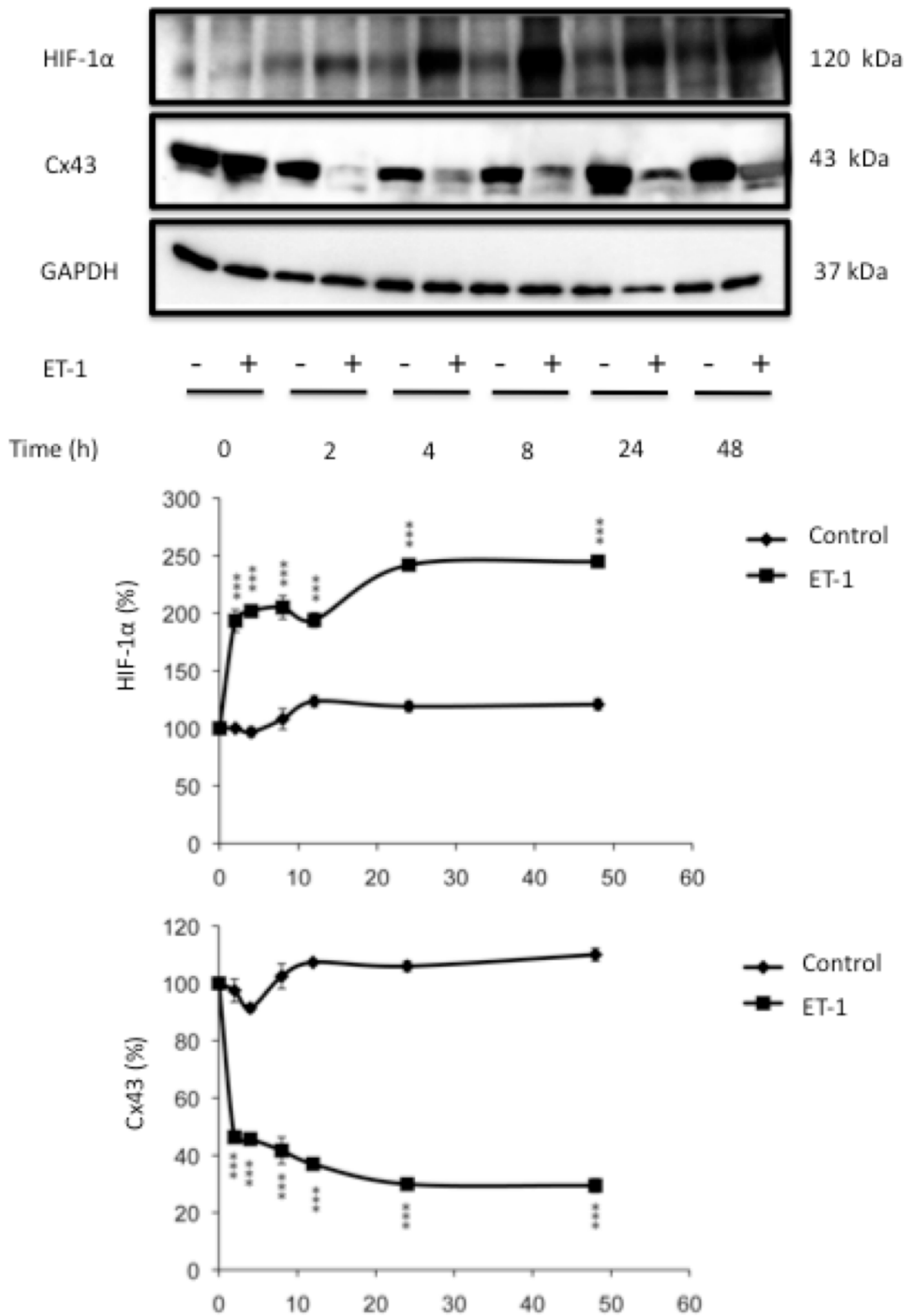


FIGURE 20.- Effect of the ET-1 treatment over the expression of HIF-1 α in astrocytes.

In the figure 20, our result shown that the cx43 is decreased by treatment with ET-1 and this decrease promotes an increase of HIF-1 α at astrocytes.

These results shown an upregulation of HIF-1 α when the Cx43 is downregulated, this is very interesting, because, HIF-1 α is a transcription factor for GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2 and this upregulation can promotes an increase of expression of the glucose transporter or the hexokinases at the astrocytes.

For all of that, we want to study the relationship between Cx43, HIF-1 α and the glucose uptake, silencing HIF-1 α by siRNA.

3.3 Silencing HIF-1 α

To silence HIF-1 α by siRNA, we used three different sequences, and we used the same protocol that when we silenced the Cx43.

