



Universitat de Lleida

# Valoració dels canals tipus T com a diana terapèutica en el glioblastoma: silenciament gènic *versus* bloqueig farmacològic

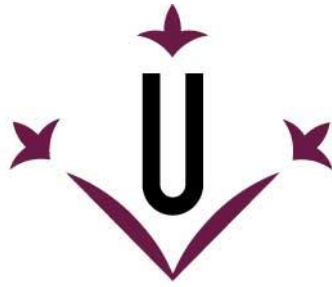
Anna Visa Pretel

<http://hdl.handle.net/10803/671725>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

**TESI DOCTORAL**

**Valoració dels canals tipus T com a diana terapèutica en el glioblastoma: silenciament gènic *versus* bloqueig farmacològic.**

Anna Visa Pretel

Memòria presentada per optar al grau de Doctora per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Directors

Carles Cantí Nicolás

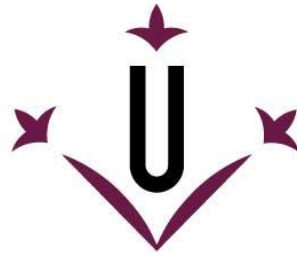
Judit Herreros Danés

Tutora

Judit Herreros Danés

2021





## Universitat de Lleida

Carles Cantí Nicolás i Judit Herreros Danés, Doctors en Ciències Biològiques, investigadors i professors agregats dels Departaments de Medicina Experimental i Ciències Mèdiques Bàsiques, respectivament, de la Universitat de Lleida, com a directors de la present tesi, fem constar que:

La graduada en Ciències Biomèdiques per la Universitat de Lleida, **Anna Visa Pretel**, ha realitzat sota la nostra direcció i supervisió dins el grup de Senyalització cel·lular per calci, el treball experimental titulat “**Valoració dels canals tipus T com a diana terapèutica en el glioblastoma: silenciament gènic versus bloqueig farmacològic**”.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s'escau, obtenir el grau de **Doctora per la Universitat de Lleida**.

I perquè així consti i als efectes oportuns, signem el present document a Lleida, 25 d'octubre de 2020

Dra. Judit Herreros Danés

Dr. Carles Cantí Nicolás



*Maravillarse es el primer paso para el descubrimiento.*

*Pasteur*

*Darte cuenta del patrón*

*Será el factor más importante*

*Para ser capaz de imaginar y adelantar*

*Al próximo revés para evitar así el desastre*

*O al menos intentarlo.*

*Izal*



*Als meus pares,  
Marta,  
padri, Mari i JM.*





# AGRAIMENTS



No recordo el primer dia de laboratori, però sí recordo el dia que vaig recórrer els passadissos de l'IRB buscant el despatx de la Judit i el Carles per demanar fer les pràctiques del TFG, el 2015 rondava. Poc m'imaginava que em trobaria tant bé que hi acabaria fent la tesi. No mentirem, no ha estat un camí de roses, amb molts moments baixos i algun d'àlgid. M'hi he deixat la pell per anar endavant. Si alguna cosa pot resumir la investigació és la frustració: moltes hores i feina invertides que molts cops sembla que van a la brossa... Però aiii, quan surt! L'adrenalina i l'emoció, la nostra droga particular.

Aquest només pretén ser un petit recordatori per totes aquelles persones més importants que de forma diversa han permès que arribi fins aquí. I agrair amb unes breus paraules el granet de sorra que han aportat. Moltes altres han estat presents, l'enumeració seria extensa, però espero que totes elles sapiguin que els estic igualment agraïda.

En primer lloc al Carles i la Judit, per obrir-me les portes i veure potencial en mi. Sense ells aquesta tesi mai hauria sortit a la llum. El Carles, el mestre dels canals de calci, que a vegades el prenem per boig però acaba donant en el clau. Gràcies, per la paciència explicant el món dels Window Currents repetidament. I a la Judit, que ja em coneix les cares només entrar per la porta del laboratori. Per estar sempre disponible, per ajudar-me a trobar solucions quan m'he encallat, per ensenyar-me a prioritzar... I per sentir-me acompanyada intentant entendre les explicacions del Carles! He tingut molta sort de tenir-vos com a jefes, pel suport que sempre m'heu donat, per ensenyar-me tant en les primeres passes per aquest món de la ciència i sobretot per ser unes grans persones.

A la Mireia, la que sempre serà la meva jefa suprema! Per ensenyar-me a manejar-me pel laboratori quan vaig arribar sent un pollito, o com ella em cridava retales, la submarino, mindundi,... Gràcies per ensenyar-me que en ciència la meitat de coses es fan a "ojo de buen cubero" :'). Creu-me, ara entenc els teus crits i renecs quan escrivies la tesi.

I tot pollito té els seus polluelos: a la Lía. A pesar de bañarme con anticuerpo el primer día... Gracias, por no tirar la toalla con los 98347 experimentos fallidos, por los cafés endulzados con un poco de cotilleo y drama, por tu poesía esporádica plasmada en cualquier parte (desde los post-it hasta los geles de WB), por estar siempre dispuesta a ayudar, por aportar color con tus bolis y tus ganas a nuestro lab... Muy pronto podremos hacer esas excursiones, cenas y fiestas que hace tiempo que tenemos planeadas y aún no hemos podido. Eres la mejor pollito del mundo mundial!

Per tota la gent de la 2a planta amb la que he compartit des de crisis en les sales de cultius fins a carnavals, nadals, tesis i celebracions diverses. Però en especial a les meves Zipi y Zape particulars que he tingut de veïnes de laboratori, l'Aida i la Gisel. Sense els vostres crits, bronques i riures això hauria estat més difícil. Perquè les 3 ens hem menjat el "jo mai faré servir les palanganes per rebel·lar" amb patates, pels microatacs de cor amb les contaminacions als incubadors, però sobretot pels nostres rastrejos detectivescos bastant infructuosos però que almenys ens van deixar riures i unes bones fotos de la Gisel.

A la família que Biomed va engendrar amb vosaltres Dani, Eva (+Dusky!) i Marta. I que ha anat creixent i diversificant amb la Mariona, l'Ori, l'Andreu, el Pol, el Marlon... Per molts escampats que estiguem, quan ens unim tot segueix com sempre, les hores passen volant i amb mil riures (o plors si tornem de la muralla China de Huesca...:P). Però sobretot a tu Marta, si ens vam aguantar en aquelles interminables hores d'estudi i d'estrès a la carrera (comparant apunts que s'entenen igual de malament), els atacs de riure incontrolats a la biblioteca (entre molts altres), la convivència a València amb certs personatges o els matins post-festa arrasant la cuina, què pot amb nosaltres? Espero que aviat puguem reprendre els nostres viatges amb mil aventures: Tenerife (viento huracanado), Brussel·les (i la meva targeta?), Milà (entrenant-nos per la Filomena), Santander sense GPS però amb flash... Eh Eva! (i l'acomiadament del Xiqui amb una coordinació digna de natació sincronitzada).

I com oblidar-me de les meves metgesses preferides: Xis i Ana (i del "melicotó" i la perera!). Sé que Mallorca-València-Mataró-Lleida costa de quadrar i que Lleida és una "gelera" la meitat de l'any, però "no sigueu pomes", i veniu a visitar-nos més sovint, que us trobem a faltar!

Als de sempre, als de Molle, moltes amistats forjades des de pàrvuls fins a l'institut i que encara duren. Per seguir vivint 1001 peripècies junts (Ja sabeu, les més mítiques la del "jabalí" i la de "l'espelma", tot i que l'Albert i el semàfor també és bastant top). Hem viscut tantes coses junts que és impossible reflexar-ho en aquestes línies. Però en particular a tu Judit, malgrat ser tant diferents, la nostra amistat ha anat aguantant i creixent al llarg de tants anys. Crec que no tinc un record al teu costat que no m'arrenqui un somriure (ni que sigui en la distància i amb perspectiva). Tants moments que no sabia ni per on començar, en especial en plena adolescència: des de l'institut, fins a les piscines (aquell estiu mític) passant pels primers bailoteos al BigBen (que tant et van costar :P). Et podria dir moltes coses, però ja sabem que tu i jo som més de fets que de paraules, així que espero que els meus actes puguin substituir les meves paraules i sapiguis que ets com una germana.

A la Miryam, en poc temps t'has convertit en una d'aquelles poques persones que pots considerar realment amigues, aquelles que pots contar amb els dits de la mà. Gràcies per ser-hi, escoltar-me i aguantar-me aquests últims mesos amb la tabarra de la tesi. Espero seguir sumant capítols a les sèries que ens muntem, amb molts més vermuts, viatges i tabates (:P).

Arquímedes va dir: doneu-me un punt de recolzament i mouré el món. El meu punt de recolzament ha estat la meva petita, inclús podríem dir minúscula família. Sense tots i cadascun d'ells, no hauria pogut arribar fins aquí. A la Mari, que pràcticament ha exercit de segona mare però malcriant-nos una miquetona, com a bona tieta. Al JM, que més que cosí sempre ha fet de germanet gran, company infatigable de viatges, rutes i acudits dolents. Al meu padrí, sempre amb el seu bon humor i el somriure als llavis. A la Marta, la meva sister, confident, consellera, assessora... La meva infermera particular. Qui m'havia de dir que aquell bitxito que em robava les sabates de petita (entre moltes altres coses), també es convertiria en còmplice i amiga? Possiblement una de les persones que millor em coneix, t'estimo peque!

Als meus pares, pel seu suport incondicional. Possiblement els que més han patit la muntanya russa que és la tesi, però sobretot en aquests últims mesos que semblaven interminables. Per aquelles abraçades que ho curaven i ho curen tot en els mals moments. Per no deixar-me defallir, per saber que podia amb tot fins i tot quan jo no ho sabia.





# **INDEX**







# ÍNDIX

<b>RESUM.....</b>	<b>21</b>
Resum.....	23
Resumen.....	25
Abstract.....	27
<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>37</b>
1. Tumors astrocítics.....	39
1.1 Classificació.....	40
1.2 Origen.....	43
1.3 Tractament.....	44
2. Canals de Ca <sup>2+</sup> tipus T.....	48
2.1 Homeòstasi del Ca <sup>2+</sup> .....	48
2.2 Canals de Ca <sup>2+</sup> voltatge dependent (VGCC).....	52
3. Estrès de Reticle Endoplasmàtic.....	60
3.1 <i>Unfolded Protein Response</i> .....	61
4. Autofàgia.....	65
4.1 Mecanisme autofàgic.....	66
5. Connexió entre Ca <sup>2+</sup> , reticle endoplasmàtic i autofàgia.....	69
5.1 Ca <sup>2+</sup> i Reticle Endoplasmàtic.....	69
5.2 Estrès de RE i autofàgia.....	70
5.3 Ca <sup>2+</sup> i autofàgia.....	73
6. El paper dual del Ca <sup>2+</sup> , l'UPR i l'autofàgia en el destí cel·lular.....	79
6.1 Ca <sup>2+</sup> en el destí cel·lular.....	79
6.2 UPR en el destí cel·lular.....	81
6.3 L'autofàgia en el destí cel·lular.....	83
7. Paper dual de l'UPR i l'autofàgia en càncer.....	84

7.1 Supressió tumoral.....	85
7.2 Autofàgia.....	85
7.3 Progressió tumoral.....	86
8. Senescència.....	90
8.1 Característiques de l'estat senescent.....	90
8.2 Senescència cel·lular i càncer.....	94
<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>	<b>97</b>
Context i hipòtesi.....	99
Objectius específics.....	99
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>101</b>
1. Tècniques de biologia cel·lular.....	103
1.1 Línies de glioma.....	103
1.2 Cultiu de la línia cel·lular HEK293T.....	104
1.3 Cultius primaris.....	104
1.4 Descongelació, manteniment i congelació.....	105
1.5 Generació i manteniment de Neuroesferes (NS).....	106
1.6 Viabilitat cel·lular.....	106
1.7 Producció de lentivirus i infecció.....	107
2. Tècniques de bioquímica i biologia molecular.....	109
2.1 Construccions plasmídiques per el silenciament gènic.....	109
2.2 Amplificació en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa.....	110
2.3 Immunodetecció de proteïnes.....	112
2.4 Assaig de Ca <sup>2+</sup> amb Fluo-8 AM.....	116
2.5 Assaig de β-galactosidasa.....	117
2.6 Assaig d'AnnexinaV.....	117
3. Animals d'experimentació.....	118
3.1 Consideracions prèvies.....	118
3.2 Animals i tumors subcutanis.....	119

4.	Altres tècniques.....	119
4.1	Càlcul de corbes SSI, SSA i disponibilitat de canals.....	119
4.2	Tècniques bioinformàtiques: Anàlisi d'imatges.....	120
4.3	Avaluació estadística de les dades.....	120
5.	Materials utilitzats en aquest treball.....	121
5.1	Tractaments i drogues utilitzades en aquest treball.....	121
5.2	Llistat de construccions shRNA.....	122
5.3	Llistat de sondes utilitzades per RT-qPCR.....	122
5.4	Llistat d'anticossos primaris.....	123
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>125</b>
	<b>Capítol 1: Concepte de corrents finestra i efectes “off-target” dels bloquejants de TTCCs. ..</b>	<b>127</b>
1.1	Funció dels TTCCs en membranes no excitable: Concepte de corrents finestra. ...	129
1.2	Bloquejants de TTCCs, efectes en els corrents finestra.....	131
	<b>Capítol 2: El NNC indueix apoptosi en cèl·lules de glioblastoma elevant els nivells de Ca<sup>2+</sup>, activant l'UPR i alterant l'autofàgia. ....</b>	<b>137</b>
2.1	NNC indueix l'apoptosi a través de l'elevació de Ca <sup>2+</sup> citosòlic.....	139
2.2	La inhibició dels TTCCs per NNC afecta a l'autofàgia.....	143
2.3	La inhibició dels TTCCs per NNC indueix la branca IRE1α de l'UPR.....	151
2.5	CHOP i Ero1α desencadenants de l'increment de Ca <sup>2+</sup> citosòlic per NNC.....	153
2.6	El silenciament d'IRE1α i JNK1 evita la mort per NNC.....	156
2.7	El silenciament d'IRE1α evita l'activació del factor de transcripció CHOP.....	158
2.8	El silenciament d'IRE1α i JNK1 evita la desregulació autofàgica provocada per NNC....	159
	<b>Capítol 3: El silenciament gènic de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 promou apoptosi en cèl·lules de glioblastoma.....</b>	<b>161</b>
3.1	El silenciament de Ca <sub>v</sub> 3.1 i Ca <sub>v</sub> 3.2 promou apoptosi en cèl·lules adherents i neuroesferes de glioblastoma.....	163

3.2 El silenciament de Ca <sub>v</sub> 3.1 disminueix el creixement tumoral de glioblastoma in vivo..	167
<b>Capítol 4: El silenciament gènic de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 en cultius de glioblastoma promou senescència.</b>	<b>169</b>
4.1 El silenciament de Ca <sub>v</sub> 3.1 i Ca <sub>v</sub> 3.2 afecten la viabilitat dels cultius primaris de glioblastoma.....	171
4.2 El silenciament de Ca <sub>v</sub> 3.1 i Ca <sub>v</sub> 3.2 en cultius primaris de glioblastoma produeix un fenotip compatible amb senescència. ....	172
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>203</b>
<b>ANNEX .....</b>	<b>229</b>
Publicacions.....	231

# RESUMS



## RESUM.

En la present tesi es busca avaluar els canals de calci tipus T (TTCCs) i la seva senyalització com a possibles dianes terapèutiques en el glioblastoma, donat que aquests canals juguen un paper clau en la biologia de cèl·lules canceroses. El glioblastoma és un tumor cerebral de mal pronòstic caracteritzat per un creixement ràpid, invasivitat cel·lular i necrosi, en què prèviament s'ha descrit la implicació dels TTCCs en processos de proliferació i supervivència.

Tot i que els TTCCs es van identificar en cèl·lules excitable, on tenen una funció rellevant ben coneguda, també representen un mecanisme clau d'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en cèl·lules no excitable, on la seva expressió augmenta durant la fase  $G_1$ -S. En cèl·lules tumorals, amb potencials de membrana més despolaritzats, hem estimat que els TTCCs que participen en els corrents són un 1% dels TTCCs presents a la membrana, els quals per tant es troben permanentment oberts.

El principal objectiu d'aquesta tesi és intentar desxifrar el mecanisme pel qual l'atac dels TTCCs indueix mort en cèl·lules de glioblastoma. Amb especial èmfasi en discernir els efectes "*on-target*" dels "*off-target*" i quin paper hi juguen sobre la viabilitat cel·lular.

Els nostres resultats indiquen que el bloqueig dels TTCCs amb NNC 55-0396 promou una sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  del principal magatzem de la cèl·lula, el Reticle Endoplasmàtic, deguda a un efecte "*off-target*". Aquest fet s'explica per la baixa afinitat dels bloquejants de TTCCs pels canals que participen en els corrents finestra, sent per tant necessària una concentració superior per a la seva inhibició i que acaba provocant efectes inespecífics.

L'elevació del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic condueix a l'activació d'una complexa cascada senyalitzadora que implica l'activació de vies de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) i de coneguts efectors de la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  activadors del procés de mort. El conjunt d'aquests esdeveniments porta a una possible doble regulació del procés autofàgic que acaba desencadenant en apoptosi.

Per tal d'estudiar els efectes específics ("*on-target*"), en el present treball hem emprat shRNAs contra les isoformes de  $\text{Ca}_v3.1$  i  $\text{Ca}_v3.2$  en diferents models de glioblastoma. El silenciament específic de les isoformes en línies cel·lulars i en model de neuroesferes afecta la seva supervivència; a més, hi ha una disminució del creixement tumoral en el model *in vivo* de xenografts de ratolí. En cultius primaris de pacients de glioblastoma hem pogut caracteritzar una parada proliferativa. En conjunt, aquests resultats reforcen la idea de que els TTCCs poden ser una bona diana terapèutica, malgrat els bloquejants tenen uns efectes inespecífics que participen o inclús incrementen la inducció de mort cel·lular.





## RESUMEN.

En la presente tesis se busca evaluar los canales de calcio tipo T (TTCCs) y su señalización como posibles dianas terapéutica en el glioblastoma, dado que estos canales juegan un papel clave en la biología de las células cancerosas. El glioblastoma es un tumor cerebral de mal pronóstico caracterizado por un crecimiento rápido, invasividad celular y necrosis, en el que previamente se ha descrito la implicación de los TTCCs en procesos de proliferación y supervivencia.

Aunque los TTCCs se identificaron en células excitables, donde tienen una función relevante y bien conocida, también representan un mecanismo clave de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células no excitables, con un aumento de su expresión durante la fase  $G_1$ -S. En células tumorales, con potenciales de membrana más despolarizados, hemos estimado que los TTCCs que participan en las corrientes son un 1% de los TTCCs presentes en la membrana.

El principal objetivo de esta tesis es descifrar el mecanismo por el cual el ataque de los TTCCs induce la muerte de células de glioblastoma. Con especial énfasis en discernir los efectos “*on-target*” de los “*off-target*” y qué papel juegan en la viabilidad celular.

Nuestros resultados indican que el bloqueo de los TTCCs con NNC 55-0396 promueve una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del principal almacén de la célula, el Retículo Endoplasmático, debida a un efecto “*off-target*”. Este hecho se explica por la baja afinidad de los bloqueantes de TTCCs por los canales que participan en las corrientes ventana, siendo por lo tanto necesaria una concentración superior para su inhibición, provocando efectos inespecíficos.

La elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico conduce a la activación de una compleja cascada señalizadora que implica la activación de vías de la UPR (*Unfolded Protein Response*) y de conocidos efectores de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  activadores del proceso de muerte. El conjunto de estos eventos lleva a una posible doble regulación del proceso autofágico que acaba desencadenando en apoptosis.

Para estudiar los efectos específicos (*on-target*), hemos usado shRNAs contra las isoformas de TTCCs  $\text{Ca}_v3.1$  y  $\text{Ca}_v3.2$  en diferentes modelos de glioblastoma. El silenciamiento específico de las isoformas en líneas celulares y en modelo de neuroesferas afecta su supervivencia; además hay una disminución del crecimiento tumoral en el modelo *in vivo* de xenografts de ratón. En cultivos primarios de pacientes de glioblastoma, hemos podido caracterizar una parada proliferativa. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que los TTCCs pueden ser una buena diana terapéutica, a pesar de que los bloqueantes tienen unos efectos inespecíficos que participan o incluso aumentan la inducción de muerte celular.



## ABSTRACT.

The present doctoral thesis seeks to evaluate the T-Type Calcium Channels (TTCCs) and their signalling as possible therapeutic targets for glioblastoma since these channels play a key role in the cancer cellular biology. Glioblastoma is a brain tumour of poor prognosis that is characterized by a rapid growth, invasiveness and necrosis, in which TTCCs have been implicated in proliferation and survival.

Although TTCCs were identified in excitable cells where they play a prominent function, they also provide a key pathway for  $\text{Ca}^{2+}$  entry in non-excitable cells, with an enhanced expression during the  $G_1$ -S transition. In tumour cells that show more depolarized membrane potentials, we have estimated that approximately a fraction of 1% of TTCCs expressed at the plasma membrane is permanently open and contributes the so-called window currents.

The main aim of this doctoral thesis was to disclose the mechanism by which targeting TTCCs induces the death of glioblastoma cells. We have put special emphasis on discriminating between on-target and off-target effects and the role they play in the cellular viability.

Our results point out that TTCCs block by NNC 55-0396 induces  $\text{Ca}^{2+}$  release from the main  $\text{Ca}^{2+}$  store of the cell, the Endoplasmic Reticulum. This off-target effect can be explained by the low affinity of TTCC blockers for the channels contributing window currents and the need for higher concentrations to achieve cytotoxicity.

The resulting cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation triggers an intricate signalling pathway, which induces the activation the UPR (Unfolded Protein Response) and well-known  $\text{Ca}^{2+}$  signalling effectors of the cell death process. These set of events leads to a dual dysregulation of the autophagic process that results in apoptosis.

In order to study on-target effects, we used shRNAs against  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$  TTCCs isoforms in different glioblastoma models. Survival was affected when expression of specific TTCCs isoforms was silenced in glioblastoma cell lines and in the neurospheres model. In addition, tumour growth was reduced in the *in vivo* model of mouse xenografts. A proliferative arrest has also been described in primary cultures derived from GBM patients. Taken together, these results strengthen the value of TTCCs as therapeutic targets against glioblastoma, aside from the off-target cytotoxicity of commonly used pharmacological blockers



# **ABREVIATURES**



<b>μM</b>	Micromolar
<b>μm</b>	Micrometre
<b>2-APB</b>	<i>2-Aminoethoxydiphenyl borate</i>

## A

---

<b>AECC</b>	<i>Asociación Española Contra El Cáncer</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>AMPK</b>	<i>Adenine monophosphate (AMP) activated protein kinase</i>
<b>ATF 4/6</b>	<i>Activating Transcription Factor 4/6</i>
<b>ATG</b>	<i>Autophagy-related genes</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosina Trifosfat</i>

## B

---

<b>BAPTA-AM</b>	<i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BiP/GRP78</b>	<i>Binding Immunoglobulin Protein/ 78-kDa Glucose-Regulated Protein</i>
<b>BNIP3</b>	<i>BCL-2 Interacting Protein 3</i>
<b>BSA</b>	<i>Albúmina de Sèrum Boví</i>

## C

---

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<i>Calci</i>
<b>CaM</b>	<i>Calmodulina</i>
<b>CaMKII</b>	<i>Ca<sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent protein kinase II</i>
<b>CaMKKβ</b>	<i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β</i>
<b>Caspasa</b>	<i>Cysteine- containing aspartate specific proteases</i>
<b>Ca<sub>v</sub></b>	<i>Voltage-gated calcium channels</i>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
<b>cDNA</b>	<i>Àcid deoxiribonucleic complementari</i>
<b>CHOP/Gadd153</b>	<i>C/EBP homologous protein/ Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i>
<b>CICR</b>	<i>Calcium Induced Calcium Release</i>
<b>CNS</b>	<i>Sistema Nervios Central</i>
<b>CQ</b>	<i>Cloroquina</i>
<b>CRE</b>	<i>cAMP Response Elements</i>



<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>

**D**


---

<b>DDR</b>	Resposta de dany al DNA
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxid
<b>DNA</b>	Àcid deoxiribonucleic
<b>dNTP</b>	Deoxiribonucleòtid

**E**


---

<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentració efectiva màxima mitjana
<b>EMEM</b>	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
<b>EMT</b>	Transició epiteli-mesènquima
<b>ERAD</b>	<i>Endoplasmic Reticule Associated Degradation</i>
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2<math>\alpha</math></i>

**F**


---

<b>FAM</b>	<i>Green fluorescent fluorophore 6-carboxyfluorescein</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>

**G**


---

<b>GSC</b>	Cèl·lules mare de glioma
------------	--------------------------

**H**


---

<b>HBSS</b>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
<b>HUAV</b>	Hospital Universitari Arnau de Vilanova
<b>HVA</b>	<i>High Voltage-Activated</i>

**I**


---

<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentració inhibidora màxima mitjana
<b>ICQ</b>	Immunicitoquímica
<b>IHQ</b>	Immunohistoquímica
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	<i>Inositol-Requiring Enzyme-1<math>\alpha</math></i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol Trifosfat
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor Inositol Trifosfat

**J**


---

**JNK** *c-Jun N-terminal kinase*

**K**


---

**K** Pendent

**KDa** Kilo Dalton

**L**


---

**LC3** *Light chain 3*

**LIR** Regió d'interacció amb LC3

**LVA** *Low Voltage-Activated*

**M**


---

**MAMs** *Mitochondria-associated ER membranes*

**MGMT** *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*

**mM** Millimolar

**mRNA** Àcid ribonucleic missatger

**ms** Millisegons

**mTOR** *Mammalian Target of Rapamycin*

**mV** Millivolts

**N**


---

**NEAA** Aminoàcids no essencials

**nm** Nanòmetre

**NS** Neuroesfera

**NSC** Cèl·lules mare neural

**O**


---

**OIS** Senescència induïda per oncògens

**P**


---

**PAS** *Phagophore Assembly Site*

**PBS** Buffer fosfat salí

<b>PEI</b>	<i>Polyethilenimine</i>
<b>PERK</b>	<i>PKR-like ER kinase</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehid
<b>PI</b>	Iodur de Propidi
<b>PP</b>	Prepols

## R

---

<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	Reticle Endoplasmàtic
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>RT-qPCR</b>	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
<b>RyR</b>	<i>Ryanodine Receptor</i>

## S

---

<b>SASP</b>	Fenotip secretor associat a senescència
<b>SCID</b>	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SERCA</b>	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>shRNA</b>	<i>Short hairpin RNA</i>
<b>SOCE</b>	<i>Store Operated Calcium Entry</i>
<b>SQSMT1</b>	<i>Sequestosome 1</i>
<b>SSA</b>	Estat estacionari d'activació
<b>SSI</b>	Estat estacionari d'inactivació

## T

---

<b>TBST-Buffer</b>	Tampó tris salí amb Tween 20
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>Tg</b>	Tapsigargina
<b>TMZ</b>	Temozolomida
<b>TP</b>	<i>Test Pulse</i>
<b>TPCN</b>	<i>NAADP-dependent 2 pore segment channels</i>
<b>TRP</b>	<i>Transient Receptor Potential</i>

<b>TTCC</b>	Canals de Ca <sup>2+</sup> tipus T
<b>Tween20</b>	<i>Polyoxyethylene sorbitan monolaurate</i>
<b>TPCN</b>	<i>NAADP-dependent 2 pore segment channel</i>

## U

---

<b>UPR</b>	<i>Unfolded Protein Response</i>
------------	----------------------------------

## V

---

<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VGCC</b>	<i>Voltage-gated calcium channel</i>
<b>V<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana

## W

---

<b>WB</b>	Western Blot
<b>XBP-1</b>	<i>X-box binding protein 1</i>

## X

---

<b>XeC</b>	Xestospongina C
------------	-----------------



# INTRODUCCIÓ





## 1. Tumors astrocítics.

El càncer no és una única malaltia, és un conjunt de més de 100 tipus de malalties diferents i distintives, que tenen en comú una multiplicació sense control de cèl·lules anormals que poden envair teixits pròxims. Aquestes cèl·lules també poden disseminar-se cap a altres parts del cos pel sistema limfàtic i sanguini tal com defineix el NIH (*National Institutes of Health*).

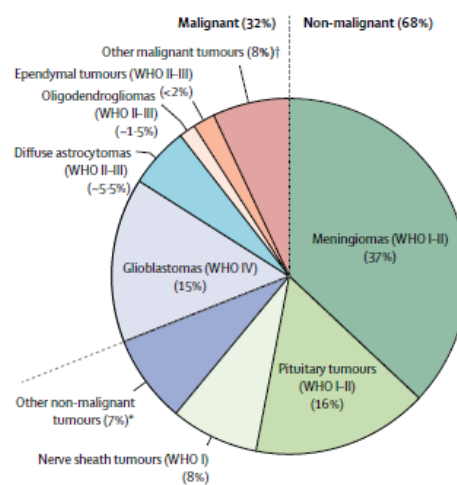
Hanahan i Weinberg van descriure l'any 2006 les característiques bàsiques que presenta un tumor: senyalització sostinguda per proliferar, la capacitat d'ignorar les senyals dels supressors tumorals, resistència a la inducció de la mort cel·lular, immortalitat replicativa, capacitat angiogènica i capacitat per envair i/o metastatitzar (Hanahan and Weinberg, 2000). A aquestes sis característiques, l'any 2011 se'ls hi van afegir quatre més: reprogramació del metabolisme energètic, competència per enganyar el sistema immune, inestabilitat genòmica i capacitat del tumor per induir inflamació (Hanahan and Weinberg, 2011).

Són considerats tumors cerebrals aquells que afecten al sistema nerviós central (SNC) i estan caracteritzats per una alta mortalitat i morbiditat, principalment per la seva localització i el seu creixement altament invasiu (Weller et al., 2015).

En vertebrats, el tub neural embrional o neuroectoderma dona lloc a la major part dels tipus cel·lulars del SNC, incloent neurones, astròcits i oligodendròcits (Zhu and Parada, 2002). Un cop finalitzat el desenvolupament, les neurones es tornen post-mitòtiques mentre que les cèl·lules de la glia retenen la capacitat de proliferar. És per aquesta raó, que la major part de càncers neurològics es consideren d'origen glial i aquests tumors s'anomenen gliomes (Zhu and Parada, 2002; Weller et al., 2015).

Els tumors cerebrals es poden dividir en primaris quan tenen el seu origen en el propi sistema nerviós, o per contra, poden tenir el seu origen fora d'aquest i envair-lo, originant un tumor metastàtic, altrament anomenat secundari.

El *BTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015* estableix que a Estats Units, els tumors cerebrals primaris constitueixen un 2% de tots els càncers amb una incidència de 22 per cada 100.000 persones, amb un augment de la incidència amb l'edat



**Figura 1: Representació simplificada de la incidència anual de tumors cerebrals primaris en adults** (Lapointe et al., 2018).



(Lapointe et al., 2018). A Espanya, segons dades de l'Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC) la incidència dels tumors cerebrals és de 8,73 per cada 100.000 individus en homes i 5,41 en dones. La incidència varia en funció de l'edat, el sexe i el grup ètnic (Fig.1).

## 1.1 Classificació.

Abans de ser publicada la classificació revisada de l'OMS (Organització Mundial de la Salut) del SNC al 2016, els tumors cerebrals eren classificats en base a una caracterització histològica, és a dir, en funció de la seva similitud amb les cèl·lules constituents del SNC, com són els astròcits, els oligodendròcits i les cèl·lules endodurals. A més de la tipificació de tumors histològics, a cada tumor se li assignava un grau (de I al IV) en funció del grau d'anaplàsia. Aquest reflexava el grau de malignitat que presentava el tumor sent el grau I, una lesió de creixement lent associada a un pronòstic favorable, mentre que el grau IV era assignat als tumors més malignes. Malgrat això, la gran heterogeneïtat en aquests tumors portava a múltiples tipus de diagnòstics donat per les divergències entre els observadors (Reifenberger et al., 2017).

Els estudis moleculars i les seqüenciacions genòmiques de les últimes dècades han aclarit la base genètica en tumors cerebrals comuns i altres més rars, podent contribuir a la seva categorització, així com amb un millor diagnòstic i pronòstic d'aquests càncers. És per aquest motiu, que la classificació del 2016 de l'OMS, es basa en un combinació de la classificació fenotípica i genotípica, que ha permès entendre millor els diferents comportaments biològics. Com a resultat, ha tingut implicacions en el pronòstic i ha permès generar diagnòstics integrats que poden guiar en l'ús de teràpies, tant generals com personalitzades.

### 1.1.1 Glioma.

Els gliomes representen un 30% de tots els tumors cerebrals, i un 75% dels tumors cerebrals primaris malignes (Lapointe et al., 2018). Addicionalment, arran de la seva localització té un alt índex de mortalitat, agressivitat i resistència a la teràpia, amb una supervivència del 5% als 5 anys des del diagnòstic. Presenten una gran capacitat d'infiltrar el teixit adjacent, inclús els gliomes de baix grau, fent difícil una resecció quirúrgica completa. D'altra banda, els gliomes no metastatitzen fora del cervell (Zhu and Parada, 2002; Weller et al., 2015).

A partir de la classificació de l'OMS del 2016, s'han incorporat característiques moleculars ben establertes, com la distinció dels diferents gliomes en funció de l'estat de certs gens clau, principalment la mutació en IDH 1 i 2 i la codelecció 1p/19q (Fig.2).

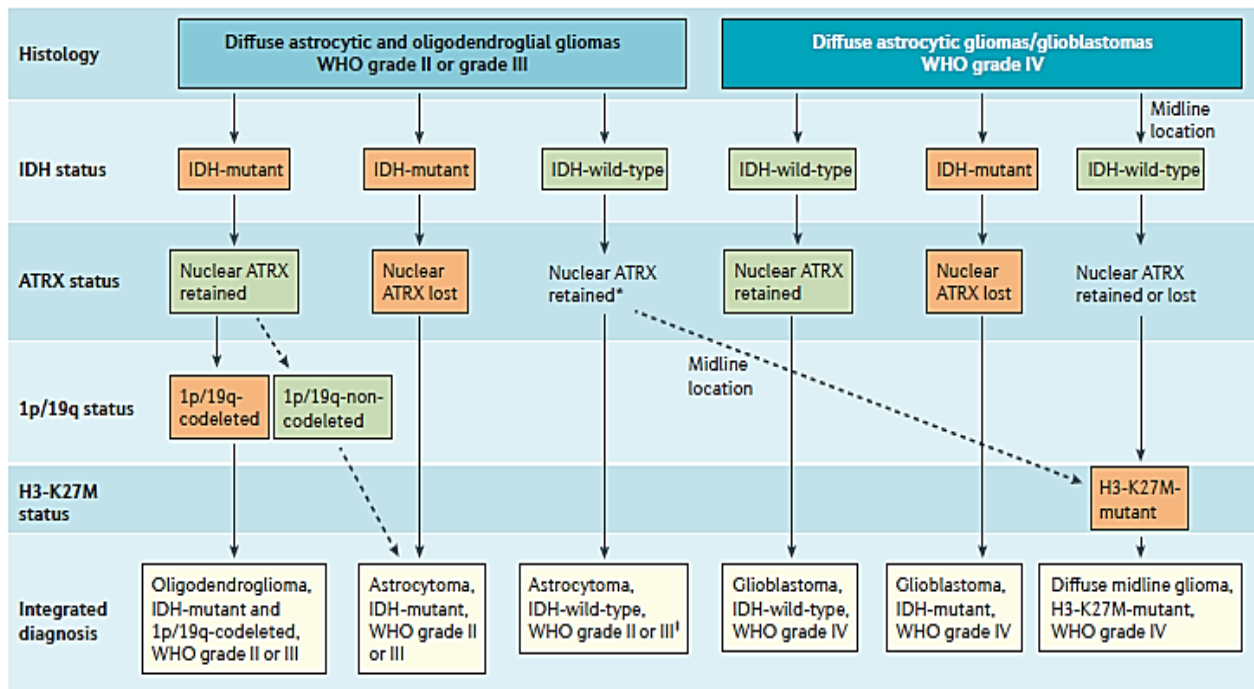
Un cop confirmat l'astrocitoma histològicament, el segon estratificador en pacients adults és la presència o absència de mutacions en la **Isocitrat Dehidrogenasa (IDH) 1 o 2**. Diferents estudis

han demostrat que la presència d'aquestes mutacions diferencia gliomes amb diferents biologies i conductes clíniques (Louis et al., 2016; Komori, 2017; Reifenberger et al., 2017). Mecanísticament, les proteïnes IDH mutants adquireixen una activitat neomòrfica que resulta en la conversió de l' $\alpha$ -cetoglutarat a d-2-hidroxioglutarat (2 HG), que inhibeix diversos components de la maquinària epigenètica, incloent algunes demetilases del DNA. Com a conseqüència, les mutacions en l'IDH provoquen metilacions aberrants d'histones i DNA, portant a una hipermetilació generalitzada de les illes CpG, un fenomen anomenat "fenotip metilador de les illes CpG en glioma" (G-CIMP) (Reifenberger et al., 2017). Precisament l'acumulació de l'onco-metabòlit 2 HG pot ser un dels motius pels quals es considera la IDH mutant com una mutació "conductora" (Cohen et al., 2013). El test diagnòstic per a les mutacions de l'IDH són immunohistoquímiques amb l'anticòs contra la proteïna IDH1-R132H que detecta aquesta mutació sense sentit més comú en gliomes (present en aproximadament un 90% dels tumors amb la IDH mutada) (Reifenberger et al., 2017). Tanmateix, són necessaris estudis addicionals en aquells tumors que donin negatiu en la immunohistoquímica, per descartar altres mutacions menys comuns en les IDH. Els casos rars en els quals les proves moleculars són inconclusives o no es poden realitzar correctament, es classifiquen com a NOS (*Not Otherwise Specified*) (Louis et al., 2016; Komori, 2017; Reifenberger et al., 2017).

