



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCTO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Participación de la subunidad $\alpha_2\delta-1$ de los canales de Ca^{2+}
en la proliferación y migración de células de glioblastoma**

Tesis que presenta:

Miriam Fernández Gallardo

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología celular y molecular

Directores de tesis:

Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Ciudad de México

Abril, 2023

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
CaMKII	cinasa de calmodulina II
Ca_v	Canales de calcio dependientes de voltaje
DAMS	Patrones moleculares asociados a daños
GB	Glioblastoma
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HVA	Canales de alto umbral de activación
IFN	Interferón
IL	Interleucinas
IRF-3	Factor regulador de interferón 3
LPS	Lipopolisacárido
LVA	Canales de bajo umbral de activación
MD-2	Molécula cooperante de diferenciación mieloide 2
MEC	Matriz extracelular
MGMT	o(6)-metilguanina ADN metiltransferasa
MLC	Cadena ligera de miosina
NFAT	Factor nuclear de la célula T activada
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NSPC	Células neuronales troncales progenitoras
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
siRNA	ARNs pequeños de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
SOCE	Entrada de calcio operada por reservorios intracelulares
Sp1	Factor específico de transcripción 1
TICs	Células iniciadores de tumor
TLR-4	Receptor tipo <i>Toll</i> 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRPs	Receptores de potencial transitorio

Contenido

Prefacio	1
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Glioblastoma	5
Factores de riesgo para el GB	8
Calcio intracelular y progresión tumoral	9
Calcio y proliferación celular	12
El calcio en la migración e invasión celular	14
Estructura y función de los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	17
La subunidad auxiliar $\alpha_2\delta-1$ en el cáncer	22
Regulación en la expresión de $\alpha_2\delta-1$ y su relación con el GB	24
La vía de señalización de TLR-4 y su relación con $\alpha_2\delta-1$	25
Justificación	30
Hipótesis	30
Objetivo General	31
Objetivos Particulares	31
Materiales y Métodos	32
Reactivos y fármacos	32
Cultivo celular	32
Inmunocitoquímica	32
Extracción de proteínas y <i>Western blot</i>	33
Ensayos de luciferasa	34
Ensayos de proliferación celular	35
Ensayos de migración celular	35
Silenciamiento usando ARN pequeños de interferencia (siRNAs)	36
Análisis estadístico	36
Resultados	37
Las células U87 expresan $\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4	37
La activación de TLR-4 favorece la expresión de $\alpha_2\delta-1$	38
La activación de TLR-4 favorece la proliferación y migración celular	40

La sobreexpresión de $\alpha_2\delta$ -1 aumenta la proliferación y migración celular	43
La sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 aumenta la proliferación y migración celular	48
El silenciamiento de Cav $\alpha_2\delta$ -1, Sp1 y TLR-4 afecta la proliferación y migración celular	49
La señalización por NF-kB/Sp1 activada por TLR-4 regula la expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1	50
El silenciamiento y la sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 modifican la expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1	52
Discusión	54
Bibliografía	59

Prefacio

El glioblastoma (GB) es el tipo de cáncer cerebral más agresivo, con una alta tasa de mortalidad. Debido a que se conoce poco de los aspectos moleculares que participan en su fisiopatología, resulta oportuno investigar y comprender mejor los elementos involucrados en su inicio y desarrollo con miras a proponer nuevas estrategias para su prevención y/o tratamiento.

Unas de las alteraciones centrales involucradas en el desarrollo del GB son los cambios en las concentraciones intracelulares de calcio que ocurren a través de diversas vías. Entre ellas, la actividad de los canales de calcio juega un papel muy relevante pues se sabe que contribuye a determinar procesos celulares integrales diversos como la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia en una variedad de tipos celulares, tanto en condiciones normales como patológicas.

En este contexto, en los últimos años ha tomado relevancia la participación de la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta-1$ de los canales de calcio de alto umbral de activación en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como el hepático, de la laringe, del pulmón y del ovario. Por lo que el objetivo central de este trabajo de tesis es estudiar la participación y la posible regulación de $\alpha_2\delta-1$ en la proliferación y migración de las células U87, una línea celular derivada de un glioblastoma humano.

La parte experimental del proyecto de investigación se llevó a cabo en los laboratorios 9 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (DFBN) y 55, del departamento de Biología Celular (DBC), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav). La dirección de la tesis estuvo a cargo de los doctores José Rodolfo Delgado Lezama (DFBN) y Diego

Ricardo Félix Grijalva (DBC), y contó con la asesoría de los doctores Benjamín Florán Garduño y José Segovia Vila, ambos profesores titulares del DFBN.

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica que se realizó en Ixtapa, Guerrero del 4 al 9 de noviembre del 2018. Durante el doctorado conté con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca # 48119), además de un apoyo extraordinario por parte del Cinvestav para concluir el proyecto, debido al retraso ocasionado por pandemia de COVID-19.

Resumen

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral primario más agresivo y representa >70% de los tumores cerebrales en personas adultas >50 años. A pesar de la existencia de una variedad de tratamientos (cirugía, radio y quimioterapia), el GB sigue siendo un padecimiento con un pobre pronóstico de sobrevida. De manera interesante para el presente trabajo de tesis, se sabe que la sobreexpresión de $\alpha_2\delta-1$ está relacionada con el desarrollo y el grado de malignidad de diferentes tipos de cáncer. Esta proteína es una subunidad auxiliar de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav), cuya expresión favorece el tránsito de la subunidad formadora del poro del complejo de canales (α_1) hacia la membrana plasmática, favoreciendo así un eventual aumento en la entrada de Ca^{2+} . De manera interesante, TLR-4, una proteína perteneciente a la familia de los receptores tipo *Toll* que participan en la respuesta inflamatoria, y el factor de transcripción Sp1 se han relacionado con la progresión del GB. Por lo tanto, el objetivo central del presente trabajo de tesis fue evaluar el papel de la subunidad $\alpha_2\delta-1$ en la progresión del GB e investigar si Sp1 regula su expresión después de la activación de TLR-4. Para ello, se evaluó la expresión de $\alpha_2\delta-1$, TLR4 y Sp1 en la línea celular de glioblastoma humano U87 y se realizaron ensayos de proliferación y migración celular utilizando diferentes agonistas y antagonistas. Las acciones de $\alpha_2\delta-1$ también se investigaron utilizando estrategias de sobreexpresión y silenciamiento. Los ensayos iniciales de luciferasa y los análisis de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) mostraron que la activación de TLR-4 favorece la transcripción y expresión de $\alpha_2\delta-1$, lo que promovió la proliferación y migración de las células U87. Asimismo, la sobreexpresión de $\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4 aumentó la proliferación y migración celular, mientras que su silenciamiento con ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) específicos previno estas acciones. Los resultados sugieren también que la regulación en la expresión de $\alpha_2\delta-1$ mediada por TLR-4 se produce a través de la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B. Juntos, estos hallazgos sugieren fuertemente que la activación de TLR-4 aumenta la expresión de $\alpha_2\delta-1$ en las células U87, favoreciendo su potencial proliferativo y migratorio, lo que eventualmente podría proporcionar una base teórica para examinar nuevos biomarcadores y dianas moleculares para el diagnóstico y tratamiento del GB.

Abstract

Glioblastoma (GB) is the most aggressive primary brain tumor, accounting for >70% of brain tumors in adults >50 years of age. Despite various treatments (surgery, radio, and chemotherapy), GB continues to be a condition with a poor prognosis for survival. Interestingly, the overexpression of $\alpha_2\delta-1$ is related to the development and degree of malignancy of distinct types of cancer. This protein is an auxiliary subunit of voltage-gated Ca^{2+} (Ca_v) channels, whose expression favors the trafficking of the main pore-forming (α_1) subunit of the channel complex to the plasma membrane, thereby resulting in a potential increase in Ca^{2+} entry. Likewise, TLR-4, a protein belonging to the family of Toll-like receptors that participate in the inflammatory response, and the transcription factor Sp1, have been linked to the progression of GB. Therefore, this report aimed to evaluate the role of $\alpha_2\delta-1$ in the progression of GB and investigate whether Sp1 regulates its expression after the activation of TLR-4. To this end, the expression of $\alpha_2\delta-1$, TLR4, and Sp1 was assessed in the U87 human glioblastoma cell line, and proliferation and migration assays were conducted using different agonists and antagonists. The actions of $\alpha_2\delta-1$ were also investigated using overexpression and knockdown strategies. Initial luciferase and Western blot assays showed that the activation of TLR-4 favors the transcription and expression of $\alpha_2\delta-1$, which promoted the proliferation and migration of the U87 cells. Consistent with this, overexpression of $\alpha_2\delta-1$, Sp1, and TLR-4 increased cell proliferation and migration, while their knockdown with specific small interference RNAs (siRNAs) prevented these actions. The results also suggest that TLR-4-mediated regulation of $\alpha_2\delta-1$ expression occurs through the NF- κ B signaling pathway. Together, these findings strongly suggest that the activation of TLR-4 increases the expression of $\alpha_2\delta-1$ in U87 cells, favoring their proliferative and migratory potential, which might eventually provide a theoretical basis to examine novel biomarkers and molecular targets for the diagnosis and treatment of GB.

Introducción

De los tumores cerebrales primarios malignos, el más común y agresivo es el glioblastoma (GB). Es una neoplasia de clase IV con una diferenciación astrocítica según la clasificación de tumores del sistema nervioso central (SNC) de la organización mundial de la salud (OMS) versión 2016. En general, tienen un mal pronóstico con una media de supervivencia <2 años (Wesseling & Capper 2018).

Glioblastoma (GB)

EL GB fue descrito por primera vez hace más de dos siglos, y de acuerdo con la clasificación actual de la OMS, presenta un perfil histopatológico característico de necrosis y proliferación endotelial, con un conjunto amplio de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas, lo que resulta en la asignación de grado IV, el más alto grado de letalidad dentro de los tumores del sistema nervioso central (SNC) (Scherer, 1940; Wesseling & Capper, 2018; Wirsching et al., 2016).

Se sabe que cambios genéticos y epigenéticos conducen a la reorganización citoplasmática y de la matriz extracelular. Estos cambios alteran el perfil morfológico del tejido originando células amorfas y áreas de muerte celular o células que migran lejos de la necrosis, provocando formaciones neovasculares a partir de factores de crecimiento liberados por las células tumorales que se autoestimulan. Estos componentes forman parte del comportamiento biológico del tumor y de la resistencia al tratamiento en el transcurso clínico de la enfermedad. Algunos de los cambios en el GB pueden ser observados a través del microscopio a medida que se forman las células y tejidos característicos de la enfermedad. Los cambios en la información genética resultan en alteración, supresión y expresión de genes y se

utilizan como herramientas de diagnóstico, permitiendo la validación histopatológica del GB (Louis et al., 2016).

Entre estos biomarcadores tumorales se encuentra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio de clase III del citoesqueleto con un peso molecular de ~50 kDa, que se encuentra presente en los astrocitos, otras células gliales y algunos pericitos. En muestras neuropatológicas, la GFAP se utiliza con frecuencia como un marcador confiable de astrocitos, pero también de tumores de origen glial. Algunos estudios muestran que la pérdida progresiva de la expresión de GFAP está relacionada con el aumento en el grado de malignidad de los astrocitomas (Krex et al., 2007). Otros marcadores pronósticos de supervivencia son la hipermetilación del promotor de la o(6)-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), y las mutaciones de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) (Werneck de Carvalho et al., 2017; Yeung et al., 2013).

El tratamiento del GB incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia alquilante. De manera interesante, la metilación del promotor del gen que codifica para la proteína de reparación del ADN, MGMT, predice el beneficio de la quimioterapia alquilante con temozolomida, el fármaco de primera elección para el tratamiento del tumor en pacientes de edad avanzada (Darefsky et al., 2012; Wirsching et al., 2016).

Las investigaciones actuales se han enfocado en las características moleculares que impulsan el fenotipo maligno, incluidas las alteraciones en la transducción de señales, la angiogénesis, la expresión de genes, y más recientemente la participación de los canales iónicos (Wirsching et al., 2016). Sin embargo, a pesar del desarrollo en las investigaciones sobre distintos aspectos moleculares del GB, el tumor sigue teniendo una de las tasas de mortalidad más altas, por lo que existe un interés creciente en conocer más acerca de su origen y desarrollo.

Los datos experimentales sugieren que el GB en el adulto puede originarse de un pequeño conjunto de células troncales y progenitoras neuronales adultas llamadas NSPC por sus siglas en inglés (*neuronal stem and progenitor cells*), presentes en la zona subventricular, la sustancia blanca subcortical y la circunvolución dentada del hipocampo (Sanai et al., 2004; Nunes et al., 2003; Eriksson et al., 1998). Las NSPC conservan la capacidad para entrar en mitosis y participar en la plasticidad neuronal principalmente asociada al aprendizaje y la memoria (Sanai et al., 2005). Una subpoblación de células del GB, iniciadoras del tumor (*stem cell like* o células troncales de glioma, GSC) presentan características similares a las de las NSPC, como la ubicación en los nichos perivasculares e hipóxicos (Gilbertson & Rich, 2007), y la capacidad de autorenovación y de formar tumores secundarios en ensayos de xenotransplante que tiene similitud con el tumor original.

En la actualidad se han identificado diversos marcadores de células iniciadoras de glioma como la prominina, también conocida como CD133, el antígeno embrionario específico de estadio-1 o CD15, el CD44 y la integrina $\alpha 6$ (Singh et al., 2004; Son et al., 2009; Pietras et al., 2014; Lathia et al., 2010), aunque su abundancia es muy variable entre los distintos tumores (Yan et al., 2013). La mayor parte de la progenie de las células iniciadoras de glioma tienen características de astrocitos, pero también se ha observado que pueden diferenciarse a células endoteliales y pericitos (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010; Cheng et al., 2013). A las células iniciadoras de glioma se les ha atribuido un papel crucial en el crecimiento, la angiogénesis, la invasión y la resistencia a la radio y quimioterapia (Bao et al., 2006; Beier et al., 2008).

Factores de riesgo para el GB

El GB se puede presentar en todos los grupos de edad, aunque se sabe que su incidencia aumenta con el transcurrir de los años. Tiene una edad promedio de diagnóstico de 65 años (Geraghty et al., 1989; Stoyanov et al., 2017; Werneck de Carvalho et al., 2017). A pesar de que se han realizado estudios sobre los factores de riesgo que pudieran estar asociados con la enfermedad, como la exposición ambiental, la ocupación, la edad, el sexo y la raza, la mayoría de ellos no han sido concluyentes. Aparentemente, sólo la radiación ionizante es un factor que pudiera estar directamente asociado al riesgo para el desarrollo y progresión del glioblastoma (Ellor et al., 2014; Enchev et al., 2009).

Históricamente se ha establecido que la proporción hombre:mujer en el GB es entre 1.3:1 y de 2:1 dependiendo de la población estudiada (Ahmadloo et al., 2013; Sun et al., 2015; Stoyanov et al., 2017). Los factores de riesgo establecidos son la presencia de enfermedades genéticas como neurofibromatosis, la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), y otras que están asociadas con mayor riesgo de padecer diversas enfermedades benignas nerviosas y tumores malignos (Abadin et al., 2015; Karajannis & Ferner, 2015). Por otro lado, una vertiente para investigaciones futuras en el GB, son las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y en la autofagia, así como en la actividad de los canales de calcio, eventos que tienen un papel en la regulación de la hipoxia, el rejuvenecimiento de las células troncales, la quimioresistencia y la agresividad tumoral (Wang et al., 2020). Asimismo, las diferentes propiedades de las proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} las convierten en modelos prometedores para terapias dirigidas y posibles marcadores pronósticos en el desarrollo y progresión de GB, así como su efecto en el tratamiento

de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes (Vander et al., 2009; Azab et al., 2020).

Calcio intracelular y progresión tumoral

El calcio (Ca^{2+}) es un catión divalente ubicuo y un segundo mensajero que participa en múltiples procesos fisiológicos, regulados por las oscilaciones en su concentración intracelular. En las células en reposo, la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mantiene en niveles muy bajos en comparación al compartimiento extracelular, con un gradiente aproximado de $\sim 2 \times 10^4$ veces mayor en el exterior (1-2 mM) que en el interior (10-100 nM) de las células. En los organelos celulares como las mitocondrias y el núcleo, las concentraciones de Ca^{2+} son similares a las del citoplasma. El retículo endoplásmico (RE) por su parte, es considerado el principal reservorio de Ca^{2+} intracelular, con una concentración de Ca^{2+} que oscila entre 100 y 800 μM (Raffaello et al., 2016). Asimismo, las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial, tienen un papel en la producción de ATP necesario para el estado energético correcto de la célula y la muerte celular (inducción de la apoptosis y la activación de la autofagia) (Bhosale et al., 2015). Las mediciones directas de los niveles de Ca^{2+} en los lisosomas arrojan una concentración interna de aproximadamente 500 μM (Christensen et al., 2002).

Por lo anterior, las concentraciones de Ca^{2+} en el interior celular están determinadas por un elaborado sistema de transportadores, canales, intercambiadores de Ca^{2+} , proteínas de unión/amortiguadoras y bombas que regulan finamente el flujo del Ca^{2+} dentro y fuera de las células y entre los distintos organelos celulares (Marchi et al., 2020). Este sistema permite el mantenimiento de concentraciones bajas de Ca^{2+} en reposo y regula la propagación de cambios de Ca^{2+}

en el interior de la célula, eventos fundamentales para que la información biológica se transmita adecuadamente y se puedan llevar a cabo una pléyade de procesos fisiológicos, que incluyen al metabolismo, la proliferación y muerte celulares, la fosforilación de proteínas, la transcripción de genes, la neurotransmisión, el acople excitación-contracción, entre muchos otros (Berridge et al., 2003; Giorgi et al., 2018; Bootman et al., 2020).