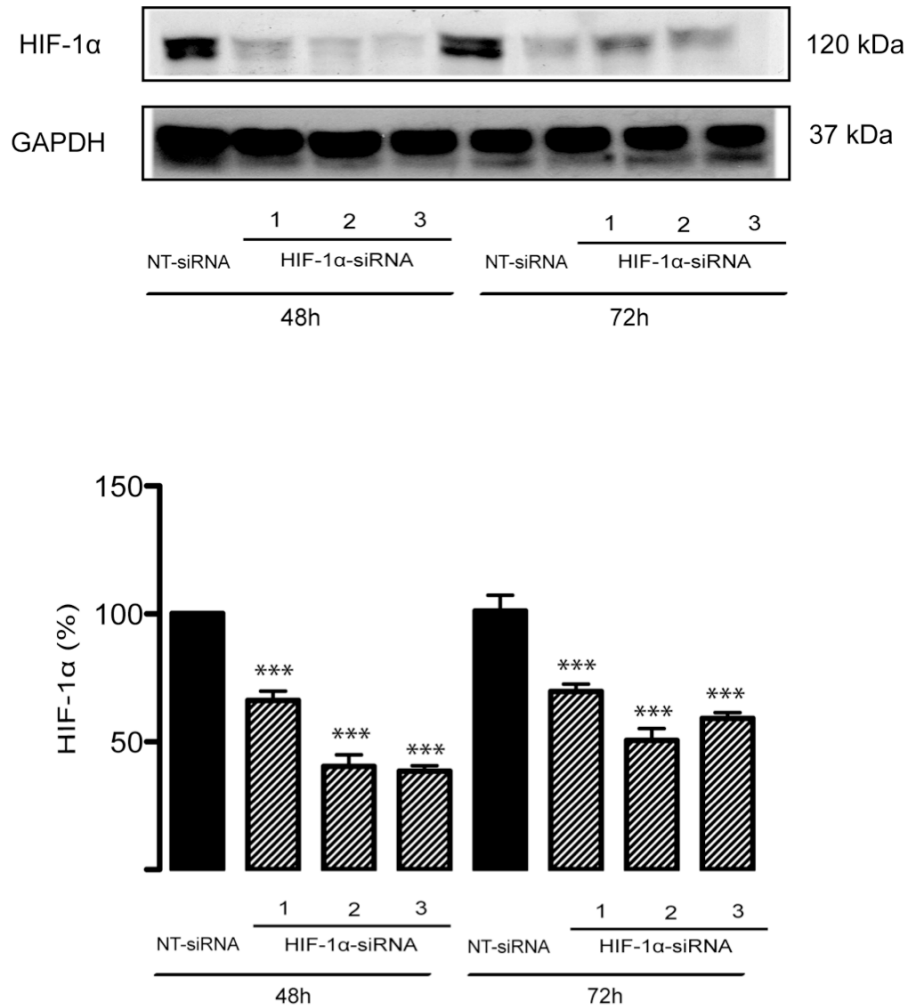


FIGURE 21.- Effect of the ET-1 treatment over the expression of HIF-1 α in astrocytes.

In the figure 21, we can see, two groups of samples. The first group show the expression of HIF-1 α 48h after the HIF-1 α -siRNA treatment and the second group show the expression of HIF-1 α 72h after the HIF-1 α -siRNA treatment.

Our result show that the best time to apply the treatments are at 48h after transfection and the best sequence to silence HIF-1 α is the sequence 3.

3.3.5 Effect of the ET-1 treatment over the HIF-1^a expression on the HIF-1z-Silenced astrocytes.

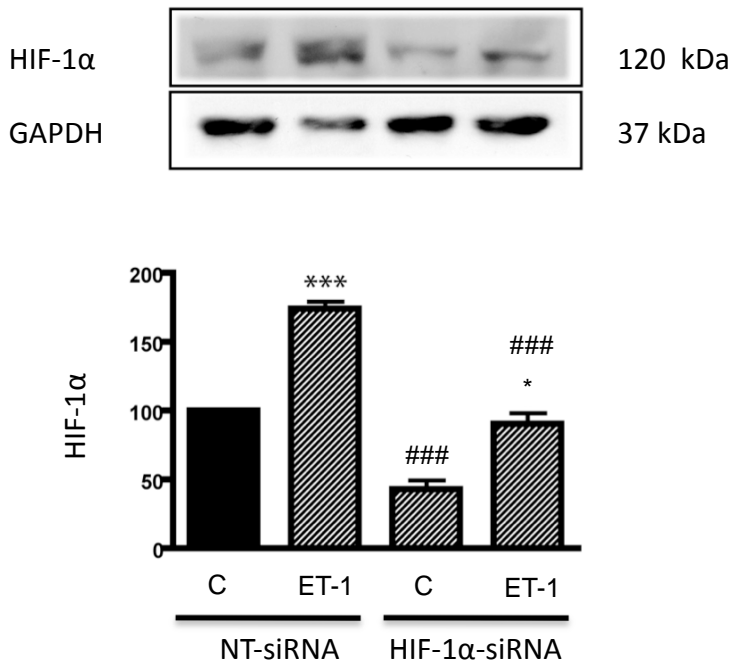


FIGURE 22.- Effect of the ET-1 treatment over the HIF-1^a expression on the HIF-1^z silenced astrocytes.

In the figure 22, we can see 2 groups. In the NT-siRNA group, you can see how the ET-1 can increase the expression level of HIF-1^a. In the second group treated with HIF-1^a-siRNA, we can see that the HIF-1^a decreases the expression and it's downregulation promote that the ET-1 can't increase the levels of HIF-1^a.

These result are interesting because, if there is not an increase of the transcription factor, probably these is not an increase of the proteins involved in the glucose uptake.