Altres mutacions d'estudi només presents en els astrocitomes IDH mutants són la codelecció 1p/19q i les mutacions ATRX i TP53 (ambdues mutacions són mutualment excloents amb la codelecció 1p/19q). **ATRX** té funcions importants en la remodelació de la cromatina i la regulació de la llargada dels telòmers, la seva mutació sol donar a una pèrdua de l'expressió nuclear detectada per immunohistoquímica. **TP53** s'encarrega de regular el cicle cel·lular funcionant com a supressor tumoral i evitant que les cèl·lules proliferin massa ràpid o de forma incontrolada. La seva mutació, també detectada per immunohistoquímica, se sol donar en estadis inicials de la cascada de mutacions durant la tumorogènesi. A més a més, sembla que les mutacions en TP53 disminueixen la quimiosensibilitat del glioblastoma augmentant l'expressió de MGMT. La **codelecció 1p/19q** detectada per FISH com una pèrdua completa dels braços 1p i 19q és una signatura determinant d'oligodendroglioma, independentment de la seva histologia. D'aquesta manera, tots els gliomes IDH1/2 mutants sense codeleccions, són considerats astrocitomes.

A diferència dels tumors adults, els pediàtrics no solen tenir mutacions en la IDH ni la codelecció 1p/19q i normalment es troben classificats dins la categoria d'astrocitoma difús IDH *Wild Type* (WT), tot i tenir un comportament clínic diferent al del seus homòlegs en adults. L'única excepció és la generació de l'entitat nova: glioma intermig difús **H3 K27M-mutant**. Malgrat trobar-se

principalment en nens, també existeixen casos en adults, i es caracteritza per ser un glioma de grau IV amb mutacions a la histona H3.3 (Fig.2) (Louis et al., 2016; Komori, 2017; Reifenberger et al., 2017; Young et al., 2018).



**Figura 2: Aproximació diagnòstica de la classificació histològica i molecular integrada dels gliomes d'acord amb la classificació de tumors del sistema nerviós central de l'OMS al 2016** (Reifenberger et al., 2017).

### Glioblastoma.

El glioblastoma o astrocitoma difús de grau IV, és considerat el tumor intracranial més maligne i més freqüent dins dels tumors cerebrals en adults. Representa al voltant d'un 50% de tots els gliomes i amb una incidència estimada anual d'entre 3-5 nous casos per cada 100.000 persones. Es caracteritza per un pronòstic pobre i una alta resistència a la teràpia, en gran part per culpa de l'heterogeneïtat tumoral, on els diferents fenotips funcionals ajuden al creixement, agressivitat i resistència al tractament (Prager et al., 2020). Malgrat el diagnòstic de glioblastoma segueix sent majoritàriament histopatològic, actualment es classifiquen en glioblastoma (Songtao et al., 2012; Louis et al., 2016):

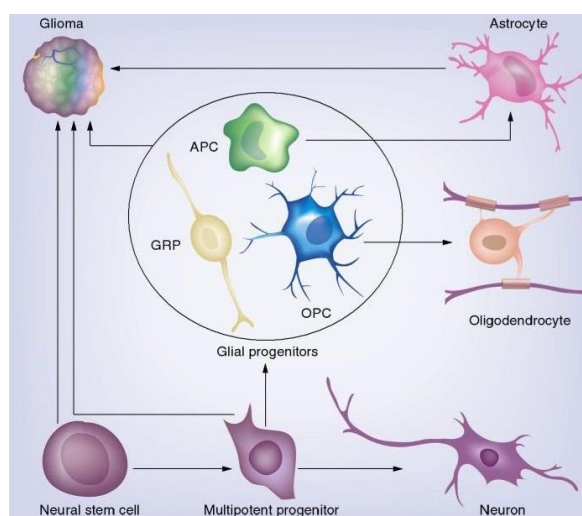
- **IDH Wild Type** es genera en absència d'un precursor menys maligne i es correspon amb el prèviament anomenat glioblastoma primari o *de novo*. Constitueix al voltant d'un 90% dels casos de glioblastoma, i es dona principalment en pacients majors de 55 anys amb una supervivència mitjana de 15 mesos després de la quimioteràpia (Fig.2).

- **IDH mutant** o glioblastoma secundari, es desenvolupa a partir d'un glioma difús de baix grau. Aquest representa un 10% dels casos i principalment es dona en pacients més joves (amb una mitjana d'edat de diagnòstic de 44 anys), sent la supervivència mitjana després de la quimioteràpia de 31 mesos (Fig.2).

En base a diversos estudis, Shirahata et al. 2018 apunta que la nova classificació de l'OMS 2016 utilitza l'IDH com a criteri principal per a la classificació però que l'establiment del grau no es modifica, sent una classificació sense suficient valor pronòstic. Per exemple, astrocitomes IDH mutant de grau II i grau III, tenen diferències importants en supervivència malgrat estar classificats conjuntament. Per intentar resoldre el problema d'establir una classificació pronòstic en gliomes IDH mutants, desenvolupen un algoritme basat en característiques moleculars, morfològiques i dades clíniques. Així, estableixen com el paràmetre més rellevant per la supervivència general la deleció homozigota de CDKN2A/B, seguit per la necrosi i el nombre total de CNV (*Copy Number Variation*). De forma resumida, els tumors de grau IV són els de pitjor pronòstic caracteritzats per la deleció homozigota CDKN2A/B, CNV- load>350Mb i presència de necrosi. Per contra, els de grau 2 no tenen ni deleció homozigota CDKN2A/B, ni presència de necrosi i el CNV-load<350Mb (Shirahata et al., 2018).

## 1.2 Origen.

L'origen del glioblastoma segueix sent un tema de debat. Inicialment es va suggerir que els astròcits patien diverses alteracions oncogèniques donant lloc al glioblastoma (Visvader, 2011). Més tard, es va apuntar a que aquests tumors podien derivar de precursors, com cèl·lules progenitores neuronals o d'oligodendròcits (Liu et al., 2011; Llaguno and Parada, 2016). Tanmateix, la gran heterogeneïtat tumoral present en el glioblastoma, fa extremadament difícil una identificació precisa de l'origen cel·lular d'aquest.



**Figura 3: Potencial gliomagènic dels diferents llinatges neuronals.** El glioma es divideix en diferents subtipus i cada un es pot originar per diferents cèl·lules d'origen (Zong et al., 2012).

Més recentment, el descobriment de les cèl·lules mare neuronals (NSC) en cervell postnatal va obrir la porta a una nova teoria sobre l'origen dels gliomes. La capacitat d'autorenovació de les NSC faria que fossin més susceptibles a acumular mutacions i a desenvolupar tumors. A part de l'habilitat d'autorenovar-se i mantenir la proliferació, les cèl·lules mare de glioma (GSCs) tenen

capacitat per a una diferenciació multipotent (Fig.3)(Geraldo et al., 2019; Gimple et al., 2019). La seva presència s'ha associat amb l'heterogeneïtat tumoral, ja que es poden dividir i diferenciar de forma asimètrica sent més resistents a la quimioteràpia convencional. Les GSCs prosperen en nínxols microambientals durs i complexos, sense estar limitades per punts de controls en proliferació i supervivència que restringeixen als seus homòlegs (Prager et al., 2020). Així doncs, no és estrany que diversos estudis demostrin la capacitat tumorogènica de les GSCs, que a part de recapitular l'heterogeneïtat del tumor parental *in vivo*, també presenten propietats pro-angiogèniques (Geraldo et al., 2019; Gimple et al., 2019).

### 1.3 Tractament.

Malgrat els diversos avenços en la comprensió del glioma genèticament, no s'ha aconseguit generar noves teràpies dirigides molecularment i la modalitat clàssica de tractament basat en la màxima resecció quirúrgica, radioteràpia i quimioteràpia amb l'agent alquilant del DNA Temozolomida (TMZ) segueix sent l'eix terapèutic principal.

Tot i no influir en el tractament estàndard del glioma, el nombre de biomarcadors amb importància predictiva per a l'orientació del tractament postoperatori, està augmentant. Entre aquests trobem la metilació del promotor **MGMT** (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), un enzim capaç de reparar el dany al DNA que produeixen els agent alquilants, com el quimioterapèutic utilitzat en el tractament del glioblastoma, Temozolomida (TMZ). Així, aquells tumors amb el promotor MGMT metilat i conseqüentment amb el gen silenciats, tindran una millor resposta al tractament ja que el dany al DNA produït per la TMZ no podrà ser reparat i seran sensibles al tractament amb el quimioterapèutic, tenint un millor pronòstic (Weller et al., 2015).

#### 1.3.1 Resistència al tractament i recurrència.

A pesar de que molts pacients responen al tractament clàssic, actualment no hi ha cap estratègia que pugui evitar un recreixement tumoral a partir d'aquelles cèl·lules que han sobreviscut al tractament inicial. Després de l'aparició de recurrències, la supervivència del pacient disminueix a menys de 6 mesos.

La dificultat en el tractament d'aquests tumors resideix, per una part, en la seva complexitat inherent, com és la gran **heterogeneïtat tumoral** que presenta. En el glioblastoma, podem diferenciar entre heterogeneïtat intertumoral i intratumoral. La primera es refereix a les alteracions genètiques que pateixen tumors individuals permetent la classificació en subgrups moleculars. En canvi, l'heterogeneïtat intratumoral fa referència a la diversitat dins del tumor

individual. Aquesta no només augmenta la probabilitat de que emergeixin subclons resistents al tractament promovent l'aparició de recurrències, sinó que també facilita el creixement del tumor primari. Les dues estan relacionades amb la diversitat de fenotips cel·lulars tumorals que formen la massa del tumor i les altres entitats cel·lulars que formen el microambient tumoral, tals com la microglia/macròfags o les cèl·lules endotelials (Haar et al., 2012; Prager et al., 2020).

Per una altra part, existeixen nombrosos **sistemes de resistència al tractament** que es poden categoritzar en: resistència al tractament adquirida, quan un tumor que inicialment responia al tractament, deixa de ser sensible a l'agent anticancerígen. O resistència al tractament intrínsec, quan el tumor presenta una resposta insignificant o no hi ha resposta des de l'inici de la teràpia. Entre aquests mecanismes trobem:

- **Eflux de drogues:** permet adquirir resistències a un ampli ventall de drogues anticancerígenes que són expulsades per proteïnes localitzades a la membrana cel·lular (Eramo et al., 2006; Haar et al., 2012).
- **Hipòxia:** la ràpida proliferació de les cèl·lules tumorals provoca que hi hagi un subministrament insuficient de vasos sanguinis, generant àrees d'hipòxia i acidesa. Donada la distància que hi ha fins a la vasculatura, les cèl·lules que es troben en la zona externa del tumor seran més accessibles per les drogues anticancerígenes que les de la zona interna, essent més fàcil en aquest entorn la supervivència de cèl·lules resistents adaptades a la hipòxia (Vaupel, 2001). Un altre factor protector ve donat perquè les cèl·lules canceroses de l'interior del tumor tendeixen a estar inactives i no es divideixen, això provoca que no siguin susceptibles als agents anticancerígens antiproliferatius (Oliver et al., 2010).
- **Reparació del dany al DNA:** molts quimioterapèutics indueixen dany al DNA com a mecanisme d'acció. Idealment, la resposta d'una cèl·lula cancerígena seria la inducció d'apoptosi. Tanmateix, moltes cèl·lules tumorals tenen mecanismes de reparació al DNA, reduint la quimiosensibilitat (Haar et al., 2012). És el cas de l'expressió de l'enzim MGMT en glioblastoma que repara el dany induït al DNA per l'agent alquilant TMZ (Weller et al., 2015; Lee, 2016).
- **miRNAs:** són molècules de RNA monocatenàries no codificants que post-transcripcionalment modifiquen la traducció dels mRNA diana. Tant la sobreregulació com la disminució de miRNAs s'ha implicat en el desenvolupament i resistència del glioblastoma (Haar et al., 2012).

- **Cèl·lules mare:** les GSC a part de tenir la capacitat de generar tumors *in vivo* amb les mateixes característiques que el tumor primari, també participen en la protecció d'aquest, ja que són altament resistents a les teràpies tradicionals iniciant la formació del tumor recurrent (Prager et al., 2020).

### 1.3.2 Noves teràpies en el tractament del glioblastoma.

Poc ha canviat el tractament dels gliomes en l'última dècada. No obstant, tant els avenços en la comprensió dels gliomes, com el descobriment de biomarcadors en tumors cerebrals i antígens específics de tumor, proporcionen oportunitats de nous esquemes de tractaments personalitzats per millorar la supervivència. Entre aquests trobem:

#### Immunoteràpia.

La utilització del sistema immunològic, ja sigui estimulant-lo o suprimint-lo, per lluitar contra les cèl·lules tumorals ha estat un dels camps amb major interès en els últims anys. S'ha observat que el sistema immunològic és un component essencial en el desenvolupament i progressió del tumor, especialment en tumors tan heterogenis com el glioblastoma. Agències reguladores del Estats Units ja han aprovat diverses immunoteràpies com:

- **Inhibidors de punts de control immunitaris:** els punts de control immunitaris són reguladors immunològics negatius. Malgrat l'augment d'assajos clínics basats en la inhibició d'aquests punts de control, estudis preliminars no apunten a un gran benefici pronòstic (Caccese et al., 2019).
- **Vacunes:** aquesta modalitat d'immunoteràpia busca enfortir la resposta immune antitumoral del propi pacient. D'aquesta manera, es busca mobilitzar diversos mecanismes efectors del sistema immune per atacar i destruir cèl·lules tumorals, evitant les cèl·lules no cancerígenes (Kang and Adamson, 2015; Geraldo et al., 2019).
- **Teràpia amb virus oncolítics:** aquests virus tenen l'habilitat d'infectar i replicar-se específicament en cèl·lules tumorals sense afectar a les cèl·lules normals. Entre altres avantatges trobem que no es generen mecanismes de resistència per part de les cèl·lules diana, l'habilitat de l'oncovirus d'escampar-se per tot el tumor un cop infectades unes quantes cèl·lules i la capacitat de desencadenar una resposta immune contra el tumor (Varela-Guruçea et al., 2018). Els adenovirus oncolítics DNX-2401 (Delta-24-RGD) destaquen entre els tractaments en assaig amb millors resultats en glioblastoma i tumors cerebrals pediàtrics (Lang et al., 2018).

### **Teràpia dirigida a l'angiogènesi.**

Donat el ràpid creixement del glioblastoma, aquests són altament dependents de l'angiogènesi per a l'aport de nutrients i oxigen, sent el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) un dels reguladors clau en el procés. Bevacizumab, un anticòs monoclonal recombinant humà de VEGF-A, té un efecte inhibitori en el procés de neovasculariació del tumor.

Al 2009 la FDA (*Food and Drug Administration*) va aprovar el bevacizumab en monoteràpia o combinat amb quimioteràpia com a tractament de segona línia en el glioblastoma recurrent. Malgrat no ha pogut parar la progressió del glioblastoma, la forma més comú de tractar les recurrències en glioblastoma segueix sent el tractament amb bevacizumab en combinació amb altres agents anticancerígens. Aquesta estratègia encara s'utilitza perquè una baixa dosi de teràpia antiangiogènica normalitza la microvasculatura del tumor, la qual cosa pot millorar el lliurament de la droga i reduir la hipòxia. Amb aquesta idea, s'estan intentant desenvolupar nous antiangiogènics alternatius al tractament amb bevacizumab que tinguin una finestra de normalització de la vasculatura més llarga o vies de senyalització alternatives que puguin ser responsables per la resistència quan s'ataca el VEGF (Geraldo et al., 2019).

### **Teràpia dirigida al metabolisme reprogramat.**

Les cèl·lules transformades tenen un metabolisme reprogramat que els proporciona substrats per mantenir la intensa divisió cel·lular. S'ha observat que en diversos tipus de càncers, incloent els gliomes, es produeix "l'efecte Warburg" que consisteix en una glicòlisis aeròbica (Warburg, 1956). Per fomentar aquest flux glicolític, el glioblastoma ha de patir modificacions en l'expressió de proteïnes i la seva activitat, les quals poden ser explotades terapèuticament (Geraldo et al., 2019).

### **Mètodes de lliurament alternatius.**

Creuar la barrera hematoencefàlica ha estat un repte i el motiu pel qual moltes teràpies dirigides han resultat inefectives. Per tal d'aconseguir superar aquest obstacle, s'estan centrant esforços en mètodes de lliurament alternatius, entre aquests trobem:

- Mètodes d'**alliberament intracerebral** on es busca aplicar la teràpia localment per eludir els problemes provocats per la barrera hematoencefàlica. A més a més, permet disminuir l'exposició sistèmica a les drogues i reduir toxicitats (Kang and Adamson, 2015).



- Mètodes d'**alliberament basat en cèl·lules**, com les nanopartícules que es troben en fase I d'assajos clínics, són capaces de travessar la barrera hematoencefàlica i alliberar la droga al teixit tumoral (Sampson et al., 2008).
- Les **cèl·lules mare** també han estat explorades àmpliament en la preclínica com a mecanisme de lliurament, especialment les mesenquimals derivades de la medul·la òssia. Aquestes cèl·lules mare són prometedores portadores de molècules genètiques o citotòxiques, ja que tenen tropisme intrínsec pels tumors cerebrals, poden travessar la barrera hematoencefàlica i no indueixen una resposta immune (Nakamizo et al., 2005).

## 2. Canals de $\text{Ca}^{2+}$ tipus T.

### 2.1 Homeòstasi del $\text{Ca}^{2+}$ .

Els ions de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracel·lular, el segon missatger més abundant a les cèl·lules animals, integren múltiples vies de transducció de senyals rellevants per la biologia cel·lular. Ja sigui en funcions bàsiques de les cèl·lules tals com expressió de gens, síntesi proteica, control del cicle cel·lular, diferenciació, autofàgia o apoptosi. Així com també en funcions cel·lulars especialitzades com l'excitabilitat de la membrana, la contracció muscular o l'alliberament de neurotransmissors.

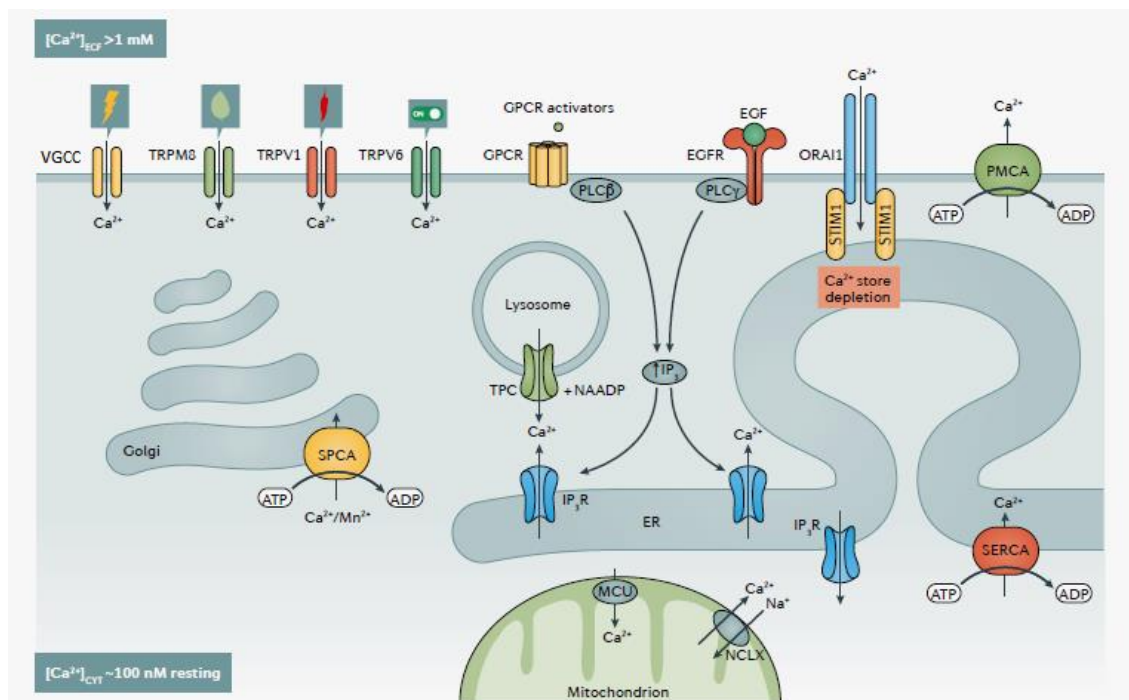
El  $\text{Ca}^{2+}$  es troba en unes concentracions relativament altes en l'espai extracel·lular (de 1 a 2 mM), mentre que les citosòliques es mantenen relativament baixes ( $\sim 10^{-7}$  mol/L). De fet, una petita fracció de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat des d'orgànuls (considerant una concentració general dins dels orgànuls de  $\sim 10^{-5}$  mol/L) o l'entrada des del medi extracel·lular ( $\sim 10^{-3}$  mol/L) dins de la cèl·lula poden activar diverses cascades de senyalització (Cui et al., 2017; Monteith et al., 2017). Entre la diversitat de senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  i les seves conseqüències trobem:

- Augments o oscil·lacions del  $\text{Ca}^{2+}$  lliure citosòlic poden controlar el destí cel·lular participant, per exemple, en proliferació i mort cel·lular (Berridge, 2002; Monteith et al., 2017).
- Increments molt elevats de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma localitzada (conegut com microdominis de  $\text{Ca}^{2+}$ ) poden regular vies de transcripció gènica i cascades de senyalització (La Rovere et al., 2016).
- Augments localitzats i transitoris en l'extrem d'algunes cèl·lules, pot controlar una migració direccional (Wei et al., 2009).

- Augments dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  lliure poden influenciar l'estrès de Reticle Endoplasmàtic (RE) i sensibilitzar a un estímul apoptòtic (Krebs et al., 2015; Vervliet et al., 2016).
- L'alteració de la transferència de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE i el mitocondri pot induir l'autofàgia o fins i tot la mort cel·lular (Kiviluoto et al., 2013; Cárdenas et al., 2016).
- Canvis petits dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriu mitocondrial poden promoure un augment de la síntesi d'ATP. Per contra, un augment sostingut pot promoure la mort cel·lular (Kiviluoto et al., 2013; Cárdenas et al., 2016).

Per aquest motiu, es necessita un control de magnitud i espai-temporal estricte de les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  als compartiments intracel·lulars (Raffaello et al., 2016; Monteith et al., 2017). En consonància amb les seves múltiples funcions, l'alteració de la senyalització normal del  $\text{Ca}^{2+}$  pot contribuir al desenvolupament de fenotips malignes, ja sigui permetent que les cèl·lules proliferin a taxes elevades, escapin de la mort cel·lular, o augmentin la motilitat i invasivitat, entre d'altres (Cui et al., 2017; Maklad et al., 2019).

L'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  està regulada per una àmplia varietat de canals iònics, bombes de  $\text{Ca}^{2+}$ , intercanviadors de  $\text{Ca}^{2+}$ , proteïnes d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$ , així com proteïnes que participen en senyalització i els seus efectors. En conjunt, permeten tant l'elevació com la restricció del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic i el seu magatzem als diferents orgànuls cel·lulars, i també organitzen la seva propagació pel citosol i nucli (Fig. 4) (Bootman et al., 2002; Barbado et al., 2009).



**Figura 4: Exemples de canals i bombes permeables per  $\text{Ca}^{2+}$ , així com intercanviadors de la membrana plasmàtica i d'orgànuls intracel·lulars** (Monteith et al., 2017).

El RE, el Golgi i el mitocondri són els principals orgànuls que acumulen  $\text{Ca}^{2+}$  i que per tant regulen la seva concentració al citosol (Monteith et al., 2017; Pedriali et al., 2017):

- **Reticle Endoplasmàtic (RE)** (Fig.4). Principal magatzem de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cèl·lula. Primordialment regula el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de:
  - **RyR** (*Ryanodine Receptor*): canals de  $\text{Ca}^{2+}$  que s'activen per la unió del propi  $\text{Ca}^{2+}$ , fent possible l'anomenat alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per  $\text{Ca}^{2+}$  (*Calcium Induced Calcium Release*; CICR) que amplifica els senyals iniciats per l'entrada de l'ió procedent de l'exterior (Endo, 2009; Santulli et al., 2017).
  - **IP<sub>3</sub>R** (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*): un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que s'activa per la unió de  $\text{Ca}^{2+}$  i per l'IP<sub>3</sub> generat per la fosfolipasa C (PLC) a partir de PIP<sub>2</sub> (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*). La seva activació permet que el  $\text{Ca}^{2+}$  surti del RE a favor de gradient electroquímic, produint un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic, i també participa en el CICR (Foskett et al., 2007; Cui et al., 2017).
  - **SERCA** (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*): pot retornar el  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del RE gràcies al seu transport actiu (Vandecaetsbeek et al., 2011).
- **Golgi** (Fig.4). És un magatzem de  $\text{Ca}^{2+}$  amb una major resistència a l'alliberament d'aquest respecte altres orgànuls. Els seus sistemes més rellevants per a la regulació del  $\text{Ca}^{2+}$  són:
  - **TPC1** (*Two-Pore Channels 1*) i **TRP2** (*Tyrosinase-Related Protein-2*): canals iònics que regulen l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  des de components del sistema endolisosomal (Pitt et al., 2016).
  - **Bombes SPCA1-SPCA2** (*Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase*): de forma similar a la SERCA, el seu transport actiu segresta al lumen del Golgi el  $\text{Ca}^{2+}$ , així com ions de manganès ( $\text{Mn}^{2+}$ )(Vandecaetsbeek et al., 2011).
- **Mitocondri** (Fig.4). Permet una captació ràpida del  $\text{Ca}^{2+}$ . Principalment els seus mecanismes són mitjançant:
  - **MCU** (*Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter*): permet l'entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  al mitocondri i està regulat per MICU1 (*Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake 1*), una proteïna "gatekeeper" (De Stefani et al., 2016).

- NCX (*Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger*): s'encarrega de bombejar els ions de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial acumulats cap al citosol, gràcies a l'intercanvi amb el Na<sup>+</sup> que entra a favor del seu gradient electroquímic (De Stefani et al., 2016).
- Canals de Ca<sup>2+</sup> mitocondrials: existeixen diferents tipus, els més rellevants són els mRYRs (Ryu et al., 2010), els VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) (Shoshan-Barmatz et al., 2017) i els mCa2 (*Mitochondrial Calcium Channel Type 2*) (Hoppe, 2010).

En la **membrana plasmàtica**, els mecanismes de control de la concentració del Ca<sup>2+</sup> intracel·lular es divideixen en:

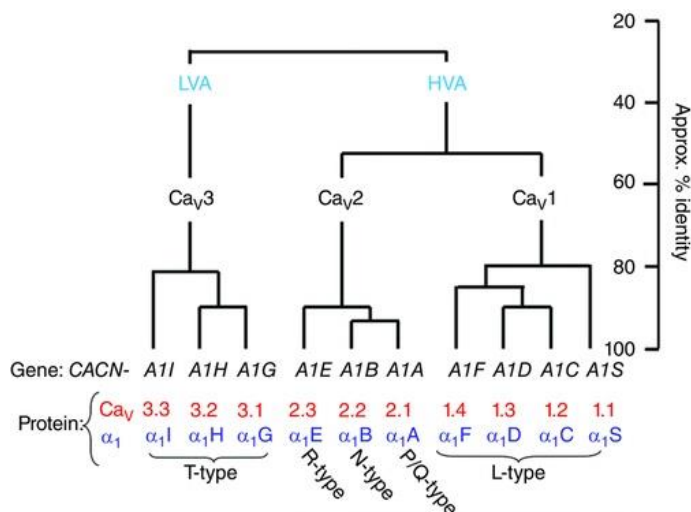
- **Eflux de Ca<sup>2+</sup>** des del citosol a l'espai extracel·lular (Fig.4). Es produeix en contra del gradient de concentració gràcies al sistema de transport actiu, ja sigui utilitzant ATP o gradients iònics:
  - PMCA (*Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-Transporting ATPases*): conjunt de bombes que aconseguen l'eflux de Ca<sup>2+</sup> gràcies al trencament de l'ATP. Està format per 4 gens diferents que a partir del seu *splicing* alternatiu generen una gran varietat de funcions i regulacions (Strehler and Zacharias, 2001).
  - Intercanviadors de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>: permeten l'extrusió de Ca<sup>2+</sup> de la cèl·lula utilitzant l'entrada de Na<sup>+</sup> a favor del seu gradient electroquímic (Blaustein and Lederer, 1999).
- **Entrada de Ca<sup>2+</sup>** al citosol mitjançant canals permeables a l'ió Ca<sup>2+</sup> (Fig.4):
  - TRP (*Transient Receptor Potential*): família de proteïnes que poden formar canals catiónics homo- o heterotetramèrics provocant l'augment intracel·lular de Ca<sup>2+</sup> i Na<sup>+</sup>. Poden ésser activats per una gran varietat d'estímuls tals com el Ca<sup>2+</sup>, temperatura, pH, espècies reactives d'oxigen (ROS) o estrès químic i mecànic (Ramsey et al., 2006; Smani et al., 2015; Duitama et al., 2020).
  - ORAI (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel protein 1*) - STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*): canals d'entrada de Ca<sup>2+</sup> involucrats en un mecanisme anomenat SOCE (*Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry*). En l'activació d'aquest mecanisme, primerament STIM1 detecta el buidament o reducció dels magatzems de Ca<sup>2+</sup> del RE. Això provoca la translocació de STIM1 als punts d'unió entre el RE i la membrana plasmàtica, on interacciona amb els canals ORAI1 que permeten l'entrada de Ca<sup>2+</sup> al citosol (Hogan and Rao, 2015; Monteith et al., 2017).

- Receptors ionotròpics: canals catiónics (que en alguns casos poden tenir una permeabilitat superior pel  $\text{Ca}^{2+}$  vers altres cations) que s'obren per la unió d'un lligand o primer missatger a un domini extracel·lular. Alguns exemples són els receptors purinèrgics, receptors d'acetilcolina de tipus nicotínic i els receptors de glutamat ionotròpics, entre d'altres (Vernino et al., 1992; Wisden and Seeburg, 1993; Scarpellino et al., 2019).
- VGCC (Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels): també coneguts com la família  $\text{Ca}_v$ , medien una entrada ràpida de  $\text{Ca}^{2+}$  en resposta a la despolarització de la membrana. Hi ha 6 subfamílies de VGCCs que es classifiquen en tipus L, N, P, Q, R i T (Catterall, 2000).

## 2.2 Canals de $\text{Ca}^{2+}$ voltatge dependent (VGCC).

Els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  voltatge dependent (VGCCs) són essencials per a l'inici de les cascades de senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$ , desencadenades *a priori*, per despolaritzacions de la membrana (Ertel et al., 2000; Stock et al., 2013). D'una forma simplificada, aquests canals es poden trobar en 3 estats conformacionals: en repòs o desactivat (tancats i sensibles a un estímul despolaritzant), activats (oberts) i inactivats (no conductors i refractaris a un estímul despolaritzant). Els canvis conformacionals per passar entre aquests estats s'anomenen accions de comporta o *gating* i són dependents de temps i del potencial de membrana o de l'estat del canal (Visa et al., 2019).

En base als perfils electrofisiològics i farmacològics, els VGCC es poden dividir en canals activats a alt voltatge (HVA; *High Voltage-Activated*) o activats a baix voltatge (LVA; *Low Voltage-Activated*). Els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA són activats per potencials de membrana més despolaritzats i per tant, menys negatius (al voltant de -40 mV), mentre que els LVA (també coneguts com canals de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus T) són activats a potencials de membrana propers al repòs (al voltant de -70 mV).

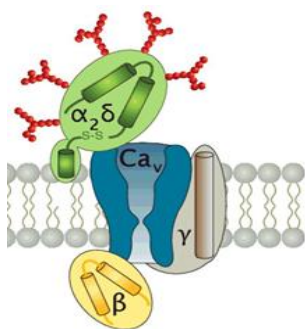


**Figura 5: Homologia de la subunitat  $\alpha_1$  dels VGCCs.** La relació entre les subunitats  $\alpha_1$  dels VGCCs, el nom dels gens (negre) i la nomenclatura de la proteïna (vermell i blau). Històricament, els VGCCs primer es van dividir en HVA i LVA (Dolphin, 2016).

S'han identificat almenys 10 gens que donen lloc al porus principal  $\alpha_1$  dels VGCC en mamífers. Es creu que la duplicació gènica i la divergència des d'un gen codificant de canals de  $K^+$  dependents de voltatge va donar lloc als diferents gens que codifiquen per canals de  $Ca^{2+}$  dependents de voltatge. Així els 10 membres de la família  $Ca_v$  en mamífers, es troben classificats en 3 subfamílies en base a l'homologia de seqüència de la subunitat  $\alpha_1$ :  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  i  $Ca_v3$ , cadascun dels quals està format per diferents membres (Fig.5)(Ertel et al., 2000; Perez-Reyes, 2003; Antal and Martin-Caraballo, 2019).

Els canals  $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$  (també coneguts com canals tipus L) estan codificats pels gens CACNA1S, -C, D i F respectivament. Els canals  $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$  (també anomenats, en el mateix ordre canals tipus P/Q-, N- i R-) estan codificats per CACNA1A, -B i E- respectivament. Finalment els canals  $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$  (o canals tipus T) estan codificats pels gens CACNA1G, -H i -I (Fig.5) (Buchanan and McCloskey, 2016; Dolphin, 2016).

Adicionalment a la subunitat principal formadora de porus  $\alpha_1$ , hi ha múltiples subunitats auxiliars que regulen el tràfic a membrana i les propietats biofísiques dels VGCCs de les famílies  $Ca_v1$  i  $Ca_v2$ , entre les quals trobem  $\alpha_2\delta$  (amb un gran domini extracel·lular),  $\beta$  (intracel·lulars) i  $\gamma$  (amb un gran domini de transmembrana), que a la seva vegada tenen diferents membres (Fig.6). Recentment, s'ha descobert que els canals de la família  $Ca_v3$  estan associats a una proteïna, CACHD1, que té un domini extracel·lular que mostra una notable homologia amb el domini extracel·lular de les  $\alpha_2\delta$  i que controla l'expressió dels canals  $Ca_v3$  a la membrana en sistemes d'expressió heteròloga i en neurones (Dolphin, 2018; Stephens and Cottrell, 2019).