En general, los mecanismos que preservan la correcta señalización y homeostasis del Ca^{2+} , operan regulando el gradiente electroquímico del ion en el ambiente extracelular o en los reservorios en el interior de la célula y el citoplasma. El calcio es almacenado en reservorios (por ejemplo, el retículo endo/sarcoplasmático o la mitocondria) y mantenido ahí por proteínas que lo captan entre las que destacan la calsecuestrina y la calreticulina (Berridge et al., 2003). El calcio es internalizado a los reservorios por la acción de ATPasas como la SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*), o la SPCA (*secretory pathway Ca^{2+} -ATPase*) que cataliza la hidrólisis del ATP acoplado con el transporte de calcio en la mitocondria (Wuytack et al., 2002).

Por otro lado, una gran variedad de proteínas en la membrana celular como receptores a hormonas y factores de crecimiento pueden inducir aumentos en el Ca^{2+} citosólico mediante la generación de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que ocasiona la apertura de canales de Ca^{2+} en los reservorios del retículo endoplásmico (RE) y liberan el calcio hacia el citosol. Una vez cumplida su función en este compartimento, el Ca^{2+} es extruido de la célula a través de una ATPasa conocida como PMCA (*plasma membrane calcium ATPase*) que expulsan el Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, así como por intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) que

movilizan el calcio usando el gradiente electroquímico del sodio como fuerza impulsora (Berridge et al., 2003).

Para rellenar nuevamente los reservorios de Ca^{2+} después de su depleción, el ion es internalizado por un sistema conocido como entrada de calcio operada por Ca^{2+} extracelular conocida como SOCE (*store-operated calcium entry*). La SOCE implica la entrada de Ca^{2+} a través Orai1, un canal de calcio de la membrana plasmática que se activa a través de su interacción con una proteína llamada STIM1 que detecta cambios en el Ca^{2+} dentro de compartimientos del retículo endoplásmico y que transmite la señal a la superficie celular (Roberts-Thomson et al., 2019).

Otras vías para la entrada de Ca^{2+} incluyen la activación de canales ocasionada por cambios en el potencial de membrana, como es el caso de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y estímulos físicos como la temperatura en el caso de los canales llamados receptores de potenciales transitorios o TRPs, o el estiramiento de la membrana como es el caso de los canales mecanosensibles PIEZO (Pedersen et al., 2005; Felix et al., 2013; Moroni et al., 2018).

Al presentarse una alteración en estos sistemas, se provocan modificaciones en la dinámica de los flujos de Ca^{2+} afectando el funcionamiento de diversos eventos celulares como la proliferación, la expresión génica, la fosforilación y desfosforilación de proteínas y la muerte celular (Giorgi et al., 2018). Existe evidencia de que las células tumorales presentan alteraciones en estos sistemas de homeostasis de Ca^{2+} , donde la expresión de los canales/bombas de Ca^{2+} y su regulación se encuentran modificadas (Marchi et al., 2020).

Por lo tanto, la remodelación de los sistemas homeostáticos de Ca^{2+} puede ser un interesante tópico de investigación para el desarrollo de terapias encaminadas a

detener la progresión del cáncer. A continuación, se describirá la participación del Ca^{2+} en los procesos de proliferación, migración e invasión.

Calcio y proliferación celular

La proliferación celular depende del ciclo celular, que consta de cuatro fases principales: G1, la primera fase o de intervalo; Fase S, en la que se sintetiza el ADN; G2, la segunda fase o de brecha; y Fase M, o mitosis, en la que los cromosomas y los componentes citoplasmáticos se dividen en dos células hijas. Las transiciones entre estas diferentes fases están estrictamente controladas, y los puntos de control durante el ciclo celular determinan si la célula pasa a la siguiente fase (Vermeulen et al., 2003).

Se ha demostrado que estos puntos de control dependen, entre otros elementos, del Ca^{2+} que fluye a través de canales específicos, contribuyendo a la homeostasis del ion en varios organelos. Por ejemplo, una reducción en la entrada de Ca^{2+} al bloquear los canales en la membrana plasmática, o la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede reducir la proliferación celular (Borowiec et al., 2014).

Las variaciones de Ca^{2+} juegan un papel fundamental a lo largo del ciclo celular, durante la fase temprana G1 y en las transiciones G1/S y G2/M (Roderick & Cook, 2008). Diversos estudios han establecido que la proliferación y división celulares son dependientes del Ca^{2+} extracelular, y que las oscilaciones de Ca^{2+} basal o un aumento transitorio de Ca^{2+} están implicados en la progresión del ciclo y la proliferación celulares (Capiod et al., 2016; Kahl et al., 2003). Durante el ciclo celular, se han evaluado los transitorios de Ca^{2+} en la fase G1 y la mitosis (Santella et al., 1998), y se ha encontrado que se requiere del Ca^{2+} en G1 a medida que las células vuelven a ingresar al ciclo celular, para promover la activación de los factores de

transcripción AP1 (FOS y JUN), la proteína de unión al elemento que responde a AMPc (CREB) y el factor nuclear de la célula T-activada (NFAT).

El Ca^{2+} activa a estos factores para regular la expresión de las ciclinas de tipo D, que son necesarias para la activación de los complejos de cinasa 4 dependientes de ciclinas. El ensamblaje de los complejos D-K4 y E-K2 también depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular, y a través de ellos se activa y controla la fosforilación e inactivación del gen RB1 de retinoblastoma, que participa en la entrada a la fase S. El inicio de la duplicación centrosomal en la transición G1/S, también depende de Ca^{2+} y de calmodulina (CaM), la CaMcinasa II (CaMKII) y la proteína centrosomal CP110. Se sabe además que las vías Ca^{2+} /CaM/CaMKII son necesarias para la progresión del ciclo celular (Kahl et al., 2003), y también se ha descrito que la CaM se requiere en dos puntos, la estimulación posmitogénica temprana y la tardía en G1 cerca del límite G1/S (Chafouleas et al., 1984; Rasmussen & Means, 1989).

Por su parte, la vía Ca^{2+} /calcineurina está implicada en la regulación de los puntos de control del ciclo celular. La calcineurina es una fosfatasa dependiente de calcio que juega un papel importante en la progresión a través de las fases G1 y S, y se ha demostrado que también regula a las ciclinas A y E, así como la acumulación de ciclina D1 (Kahl et al., 2003). Además, la calcineurina es conocida por activar al factor de transcripción NFAT, y establecer un vínculo molecular con MYC que regula las ciclinas E y E2F, reforzando la idea de una conexión entre las vías dependientes del Ca^{2+} y la proliferación celular (Prevarskaya et al., 2018; Buchholz et al., 2006).

Los cambios en la funcionalidad de la maquinaria del ciclo celular son la razón principal por la que el cáncer surge, crece y se propaga. La mayoría de las características del cáncer se sustentan en la capacidad de las células tumorales para

proliferar constantemente. Por lo tanto, el punto de partida para entender la carcinogénesis es comprender cómo y por qué se reprograma el ciclo celular para priorizar la proliferación, incluso en condiciones de estrés ambiental y daño al ADN. En un contexto tumoral, las células adquieren sus propios mecanismos para alcanzar suficiente estimulación mitogénica para salir de la quiescencia. Además, los puntos de control del ciclo celular, que garantizan las condiciones ambientales adecuadas y la integridad del ADN durante el proceso de división celular, suelen verse alterados (Hanahan & Weinberg 2011).

El calcio en la migración e invasión celular

La metástasis tumoral es una característica distintiva del cáncer que representa la etapa terminal de la progresión del tumor. Conceptualmente, la cascada metastásica se puede simplificar en la translocación física de las células metastásicas del tumor primario a órganos distantes y la expansión de células tumorales diseminadas para formar un tumor secundario macroscópico (Chaffer & Weinberg 2011). Para diseminarse desde el tumor primario a sitios distantes, las células tumorales metastásicas necesitan invadir los tejidos circundantes, infiltrarse en la circulación linfática y sanguínea (intravasación), sobrevivir en el tránsito a órganos distantes y escapar de la microvasculatura al parénquima de órganos distantes. Las células tumorales diseminadas pueden permanecer latentes durante un período prolongado antes de colonizar el sitio distante y establecer tumores secundarios (expansión metastásica) (Fidler, 2003). La metástasis es responsable de ~90% de las muertes relacionadas con el cáncer proporcionando una de las características que distinguen un tumor maligno de un tumor benigno.

Brooks, Hannahan, y otros autores han redefinido las "características distintivas de la metástasis" (Brooks et al., 2010; Hanahan & Weiberg, 2000), proponiendo cuatro características esenciales de las células metastásicas: 1) motilidad capacidad de ingresar al sistema circulatorio, 2) capacidad para modular el microambiente local metastásico, 3) plasticidad alta y reversible de las células metastásicas (*stem cell like*), y 4) capacidad de invadir los tejidos secundarios y proliferar.

En este proceso tumoral, las células adquieren capacidades que le permiten la proteólisis y la degradación de la matriz extracelular (MEC) para proceder a la invasión del tejido circundante, al iniciarse estos cambios, la membrana celular presenta protuberancias especializadas que proporcionan varias funciones. Los lamelipodios son proyecciones de actina del citoesqueleto en el borde móvil de la célula, mientras que los invadopodia, son extensiones de membrana plasmática proteolíticamente activas responsables de la degradación focal de los componentes de la MEC. Los invadopodia son comunes en las células tumorales altamente invasivas y contienen metaloproteinasas (MMP) para la degradación de la MEC (Nabeshima et al., 2002; Yoon et al., 2003).

En la parte "posterior" de la célula con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, las adherencias focales maduras se desmontan para permitir que el cuerpo de la célula sea empujado hacia adelante por la contracción de la miosina II, proceso que se encuentra regulado por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) a través de la MLC cinasa dependiente de Ca^{2+} (MLCK), y por la disgregación de las adherencias en la parte trasera de la célula debido a la escisión de proteínas de adhesión focal mediada por calpaína, entre las cuales se encuentran las integrinas, la talina, la vinculina y la cinasa de adhesión focal (FAK) (Ridley et al., 2003; Mo &

Yang, 2018). Las adherencias focales son conjuntos macromoleculares asociados a la membrana celular ricos en integrinas, que conectan al citoesqueleto a través de actina con la matriz extracelular (Huang et al., 2020). La regulación dinámica de las adherencias focales es esencial para la migración celular exitosa y está mediada por ciclos de ensamblaje dependiente de Ca^{2+} y de desmontaje mostrando un comportamiento estable y transitorio. Es importante mencionar aquí que los cambios morfológicos y de adherencia que se observan durante la migración celular también van acompañados de señales de Ca^{2+} , que toman la forma de picos u oscilaciones (Pettit et al., 1998). La liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares y el influjo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular se han relacionado con migración celular en función de los tipos de células y los estímulos recibidos.

El objeto de estudio del presente trabajo de tesis se centra en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, ya que se ha visto que éstos juegan un papel fundamental en la biología tumoral (Déliot & Constantin, 2015; Terrié et al., 2019), mostrando que una posible expresión aberrante puede promover el crecimiento tumoral y la migración celular.

Estructura y función de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav) son proteínas presentes en la membrana plasmática de las células excitables y son esenciales para su funcionamiento. Los canales Cav se activan en respuesta a la despolarización de la membrana y conducen el Ca^{2+} hacia el interior de la célula, donde el ion inicia muchas respuestas fisiológicas, incluidas la secreción de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular y la transcripción de genes (Catterall, 2011; Zamponi et al., 2015), entre muchos otros procesos. El Ca^{2+} a menudo se une

a proteínas diana de manera rápida creando nano o microdominios de señalización de Ca^{2+} (Llinás et al., 1992; Stanley, 1997; Parek, 2008; Wang & Augustine, 2015). La función de los canales de Ca^{2+} puede ser regulada por el mismo Ca^{2+} , al unirse a otros ligandos y mediante la fosforilación de proteínas en este dominio local de señalización de Ca^{2+} (Catterall, 2011; Zamponi et al., 2015). Las mutaciones de los canales de Ca^{2+} y la desregulación de su función están implicadas en una amplia gama de enfermedades humanas, que incluyen a la hipertensión arterial sistémica y la arritmia e insuficiencia cardíacas en el sistema cardiovascular (Liao & Soong, 2010; Venetucci et al., 2012); así como a la parálisis periódica del músculo esquelético (Jurkat-Rott & Lehmann-Horn, 2006; Venance et al., 2006); la falla en la liberación de insulina y aumento en la apoptosis de las células beta pancreáticas en la diabetes (Yang et al., 2014); algunos tipos de migraña y dolor crónico (Pietrobon, 2013; Bourinet et al., 2014), y por supuesto diversos tipos de cáncer (Prevarskaya et al., 2018).

Fatt y Katz (1953), fueron quienes identificaron por primera vez los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Más tarde se descubrió que existen diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} en las células excitables y, en consecuencia, se clasificaron de acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas y bioquímicas. En la década de los 80s, las proteínas de los canales de calcio se empezaron a purificar y se demostró que constaba de varias subunidades (Borsotto et al., 1985; Flockerzi et al., 1986; Sieber et al., 1987; Takahashi et al., 1987; Vaghy et al., 1987; Leung et al., 1988). Así, la subunidad principal de los canales de calcio dependiente de voltaje se denominó α_1 y se encontró que estaba conformada por 4 dominios homólogos con 6 segmentos transmembranales cada uno. En el S4 se encuentra el sensor de voltaje y los segmentos S5-S6 unidos por un *bucle P* forman el poro del canal (Fig. 1).

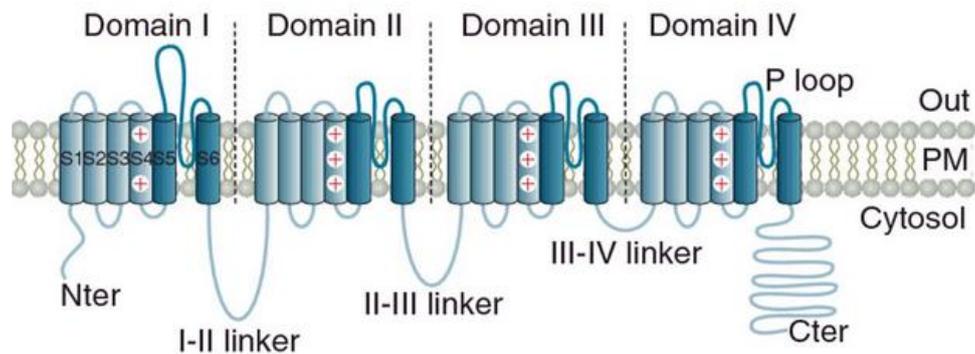


Figura 1. Estructura de la subunidad formadora del poro (α_1) de los canales Cav. A) Topología membranar de la proteína. Al igual que otros canales dependientes de voltaje, la subunidad principal (Cav α_1) consta de cuatro dominios homólogos repetidos (I-IV) unidos por tres bucles citoplasmáticos, a saber, bucle I-II, II-III y III-IV. Cada dominio repetido contiene seis hélices transmembranales que incluyen dos dominios estructurales separados: el dominio de detección de voltaje formado por las primeras cuatro hélices y el dominio de poro (P loop). Modificado de Weiss & Zamponi, 2017.

Las subunidades auxiliares se denominaron de la siguiente manera: β que se encuentra unida a una región intracelular del canal (Pragnell et al., 1994), los péptidos α_2 y δ codificados por un solo gen y que se mantienen unidos por un puente disulfuro después de su escisión proteolítica postraduccional, y anclados a la membrana por un grupo glucosfatidilinositol (Davies et al., 2010; De Jongh et al., 1990; Jay et al., 1991), y γ la cual se conforma de cuatro segmentos transmembranales que interactúan con el sensor de voltaje en el S4 de la subunidad α_1 (Jay et al., 1990; Wu et al., 2016).

Los primeros estudios electrofisiológicos mostraron diferentes propiedades de los canales de Ca^{2+} . Algunos de ellos solo necesitan una pequeña despolarización para activarse, mientras que otros requieren despolarizaciones más fuertes de la membrana para activarse (Hagiwara et al., 1975; Llinás & Yarom, 1981). De acuerdo

con este criterio, los canales de calcio se dividieron en canales de bajo (LVA) y alto umbral de activación (HVA) (Fig. 2).

Otra de las clasificaciones de los canales de calcio se basa en los diferentes tipos de corrientes que generan. Las llamadas corrientes de Ca^{2+} de tipo L se registraron inicialmente en los miocitos cardíacos (Reuter, 1983). Estos canales se distinguen por su inactivación lenta dependiente de voltaje y por su sensibilidad al bloqueo por un grupo de fármacos conocidos como dihidropiridinas. Por su parte, las corrientes de Ca^{2+} de tipo N, P/Q y R tienen una inactivación más rápida dependiente del voltaje, se encuentran principalmente en neuronas y pueden ser bloqueadas por toxinas peptídicas contenidas en el veneno de arañas y caracoles marinos (Nowycky et al., 1985; Llinás et al., 1989; Olivera et al., 1994). Finalmente, las corrientes de calcio de tipo T (LVA) se activan a potenciales de membrana más negativos que los canales de alto umbral (HVA) y tienen una inactivación rápida dependiente del voltaje durante las despolarizaciones sostenidas, y una desactivación rápida tras la repolarización (Carbone & Lux, 1984; Nowycky et al., 1985). Estos canales se expresan en abundancia en los miocitos cardíacos del nódulo sinoauricular y en las neuronas del tálamo (Deleuze et al., 2012; Mesirca et al., 2015).