3.3.6 Effect of the ET-1 treatment over the glucose uptake in HIF-1z-Silenced astrocytes.

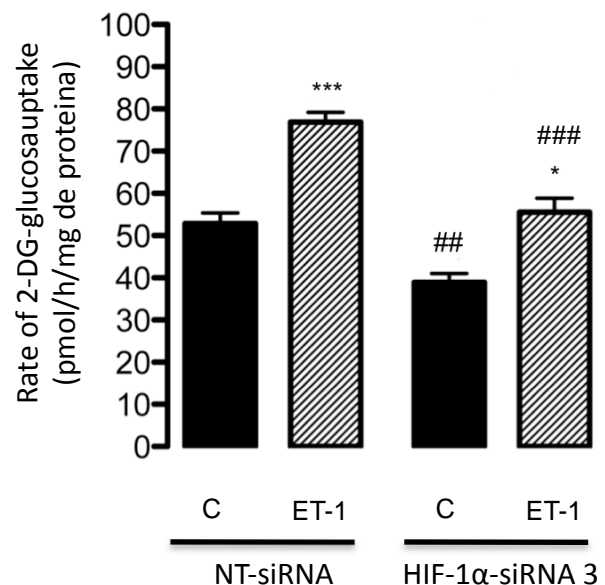


FIGURE 23.- Effect of the ET-1 treatment over the rate of glucose uptake on the HIF-1^z silenced astrocytes.

In the figure 23, you can see 2 groups. In the NT-siRNA group, we can see how ET-1 increases the rate of 2-deoxy-glucose uptake. In the second group, we can see that the HIF-1^a-siRNA decrease the rate of 2-deoxy-glucose uptake. The expression of HIF-1^a, and it's downregulation promote an increase at rate of 2-deoxy-glucose uptake

These results are interesting because, if there is not increase of the transcription factor, probably there is not an increase at the proteins involved at the glucose uptake.

3.3.5 Effect of the ET-1 treatment over the expression of the proteins involved on the glucose uptake in HIF-1^a)Silenced astrocytes.

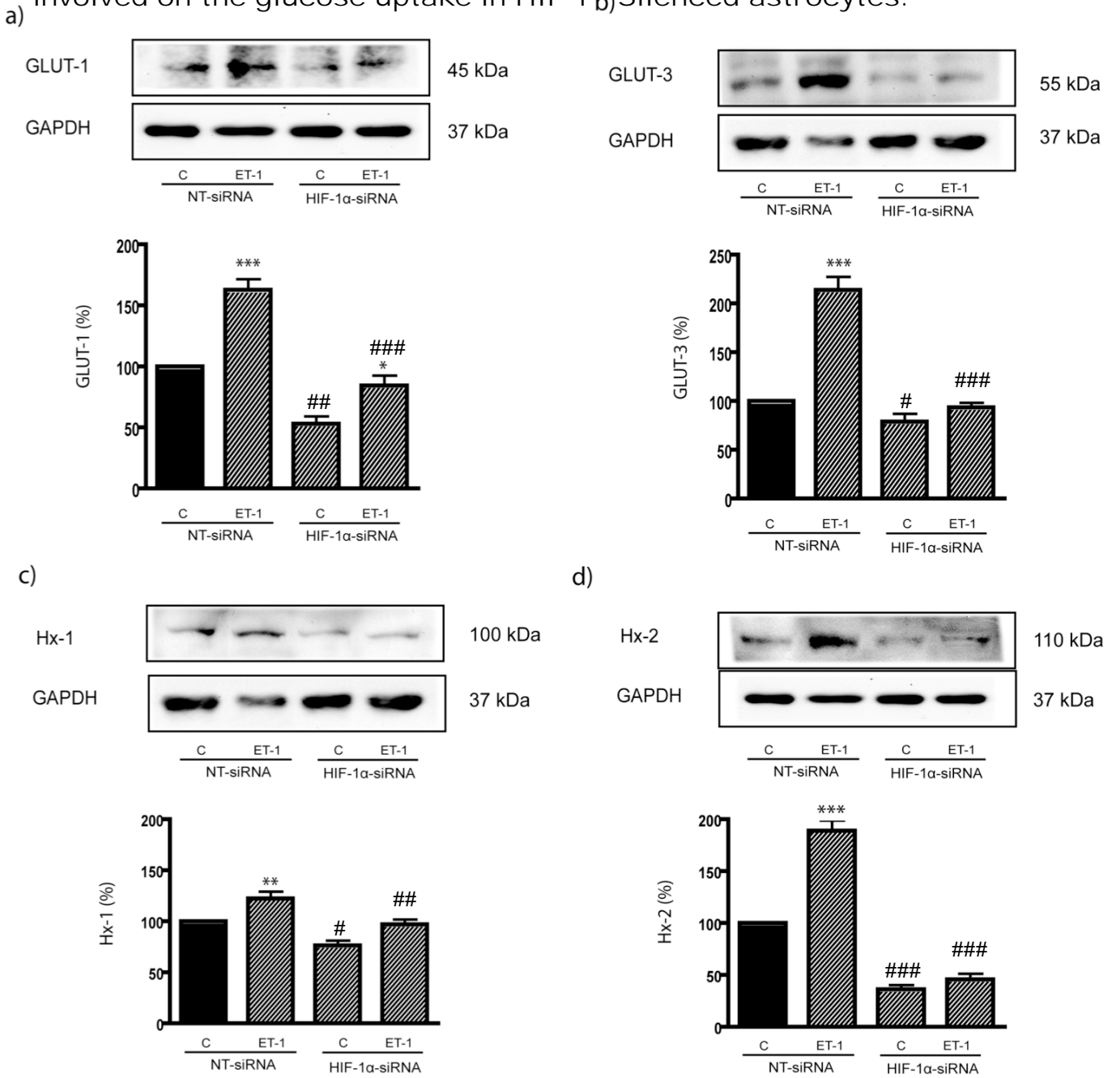


FIGURE 24.- Effect of the ET-1 over the expression of the proteins involved on the glucose uptake, in astrocytes with HIF-1 α silenced.