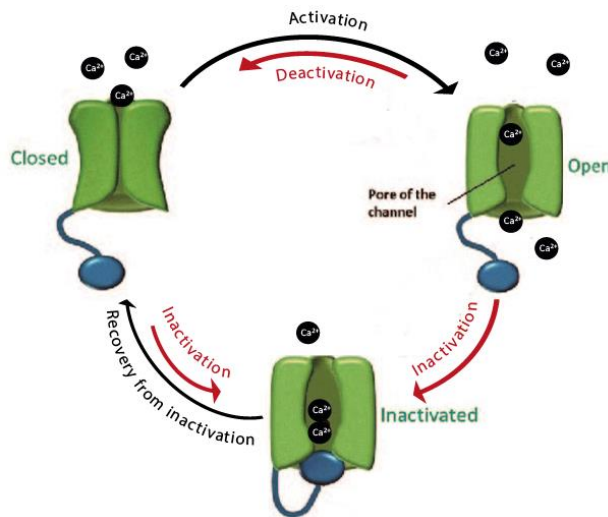


**Figura 6: Representació esquemàtica del VGCC.** El canal està format per la subunitat  $Ca_v$  ( $\alpha_1$ ) formadora del porus i envoltada per la subunitat  $\beta$  (groc),  $\alpha_2\delta$  (verd) i  $\gamma$  (marró) (Weiss and Zamponi, 2017).

### 2.2.1 Canals de $Ca^{2+}$ tipus T.

Els canals de la família  $Ca_v3$  o canals de  $Ca^{2+}$  tipus T (TTCCs) anomenats així per les corrents “tiny” (petites) i transitòries que presenten, es caracteritzen per tenir propietats biofísiques diferents. En part perquè comparteixen menys homologia estructural amb la resta de VGCCs. Entre aquestes característiques distintives dels TTCCs, trobem una activació en potencials de membrana propers al repòs per la seva ràpida activació i inactivació a potencials negatius i una cinètica de desactivació lenta (Fig.7). En altres paraules, els TTCCs s'obren a potencials de

membrana més negatius que els HVA, amb la qual cosa necessiten despolaritzacions més petites. Addicionalment, els corrents a través seu són transitoris com a conseqüència d'una ràpida inactivació dependent de voltatge. Un cop es produeix la repolarització de la membrana, els TTCCs que romanen oberts es tanquen amb relativa lentitud (desactivació) (Catterall, 2000; Sallán et al., 2018). Per aquests motius els TTCCs són adequats per amplificar petites despolaritzacions de la membrana i mediar oscil·lacions de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica.

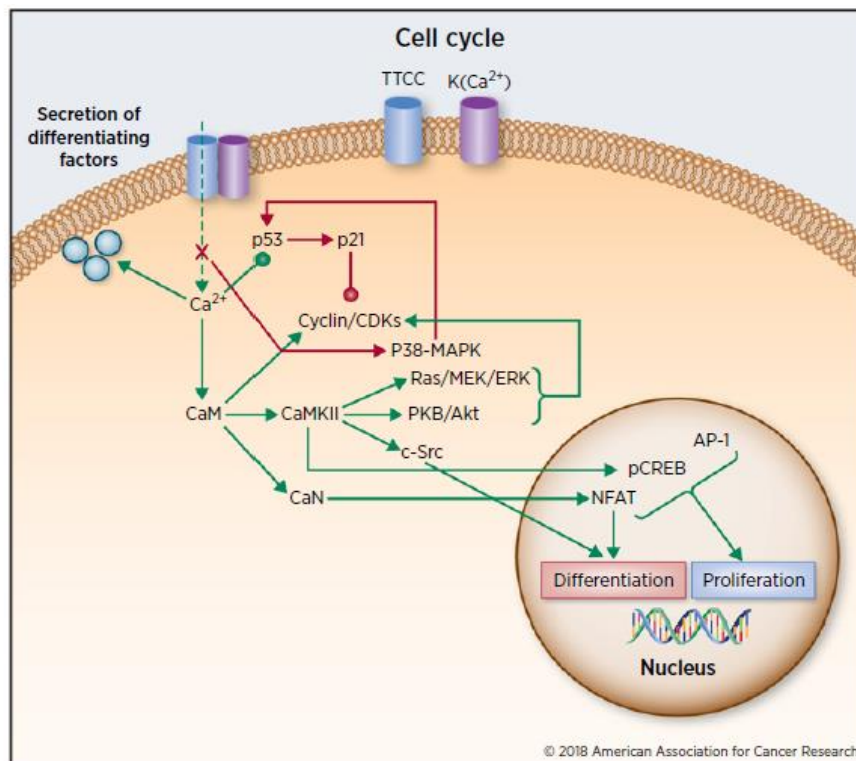


**Figura 7: Gating dels TTCCs.** Les transicions entre l'estat obert, tancat o desactivat i inactivat són dependents de temps i de l'estat del canal o del voltatge de transmembrana. L'activació és un procés més ràpid que la inactivació. L'estat inactivat és termodinàmicament estable i es pot assolir tant des de l'estat obert com tancat. Adaptat de Visa et al. 2019.

En realitat, l'expressió dels TTCCs inicialment es va relacionar amb l'excitabilitat de la membrana, com en el cas de les descàrregues de potencials d'acció neuronals (*neuronal firing*) (Carbone and Lux, 1984; Jahnsen and Llinás, 1984) o dels potencials d'acció de les cèl·lules marcapassos cardíacs (Nilius, 1986). No obstant això, en cèl·lules no excitablels els TTCCs proporcionen un mecanisme d'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en potencials de membrana propers al repòs i presenten una expressió augmentada durant la transició  $G_1$ -S, participant així en les ones oscil·latòries del  $\text{Ca}^{2+}$  necessàries per a la progressió del cicle cel·lular (Lory et al., 2006; Gray et al., 2013). Durant aquest període s'espera un augment de la disponibilitat de TTCCs i de la força conductora per a l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ja que la membrana està hiperpolaritzada (Urrego et al., 2014).

Aquest fet, també pot ser cabdal en cèl·lules amb voltatges de membrana més despolaritzats tals com cèl·lules mare o canceroses (Sallán et al., 2018). De fet, la "hiperactivació" dels TTCCs s'ha descrit com un dels mecanismes per desregular la senyalització/homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  en cèl·lules canceroses (Fig.8). D'aquesta manera, un augment en l'entrada basal del  $\text{Ca}^{2+}$  i la conseqüent remodelació de la seva senyalització, pot contribuir a la progressió tumoral mitjançant un augment de la proliferació, promovent la invasivitat i/o conferint resistència a la quimioteràpia (Büsselberg and Florea, 2017; Monteith et al., 2017). A més a més, els TTCCs també poden regular la migració cel·lular, la qual cosa pot tenir implicacions importants en el

desenvolupament de metàstasi (Zhang et al., 2012). Precisament per l'augment d'evidències relacionant els TTCCs amb diversos *hallmarks* del càncer, hi ha hagut un augment d'interès en l'estudi d'aquests en l'última dècada i s'han proposat com a possibles dianes terapèutiques. Així, les dades disponibles indiquen que els nivells d'expressió dels TTCCs depenen del tipus de càncer, de l'estadi d'aquest i de la isoforma de TTCC (Taula 1) (Sallán et al., 2018).



**Figura 8:** Els TTCCs formen complexos amb els canals  $K(Ca^{2+})$  de la membrana plasmàtica i desencadenen vies de senyalització que poden afavorir la progressió del cicle cel·lular i la diferenciació, dependent del tipus cel·lular i el context. La figura combina la selecció d'associacions identificades en diferents estudis per la senyalització mediada pels TTCCs (fletxes verdes) i els efectes de la inhibició dels TTCCs (fletxes/creus vermelles) incloent l'activació dels complexos ciclina/CDK i els esdeveniments de fosforilació/desfosforilació. Les puntes de les fletxes indiquen si la modulació és positiva (triangular) o negativa (rodona). Les línies discontinües marquen el flux/transport de l'ió a través de la membrana plasmàtica (Sallán et al., 2018).



TTCC isoform	Tumor type	Prognostic	Expression level	Assay	References
Ca <sub>v</sub> 3.1	Ovarian	n.d.	Increased protein <sup>a</sup>	IHC	26
Ca <sub>v</sub> 3.2	Ovarian	n.d.	Increased protein <sup>a</sup>	IHC	26
Ca <sub>v</sub> 3.1	GBM (82% samples), prostate (75% samples)	n.d.	n.d.	IHC	27
Ca <sub>v</sub> 3.2	GBM (27% samples), prostate (100% samples)	n.d.	n.d.	IHC	27
Ca <sub>v</sub> 3.1	Melanoma	Negative	Increased protein <sup>a</sup>	IHC	28
Ca <sub>v</sub> 3.2	Melanoma	Negative	Increased protein <sup>a,b</sup>	IHC	28
Ca <sub>v</sub> 3.2	Subset of GBM enriched in GSC	Negative	Increased mRNA <sup>a</sup> and increased protein <sup>a</sup>	RT-PCR and WB	20
Ca <sub>v</sub> 3.1	Sarcoma, lung, uterine, prostate, breast carcinoma, rectosigmoid carcinoma	n.d.	Increased mRNA <sup>a</sup>	MA, Oncomine database	31
Ca <sub>v</sub> 3.2	Ovarian, renal, brain, bladder, mantel cell lymphoma, colorectal carcinoma	n.d.	Decreased mRNA <sup>a</sup>		
Ca <sub>v</sub> 3.2	Renal, sarcoma, gastrointestinal stroma	n.d.	Increased mRNA <sup>a</sup>	MA, Oncomine database	31
Ca <sub>v</sub> 3.2	Brain, ovarian, bladder, breast	n.d.	Decreased mRNA <sup>a</sup>		
Ca <sub>v</sub> 3.3	Breast, liposarcoma, esophageal adenocarcinoma	n.d.	Increased mRNA <sup>a</sup>	MA, Oncomine database	31
Ca <sub>v</sub> 3.3	GBM, anaplastic oligodendroglioma	n.d.	Decreased mRNA <sup>a</sup>		
Ca <sub>v</sub> 3.1	Gastric, lung	Positive	n.d.	MA, Kaplan-Meier database	32
Ca <sub>v</sub> 3.2	Ovarian	Negative			
Ca <sub>v</sub> 3.2	Gastric, lung	Negative	n.d.	MA, Kaplan-Meier database	32
Ca <sub>v</sub> 3.3	Ovarian	Positive			
Ca <sub>v</sub> 3.3	Gastric, lung, ovarian	Negative	n.d.	MA, Kaplan-Meier database	32
Ca <sub>v</sub> 3.1	Pancreatic, hepatic, gastric, colorectal, acute myelogenous leukemia (18%-35% samples)	n.d.	Hypermethylation	MSP	33-36

Abbreviations: n.d., not determined; MA, microarray analysis; MSP, methylation-specific PCR; WB, Western blot.

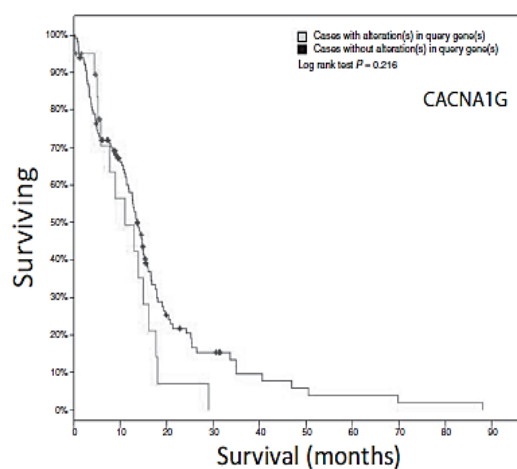
<sup>a</sup>Relative to untransformed tissue.

<sup>b</sup>Metastatic versus primary tumors.

**Taula 1: Signatura i valor dels TTCCs com a marcador pronòstic en càncer** (Sallán et al., 2018).

### 2.2.1.1 Canals de Ca<sup>2+</sup> tipus T en glioblastoma.

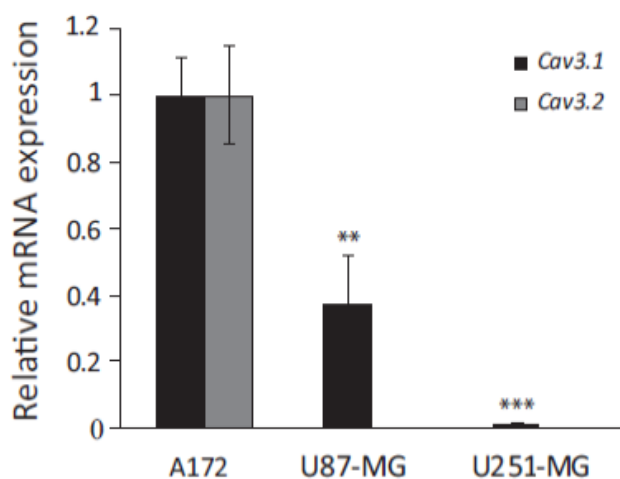
Segons el *Human Protein Atlas*, un 82% de les biòpsies de glioblastoma expressen Ca<sub>v</sub>3.1 i un 27% Ca<sub>v</sub>3.2. D'altra banda, anàlisis genòmic *in silico* del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) mostren que de les 136 mostres de glioblastoma analitzades, 20 sobreexpressen Ca<sub>v</sub>3.1 i 13 sobreexpressen Ca<sub>v</sub>3.2 i que aquells pacients amb alteracions en alguna de les dues isoformes tendeixen a tenir una supervivència global més curta (Fig.9) (Zhang et al., 2017; Visa, Sallán et al., 2019).



**Figura 9: Supervivència global amb l'estimador de Kaplan-Meier en pacients amb glioblastoma que presenten alteracions del gen CACNA1G (Ca<sub>v</sub>3.1).** L'anàlisi es va realitzar a partir de dades del TCGA per a l'expressió de mRNA de Ca<sub>v</sub>3.1 (CACNA1G) i Ca<sub>v</sub>3.2 (CACNA1H). De 136 mostres de glioblastoma, 20 casos sobreexpressen Ca<sub>v</sub>3.1 (15%) i 13 casos sobreexpressen Ca<sub>v</sub>3.2 (10%), i 4 casos sobreexpressen els dos canals (5%). La co-ocurrència va ésser significativa ( $P < 0,05$ ) (Sallán et al., 2018).



Estudis han descrit prèviament l'expressió de les isoformes  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$ , tant a nivell de mRNA com per proteïna, en línies cel·lulars i en mostres de teixit de glioblastoma (Latour et al., 2004; Zhang et al., 2012; Valerie et al., 2013; Visa, Sallán et al., 2019). El nostre grup també ha demostrat una expressió augmentada dels TTCCs, especialment de  $Ca_v3.1$ , en un model cel·lular de glioblastoma resistent al quimioterapèutic TMZ i en biòpsies de glioblastoma recurrent (Fig.10) (Visa, Sallán et al., 2019). Latour et al. 2004 descriu diferències significatives en el *splicing* alternatiu de  $Ca_v3.1$ . Per exemple, en cervell normal adult l'expressió de les isoformes  $Ca_v3.1a$  i  $Ca_v3.1bc$  és més abundant. En canvi en els gliomes, la majoria expressen  $Ca_v3.1bc$  i  $Ca_v3.1b$ , així com l'expressió d'una nova variant,  $Ca_v3.1ac$ . En el cas de  $Ca_v3.2$ , s'ha observat una expressió elevada, tant a nivell de transcripts com de proteïna, en un subconjunt de tumors de glioblastoma enriquits en cèl·lules mare de glioma (GSC) (Zhang et al., 2017) consistent amb funcions prèviament descrites d'aquesta isoforma en *stemness* (Rodríguez-Gómez et al., 2012).



**Figura 10: Prevalència dels TTCCs en línies de glioblastoma.** Els nivells de mRNA de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  es van detectar per RT-qPCR de les línies de glioblastoma A172, U251-MG i U87-MG.  $Ca_v3.1$  és el prevalent, mentre que  $Ca_v3.2$  només es detecta en la línia cel·lular A172 \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (Sallán et al., 2018).

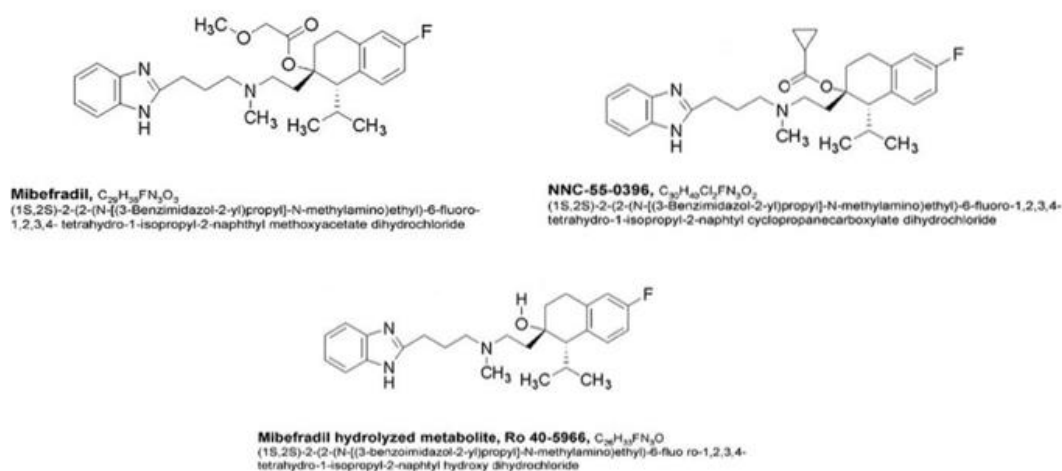
### 2.2.1.2 Canals de $Ca^{2+}$ tipus T com a diana en el glioblastoma.

Considerant el paper, cada cop més establert, dels TTCCs en la progressió i recurrència tumoral, ha guanyat força la idea d'inhibir-los per tal de disminuir la proliferació o induir la mort de les cèl·lules canceroses. Aquest darrer fenomen va ser descrit per Valerie *et al.*, 2013 en glioblastoma i per treballs pioners en el nostre grup en melanoma (Fig.11) (Das et al., 2013).

D'altra banda, donat que els TTCCs han estat àmpliament estudiats en el context de cèl·lules excitables en fisiologia cardiovascular i neurofisiologia, l'ús d'antagonistes de canals de  $Ca^{2+}$  dependents de voltatge (*Ca<sup>2+</sup> Channels Blockers*, CCBs) s'ha utilitzat en el tractament de la

hipertensió, l'epilèpsia o el dolor crònic. Així, aquestes drogues aprovades per la FDA podrien ser redefinides per al tractament del càncer.

Entre aquests fàrmacs, trobem el mibefradil (Fig. 11) que es distingeix d'altres CCB per la seva major afinitat pels TTCCs, tot i que també inhibeix amb menor afinitat els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus L. El mibefradil va ésser aprovat per la FDA i es va introduir l'any 1997 clínicament com a fàrmac per a l'angina de pit i la hipertensió, però va ser retirat del mercat per interaccions amb altres drogues i la inhibició del citocrom P450. El mibefradil és metabolitzat principalment al fetge, on produeix fins a 30 metabòlits. Un dels principals metabòlits hidrolitzats és el Ro 40-5966 (Fig.11), el qual s'uneix amb molta afinitat als canals de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus L. L'activitat sobre els tipus L és una característica inespecífica que pot explicar altres efectes adversos associats al mibefradil. No obstant això, en els últims anys s'ha tornat a introduir en la pràctica clínica amb la condició de medicament orfe, per al tractament de càncers de pàncrees, glioblastoma i càncer d'ovari per la FDA (clinicaltrials.gov).



**Figura 11: Estructures químiques del mibefradil, NNC 55-0396 i del metabòlit hidrolitzat del mibefradil, Ro 40-5966** (Bui et al., 2008).

D'altra banda, s'ha desenvolupat un anàleg del mibefradil anomenat NNC 55-0396 (Fig. 11) que ha mostrat ser equipotent al mibefradil antagonitzant els TTCCs sense presentar inhibició del tipus L, ja que es va desenvolupar per ser resistent a la hidròlisi. A més a més, el NNC 55-0396 té un perfil inhibitori per CYP3A4 molt més dèbil que el mibefradil (Bui et al., 2008).

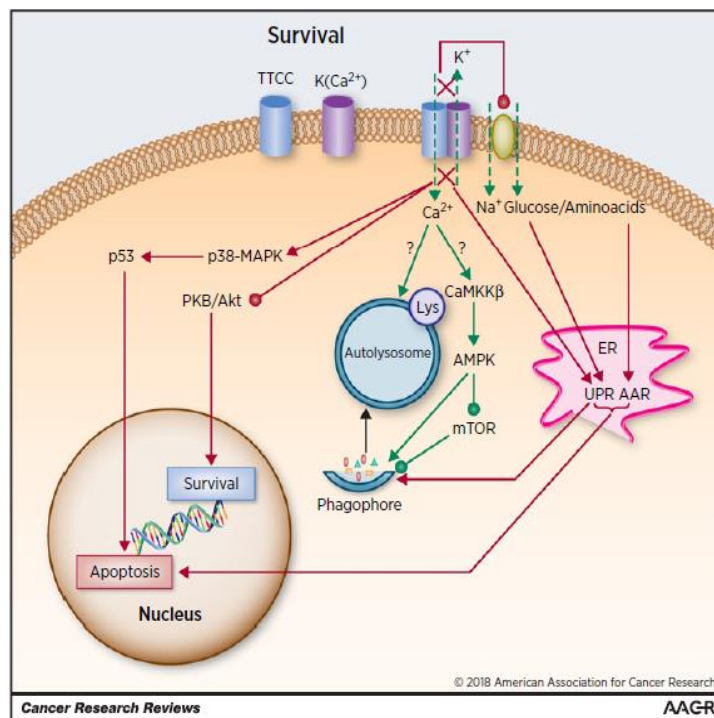
La idea de que els TTCCs poden ser una bona diana terapèutica, ha estat reforçada per múltiples estudis on han demostrat tant *in vitro* com *in vivo*, que la inhibició farmacològica o el

silenciament dels TTCCs porta a una inhibició de la proliferació i/o una disminució de la supervivència cel·lular de les cèl·lules tumorals (Fig.12).

En el cas del glioblastoma, Niklasson et al. 2017 van fer un assaig per al cribatge de drogues en GSCs i van trobar que entre diferents disruptors de la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$ , els compostos amb activitat de bloqueig dels TTCCs en disminuïen la viabilitat cel·lular.

Valerie et al. 2013, van mostrar que a part de la inhibició de la proliferació, el mibefradil o el silenciament del gen de  $\text{Ca}_v3.1$  o  $\text{Ca}_v3.2$  induïa una mort apoptòtica en cèl·lules de glioblastoma. La inhibició dels TTCCs també sensibilitzava per la TMZ, establint la base per a l'utilització de bloquejants de TTCC en teràpia combinada.

Zhang et al., 2012 va demostrar que la inhibició amb mibefradil reduïa la viabilitat de GSCs. També va mostrar que l'administració de mibefradil inhibia el creixement de les GSC implantades intracranialment en xenografts murins de glioblastoma i sensibilitzava el tumor al tractament amb TMZ.



**Figura 12: La senyalització mediada per TTCCs (fletxes verdes) i els efectes de la inhibició dels TTCCs (fletxes/creus vermelles) en la supervivència cel·lular i apoptosi.** La figura combina una selecció d'associacions identificades en diferents estudis. La punta de la fletxa senyala si la modulació és positiva (triangular) o negativa (rodona). La inhibició dels TTCCs pot induir apoptosi per desfosforilació de PKB/Akt o per l'activació de l'eix p38-MAPK-p53. El bloqueig dels TTCC/ $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$  també pot provocar una despolarització de membrana i comprometre el transport de nutrients dependent de  $\text{Na}^+$  i al seu torn induir l'UPR (Unfolded Protein Response) i l'AAR (Amino Acid Response) que poden convergir en autofàgia o apoptosi. El signe d'interrogació "?" indica que la contribució dels TTCCs en aquests processos dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  és especulativa. Lys significa lisosoma (Sallán et al., 2018).

El nostre grup, ha corroborat que tant la inhibició dels TTCCs (amb mibefradil i NNC 55-0396) com el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 indueixen apoptosi en línies de glioblastoma, així com en una línia resistent al quimioterapèutic TMZ (Visa, Sallán et al., 2019).

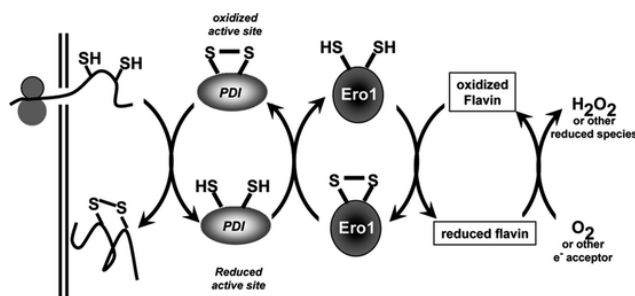
Els resultats obtinguts en xenografts de ratolí utilitzant mibefradil (Keir et al., 2013; Zhang et al., 2017), va animar al desenvolupament d'assajos clínics utilitzant la mateixa droga, que presenta un perfil farmacocinètic i de toxicitat ben conegut.

L'any 2012 es va realitzar un assaig per tal de valorar la seguretat del mibefradil en 30 pacients sans que només va comportar efectes secundaris lleus i autolimitats (NCT01550458). Seguidament, es va realitzar un assaig per valorar l'eficiència i la dosi òptima del mibefradil administrat de forma seqüencial amb la TMZ en pacients amb glioblastomes recurrents (NCT01480050). Els resultats indicaven que la teràpia era ben tolerada. Un tercer assaig (NCT02202993, 2014-2017) es va realitzar per determinar la seguretat i la dosi màxima de mibefradil tolerada en combinació amb radioteràpia hipofraccionada en pacients amb glioblastoma recurrent, sense resultats publicats fins a la data.

### 3. Estrès de Reticle Endoplasmàtic.

El Reticle Endoplasmàtic (RE) és una xarxa de túbuls ramificats i sacs aplanats que, a part del seu paper essencial en l'homeòstasi del Ca<sup>2+</sup> i la biosíntesi de lípids, regeix la síntesi, el plegament i el processament d'un terç de totes les proteïnes cel·lulars (Hetz and Papa, 2018).

Les proteïnes són translocades com cadenes polipeptídiques desplegadas al lumen del RE, on seran plegades i experimentaran diverses modificacions post-traduccionals per enzims residents al RE com xaperones, enzims de glicosilació, oxidoreductases i foldases com la PDI (*thioredoxin-like protein disulfide*). La PDI oxida residus de cisteïna en les proteïnes naixents resultant en la formació d'enllaços disulfur intra- i intermoleculars. La PDI reduïda, a la seva vegada és oxidada per la tiol oxidoreductasa Ero1α (*ER oxidorectin-like protein 1α*). Per tal de mantenir l'estat oxidat, l'Ero1α combina la transferència de disulfurs a la PDI amb la reducció de l'oxigen molecular, formant peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Per aquest motiu, l'activitat d'Ero1α constitueix una font potencial d'estrès oxidatiu derivada del RE (Fig.13)(Frandsen et al., 2000).



**Figura 13: Representació esquemàtica de la regulació per al plegament proteic oxidatiu en el RE.** La formació de ponts disulfur en el RE és conduït per la cascada d'Ero1α i PDI (Gilbert, 2011).

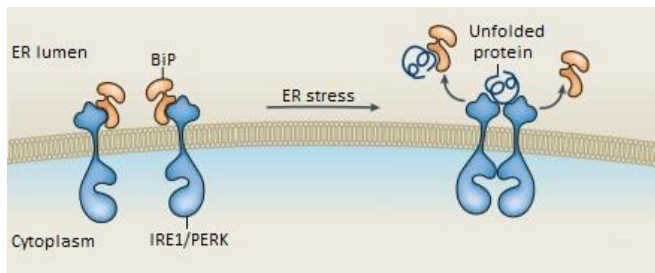
Aquelles proteïnes que no es pleguin o ho facin en una conformació incorrecta seran detectades pel sistema de control de qualitat del RE i translocades al citosol per ser degradades pel proteasoma 26S en un procés anomenat ERAD (*ER-Associated Degradation*) (Smith et al., 2011). Per a l'òptim funcionament de tota aquesta maquinària, és necessari conservar l'ambient del RE en les condicions adequades, com són mantenir una concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  més elevada i un potencial redox molt més oxidant respecte el citosol (Madden et al., 2019). En especial, el  $\text{Ca}^{2+}$  té un paper central en aquest procés, ja que les xaperones reticulars tenen diferents valors d'afinitat pel  $\text{Ca}^{2+}$  i la seva activitat és modulada per les fluctuacions d'aquest ió (Coe and Michalak, 2009; Sisinni et al., 2019).

Malgrat la capacitat de la cèl·lula per adaptar el plegament de proteïnes del RE als seus requisits i assegurar la qualitat de les proteïnes produïdes, hi ha una àmplia sèrie de perturbacions cel·lulars que poden interrompre el correcte plegament d'aquestes. Aquests estressos cel·lulars, intrínsecs o extrínsecs, poden provocar una acumulació de proteïnes mal plegades, generant el que es coneix com estrès de RE (Ron and Walter, 2007; Hetz and Papa, 2018; Bhardwaj et al., 2019; Madden et al., 2019; Oakes, 2020).

En el desenvolupament i la progressió del càncer, les cèl·lules afronten un gran ventall d'estressos que poden acabar desembocant en estrès de RE: canvis en els nivells d'oxigen (hipòxia), deprivació de nutrients, acidosis, alteració de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  i estrès oxidatiu o genotòxic. Les cèl·lules amb una taxa de proliferació elevada, com les cèl·lules tumorals, també han de mantenir una taxa de síntesis proteica alta i un flux massiu a través del RE, que en conjunt pertorba l'homeòstasi del RE i fomenta el seu estrès. Finalment, les alteracions genètiques que es troben en el càncer (mutacions, translocacions, aneuploïdies, etc) són altres alteracions que poden estar lligades a l'establiment d'un estrès del RE crònic (Madden et al., 2019; Jaud et al., 2020).

### 3.1 *Unfolded Protein Response.*

La resposta a proteïnes mal plegades (*Unfolded Protein Response*; UPR) es desencadena per intentar alleujar l'estrès de RE i restaurar les funcions metabòliques i de processament de proteïnes (Madden et al., 2019). En vertebrats, l'UPR ha evolucionat cap a una xarxa complexa de vies de senyalització interconnectades que s'inicia per l'estimulació de tres sensors transmembrana del RE coneguts com *Inositol Requiring Enzyme 1 $\alpha$*  (IRE1 $\alpha$ ), *Protein kinase RNA-activated-like ER kinase* (PERK), i *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) (Hetz and Papa, 2018).



**Figura 14: Model de detecció de proteïnes mal plegades.** En un estat sense estrès, BiP bloqueja els sensors en un estat inactiu. En presència de proteïnes mal plegades, BiP alliberarà els sensors per unir-se a aquestes. Finalment, els pèptids també s'uniran als receptors provocant que oligomeritzin i s'activin. Adaptat de Ron and Walter 2007.

En condicions homeostàtiques, els dominis luminals d'IRE1 $\alpha$ , PERK i ATF6 es mantenen en un estat monomèric i inactiu a través de la interacció amb una abundant xaperona del RE anomenada Binding Ig Protein (BiP; àlies *Glucose-Regulated Protein 78*, GRP78) (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002). Tanmateix, durant l'estrès de RE, BiP es dissocia

dels sensors per unir-se a les proteïnes mal plegades permetent que els sensors d'UPR estiguin preparats per a senyalitzar (Oakes, 2020). A més, les proteïnes mal plegades també serveixen de lligands directes pels sensors d'UPR alliberats mitjançant la unió als seus dominis luminals, la qual cosa portarà a la seva oligomerització i activació (Fig.14)(Ron and Walter, 2007; Gardner and Walter, 2011).

Les conseqüències inicials de l'UPR per alleujar l'estrès de RE són 1) disminuir la càrrega de proteïnes entrant mitgant la traducció de proteïnes, 2) incrementar la capacitat de la maquinària encarregada del plegament de proteïnes (augmentant l'expressió de xaperones del RE) i 3) activar mecanismes per degradar i reciclar proteïnes mal plegades (com la via ERAD i l'autofàgia) (Hetz, 2012; Madden et al., 2019). Tanmateix, si l'estrès de RE persisteix, la cèl·lula canvia la resposta adaptativa cap a una resposta inductora de mort (Szegezdi et al., 2006). Això demostra que l'estrès de RE ha de sobrepassar un llindar potencial abans de que la cèl·lula cometi apoptosi (Madden et al., 2019; Oakes, 2020).

### 3.1.1 Les tres branques de l'UPR.

**IRE1 $\alpha$**  és una proteïna transmembrana tipus I amb dominis cinasa/endoribonucleasa (RNasa) citosòlics. Els dos són activats per l'oligomerització d'IRE1 $\alpha$  i la *trans*-autofosforilació dels dominis cinasa juxtaposats (Oakes, 2020). El domini RNasa talla un intró de 26 nucleòtids del mRNA que codifica per la *X Box Binding Protein 1* (XBP1)(Calfon et al., 2002). Els fragments resultants són relligats per la lligasa citosòlica anomenada RtcB (*RNA 2',3'-cyclic phosphatase and 5'-h ligase*) per generar el mRNA XBP1 *spliced* o XBP1s (Kosmaczewski et al., 2014; Lu et al., 2014). Aquest codifica per un factor de transcripció que promou l'expressió de gens que

participen en el plegament, control de qualitat i biogènesi de proteïnes en el RE (Fig.15) (Lee et al., 2003).

Un estrès de RE persistent i no resolt porta a uns nivells elevats i sostinguts d'autofosforilació d'IRE1 $\alpha$  i la seva major oligomerització. Com a conseqüència, la RNasa d'IRE1 $\alpha$  perd especificitat i degrada espècies de mRNA que intenten traduir-se al RE, un procés anomenat RIDD (*Regulated IRE1 $\alpha$ -Dependent Decay*) (Han et al., 2009; Hollien et al., 2009). Malgrat que inicialment RIDD limita l'estrès de RE per la disminució en la càrrega de proteïnes que necessiten ser plegades, la destrucció no selectiva de mRNAs de la membrana del RE resulta en la supressió d'enzims crítics i components estructurals d'aquest orgànu. A part de la destrucció activa de la funció del RE, RIDD també redueix miRNAs que s'encarreguen de reprimir dianes pro-apoptòtiques (Oakes, 2020). D'aquesta manera, la RNasa d'IRE1 $\alpha$  promou una UPR terminal per sobre de l'homeostàtica, en la qual la destrucció del RE i les senyals pro-apoptòtiques aclaparen la senyal adaptativa (Fig.15) (Madden et al., 2019; Oakes, 2020).