Finalmente, de acuerdo con la naturaleza molecular de las diez distintas subunidades α_1 los canales se han clasificado en tres familias (Catterall, 2011; Zamponi et al., 2015) (Fig. 2). Los canales Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4 conducen corrientes de calcio tipo L. Estos canales tienen diversas funciones, incluida su participación en los acoplos excitación/contracción, excitación/secreción y excitación/transcripción. Los canales Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3 conducen corrientes de Ca^{2+} de tipo N, P/Q, y R, respectivamente (Catterall, 2011; Zamponi et al., 2015;

Olivera et al., 1994). Estos canales inician la transmisión sináptica en las neuronas y también cumplen funciones importantes en la señalización del Ca^{2+} en los cuerpos de las neuronas y en las dendritas. Por su parte, los canales $\text{Cav}3.1$, $\text{Cav}3.2$ y $\text{Cav}3.3$ (tipo T), impulsan la generación rítmica de potenciales de acción en el nódulo sinoauricular del corazón y las neuronas talámicas, y son importantes para mantener los ritmos de sueño, entre otras funciones (Zamponi et al., 2015).

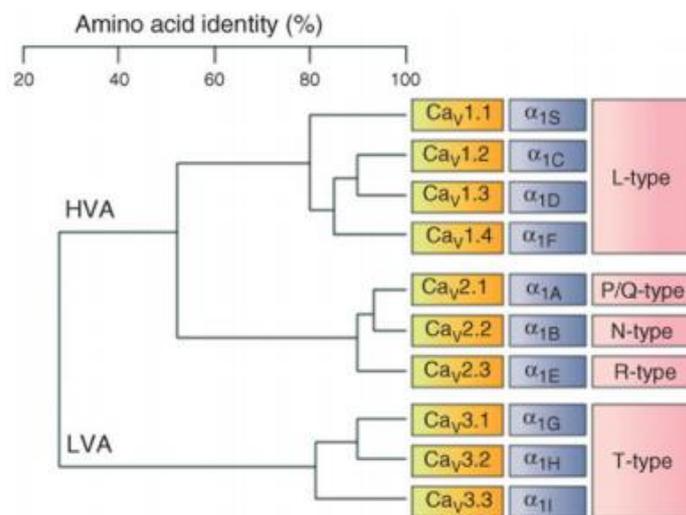


Figura 2. Clasificación de los canales Ca_v . Las subunidades $\text{Ca}_v\alpha_1$ se pueden dividir en tres clases según la identidad de la secuencia de aminoácidos, como se muestra en el dendrograma. Las clases Ca_v1 y Ca_v2 se denominan canales de alto umbral de activación (HVA), mientras que las subunidades $\text{Ca}_v3\alpha_1$ forman los canales de bajo umbral de activación (LVA). Los nombres originales, la nomenclatura molecular y el tipo de corrientes se dan en azul, amarillo y rosa, respectivamente. Tomada de Felix et al., 2013.

Todas las subunidades de los canales de calcio se modifican mediante el corte y empalme alternativo de sus respectivos ARNm, lo que conduce a una gran diversidad molecular y funcional (Liao et al., 2009; Lipscombe et al., 2013). Las subunidades auxiliares también contribuyen a la diversidad de los canales de calcio, ya que están codificadas por cuatro genes que codifican para $\alpha_2\delta$, cuatro para β y nueve para γ (Arikkath & Campbell, 2003).

Las subunidades $\alpha_2\delta$ tienen un papel canónico bien establecido que es el de influir en el tráfico y la función de los canales Cav_1 y Cav_2 aumentando la densidad de estos canales en la membrana plasmática (Cassidy et al., 2014). También dirigen el tráfico de los canales a sitios subcelulares específicos, incluidos en los procesos neuronales (Cassidy et al., 2014, Kadurin et al., 2016). Asimismo, las subunidades $\alpha_2\delta$ modifican la función de los canales Cav al influir en las propiedades biofísicas de las corrientes (Gurnett et al., 1996; Shistik et al., 1995; Mikami et al., 1989; Felix et al 2013; Dolphin et al., 2016), además de su efecto sobre el tráfico celular de los canales (Kadurin et al., 2016).

La subunidad $Cav\alpha_2\delta-1$ tiene un peso aproximado de 170 kDa, deriva del gen *CACNA2D1* cuya proteína precursora, como ya se mencionó, es procesada proteolíticamente generando dos polipéptidos, α_2 y δ , los cuales se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro (Jay et al., 1991; Davies et al., 2010; Calderón-Rivera et al., 2012). Asimismo, se sabe que $Cav\alpha_2\delta-1$ interacciona con la subunidad $Cav\alpha_1$ favoreciendo su incorporación a la membrana plasmática, desconociéndose hasta el momento con precisión el mecanismo molecular involucrado. La subunidad $Cav\alpha_2$ está altamente glicosilada e interacciona con la porción glicosilada de la subunidad $Cav\alpha_1$, mientras que se ancla al lado externo de la membrana plasmática mediante la unión a un GPI (Dolphin, 2016) (Fig. 3).

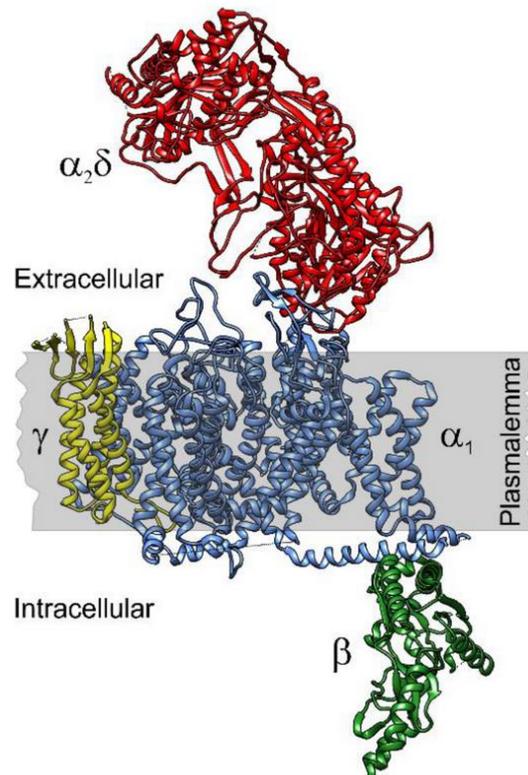


Figura 3. Estructura del complejo de los canales Cav1.1 del músculo esquelético determinada a través de criomicroscopía electrónica. Las diferentes subunidades tienen colores diferentes. Tomada de Tuluc et al., 2021.

La subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1 en el cáncer

De manera interesante, diversos estudios han relacionado la sobreexpresión de la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 de los canales Cav de alto umbral de activación con el desarrollo y grado de malignidad de diferentes tipos de cáncer, como el de laringe, pulmón, ovario e hígado (Huang et al., 2019; Sui et al., 2018; Yu et al., 2018; Zhao et al., 2013).

Esto ha llamado la atención de diversos grupos, que se han mostrado particularmente interesados en investigar cuál sería el papel de esta subunidad en el desarrollo del fenotipo tumoral de las células, si puede ser causa o efecto de la transformación maligna, y si los canales tuviesen un papel particular en el potencial metastásico de las células tumorales.

Así, el grupo de Zhao y colaboradores (2013) identificó en biopsias de pacientes que padecían cáncer de hígado y en líneas de hepatocarcinoma, una pequeña subpoblación de células tumorales con propiedades muy particulares, por ejemplo, una alta actividad clonogénica, resistencia a quimio y radioterapia, así como una baja capacidad apoptótica, denominando a esta subpoblación células iniciadoras de tumores (TICs), o como se refirió anteriormente *stem cell like*. Las TICs sobre-expresan la proteína de superficie 1B50-1 que posteriormente mediante anticuerpos monoclonales específicos se identificaría como la subunidad Cav α 2 δ -1. Experimentos de silenciamiento del ARNm que codifica para Cav α 2 δ -1 mostraron que las TICs perdían su capacidad clonogénica e incrementaban su índice apoptótico, dejando en claro la participación de la proteína en el potencial metastásico en células de hepatocarcinoma, aunque aún se desconoce el mecanismo molecular involucrado (Zhao *et al.*, 2013).

La participación de la subunidad Cav α 2 δ -1 en la progresión tumoral no solamente se ha visto en el cáncer de hígado, sino también en otros tipos de cáncer. Por ejemplo, en células tumorales provenientes de cáncer de esófago que sobre-expresan la subunidad Cav α 2 δ -1 se presenta una mayor resistencia a la quimioterapia (Yu *et al.*, 2018). Asimismo, a pacientes con cáncer de ovario que presentan una mayor expresión de Cav α 2 δ -1 tienen una menor expectativa de supervivencia (Yu *et al.*, 2018). Finalmente, el silenciamiento de Cav α 2 δ -1 reduce la capacidad migratoria e invasiva de células de carcinoma de laringe (Huang *et al.*, 2019), y la sobreexpresión de la proteína reduce su sensibilidad a las radiaciones ionizantes en células de cáncer de pulmón (Sui *et al.*, 2018). Estas evidencias dejan en claro la importancia de la subunidad Cav α 2 δ -1 sobre el potencial metastásico de las células tumorales, por lo que resulta de suma importancia estudiar con detalle

los factores o señales que regulan su expresión, con el fin de eventualmente proponer nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento efectivo del cáncer. En este contexto, vale la pena resaltar que hasta el momento se sabe que el factor de transcripción Sp1 regula positivamente la expresión de la subunidad Cav α 2 δ -1 (Martínez-Hernández et al., 2013).

Regulación en la expresión de Cav α 2 δ -1 y su relación con el GB

Factor específico de transcripción 1 (Sp1). Sp1 es un factor de transcripción con un peso aproximado de 100 kDa que pertenece a la familia de proteínas *finger zinc* (Li & Davie, 2010; Suske et al., 1999), que regula tanto en condiciones fisiológicas como patológicas la expresión de diversas proteínas entre las que destacan canales de potasio (Danesh et al., 2011; Kundu et al., 2007; Li & Davie, 2010; Pierce et al., 2010), canales de sodio (Zhang et al., 1999) y la subunidad Cav α 2 δ -1 (Martínez-Hernández et al., 2013). Se sabe que modificaciones postraduccionales de Sp1 como la fosforilación, la acetilación y la glicosilación influyen sobre su actividad transcripcional y su estabilidad. Además, en la región promotora del gen *CACNA2D1*, que codifica para la subunidad Cav α 2 δ -1 de humano, se han identificado dos sitios funcionales de unión a Sp1 y un segmento de nucleótidos (-326 a +98) indispensable para la actividad basal del promotor (Martínez-Hernández et al., 2013). De manera interesante, diversos reportes han mostrado la sobreexpresión de Sp1 en diferentes tipos de cáncer, relacionando su nivel de expresión con el estadio tumoral y el pronóstico desfavorable de supervivencia del paciente (Safe & Abdelrahim, 2005; Li & Davie., 2010; Sankpal et al., 2012).

Por su parte, el silenciamiento o la inhibición de Sp1 reduce la formación de tumores, el crecimiento y la metástasis (Previdi et al., 2010). Finalmente, se ha

reportado que la expresión de Sp1 en células tumorales induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor angiogénico relacionado con la metástasis (Ishibashi et al., 2000; Safe et al., 2014). Asimismo, en sus investigaciones Küper y colaboradores (2012) observaron que la activación de TLR-4 por su ligando endógeno LPS activaba al factor de transcripción NF- κ B involucrando también la regulación de la expresión de Sp1 en células del conducto colector de la médula renal.

La vía de señalización de TLR-4 y su relación con la expresión de Cav α 2 δ -1

El *Toll like receptor 4* (TLR-4) forma parte de la familia TLR de proteínas transmembranales con una estructura similar de tres dominios y una alta homología con la proteína *Toll* de *Drosophila melanogaster*. Estos receptores representan uno de los componentes más antiguos de los mecanismos de defensa inmunológica del huésped (Anderson & Nüsslein-Volhard 1984; Gay & Gangloff 2007; Leulier & Lemaitre, 2008).

La familia TLR comprende un grupo de diez receptores (TLR-1 a TLR-10) caracterizados por la detección de un patrón particular de microorganismos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP), que son invariables para la mayoría de los patógenos, aunque no estén presentes en el organismo de los mamíferos. Los receptores TLR también son sensibles a las partículas secretadas durante la necrosis y la muerte celular denominadas patrones moleculares asociados al peligro (DAMP; Kawai & Akira, 2009; Akira et al., 2006; Krysko et al., 2012). Por lo general, los TLR se agrupan en dos categorías principales, endosomales (TLR-9, TLR-8, TLR-7 y TLR-3) y de acción de superficie celular (TLR-

10, TLR-6, TLR-5, TLR- 4, TLR-2 y TLR-1) (Meng et al., 2008; Medvedev et al., 2006; Aalaei-andabili & Rezaei, 2013).

Los TLR que funcionan endosómicamente, se activan principalmente con ácidos nucleicos, por esta parte una variedad de moléculas puede activar los TLR expresados en la superficie celular. La mayoría de ellos incluyen lipoproteínas. Después de la unión del ligando, los TLR reorientan los dominios y se dimerizan, activando una cascada intracelular que promueve la señalización citoplasmática (Han et al., 2017; Sarrazy et al., 2011). Los mecanismos de autocontrol por ligandos específicos aseguran una reacción adecuada a patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMP), previniendo la autoinmunidad y la respuesta excesiva. TLR-4, después de la unión de un antígeno particular a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o DAMP, se desplaza de la superficie celular para formar el endosoma durante la fagocitosis.

TLR-4 es el único receptor de la familia TLR que no se une directamente a su ligando el lipopolisacárido (LPS) presente en las paredes de bacterias Gram negativas, pues para su unión requiere la ayuda de un correceptor, la proteína MD-2 (Hoffmann, 1995; Medzhitov et al., 1997; Pikarsky et al., 2004). Se cree que las bolsas hidrofóbicas presentes en el ectodominio de TLR-4 permiten la dimerización del receptor mediante la unión de una de las seis cadenas lipídicas en LPS por uno de los receptores, mientras que las cadenas lipídicas restantes de LPS permanecen ocultas en una bolsa hidrofóbica de la proteína MD-2, asociado con una molécula TLR-4 vecina (Casili et al., 2018).

Para unirse a los lipopolisacáridos, TLR-4 requiere una molécula cooperante de diferenciación mieloide 2 (MD-2), lo cual estabiliza el ligando extracelularmente durante la activación. Después de la unión de los antígenos, el receptor se dimeriza

y activa los dominios TIR. Para señalizar correctamente, los TLR requieren de MyD88, un adaptador esencial que se activa durante las primeras etapas después de la unión para promover una respuesta inmune. La activación de TLR-4 transfiere la señalización de dos formas principales, la vía dependiente de TIRAP-MyD88 que controla la promoción del factor nuclear primario kappa-cadena ligera-potenciador de las células B activadas (NF-B), y la combinación producción de citocinas inflamatorias. La activación de MyD88 da como resultado la inducción de la cinasa 1 asociada a IL-1R/factor 6 asociado a TNFR (IRAK-1/TRAF-6) con ubiquitinación colateral, y el TRAF-6 promueve la cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante- β (TAK-1). La activación de TAK-1 da como resultado la formación y promoción del complejo IKK/NF κ -B y la activación de proteínas cinasas por mitógenos-c-Jun. Las cinasas N-terminal son reguladas por señalización extracelular de las vías de señalización MAPK-JNK y ERK1/2. La señalización descendente promueve factores de transcripción, como el Ap1, que regula varios genes relacionados con la inflamación (Viriyakosol et al., 2001; Ohto et al., 2012; Shimazu et al., 1999).

Una segunda vía de señalización de la membrana llamada de asociación de cadena translocada (TRIF-TRAM) y que es independiente de MyD88, activa el factor regulador de interferón-3 (IRF-3). La señalización por TRAM, a través de la activación de TRIF, da como resultado la promoción de TRAF-3 y TRAF-6; RIP es reclutado por TRAF-6 y la señalización RIP se activa en el eje TAK-1/ERK1/2/Ap-1. TRAF-3 activa IKK y TBK-1 para activar IRF-3. IRF-3 como factor de transcripción regula genes, codificando principalmente algunos tipos de IFN y otras citocinas proinflamatorias. La vía independiente de MyD88 estimula la secreción y producción de TNF α . La interacción de TNF α con un receptor adecuado favorece la

activación de NF- κ B. Por tanto, la vía independiente de MyD88 induce la activación de NF- κ B en una fase tardía a través de IRF-3 y la secreción de TNF α . También se promueve la producción de moléculas proinflamatorias, como IFN, pro-IL-1 y pro-IL-6 (Kim et al., 2007; O'Neill & Bowie 2007; Park et al., 2009; Zeuner et al., 2016; Finocchiaro, 2017) (Fig. 4).