In the figure 24, our result shown two groups.

In the first group treated with NT-siRNA we can see how the ET-1 promotes an increase the GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2 expression.

In the second group treated with Cx43-siRNA we can see that the ET-1 can not increase the GLUT-1, GLUT-3 Hx-1 and Hx-2 expression.

These result suggests that ET-1 need the HIF-1 α to increase the expression of the proteins involved on the glucose uptake.

3.4 Study the implication of c-Src on the changes on the rate of glucose uptake, promotes by the lack of intercellular communication. We need know something about c-Src

c-Src is an oncogen.

c-Src can be interaction with Cx43 and regulate the gap junctions channels. Recent studies in our laboratory also suggest that the Cx43 can be modulated the activity of c-Src.

c-Src can activate HIF-1 α in a normoxic conditions. This property is very interesting because can include this oncogen in the mechanism that regulates the rate of glucose uptake by the Cx43 in astrocytes.

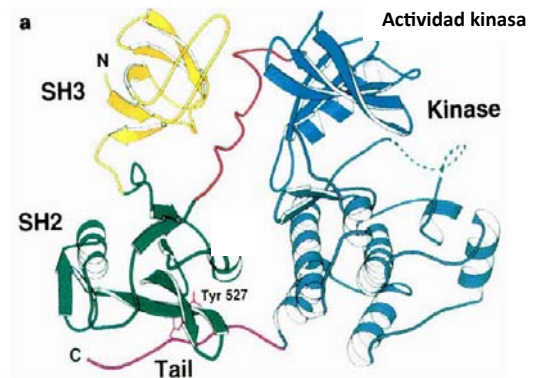


FIGURE 25.- Structure of c-Src

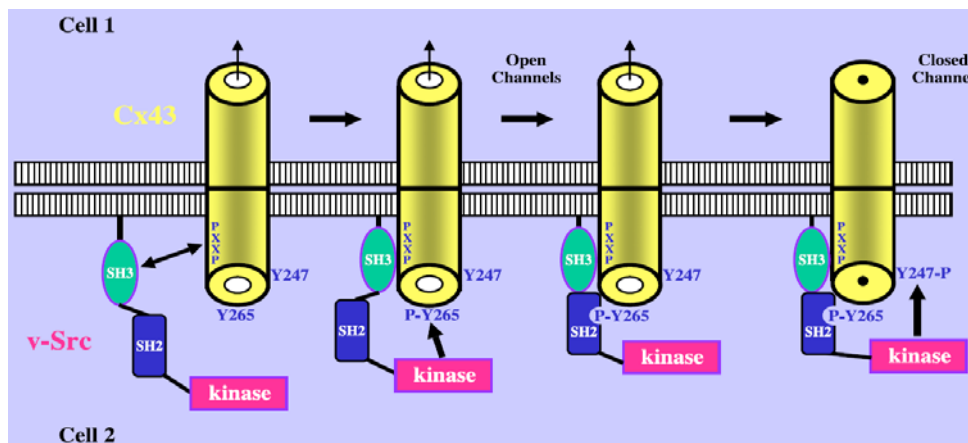


FIGURE 26.- Relationship between the c-Src and Cx43.

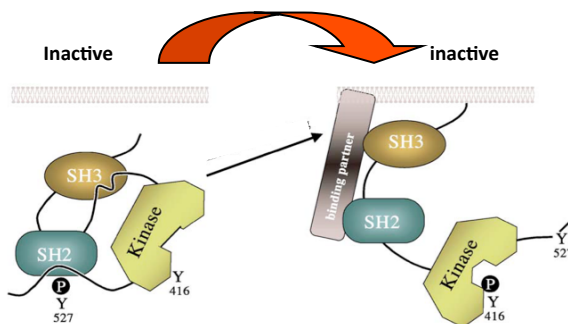


FIGURE 27.- The two conformation for c-Src.