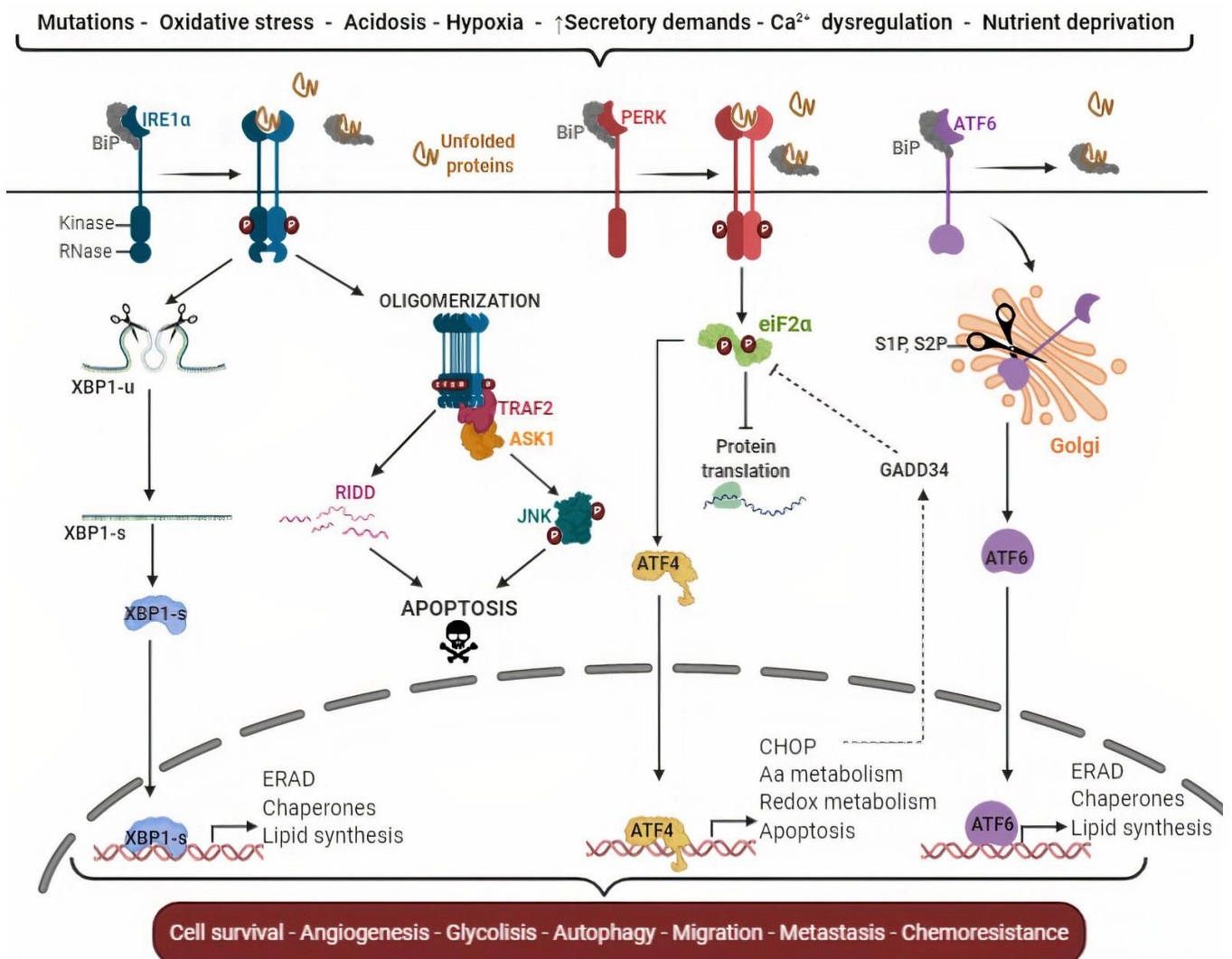
L'activitat cinasa d'IRE1 $\alpha$  ha estat menys estudiada però s'ha demostrat que és capaç de reclutar TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*), que s'unirà a la regió citoplasmàtica d'IRE1 $\alpha$  (Urano, 2000). El complex IRE1 $\alpha$ /TRAF2 interacciona amb ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) activant JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Urano, 2000; Jaud et al., 2020). En funció del context cel·lular, l'activació de JNK pot donar una inducció de l'autofàgia o promoure una senyalització pro-apoptòtica davant un estrès de RE persistent (Fig.15) (Verfaillie et al., 2010; Tabas and Ron, 2011).

**PERK**, de forma similar a IRE1 $\alpha$ , respon a l'estrès de RE dimeritzant i *trans*-autofosforilant-se. Com a conseqüència, PERK fosforila eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation Initiation Factor 2 subunit alpha*) que resulta en una atenuació global de la traducció (Walter and Ron, 2011; Hetz and Papa, 2018). eIF2 $\alpha$ , a part de reduir la càrrega del RE reduint la síntesi global de proteïnes, també permet l'expressió del factor de transcripció ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) que indueix gens que participen en el plegament de proteïnes, el metabolisme d'aminoàcids i en autofàgia (Harding et al., 2000, 2003; B'chir et al., 2013). ATF4 també promou l'expressió de CHOP (*CCAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein*; àlies GADD153, *growth arrest and DNA damage 153*) que s'ha relacionat amb la mort cel·lular per diversos mecanismes (Li et al., 2014). Entre aquests mecanismes trobem, una regulació directa de la maquinària de mort i de forma indirecta, un restabliment de la traducció de proteïnes mitjançant un augment en l'expressió de GADD34. GADD34 desfosforila eIF2 $\alpha$  restablint la traducció de proteïnes, fet que intensifica l'estrès de RE i indueix la mort cel·lular (Fig.15) (Marciniak, 2004).



**ATF6** és una proteïna transmembrana tipus II que és transportada des del RE fins al Golgi, un cop es dissocia de BiP. Al Golgi és tallada per les proteases S1P i S2P (*Site 1 and Site 2 Proteases*), alliberant el factor de transcripció actiu ATF6 (Ye et al., 2000; Madden et al., 2019). Seguidament, ATF6 translocarà a nucli on promourà l'expressió de diversos gens relacionats amb l'augment de mida del RE, plegament de proteïnes i la via ERAD (Fig.15) (Hetz and Papa, 2018; Oakes, 2020). ATF6 també pot formar heterodímers amb XBP1s que conduirà a l'expressió de programes gènics concrets (Yamamoto et al., 2007).

Les tres branques es poden activar per qualsevol estrès de RE, però els temps d'activació de cada branca pot variar (DuRose et al., 2006). En concret, un estrès de RE prolongat pot conduir a una activació i desactivació seqüencial de les vies IRE1 $\alpha$ , PERK i ATF6, respectivament (Lin et al., 2007). Aquesta seqüència de temps probablement té implicacions en l'apoptosi dependent de l'estrès de RE (Tabas and Ron, 2011).



**Figura 15: Mecanisme de senyalització d'UPR.** Els diferents efectors de l'UPR i els seus mecanismes d'acció, així com les implicacions de l'activació de l'UPR en el càncer.

Igualment s'ha de tenir en compte que no són vies independents i les diferents branques de l'UPR poden interaccionar. Així, ens podem trobar en diferents situacions: 1) dues o més branques de l'UPR activen diferents passos d'una mateixa via d'apoptosi (epistasi), 2) diferents branques de l'UPR poden induir separatament el mateix efector o resposta pro-apoptòtica, la qual cosa amplificaria aquesta resposta i, 3) diferents branques d'UPR complementàries promouen vies apoptòtiques totalment diferents, de manera que augmentarà la intensitat i cronicitat de la resposta de mort cel·lular (Tabas and Ron, 2011).

#### 4. Autofàgia.

Autofàgia prové dels termes grecs “*phagy*” que significa menjar i “*auto*” a un mateix. Es defineix com un conjunt de processos evolutivament conservats i altament regulats, on components citoplasmàtics són lliurats als lisosomes per a ser degradats i posteriorment reciclats per tal de mantenir l'homeòstasi cel·lular (Yang and Klionsky, 2010a).

En escenaris fisiològics, aquest mecanisme de “canibalisme” s'encarrega d'eliminar proteïnes intracel·lulars mal plegades o velles i orgànuls superflus o danyats, que poden ser potencialment perillosos, funcionant com un sistema de control de qualitat (Nakatogawa et al., 2009; Ohsumi, 2014).

Hi ha un ampli ventall d'estressos que poden promoure l'autofàgia com a resposta adaptativa per intentar eliminar l'origen de l'estrès i proporcionar nutrients i energia. Malgrat la inanició és l'inductor d'autofàgia més ben caracteritzat, n'existeixen d'altres com la hipòxia, els patògens invasors, el dany al DNA, les ROS o l'estrès de RE (Yang and Klionsky, 2010a; Galluzzi et al., 2015).

Hi ha tres tipus principals d'autofàgia en cèl·lules de mamífer: microautofàgia, autofàgia mitjançada per xaperones i macroautofàgia (Parzych and Klionsky, 2014).

- En la **microautofàgia** es produeixen invaginacions o protrusions de la membrana lisosomal per capturar el *cargo* (proteïnes citoplasmàtiques i orgànuls cel·lulars)(Marzella et al., 1981; Parzych and Klionsky, 2014).
- **L'autofàgia mediada per xaperones**, difereix de les altres perquè no utilitza la membrana per capturar el *cargo*, sinó que utilitza les xaperones per identificar les proteïnes que contenen un motiu pentapèptid particular (KFERQ) (Fred Dice, 1990; Galluzzi et al., 2015). Aquests substrats són individualment desplegats i translocats directament per les xaperones a través de la membrana lisosomal mitjançant la interacció amb la proteïna LAMP2A (*Lysosomal Associated Membrane Protein 2A*)(Cuervo and Dice, 1996).

- En la **macroautofàgia**, es produeix una síntesi *de novo* de vesícules de doble membrana (anomenades autofagosomes) que rodegen i engoleixen el *cargo* segregant grans porcions del citoplasma, incloent orgànuls sencers o parts d'aquests (Parzych and Klionsky, 2014; Kaur and Debnath, 2015). Els autofagosomes deriven dels fagòfors, estructures membranoses també conegudes com membranes d'aïllament. Un cop tancats, els autofagosomes es fusionen amb els lisosomes, formant el que s'anomena com autofagolisosomes, on el *cargo* serà exposat a l'activitat catalítica de les hidrolases lisosomals (Kroemer et al., 2010; Gray et al., 2013; Galluzzi et al., 2015; Graef, 2020).

La macroautofàgia és la forma més coneguda (i de la que es tracta en aquest treball), per aquest motiu ens referirem a ella com simplement autofàgia.

#### 4.1 Mecanisme autofàgic.

L'autofàgia és iniciada per l'acoblament de la maquinària autofàgica que inclou l'acció de més de 40 proteïnes relacionades amb l'autofàgia (ATGs, *Autophagy-Related Proteins*) (Hollenstein and Kraft, 2020). Aquest acoblament s'inicia en una localització subcel·lular concreta anomenada PAS (*Phagophore Assembly Site*) o estructura pre-fagosomal, que determina la iniciació de l'autofàgia i el lloc de formació de l'autofagosoma. S'ha observat que el PAS es produeix en estreta associació amb la xarxa intrínseca i dinàmica del RE; malgrat la membrana plasmàtica, l'aparell de Golgi, o bé intermediaris entre aquests també podrien participar (Hamasaki et al., 2013; Dikic and Elazar, 2018). Així, l'origen de la membrana d'aïllament es produeix a partir d'unes estructures en forma d' $\Omega$ , riques en PI3P (fosfatidilinositol-3-fosfat) i que parteixen del RE anomenades "omegasomes" (Axe et al., 2008). Malgrat el PAS participa en la formació dels autofagosomes, aquesta estructura no serà part del propi autofagosoma, ja que les proteïnes Atg que permeten la formació del PAS es dissocien de l'autofagosoma un cop aquest ha estat format (Hollenstein and Kraft, 2020).

La biogènesi de l'autofagosoma, i conseqüentment l'autofàgia, s'han dividit en diferents estadis: inducció, nucleació, elongació, fusió i degradació/reciclatge del cargo.

**Inducció:** en condicions normals, els nivells basals d'autofàgia són baixos, tanmateix davant una situació d'estrès, la cèl·lula ha de ser capaç d'adaptar-se mitjançant una estimulació del flux autofàgic. El repressor de la resposta autofàgica més ben caracteritzat és la serina/treonina cinasa *mammalian Target Of Rapamycin (MTOR) Complex I (MTORCI)*. Diversos inductors de l'autofàgia promouen la inhibició de MTORCI, que entre d'altres efectes, promou el reclutament de proteïnes Atg al PAS i l'activació mitjançant la fosforilació d'altres dianes autofàgiques. La inhibició de MTORCI també promou la seva dissociació del complex format per ULK1, Atg13,

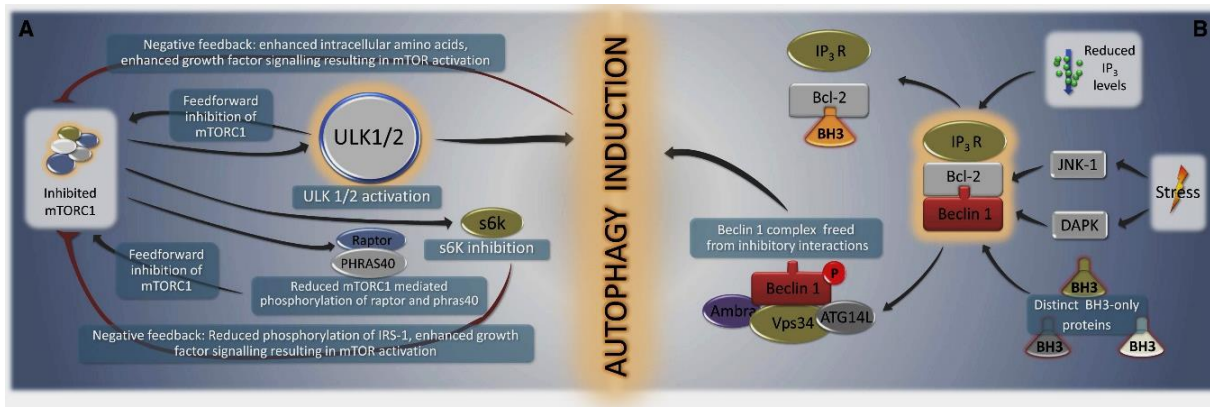
FIP200 i Atg10, provocant un canvi de fosforilació en ULK1 i una activació catalítica. Aquesta activació produeix la fosforilació d'Atg13 i FIP200 i conseqüentment l'inici de l'autòfagia (Fig.16 A) (Kroemer et al., 2010; Yin et al., 2016).

**Nucleació:** es pot veure com un esdeveniment que resulta en la mobilització al PAS de les proteïnes necessàries per a l'expansió del fagòfor. L'activació d'ULK1 provoca el reclutament al PAS del complex format per Beclin-1, Vsp34, Atg15L i Vsp15, clau en la inducció de l'autòfagia. De forma breu, aquest complex acabarà fosforilant Beclin-1 i Vsp34 produirà PI3P a partir de fosfatidilinositol. Aquest PI3P és important per a la correcta localització d'algunes proteïnes Atg que permetrà la nucleació de la doble membrana de la vesícula (Kim and Lee, 2014; Yin et al., 2016).

Proteïnes amb funció anti-apoptòtica com Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Mcl-1 són importants reguladors negatius de l'autòfagia mitjançant la interacció entre els seus dominis BH3 i els de Beclin-1, inhibint conseqüentment la seva funció i l'autòfagia (Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007). Existeixen diversos mecanismes pels quals senyals inductores de l'autòfagia poden trencar la interacció inhibidòria, incloent una competició per les proteïnes pro-apoptòtiques BH3-only (Maiuri et al., 2007), la fosforilació del domini BH3 de Beclin-1 per DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) (Zalckvar et al., 2009) o la fosforilació de Bcl-2 (Fig.16 B)(*B cell lymphoma 2*) per JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase-1*)(Wei et al., 2008).

L'IP<sub>3</sub>R, el canal de Ca<sup>2+</sup> activat per IP<sub>3</sub> en el RE, també interacciona amb Beclin-1 via Bcl-2. Quan es produeixen reduccions en els nivells d'IP<sub>3</sub> (o per la unió d'antagonistes), la interacció es trenca, alliberant Beclin-1 i promovent l'autòfagia (Fig.16 B) (Parys and Vervliet, 2020).

D'altra banda, l'autòfagia pot ser també induïda independentment de MTOR, mitjançant la fosforilació directa d'AKT i EGFR sobre Beclin-1 (Kim and Lee, 2014).



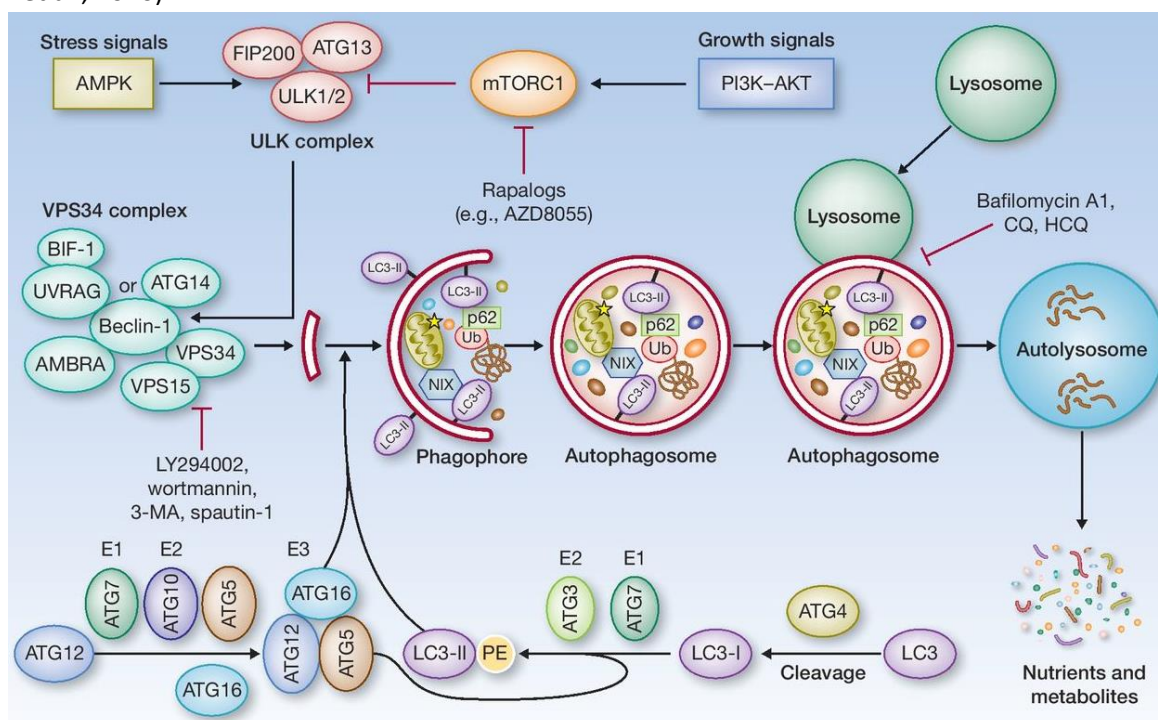
**Figura 16: Vies de transducció de senyal que regulen components autofàgics que participen en la formació/nucleació del fagòfor** (Kroemer et al., 2010).

**Elongació de la vesícula:** un tret característic de l'autofàgia és la formació de vesícules de doble membrana conegudes com autofagosomes, que corresponen a la forma madura del fagòfor. Bàsicament hi ha dos sistemes de conjugació *ubiquitin-like* necessaris per a l'expansió i tancament de l'autofosoma, un format per Atg12-Atg5-Atg16L i l'altre per Agt8 (LC3) – fosfatidiletanoalamina (PE)(Fig.17)(Yang and Klionsky, 2010b).

En la primera situació, mitjançant l'acció d'Atg7 i Atg10, Atg12 és conjugat a Atg5 i aquests seran conjugats a Atg16L formant el complex Atg12-Atg5-Atg16L (Fig. 17).

En el segon sistema, la proteasa Atg4 talla pro-LC3 exposant un residu glicina essencial per la posterior conjugació de LC3 a la PE gràcies a l'activitat d'Atg3, Atg7 i el complex Atg12-Atg5-Atg16L. Això provocarà que LC3 passi d'una forma difusa i lliure (coneguda com LC3-I) a una forma lipídada i ancorada a la membrana dels autofagosomes (LC3-II). Aquesta conjugació de LC3 a PE, produïda en les zones de sortida del RE, promou l'expansió i tancament de la membrana del fagòfor. LC3-II també facilita el reclutament del cargo en l'autofàgia selectiva, ja que interacciona amb els LIRs (*LC3-Interacting Region*) dels receptors del cargo (Fig. 17)(Dikic and Elazar, 2018).

La forma lipídada de LC3 s'associa a la membrana de l'autofosoma i la seva detecció bioquímica i microscòpica és àmpliament utilitzada per mesurar l'autofàgia cel·lular (Mizushima et al., 2010)



**Figura 17:** Esquema representatiu de la principal maquinària que participa en la macroautofàgia. També es mostren alguns dels compostos químics més emprats per la modulació del flux autofàgic i les seves dianes (Cicchini et al., 2015).

**Fusió, degradació i reciclatge:** diverses proteïnes que tenen la regió LIR, funcionen com a receptors o adaptadors entre LC3 i les estructures diana que es vol incorporar a la maquinària autofàgica per a ser degradades. Els exemples més ben caracteritzats són p62 (també conegut com sequestosoma-1, SQSTM1) i NBR1 (*Neighbor of BRCA1*) que reconeixen proteïnes ubiquitinitzades, així com BNIP3L (o NIX) que s'uneix a la membrana mitocondrial (Kroemer et al., 2010).

A mesura que l'autofagosoma madura, elimina de la membrana externa les Atgs necessàries durant el naixement de l'autofagosoma i recluta maquinària responsable per al fusionament lisosomal, com les proteïnes SNARE (*SNAP receptors*) (Dikic and Elazar, 2018). Aquesta fusió dóna lloc als autofagolisosomes (o autolisosomes), on tot el contingut és degradat per l'acció d'enzims lisosomals i posteriorment retornat al citosol mitjançant permeases, per tal de reincorporar els productes al metabolisme cel·lular (Fig. 17) (Parzych and Klionsky, 2014). Juntament amb el cargo, també es degraden les proteïnes adaptadores, p62 i la fracció de LC3-II que es troba localitzada a la membrana interna de l'autofagosoma. Únicament la fracció de LC3-II que es troba en la part externa no serà degradada (Bjørkøy et al., 2009; Rubinsztein et al., 2012).

## 5. Connexió entre $\text{Ca}^{2+}$ , reticle endoplasmàtic i autofàgia.

### 5.1 $\text{Ca}^{2+}$ i Reticle Endoplasmàtic.

El RE juga un paper crític en múltiples processos cel·lulars, entre els que s'inclou el manteniment de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , tant del propi RE com d'altres compartiments cel·lulars. Una senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  eficient requereix de mecanismes per mantenir la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic baix i estable. Gràcies a la seva naturalesa multifuncional, el RE pot sentir i integrar moltes de les senyals entrants, en particular, els canvis en les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  lliure i unit, tant dins com fora del RE (Bravo et al., 2013; Krebs et al., 2015).

Encara més important, la membrana del RE pot modular la seva pròpia dinàmica de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal i generar les senyals apropiades per mantenir una homeòstasi balancejada (Krebs et al., 2015). La senyalització produïda pels canals del RE està molt controlada, originant augments de  $\text{Ca}^{2+}$  localitzats amb funcions de senyalització específiques. Aquests augments locals activen/desactiven enzims sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ , generant cadenes de transducció de senyals que controlen funcions cel·lulars diverses com la mitosis, la motilitat o l'apoptosi (Cerella et al., 2010).

Donat el paper crític del RE en la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$ , al seu lumen la majoria del  $\text{Ca}^{2+}$  es troba unit a tampons, per tal de mantenir una regulació estricta. De fet, gran part de les proteïnes

associades al RE participen en el manteniment de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , per exemple, xaperones (com la calreticulina, GRP94 o BiP) i enzims de plegament (enzims de la família de PDI) contribueixen a tamponar el  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del RE (Krebs et al., 2015).

BiP és una proteïna que a part de sensar les proteïnes mal plegades del RE per activar l'UPR, també s'uneix al  $\text{Ca}^{2+}$  funcionant com a tampó (Coe and Michalak, 2009). A més a més, contribueix a limitar la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE per mantenir l'equilibri i participa en el transport de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE i mitocondri (Hayashi and Su, 2007; Malhotra and Kaufman, 2011; Schäuble et al., 2012).

La família d'enzims PDI, requereixen d'unió directa al  $\text{Ca}^{2+}$  per interaccionar amb polipèptids i xaperones i permetre un correcte plegament de les proteïnes (Coe and Michalak, 2009).

Atès que un correcte balanç del  $\text{Ca}^{2+}$  al RE és crític per a suportar pràcticament totes les funcions de l'òrganul, no és sorprenent que la disrupció d'aquesta homeòstasi provoqui estrès de RE. La resposta a l'estrès de RE, més enllà d'activar l'UPR, també condueix a l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocant un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic lliure. A la seva vegada, aquest buidament de  $\text{Ca}^{2+}$ , pot generar dany i més estrès de RE ja que aquest ió juga un paper clau en el manteniment estructural de l'òrganul: la forma aplanada de les cisternes del RE es mantenen activament gràcies a ponts constituïts per proteïnes amb alta capacitat d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$  com la calreticulina, la calseqüestrina i la calnexina. Després del buidatge del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, la unió a  $\text{Ca}^{2+}$  es perd, els ponts es debiliten i el RE adquireix una forma esfèrica de baixa energia, perdent la seva funció. L'estrès de RE, a l'igual que la resta d'estressos, poden evolucionar en reparació o apoptosi (Milner et al., 1992; Cerella et al., 2010).

## 5.2 Estrès de RE i autofàgia.

L'estrès de RE i l'autofàgia estan estretament lligats, per un costat el RE constitueix una font important per a la membrana d'aïllament autofàgic i funciona com a bastida per a l'assemblatge de la maquinària del PAS. D'altra banda, l'UPR (la principal resposta a l'estrès de RE) és un potent estímul per a la inducció de l'autofàgia, ja que aquesta elimina proteïnes mal plegades ajudant a alleujar l'estrès de RE i restaurar l'homeòstasi. Així, UPR i autofàgia estan entrelaçats, de forma que l'estrès de RE no només pot induir l'autofàgia, també pot suprimir-la (Kroemer et al., 2010; Yan et al., 2015; Bhardwaj et al., 2019).

Les 3 branques de l'UPR juguen papers diferencials en la regulació de l'autofàgia:

- **Via PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP.** L'activació de PERK i eIF2 $\alpha$  promou que els factors de transcripció ATF4 i CHOP transcrivin una sèrie de gens que participen en la formació,

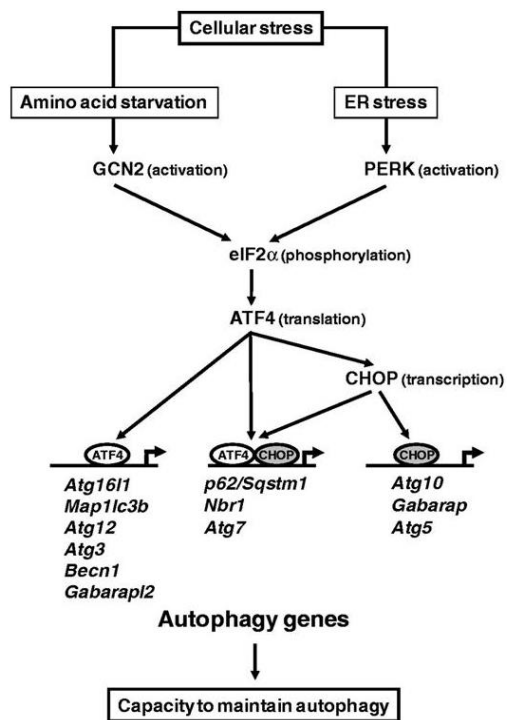
elongació i funció dels autofagosomes. ATF4 és un regulador mestre que controla la transcripció de gens clau per a funcions adaptatives mitjançant la unió a seqüències CARE. En relació amb l'autofàgia, ATF4 regula transcripcionalment Atg5, Atg12 i Atg16L per formar el complex Atg5-Atg12-Atg16L, que participa en el procés d'elongació. Així com també transcriu els gens que donaran lloc a les proteïnes Beclin-1 (important en la formació dels autofagosomes), LC3 (junt amb diferents receptors participa en la captura selectiva del cargo), Atg3 (participa en la lipidació de LC3), ULK1 (important en la iniciació de l'autofàgia) i Gabarapl2 (que participa en tancament i fusió vesicular) (B'chir et al., 2013; Füllgrabe et al., 2016; Song et al., 2018a).

ATF4 s'activa per diferents tipus d'estrès, per aquest motiu, pot unir-se a diversos factors que proveeixen d'especificitat la seva senyalització. Entre aquests, trobem el factor de transcripció CHOP, que a part d'ésser transcrit pel propi ATF4 també poden cooperar.

CHOP és essencial per l'activació de dos classes de gens autofàgics dependents d'ATF4. Per un costat, es troben p62 i Nbr1 (dos receptors de proteïnes ubiquitinitzades amb unió a LC3), així com Atg7 (participa en la lipidació de LC3), on es requereix de la unió simultània d'ATF4 i CHOP als seus promotors (B'chir et al., 2013; Bhardwaj et al., 2019) (Fig.18).

La segona classe de gens autofàgics dependents d'ATF4-CHOP inclou Gabarap (o Atg8a, precursor de LC3), Atg5 (forma el complex Atg12-Atg5-Atg16L) i Atg10 (important en la conjugació d'Atg12 amb Atg5), on CHOP s'uneix al promotor sense interaccionar amb ATF4 (B'chir et al., 2013)(Fig.18).

En resum, ATF4 mitjançant la regulació de CHOP, indueix directa o indirectament la transcripció específica d'una sèrie de gens autofàgics en resposta a estrès (B'chir et al., 2013).



**Figura 18: Model de senyalització per eIF2α/ATF4 en la transcripció de gens autofàgics.** La forma en que cada gen és regulat està indicat entre parèntesi (B'chir et al., 2013).



- **Via IRE1 $\alpha$ .** La seva senyalització, i conseqüentment la seva implicació en autofàgia, es pot dividir en:

Eix IRE1 $\alpha$  /XBP1s. S'ha descrit que indueix l'autofàgia en diferents fases. Primerament, s'ha observat que XBP1s regula l'autofàgia de forma indirecta mitjançant una regulació transcripcional de l'expressió de Bcl-2. Bcl-2 és una proteïna antiapoptòtica que interacciona amb Beclin-1 inhibint l'autofàgia dependent d'aquesta (Pattingre et al., 2005; Gomez et al., 2007; Yan et al., 2015). Addicionalment, XBP1s pot formar homo o heterodímers amb altres factors de transcripció, i unir-se a la regió promotora del gen de Beclin-1 promovent la seva expressió i conseqüentment l'autofàgia (Margariti et al., 2013; Yan et al., 2015).

Eix IRE1 $\alpha$  /JNK. L'activitat cinasa de JNK promoguda per l'activació d'IRE1 $\alpha$  pot tenir diverses implicacions relacionades amb l'autofàgia. En concret, la isoforma JNK1 és capaç de fosforilar Bcl-2, reduint la seva afinitat pel domini BH3 de Beclin-1 i alliberant-la per poder induir l'autofàgia dependent d'aquesta (Wei et al., 2008). JNK també pot promoure el procés autofàgic inhibint el complex MTORC1 a través de la fosforilació de Raptor, un dels components del complex (March and Winton, 2011; Kwak et al., 2012).

També s'ha observat que la senyalització per JNK1 modula l'expressió de múltiples gens ATG a través del factor de transcripció c-Jun, que regula la transcripció de SQSTM1 (Puissant et al., 2010; Go et al., 2017), BECN1 (Li et al., 2009a; Park et al., 2009; Zhou et al., 2015) i MAP1LC3B (Jia et al., 2006; Sun et al., 2011) que codifiquen per p62, Beclin-1 i LC3 respectivament. Finalment, ANXA 2 (Annexin A2) que en condicions d'inanició participa en el tràfic vesicular en autofàgia, també és regulat transcripcionalment per la via JNK/c-Jun (Moreau et al., 2015)(Fig.19).

En conjunt, es demostra com la via IRE1 $\alpha$ /JNK1/c-jun és un altre mecanisme important per a la inducció de l'autofàgia (Füllgrabe et al., 2016).

- **Branca ATF6.** El principal mecanisme d'inducció autofàgica per ATF6 és a través de l'acció de DAPK1 (*Death-Associated Kinase 1*), una cinasa implicada en la formació dels autofagosomes gràcies a la capacitat de fosforilar Beclin-1. El mecanisme subjacent radica en la interacció d'ATF6 amb el factor de transcripció C/EBP- $\beta$ , formant un complex heterodimèric que s'uneix als elements CRE/ATF del promotor de DAPK1, induint la seva expressió .

Addicionalment, ATF6 fomenta la transcripció de gens autofàgics a través de la regulació d'altres factors de transcripció de l'UPR, tals com XBP1s i CHOP (Fig.19) (Yan et al., 2015).

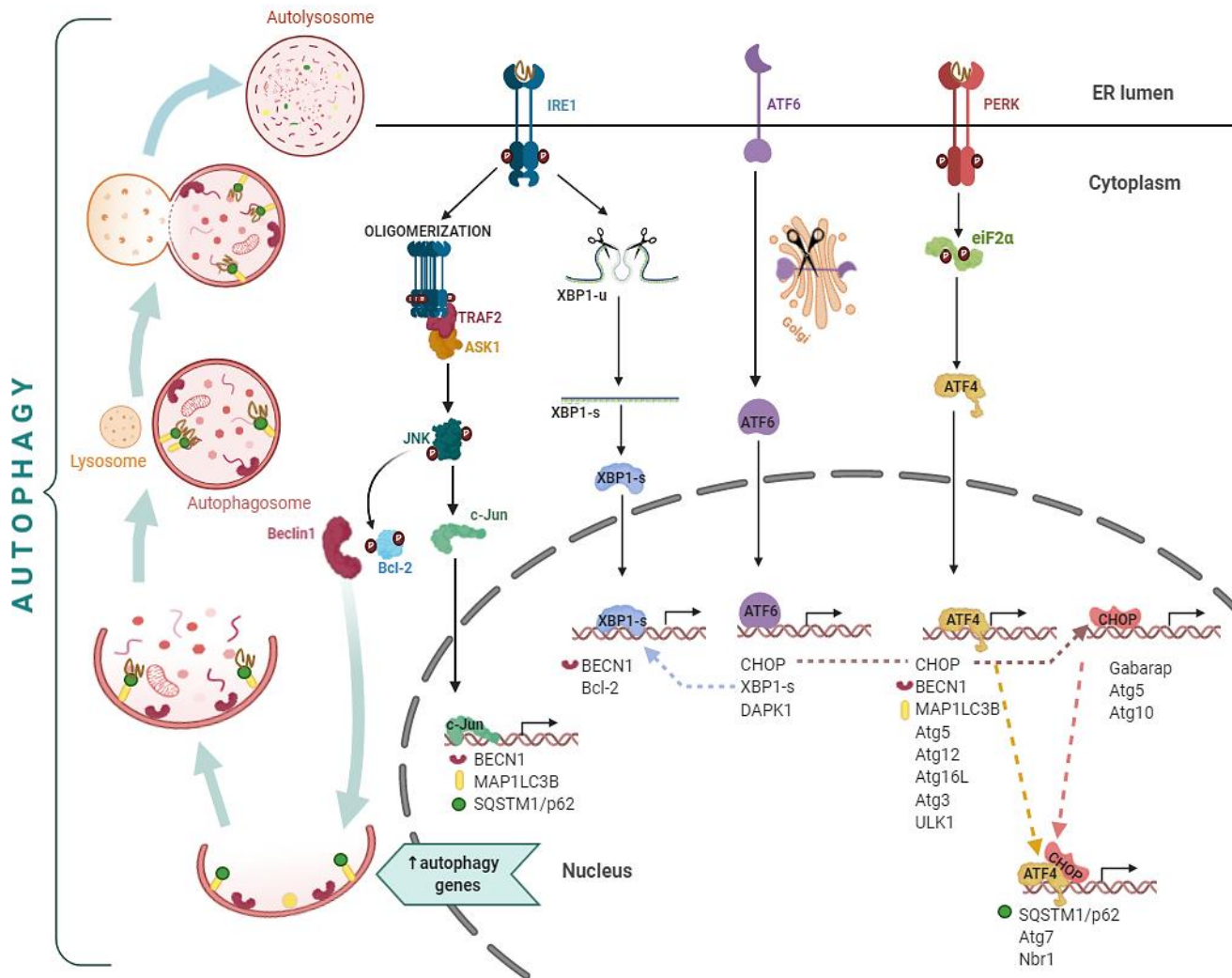


Figura 19: Senyalització de l'UPR en el control de l'autofàgia, principalment a través de la transcripció de gens autofàgics.

### 5.3 $\text{Ca}^{2+}$ i autofàgia.

Està ben establert que la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  impacta en la iniciació i la regulació de l'autofàgia. Així ho demostra que hi hagi una modulació del procés autofàgic quan s'empren compostos que afecten directament a la senyalització d'aquest ió. Tanmateix, malgrat el paper cabdal del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulació autofàgica, aquest és complicat i controvertit (Decuyper et al., 2011a; Sun et al., 2016; Bootman et al., 2018).