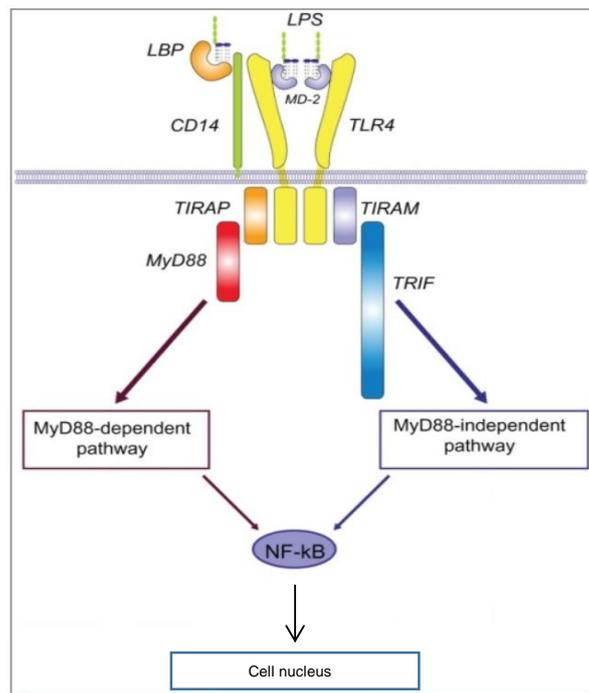


Figura 4. Esquema simplificado de la vía de transducción de señales desencadenada por LPS/TLR4. Esta interacción molecular da como resultado la activación de dos ramas, una canónica mediada por MyD88 y la otra independiente de MyD88. Ambas convergen en el factor de transcripción NF- κ B para señalizar en el núcleo celular. Modificado de Lu et al., 2008.

Asimismo, diversos trabajos han reportado la expresión de TLR-4 en células provenientes de GB, y que su estimulación por LPS promueve la activación de las vías NF- κ B, y la translocación nuclear de NF- κ B. Como consecuencia de la activación de estas vías de señalización se produce la transcripción de genes, la proliferación y migración celular (Che et al., 2017; Zeuner et al., 2016).

Con estos antecedentes en el presente trabajo de tesis se evaluó la participación de la subunidad $\alpha_2\delta-1$ de los canales de calcio dependientes de voltaje en la proliferación y migración de las células U87 de GBM y su posible regulación a través de la activación de TLR-4. Así, al desencadenarse la vía de señalización que provoca la translocación de NF- κ B, se podría aumentar la expresión de Sp1 que como se ha reportado en trabajos previos (Martínez- Hernández et al., 2013), regula la expresión de $\alpha_2\delta-1$. De esta manera, se los resultados aquí mostrados podrían ayudar a conocer más acerca del desarrollo y progresión del glioblastoma, y podrían también eventualmente a ampliar el arsenal de marcadores moleculares y blancos farmacológicos para el padecimiento.

Justificación

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral primario más agresivo en adultos, representando > 70% de los tumores del sistema nervioso central. Después de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, la supervivencia sigue siendo baja, < 15 meses.

Una de sus principales características del GB es su alta tasa proliferativa y su capacidad para invadir tejido circundante, por lo que conocer los aspectos moleculares involucrados en estos procesos celulares podrían ayudar a buscar nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas.

En investigaciones recientes se ha visto que la sobreexpresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ afecta la progresión tumoral, favoreciendo la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de algunos tipos de cáncer (hígado, laringe, pulmón y ovario), y aunque no se conoce su participación en tumores del sistema nervioso central, parece ser un elemento molecular importante en la patogénesis de la enfermedad.

Hipótesis

La sobreexpresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ de los canales de calcio dependientes de voltaje favorece el potencial proliferativo y migratorio de las células de glioblastoma humano.

Objetivo General

Determinar el papel de la subunidad auxiliar Cav α 2 δ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje en el desarrollo y progresión del glioblastoma humano.

Objetivos Particulares

- 1) Determinar la expresión de la subunidad Cav α 2 δ -1 en las células de glioblastoma humano U87.
- 2) Evaluar el efecto del silenciamiento y la sobreexpresión de la subunidad Cav α 2 δ -1 sobre el potencial proliferativo y migratorio de las células U87.
- 3) Determinar la expresión de Sp1 y TLR-4 en las células U87.
- 4) Evaluar el efecto del silenciamiento o sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 sobre la expresión de Cav α 2 δ -1 y sobre el potencial proliferativo y migratorio de las células U87.
- 5) Determinar si la activación de TLR-4 modifica los niveles de expresión de Sp1, y definir la posible vía de señalización intracelular involucrada.

Materiales y Métodos

Reactivos y fármacos

Para la activación de TLR-4 se utilizó su ligando exógeno, el lipopolisacárido de *Escherichia coli* LPS (Sigma-Aldrich). Para los tratamientos el LPS se agregó a una concentración de 10 µg/ml y se incubó por 48 h. Asimismo, se utilizó Gabapentina (Sigma-Aldrich) como antagonista de la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 a diferentes concentraciones (desde 1 a 100 µM). Por otro lado, se utilizó C34 (Sigma-Aldrich) como antagonista de TLR-4, a una concentración de 10 µM. Finalmente, se empleó el bloqueador del NF- κ B (pyrrolidine dithiocarbamate; PDTC) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µM.

Cultivo celular

Las líneas celulares de GBM humano U87MG, y de neuroblastoma SH-SY5Y, se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en monocapa usando medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) (Thermo Fisher Scientific), suplementado con suero fetal bovino al 10% y 100 µg/ml de estreptomina más 100 µl/ml de penicilina. Las células se mantuvieron en una temperatura constante de 37 °C con una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

Inmunocitoquímica

Las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm, y al alcanzar una confluencia del 80-90% se fijaron en glutaraldehído al 2% en PBS durante 30 min. A continuación, se lavaron en fructosa al 4.5% y se incubaron en H₂O₂ para bloquear la peroxidasa endógena, seguida de 3 h de incubación en suero de caballo para bloquear la unión

inespecífica. Posteriormente, las células se incubaron en ausencia o en presencia de anticuerpos primarios anti-Cav $\alpha_2\delta$ -1, anti-Sp1 y anti-TLR-4, respectivamente (Santa Cruz Biotechnology), a una dilución de 1:500, durante toda la noche a 4 ° C, seguido por el anticuerpo secundario biotinilado apropiado durante 2 h a temperatura ambiente a una dilución de 1:1000). El anticuerpo se localizó usando estreptavidina-HRP durante 20 min a temperatura ambiente.

Extracción de proteínas y *Western blot*

Para la extracción de proteínas y el análisis por Western blot, las células U87 se sembraron en cajas Petri de 60 mm, y al alcanzar una confluencia de 90-100%, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente se agregaron 250 μ l de tampón de lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (en mM): 100 Tris-HCl (pH 8.0), 150 NaCl, 1 EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 0.5% sodio desoxicolato, 0,1% SDS, fluoruro de 1 fenilmetilsulfonilo (PMSF) y Complete 1 (Roche). A continuación, se incubó una alícuota de la muestra en hielo durante 30 min. El lisado celular se recuperó después de centrifugarse (12000 x g; 2 min) y se recolectó el sobrenadante. Para la electroforesis se utilizaron las proteínas a una concentración de 30 μ g en un tampón de Laemmli 1 (SDS al 1.6%, 2-mercaptoetanol 0.1 M, glicerol al 5%, 4Tris-Cl/SDS 0.083 M; pH 6.8) y azul de bromofenol al 0.002%. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y las proteínas se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en un tampón de electroforesis SDS (base Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%). Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m y se tiñeron con rojo de Ponceau. Después de lavar la membrana con solución salina tamponada con Tris (TBS)-Teen 20 (TBST) y bloquearla con leche

descremada al 5% en TBST (2 h a temperatura ambiente), las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti- $\alpha_2\delta-1$ (1:1000), anti-Sp1 (1:1000), anti-TLR-4 (1:500), anti- β -actina (1: 10,000) (Santa Cruz Biothecnology). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón (1:10,000) o anti-conejo (1:10,000), y la inmunodetección de proteínas se realizó utilizando el reactivo Immobilon Western (Millipore). La quimioluminiscencia se detectó con el sistema de imágenes Odyssey Fc (LI-COR).

Ensayos de luciferasa

Veinticuatro horas después de la siembra, las células a una confluencia de ~ 80% se sometieron a transfección transitoria utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se co-transfectaron con 2 μ g de la construcción que contiene el promotor del gen que codifica para $\alpha_2\delta-1$ y 0,4 μ g de una construcción que codifica para un gen reportero, pRSV- β Gal. Esta última construcción dirige la expresión del gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous, y ayuda a determinar la eficiencia de la transfección. Una vez concluido el tratamiento con LPS, la actividad de la luciferasa se cuantificó por triplicado 48 h después de la transfección, utilizando un sistema de ensayo comercial (Promega) y un luminómetro (Turner BioSystems). Para corregir las diferencias en la eficacia de transfección, las actividades de luciferasa se normalizaron a los valores de β -galactosidasa en cada muestra individual.

Ensayos de proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular se realizaron con un contador automático de células Countes II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific). Para el conteo de células la muestra se obtuvo a partir del cultivo celular U87 y bajo el microscopio de campo claro se realizó un conteo previo a la siembra. A continuación, se sembraron 1×10^6 células/ml en cajas Petri de 35mm, con un crecimiento en monocapa, y al alcanzar una confluencia del 60-70% se iniciaron los diferentes tratamientos con los agonistas y antagonistas de TLR-4, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, así como los silenciamientos y la sobreexpresión de TLR-4, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y Sp1. Posteriormente, 48 h después de iniciados los tratamientos, se procedió a obtener la muestra para el conteo celular, para lo cual se tripsinizó el cultivo celular, tomando 50 μ l de la suspensión celular, a los cuales se añadieron 50 μ l de azul de tripano al 0.4%. La mezcla se homogenizó, se dejó reposar durante 30 s, y posteriormente se cargaron 10 μ l de la muestra por cámara esperando 30 s para que se establezca el contenido, y después se insertó la cámara (*cell counting Chamber slide*). El instrumento se enfocó y configuró automáticamente, capturando la imagen y mostrando los resultados de concentración y porcentaje de células vivas y muertas en la muestra.

Ensayos de migración celular

El ensayo de migración se realizó en cámaras “transwell” de 24 pozos con filtros Nucleopore de policarbonato de 8 μ m. Inicialmente, los filtros se lavaron con DMEM sin suero y se colocaron en placas de 24 pozos. Las cámaras inferiores contenían DMEM suplementado con FBS al 3%. Para las cámaras superiores, se realizó el conteo celular de cada condición a fin de colocar 3×10^4 células en 300 μ l de medio

DMEM libre de FBS. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Después de 12 h, las células que no migraron se retiraron de las cámaras, mientras que las células que migraron a través de las membranas se fijaron con metanol-acetona 1:1 y se tiñeron con cristal violeta al 0.5%. El número de células que migraron se cuantificó contando diez campos visuales seleccionados al azar.

Silenciamiento usando ARN pequeños de interferencia (siRNAs)

El *knockdown* de Cav α 2 δ -1, Sp1 y TLR-4 se realizó utilizando ARN pequeños de interferencia (siRNAs), (sc-89621 Cav-1, sc-29487 Sp1 y sc-40260 TLR-4, Santa Cruz Biothecnology). Para cada transfección se utilizaron 150 pmol de siRNA, empleando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión Sigma Plot 12.3. Todos los datos se presentan como valores medios \pm DE. Se utilizó la prueba *t* de Student para determinar diferencias significativas entre los grupos. Valores *P* < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Las células U87 expresan Cav α 2 δ -1, Sp1, TLR-4

La primera serie de ensayos desarrollados en el presente trabajo estuvieron enfocados en la evaluación de la expresión proteica basal por medio de *Western blot* e inmunocitoquímica en la línea celular U87 de los tres elementos moleculares de mayor interés para la tesis, Cav α 2 δ -1, Sp1 y TLR-4. Las células SHSY-5Y se utilizaron como un control positivo, ya que se conocía por trabajos previos (Martinez-Hernandez et al., 2013) que esta línea expresa al menos dos de estos elementos Cav α 2 δ -1 y Sp1. Los datos muestran que las células U87 expresan a la subunidad Cav α 2 δ -1, encontrándola en los ensayos de *Western blot* en el peso molecular esperado de ~170 kDa y presentando inmunoreactividad para el anticuerpo que reconoce de manera específica a Cav α 2 δ -1 (Figs. 5A y 5B). De igual manera, en esa misma serie de experimentos se observó una banda con un peso molecular de ~100 kDa que corresponde a tamaño esperado del factor de transcripción Sp1 (Fig. 5C), así como otra banda con un peso molecular de ~95 kDa que corresponde a TLR-4 (Fig. 5E). Al igual que para Cav α 2 δ -1 en ambos casos los experimentos de inmunocitoquímica evidenciaron inmunoreactividad para los anticuerpos correspondientes (Figs. 5D y 5F).

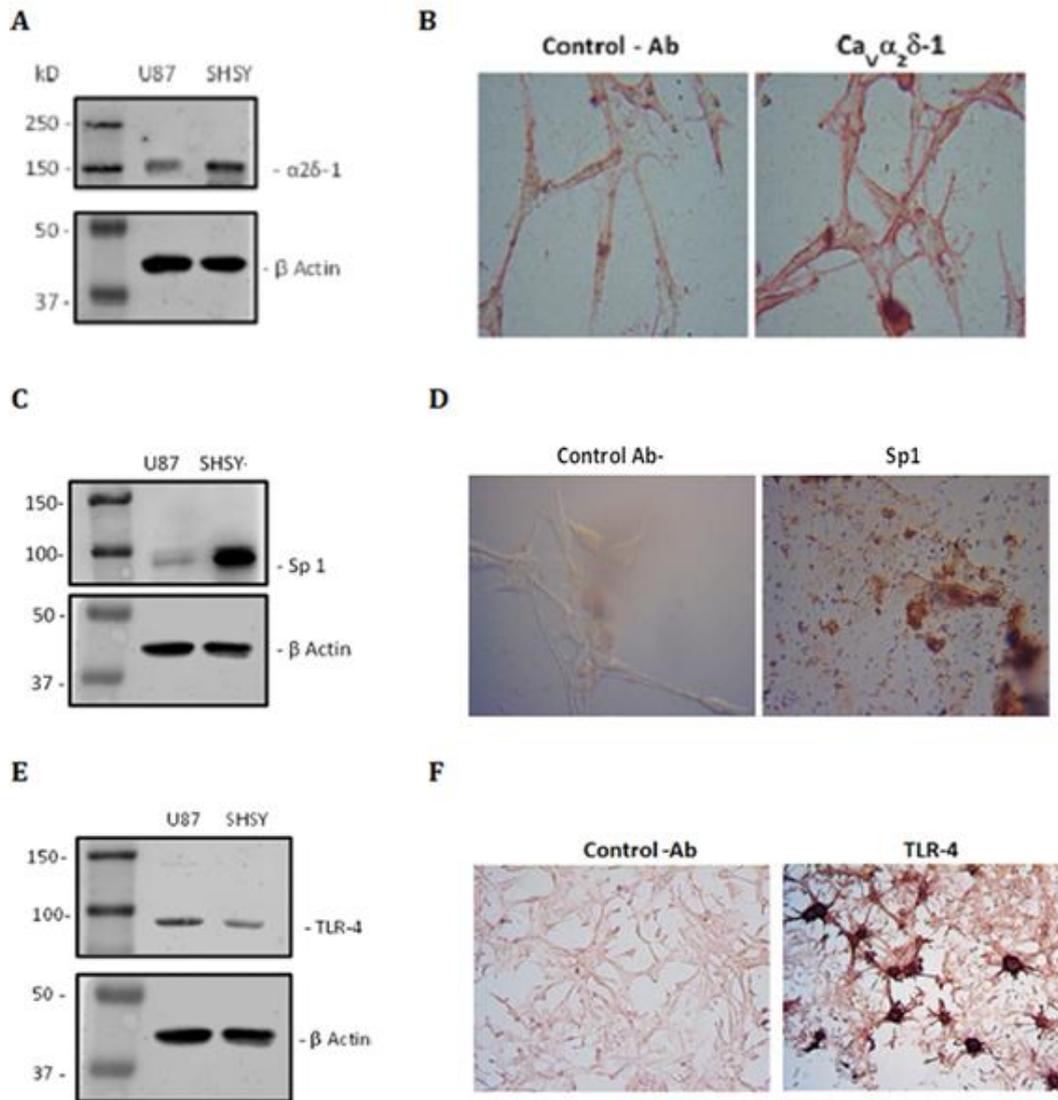


Figura 5. Las células U87 expresan la subunidad Cav α 2 δ -1, Sp1, TLR-4. Los *blots* en la columna de la izquierda muestra los resultados de los experimentos de *Western blot* (paneles A, C y E), mientras que a la derecha se muestra el análisis por inmunocitoquímica para cada uno de los elementos moleculares de interés: Cav α 2 δ -1, Sp1 y TLR-4 (paneles B, D y F). Los datos indican que las tres proteínas se encuentran expresadas en las células U87 de glioblastoma ($n=3$).