3.4.1 Study of the c-Src activation in Cx43-Silenced astrocytes

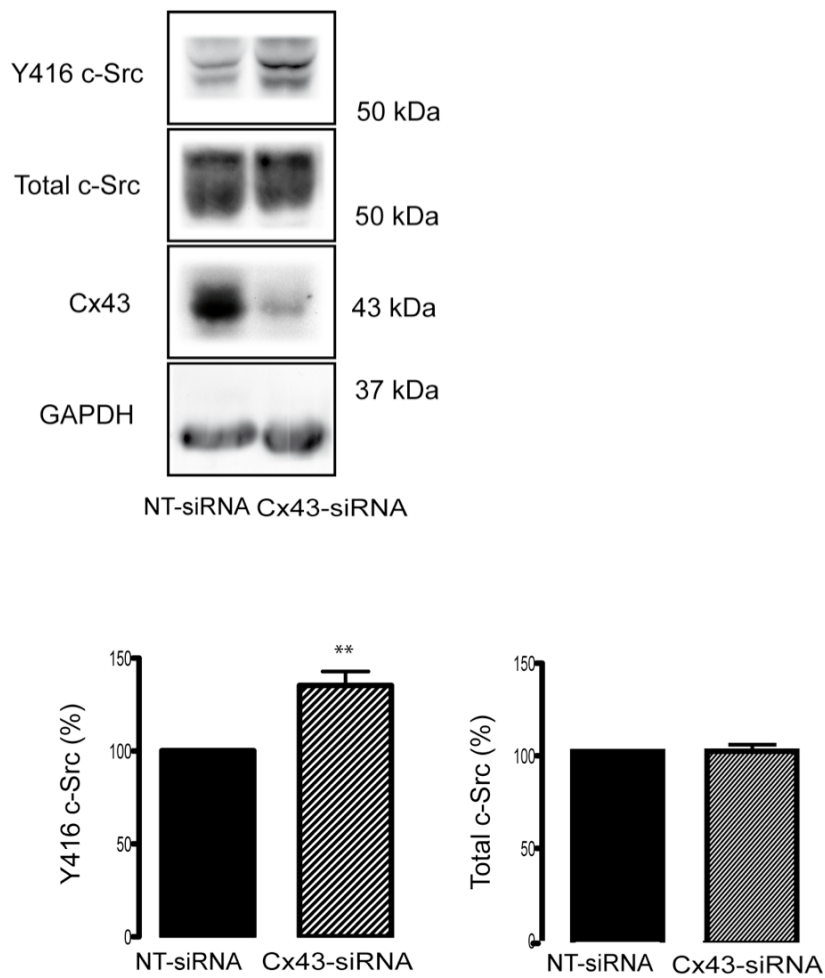


FIGURE 28 .- Effect of connexin 43 silenced astrocytes on c-Src activation

c-Src activation is induced by Cx43 silencing. On the other hand the total c-Src does not change during the NT-siRNA transfection.

3.4.2 Effect of ET-1 on the c-Src activation in astrocytes

After studying the effect silencing Cx43 on astrocytes, we decided to study the effect on c-Src activity upon the ET-1 treatment. .

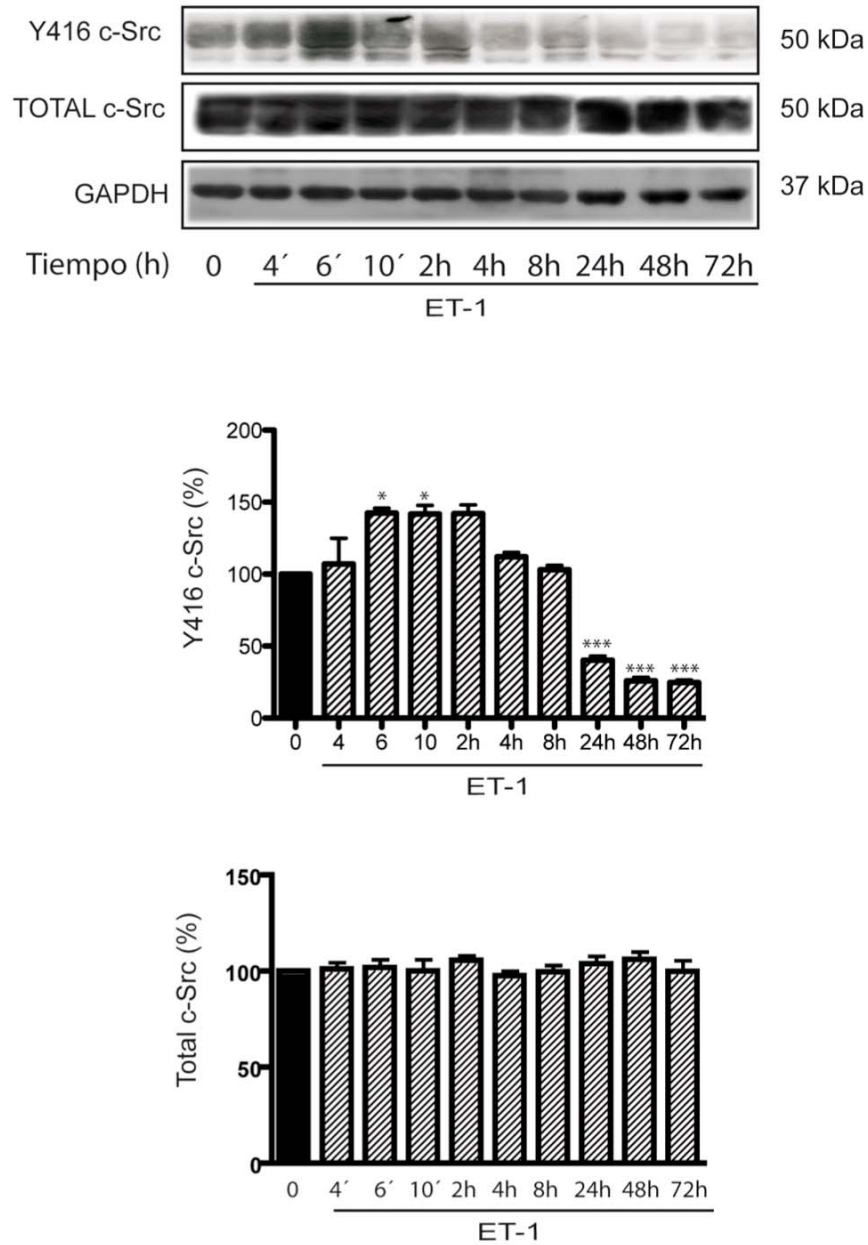


FIGURE 29 .- Effect of ET-1 on the c-Src activation in astrocytes

Our results indicates that c-Src activity is promoted by ET-1 on the astrocytes.