Algunes evidències senyalen el  $\text{Ca}^{2+}$  com un estimulador del flux autofàgic. Per exemple, els quelants de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibeixen l'autofàgia induïda per diferents estímuls, suggerint que aquest ió no només afecta al desencadenament de l'autofàgia, sinó que també participa en els passos proximals i distals del flux. Normalment aquest segrest del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic s'aconsegueix amb l'agent BAPTA-AM que redueix tant el nombre basal d'autofagosomes en condicions d'excés de

nutrients, així com també evita la formació de nous autofagosomes en resposta a estímuls pro-autofàgics (Bootman et al., 2018).

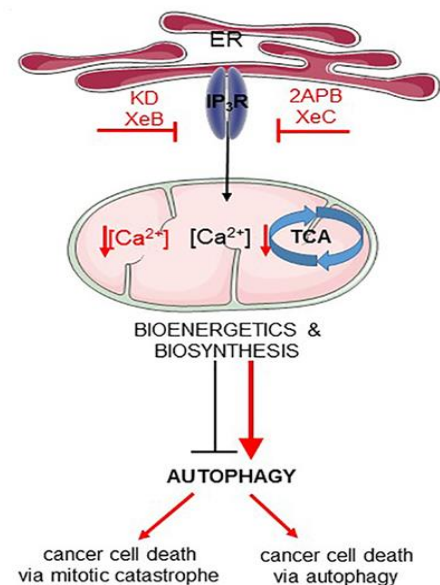
Per contra, altres evidències revelen que les senyalitzacions per  $\text{Ca}^{2+}$  cel·lular també poden exercir accions anti-autofàgiques. Per exemple, alguns bloquejants de canals de  $\text{Ca}^{2+}$  poden induir el flux autofàgic com a conseqüència de la pèrdua de senyalitzacions supressores de l'autofàgia dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  (Parys et al., 2012; Williams et al., 2013; Kania et al., 2015). Així, s'han relacionat canals permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (com els  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , els TRPML1s, els TRPV1s, els MCUs, els TPCs, els MPTPs o els TTCCs i LTCCs) com uns reguladors importants de l'autofàgia en diferents tipus cel·lulars (Kondratskyi et al., 2013, 2018). Tanmateix, el coneixement de la seva funció en la regulació autofàgica encara és limitat.

Aquestes controvèrsies provenen de la gran complexitat en la senyalització intracel·lular del  $\text{Ca}^{2+}$ . En realitat, l'efecte final del  $\text{Ca}^{2+}$  en l'autofàgia depèn de les característiques espai-temporals i l'amplitud de les senyals del  $\text{Ca}^{2+}$ , així com de les condicions de creixement (com la disponibilitat de nutrients i de factors de creixement) i del tipus d'autofàgia (Kondratskyi et al., 2018).

### 5.3.1 Inhibició autofàgica per $\text{Ca}^{2+}$ .

En el cribatge de molècules moduladores de l'autofàgia, es van identificar compostos que induïen l'autofàgia suprimint la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$ . És interessant que Pimozida, que és considerat un antagonista de TTCCs (Enyeart et al., 1990, 1992), produeix la inducció i el bloqueig de l'autofàgia en punts finals, provocant l'acúmulo de vacuoles grans i un efecte citotòxic en cèl·lules de glioblastoma (Zielke et al., 2018; Kinzler et al., 2020).

També trobem que els antagonistes de VGCCs i dels receptors per  $\text{IP}_3$ , augmenten l'autofàgia evitant la senyalització de les proteases sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  conegudes com calpaines (Bootman et al., 2018). S'ha suggerit que les senyals del  $\text{Ca}^{2+}$  són necessàries per a que es talli de forma constitutiva Atg5 dependent de calpaines i aquesta proteòlisi d'Atg5 evita la inducció de l'autofàgia (Demarchi et al., 2006).



**Figura 20: La transferència de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE al mitocondri regula l'autofàgia en cèl·lules canceroses.** Les fletxes negres representen els mecanismes cel·lulars basals, mentre que les vermelles indiquen la modulació de la via pels compostos químics o les modificacions genètiques indicades (Kania et al., 2017).

Altament, s'ha implicat el **RE** en el control de l'autofàgia basal en relació a la seva funció "d'energització" del mitocondri dependent de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$ , basal i constitutiva, a través del  $\text{IP}_3\text{Rs}$  del RE cap al mitocondri, s'ha involucrat en el manteniment de la bioenergètica mitocondrial mitjançant la producció de NADH i la subseqüent síntesi d'ATP. Això es deu a la presència de 3 enzims mitocondrials del cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA) activats pel  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Rizzuto et al., 2012). Abrogant aquestes senyals, a través de la inhibició farmacològica o el *knockdown* dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , es produeix un augment del flux autofàgic. En resum, els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  exerceixen un paper inhibitori en l'autofàgia basal i conseqüentment, el seu bloqueig provoca un augment del flux autofàgic (Fig.20)(Kania et al., 2017).

### 5.3.1 Inducció autofàgica per $\text{Ca}^{2+}$ .

Per tal de desencadenar cascades de senyalització, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic fluctua gràcies al moviment des de l'espai extracel·lular i des dels principals magatzems de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular.

En relació, diversos estudis connecten els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulació autofàgica, com és el cas dels **VGCCs**. Ha estat reportat que el bloqueig dels TTCCs o dels canals tipus L evoquen l'autofàgia en cèl·lules canceroses (Zhang et al., 2007; Rim et al., 2014; Zielke et al., 2018; Visa, Sallán et al., 2019; Kinzler et al., 2020), trobant-se aquests canals sobreexpressats en múltiples càncers. Tanmateix, altres estudis també indiquen que la inhibició d'aquests canals provoquen un bloqueig autofàgic i com a conseqüència una acumulació dels seus marcadors (Das et al., 2013; Tian et al., 2015; Barceló et al., 2020). En general, les funcions específiques dels VGCCs en relació amb l'autofàgia continuen sense estar clares, amb potencials implicacions tant en estadis primerencs com tardans de l'autofàgia.

D'altra banda, s'ha relacionat el  **$\text{Ca}^{2+}$  reticular** en la inducció de l'autofàgia. No és estrany tenint en compte que el RE és el principal magatzem de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, i que un moviment de  $\text{Ca}^{2+}$  òptim a través de la seva membrana garanteix el correcte funcionament de diverses cinases i proteases. En realitat, una pèrdua del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal és freqüentment acompanyat per estrès de RE, que en funció del grau i la duració de l'estrès, pot activar diverses vies regulades per  $\text{Ca}^{2+}$ , incloent l'autofàgia (Rashid et al., 2015).

En realitat hi ha una influència mútua entre la mobilització del  $\text{Ca}^{2+}$  reticular i l'autofàgia. Així ho demostra el fet que una autofàgia defectiva provoqui un augment en la mida del RE per l'acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  en l'òrganul (Jia et al., 2011; Rashid et al., 2015). S'ha descrit que una inducció de l'autofàgia es produeix de forma concomitant amb una remodelació de proteïnes involucrades en l'homeòstasi i dinàmica del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, sensibilitzant a diversos mecanismes de

regulació del  $\text{Ca}^{2+}$ . Durant la fase inicial de la resposta autofàgica, els nivells de les xaperones d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$  calreticulina i BiP augmenten i la fuga del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE disminueix, provocant una elevació dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en estat estable, mentre que la sensibilitat dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  cap a l' $\text{IP}_3$  augmenta (Decuyperre et al., 2011b).

Aquesta sensibilització no només es dona indirectament per l'augment de magatzems de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. També està afectat directament per una major unió de Beclin-1 als  $\text{IP}_3\text{Rs}$  que provoca l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  per aquests canals i proporciona el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic necessari per induir l'autofàgia (Fig.21) (Decuyperre et al., 2011a; Parys et al., 2012; Kania et al., 2017).

A més a més, els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  són capaços d'amplificar les senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  des dels lisosomes, i per tant, impactar en el flux autofàgic en resposta a l'activació de canals lisosomals (Kania et al., 2017).

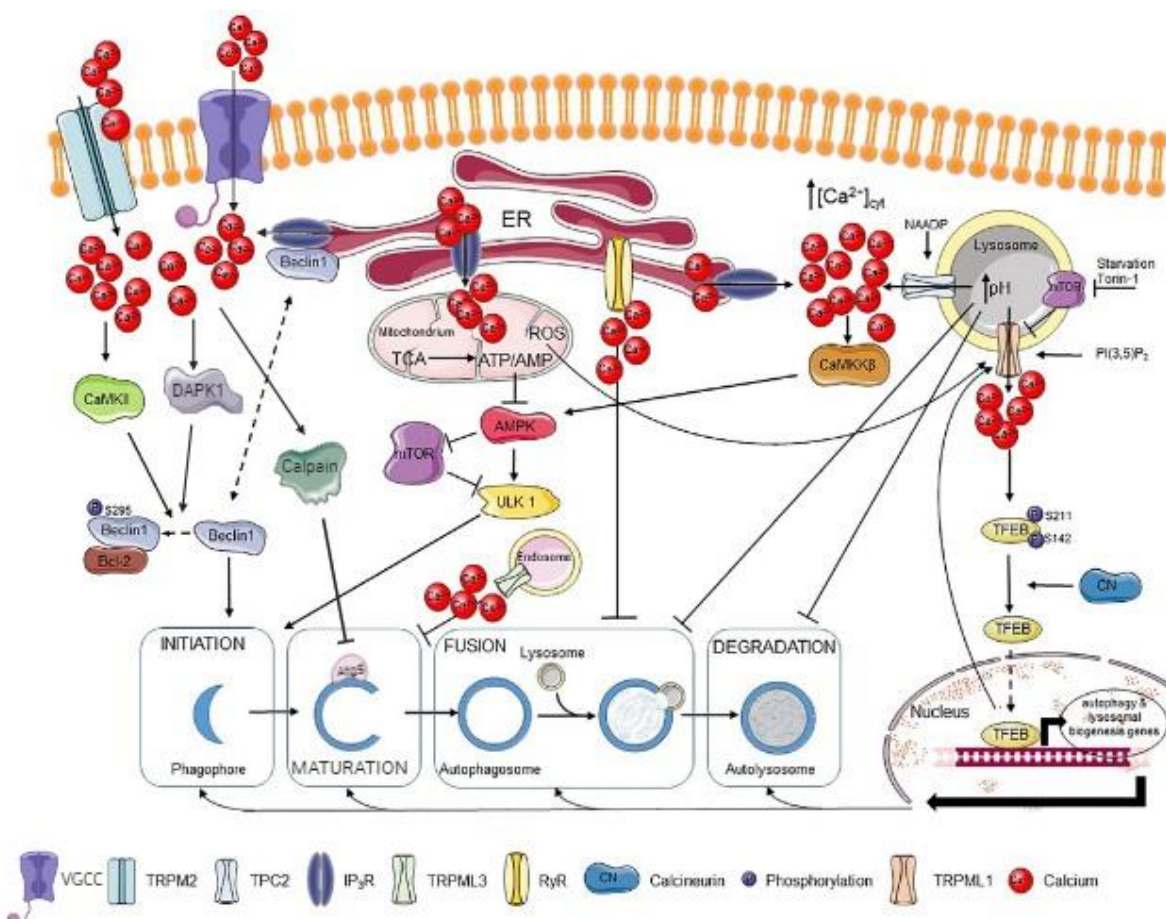


Figura 21: Regulació per  $\text{Ca}^{2+}$  dels diversos passos de l'autofàgia. Adaptat d'Elzbieta Kania et al. 2017

### 5.3.1 Efectors *downstream*.

Diversos efectors *downstream* han estat implicats en la regulació autofàgica per  $\text{Ca}^{2+}$  incloent la PKC (*Protein Kinase C*), la CaMKK $\beta$  o CaMKK2 (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase  $\beta$* ), la CaMK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase*), l'ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) i Vps34 (una proteïna d'unió a calmodulina). De tots, la CaMKK $\beta$  és la que ha estat més àmpliament demostrada (Fig.21) (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Bootman et al., 2018).

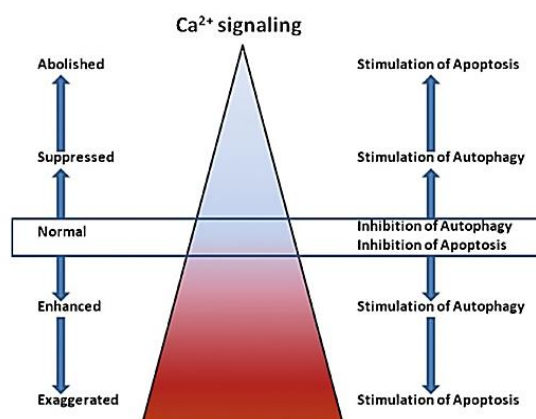
La **CaMKK $\beta$**  respon a concentracions elevades de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic i és un activador *upstream* d'AMPK. La via de senyalització  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKK $\beta$ /AMPK s'ha proposat que augmenta l'autofàgia en diverses condicions experimentals i tipus cel·lulars, com és el cas de cèl·lules tumorals estimulades amb agonistes generadors d' $\text{IP}_3$ , la taspigargina (Tg), la ionomicina i anàlegs de la vitamina D (Høyer-Hansen et al., 2007).

Adicionalment, s'han suggerit altres vies independents de CaMKK $\beta$  per a la inducció de l'autofàgia per  $\text{Ca}^{2+}$ . És el cas de l'activació dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  de **PKC $\theta$**  (*Protein Kinase C  $\theta$* ) que es requereix per a l'activació de l'autofàgia en resposta específica a estrès de RE, però no d'altres senyals com la manca de nutrients (Sakaki and Kaufman, 2008; Sakaki et al., 2008).

Una altra cinasa activada per  $\text{Ca}^{2+}$  que regula l'autofàgia en resposta a l'estrès de RE és la **DAPK1**. DAPK1 fosforila Beclin-1 en el domini BH3-only evitant la interacció d'aquesta proteïna amb Bcl-2, i induint l'autofàgia com a conseqüència. (Fig.21) (Verfaillie et al., 2010).

### 5.3.1 La funció dual del $\text{Ca}^{2+}$ en l'autofàgia.

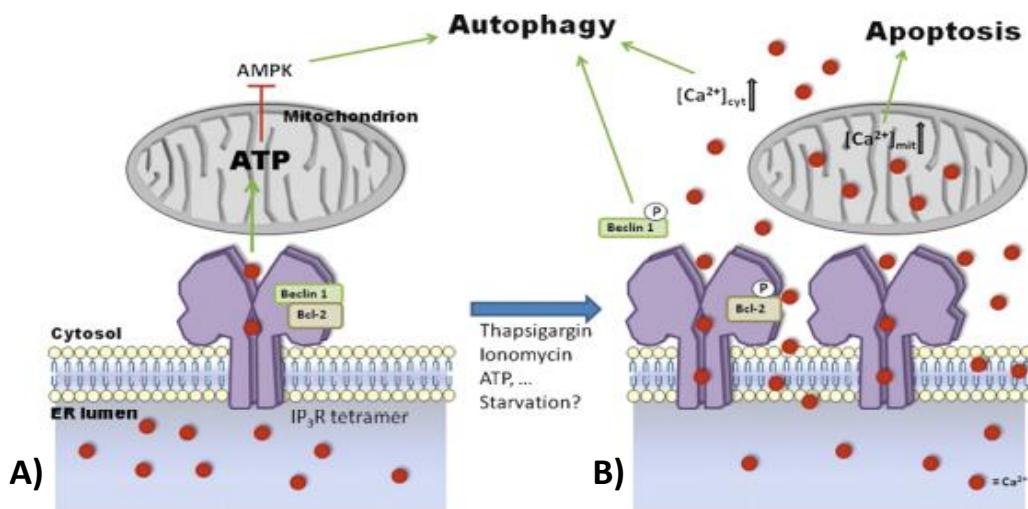
En les seccions prèvies es discuteixen dues possibles hipòtesis en relació a l'autofàgia dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.22). La primera involucra el  $\text{Ca}^{2+}$  i principalment els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  com inhibidors del procés autofàgic, mentre que la segona proposa una funció estimuladora del  $\text{Ca}^{2+}$ , on els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  també poden participar. Aquests models no han de representar necessàriament idees en conflicte, sinó que poden manifestar diferents senyalitzacions per  $\text{Ca}^{2+}$  que depenen de l'estat cel·lular amb efectes contradictoris en cèl·lules normals *versus* estressades. Un exemple és la diferent regulació en cèl·lules sanes amb una activitat autofàgica basal regida per senyals espontànies i controlades de  $\text{Ca}^{2+}$ , i una estimulació de l'autofàgia per l'elevació del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic en condicions estressants.



**Figura 22: Relació entre el  $\text{Ca}^{2+}$ , l'autofàgia i l'apoptosi** (Decuypere et al., 2011a).

L'alliberament constitutiu de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  serà captat pel mitocondri a través dels microdominis entre aquest i el RE, estimulament la bioenergètica mitocondrial per la producció d'ATP (Cárdenas et al., 2010). L'abolició dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  condueix a una menor producció d'ATP i conseqüentment a la promoció de l'autofàgia. Més enllà de l'activitat en l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$ , els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  poden segrestar Beclin-1 evitant així que participi en el procés autofàgic (Fig.23 A) (Decuyper et al., 2011a; Kania et al., 2017). Per tant, aquesta senyalització de  $\text{Ca}^{2+}$  constitutiva basal, es pot veure com un sistema de control de qualitat per determinar l'estat cel·lular. Un flux basal de  $\text{Ca}^{2+}$  cap al mitocondri indica que les cèl·lules estan sanes i no necessiten activar vies d'estrès com l'autofàgia (Decuyper et al., 2011a). Mentre que la reducció de la senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  pot conduir a una activació de l'autofàgia o fins i tot apoptosi (Higo et al., 2010).

En condicions estressants, la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  pot canviar, amb unes concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic més elevades. Aquest increment pot resultar en l'activació de proteïnes estimuladores de l'autofàgia, la més notable la CAMKK $\beta$ , i en una major captació de  $\text{Ca}^{2+}$  per part del mitocondri que pot desembocar en apoptosi (Fig.23 B) (Høyer-Hansen et al., 2007; Decuyper et al., 2011a).



**Figura 23: Commutació de l'autofàgia per  $\text{Ca}^{2+}$ .** A) En condicions normals, hi ha una alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  constitutiva pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  cap al mitocondri. Els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  també intervenen en la interacció anti-autofàgica entre Bcl-2 i Beclin-1. B) Sota condicions d'estrès, l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic estimula l'autofàgia, o fins i tot l'apoptosi. El complex anti-apoptòtic de Beclin-1 i Bcl-2 es trenca per la fosforilació de les dues proteïnes (Decuyper et al., 2011a).

El mecanisme exacte per passar d'una senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  "anti-autofàgica" a "pro-autofàgica", no es coneix. Tanmateix, està clar que els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  i algunes proteïnes accessòries com Bcl-2 o Beclin-1, juguen un paper central en els dos processos i les seves alteracions poden apuntalar aquests canvis (Pattingre et al., 2005; Decuyper et al., 2011a; Kania et al., 2017). De fet, algunes cinases com JNK i DAPK, poden modular l'estat de fosforilació de Bcl-2 i Beclin-1,

afectant al complex format per aquestes dues proteïnes (Wei et al., 2008; Decuyper et al., 2012). Tanmateix, l'efecte de la fosforilació de Bcl-2 i Beclin-1 en les propietats d'unió a IP<sub>3</sub>R i de la regulació de les propietats del flux de Ca<sup>2+</sup> a través d'aquests canals, no han estat aclarides i poden representar un canvi molecular per la senyalització per Ca<sup>2+</sup> alterada (Fig.23) (Decuyper et al., 2011a).

## 6. El paper dual del Ca<sup>2+</sup>, l'UPR i l'autofàgia en el destí cel·lular.

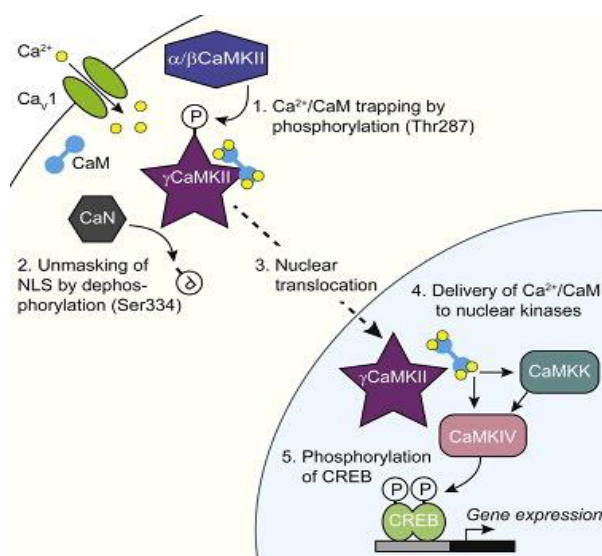
### 6.1 Ca<sup>2+</sup> en el destí cel·lular.

El Ca<sup>2+</sup> intracel·lular pot jugar un paper factor pro-supervivència o de mort cel·lular en funció, entre d'altres, de la seva concentració (Fig.22).

Augments transitoris i controlats en la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular lliure estan associats amb la **progressió del cicle cel·lular**: en la sortida de quiescència en la fase primerenca de G<sub>1</sub>, en la transició G<sub>1</sub>/S, i en altres punts de control durant les fases S i M (Capiod et al., 2007).

El Ca<sup>2+</sup> exerceix la seva funció reguladora actuant com un activador o inhibidor al·lostèric ubic de diferents enzims citosòlics. D'aquests, probablement el més rellevant relacionat amb la proliferació cel·lular és la calmodulina (CaM), que regula diversos processos. En particular, la CaM regula la família de cinases dependents de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina cinasa tipus II (CaMKII) involucrades en diversos punts de la transició del cicle cel·lular (Capiod et al., 2007; Humeau et al., 2018). La CaM també s'associa amb diversos canals de membrana, entre els que es troben els TTCCs, portant a l'activació d' $\alpha$ CaMKII (Asmara et al., 2017).

Altrament, molts enzims dependents de Ca<sup>2+</sup> també regulen l'activació de diversos factors de transcripció nuclears i factors involucrats en la divisió cel·lular, incloent CDKs i ciclines. L'activació de tota aquesta maquinària també s'associa amb microdominis de Ca<sup>2+</sup> relacionats amb clústers de canals (Capiod et al., 2007).



**Figura 24:**  $\gamma$ CaMKII actua com a proteïna transportadora del complex Ca<sup>2+</sup>/CaM al nucli per induir la fosforilació de CREB i l'expressió gènica (Ma et al., 2014).



A nivell nuclear, la senyalització dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  també pot estimular la transcripció a través de *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB). Malgrat s'ha descrit que en neurones hipocampals el  $\text{Ca}^{2+}$  *per se* pot activar CREB sense la necessitat de translocació de proteïnes citoplasmàtiques (Hardingham et al., 2001), en la majoria de casos l'activació de CREB requereix de l'activitat del complex  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Arran d'un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic, es promou la unió del  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  a la CaMKII, que serveix com a transportador del complex al nucli. Un cop al nucli el complex  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  activa la cascada de CaMK que acabarà fosforilant CREB i la transcripció dels gens portadors de l'element CRE (Fig.24) (Ma et al., 2014)

Més enllà, el  $\text{Ca}^{2+}$  també juga una funció complexa en **mort cel·lular**. Una sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  sostinguda normalment resulta en diferents rutes, que poden actuar juntes o de forma independent, i que condueixen a la mort cel·lular, ja sigui necròtica o apoptòtica. Aquests mecanismes mediat per  $\text{Ca}^{2+}$  han estat estudiats i definits en funció dels principals compartiments involucrats: el mitocondri, el citosol i el RE (Orrenius et al., 2003; Galluzzi et al., 2012)

Mitocondri. L'acumulació excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial indueix un inflament mitocondrial pertorbant i/o trencant la membrana externa. Fet que culminarà en l'alliberament de factors pro-apoptòtics tals com el citocrom C i l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) al citoplasma, on al seu torn activaran caspases (Galluzzi et al., 2012; Bonora et al., 2013).

Citosol. Una entrada sostinguda de  $\text{Ca}^{2+}$  pot conduir a la mort cel·lular per vies citosòliques, mitocondrials o ambdues. Una via apoptòtica ben caracteritzada implica la fosfatasa calcineurina que regula diferents dianes com la família Bcl-2. Altres enzims dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  que participen en apoptosi són diverses endonucleases que degraden el DNA, així com proteases de la família de les calpaines (Orrenius et al., 2003; Dubois et al., 2016).

RE. Qualsevol alteració en l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE condueix a l'anormalitat de la síntesi i/o conformació de proteïnes que en última instància, si no es corregeix, porten a la inducció de l'apoptosi. A més, sota condicions d'estrès sostingut, hi ha un augment de flux de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol provinent del RE, permetent l'activació de calpaines que desemboca en apoptosi (Scorrano, 2003; Zong et al., 2003).

Una altra via apoptòtica on participa el RE s'activa gràcies a la proteïna CHOP, que inhibeix Bcl-2, un factor anti-apoptòtic. La proteïna Bcl-2 localitzada al RE juga un paper crucial en la resistència a l'apoptosi mitjançant la seva unió i inhibició dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , també promou proliferació modulant la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  (Dubois et al., 2016; Kania et al., 2017).

## 6.2 UPR en el destí cel·lular.

L'UPR és un mecanisme de supervivència que busca restaurar l'homeòstasi alterada per diferents estressos i que implica la regulació i la integració recíproca de l'autofàgia i l'apoptosi (Cheng et al., 2014; Sisinni et al., 2019).

Sota unes condicions d'estrès tolerable i remeiable, la senyalització per UPR indueix mecanismes de supervivència intentant atenuar l'estrès de RE. Per exemple, augmentant la capacitat de plegament de proteïnes, disminuint la traducció d'aquestes o promovent la degradació de proteïnes anormals mitjançant la via ERAD o l'autofàgia (Bravo et al., 2013).

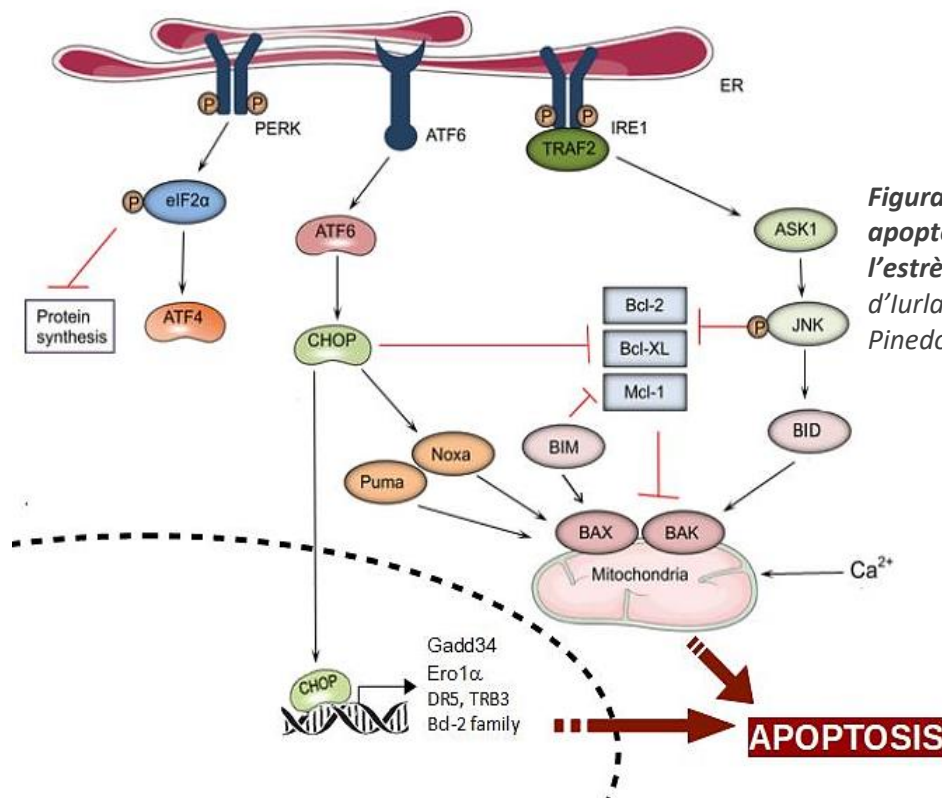
Per contra, en condicions d'estrès sever, altament tòxic i irreversible, amb una acumulació catastròfica de proteïnes mal plegades al RE per la incapacitat d'eliminar la condició estressant, la pròpia UPR indueix mecanismes de mort. La decisió dependrà de com la cèl·lula interpreta el conjunt de senyals de supervivència i apoptosi transmeses per l'UPR. Per prendre aquesta decisió, les cèl·lules han d'incorporar el factor temps, on una senyalització prolongada i sostinguda de l'UPR (com passa durant un estrès de RE crònic) augmenta la probabilitat d'apoptosi (Sano and Reed, 2013).

Això significa que l'activació tant de l'autofàgia com de l'UPR porten a canvis en l'activitat de reguladors clau, integrant senyals pro-supervivència i pro-mort, determinant d'aquesta forma el destí cel·lular (Corazzari et al., 2017; Sisinni et al., 2019).

En condicions fisiològiques, l'UPR pot induir l'apoptosi per eliminar cèl·lules danyades en un ambient que indueix estrès de RE. L'apoptosi normalment és acompanyada per una neteja fagocítica que prevé la els processos inflamatoris i la necrosi (Erwig and Henson, 2008).

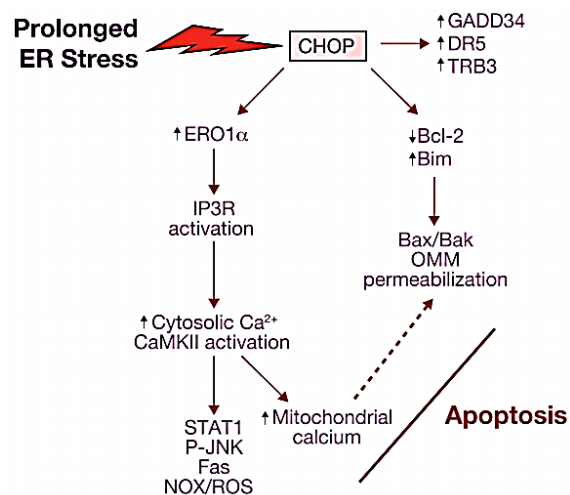
En funció de la severitat de l'estrès de RE, aquest pot alterar l'activació relativa de certes branques i influenciar les decisions de destí cel·lular. Per exemple, IRE1 $\alpha$  pot tenir com a mínim tres respostes diferents: *splicing* del mRNA de XBP1, una degradació no específica de mRNAs i una activació de JNK (Urano, 2000; Hollien et al., 2009; Merksamer and Papa, 2010). És possible que els diferents graus de mal plegament de proteïnes puguin afectar quina d'aquestes respostes es realitza mitjançant un estat d'oligomerització del receptor diferent. La degradació inespecífica de mRNA, no és la única forma d'induir mort cel·lular per la branca IRE1 $\alpha$ . Una activació de JNK pot regular l'apoptosi interaccionant amb membres de la família de Bcl-2: JNK pot fosforilar i inhibir les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2, Bcl-XL i Mcl1; així com també pot fosforilar i activar diverses proteïnes BH3-only, incloent Bid i Bim, per induir apoptosi (Fig.25) (Weston and Davis, 2007; Merksamer and Papa, 2010).

Altrament, en funció de la durada i la intensitat de l'estrès, el paper de CHOP en el destí cel·lular també pot ésser diferent. Primerament, CHOP contribueix en la transcripció de gens autofàgics participant així en la supervivència cel·lular. Tanmateix, si l'estrès es manté, CHOP participa en l'aturada del cycle cel·lular i en la inducció d'apoptosi en resposta a estrès (Yang et al., 2017). Un augment de l'activitat transcripcional de CHOP, afavoreix l'expressió de gens pro-apoptòtics com DR5 (*Death Receptor 5*), TRB3 (*Tribbles-related protein 3*), i proteïnes BH3-only de la família Bcl-2 com Bim, Bak, Bax, PUMA i NOXA, i també una menor expressió dels gens anti-apoptòtics de la mateixa família, com Bcl-2 (Fig.25). En resum, una senyalització sostinguda pot ser necessària per augmentar els nivells de CHOP fins a un llindar suficient per estimular l'apoptosi (Merksamer and Papa, 2010; Sisinni et al., 2019).



Com a conseqüència d'un estrès de RE prolongat, CHOP també pot induir apoptosi a través de l'estrès oxidatiu. La diàna transcripcional de CHOP, Ero1 $\alpha$ , pot hiperoxidar el lumen del RE provocant una fuga de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al citoplasma, on induirà la formació de ROS (Marciniak, 2004). La

inducció d'Ero1 $\alpha$  per CHOP també provoca una alliberació de Ca<sup>2+</sup> del RE al citosol, a través del canal IP<sub>3</sub>R1, on activarà la cinasa sensora de Ca<sup>2+</sup> CaMKII que pot induir diverses vies apoptòtiques (Marciniak, 2004; Higo et al., 2005). La generació de ROS com a conseqüència de la via CHOP-Ero1 $\alpha$ -IP<sub>3</sub>R1-CaMKII, no és únicament essencial per a l'apoptosi, també pot amplificar l'activació de CaMKII com a part del bucle positiu (Li et al., 2010; Tabas and Ron, 2011). Entre els principals efectors sota la via CHOP-CaMKII hi ha l'activació de JNK. Per tant, en escenaris on hi ha una activació d'IRE1 $\alpha$  i una expressió prolongada de CHOP, hi ha una activació additiva o sinèrgica que pot jugar un paper essencial en l'apoptosi (Fig.26) (Li et al., 2009b; Tabas and Ron, 2011).



**Figura 26: Vies per les quals l'activació prolongada de CHOP pot promoure l'apoptosi** (Tabas and Ron, 2011).

A més a més, una activitat sostinguda de PERK resulta en una atenuació de la traducció, que serà incompatible amb la vida cel·lular a llarg termini, de la mateixa forma que una degradació sostinguda de mRNA mediada per IRE1 $\alpha$  (Sisinni et al. 2019; Merksamer and Papa 2010).

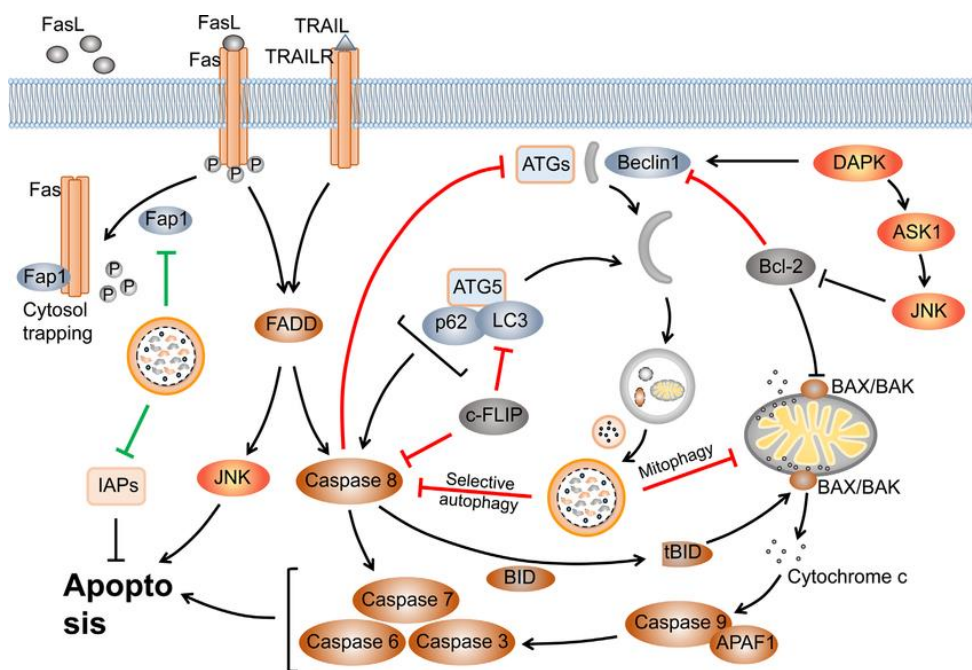
### 6.3 L'autofàgia en el destí cel·lular.