La activación de TLR-4 favorece la expresión de Cav α 2 δ -1

Una vez que se confirmó la presencia de TLR-4 y Cav α 2 δ -1, se evaluó si la activación del receptor (TLR-4) regulaba la transcripción y la expresión de Cav α 2 δ -1, para lo cual inicialmente se realizaron ensayos de luciferasa con el fin de evaluar la

actividad del promotor del gen que codifica para Cav α 2 δ -1 en presencia y en ausencia de LPS. Así, se transfectaron las células con el promotor de la subunidad de los canales, se aplicaron los tratamientos con LPS durante 48 h, y posteriormente se evaluó la actividad de la luciferasa. Los datos muestran que en presencia de LPS aumenta significativamente la actividad de la luciferasa en comparación a la condición control (Fig. 6A). Por otro lado, el panel B de la figura 6 muestra la expresión de la proteína Cav α 2 δ -1 en presencia y ausencia de LPS. La imagen es representativa en un ensayo de *Western blot* de tres experimentos independientes, y muestra una banda de mayor densidad en la condición de tratamiento con LPS. En el panel C se muestra el resumen del análisis de los tres experimentos, observándose que la diferencia en la densidad de la banda para Cav α 2 δ -1 es estadísticamente significativa en presencia de LPS en comparación con la condición control. Estos resultados confirman que, al ser activado, el receptor TLR-4 desencadena vías de señalización que regulan positivamente la expresión de Cav α 2 δ -1.

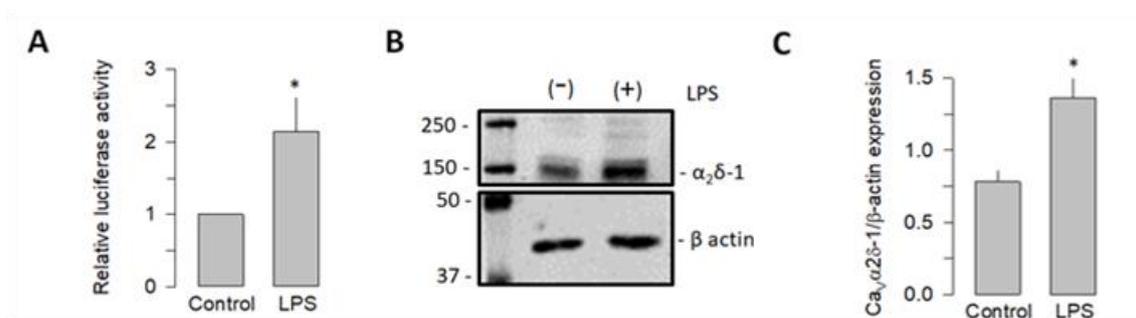


Figura 6. Papel de la activación de TLR-4 en la expresión de Cav α 2 δ -1. A) El tratamiento con LPS aumenta la actividad transcripcional del promotor del gen de la subunidad Cav α 2 δ -1 (*CACNA2D1*) en las células de U87. B) La expresión proteica de Cav α 2 δ -1 en presencia de LPS se evaluó por *Western blot*, según se indica. β -actina se usó como control de carga. C) La gráfica de barras muestra la cuantificación de la señal de Cav α 2 δ -1 normalizada con respecto a β -actina en lisados celulares tratados con 10 μ g/ml de LPS durante 48 h ($n=3$) $p<=0.002$. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas.

La activación de TLR-4 favorece la proliferación y migración celular

Para estudiar los efectos del LPS sobre la proliferación de las células U87, a continuación, se realizaron ensayos de conteo celular automatizado después de mantener a las células por 48 h en ausencia (control) y presencia del lipopolisacárido. Los resultados muestran que la activación de TLR-4 estimula la proliferación celular de la línea U87 (>5 veces) en relación con la condición control (Fig. 7). Asimismo, para evaluar si el efecto observado se producía por la activación de TLR-4, se utilizó un antagonista del receptor conocido como C34. Después de esta maniobra experimental, los datos muestran que la presencia de C34 previene significativamente el efecto del LPS (Fig. 7). De esta manera se corroboró que la activación del receptor TLR-4 con LPS induce un aumento en la proliferación de las células U87.

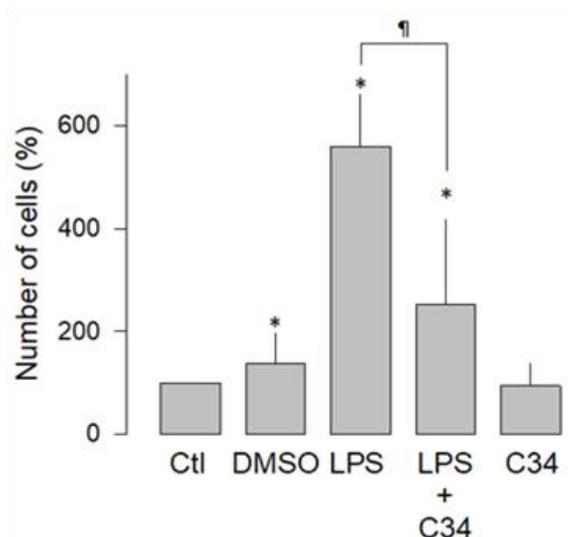


Figura 7. Efecto de la activación de TLR-4 sobre la proliferación de las células U87. En la gráfica se comparan los promedios del conteo celular en cinco condiciones experimentales distintas. El DMSO se usó como vehículo para diluir el antagonista de TLR-4, C34 y sirvió como control. Los experimentos se realizaron en presencia y en ausencia (control) de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y utilizando el antagonista de TLR-4 (C34) durante 48 h ($n=5$). Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los efectos del LPS sobre la migración de las células U87 se evaluaron semicuantitativamente por medio de ensayos de reparación de la herida y de migración en cámaras “transwell”. Así, después del tratamiento con LPS durante 48 h, se procedió por un lado a realizar una herida en las monocapas del cultivo celular, y por otro lado, a la siembra de las células en las cámaras. Doce horas después, las células se fijaron y tiñeron, y se procedió a determinar el área de cierre de herida y el conteo celular de diferentes campos en las cámaras “transwell”. Los resultados indican que en presencia de LPS (5 µg/ml), el área de la herida es menor en comparación con el control y que el cierre de la herida es aún mayor cuando se usan 10 µg/ml. Estos datos sugieren que el efecto del LPS sobre la migración celular es dependiente de la concentración (Figs. 8A y 8B). En el ensayo en cámaras “transwell”, se verificó que el aumento en la migración de las células U87 se llevó a cabo a través de la activación del receptor TLR-4, usando el antagonista C34. En la figura 8C se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes en las diferentes condiciones experimentales (control, LPS, C34 y LPS + C34), mientras que en la figura 8D se presenta el resumen gráfico de dichos experimentos. El análisis de estos datos sugiere que la migración celular se ve favorecida en presencia de LPS a través de la activación de TLR-4. Al igual que ocurrió con el ensayo de cierre de la herida, la presencia del antagonista previno el efecto del LPS en los ensayos de cámara “transwell”.

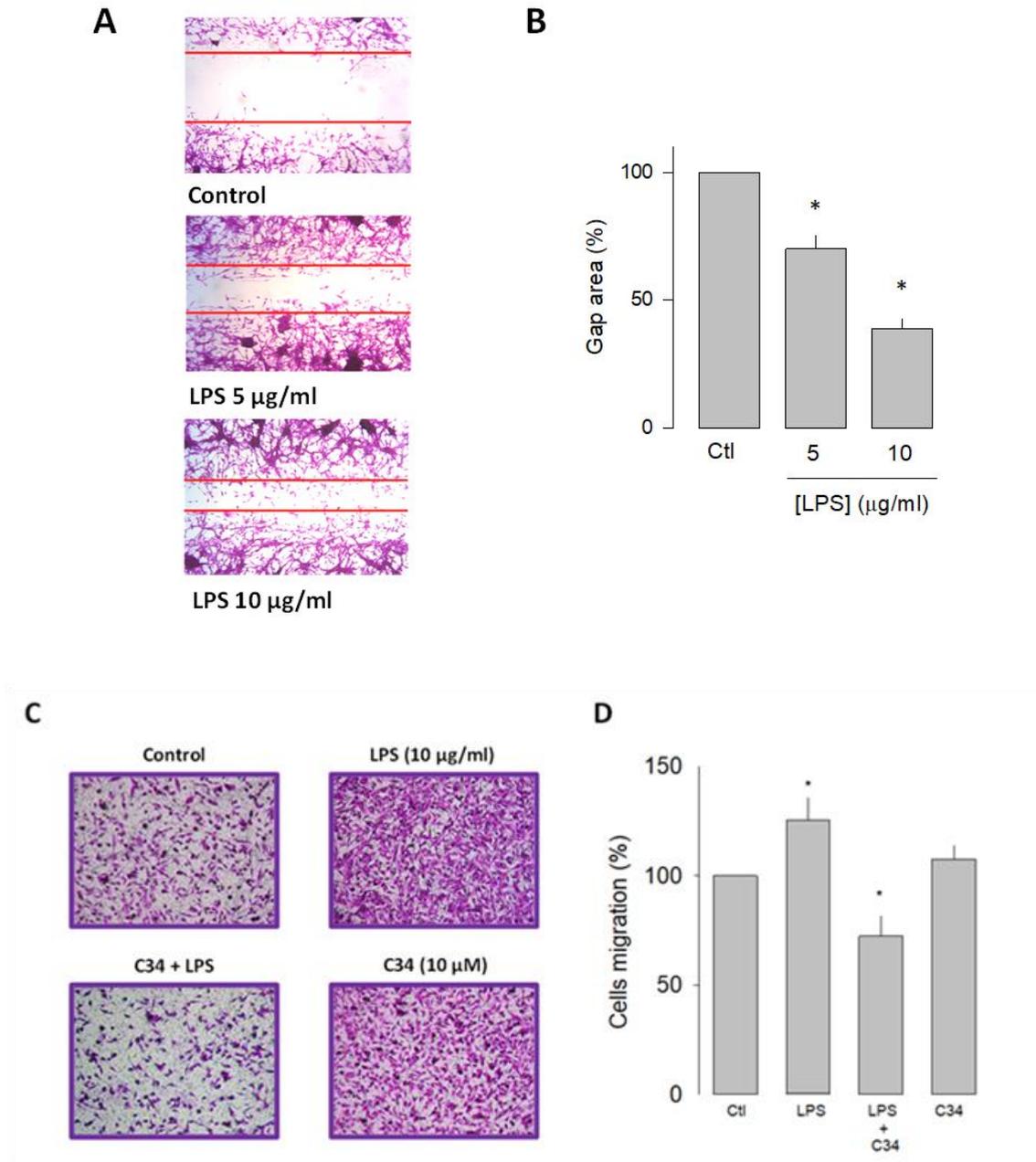


Figura 8. Efecto del LPS sobre la migración de las células U87. A) Imágenes representativas obtenidas en presencia del lipopolisacárido y del antagonista de TLR-4, C34, sobre la migración celular estimada como el área de la herida. B) comparación del área de la herida en la condición control y en presencia del lipopolisacárido (LPS) a dos concentraciones diferentes, según se indica. C) Imágenes representativas obtenidas en presencia del lipopolisacárido y del antagonista de TLR-4, C34, sobre la migración celular estimada en las cámaras “transwell”. D) Porcentaje de células que migraron en las diferentes condiciones experimentales ($n=3$). Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

La sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 aumenta la proliferación y migración celular

Una vez que se evaluaron las acciones del LPS sobre la proliferación y migración celulares, a continuación, se evaluó el posible efecto de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 sobre la proliferación de las células U87 celular, tal y como se ha sido reportado en trabajos previos para células de hepatocarcinoma (Zhao et al., 2013). En primer lugar, se procedió a determinar la concentración del plásmido que favoreciera la expresión óptima de Cav $\alpha_2\delta$ -1 (Fig. 9). La figura 9A muestra una imagen representativa de un ensayo de *Western blot* y en la figura 9B el resumen de la comparación de la media aritmética de una serie de tres experimentales independientes. Los datos muestran que a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se obtiene un valor óptimo de expresión, por lo que se utilizó en los experimentos subsecuentes.

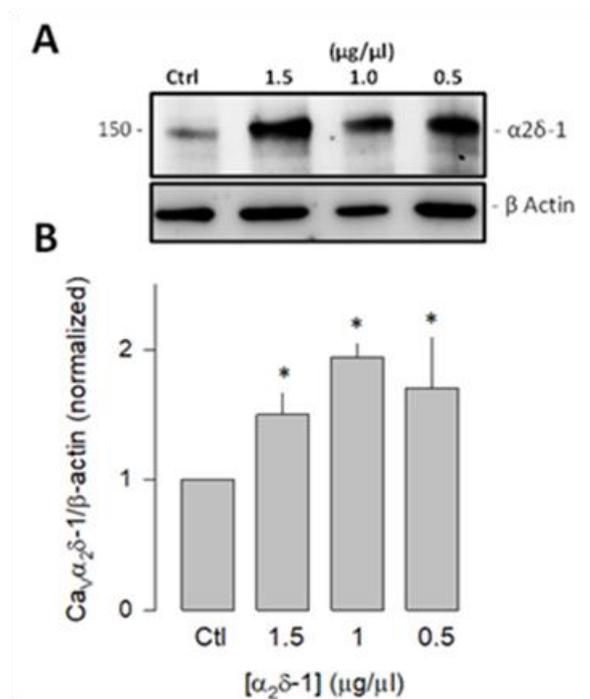


Figura 9. Determinación de la concentración óptima del plásmido para la expresión heteróloga de Cav $\alpha_2\delta$ -1. A) Imagen representativa de un experimento de *Western blot* de la expresión de la proteína en células U87, 48 h después de la transfección con diferentes concentraciones de plásmido. B) Gráfica que compara el nivel de expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 a las diferentes concentraciones del plásmido como en A (n=3; p<0.05).

Las figuras 10A y 10D muestran el análisis por *Western Blot* de la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1 en las células U87, en donde se corrobora que, efectivamente, existe un mayor nivel de expresión de la proteína después de la transfección con el plásmido que contiene el ADNc que codifica para la subunidad Cav α 2 δ -1. Finalmente, la figura 10C, muestra el resultado del conteo celular en condiciones control y después de la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1. De manera interesante los datos muestran que la sobreexpresión de la subunidad aumenta el número de células y que este es aún mayor en presencia de LPS. Como podía adelantarse con base en los datos previos, el efecto del lipopolisacárido se previene en presencia del antagonista de TLR-4 (C34), confirmando que Cav α 2 δ -1 favorece la proliferación de las células de glioblastoma a través un mecanismo que involucra la activación del receptor TLR-4.

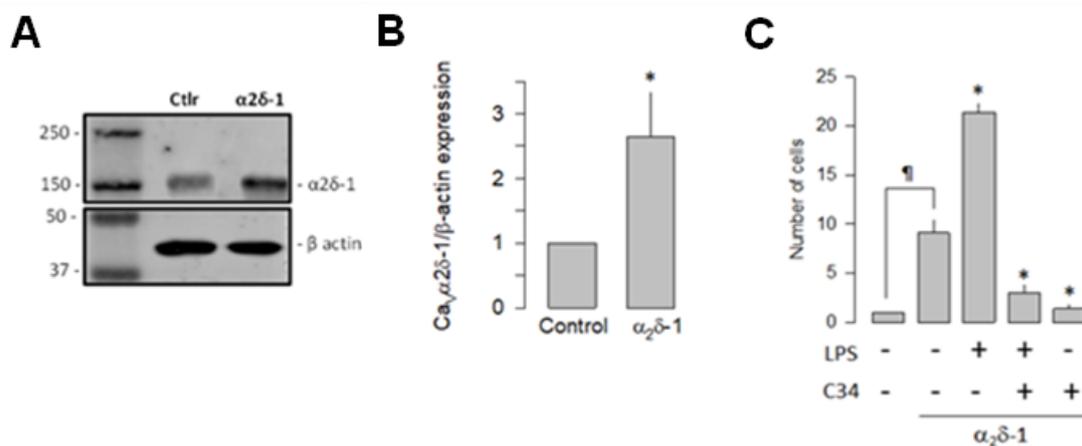


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1 sobre la proliferación celular. A) Imagen típica de un experimento de *Western blot* que muestra la expresión de Cav α 2 δ -1 normalizada con respecto al control de carga (actina) en condiciones control y después de la transfección. B) Análisis comparativo de la expresión de Cav α 2 δ -1 como en A. C) La gráfica muestra el análisis comparativo del conteo celular después de la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1 en presencia y ausencia del agonista (LPS) y del antagonista de (C34) de TLR-4, según se indica. Los datos se presentan

como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($n=4$; $p<0.05$).

Al igual que la proliferación, la migración celular también se ve favorecida después de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1. Esta inferencia se desprende de los ensayos de migración en cámaras “transwell” que se realizaron en células U87, tanto en condiciones basales como después de la sobreexpresión de la subunidad, en presencia y en ausencia de LPS. Los datos muestran la presencia de un mayor número de células cuando se sobre-expresa Cav $\alpha_2\delta$ -1, y que este número se incrementa significativamente en presencia del lipopolisacárido (Fig. 11).

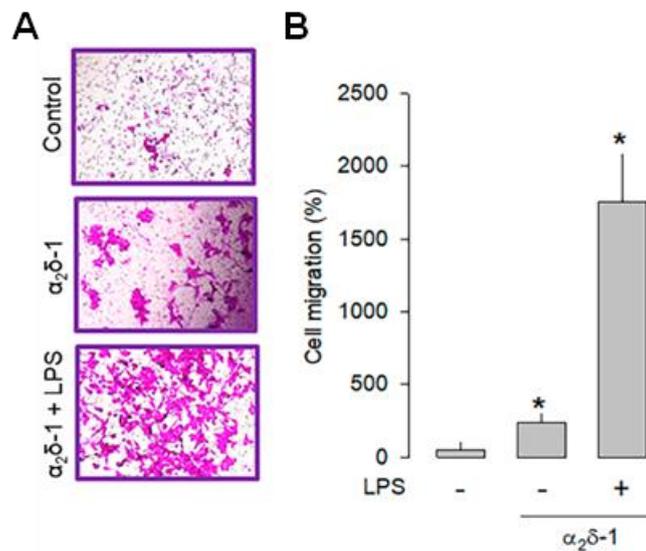


Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 sobre la migración de las células U87. A) Imágenes representativas de ensayos de migración en la condición control y después de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1, en presencia y en ausencia de LPS. B) Análisis comparativo de los resultados obtenidos en una serie de experimentos como los mostrados en A. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($n=3$; $p<0.05$).