This result suggests that Cx43 expression of Cx43 can modify c-Src activity on astrocytes.

3.4.3 Effect of ET-1 on c-Src activation upon PP2 treatment

As silencing Cx43 in astrocytes promotes the c-Src activation, we studied c-Src activity in astrocytes treated with ET-1

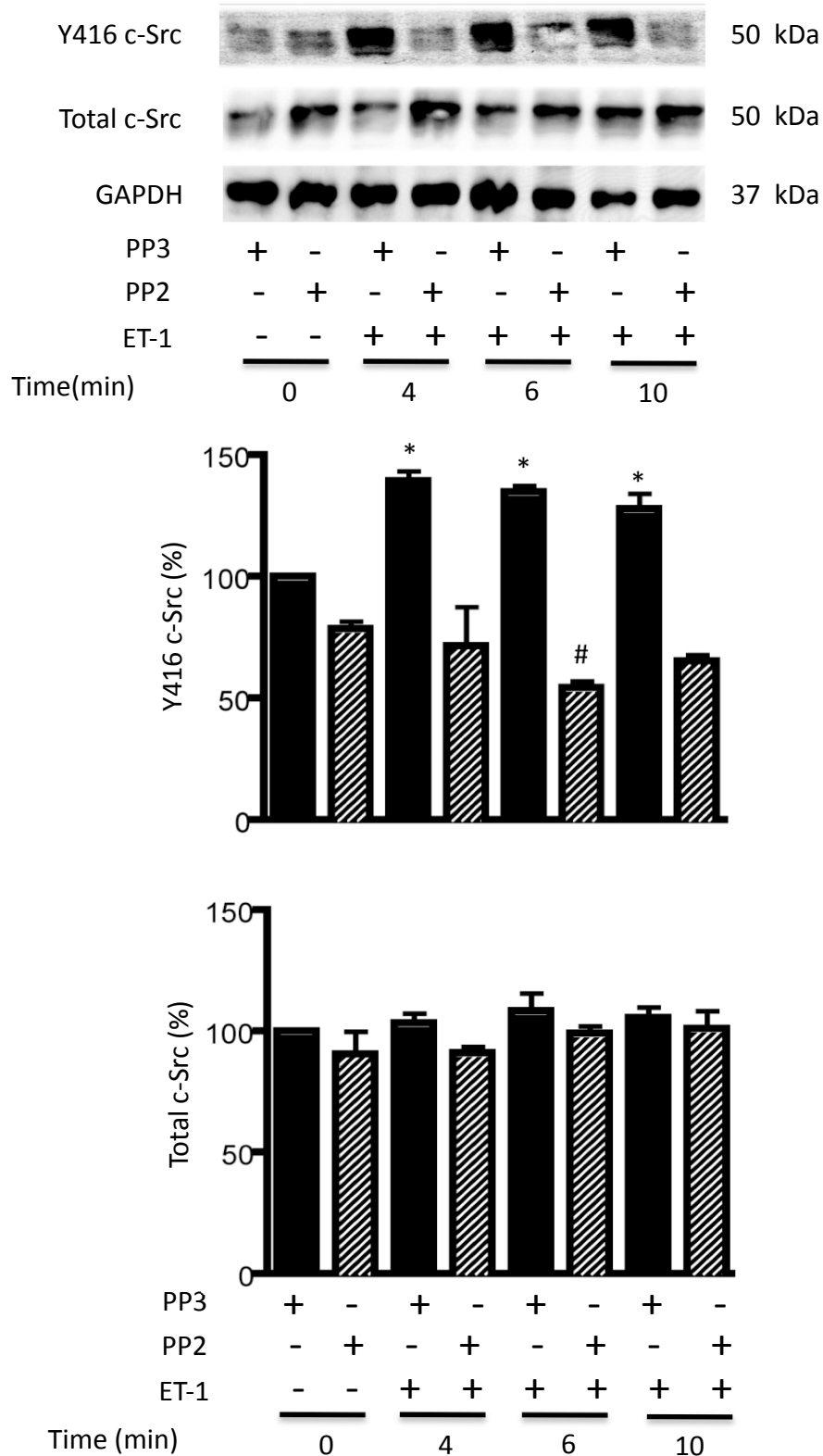


FIGURE 30 .- Effect of ET-1 on c-Src activation upon PP2 treatment.

Astrocytes were treated with PP2 (a c-Src inhibitor) or PP3 (a placebo treatment). ET-1 was not able to increased the c-Src activity upon the treatment of PP2 corroborating that c-Src activity is promoted by ET-1 in astrocytes.

3.4.4 Effect of ET-1 on HIF-1^a expression upon c-Src inhibition in astrocytes

After studying the effect of ET-1 in c-Src upon PP2 treatment, we wanted to know how the c-Src inhibition affects HIF 1 α , a transcription factor for proteins involved in the glucose.