El nivell i la duració de l'autofàgia pot variar significativament, i a l'igual que l'UPR, l'autofàgia s'associa tant amb supervivència com amb mort cel·lular. Una autofàgia pro-supervivència pot eliminar proteïnes mal plegades/desplegades ubiquïtinitzades. El reciclatge d'aquest contingut cel·lular permet alimentar la maquinària metabòlica basal de la cèl·lula a un nivell suficient per a poder sobreviure. Tanmateix, una inducció persistent de l'autofàgia (per un augment de la durada/grau de l'estrès) no és viable, ja que pot resultar en una "auto-digestió" de la cèl·lula o fins i tot l'apoptosi (Codogno and Meijer, 2005; Kroemer and Levine, 2008).

Molts cops l'autofàgia i l'apoptosi es desenvolupen en la mateixa cèl·lula, en una seqüència on l'autofàgia precedeix l'apoptosi (Wirawan et al., 2010). Normalment l'autofàgia bloqueja la inducció de l'apoptosi amb una inactivació de les caspases i l'apoptosi mediada per caspases apaga el procés autofàgic tallant proteïnes autofàgiques (Song et al., 2017). Tanmateix, en alguns casos, l'autofàgia o proteïnes relacionades amb el flux autofàgic poden ajudar a induir l'apoptosi. Per exemple, p62 té una funció crítica en l'activació de la caspasa 8 (Jin et al., 2009) i

la caspasa 8, a la seva vegada, pot tallar p62 (Norman et al., 2010). A més a més, la caspasa 8 es pot degradar per autofàgia (presumtament a través de p62)(Hou et al., 2010).

Un altre cas, és la interacció entre Beclin-1 i la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2. La fosforilació de Beclin-1 per la DAPK (una cinasa regulada per la  $Ca^{2+}$ -CaM) (Zalckvar et al., 2009) o de Bcl-2 per JNK (Pattingre et al., 2005), provoca la separació entre Bcl-2 i Beclin-1, permetent que s'iniciï el procés autofàgic. Tot això suggereix una dualitat de l'autofàgia que pot regular la inducció de l'apoptosi en condicions d'estrès de RE (Fig.27) (Gump and Thorburn, 2011; Song et al., 2017).



**Figura 27: Comunicació entre les vies d'autofàgia i apoptosi.** L'autofàgia i l'apoptosi es poden regular per senyals upstream, i també es poden regular entre elles. La família de Bcl-2 pot regular ambdues vies regulant proteïnes reguladores de l'autofàgia i de l'apoptosi, tals com Beclin-1 i el dímer BAX/BAK, respectivament. L'autofàgia també degrada IAPs per estimular l'apoptosi. L'autofagosoma facilita l'activació de la caspasa 8 proporcionant una plataforma formada per p62, Atg5 i LC3. Les línies verdes i vermelles representen respectivament l'efecte estimulador i inhibitor final en l'apoptosi o l'autofàgia (Zhang et al., 2015).

## 7. Paper dual de l'UPR i l'autofàgia en càncer.

Donada la importància de l'UPR i l'autofàgia en la regulació de l'homeòstasi cel·lular, per una banda degradant proteïnes no funcionals i per l'altra, fent front a estressos; no és estranya la implicació que té la seva desregulació en diverses patologies, entre les quals destaca el càncer.

Tant l'UPR com l'autofàgia poden tenir un paper dual en el càncer. En estadis inicials de la malaltia, majoritàriament actuen com a supressors tumorals funcionant com una barrera per la tumorigènesi en estadis pre-malignes. En canvi, poden fomentar la progressió en estadis més

avançats i el manteniment en tumors ja establerts (Szegezdi et al., 2006; White and DiPaola, 2009).

## 7.1 Supressió tumoral.

En condicions fisiològiques tant l'autofàgia com l'UPR actuen com a sistemes de control de qualitat. Responen a estímuls que permet una resposta adaptativa amb funcions citoprotectores.

### 7.1.1 UPR.

L'UPR en cèl·lules pre-malignes pot ser activada com una garantia intrínseca per evitar la transformació enfront errors. Davant estressos ambientals o intrínsecs de la cèl·lula, l'activació d'una UPR transitòria obstaculitza la progressió tumoral.

A pesar que en condicions fisiològiques, l'UPR busca restaurar l'homeòstasi cel·lular, també pot promoure apoptosi o una senescència prematura com un mecanisme de seguretat en cèl·lules danyades irreparablement (Walter and Ron, 2011; Vanacker et al., 2017). De fet, s'ha proposat un paper en l'activitat d' IRE1 $\alpha$ -RIDD en la senescència cel·lular (Blazanin et al., 2017).

La transformació cel·lular normalment s'associa a un augment en la síntesi de proteïnes, que pot conduir a l'UPR. Per exemple, en el model de càncer de pulmó induït pels oncògens RET o RAS, l'UPR s'ha descrit en estadis primerencs com una barrera protectora contra la malignitat mitjançant l'expressió de CHOP i la conseqüent inducció d'apoptosi (Huber et al., 2013).

## 7.2 Autofàgia.

L'autofàgia, en uns nivells basals també opera com un mecanisme de supressió tumoral mitjançant una reducció de parts cel·lulars danyades i el manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

Existeixen diversos mecanismes que poden explicar l'activitat onco-supressora de l'autofàgia:

- Estrès oxidatiu i inestabilitat genòmica. Un augment en la producció de ROS accelera la mutagènesi, incrementant l'activació d'oncògens i estimulant la carcinogènesi (Marnett, 2000; Goetz and Luch, 2008). Entre els principals productors de ROS trobem: 1) els mitocondris (especialment els vells o danyats), els qual l'autofàgia pot ajudar a eliminar-los en un procés anomenat mitofàgia (Galluzzi et al., 2010), i 2) els agregats proteics que són la principal diana del procés autofàgic.

- Inflamació i necrosi. S'ha suggerit el paper de l'autofàgia restringint el microambient tumoral pro-inflamatori que promou proliferació i supervivència de cèl·lules malignes, l'angiogènesi, la metastasi i modifica la resposta a drogues (Degenhardt et al., 2006).
- Mort cel·lular autofàgica i senescència. Un augment del flux en determinades situacions (com l'activació d'oncògens) pot provocar la mort cel·lular per autofàgia i explicar, en part, la seva funció com a supressor tumoral (Kroemer and Levine, 2008). També pot explicar-ho el paper de l'autofàgia en senescència, un procés que implica l'aturada del cicle cel·lular, *a priori* irreversiblement, limitant així la proliferació de les cèl·lules transformades pels oncògens (Young et al., 2009).

### 7.3 Progressió tumoral.

L'UPR i l'autofàgia tenen funcions pro-supervivència funcionant com un mecanisme adaptatiu davant estressos intracel·lulars i ambientals tals com manca de nutrients, hipòxia, ràpida proliferació o la teràpia. Malgrat ajudar a les cèl·lules tumorals a fer front a aquests insults, l'UPR i l'autofàgia han d'estar estretament controlades per evitar una inducció de la mort cel·lular: una senyalització feble seria insuficient per suportar una proliferació sostinguda, però un excés de senyalització conduiria a la mort cel·lular (White, 2015; Madden et al., 2019).

#### 7.3.1 UPR

L'estrès de RE i l'activació de l'UPR contribueixen en els diferents estadis de la progressió tumoral (Fig.28) (Madden et al., 2019):

- Transformació cel·lular i adaptació. La saturació de la capacitat de plegament de proteïnes del RE per la divisió cel·lular incontrolada, l'activació d'oncògens o la pèrdua de supressors tumorals, així com l'exposició a ambients durs desencadenen en estrès de RE que condueix a una forta activació de l'UPR, un element clau per a l'adaptació i supervivència (Denoyelle et al., 2006; Huber et al., 2013; Blazanin et al., 2017; Cubillos-Ruiz et al., 2017). Per tal d'evitar que la forta activació de l'UPR induïxi la mort, les cèl·lules tumorals suprimeixen components de la via de mort cel·lular o estimulen mecanismes citoprotectors com l'autofàgia (Chen and White, 2011; Fernald and Kurokawa, 2013).

Recentment també s'ha descrit la possibilitat que les mutacions en mediadors de l'UPR tinguin el potencial per conduir el desenvolupament del càncer. Per exemple, la mutació del gen d'IRE1 $\alpha$  es troba entre les 20 cinases més mutades en càncer presentant almenys una mutació conductora (Greenman et al., 2007).

- Creixement tumoral: angiogènesi i metabolisme. Seguidament d'una transformació exitosa, els tumors sòlids han d'assegurar el seu creixement i disseminació cap a altres regions de l'organisme. La via IRE1 $\alpha$ -XBP1s s'ha relacionat amb proliferació en diferents neoplàsies, com càncer de colon, pròstata i melanoma (Li et al., 2017b; Logue et al., 2018) on l'atac d'aquesta via produeix una aturada de cicle i una disminució de la proliferació cel·lular (Madden et al., 2019).

El creixement tumoral es veu limitat per la capacitat de proporcionar suficient oxigen i nutrients a la massa cel·lular en expansió. Aquestes cèl·lules activen l'UPR, la qual pot regular transcripcional i post-traduccionament diversos factors pro-angiogènics. (Ghosh et al., 2010).

- Sistema immunitari. Evidències emergents suggereixen que l'UPR pot contribuir a mitigar o suprimir les respostes immunes antitumorals de diferents maneres (Logue et al., 2018; Hsu et al., 2019; Oakes, 2020). Per exemple, les cèl·lules canceroses secreten factors solubles que transmeten l'estrès de RE a les cèl·lules immunes (Madden et al., 2019). D'altra banda, l'UPR pot disminuir l'expressió de lligands de superfície en cèl·lules canceroses, com els MHC de classe I, suprimint la citotoxicitat induïda per les cèl·lules immunes (de Almeida et al., 2007; Granados et al., 2009; Fang et al., 2014).
- Migració cel·lular, invasió i metàstasi. L'UPR pot participar en la remodelació de l'esquelet i promoure la migració cel·lular. IRE1 $\alpha$ , independentment de la seva funció com a transductor de senyal de l'UPR, pot unir-se a la filamina A i controlar la dinàmica del citoesquelet i la motilitat cel·lular (Urrea et al., 2018).

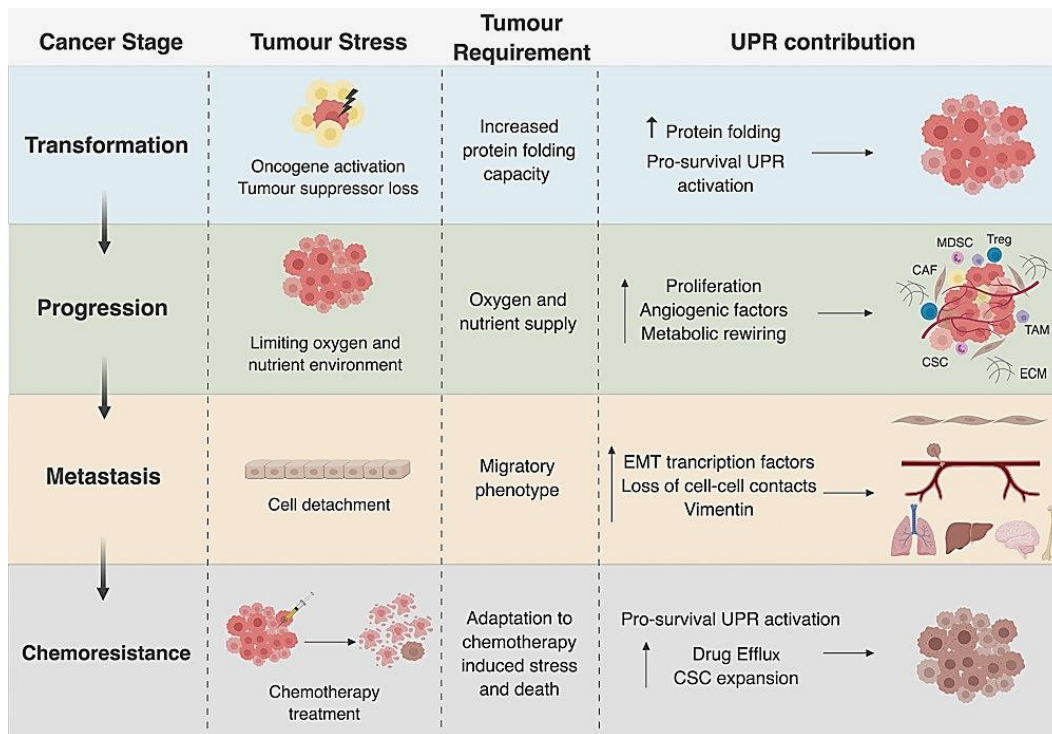
Seguidament, per poder metastatitzar, les cèl·lules canceroses adquireixen un fenotip invasiu i migratori on s'han implicat les vies PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 i IRE1 $\alpha$ -XBP1s (Auf et al., 2010; Feng et al., 2014). El conjunt d'estressos derivats d'aquests processos poden ésser pal·liats per mecanismes adaptatius com l'UPR (Santamaría et al., 2019).

- Adormiment tumoral. Les cèl·lules disseminants que arriben a l'òrgan diana, poden frenar el creixement fins a trobar unes condicions ambientals més favorables, en un procés anomenat "adormiment" tumoral (Aguirre-Ghiso, 2007). S'ha observat un augment dels marcadors d'UPR en aquestes cèl·lules adormides (Bartkowiak et al., 2010, 2015). Per exemple, la combinatòria d'aturada del cicle cel·lular en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> per efecte de PERK i supervivència per l'estimulació de BiP, condueix a un adormiment cel·lular i a una resistència



a drogues, especialment a les que afecten la divisió cel·lular, com és el cas de molts quimioteràpics (Ranganathan et al., 2006).

- **Resistència al tractament.** Les 3 branques de l'UPR han estat implicades en l'adaptació per tal d'assegurar la viabilitat de les cèl·lules tumorals enfront l'exposició a agents quimioteràpics (Madden et al., 2019).



**Figura 28: El paper de l'UPR en els diferents estadis de la progressió tumoral** (Madden et al., 2019).

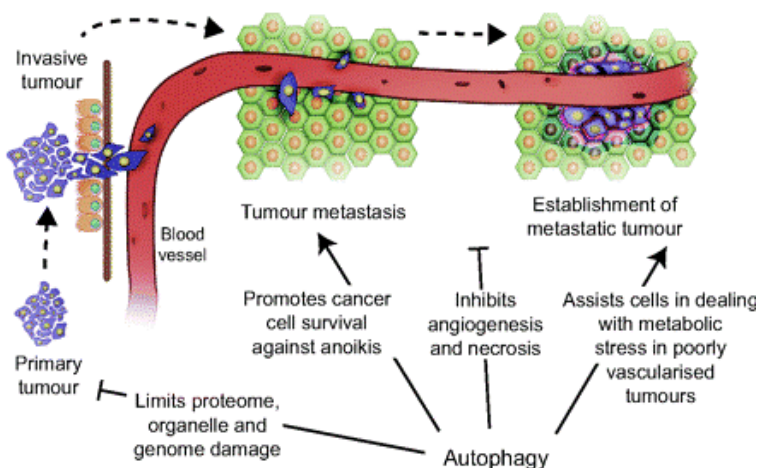
### 7.3.2 Autofàgia.

La resposta autofàgica ajuda al creixement i la progressió dels tumors ja establerts, reduint la sensibilitat a estímuls i estressos que poden portar a mort cel·lular. Així ho recolza el fet que en tumors ja establerts, defectes en l'autofàgia produeixen una disminució en proliferació, disseminació i en la capacitat metastàtica de les cèl·lules malignes. El paper oncogènic de l'autofàgia s'ha observat en diferents punts de la tumorigènesi (Fig.29):

- **Hipòxia i manca de nutrients.** A l'igual que l'UPR, l'autofàgia es troba especialment activada en la part central dels tumors sòlids per ajudar a adaptar-se a les condicions estressants que estan sotmesos, com la manca de nutrients o la hipòxia (Yun and Lee, 2018). D'altra banda, l'autofàgia també ajuda a complir les altes exigències energètiques i metabòliques dels tumors proliferants, reciclant components intracel·lulars per generar substrats metabòlics (Rabinowitz and White, 2010; Liu and Ryan, 2012). D'acord amb això, la inhibició de

l'autofàgia o el silenciament de gens autofàgics en aquestes condicions pot resultar en la mort de cèl·lules tumorals.

- **Invasió i metàstasi.** La pèrdua d'unió a l'ECM induïx l'anoikis, un procés apoptòtic en cèl·lules canceroses que pot ser evitat per l'autofàgia permetent el desenganxament de l'ECM (Guadamillas et al., 2011). A més, el mecanisme autofàgic, a l'igual que l'UPR, serveix com un sistema adaptatiu per sobreviure a les condicions estressants a les que es troben exposades les cèl·lules tumorals en els processos d'invasió i metàstasi (Yun and Lee, 2018).
- **Quimioresistència.** Diversos estudis senyalen una autofàgia protectora com un dels mecanismes de resistència a múltiples drogues antitumorals. Per aquest motiu, es creu que l'aplicació combinada del quimioteràpic amb un modulador de l'autofàgia pot portar a millors pronòstics en el tractament de neoplàsies (Moretti et al., 2007; Liu and Ryan, 2012). La sobrerregulació de l'autofàgia per TMZ en glioblastoma ha estat àmpliament discutida (Kanzawa et al., 2004; Kondo et al., 2005; Koukourakis et al., 2016; Yan et al., 2016b; Würstle et al., 2017) i en el cas del nostre clon quimioresistent també va ser demostrada (Visa, Sallán et al., 2019).



**Figura 29: Els múltiples papers de l'autofàgia durant la tumorigènesi.** Pot afavorir o inhibir la formació i desenvolupament de neoplàsies a través de diferents mecanismes, segons l'etapa i condicions del tumor (Liu and Ryan, 2012).

El fet que l'autofàgia i l'estrès de RE estiguin implicats en la determinació cel·lular ha cridat l'atenció com a possibles dianes pel tractament antineoplàsic. Per exemple, s'han descrit com inductors de mort en cèl·lules canceroses, alguns compostos com la pimoizida un potent inhibidor de TTCCs que modula l'autofàgia (Zielke et al., 2018; Kinzler et al., 2020), així com diversos activadors d'IRE1 $\alpha$  (Kim et al., 2018).

## 8. Senescència.

L'estat cel·lular ve determinat per senyals fisiològiques i d'estrès. La resposta pot permetre una reversió del dany provocat per l'estrès, o activar mecanismes de mort per tal de restringir l'impacte en la degeneració cel·lular. Entre aquests extrems, les cèl·lules poden adquirir altres estats, normalment associats amb supervivència, però també amb canvis estructurals i funcionals permanents. Un exemple n'és la senescència, entesa com un cessament de la proliferació, fonamentalment irreversible i refractària a diversos mitògens. Aquest bloqueig del cycle cel·lular en presència de factors de creixement, sobrestimula vies promotores del creixement i condueix a una hipertròfia cel·lular (morfologia cel·lular engrandida), així com fenotips pro-inflamatoris i hipersecretors. A part de característiques secretores, el fenotip senescent també presenta dany macromolecular, un metabolisme alterat i resistència a l'apoptosi. Existeixen diversos estressos que poden conduir a senescència, tals com agents genotòxics, deprivació de nutrients, hipòxia, disfunció mitocondrial i activació oncogènica (Campisi and Di Fagagna, 2007; Blagosklonny, 2011; Gorgoulis et al., 2019).

### 8.1 Característiques de l'estat senescent.

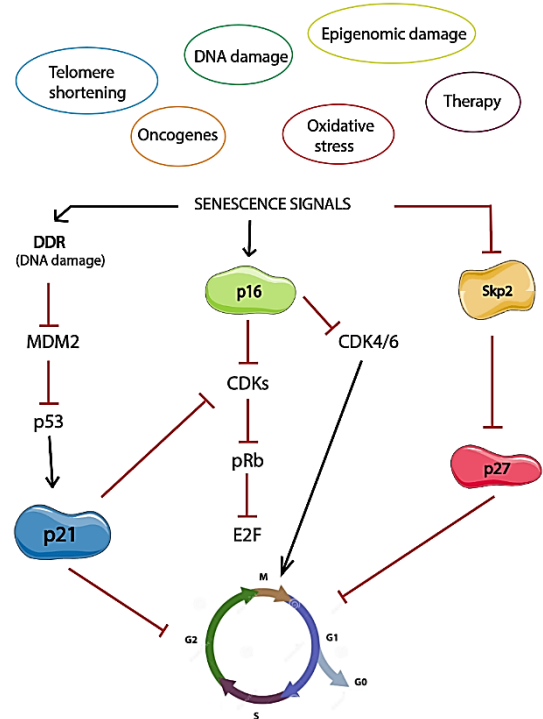
#### 8.1.1 Aturada del cycle cel·lular.

Una característica comuna de les cèl·lules senescentes és una aturada del cycle cel·lular, essencialment irreversible, com a resposta d'alarma instigada per estímuls nocius o una proliferació aberrant (Gorgoulis et al., 2019).

Tanmateix, l'aturada del cycle cel·lular no és sinònim de senescència, ja que existeixen altres estats no proliferatius viables, com la quiescència. En aquesta, l'aturada del cycle és reversible i caracteritzada per uns baixos nivells metabòlics, de síntesi proteica i de funcions cel·lulars sense creixement en la mida cel·lular (Blagosklonny, 2011; Gorgoulis et al., 2019).

En les cèl·lules de mamífer, la família del retinoblastoma (RB) i de les proteïnes p53 són importants per establir l'aturada del cycle cel·lular (Rodier and Campisi, 2011). RB1, i membres de la seva família, són fosforilats per cinases dependents de ciclins (CDKs) específiques (CDK2, CDK4 i CDK6). Aquesta fosforilació redueix la repressió exercida per la família RB al factor de transcripció E2F, necessari per al progrés del cycle cel·lular (Sharpless and Sherr, 2015).

Durant la senescència es produeixen canvis importants en l'expressió de gens, incloent canvis en activadors o inhibidors del cicle. Fonamentalment, en cèl·lules senescentes s'acumula l'inhibidor de CDK2, p21 (també anomenat p21<sup>WAF1/Cip1/Sdi</sup> o CDKN1a) i l'inhibidor de CDK4/6, p16 (també anomenat p16<sup>INK4A</sup> o CDKN2a). L'acumulació d'inhibidors de cicle provoca una activació persistent de les proteïnes de la família RB, la inhibició de la transactivació d'E2F i la consegüent aturada de cicle cel·lular en la fase G<sub>1</sub> del cicle (Gorgoulis et al., 2019; Lee and Schmitt, 2019). Aquesta persistència és reforçada per l'heterocromatització de gens diana d'E2F (Salama et al., 2014), els efectes de les citokines alliberades per les cèl·lules senescentes (Rodier and Campisi, 2011) i/o la producció persistent de ROS (Takahashi et al., 2006). Això pot explicar perquè la inactivació de la família de proteïnes del RB o p53 no podrà revertir el bloqueig del cicle (Fig.30).



**Figura 30:** Diagrama on es mostra les vies moleculars que condueixen a una aturada del cicle cel·lular associat a senescència.

Els inhibidors de cicle són considerats marcadors clau en senescència i malgrat que p16 es considera el més específic, també s'expressa en certes cèl·lules no senescentes i no totes les cèl·lules senescentes l'expressen (Campisi and Di Fagagna, 2007; Gorgoulis et al., 2019). D'altra banda, l'inhibidor p27 s'ha associat amb quiescència i amb senescència induïda per teràpia (Nardella et al., 2011; Alza et al., 2020). Per aquest motiu, la detecció d'aturada de cicle cel·lular senescent necessita la quantificació de múltiples factors i característiques.

### 8.1.2 Secreció.

Les cèl·lules senescentes secreten una plèthora de factors, incloent citocines i quimioquines proinflamàtories, moduladors del creixement, factors angiogènics i metaloproteases de matriu (MMPs), que en conjunt s'anomenen fenotip secretor associat a senescència (SASP). A l'igual que l'aturada del cicle cel·lular, el SASP constitueix un *hallmark* de cèl·lules senescentes i intervé en molts dels efectes pato-fisiològics. Per exemple, el SASP reforça i propaga la senescència de forma paracrina i autocrina i activa respostes immunitàries per tal d'eliminar les cèl·lules senescentes (Gorgoulis et al., 2019).

Mentre que la parada del cicle cel·lular és regulada per les vies supressores tumorals p53 i p16/Rb, el SASP és controlat per factors de transcripció tals com NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$ , GATA4, vies de senyalització de p38MAPK i MTOR (Kuilman and Peeper, 2009; Salama et al., 2014; Ito et al., 2017)

La composició i força del SASP varia substancialment depenent de la durada de la senescència, l'origen de l'estímul pro-senescent i el tipus cel·lular (Gorgoulis et al., 2019).

### **Dany macromolecular.**

Dany al DNA: La majoria de cèl·lules tenen una vida útil replicativa finita; quan arriben al final d'aquesta, les cèl·lules poden patir senescència cel·lular o replicativa (Campisi, 2013).

La finitud de la via replicativa es deu a la incapacitat de replicar completament les molècules lineals de DNA (Allsopp et al., 1995). Per aquest motiu, les estructures de DNA que tapen els extrems dels cromosomes lineals, anomenades telòmers, s'escurcen en cada divisió. Aquest escurçament no es produeix en les cèl·lules que expressen la telomerasa, una transcriptasa reversa capaç de reomplir el DNA telomeric repetitiu *de novo* (Collins, 2000). En humans, entre les cèl·lules telomerasa positives s'inclou la majoria de cèl·lules canceroses, cèl·lules mare embrionals, algunes cèl·lules mare adultes i algunes cèl·lules somàtiques (per exemple, les cèl·lules T activades)(Campisi, 2013).

Les repetides divisions cel·lulars en absència de telomerasa, eventualment provoquen que un o més telòmers esdevinguin críticament curts i disfuncionals. Aquests telòmers disfuncionals provoquen una resposta de dany al DNA (DDR) però a la vegada suprimeix l'intent de reparació del DNA (D'Adda Di Fagagna et al., 2003; Fumagalli et al., 2012). La DDR també atura la divisió cel·lular principalment a través de l'activitat del supressor tumoral p53 (Campisi, 2013).

Malgrat la meitat del dany al DNA de cèl·lules senescents es localitza als telòmers, altres insults subcitotòxics poden induir dany al DNA sever, independentment de la seva localització genòmica desencadenant en senescència. Molts agents genotòxics, incloent la radiació (ionitzant i UV), agents farmacològics (com certs quimioterapèutics) i l'estrès oxidatiu poden provocar senescència. Altrament, l'activació d'oncògens pot induir senescència (conegut com OIS), com una resposta de supressió tumoral, restringint la poliferació incontrolada de les cèl·lules potencialment oncogèniques (Gorgoulis et al., 2019).

Dany proteic: La proteotoxicitat és un *hallmark* de l'envelliment i la senescència. Una de les principals fonts de dany proteic a través de l'oxidació de proteïnes són les ROS. La majoria de dany oxidatiu en proteïnes és irreversible, per aquest motiu s'activen mecanismes per a la seva

eliminació com l'UPR, la degradació pel sistema de l'ubiquitina proteasoma (UPS) i/o l'autofàgia (Deschênes-Simard et al., 2014). L'estrès proteostàtic també es dona per la producció massiva de factors del SASP, que acaba generant pèptids mal plegats i desencadena en l'activació d'aquestes vies. Precisament, perquè l'UPR, l'UPS i l'autofàgia es troben actives en aquestes condicions, el seu estudi pot ser útil per a caracteritzar l'estat senescent (Gorgoulis et al., 2019).

Dany lipídic: les cèl·lules senescentes tenen canvis marcats en el metabolisme lipídic, tot i que no està clar com contribueixen al fenotip senescent (Gorgoulis et al., 2019). Un dels possibles responsables del dany lipídic per generació de ROS, és la disfunció mitocondrial present durant la senescència (Correia-Melo et al., 2016; Ogrodnik et al., 2017).

### 8.1.3 Perfil de desregulació metabòlica.

Entre els orgànuls més alterats durant la senescència es troben els mitocondris i els lisosomes .

Mitocondris. En les cèl·lules senescentes presenten canvis estructurals graduals que acaben amb l'alteració de la seva funció, dinàmica i morfologia. Malgrat les cèl·lules senescentes presenten més mitocondris, sembla que l'habilitat per produir ATP està compromesa (Korolchuk et al., 2017; Birch et al., 2018). En canvi, també produeixen més ROS, que és un dels responsables del dany proteic i lipídic, així com l'escurçament de telòmers i l'activació de DDR (Passos et al., 2007). La disfunció mitocondrial durant la senescència també està implicada en la regulació del SASP (Correia-Melo et al., 2016).

Lisosomes. Són els compartiments finals de la fagocitosis, l'endocitosis i l'autofàgia, i ajuden a proveir d'energia i matèries primeres a la cèl·lula, requeriments imprescindibles per a processos senescentes com la secreció. Els lisosomes en les cèl·lules senescentes es troben augmentats tant en nombre com en mida. Aquest increment en mida pot reflexar l'acumulació gradual de lisosomes disfuncionals, mentre que l'augment en nombre pot ser un intent d'equilibrar-ho produint més lisosomes nous (Gorgoulis et al., 2019).

Precisament, l'augment de massa lisosomal s'ha relacionat amb l'activitat  $\beta$ -galactosidasa associada a senescència, un biomarcador de senescència (Gorgoulis et al., 2019).

Des d'un punt de vista terapèutic, un engrandiment del compartiment lisosomal ofereix un augment en la capacitat d'atrapar drogues que poden ser protonades. Aquesta capacitat redueix la concentració efectiva al citosol i el nucli, però és contrarrestada per l'alliberació lenta de les drogues des dels lisosomes (J. T. Park et al. 2018).

### 8.1.4 Resistència a l'apoptosi.

A l'igual que la senescència, l'apoptosi és una resposta extrema a estressos cel·lulars i és un mecanisme important de supressió tumoral. Però mentre que la senescència evita el creixement de cèl·lules danyades o estressades, l'apoptosi les elimina ràpidament.

Molts tipus cel·lulars (però no tots) adquireixen resistència a l'apoptosi quan es tornen senescent. No està clar què determina que una cèl·lula sofreixi apoptosi o senescència però els sistemes reguladors de les dues vies es comuniquen, probablement a través de la proteïna reguladora comuna, p53. Un determinant de la resposta, és el tipus cel·lular, tot i que la intensitat i naturalesa del dany també poden participar (Campisi and Di Fagagna, 2007).

## 8.2 Senescència cel·lular i càncer.

### 8.2.1 Promotora tumoral.

Un augment d'evidències apunten que les cèl·lules senescent poden conduir a la transformació hiperplàstica (Campisi, 2013). Per una part, aquesta estimulació tumorigènica es deu als factors solubles produïts per cèl·lules senescent, com el VEGF que promou l'angiogènesi tumoral (Coppe et al., 2006) o MMP3 que promou invasió (Liu and Hornsby, 2007). Algunes interleucines que conformen el SASP també s'han relacionat amb l'EMT (Campisi, 2013).

D'altra banda, la senescència pot promoure l'aparició de marcadors de cèl·lules mare al seus voltants, a través del SASP, que pot millorar la reprogramació de cèl·lules veïnes. Per aquest motiu s'hipotetitza una relació entre la reprogramació associada a senescència i el *stemness* del càncer (Abad et al., 2011; Mosteiro et al., 2016; Milanovic et al., 2018; Lee and Schmitt, 2019).

Les cèl·lules senescent també estan implicades en la manca de resposta al tractament anticancerigen. En alguns casos aquelles cèl·lules que responen al dany al DNA per radiació o per agents quimioterapèutics, secreten factors que poden protegir les cèl·lules tumorals veïnes de ser eliminades pels mateixos agents quimioteràpics (Gilbert and Hemann, 2010; Sun et al., 2012). De fet, aquelles cèl·lules canceroses que escapen de l'estat senescent presenten un potencial iniciador de tumor molt més elevat que la població de cèl·lules que mai han entrat en senescència (Milanovic et al., 2018; Lee and Schmitt, 2019). Per contra, alguns agents del SASP poden ser quimiosensibilitzadors (Chien et al., 2011).

En resum, en el panorama emergent l'acumulació de cèl·lules senescent amb l'edat crea un microambient permissiu per al desenvolupament, o almenys la progressió del càncer (Campisi, 2013; Lee and Schmitt, 2019).

### 8.2.2 Supressora tumoral.

La parada en el creixement cel·lular causada per la senescència és capaç de suprimir el desenvolupament del càncer pel seu efecte inhibint la proliferació. Donats els defectes freqüents de la via apoptòtica en neoplàsies primàries, pot operar com un mecanisme addicional de protecció.

Aparentment, alguns components del SASP poden actuar de forma autocrina per produir aquesta parada en el creixement, ajudant a establir una resposta senescent induïda per oncògens (OIS). En conjunt, aquestes troballes recolzen la idea, de que almenys alguns factors del SASP i sota algunes circumstàncies, ajuden a la supressió tumoral participant en l'aturada del creixement senescent (Campisi, 2013).

#### Neteja immunològica.

Donada la naturalesa pro-inflamatòria del SASP, no és sorprenent que les cèl·lules senescentes puguin atraure cèl·lules immunològiques, tant del sistema immune innat, com de l'adaptatiu per generar una neteja immunològica (Xue et al., 2007; Chien et al., 2011; Kang et al., 2011). Sembla ser que una funció del sistema immunològic és la d'atacar i netejar les cèl·lules senescentes (Kang et al., 2011). Una altra funció, busca estimular una reacció immune local per eliminar cèl·lules que expressen oncògens, ja sigui aquelles que han patit una senescència induïda per oncògens, o cèl·lules transformades que han escapat/evitat la senescència (Campisi, 2013).

A pesar de l'aparent contradicció en aconseguir un pronòstic favorable amb la inducció o restauració de la senescència en càncer, la seva modulació s'ha postulat com a possible teràpia. En essència, les noves teràpies anticancerígenes busquen estratègies amb doble acció: primerament evocar la senescència i després eliminar aquestes cèl·lules tenint com a diana els talons d'Aquiles més vulnerables de la condició senescent (Milanovic et al., 2018; Lee and Schmitt, 2019).





# **HIPÒTESI I OBJECTIUS**



## CONTEXT I HIPÒTESI.

El calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) és el segon missatger més abundant de la cèl·lula i la seva senyalització està implicada en processos tan importants com proliferació, diferenciació, migració, supervivència o apoptosi, entre d'altres. Precisament, s'ha descrit que els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  voltatge dependents tipus T (TTCCs) i la seva senyalització, són reguladors clau en la biologia de cèl·lules tumorals, participant en processos fonamentals com la progressió del cicle cel·lular. Altrament, vies com la resposta a estrès de RE (UPR; *Unfolded Protein Response*) o l'autofàgia estan estretament relacionades tant amb la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  en general, com amb els TTCCs en concret. A més, donat que aquestes vies són mecanismes adaptatius de la cèl·lula, es troben freqüentment sobreactivades en múltiples càncers (com el glioblastoma), així com en resposta al tractament. El conjunt d'aquests factors ha despertat l'interès pels TTCCs en els últims anys i ha desencadenat nombrosos estudis utilitzant inhibidors de TTCCs amb la idea d'aturar la proliferació o induir mort cel·lular en una gran varietat de cèl·lules cancerígenes.

La nostra hipòtesi és que els TTCCs juguen una funció important en el curs del glioblastoma, en especial en proliferació i supervivència. Donat que aquestes són dues de les característiques cel·lulars més rellevants en qualsevol càncer, tenir-los com a diana esdevé una estratègia terapèutica antitumoral interessant. Per aquest motiu, en el present treball es busca estudiar com el bloqueig o el silenciament específic d'aquests canals afecta a la viabilitat de les cèl·lules de glioblastoma. A més, donat que conèixer el mecanisme de mort ens pot ajudar a entendre la biologia del tumor i a establir i/o millorar l'estratègia terapèutica actual, ens proposem identificar les vies moleculars que es troben al darrere, amb especial èmfasi en l'autofàgia i l'estrès de RE.