Estudios previos han mostrado que la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 aumenta la expresión de los canales de Cav nativos y recombinantes en la membrana celular.

Asimismo, se sabe que esta proteína hace que los canales sean sensibles a los efectos inhibidores de un grupo de fármacos antiepilépticos/analgésicos llamados gabapentinoides, que incluye a la gabapentina, la pregabalina y el AdGABA (Zoidis et al., 2005; Thorpe & Offord, 2010). Dado que los datos de la sección anterior implican un papel de Cav α 2 δ -1 en la migración celular, a continuación, se exploró la posibilidad de que la gabapentina también pudiera afectar la migración de las células U87. Los resultados de este análisis mostraron que la exposición crónica (48 h) a gabapentina (25 μ M) impidió el efecto estimulante del LPS sobre la capacidad migratoria de las células U87 del neuroblastoma y corroboró la contribución de la subunidad Cav α 2 δ -1 al proceso de migración celular (Fig. 12).

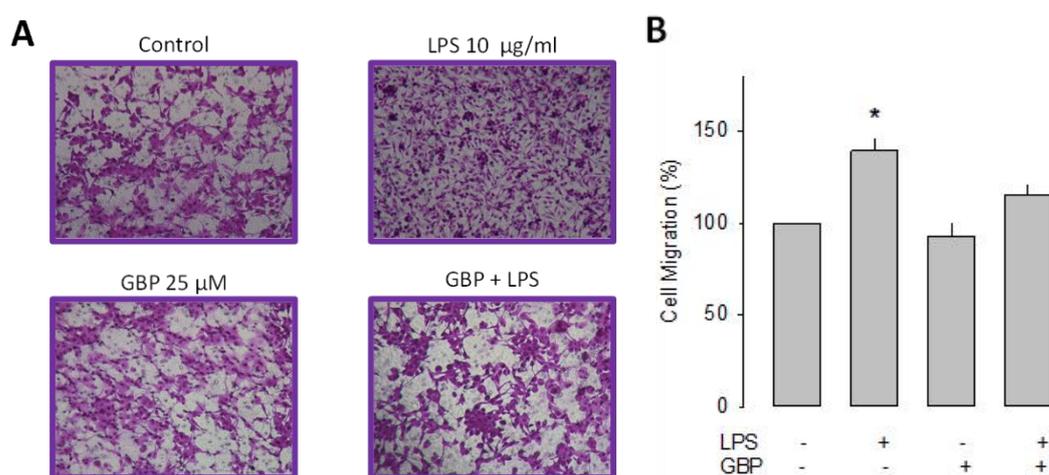


Figura 12. Efecto de la gabapentina sobre la migración de células U87. A) Imágenes representativas de tres experimentos realizados por separado de ensayos de migración en cámaras “transwell”, en presencia o ausencia del activador de TLR-4 (LPS) y el antagonista de la subunidad Cav α 2 δ -1 (gabapentina). B) Análisis comparativo de la media \pm EE de 3 experimentos independientes en las cámaras “transwell”. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$ en comparación con las células no tratadas).

Asimismo, la evidencia experimental sugiere una acción directa de la estimulación con LPS sobre la proliferación y migración celular mediada por Cav α 2 δ -

1. Para corroborar de una manera adicional la participación de Cav α 2 δ -1 en estos eventos celulares, realizamos una serie de experimentos en presencia de trombospondina-1, un ligando endógeno de la subunidad Cav α 2 δ -1 (Eroglu et al., 2009). Dado que las trombospondinas (TBPs) son moléculas de la matriz extracelular relevantes en la sinaptogénesis y otros eventos de organización celular (Risher et al., 2018), tales experimentos podrían sugerir posibles interacciones específicas entre las células de glioblastoma y su entorno celular. Sin embargo, el objetivo central de estos experimentos fue determinar la capacidad que pudiera tener la trombospondina-1 para inducir la proliferación en las células U87. Después de 48 h de estimulación, la curva dosis-respuesta presentada en la figura 13A muestra que la TSP induce un aumento significativo en la proliferación de las células U87, con la mitad del efecto máximo alcanzado a \sim 0.5 nM y un efecto máximo observado a 1 nM. La estimulación por TSP a 1 nM aumentó la proliferación celular a un nivel similar al inducido por LPS (5 μ g/ml).

De igual manera, en experimentos posteriores, se examinó el efecto de TSP sobre la migración de células U87 (Fig. 13B). Por lo tanto, este análisis muestra que la incubación con TPS también afecta significativamente la migración celular, produciendo un aumento de \sim 25% con respecto a la condición de control (Fig. 11C). Estos datos apoyan la idea de que la subunidad Cav α 2 δ -1 regula la proliferación y la migración de las células U87.

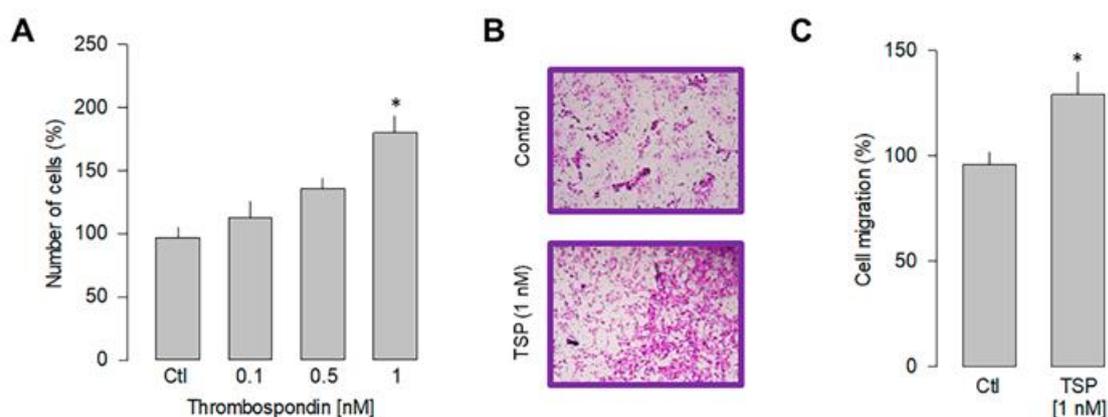


Figura 13. Efecto de la trombospondina-1 sobre la proliferación y migración celular. A) Comparación de la proliferación de células U87 en respuesta a varias dosis de trombospondina-1 según se indica. B) Imágenes representativas de tres experimentos separados de ensayos de migración en cámaras “transwell” en presencia o en ausencia de trombospondina-1 (TSP; 1 nM), un activador de la subunidad Cav α 2 δ -1, después de 48 h de incubación. C) Análisis comparativo de tres experimentos independientes en cámaras “transwell” como en B. Los datos muestran la media \pm SEM de tres experimentos separados. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición de control ($p < 0.05$, en comparación con las células no tratadas).

La sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 aumenta la proliferación y migración celular

Estudios previos en tumores humanos han mostrado que Sp1 y TLR-4 participan en el desarrollo del glioblastoma (Chang et al., 2017; Casili et al., 2018), por lo que a continuación se realizaron experimentos para evaluar su participación en la proliferación y migración celular en las células U87. Los resultados de esta serie de experimentos muestran que la sobreexpresión tanto de Sp1 como de TLR-4 produce un aumento significativo en la proliferación celular, aunque menor que el observado después de la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1 (Fig. 14A). De igual manera, la sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 favorece la migración celular (Fig. 14B), y en este caso el efecto es significativamente mayor que el producido por la sobreexpresión de Cav α 2 δ -1. Estos hallazgos corroboran que la subunidad Cav α 2 δ -1 contribuye a la proliferación y migración celular de las células U87, y sugieren que la

sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 también participan de manera determinante en la proliferación y migración de las células de glioblastoma.

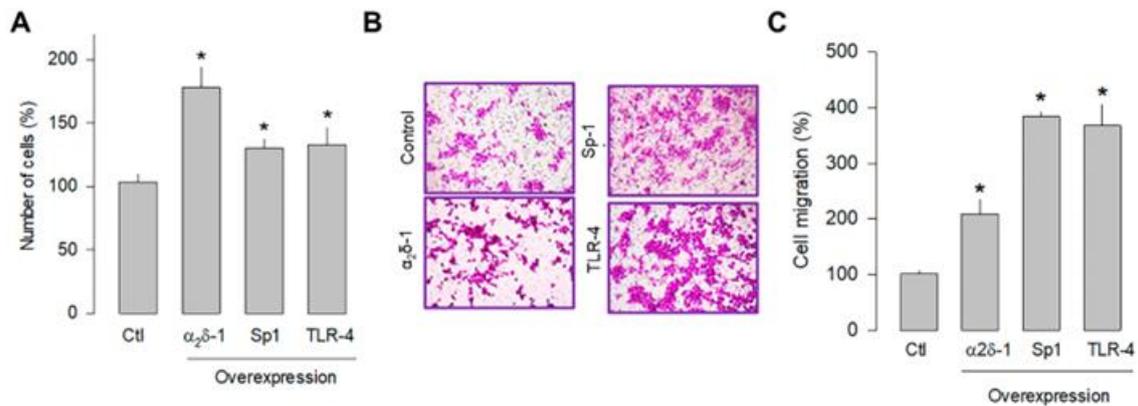


Figura 14. Efecto de la sobreexpresión de $Cav\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4 sobre la proliferación y migración celular. A) Comparación de los datos del conteo celular automático de células en los cultivos de la línea celular U87. La determinación se realizó después de 48 h de la transfección. B) Comparación de la migración celular en las mismas condiciones experimentales que en A. Las células se sembraron en cámaras “transwell”, y después de 12 h se fijaron y tiñeron (panel izquierdo). En el panel derecho se muestra la comparación de los resultados expresados como porcentaje del control. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($n=3$; $p<0.005$).

El silenciamiento de $Cav\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4 afecta la proliferación y migración celular

Con el fin de verificar si $Cav\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4 estaban relacionados directamente con la proliferación y la migración de las células U87, a continuación, se empleó una estrategia de *knockdown* (silenciamiento) para cada una de estas proteínas, utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) que se transfectaron antes de someter las células a ensayos de proliferación (conteo celular) y migración (en cámaras “transwell”). Los resultados de esta serie de experimentos muestran que el silenciamiento mediante el uso de siRNAs específicos tanto contra $Cav\alpha_2\delta-1$, como

contra Sp1 o TLR-4, disminuye significativamente el número de células en los cultivos, así como su capacidad de migración en las cámaras “transwell” (Figs. 15A y 15B). Estos datos corroboran que las tres proteínas estudiadas se relacionan con la capacidad proliferativa y migratoria de las células de glioblastoma.

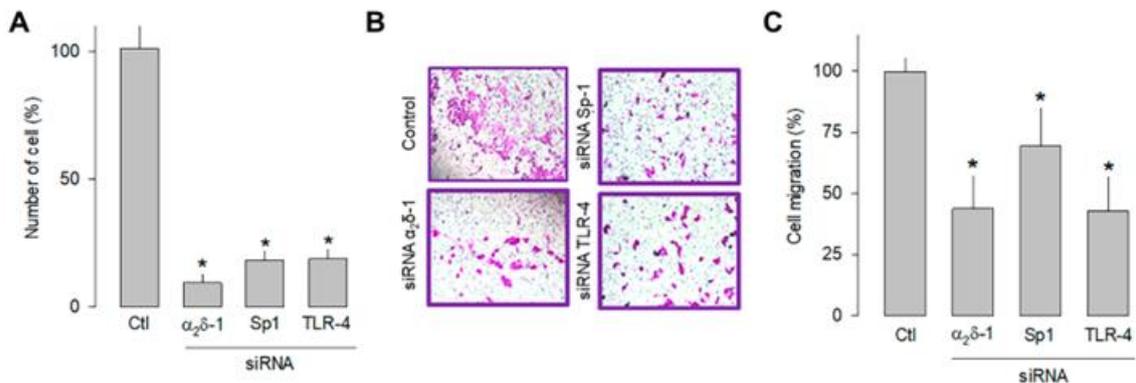


Figura 15. Efecto del silenciamiento de Cav $\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4 sobre la proliferación y migración celular. A) Comparación del conteo celular en cultivos sometidos al silenciamiento transitorio de Cav $\alpha_2\delta-1$, Sp1 y TLR-4; la proliferación se avaluó después de 48 h. B) Imágenes representativas de cultivos sujetos al silenciamiento como en A (panel izquierdo). C) Comparación del porcentaje de células que migraron en después del silenciamiento de la expresión de las proteínas. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($n=3$ $p<0.005$).

La señalización por NF- κ B/Sp1 activada por TLR-4 regula la expresión de Cav $\alpha_2\delta-1$

A continuación, se investigó a través de qué vía de señalización desencadenada por la activación de TLR-4 podría estar dando el aumento en Sp1 que finalmente converge en la expresión de $\alpha_2\delta-1$. Con este fin, se planteó una serie de experimentos empleando un bloqueador del factor nuclear κ B (NF- κ B), pues se sabe que tras la activación de TLR4 se activan dos vías de señalización, una canónica dependiente de MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) y otra no canónica dependiente de una proteína llamada TRIF (*Toll/IL-1R domain-containing adapter-inducing IFN- β*).

Ambas vías involucran una translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B provocando la regulación en la expresión de diferentes proteínas incluyendo Sp1. Por esta razón, se decidió evaluar la expresión de Sp1 y Cav α 2 δ -1 en presencia y ausencia del bloqueador de NF- κ B conocido como pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC; Figs. 16A y 16B). Los resultados muestran que al bloquear la actividad de NF- κ B con PDTC, se disminuye significativamente tanto la expresión de Sp1 como de Cav α 2 δ -1. Esta inhibición se mantiene aún en presencia de LPS, lo que apoya la idea de que la activación de TLR-4, desencadena la formación del complejo IKK/NF- κ B, regula la expresión de Sp1 y Cav α 2 δ -1.

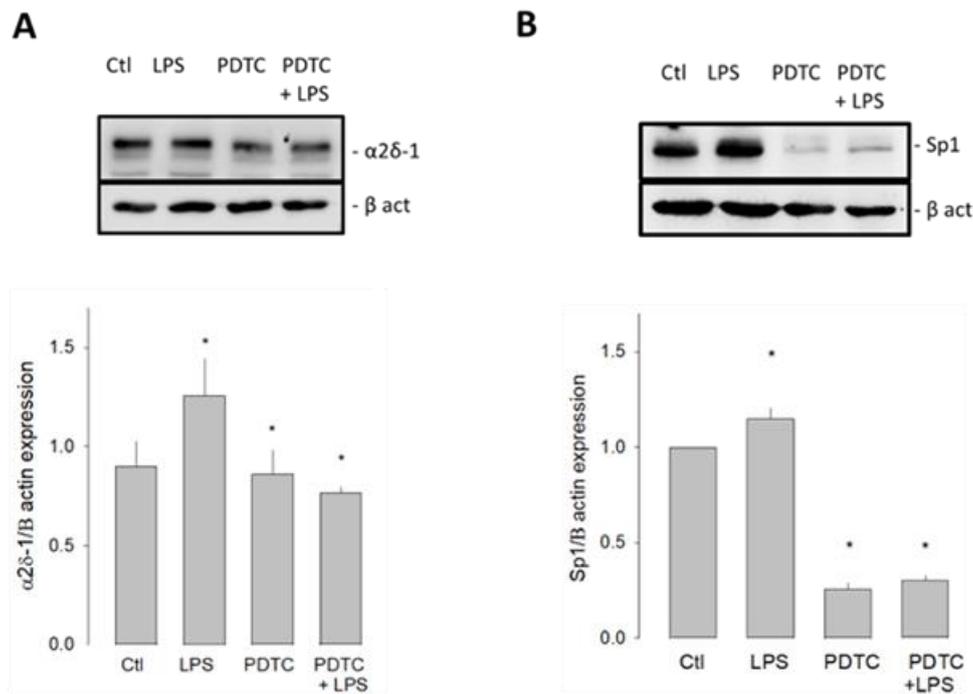


Figura 16. La activación de TLR-4 regula la expresión de Cav α 2 δ -1. La expresión de Cav α 2 δ -1 (A) y Sp1 (B) se analizó por *Western blot* en cuatro condiciones experimentales, según se indica, después de 48 h de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($n=3$; $p < 0.005$).

El silenciamiento y la sobreexpresión de Sp1 y TLR-4 modifican la expresión de Cav α δ -1

Finalmente, se realizó una serie de experimentos en que el silenciamiento y la sobreexpresión de Sp1, TLR-4 y Cav α δ -1, se hicieron por separado y la expresión de Cav α δ -1 se evaluó mediante *Western blot* (Fig. 17). Los resultados de este análisis muestran que la expresión de TLR-4 como de Sp1 y Cav α δ -1 disminuyen significativamente después del silenciamiento usando siRNAs específicos. De manera interesante, tanto el *knockdown* de TLR-4 como de Sp1 regularon la expresión de la subunidad Cav α δ -1, ya que al silenciarse cualquiera de estas proteínas disminuye la expresión de la subunidad auxiliar de los canales de calcio (Fig. 17A). Por otra parte, la participación de TLR-4 como de Sp1 en la expresión de Cav α δ -1 se corroboró al realizar experimentos de sobreexpresión de las tres proteínas, donde primeramente se observó un aumento en su expresión y posteriormente se reveló que la expresión de Cav α δ -1 se vio incrementada significativamente después de la sobreexpresión tanto de TLR-4 como de Sp1 (Fig. 17B).