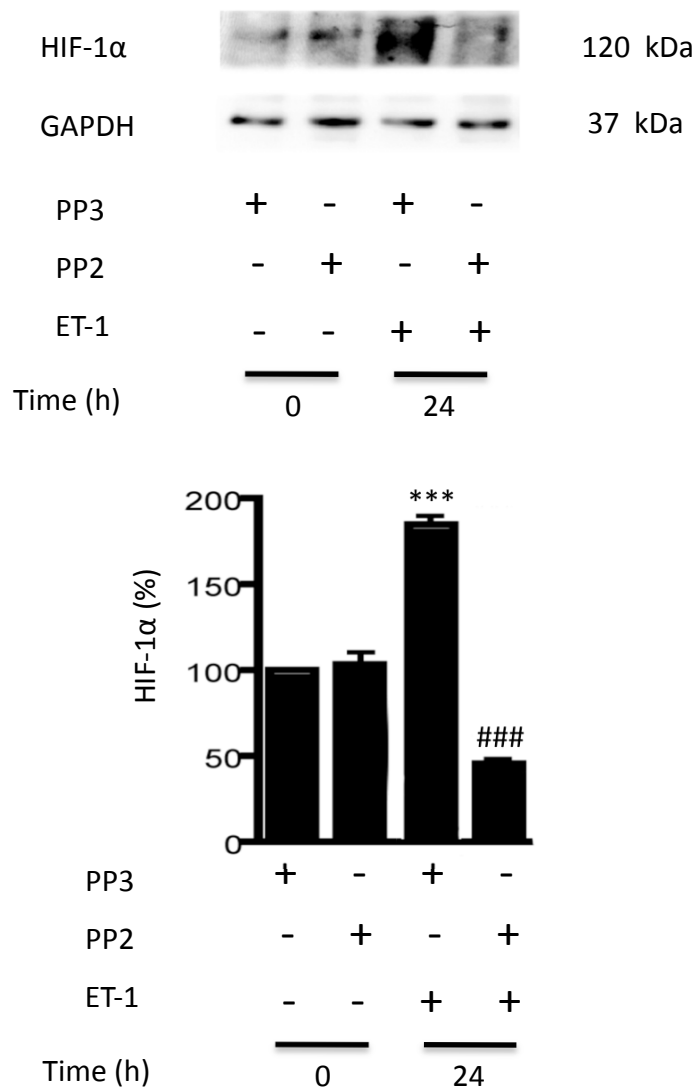


FIGURE 31 .- Effect of ET-1 on HIF 1a expression upon c-Src inhibition in astrocytes.

Our results suggest that c-Src inhibition promotes the downregulation of HIF-1^a expression after the treatment with ET-1.

To know if c-Src is able to regulate the proteins the glucose uptake, we performed a glucose uptake assay upon the inhibition of c-Src.