## OBJECTIUS ESPECÍFICS.

- 1. Esbrinar el mecanisme d'acció del bloquejant de TTCCs, NNC 55-0396, que condueix a la mort cel·lular en línies cel·lulars de glioblastoma.**
  - 1.1. Analitzar les discrepàncies entre les concentracions inhibidores i les concentracions citotòxiques establertes pels bloquejants de TTCCs.
  - 1.2. Investigar la implicació del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic en la senyalització apoptòtica induïda per NNC 55-0396.
  - 1.3. Avaluar l'estrès de RE generat per l'aplicació de NNC 55-0396 i la conseqüent activació de l'UPR.
  - 1.4. Determinar la funció de l'autofàgia en resposta a l'estrès generat pel NNC 55-0396.

**2. Estudar específicament el paper dels TTCCs en supervivència mitjançant el silenciament gènic en diferents models de glioblastoma.**

2.1. Avaluar la inducció de mort cel·lular en el model *in vitro* de línies cel·lulars i neuroesferes.

2.2. Validar l'efecte del silenciament de TTCCs en el model *in vivo* de xenografts murins.

2.3. Estudar el silenciament dels TTCCs en cultius primaris de pacients de glioblastoma i el seu paper en senescència.



**MATERIALS**  
**I**  
**MÉTODES**



# 1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR.

## 1.1 Línies de glioma.

En el present treball s'han utilitzat les línies cel·lulars de glioblastoma: A172 i U87-MG, obtingudes de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les línies van ser autenticades mitjançant el perfil de *short tandem repeat* (Stab Vida) un cop purificat el DNA genòmic utilitzant el kit Maxwell16 Tissue DNA Kit (Promega, AS1030). Els resultats de l'autenticació van confirmar l'origen ATCC de les línies, especialment important pel cas de U87-MG de la qual se n'han descrit al menys dos de diferents (Uppsala i ATCC).

La línia U87-MG prové del glioblastoma d'una dona de 45 anys, té un creixement en agregats característic i és capaç de generar tumors en ratolins immunodeprimits. Mentre que la línia A172 prové del glioblastoma d'un home de 53 anys i no és tumorigènica en ratolins immunodeprimits. Tanmateix el seu cariotip sí que presenta alteracions cromosòmiques, típic de cèl·lules tumorals (Fig.31).



**Figura 31: Exemple representatiu de cariotip de la línia cel·lular A172.** La línia A172 presenta un cariotip poliploide i complex, tal com s'indica a continuació. A172: 72-80, XY, +Y, +1, -1, +2, +2, +2, add(2)(q24), add(2)(q24), +3, add(3)(q26), +4, +4, del(4)(p15), +5, del(5)(p14), +6, +7, +7, del(7)(q22), del(7)(q32), +8, +10, +11, del(11)(q22), +12, del(12)(p13), +13, +13, +13, -14, +15, +16, +16, +16, +17, +17, +17, +18, +18, +19, +19, +19, +20, +20, +20, +21, add(21)(q22), add(21)(q22), +22, +22, +mark1, +mark1, +mark2[cp10].

Aquestes línies cel·lulars es mantenen en medi MEM (*Minimal Essential Medium*, Lomza) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; Invitrogen) prèviament inactivat, 1 mM de sodi piruvat (Invitrogen), aminoàcids no essencials (NEAA; Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen) i 20 unitats/ml de penicil·lina i 20 µg/ml estreptomicina. Aquestes línies creixen en incubadors de CO<sub>2</sub> (ThermoScientific) a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO<sub>2</sub>. Les cèl·lules es testen periòdicament per a descartar la presència de micoplasma. En cas de que el test surti



positiu, les cèl·lules són tractades amb Plasmocin™ - *Mycoplasma Elimination Reagent* (InvivoGen) a una concentració de 25 µg/ml fins a obtenir un cultiu lliure de Micoplasma. Els cultius cel·lulars utilitzats en els experiments *in vivo* d'aquesta tesi eren negatius per la contaminació de micoplasma. Per la detecció d'aquest organisme es va utilitzar la tècnica de PCR, els encebadors que es van utilitzar són *forward*: GGCGAATGGGTGAGTAACACG i el *reverse*: CGGATAACGCTTGCGACCTATG.

## 1.2 Cultiu de la línia cel·lular HEK293T.

La línia humana HEK293T de ronyó embrionari és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana de l'epiteli renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. És una línia cel·lular que creix molt ràpid i que es transfecta molt fàcilment, és per aquesta raó que en aquest treball s'utilitzen les HEK293T per a la producció de virus. Aquestes cèl·lules creixen en medi DMEM suplementades amb 10% FBS, 1 mM de sodi piruvat, NEAA i 20 unitats/ml de penicil·lina i 20 µg/ml estreptomina a 37°C i en condicions d'elevada humitat i 5% CO<sub>2</sub>.

## 1.3 Cultius primaris.

El cultius primaris de gliomes van ésser establerts a partir de biòpsies de pacients operats a la Unitat de Neurocirurgia de l'Hospital Arnau de Vilanova (HUAV), prèvia obtenció d'un consentiment informat dels pacients.

La peça del tumor extreta pels neurocirurgians es renta dos cops amb tampó fosfat salí (PBS) i els coàguls i les zones necròtiques s'eliminen per tal de no interferir amb el cultiu. El teixit es fragmenta en trossos d'uns 5 mm<sup>2</sup> i cada tros es col·loca en un eppendorf amb 1 ml de PBS que conté col·lagenasa al 0,025% (Worthington) i DNasa (Sigma Aldrich) a 4.800 U/ml durant 2 hores a 37°C i en agitació. Un cop passat aquest temps, el cultiu es filtra amb filtres de nilon de 70 µm (BD) per tal d'eliminar el teixit que no s'ha digerit. A continuació, el cultiu es centrifuga i el pellet es renta dues vegades amb PBS (Bruna et al., 2007). Finalment, el pellet es sembra en medi DMEM suplementat amb 10% FBS i 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomina. Al dia següent es realitza un canvi de medi i es permet que les cèl·lules creixin fins a un 90% de confluència i després es divideixen 1:2 per regla general.

Tot el processament i el posterior cultiu de les mostres es realitzen en una campana de bioseguretat Bio2A.

En el present treball s'utilitzen cultius primaris de dos pacients diferents. El Cas 65 (C65) prové d'un home de 68 anys i el Cas 66 (C66) d'una dona de 78 anys, tots dos són Retinoblastoma negatius.

#### 1.4 Descongelació, manteniment i congelació.

Alíquotes tant de les línies cel·lulars com dels cultius primaris són guardades en nitrogen líquid per emmagatzemar-les durant molts anys. Per tal de descongelar les cèl·lules d'una manera adequada, s'extrauen els criotubs del nitrogen líquid i directament es passen a un bany a 37°C, donat que per una descongelació òptima és necessari que aquesta sigui molt ràpida. Una vegada descongelats, el contingut es transfereix a un tub amb 10 ml amb medi complet i es centrifuga 5 minuts a 1.000 rpm, s'aspira el sobrenedant per eliminar el dimetil sulfòxid (DMSO; Sigma Aldrich) i el pellet es sembra amb medi complert. Al dia següent es canvia el medi per eliminar possibles cèl·lules mortes que puguin interferir en el cultiu. Una vegada aquestes cèl·lules arriben a la confluència, és necessari "dividir-les".

Per fer-ho, les cèl·lules es renten amb PBS, i s'incuben amb tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37°C durant 3 minuts. Un cop les cèl·lules estan desenganxades, es transfereixen a un tub que conté medi complert, de manera que el sèrum inactivarà la tripsina. Es centrifuguen 5 min a 1.000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El pellet es resuspen en medi i la quantitat corresponent, depenent de la dilució de cada tipus cel·lular, se sembra en una nova placa que contingui medi complert. Per regla general, en les línies cel·lulars de glioblastoma U87-MG apliquem una dilució 1:3, mentre que per les A172 fem una dilució 1:4; per les HEK293T una dilució 1:10, i en els cultius primaris una dilució 1:2. Les línies cel·lulars es passen dos cops per setmana, mentre que els primaris degut a la seva baixa velocitat de creixement es passaran quan arribin a confluència, mantenint un canvi de medi dos cops per setmana.

Finalment, per congelar alíquotes de cèl·lules en nitrogen líquid, aproximadament un milió de cèl·lules són resuspeses en 850 µl de FBS i transferides a un criotub on gota a gota afegirem 150 µl de DMSO. Per a una congelació òptima, les cèl·lules s'han d'anar refredant poc a poc, idealment, a un grau per hora. En el nostre cas, transferim els criotubs a un tanc de congelació a -80°C que conté isopropanol, fent que l'intercanvi de fred sigui lent durant 24 hores. Després d'aquest període, les cèl·lules són transferides al nitrogen líquid on poden romandre durant anys.

## 1.5 Generació i manteniment de Neuroesferes (NS).

Les neuroesferes (NS) són agregats esfèriques de cèl·lules (U87-MG en el nostre cas) formades en un cultiu en suspensió en presència de medi sense sèrum, amb factors mitogènics (principalment EFG i FGF) i amb substrats no adherents que permeten tornar les cèl·lules a un estat més desdiferenciat amb característiques de cèl·lula mare.

Per tal de generar NS, partim d'un pellet de cèl·lules adherents (aproximadament 1,5 milions de cèl·lules) que es resuspèn en medi Neurobasal (Gibco LS21103049) suplementat amb B27 (1:50; Gibco 17504044), 20 unitats/ml de penicil·lina, 20 µg/ml estreptomicina, 2 mM de Lglutamina (Invitrogen), i 20 ng/ml bFGF (Gibco, 13256029) i 20 ng/ml EGF (Gibco, PHG0314). Els factors de creixement es renoven cada 3 dies.

Les cèl·lules són sembrades de forma individualitzada en plaques no adherents i també es mantenen a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO<sub>2</sub>.

Aquests cultius no poden arribar a confluència, tal com passa amb les cèl·lules que creixen en condicions adherents. És per aquest motiu, que els "passes" es fan quan el color del medi vira de color rosat a grogós, indicant un exhauriment dels nutrients presents en el medi i un canvi del pH provocat pels diferents metabòlits secretats per les cèl·lules. Per fer-ho, es recull el medi on es troben les NS i es centrifuga 1 minut a 1.000 rpm per a que precipitin, s'aspira el medi i es resuspèn el pellet amb medi, disgregant les NS amb la pipeta abans de tornar a sembrar-les en una placa no adherent.

## 1.6 Viabilitat cel·lular

### 1.6.1 Blau tripà

El Blau Tripà és un colorant impermeable que només pot creuar la membrana cel·lular quan aquesta està afectada, és per aquest motiu que la seva tinció s'utilitza per determinar la viabilitat cel·lular. Un cop dins de la cèl·lula, el Blau de Tripà s'uneix a diferents proteïnes conferint a les cèl·lules una coloració blava, d'aquesta forma es poden identificar d'una manera directa les cèl·lules mortes (tenyides) de les vives (no tenyides).

Per fer la tinció de Blau Tripà es recull en un tub el medi que conté les NS amb una pipeta de 10 mL (per evitar disgregar les NS) i es deixen sedimentar durant uns 15 minuts. S'aspira el medi conservant uns 200 µL d'aquest juntament amb el pellet de NS i s'afegeix 200 µL de Blau Tripà, deixant la tinció 2 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'afegeix 12 mL de PBS

per tal de fer un rentat i es centrifuga durant 5 min a 200 rpm. El pellet es resuspèn en 1 mL de PBS i es transfereixen les NS en una placa de M24 per fer les fotografies.

### 1.6.2 Wst-1.

El reactiu Wst-1 (basat en sals de tetrazolium) ens permet analitzar de forma indirecta la viabilitat cel·lular. És un assaig colorimètric, de quantificació espectrofotomètrica que es basa en la reducció de les sals de tetrazolium (Wst-1) a sals de formazan mitjançant l'acció de les succinat deshidrogenases mitocondrials i per tant, l'assaig determina l'activitat enzimàtica mitocondrial. Les sals de formazan que es formen són solubles i donen un color púrpura que és quantificable a l'espectrofotòmetre. La quantitat de cèl·lules metabòlicament actives és directament proporcional a l'absorbància obtinguda.

Per aquest tipus d'assaig es treballa en plaques de 96 pous (M96), on en cada pou es sembren 5.000 cèl·lules i es deixen créixer durant 24 hores a 37°C. Passat aquest temps les cèl·lules es tracten segons correspongui. Per acabar, s'aspira el medi amb cura, evitant aspirar les cèl·lules, i s'afegeix el reactiu Wst-1 diluït 1:15 en medi complet i es deixa incubar a 37°C. Es realitzaran lectures a 30 min, 1 hora, 2 hores i 3 hores en el lector de plaques multipous Biotek utilitzant el filtre de 450 nm i el de 655 nm com a filtre de referència. Cada condició es fa per triplicat i l'experiment es repeteix almenys tres vegades per fer un anàlisi estadístic.

## 1.7 Producció de lentivirus i infecció.

### 1.7.1 Transfecció amb polietilenamina (PEI).

La majoria de les membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, sent molt difícil que les molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin travessar-les. Els lípids catiónics, com la polietilenamina (PEI), condensen el DNA plasmídic, neutralitzant així les càrregues negatives i protegint-lo de l'acció de les DNAses. Els agregats resultants tenen alta afinitat per les cèl·lules, donant lloc a una alta efectivitat de transfecció (Florea et al., 2002).

### 1.7.2 Producció de lentivirus en la línia cel·lular HEK 293T.

Degut a la gran quantitat de partícules lentivirals necessàries per a infectar els cultius, és necessari partir d'almenys 3 plaques p100 de cèl·lules a una concentració aproximada de  $3,5 \times 10^5$  cèl·lules per placa. La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics, ja que el PEI permeabilitza les cèl·lules i aquests podrien resultar tòxics. Per aquest motiu, l'endemà de ser sembrades les cèl·lules, es canvia el medi per medi DMEM sense

antibiòtic ni sèrum, i es mantenen en repòs a l'incubador mentre es prepara la barreja de transfecció.

Es transfecta un total de 40 µg de DNA per placa p100, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 3:2:1. És a dir, 20 µg del plasmidi lentiviral d'interès (que incorpora la seqüència per a l'expressió dels shRNA), 13 µg del plasmidi empaquetador psPAX2 i 7 µg del plasmidi pMD2G, que codifica per la coberta vírica. Es necessiten 50 µl de PEI per placa i tant el DNA com el PEI es resuspendran en 1 ml de NaCl 150 mM estèril. S'afegeix la solució de PEI sobre la de DNA, es vorteja 1 minut i es deixa reposar 20 minuts. A continuació s'afegeix la barreja gota a gota a la placa de HEK 293T i es deixa a l'incubador durant 3 hores. Passat aquest temps, s'aspira el medi sense sèrum ni antibiòtic que conté el PEI i el DNA a la campana de seguretat Bio2A i s'afegeix medi complet de HEK 293T. A partir de les 24 hores el medi ja conté nombrosos virus.

Normalment es recull el medi amb les partícules víriques al cap de 3 dies després de la transfecció. Tot el procés es duu a terme a la campana de seguretat Bio2A. El medi recollit que conté els virus es centrifuga 5 minuts a 2.000 rpm i després es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0,45 µm, per tal d'eliminar qualsevol cèl·lula que pugui quedar en el medi.

Si l'eficàcia de producció de virus és bona, aquest medi es pot utilitzar directament per infectar les cèl·lules de glioma, com és el nostre cas. Els virus es guardaran a -80°C.

### 1.7.3 Transducció de línies cel·lulars mitjançant lentivirus

Un cop obtinguda la concentració de cèl·lules desitjada en la placa de cultiu, s'afegeix al pou que volem infectar el medi amb partícules lentivirals (habitualment diluïdes 1:4 en medi normal) més Polybrene (*Hexadimethrine Bromide*, un polímer catiònic que augmenta l'eficiència de la infecció) (Sigma-Aldrich) a una concentració final de 1,75 µg/ml en la campana Bio2A. Les línies cel·lulars es deixen en contacte amb els virus durant 24 hores i posteriorment reemplacem per medi amb puromicina (2 µg/mL). Les cèl·lules seleccionades començaran a expressar els shRNA en uns 4 dies, temps en que es podrà començar a fer els tractaments corresponent o a processar les mostres per analitzar-les.

### 1.7.4 Transfeccions amb Lipofectamina

En aquelles cèl·lules on la transfecció resulta especialment difícil, s'utilitza la Lipofectamina (LFT; Invitrogen) per augmentar l'eficiència de transfecció. La LFT és una mescla de liposomes amb càrrega positiva i capacitat d'unir-se al DNA que aconsegueix superar la repulsió electroestàtica provocada per la càrrega negativa de les membranes plasmàtiques. En el present treball s'utilitza

la LFT2000 per transfectar el plasmidi pEGFPC1+mRFP cedit pel Dr T. Yoshimori (Universitat d'Osaka, Osaka, Japó).

Les cèl·lules són sembrades en pous de M24, a una confluència del 70% aproximadament, un dia abans de la transfecció. L'endemà es canvia el medi complet per medi Optimem (200 µl/pou; Invitrogen) i s'afegeix la barreja de transfecció que consisteix en: la mescla de DNA (1 µg DNA/ 50 µl Optimem) i la mescla de LFT 1,5 µl (LFT2000/ 50 µl Optimem). Les dues barreges s'incuben per separat durant 5 minuts i a continuació, s'afegeix el DNA sobre la mescla de LFT i s'incuba durant 15-20 minuts a temperatura ambient, per a que es formin els complexos d'àcids nucleics amb la LFT. Finalment, els 50 µl de la barreja resultant s'afegeixen gota a gota sobre les cèl·lules que es troben en medi Optimem. A les 3 hores de la transfecció, s'aspira el medi per eliminar els complexos i s'afegeix medi complet.

## 2. TÈCNIQUES DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR.

### 2.1 Construccions plasmídiques per el silenciament gènic.

En enginyeria genètica, es considera un vector a una molècula de DNA que pugui utilitzar-se per introduir una seqüència de DNA en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plasmidi. Els plasmidis són petites molècules de DNA circular extracromosòmic que es troben en molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i es poden trobar múltiples còpies del plasmidi en una mateixa cèl·lula.

Els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per a la seva pròpia estructura, però que no tenen tota la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. Per tal de replicar-se envaeixen una cèl·lula i utilitzen la maquinària d'aquesta per a expressar el seu genoma viral. En enginyeria genètica s'utilitzen els virus com a vectors, ja que permeten introduir un plasmidi a l'interior de la cèl·lula gràcies al mecanisme infecció del virus. S'utilitzen virus defectius, és a dir, que no són capaços de replicar-se i produir nous virus, ja que s'ha substituït el genoma viral pel plasmidi d'interès.

#### 2.1.1 Construccions de shRNA.

La interferència de RNA mitjançant shRNAi (*short RNA interference*) indueix la degradació d'un RNA missatger concret, mitjançant la utilització de siRNA (*small interferin RNA*). Els siRNAs són fragments de RNA d'entre 22 i 25 nucleòtids, derivats de la fragmentació del RNA lineal de doble cadena que s'uneix a les seqüències de RNA homòlogues induint la seva degradació (Nelson, 2003).

La tècnica d'interferència del RNA s'utilitza àmpliament per a silenciar l'expressió gènica d'una seqüència específica.

### 2.1.2 Cultiu bacterià en medi LB.

Per a la producció de DNA plasmídic recombinant es van utilitzar cultius d'*E.coli*. Tots els plasmidis amplificats van ser d'alt nombre de còpies.

Es va inocular un volum de 6 ml de LB (Luria-Bertani) 1x amb ampil·lina (1:1.000; concentració final) (*miniprep*) amb un raspall de superfície de *glicerol-stock*. Els bacteris es van deixar créixer a 37°C en tubs de polipropilè no tancats hermèticament per tal de permetre l'intercanvi de gasos en una agitació de 120 - 140 rpm entre 6 i 8 hores. La *miniprep* va ser directament transferida a un volum de 300 ml de LB 1x amb ampil·lina (1:1.000) (*maxiprep*) i cultivat en agitació durant 18 hores.

### 2.1.3 Congelació (glicerol-stock).

Per tal de mantenir les *E.coli* que expressen les diferents construccions d'interès, es va mesclar 500 µl del cultiu de la *maxiprep* amb 500 µl solució de glicerol 50% estèril (v/v). Els stocks van ser criopreservats a -80°C. Per recuperar les construccions es va raspar la superfície del glicerol-stock amb una punta de 20 a 200 µl estèril sense arribar a descongelar-ho i es deixà créixer en *minipreps*.

### 2.1.4 Purificació de plàsmids.

Els plasmidis van ser purificats a partir dels cultius bacterians pel mètode de la lisi alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Vàrem utilitzar el kit de purificació de DNA de Macherey-Nagel seguint les instruccions del fabricant i utilitzant les solucions incloses en ell. El DNA obtingut va ser quantificat al Nanodrop (ND-1.000 UV/Vis Spectofotometer, de Nanodrop Technologies) i es va preservar a -20°C.

## 2.2 Amplificació en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa.

### 2.2.1 Extracció del mRNA.

Per a l'extracció de RNA dels cultius cel·lulars s'utilitza el E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Biotek) conjuntament amb la digestió amb DNasa I, que ens permet eliminar el DNA genòmic contaminant que pugui quedar en la mostra i que ens podria portar a amplificacions des del DNA genòmic. Un cop extret el RNA es quantifica al Nanodrop (ND-1.000 UV/Vis Spectofotometer, de Nanodrop Technologies). Els lisats de RNA es guarden a -80°C.

### 2.2.2 Síntesi de cDNA.

El cDNA s'obté del RNA a partir de la reacció de transcripció reversa (RT), que es realitza segons el protocol de l'enzim retro-transcriptasa de Taqman (Applied Biosystems) a partir d'1 µg de RNA. La reacció conté MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, hexàmers, inhibidors de RNases i la retrotranscriptasa en les proporcions indicades pel distribuïdor. Primer es posen les mostres de RNA (1 µg) 2 minuts a 90°C per aconseguir desnaturalitzar l'estructura secundària del mRNA. Tot seguit s'hi afegeix la barreja de reacció i s'inicia el programa de la transcripció reversa: 10 minuts a 25°C (anellament dels primers al motlle), 60 minuts a 42°C (extensió dels primers hibridats) i 5 minuts a 95°C (inactivació de la retrotranscriptasa). Quan acaba la reacció, el cDNA obtingut es pot guardar a -20°C o es procedeix a realitzar la PCR en temps real (RT-qPCR).

### 2.2.3 RT-qPCR.

Per determinar els nivells d'expressió gènica es va realitzar una PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR) a partir de 100 ng de cDNA. La tècnica de la PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar, tant les sondes (20x) com la "mix" (2x) són d'Applied Biosystems. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom (FAM) que el termociclador CFX96™ de Bio-Rad llegeix i quantifica. El programa que utilitzem és el següent: 2 minuts a 50°C i 10 minuts a 95°C per a activar la reacció, seguit de 40 cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Els resultats s'obtenen en forma de Ct (*Cycle Threshold*), que és el cicle de PCR on comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA del gen hi hagi en la mostra de partida, més baix serà el Ct.

La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen GAPDH}$$

I respecte la mostra control:

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra control} - \Delta Ct \text{ mostra}$$

A partir d'aquests càlculs la concentració relativa del mRNA respecte al control és  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ . De cada mostra se'n fan tres rèpliques, de les quals es calcula la mitjana i errors estàndard. Els gens analitzats i la referència de cada sonda es troben a la Taula 4.



## 2.3 Immunodetecció de proteïnes.

### 2.3.1 Western blot.

Amb la finalitat d'estudiar els nivells d'expressió de les diferents proteïnes en diverses condicions, es va usar la tècnica del Western blot. Aquesta tècnica consisteix en la separació de proteïnes en gels d'acrilamida depenent del seu pes molecular, la posterior transferència a membranes de PVDF (Immunobilon P; Millipore) i finalment la seva detecció amb anticossos específics contra les formes de les proteïnes d'interès.

En el nostre cas es treballa amb lisats cel·lulars tant de línies com de casos primaris.

#### 2.3.1.1 Extracció de proteïna total.

En el cas de lisats cel·lulars, després del pertinent tractament, les cèl·lules van ser rentades dues vegades amb PBS i a continuació es va procedir a la extracció proteica pertinent. L'extracció proteica s'ha de fer el més ràpid i eficient possible, per evitar degradacions i per a que l'extracte representi fidelment l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. D'aquesta manera s'obté una barreja desnaturalitzada dels components cel·lulars. És un mètode d'extracció eficient perquè trenca les interaccions entre les proteïnes i permet l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més a més, el detergent desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims, incloses les proteases que podrien danyar l'extracte. El tampó de lisi per cultius cel·lulars conté Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM i 2% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).

#### 2.3.1.2 Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry.

Les mostres han d'estar igualment carregades abans de migrar en gels SDS-PAGE per a una correcta interpretació dels resultats. Per quantificar els lisats cel·lulars s'utilitza el mètode de Lowry (Lowry et al., 1951) utilitzant els reactius de Biorad i una placa de 96 pous (M96). Primerament, es realitza una recta patró amb diferents quantitats d'albúmina (0, 1, 2, 5, 10 i 15 µg) per poder extrapolar l'absorbància a les mostres d'interès, i a continuació s'afegeix 2 µl de les mostres d'interès per duplicat. Tot seguit, s'afegeix 25 µl a cada pou de la barreja de reactius A i S (en proporció 50:1) i 200 µl per pou del substrat fluorogènic (reactiu B). Es deixa produir la reacció durant 10 minuts en un lloc fosc i finalment es llegeix a una absorbància de 655 nm.

#### 2.3.1.3 Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Els gels desnaturalitzants de poliactilamida en presència de SDS s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (Amresco), que és una solució al 40% acrilamida amb un 1% de bisacrilamida. La reacció de

polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) com a iniciador de la reacció i el persulfat d'amoni al 0,05% com a catalitzador. S'utilitzen gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior (o gel concentrador) on es carreguen les mostres, formem un gel d'un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara en tampó Tris-HCl 0,5 mM a pH 6,8, i serveix per a que totes les proteïnes del pouet entrin al mateix temps al gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCl 1,5 mM a pH 8,8, el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Per a proteïnes de baix pes molecular s'utilitzen gels amb un percentatge superior d'acrilamida que l'utilitzat per a separar proteïnes d'alt pes molecular. Primer es polimeritza el gel separador en la part inferior, i quan aquest està completament polimeritzat, construïm el concentrador a la part superior on afegirem una pinta per tal de formar els pouets per a la càrrega.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 375 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 25%  $\beta$ -mercaptoetanol i Blau de bromofenol) i es carreguen al gel. En un dels pous es carrega un marcador de pes molecular pretenyit (Fisher Scientific) per a usar-lo com a referència i interpretar quina és cadascuna de les bandes. L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 18 mA, tot i que quan les mostres entren al gel separador es pot pujar a 22 mA, en tampó de migració (glicina 110mM, Tris 24mM, SDS 0,1%) en el sistema Hoeffer SE260 (Amersham Biosciences).

#### 2.3.1.4 Transferència de proteïnes.

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec. Primer de tot, i mentre el gel encara està corrent, cal hidratar la membrana de PVDF (Immobilon P) en metanol 100% durant uns dos minuts i després cal submergir-la en tampó de transferència (48mM Tris, 0,0375% SDS, 39mM glicina i 20% metanol), en el qual també s'ha de submergir el paper de transferència, per tal d'equilibrar-los.

Un cop el gel acabi de córrer, també cal submergir-lo en tampó de transferència durant un parell de minuts. Una vegada equilibrats es pot començar la transferència, per fer-ho: es col·loquen 2 papers de transferència sobre l'ànode, per damunt es posa la membrana de PVDF, i per sobre d'aquest es col·loca el gel de poli(acrilamida), i dos papers de transferència més. Ens assegurem que no es formin bombolles entre el gel i la membrana i finalment posem la tapa (càtode). La transferència s'inicia a un amperatge constant de 0,8 mA per  $\text{cm}^2$  de membrana. La transferència dura 1h. El sistema utilitzat és Hoeffer TE70XP (Amersham Biosciences).

### 2.3.1.5 Immunodetecció de proteïnes.

Un cop finalitzada la transferència proteica, la membrana es posa en solució Ponceau que és capaç de tenyir les proteïnes d'una forma reversible i ens permetrà fer-nos una idea de la càrrega proteica. Per tal d'eliminar la tinció Ponceau, es renta la membrana amb TBS-T (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween20) i tot seguit, per tal d'ajudar a fixar les proteïnes, es passa la membrana per metanol uns 10 segons abans de deixar-la assecar durant 15 minuts sobre un paper a temperatura ambient. Passats els 15 minuts, la membrana assecada es posa directament en solució de bloqueig (TBS-T al 5% de llet desnatada en pols o *bovine serum albumine* - BSA) durant 1 hora a temperatura ambient, per rehidratar-la i bloquejar-la.

Després del bloqueig es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T i s'incuba amb la dilució corresponent de l'anticòs primari en TBS-T (Taula 4), juntament amb 0,02% d'Azida sòdica per evitar contaminació bacteriana i així poder-lo reutilitzar. La incubació s'acostuma a deixar durant tota la nit a 4°C, tot i que en casos d'anticòssos primaris molt potents pot ser suficient amb una incubació d'una hora a temperatura ambient ( $\beta$ -actina).

Després de la incubació, la solució de l'anticòs es recupera i es guarda a 4°C amb azida sòdica al 0,02% per a poder-se reutilitzar. Amb la membrana es fan 3 rentats de 10 min en TBS-T, i després s'incuba 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (Taula 5), que es dilueix en solució de bloqueig. Passat aquest temps, la membrana es renta 3 vegades amb TBS-T (10 minuts per cada rentat).

L'anticòs secundari és el que permet fer la detecció perquè està conjugat a peroxidasa, i per a detectar-la s'utilitzen uns reactius comercials que oxiden el luminol (de manera anàloga a com ho faria amb l'aigua oxigenada), donant una senyal luminiscent. Hi ha bàsicament dos tipus d'aquests reactius que s'utilitzen segons si es preveu tenir molta o poca senyal luminiscent, EZ-ECL (Biological Industries) i SuperSignal West Dura (Millipore), respectivament. Després s'exposa el senyal luminiscent sobre films (Fujifilm) tot utilitzant una solució reveladora i una fixadora i l'aparell Optimax de Protec.

### 2.3.2 Immunocitoquímica.

La immunocitoquímica (ICQ) és una tècnica basada en la utilització d'anticòssos específics conjugats amb fluorocroms permetent identificar la localització cel·lular de les proteïnes d'interès.

Les cèl·lules es creixen sobre cobreobjectes de vidre col·locats en plaques de M24. Aquests cobreobjectes, després de ser esterilitzats amb etanol, se'ls fa un recobriment amb poli-D-lisina

a 15 µg/mL durant 1 hora a temperatura ambient per permetre a les cèl·lules adherir-se correctament als vidres. Passat aquest temps realitzarem 3 rentats amb aigua i deixarem assecar els cobreobjectes.

Es planten 20.000 cèl·lules per cobreobjecte i un cop adherides es fa el tractament corresponent. Un cop acabat el tractament, es fixen les cèl·lules amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 15 minuts a temperatura ambient, per tal de preservar intacta la estructura de la cèl·lula i mantenir la localització de les proteïnes. A continuació es fan tres rentats amb PBS, aspirant suaument.

Abans de la incubació amb l'anticòs primari, cal bloquejar durant 1 hora en solució de bloqueig (PBS amb 5% de sèrum de cavall, 5% de sèrum fetal boví, 0,2% de glicina, 0,1% de tritó X-100). Durant el procés de bloqueig, per una banda el Tritó permet la permeabilització de les membranes, fet que permetrà l'accés dels anticossos als seus antígens específics, i per l'altra part, gràcies a l'acció del sèrum i la glicina es fa el bloqueig dels llocs d'unió inespecífics.

L'anticòs primari (Taula 4) s'incuba durant 16 hores a 4°C i després es fan tres rentats amb PBS. La incubació durant 1 hora amb l'anticòs secundari (Taula 5) junt amb Hoechst33258 (0,5 µg/mL) per marcar els nuclis es farà a les fosques ja que l'anticòs secundari està marcat amb fluorescència. Finalment, es fan tres rentats de 10 minuts en PBS i per tal de mantenir la ICQ durant més temps es munta el cobreobjectes sobre el portaobjectes amb Mowiol (Mowiol 4-88, glicerol 50%, 0,2M Tris-HCl pH 8,5), que es deixen assecar i són guardats a 4°C a la foscor. La seva observació i presa de fotos es farà al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus IX70 (10x, 0,3 NA i 20x, 0,4 NA) equipat amb fluorescència i càmera (Olympus OM-4 Ti). Les imatges es prenen utilitzant el programa DPM manager.

### 2.3.3 Immunohistoquímica

Els òrgans i tumors dels ratolins s'extreuen de l'animal i immediatament es fixen amb formol durant 24 hores a 4°C. Posteriorment, els teixits s'inclouen en parafina i es fan seccions de 5 µm amb un micròtom per tal de fer tincions d'Hematoxilina-Eosina (H-E) a fi d'estudiar la histologia de cada teixit o tincions d'antígens específics per l'anàlisi de marcadors proteics.

Abans de començar el procés, els talls de 5 µm de parafina es posen a assecar a una estufa de 65°C durant 1 hora, després es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es submergeixen els portaobjectes en un tampó que conté 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durant 20 minuts, utilitzant un aparell de pretractament PTLINK (DAKO), per tal de recuperar els antígens emmascarats durant la preparació dels teixits per a la tinció (*epitope retrieval*). Abans de la tinció, els talls de parafina s'incuben amb 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per bloquejar la

peroxidasa endògena i disminuir el fons quan utilitzem el cromogen. Després es fan tres rentats amb PBS i ja es pot aplicar l'anticòs primari (Taula 4) durant 20-30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment a la incubació es fan tres rentats amb PBS i s'aplica l'anticòs secundari. Si s'utilitza directament l'anticòs secundari unit a la peroxidasa (HRP) s'incuba durant 30 minuts, en canvi si s'utilitza un sistema d'amplificació del senyal, s'incuba primer l'anticòs unit a biotina durant 30 minuts, després es fan tres rentats amb PBS i s'incuba el teixit amb Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durant 15 minuts, tot a temperatura ambient. Finalment per tal de visualitzar la reacció s'aplica el cromogen de diaminobenzidina (DAB) i es contratenyeix amb Hematoxilina per marcar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

## 2.4 Assaig de $\text{Ca}^{2+}$ amb Fluo-8 AM.

Les mesures de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular es van realitzar amb el Kit Abcam Fluo-8-No Wash (ab112129) que detecta la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular per fluorescència. Es van sembrar 8.000 cèl·lules per pouet de M96 prèviament recoberts amb poli-D-lisina a una concentració de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per a que les cèl·lules s'enganxin millor. Les M96 utilitzades tenen les parets fosques, són plaques optimitzades per a assajos de fluorescència per minimitzar l'autofluorescència i la fluorescència dels pouets circumdants.

Al dia següent, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS 1x abans d'afegir 50  $\mu\text{l}$  per pou de la solució amb Fluo-8.

Per a la preparació del Fluo-8 s'utilitza la solució fisiològica HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*), la composició de la qual és 156mM de NaCl, 3mM de KCl, 2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 1,25 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM de glucosa i 10 mM d'HEPES en aigua i a una pH de 7,35. És important remarcar que aquesta solució no conté FBS, ni antibiòtic, ni *phenol red*.

En la solució de Fluo-8 s'utilitza HBSS 1x tamponat amb HEPES i 2,5 mM de probenecib. El probenecib és un inhibidor de transportadors aniònics que es troben a les cèl·lules i els quals poden expulsar el Fluo-8. D'aquesta manera mantenim el Fluo-8 dins de les cèl·lules, la qual cosa redueix la fluorescència de fons i ens assegurem que el Fluo-8 que mesurarem està, en la seva majoria, dins de les cèl·lules. També s'afegeix àcid plurònic a una concentració final de 0,04%, que és un agent surfactant no iònic que ajuda a millorar la solubilitat en aigua del Fluo-8. A aquesta solució s'afegirà el Fluo-8 a una concentració final de 2  $\mu\text{M}$ .