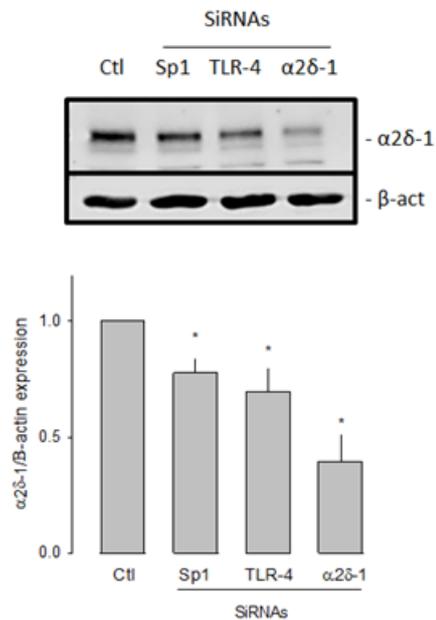
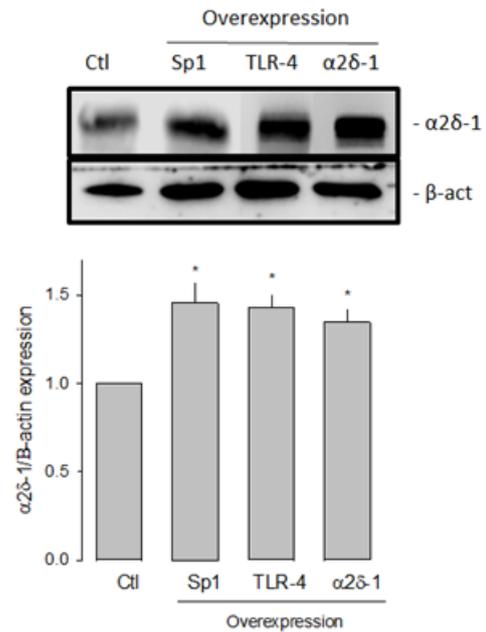
A**B**

Figura 17. Efecto del silenciamiento y la sobreexpresión de TLR-4, Sp1 sobre la expresión de Cav α 2 δ -1. A) La expresión de Cav α 2 δ -1 se analizó por *Western blot* en cuatro condiciones experimentales, según se indica, después de 48 h de transfección con los siRNAs específicos. B) La expresión de Cav α 2 δ -1 se analizó por *Western blot* en cuatro condiciones experimentales, según se indica, después de 48 h de transfección con los plásmidos que codifican para TLR-4, Sp1 y Cav α 2 δ -1. Los datos se presentan como la media \pm EE, y los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($n=3$; $p < 0.005$).

Discusión

La subunidad $\alpha_2\delta$ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje es una proteína con características topológicas complejas, que tiene un peso molecular de ~ 170 kDa y se encuentra sujeta a una escisión proteolítica postraducciona. Por tanto, la proteína madura está compuesta por dos péptidos, α_2 y δ , que en condiciones nativas se mantienen unidos por un enlace disulfuro (Calderón-Rivera et al., 2012). Aunque el papel fisiológico central de Cav $\alpha_2\delta$ -1 es funcionar como una subunidad auxiliar de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Andrade et al., 2009), su papel central en la progresión tumoral ya se ha demostrado previamente en diferentes tipos de celulares de cáncer, incluyendo laringe, pulmón, ovario, hígado, estómago y mama (Zhao et al., 2013; Yu et al., 2018; Amhimmid Badr et al., 2018; Sui et al., 2018; Huang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Li et al., 2021; Ma et al., 2021). Sin embargo, su posible contribución a la aparición y/o desarrollo de tumores del sistema nervioso permanece prácticamente inexplorada. En este trabajo de tesis, se muestra evidencia de que la activación del receptor TLR-4 por su ligando, LPS, aumenta la expresión de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 y promueve la proliferación y migración de las células de glioblastoma humano U87. Además, los datos sugieren que la regulación de la expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 mediada por la activación de TLR-4 se produce a través de la vía de señalización NF- κ B/Sp1.

Las vías de señalización de los receptores tipo Toll (TLR) desempeñan un papel esencial en el sistema inmunitario que controla el crecimiento y la progresión del tumor. La activación de este tipo de receptores puede resultar en la producción de citocinas, quimiocinas, interferones y el factor de transcripción NF- κ B. En este contexto, se sabe que la activación de TLR-4 puede estar mediada por LPS, una

endotoxina bacteriana, que conduce a dos vías de señalización distintas: la vía de respuesta primaria a través de MyD88 y la vía IFN- β (TRIF) (Lu et al., 2008; Afroz et al., 2021). Asimismo, se sabe que la activación de TLR-4 puede aumentar la producción de factores que promueven el desarrollo de tumores generalmente a través de la vía MyD88. MyD88 activa la cinasa IRAK e interactúa con el factor TRAF6, lo que resulta en la translocación nuclear de NF- κ B, que, una vez en el núcleo, puede interactuar y coactivar al factor de transcripción Sp1 promoviendo la transcripción de genes (Fig. 18), incluido el de la subunidad Cav α 2 δ -1 (Martínez-Hernández et al., 2013).

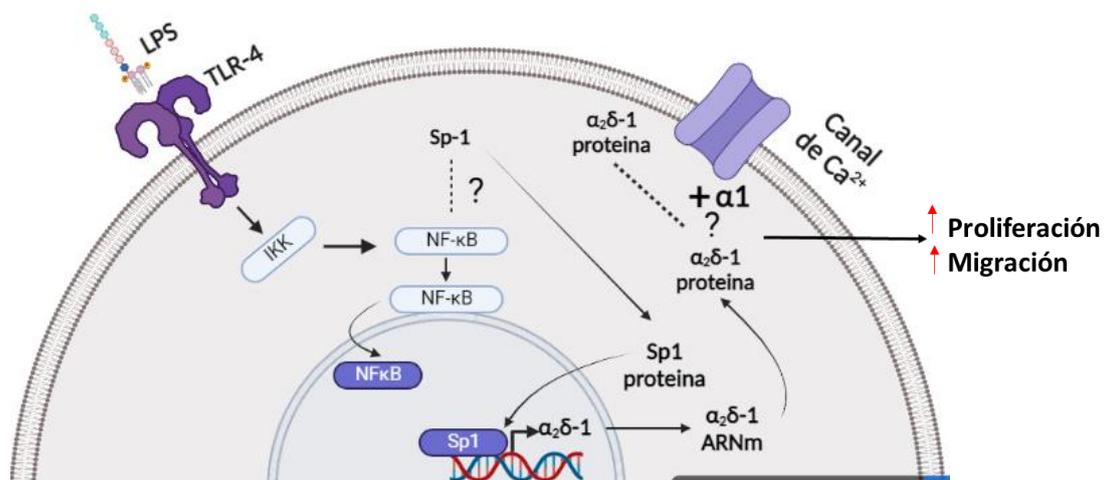


Figura 18. Modelo de la posible regulación de Cav α 2 δ -1 por la activación del receptor TLR-4. Una vez activado el receptor por su ligando (LPS) activa vías de señalización que convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B que ingresa al núcleo y promueve la expresión de factores que estimulan otras vías de señalización involucradas en la expresión de Sp1. Este último es capaz de unirse al promotor del gen que codifica para la subunidad Cav α 2 δ -1. Eventualmente esta subunidad podría unirse al complejo de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y facilitar su envío a la membrana.

Vale la pena mencionar aquí que los canales iónicos dependientes de voltaje en general, y los canales de Ca^{2+} en particular, juegan un papel fundamental en el control de la señalización eléctrica a través de la generación de impulsos nerviosos

(Bates et al., 2015). Sin embargo, se ha demostrado que estas proteínas además pueden contribuir significativamente a la señalización bioquímica celular, lo que ayuda a determinar varios eventos fisiológicos, incluida la división celular, la progresión del ciclo celular y la regulación del volumen celular (Stewart et al., 2015). Todas estas funciones son de gran relevancia para la proliferación de las células cancerosas (Bates et al., 2015; Rao et al., 2015; Stewart et al., 2015).

La concentración de Ca^{2+} intracelular se controla de manera precisa y estricta para generar señales de Ca^{2+} con atributos espaciotemporales específicos. Además, este control es esencial para la regulación diferencial de distintas proteínas y vías de señalización dependientes de Ca^{2+} involucradas en procesos celulares particulares, incluyendo la proliferación y la migración celular (Rao et al., 2015; Déliot & Constantin, 2015). Dado que estas funciones son relevantes para la tumorigénesis, se ha propuesto que las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y la señalización por Ca^{2+} son procesos cruciales para impulsar o mantener los fenotipos malignos. De hecho, la transformación tumoral está asociada con cambios en la expresión y/o función de las moléculas responsables del transporte de Ca^{2+} , que eventualmente controla muchas vías de señalización intracelular. Esto puede dar lugar a la evasión de la apoptosis con aumento de la supervivencia, proliferación excesiva, angiogénesis maligna, migración celular y metástasis (Déliot y Constantin, 2015). En este contexto, la sobreexpresión de $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ podría estar provocando cambios en la localización de membrana de los canales de Ca^{2+} en las células U87, lo que podría dar lugar a cambios en la concentración de Ca^{2+} en diferentes compartimentos y microdominios celulares y cambios en los patrones de señalización intracelular.

Por otro lado, se ha propuesto que otras subunidades Cav α 2 δ (de las cuales existen cuatro isoformas) también están asociadas con el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, estudios recientes en cáncer de próstata han mostrado que la sobreexpresión de Cav α 2 δ -2 induce una mayor proliferación celular *in vitro*, y que la utilización de xenoinjertos de células LNCaP, una línea celular de cáncer de próstata humano sensible a los andrógenos que sobre-expresa Cav α 2 δ -2, en ratones desnudos es tumorigénica. En apoyo de un papel directo de Cav α 2 δ -2 en el desarrollo del cáncer de próstata, la gabapentina, un inhibidor de las subunidades Cav α 2 δ , es capaz de inhibir el desarrollo tumoral en xenoinjertos (Warnier et al., 2015). Por el contrario, el gen *CACNA2D3*, que codifica para la subunidad Cav α 2 δ -3, se ha identificado como un sitio de metilación en el cáncer gástrico. Además, la metilación de *CACNA2D3* se asocia con una supervivencia más corta, lo que la convierte en un marcador pronóstico útil para este tipo de cáncer (Wanajo et al., 2008). Las posibles propiedades inhibitoras de tumores de Cav α 2 δ -3 también se han observado *in vitro*, donde la sobreexpresión da como resultado una reducción del crecimiento celular y la adhesión, mientras que su silenciamiento mediante siRNAs específicos tuvo el efecto contrario (Wanajo et al., 2008). Asimismo, el silenciamiento dependiente de metilación de *CACNA2D3* ha sido propuesto como un biomarcador de riesgo de metástasis en cáncer de mama (Palmieri et al., 2012). Estos hallazgos implican que, más allá del papel canónico de las subunidades auxiliares Cav α 2 δ en la determinación de las propiedades y la diversidad funcional de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de alto umbral, puede haber algunas interacciones moleculares no canónicas, es decir, no relacionadas con su función principal como parte del complejo macromolecular de los canales. Estas

interacciones podrían ser responsables, al menos en parte, de algunas de las acciones de la subunidad Cav α δ -1 sobre la proliferación y migración celular.

Asimismo, se ha visto que Cav α δ -1 también puede estar relacionada con la quimioresistencia del cáncer de laringe (Huang et al., 2019). Aquí resulta interesante que una de las características del glioblastoma es su alta recurrencia generando resistencia a los tratamientos. Dado que Cav α δ -1 está relacionada con la proliferación y migración de las células de glioblastoma sería interesante evaluar su papel en relación con la quimioresistencia de los tumores.

Aunque el mecanismo molecular preciso por el cual la subunidad Cav α δ -1 afecta la proliferación y migración en células de glioblastoma humano no se conoce, sus acciones celulares pueden agruparse en dos componentes generales. El primero de ellos estaría directamente asociado a la función de la subunidad como parte del complejo de canales de Ca²⁺ de alto umbral, mientras que el segundo sería independiente de su papel en los canales. La elucidación de cuál de estos mecanismos, que no son mutuamente excluyentes, contribuye en mayor medida a las acciones de Cav α δ -1 sobre la proliferación y migración celular en células de glioblastoma, así como la identificación de interactores moleculares para la subunidad Cav α δ -1 fuera el canal relacionado con el control de la proliferación y migración celular, son sin duda temas apasionantes para futuras investigaciones. En cualquier caso, el vínculo encontrado entre la subunidad auxiliar de los canales de Ca²⁺ y el glioblastoma revela a esta proteína como un posible biomarcador y/o diana terapéutica. Sin embargo, se requerirá una mayor comprensión mecanística de cómo Cav α δ -1 contribuye a la progresión del tumor antes de que se pueda explotar su potencial diagnóstico o terapéutico.

Bibliografía

- [1] Abadin SS, Zoellner NL, Schaeffer M, Porcelli B, Gutmann DH, Johnson KJ. Racial/ethnic differences in pediatric brain tumor diagnoses in patients with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*. 2015 Sep;167(3):613-20.e1-2.
- [2] Ahmadloo N, Kani AA, Mohammadianpanah M, Nasrolahi H, Omidvari S, Mosalaei A, Ansari M. Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2013 Mar;25(1):21-30.
- [3] Amhimmid Badr S, Waheeb Fahmi M, Mahmoud Nomir M, Mohammad El-Shishtawy M. Calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit as a novel biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Med*. 2018 Feb;15(1):52-60.
- [4] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- [5] Aalaei-Andabili SH, Rezaei N. Toll like receptor (TLR)-induced differential expression of microRNAs (MiRs) promotes proper immune response against infections: a systematic review. *J Infect*. 2013 Oct;67(4):251-64.
- [6] Anderson KV, Nüsslein-Volhard C. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*. 1984 Sep 20-26;311(5983):223-227.
- [7] Andrade A, Sandoval A, González-Ramírez R, Lipscombe D, Campbell KP, Felix R. The $\alpha_2\delta$ subunit augments functional expression and modifies the pharmacology of Cav1.3 L-type channels. *Cell Calcium*. 2009 Oct;46(4):282-292.
- [8] Arikath J, Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol*. 2003 Jun;13(3):298-307.
- [9] Azab MA, Alomari A, Azzam AY. Featuring how calcium channels and calmodulin affect glioblastoma behavior. A review article. *Cancer Treat Res Commun*. 2020;25:100255.
- [10] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by

- preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60.
- [11] Bates E. Ion channels in development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:231-47.
- [12] Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5706-15.
- [13] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.
- [14] Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchen MR. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann NY Acad Sci*. 2015 Sep;1350(1):107-16.
- [15] Bootman MD, Bultynck G. Fundamentals of cellular calcium signaling: A primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2020 Jan 2;12(1):a038802.
- [16] Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev*. 2014 Jan;94(1):81-140.
- [17] Borowiec AS, Bidaux G, Pigat N, Goffin V, Bernichtein S, Capiod T. Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation. *Eur J Pharmacol*. 2014 Sep 15;739:19-25.
- [18] Borsotto M, Barhanin J, Fosset M, Lazdunski M. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *J Biol Chem*. 1985 Nov 15;260(26):14255-63. PMID: 2997201.
- [19] Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*. 2010;112(1):3-25.
- [20] Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca^{2+} /calcineurin signaling pathway. *EMBO J*. 2006 Aug 9;25(15):3714-24.

- [21] Calderón-Rivera A, Andrade A, Hernández-Hernández O, González-Ramírez R, Sandoval A, Rivera M, Gomora JC, Felix R. Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*. 2012 Jan;51(1):22-30.
- [22] Capiod T. Extracellular Calcium Has Multiple Targets to Control Cell Proliferation. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898:133-156.
- [23] Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. 1984 Aug 9-15;310(5977):501-502.
- [24] Casili G, Caffo M, Campolo M, Barresi V, Caruso G, Cardali SM, Lanza M, Mallamace R, Filippone A, Conti A, Germanò A, Cuzzocrea S, Esposito E. TLR-4/Wnt modulation as new therapeutic strategy in the treatment of glioblastomas. *Oncotarget*. 2018 Dec 25;9(101):37564-37580.
- [25] Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, Pratt WS, Dolphin AC. Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary $\alpha_2\delta$ -1 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Jun 17;111(24):8979-84.
- [26] Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Aug 1;3(8):a003947.
- [27] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
- [28] Chafouleas JG, Lagacé L, Bolton WE, Boyd AE 3rd, Means AR. Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell*. 1984 Jan;36(1):73-81.
- [29] Chang KY, Huang CT, Hsu TI, Hsu CC, Liu JJ, Chuang CK, Hung JJ, Chang WC, Tsai KK, Chuang JY. Stress stimuli induce cancer-stemness gene expression via Sp1 activation leading to therapeutic resistance in glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):14-19.
- [30] Che F, Yin J, Quan Y, Xie X, Heng X, Du Y, Wang L. TLR4 interaction with LPS in glioma CD133+ cancer stem cells induces cell proliferation, resistance to chemotherapy and evasion from cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity. *Oncotarget*. 2017 Jun 21;8(32):53495-53507.
- [31] Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells

- generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):139-52.
- [32] Christensen KA, Myers JT, Swanson JA. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci*. 2002 Feb 1;115(Pt 3):599-607.
- [33] Danesh SM, Kundu P, Lu R, Stefani E, Toro L. Distinct transcriptional regulation of human large conductance voltage- and calcium-activated K⁺ channel gene (hSlo1) by activated estrogen receptor alpha and c-Src tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2011 Sep 9;286(36):31064-31071.
- [34] Darefsky AS, King JT Jr, Dubrow R. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: a population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer*. 2012 Apr 15;118(8):2163-72.
- [35] Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC. The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jan 26;107(4):1654-9.
- [36] Deleuze C, David F, Béhuret S, Sadoc G, Shin HS, Uebele VN, Renger JJ, Lambert RC, Leresche N, Bal T. T-type calcium channels consolidate tonic action potential output of thalamic neurons to neocortex. *J Neurosci*. 2012 Aug 29;32(35):12228-12236.
- [37] Déliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2512-22.
- [38] De Jongh KS, Warner C, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels. α_2 and δ are encoded by the same gene. *J Biol Chem*. 1990 Sep 5;265(25):14738-14741.
- [39] Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol*. 2016 Oct 1;594(19):5369-5390.
- [40] Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J Law Med Ethics*. 2014 Summer;42(2):171-82.