3.4.5 Effect of ET-1 on 2-deoxy-glucose uptake upon c-Src inhibition in astrocytes.

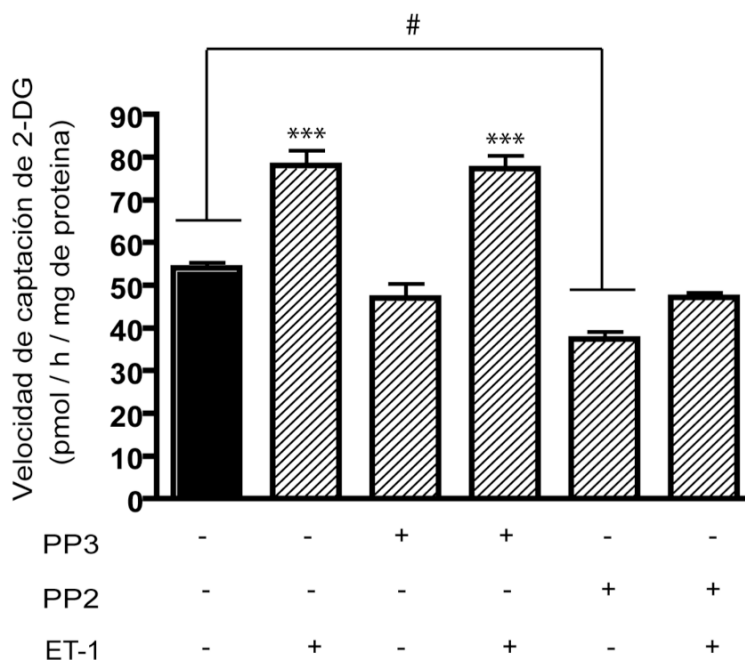
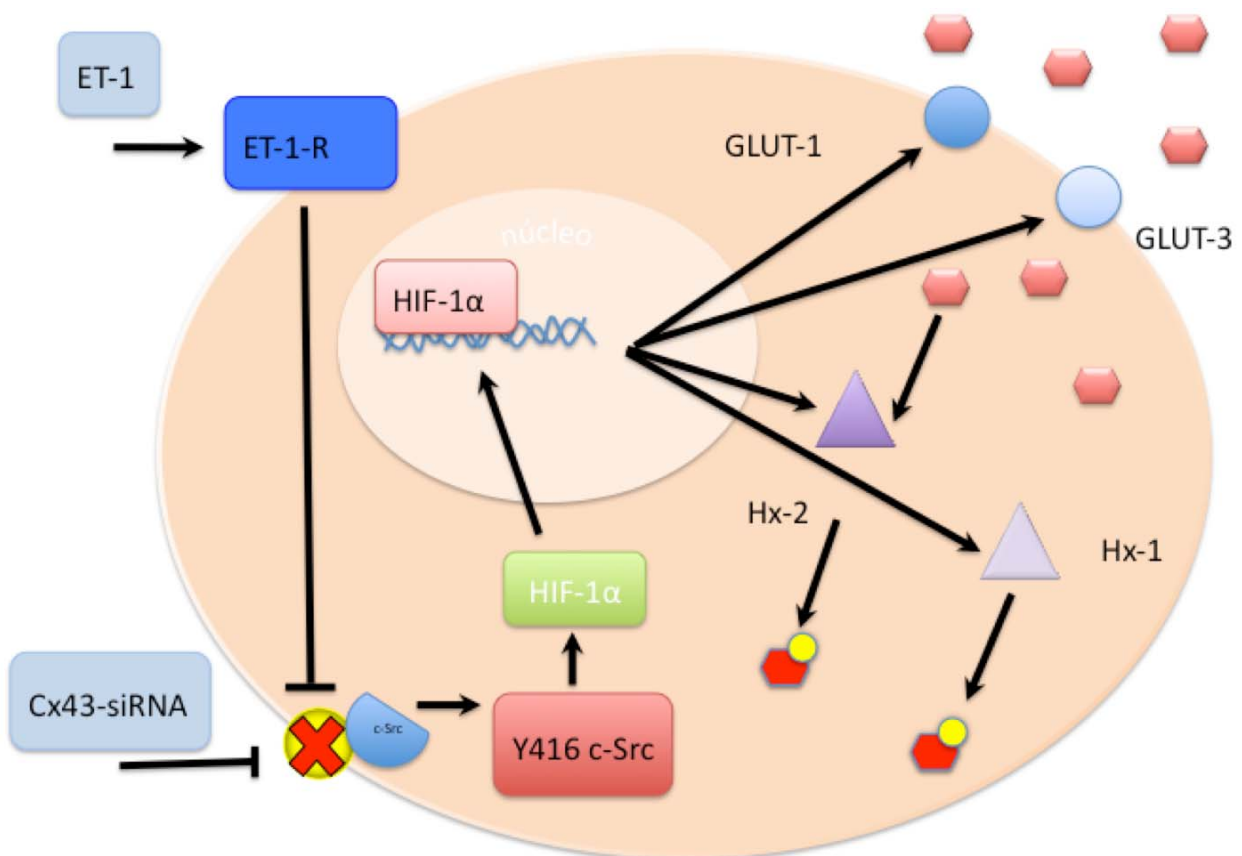


FIGURE 32 .- Effect of ET-1 on 2-deoxy-glucose uptake upon c-Src inhibition in astrocytes.

Our results suggest that c-Src promotes a downregulation of 2-deoxy-glucose uptake. Besides of that, ET-1 treatment was not able to increase the 2-deoxy-glucose uptake.

This result suggest that the activation of c-Src by the ET-1 is necessary to increase the rate of 2-deoxy-glucose uptake.

4.- DISSCUSION



In conclusion, our results suggest that gap junction inhibition promotes an increase of c-Src activation by different compounds such as ET-1 or Cx43-siRNA. This process promotes the activation and translocation of HIF-1^α to the nucleus, starting the transcription of GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2. The upregulations of these proteins promotes an increase on the rate of the glucose uptake in astrocytes, necessary for cell adaptations to different, such a reactive gliosis or tumors.

5.- CONCLUSIONS

1.- The reactive gliosis induced by the neuronal lesion promoted by kainic acid in mice cortex, decreases connexin 43 expression in astrocytes. Likewise, there is an increase in ET-1 levels at the injury zone.

2.- There is an increase in the expression of proteins involved in glucose uptake in astrocytes around the lesion, mainly GLUT-3 and Hx-2, two isoforms characteristic at proliferation cells that are not usually present in astrocytes.

3.- Down-regulation of Cx43 in astrocytes promotes an increase in the rate of glucose uptake and in the expression of proteins involved in this process, such as GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2.

4.- The increase on the rate of glucose uptake and the upregulation of GLUT-1, GLUT-3, Hx-1 and Hx-2 promoted by the ET-1, is not shown when connexin 43 is silenced in astrocytes. Therefore our results suggest that the effect of ET-1 on glucose uptake mediated by the decrease in connexin 43 expression in astrocytes.

5.- Silencing Connexin 43 and ET-1 treatment promote an increase in the expression of HIF-1 α expression in astrocytes

6.- The increase on the rate of glucose uptake promoted by the ET-1 is not observed when HIF-1 α is silenced in astrocytes. These results suggest that HIF-1 α is involved in the effect of connexin 43 and ET-1 on glucose uptake.

7.- Silencing connexin 43 silencing and ET-1 promote the activation of c-Src in astrocytes.

8.- The activation of c-Src is involved in the effect of ET-1 on the upregulation of HIF-1 α and the increase in the rate of glucose uptake.

FINAL CONCLUSION:

Our results confirm the relationship between connexin 43 and glucose uptake in astrocytes. This, c-Src, a protein that interact with connexin 43, is responsible for the activation of HIF-1 α , which induces the expression of GLUT-1, GLUT-3, hexokinase 1 and hexokinase 2, and consequently increases the rate of glucose uptake promoted by the downregulation of connexin 43 induced by ET-1.