- [41] Enchev Y, Ferdinandov D, Kounin G, Encheva E, Bussarsky V. Radiation-induced gliomas following radiotherapy for craniopharyngiomas: a case report and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009 Sep;111(7):591-6.
- [42] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1313-7.
- [43] Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA. Gabapentin receptor $\alpha 2\delta$ -1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell.* 2009 Oct 16;139(2):380-92.
- [44] Fatt P, Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1953 Apr 28;120(1-2):171-204.
- [45] Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A. Regulation of high-voltage-activated Ca^{2+} channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2013 Sep 1;2(5):207-220.
- [46] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):453-8.
- [47] Finocchiaro G. TLRgeting evasion of immune pathways in glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):422-424.
- [48] Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem.* 1986 Nov 17;161(1):217-24.
- [49] Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:141-165.
- [50] Geraghty AV, Knott PD, Hanna HM. Prenatal diagnosis of fetal glioblastoma multiforme. *Prenat Diagn.* 1989 Sep;9(9):613-6.
- [51] Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):733-736.
- [52] Giorgi C, Danese A, Missiroli S, Patergnani S, Pinton P. Calcium dynamics as a machine for decoding signals. *Trends Cell Biol.* 2018 Apr;28(4):258-273.

- [53] Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron*. 1996 Feb;16(2):431-440.
- [54] Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol*. 1975 May;65(5):617-644.
- [55] Han S, Wang C, Qin X, Xia J, Wu A. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Jun 22;36(1):83.
- [56] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- [57] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- [58] Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb;7(1):4-10.
- [59] Huang C, Li Y, Zhao W, Zhang A, Lu C, Wang Z, Liu L. $\alpha_2\delta$ -1 may be a potential marker for cancer stem cell in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2019;24(1):97-107.
- [60] Huang HK, Lin YH, Chang HA, Lai YS, Chen YC, Huang SC, Chou CY, Chiu WT. Chemoresistant ovarian cancer enhances its migration abilities by increasing store-operated Ca^{2+} entry-mediated turnover of focal adhesions. *J Biomed Sci*. 2020 Feb 21;27(1):36.
- [61] Ishibashi K, Suzuki M, Imai M. Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 13;270(2):370-376.
- [62] Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α_2 -subunit and the associated δ peptides. *J Biol Chem*. 1991 Feb 15;266(5):3287-3293.
- [63] Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Paroxysmal muscle weakness: the familial periodic paralyses. *J Neurol*. 2006 Nov;253(11):1391-8.
- [64] Kadurin I, Ferron L, Rothwell SW, Meyer JO, Douglas LR, Bauer CS, Lana B, Margas W, Alexopoulos O, Nieto-Rostro M, Pratt WS, Dolphin AC. Proteolytic

- maturation of $\alpha_2\delta$ represents a checkpoint for activation and neuronal trafficking of latent calcium channels. *Elife*. 2016 Oct 26;5:e21143.
- [65] Kahl CR, Means AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev*. 2003 Dec;24(6):719-736.
- [66] Karajannis MA, Ferner RE. Neurofibromatosis-related tumors: emerging biology and therapies. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Feb;27(1):26-33.
- [67] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009 Apr;21(4):317-37.
- [68] Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):906-17.
- [69] Krex D, Klink B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G; German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007;130(10):2596-606.
- [70] Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec;12(12):860-75.
- [71] Kundu P, Alioua A, Stefani E, Toro L. Regulation of mouse Slo gene expression: multiple promoters, transcription start sites, and genomic action of estrogen. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27478-27492.
- [72] Küper C, Beck FX, Neuhofer W. Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):F38-46.
- [73] Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macswords J, Wu Q, Vasanji A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 May 7;6(5):421-32.
- [74] Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet*. 2008 Mar;9(3):165-178.

- [75] Leung AT, Imagawa T. Structural characterization of the nitrendipine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel: evidence for a 52,000 dalton subunit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12 Suppl 4:S86-90.
- [76] Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat.* 2010 Sep 20;192(5):275-83.
- [77] Liao P, Zhang HY, Soong TW. Alternative splicing of voltage-gated calcium channels: from molecular biology to disease. *Pflugers Arch.* 2009 Jul;458(3):481-488.
- [78] Liao P, Soong TW. Cav1.2 channelopathies: from arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency. *Pflugers Arch.* 2010 Jul;460(2):353-9.
- [79] Lipscombe D, Allen SE, Toro CP. Control of neuronal voltage-gated calcium ion channels from RNA to protein. *Trends Neurosci.* 2013 Oct;36(10):598-609.
- [80] Llinás R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Mar;86(5):1689-1693.
- [81] Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* 1992 Sep;15(9):351-5.
- [82] Llinás R, Yarom Y. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol.* 1981 Jun;315:549-567.
- [83] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
- [84] Marchi S, Giorgi C, Galluzzi L, Pinton P. Ca²⁺ fluxes and cancer. *Mol Cell.* 2020 Jun 18;78(6):1055-1069.
- [85] Martínez-Hernández E, González-Ramírez R, Sandoval A, Cisneros B, Delgado-Lezama R, Felix R. Isolation and characterization of the 5'-upstream

- region of the human voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit gene: promoter analysis and regulation by transcription factor Sp1. *Pflugers Arch.* 2013 Jun;465(6):819-828.
- [86] Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res.* 2006;12(3):133-50.
- [87] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- [88] Meng J, Parroche P, Golenbock DT, McKnight CJ. The differential impact of disulfide bonds and N-linked glycosylation on the stability and function of CD14. *J Biol Chem.* 2008 Feb 8;283(6):3376-3384.
- [89] Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca²⁺ channels in heart automaticity. *Front Physiol.* 2015 Feb 2;6:19.
- [90] Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* 1989 Jul 20;340(6230):230-233.
- [91] Mo P, Yang S. The store-operated calcium channels in cancer metastasis: from cell migration, invasion to metastatic colonization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018 Jan 1;23:1241-1256.
- [92] Moroni M, Servin-Vences MR, Fleischer R, Sánchez-Carranza O, Lewin GR. Voltage gating of mechanosensitive PIEZO channels. *Nat Commun.* 2018 Mar 15;9(1):1096.
- [93] Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002 Apr;52(4):255-64.
- [94] Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 1985 Aug 1-7;316(6027):440-443.
- [95] Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):439-47.

- [96] Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 May 8;109(19):7421-6.
- [97] Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:823-867.
- [98] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64.
- [99] Palmieri C, Rudraraju B, Monteverde M, Lattanzio L, Gojis O, Brizio R, Garrone O, Merlano M, Syed N, Lo Nigro C, Crook T. Methylation of the calcium channel regulatory subunit $\alpha 2\delta$ -3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2012 Jul 10;107(2):375-81.
- [100] Parekh AB. Ca^{2+} microdomains near plasma membrane Ca^{2+} channels: impact on cell function. *J Physiol*. 2008 Jul 1;586(13):3043-3054.
- [101] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1191-5.
- [102] Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):233-52.
- [103] Pettit EJ, Fay FS. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev*. 1998 Oct;78(4):949-67.
- [104] Pierce SL, England SK. SK3 channel expression during pregnancy is regulated through estrogen and Sp factor-mediated transcriptional control of the KCNN3 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Oct;299(4):E640-E646.
- [105] Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, Werbeck JL, Amankulor NM, Huse JT, Holland EC. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14(3):357-69.
- [106] Pietrobon D. Calcium channels and migraine. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul;1828(7):1655-65.

- [107] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004 Sep 23;431(7007):461-6.
- [108] Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α 1-subunit. *Nature*. 1994 Mar 3;368(6466):67-70.
- [109] Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):559-621.
- [110] Previdi S, Malek A, Albertini V, Riva C, Capella C, Broggin M, Carbone GM, Rohr J, Catapano CV. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts. *Gynecol Oncol*. 2010 Aug 1;118(2):182-188.
- [111] Raffaello A, Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Calcium at the center of cell signaling: Interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria, and lysosomes. *Trends Biochem Sci*. 2016 Dec;41(12):1035-1049.
- [112] Rao VR, Perez-Neut M, Kaja S, Gentile S. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel)*. 2015 May 22;7(2):849-75.
- [113] Rasmussen CD, Means AR. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J*. 1989 Jan;8(1):73-82.
- [114] Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature*. 1983 Feb 17-23;301(5901):569-574.
- [115] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010 Dec 9;468(7325):824-8
- [116] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.
- [117] Risher WC, Kim N, Koh S, Choi JE, Mitev P, Spence EF, Pilaz LJ, Wang D, Feng G, Silver DL, Soderling SH, Yin HH, Eroglu C. Thrombospondin receptor α 2 δ -

- 1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1. *J Cell Biol.* 2018 Oct 1;217(10):3747-3765. doi: 10.1083/jcb.201802057.
- [118] Roberts-Thomson SJ, Chalmers SB, Monteith GR. The Calcium-signaling toolkit in cancer: Remodeling and targeting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Aug 1;11(8):a035204.
- [119] Roderick HL, Cook SJ. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer.* 2008 May;8(5):361-375.
- [120] Safe S, Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;41(16):2438-2448.
- [121] Safe S, Imanirad P, Sreevalsan S, Nair V, Jutooru I. Transcription factor Sp1, also known as specificity protein 1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2014 Jul;18(7):759-769.
- [122] Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25;353(8):811-22.
- [123] Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 2004 Feb 19;427(6976):740-4.
- [124] Sankpal UT, Maliakal P, Bose D, Kayaleh O, Buchholz D, Basha R. Expression of specificity protein transcription factors in pancreatic cancer and their association in prognosis and therapy. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3779-3786.
- [125] Santella L. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Mar 17;244(2):317-324.
- [126] Sarrazy V, Vedrenne N, Billet F, Bordeau N, Lepreux S, Vital A, Jauberteau MO, Desmoulière A. TLR4 signal transduction pathways neutralize the effect of Fas signals on glioblastoma cell proliferation and migration. *Cancer Lett.* 2011 Dec 8;311(2):195-202.
- [127] Scherer HJ. A critical review: the pathology of cerebral gliomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1940;3(2):147-77.

- [128] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1777-82.
- [129] Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N. Ca²⁺ current enhancement by $\alpha_2\delta$ and β subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and α_1 protein level. *J Physiol*. 1995 Nov 15;489 (Pt 1)(Pt 1):55-62.
- [130] Sieber M, Nastainczyk W, Röhrkasten A, Hofmann F. Reconstitution of the purified receptor for calcium channel blockers. *Biomed Biochim Acta*. 1987;46(8-9):S357-62. PMID: 2829861.
- [131] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):396-401.
- [132] Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;4(5):440-52.
- [133] Stanley EF. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci*. 1997 Sep;20(9):404-9.
- [134] Stewart TA, Yapa KT, Monteith GR. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2502-11.
- [135] Stoyanov GS, Dzhankov DL, Kitanova M, Ghenev P, Tonchev AB. Demographics, and incidence of histologically confirmed intracranial tumors: A five-year, two-center prospective study. *Cureus*. 2017 Jul 16;9(7):e1476.
- [136] Sui X, Geng JH, Li YH, Zhu GY, Wang WH. Calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit (*CACNA2D1*) enhances radioresistance in cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Manag Res*. 2018 Oct 26;10:5009-5018.
- [137] Sun T, Plutynski A, Ward S, Rubin JB. An integrative view on sex differences in brain tumors. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Sep;72(17):3323-42.
- [138] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021. 71:209–249.

- [139] Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene*. 1999 Oct 1;238(2):291-300.
- [140] Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Aug;84(15):5478-5482.
- [141] Terrié E, Coronas V, Constantin B. Role of the calcium toolkit in cancer stem cells. *Cell Calcium*. 2019 Jun;80:141-151.
- [142] Thorpe AJ, Offord J. The alpha2-delta protein: an auxiliary subunit of voltage-dependent calcium channels as a recognized drug target. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 Jul;11(7):761-70.
- [143] Vaghy PL, Williams JS, Schwartz A. Receptor pharmacology of calcium entry blocking agents. *Am J Cardiol*. 1987 Jan 23;59(2):9A-17A.
- [144] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.
- [145] Venance SL, Cannon SC, Fialho D, Fontaine B, Hanna MG, Ptacek LJ, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Griggs RC; CINCH investigators. The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain*. 2006 Jan;129(Pt 1):8-17.
- [146] Venetucci L, Denegri M, Napolitano C, Priori SG. Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2012 Oct;9(10):561-75.
- [147] Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):165-175.
- [148] Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38044-51.
- [149] Wanajo A, Sasaki A, Nagasaki H, Shimada S, Otsubo T, Owaki S, Shimizu Y, Eishi Y, Kojima K, Nakajima Y, Kawano T, Yuasa Y, Akiyama Y. Methylation of the calcium channel-related gene, CACNA2D3, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. *Gastroenterology*. 2008 Aug;135(2):580-90.
- [150] Wang LY, Augustine GJ. Presynaptic nanodomains: a tale of two synapses. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jan 26;8:455.

- [151] Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010 Dec 9;468(7325):829-33.
- [152] Wang Y, Zhao W, Xiao Z, Guan G, Liu X, Zhuang M. A risk signature with four autophagy-related genes for predicting survival of glioblastoma multiforme. *J Cell Mol Med*. 2020;24(7):3807-3821.
- [153] Warnier M, Roudbaraki M, Derouiche S, Delcourt P, Bokhobza A, Prevarskaya N, Mariot P. *CACNA2D2* promotes tumorigenesis by stimulating cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 2015 Oct 16;34(42):5383-94.
- [154] Weiss N, Zamponi GW. Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal*. 2017 Feb 20;1(1):NS20160003.
- [155] Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018 Feb;44(2):139-150.
- [156] Werneck de Carvalho LE, Sarraf JS, Semblano AA, Moreira MA, de Lemos MN, de Mello VJ, Hamoy M, Nazareth Junior MH, Paschoal Junior FM, Adami F. Central nervous system tumours profile at a referral center in the Brazilian Amazon region, 1997-2014. *PLoS One*. 2017 Apr 3;12(4):e0174439.
- [157] Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*. 2016; 134:381-97.
- [158] Wu J, Yan Z, Li Z, Qian X, Lu S, Dong M, Zhou Q, Yan N. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. 2016 Sep 8;537(7619):191-196.
- [159] Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*. 2002 Nov-Dec;32(5-6):279-305.
- [160] Yan K, Yang K, Rich JN. The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Curr Opin Neurol*. 2013 Dec;26(6):701-7.
- [161] Yang SN, Shi Y, Yang G, Li Y, Yu J, Berggren PO. Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Nov;71(21):4149-77.
- [162] Yeung JT, Hamilton RL, Ohnishi K, Ikeura M, Potter DM, Nikiforova MN, Ferrone S, Jakacki RI, Pollack IF, Okada H. LOH in the HLA class I region at 6p21 is associated with shorter survival in newly diagnosed adult glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 1;19(7):1816-26.

- [163] Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):128-37.
- [164] Yu J, Wang S, Zhao W, Duan J, Wang Z, Chen H, Tian Y, Wang D, Zhao J, An T, Bai H, Wu M, Wang J. Mechanistic exploration of cancer stem cell marker voltage-dependent calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit-mediated chemotherapy resistance in small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018 May 1;24(9):2148-2158.
- [165] Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2015 Oct;67(4):821-70.
- [166] Zeuner MT, Krüger CL, Volk K, Bieback K, Cottrell GS, Heilemann M, Widera D. Biased signalling is an essential feature of TLR4 in glioma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Dec;1863(12):3084-3095.
- [167] Zhang H, Maldonado MN, Barchi RL, Kallen RG. Dual tandem promoter elements containing CCAC-like motifs from the tetrodotoxin-resistant voltage-sensitive Na⁺ channel (rSkM2) gene can independently drive muscle-specific transcription in L6 cells. *Gene Expr.* 1999;8(2):85-103.
- [168] Zhao W, Wang L, Han H, Jin K, Lin N, Guo T, Chen Y, Cheng H, Lu F, Fang W, Wang Y, Xing B, Zhang Z. 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit. *Cancer Cell.* 2013 Apr 15;23(4):541-556.