Després del rentat amb PBS 1x s'afegirà aquesta solució deixant dos pouets sense Fluo-8 per tenir-los com a control d'autofluorescència cel·lular basal. Acte seguit, es deixa incubar durant 30 minuts a 37°C per a que s'internalitzi el Fluo-8 dins de les cèl·lules. Passat aquest temps es manté la placa a temperatura ambient durant 30 minuts. Això provoca que les esterases de la

cèl·lules degradin el grup AM (èster acetoximetil) del Fluo-8 que ha permès la càrrega del fluorocrom dins de la cèl·lula. La seva degradació permetrà que el Fluo-8 es quedi segrestat dins de la cèl·lula i no pugui sortir. Durant tots aquests processos d'incubació és important mantenint sempre la placa en la foscor ja tant el Fluo-8 com el probenecid són sensibles a la llum.

Passat el temps de les incubacions, es realitzarà un rentat amb la solució HBSS amb probenecid al 2,5 mM. Seguidament s'afegirà 150 µl de HBSS amb probenecid (2,5mM) i àcid plurònic per fer la lectura basal. Un cop realitzada, es faran els tractaments corresponents en un volum de 50 µl que s'afegiran als 150 µl que ja teníem en el pou. Finalment es faran les lectures en el temps indicat. El fluorímetre utilitzat per fer les mesures és el TECAN, Indinit M200 i llegim a una longitud d'ona de 525 nm.

## 2.5 Assaig de $\beta$ -galactosidasa.

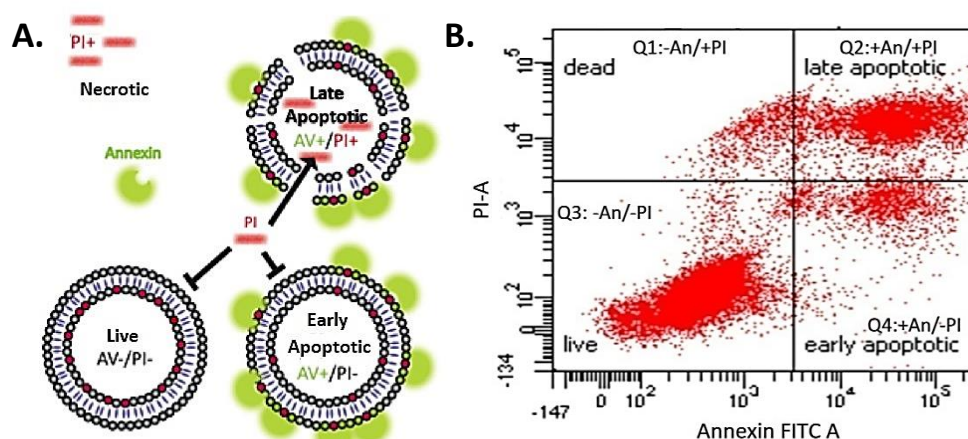
Per tal d'analitzar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència cel·lular vam utilitzar cèl·lules en cultiu fixades amb un buffer de PBS amb 0,5% de glutaraldehyd. Un cop fixades, les cèl·lules s'incuben amb buffer de PBS amb 2 mM de  $MgCl_2$  durant 10 minuts i posteriorment s'incuben amb la solució X-gal, composta per 20 mg/ml X-gal (Sigma-Aldrich), 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , i 2 mM  $MgCl_2$  en un buffer de PBS a pH6.

La incubació es duu a terme almenys 2 hores dins d'una estufa a 37°C i es va comprovant la tinció, ja que les cèl·lules adopten un color verd turquesa molt característic de la tinció senescent. És molt important realitzar aquesta tinció a pH6 o inclús a pH5, ja que l'activitat  $\beta$ -galactosidasa dels lisosomes només és activa a pH àcid. Un cop les cèl·lules adquireixen el color verd turquesa, es farà un rentat amb PBS pH7 per tal de parar la reacció. Finalment es marcaran els nuclis de les cèl·lules amb Hoechst33258 (0,5 µg/mL) per tal de poder fer el posterior recompte de cèl·lules  $\beta$ -galactosidasa positives. Per tal de poder comparar les mostres analitzades, l'assaig es duu a terme amb totes les condicions simultàniament.

## 2.6 Assaig d'AnnexinaV.

La tinció amb annexina es basa en el marcatge de la fosfatidilserina (PS) que es troba externalitzada en les cèl·lules apoptòtiques. D'aquesta manera, la combinació d'annexina V-FITC i iodur de propidi (PI) permet diferenciar entre cèl·lules apoptòtiques en estadis primerencs d'aquesta (només annexina V positives) i cèl·lules apoptòtiques tardanes o necròtiques (annexina-V i PI positives). Finalment, les cèl·lules necròtiques només tindran marcatge per PI per la dissipació de la seva membrana plasmàtica (Fig.32).

Es sembren les cèl·lules per tal d'aconseguir passar un mínim de 10.000 esdeveniments pel citòmetre. Passat el temps indicat en cada condició d'estudi, es recupera el sobrenedant de cada una per tal de recollir les cèl·lules flotants i es tripsinitza cada condició. El total de cèl·lules en flotació i les tripsinitzades es centrifuguen (5 minuts a 1.000 rpm) i es renten dos cops amb PBS. A continuació, el pellet es resuspèn en 50 µl de Binding Buffer 1X (BD Falcon), 0,8 µL d'AnnexinaV FITC/APC (Immunotools) i 1 µL de PI (0,02 mg/ml; Sigma-Aldrich). Passats els 15 minuts de la tinció a temperatura ambient i en la foscor, s'afegeix 200 µl de Binding Buffer 1X. Les cèl·lules van ser analitzades al citòmetre FACS Canto utilitzant el software Win MDI 2.9.



**Figura 32: Tinció d'annexina V i PI.** A) Il·lustració de com l'annexina s'uneix a la PS externalitzada en les cèl·lules apoptòtiques i com entra el PI quan es perd la integritat de membrana per marcar els àcids nucleics. B) Exemple de gràfic obtingut d'un assaig d'annexina.

### 3. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

#### 3.1 Consideracions prèvies.

Els mètodes experimentals utilitzats amb animals de laboratori que es detallen a continuació, s'han desenvolupat seguint les recomanacions recollides per les disposicions legals següents:

**Llei 5/1995**, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

**Decret 214/1997**, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.

**Reial Decret 1201/2005**, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

Tots els procediments utilitzats es van realitzar sota la supervisió del personal pertinent de la institució de l'IRBLleida, respectant totes les disposicions legals i ètiques vigents per a la

manipulació d'animals d'experimentació. A més a més, el present treball ha estat degudament aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

## 3.2 Animals i tumors subcutanis

### 3.2.1 Ratolins SCID

Els ratolins SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de donar una resposta immune adequada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri provocant que aquests ratolins no puguin combatre infeccions, ni rebutjar tumors o transplantaments. Aquests ratolins s'utilitzen com a model animal per l'estudi de tumors subcutanis o *xenografts* formats a partir de cèl·lules humanes.

### 3.2.2 Tumors subcutanis en ratolins SCID

Per l'estudi de la proliferació dels tumors subcutanis o *xenografts in vivo* es van utilitzar ratolins SCID d'aproximadament 8-12 setmanes d'edat i un pes comprès entre els 20-25 grams. El menjar i l'aigua estaven disponibles *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12. Es van injectar subcutàniament  $3 \times 10^6$  cèl·lules de la línia cel·lular U87-MG control (shRNA *scrambled*) o amb el gen CACNA1G codificant per  $Ca_v3.1$  silenciats (shRNA CACNA1G). El creixement tumoral es va mesurar cada dos dies mitjançant un peu de rei digital. Al cap de 13 dies des de la injecció subcutània els animals es van sacrificar per dislocació cervical. El volum tumoral es va calcular d'acord amb la fórmula TV (*Tumor Volume*):  $(d^2 \times D)/2$ , on la lletra *d* equival al diàmetre més curt i la lletra *D* al més llarg.

Els tumors dels ratolins s'extreuen de l'animal i immediatament es fixen amb formol al 24 hores a 4°C. A continuació es van processar per a l'anàlisi immunohistoquímic (apartat 2.3.3.).

## 4. ALTRES TÈCNIQUES.

### 4.1 Càlcul de corbes SSI, SSA i disponibilitat de canals.

Es van obtenir els voltatges mitjos i pendent de la corba d'activació i d'inactivació disponibles de dades bibliogràfiques. Amb aquestes es van construir les corbes d'estat estacionari d'activació (SSA) i d'inactivació (SSI) a partir de la funció de Boltzmann:

$$\text{Activació} = I_{\text{màx}} / \left[ 1 + \frac{\exp(V_{50} - V)}{K} \right] \quad \text{Inactivació} = I_{\text{màx}} / \left[ 1 + \frac{\exp(V - V_{50})}{K} \right]$$

On la *I* és l'amplitud de la corrent,  $I_{\text{màx}}$  és la màxima amplitud de corrent (pot ser substituïda per  $G_{\text{màx}}$  o la conductància màxima), *V* és el potencial de membrana,  $V_{50}$  és el potencial mitjà



d'activació/inactivació (en el qual la meitat dels canals estan oberts/inactivats) i K és el factor de pendent.

La disponibilitat de canals (canals oberts) es va obtenir a partir del producte de les corbes SSI i SSA.

## 4.2 Tècniques bioinformàtiques: Anàlisi d'imatges

Image J és un programa de processament d'imatge digital de domini públic programat en Java. Aquesta aplicació permet visualitzar i manejar imatges obtingudes a partir de qualsevol microscopi. És molt útil ja que permet editar o donar color a qualsevol imatge, quantificar intensitats, comptar punts, seleccionar regions d'interès, desenvolupar anàlisis de colocalització, entre d'altres moltes funcions.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Image J (National Institutes of Health) Software gratuït utilitzat per l'anàlisi d'imatges (àrea i intensitat) d'immunotincions i densitometria de Western blot.

## 4.3 Avaluació estadística de les dades

Les dades han estat presentades com a mitjanes  $\pm$  error standart (SEM), amb el nombre d'experiments (n) indicat entre parèntesi, essent 3 el mínim d'experiments independents realitzat per a cada assaig. La significació estadística (p-valor) ha estat calculada mitjançant el test T Student. Els asteriscos (\*, \*\* i \*\*\*) indiquen els distints graus de significació estadística ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  i  $p \leq 0.001$ , respectivament).

## 5. MATERIALS UTILITZATS EN AQUEST TREBALL.

### 5.1 Tractaments i drogues utilitzades en aquest treball.

Droga	Proveïdor	Nº Catàleg	Concentració stock	Diluent
<b>2-APB</b>	Santa Cruz	Sc-201487	100 mM	Etanol
<b>Bapta-AM</b>	BioVision	2242	10 mM	DMSO
<b>Inhibidor II caspasa 8</b>	Calbiochem	218759	10 mM	DMSO
<b>KN-62</b>	APExBIO	A8180	10 mM	DMSO
<b>NNC 55-0396</b>	Santa Cruz Alomone	Sc-203647 N-206	20 mM	H <sub>2</sub> O
<b>Plasmocin</b>	Invivogen	ant-mpt-1	25 mg/ml	RTU
<b>Pluronic® F-127</b>	ThermoFisher	P6866	10%	RTU
<b>Probenecid</b>	AAT Bioquest	20060		Solució de NaOH 1M
<b>Puromicina</b>	Sigma-Aldrich	P7255	1 mg/ml	H <sub>2</sub> O
<b>Tapsigargina</b>	Sigma-Aldrich	T9033	2,5 mM	DMSO
<b>Xestospongina C</b>	CaymanChemical Company	64950	2 mM	DMSO

Taula 2: Drogues i tractaments utilitzats en aquest treball. RTU: Ready Tu Use.

## 5.2 Llistat de construccions shRNA.

Vector	Gen	Proveïdor	Codi
<b>PkLopuro</b>	Scrambled	Sigma-Aldrich, Mission shRNA.	TRCN0000000001
<b>PkLopuro</b>	CACNA1G (Ca <sub>v</sub> 3.1)	Sigma-Aldrich, Mission shRNA.	TRCN0000044239
<b>PkLopuro</b>	CACNA1H (Ca <sub>v</sub> 3.2)	Sigma-Aldrich, Mission shRNA.	TRCN0000044209
<b>PkLopuro</b>	Ire1α	Sigma-Aldrich, Mission shRNA	TRCN000000529
<b>PkLopuro</b>	JNK1	Sigma-Aldrich, Mission shRNA	TRCN0000001055

*Taula 3: shRNAs utilitzats en el present estudi. Taula on es mostra els shRNA utilitzats i el plasmidi on es troben.*

## 5.3 Llistat de sondes utilitzades per RT-qPCR.

Gen	Espècie	Proveïdor	Codi
<b>CACNA1G (Ca<sub>v</sub>3.1)</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs00367969_m1
<b>CACNA1H (Ca<sub>v</sub>3.2)</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs00234934_m1
<b>CD133/PROM1</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs01009259_m1
<b>p16/CDKN2A</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs00923894_m1
<b>P27/ CDKN1B</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs00153277_m1
<b>SQSTM1/p62</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs00177654_m1
<b>GAPDH</b>	Humà	Applied Biosystems	Hs99999905_m1

*Taula 4: Sondes utilitzades per l'anàlisi en la RT-qPCR.*

## 5.4 Llistat d'anticossos primaris.

Anticòs	Proveïdor	Nº Catàleg	Aplicació	Dilució
pThr286-CamKII	Abcam	Ab32678	WB	1:1.000
Ciclina D1	DAKO	IR083	IHQ	RTU
pSer133-Creb	Neuromics	RA18008	ICQ WB	1:200 1:1.000
CHOP/Gadd153	Santa Cruz	sc-7351	ICQ	1:100
Ero1 $\alpha$	Cell Signaling	3264S	WB	1:1000
IRE1 $\alpha$	Cell Signaling	14C10	WB	1:1.000
pSer724 IRE1 $\alpha$	NovusBiologicals	NB100-2323SS	WB	1:1.000
pThr183/Tyr185-JNK	Cell Signaling	9251	WB	1:1.000
PSer73-c-Jun	Cell Signaling	D47G9	WB	1:1.000
JNK1	Santa Cruz	sc-1648	WB	1:800
JNK	Cell Signaling	9252	WB	1:1.000
Ki67	Santa Cruz	sc-15402	ICQ	1:1.000
	DAKO	IR626	ICH	RTU
LC3	NovusBiologicals	NB100-2331	WB	1:3.000
p27 Kip1	Genetex	GTX100446	WB	1:1.000
p62	NovusBiologicals	NBP1-48320	WB/IHQ	1:3.000
Skp2	Abcam	ab68455	WB	1:1.000
$\beta$ -actina	Sigma-Aldrich	A5441	WB	1:10.000

**Taula 5: Anticossos primaris utilitzats en aquest treball.** S'indica la casa comercial, nº catàleg, aplicació i dilució. ICQ: Immunocitoquímica, WB: Western blot, ICH: Immunocitoquímica, RTU: Ready to Use.

Anticòs	Proveïdor	Nº Catàleg	Aplicació	Dilució
Ratolí - IgG HRP	Sigma Aldrich	A9044	WB	1:10.000
Conill- IgG HRP	Sigma Aldrich	A0545	WB	1:10.000
Mouse IgG AlexaFluor 594	Molecular Probes	A11005	ICQ	1:600
Mouse IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11029	ICQ	1:600

**Taula 6: Anticossos secundaris utilitzats en aquest treball.** S'indica la casa comercial, nº catàleg, aplicació i dilució. ICQ: Immunocitoquímica, WB: Western blot.



**RESULTATS**





## **Capítol 1:**

Concepte de corrents finestra i efectes “*off-target*”  
dels bloquejants de TTCCs.





## 1.1 Funció dels TTCCs en membranes no excitable: Concepte de corrents finestra.

Els TTCCs es defineixen com uns canals activats per voltatge, entenen com a voltatge, les depolaritzacions de membrana que permeten la seva obertura o **activació**. Aquests canals porten incorporat un mecanisme d'autolimitació que provoca el seu tancament uns milisegons després d'obrir-se, malgrat que la membrana continuï despolaritzada. Aquest "tancament" implica una regió del canal diferent de la seva obertura o activació, i permet l'adopció d'un estat refractari no conductor que s'anomena **inactivat**. L'estat inactivat és molt estable, i l'única sortida és a través de la repolarització de la membrana que retorna els canals a un estat de "repòs" o **desactivat**, és a dir, tancats però sensibles a les despolaritzacions que li puguin arribar (Fig.33).

Els TTCCs han estat implicats en l'excitabilitat de membrana, en funcions tals com les descàrregues neuronals (*neuronal firing*) o els potencials de marcapassos cardíac. Tanmateix, en cèl·lules no excitable el seu rol és anti-intuïtiu ja que la membrana plasmàtica no experimenta des- o repolaritzacions dràstiques, i per tant, es pot considerar que els canals es troben sempre en el mateix estat, el que s'entén com **estat estacionari**.

Ens referim a estat estacionari quan, idealment, els canals assoleixen un estat d'equilibri i per tant, es poden trobar activats, inactivats o desactivats però no hi ha transició entre aquests estats. En experiments electrofisiològics, això s'aconsegueix aplicant polsos de voltatge suficientment llargs com per eliminar el factor temps en els canvis d'estat.

Mibefradil, i el seu derivat NNC-55-0396 (d'ara endavant simplement NNC) són dos reconeguts bloquejants de TTCCs. Les seves concentracions inhibidores màximes mitjanes o  $IC_{50}$  (concentració a la que una droga pot inhibir la seva diana en un 50%, en aquest cas els TTCCs) observades en experiments electrofisiològics en diferents tipus cel·lulars, tant si es tracta de sistemes d'expressió heteròloga com de cèl·lules natives, es troben entre 0,1 a 1,3  $\mu M$  (Taula 7). No obstant, les concentracions tòxiques d'aquests compostos sobre les nostres cèl·lules, semblants a les descrites per d'altres autors, es troben molt per sobre de les mencionades  $IC_{50}$ . Per aquest motiu, ens vam proposar analitzar el per què d'aquestes discrepàncies.

Per fer-ho vàrem construir les corbes d'activació i inactivació estacionària dels TTCCs a partir de dades publicades en diversos articles on s'especifiquen els paràmetres de la funció de Boltzmann corresponents als  $V_{50}$  d'activació (voltatge al qual el 50% dels canals es troba en l'estat activat),

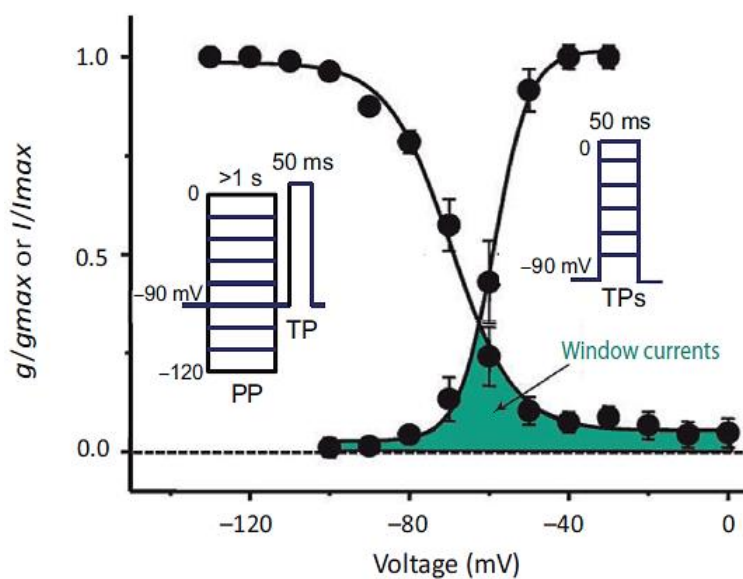
$V_{50}$  d'inactivació (50% de canals inactivats), i les  $K_s$  (pendent de les corbes d'activació i d'inactivació) (Fig.33).

En la corba d'activació d'estat estacionari (SSA) es parteix de tots els canals tancats i per tant, no hi ha conductància. Gràcies a les despolaritzacions aplicades en els protocols de voltatge, s'observa com a partir de -80 mV aproximadament la fracció de canals activats comença a augmentar de forma exponencial (Fig.33).

En la corba d'inactivació d'estat estacionari (SSI) s'observa com a partir de -90 mV comencen a disminuir els corrents també de forma exponencial. En el protocol de voltatge per a l'estudi de la corba SSI s'utilitza un PP (*Prepulse*, un pols inactivant molt llarg, ja que l'inactivació és un procés lent comparat amb l'activació) seguit dels TP (*Test Pulse*, pols de 50 ms per activar els canals), d'aquesta manera només podran activar-se els canals que no estiguin inactivats ja que el pas d'estat activat a inactivat és irreversible (Fig.33).

En base a aquestes corbes, s'observa un solapament d'ambdues en l'interval de potencials d'entre -70 mV i -50 mV aproximadament. El solapament en aquest rang de voltatges representa els canals que no estan inactivats (i per tant, potencialment activables) i que ahora estan activats, és a dir, la fracció de canals que estan permanentment oberts. Els corrents a través d'aquests canals constantment oberts s'anomenen "**corrents finestra**", per analogia amb les corrents d'aire que es produeixen a través d'una finestra que roman oberta.

Aquest concepte és clau per entendre la funció dels TTCCs en cèl·lules no excitable, ja que implica que hi ha canals permanentment oberts malgrat el potencial de membrana sigui estable.



**Figura 33: Corbes d'activació i inactivació en estat estacionari.** Protocols de voltatge per a mesurar l'activació i la inactivació en estat estacionari, i les respectives corbes. Els corrents finestra són presents en el rang de voltatges en que es solapen les corbes d'activació i inactivació (Visa et al., 2019).

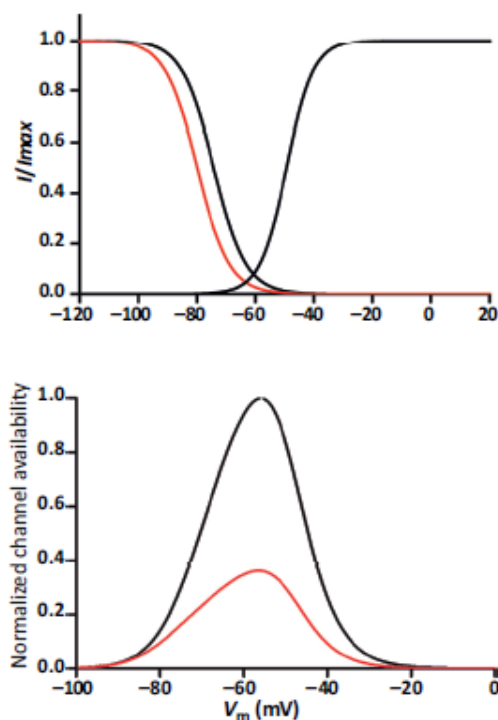
A més a més, es pot fer una estimació de la fracció d'aquests canals:

La corba d'inactivació d'estat estacionari (SSI) es troba normalitzada respecte el valor màxim de corrents (cap canal inactivat) i representa la probabilitat de que aquests canals no es trobin inactivats. Aquesta probabilitat va disminuint exponencialment a mesura que es despolaritza la membrana. Per contra, la corba d'activació d'estat estacionari (SSA) representa la probabilitat que aquests canals es trobin activats, que augmenta exponencialment amb la despolarització.

L'activació i la inactivació depenen de dominis del canal diferents i podem considerar-los com a processos independents, per tant, si multipliquem els valors d'ambdues corbes, obtenim una corba en forma de campana que representa la probabilitat de que els canals estiguin en estat no-inactivat i activat alhora. En altres paraules, representa la fracció de canals permanentment oberts que participen en els corrents finestra (fracció que hem anomenat disponibilitat de canals). D'aquesta manera, observem un pic màxim dels corrents finestra aproximadament a -60 mV pels canals  $Ca_v3.1$  (s'assoleixen valors semblants en el cas de  $Ca_v3.2$  i  $Ca_v3.3$ ), que a partir del producte de les dues corbes dóna que és contribuït per aproximadament un 1% dels canals (Fig.33).

## 1.2 Bloquejants de TTCCs, efectes en els corrents finestra.

La literatura existent demostra de forma consistent que l'aplicació de bloquejants dels TTCCs com els derivats de tetralols, desplaça la corba SSI vers potencials més negatius o hiperpolaritzants. Aquest desplaçament provoca un menor grau de solapament amb la corba d'activació, i per tant, es redueix la fracció de TTCCs oberts de forma permanent a la membrana, en el que s'entén que és part del seu mecanisme d'inhibició (Fig.34). No obstant, nombrosos



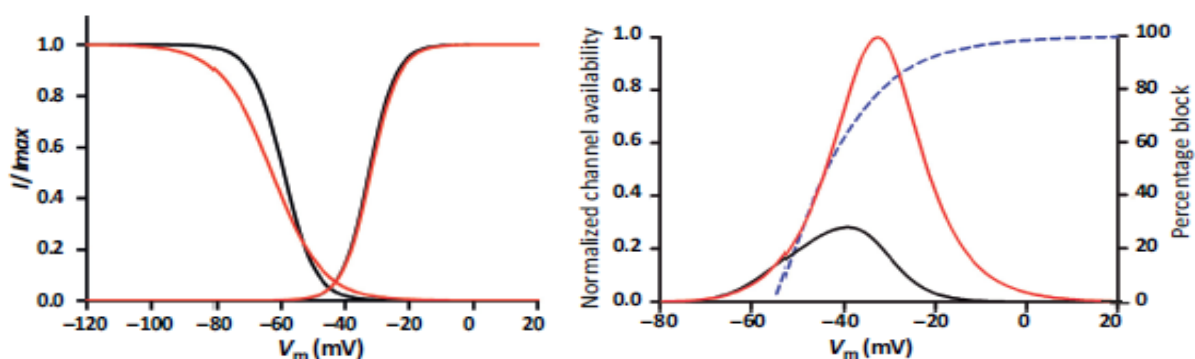
**Figura 34: Desplaçament hiperpolaritzant de l'estat estacionari inactivat.** Superior: corbes normalitzades de l'estat estacionari d'inactivació/activació construïdes a partir de les dades publicades en Chemin et al., 2002 (corba negra) i la corba d'inactivació després de l'aplicació de mibefradil a 1  $\mu$ M (corba vermella) (Gomora et al., 2000) en les corrents de TTCCs. Inferior: fracció de canals oberts permetent els corrents finestra (disponibilitat de canals). Es calcula a partir del producte de les corbes d'activació i inactivació en estat estacionari.

estudis han demostrat que aquest desplaçament de la corba SSI està vinculat a una afinitat superior del fàrmac per l'estat inactiu del canal, conclusió que també s'assoleix amb altres proves electrofisiològiques (Todorovic and Lingle, 1998; Perchenet and Clement-Chomienne, 2000; Huang et al., 2004). En cèl·lules excitable, la unió de la droga en l'estat inactiu del canal, evita la seva obertura davant una despolarització. Tanmateix, en cèl·lules no excitable, els únics canals que poden contribuir a la seva fisiologia es troben permanentment oberts, pels quals els tetralols i la majoria de compostos amb capacitat de bloqueig dels TTCCs hi tenen menor afinitat.

A part d'hiperpolaritzar el voltatge mig d'inactivació, ja que desplaça la corba cap a potencials més negatius, els tetralols i d'altres compostos blocants també redueixen el pendent de la corba. Tal com es pot observar en les corbes d'activació i inactivació construïdes a partir de dades disponibles a les bases bibliogràfiques i normalitzant respecte el màxim (Fig.35), aquesta disminució de la pendent provoca que el solapament entre les corbes augmenti, i per tant, també els corrents finestra. A la figura 35, es representa en forma de percentatge, el grau de bloqueig del canal que seria necessari per contrarestar la magnificació dels corrents finestra com a conseqüència de l'aplanament de la corba per l'acció del NNC.

En resum, els compostos bloquejants dels TTCCs tenen una baixa afinitat pels canals permanentment oberts. D'altra banda, molts d'aquests compostos tenen com a efecte col·lateral l'increment de la fracció de canals encarregats dels corrents finestra.

Aquesta anàlisi indica que la inhibició dels TTCCs per part dels compostos utilitzats contra les cèl·lules canceroses és farmacològicament poc potent, la qual cosa encaixa amb la necessitat d'utilitzar concentracions citostàtiques o citotòxiques efectives, molt per sobre de l'IC<sub>50</sub> sobre els TTCCs. Després d'una revisió extensa de la bibliografia vàrem construir la Taula 7 on es manifesta aquesta discrepància.



**Figura 35: Reducció de la pendent en la corba d'inactivació d'estat estacionari.** Esquerra: corbes normalitzades de l'estat estacionari d'inactivació/activació (en base a dades publicades a Huang et al., 2004 ) abans (corba negra) i després (corba vermella) de l'aplicació de NNC a 8  $\mu$ M. Dreta: disponibilitat de canals obtinguda a partir del producte de les corbes d'inactivació i activació. La línia blava discontinua representa el percentatge de bloqueig necessari per anul·lar l'augment dels corrents finestra com a conseqüència de la disminució de la pendent amb l'aplicació de NNC.

Compound	$IC_{50}$ or $K_d$ ( $\mu$ M)	$GI_{50}$ on cancer cells ( $\mu$ M), 24–72 h
Mibefradil	0.2–1.3 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [71,72,116,117] 0.1–0.9 ( $Ca_v3.2$ expressed in HEK293 cells) [58,62,118] 0.1 (native TTCC of rat Purkinje neurons) [119] 0.6 (native TTCC of dorsal root ganglion neuron) [120] 1.0 (native TTCC of bovine adrenal fasciculated cells) [63] 1.2 (native TTCC of pulmonary microvascular endothelial cells) [121]	3.3 (HCT116 colon carcinoma) [104] 3.5 (U251 GBM) [105] 20.5–24.3 (ovarian cancer cell lines) [71] 24.8 (A549 lung adenocarcinoma) [72] 31.4 (A549 lung adenocarcinoma) [116]
NINC-55-0396	<1 (30–60 min)–10.1 ( $\beta$ min) ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [55]	2.1–2.9 (MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells) [32] 4.8/5.3 (A2780/HO8910 ovarian carcinoma/carcinoma/adenocarcinoma) [33]
KYS05090	0.3 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [72]	4.1 (A549 lung adenocarcinoma) [72]
KYS05090S, KCP10043F	0.5, 0.9 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [116]	4.7, 7.3 (A549 lung adenocarcinoma) [116]
5b, 6b, 6c, BK10040, 8	0.5–1.8 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [72]	2.3–20.7 (A549 lung adenocarcinoma) [72]
KYS05042, KYS05043, KYS05046, KYS05047, KYS05048, KYS05055, KYS05056, KYS05057, KYS05065, KYS05080, KYS05085, KYS05089, KYS05090	0.04–1.0 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [68]	0.17–>100 $\mu$ M (A549 lung adenocarcinoma) [68]
KYS05090, 6a, 6c, 6d, 6f, 6g, 6h	0.3–0.6 ( $Ca_v3.1$ expressed in HEK293 cells) [71]	2.3–9.8 (SK-OV-3 epithelial ovarian cancer) [71]

Taula 7: Potències en el bloqueig dels TTCCs i en la reducció de la viabilitat de cèl·lules canceroses per tetralols i derivats de DHQ (Visa et al., 2019).

La baixa potència es pot contrarestar augmentant la concentració del compost actiu, però el preu a pagar és la selectivitat farmacològica del compost: com més alta és la concentració, més alta és la probabilitat que interaccioni amb d'altres dianes moleculars de baixa afinitat. Les evidències que hem trobat d'aquests efectes col·laterals o secundaris (efectes “*off-target*”) quan s'apliquen derivats dels tetralols a concentracions tòxiques són:

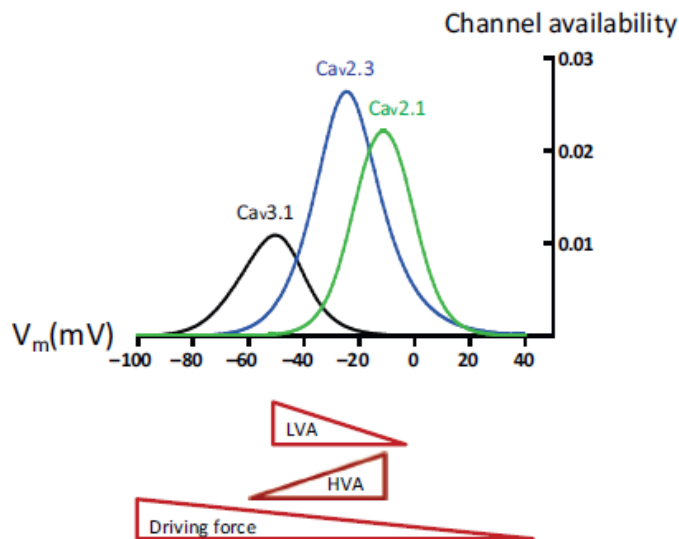
1. **El desplaçament del potencial de membrana.** *A priori* el tancament d'un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  expressat a la membrana plasmàtica ha d'evitar l'entrada d'aquest catió provocant una hiperpolarització de la membrana, és a dir, tornar-la més negativa. No obstant, s'ha descrit que l'aplicació de mibefradil despolaritza la membrana plasmàtica de forma significativa (Potocnik et al., 2000; Niklasson et al., 2017). Una possible explicació pot venir per l'associació física i funcional dels TTCCs amb els canals de  $\text{K}^+$  dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), de forma que l'activació dels primers desencadena l'activació dels segons provocant la sortida de  $\text{K}^+$  i la subseqüent hiperpolarització de la membrana (Yoo et al., 2008). Això significaria que amb la inhibició dels TTCCs i de retruc els  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , es podria donar un efecte teòricament despolaritzant.

Tanmateix, contra aquest argument, cal recordar que <1% dels TTCCs estan oberts a potencials estacionaris, per tant, la probabilitat de que juguin un paper significatiu (en col·laboració amb els  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) en l'establiment del potencial de membrana és molt baixa. Més probable és, en canvi, que el mibefradil provoqui la despolarització de la membrana a través de la inhibició de diferents tipus de canals de  $\text{K}^+$  (Gomora et al., 1999; Liu et al., 1999; Chouabe et al., 2000; Perchenet and Clement-Chomienne, 2000; Lotshaw, 2001; Yoo et al., 2008; Hong et al., 2012) o activació de canals catiónics (Schäfer et al., 2016), tots efectes “*off-target*” demostrats per d'altres autors. A més a més, és important destacar que aquest efecte despolaritzant pot tenir moltes altres conseqüències, com 1) una reducció en els corrents finestra dels TTCCs com a conseqüència d'una membrana despolaritzada, 2) una menor força impulsora d'entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  d'acord amb la llei d'Ohm [ $I_{\text{Ca}} = (V_m - V_{\text{Ca}}) \times g_{\text{Ca}}$ , on  $I_{\text{Ca}}$  és el corrent del  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $V_m$  el potencial de membrana,  $V_{\text{Ca}}$  el potencial d'equilibri del  $\text{Ca}^{2+}$  i la  $g_{\text{Ca}}$ , la conductància del  $\text{Ca}^{2+}$  i  $V_m - V_{\text{Ca}}$  és la força impulsora d'entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  o 3) promoure l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels canals HVA, que per definició s'activen a potencials més alts que els LVA (Fig.36).

2. **L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic** és un altre efecte col·lateral innegable. Contràriament al que seria esperable, els resultats preliminars obtinguts ens indicaven que la toxicitat del mibefradil o del NNC podria prevenir-se amb l'aplicació del quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM. Estirant del fil, vam concloure que aquests compostos provoquen una mobilització per

$\text{Ca}^{2+}$  des del RE a través dels receptors  $\text{IP}_3$ , en consonància amb resultats descrits per Eberhard et al. 1995 en fibroblasts cardíacs de rata i plaquetes humanes. Malgrat que aquests resultats es mostraran més endavant en el treball, es pot anticipar que el tancament d'un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  present a la membrana plasmàtica no és compatible amb un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic.

Per concloure, aquesta anàlisi de dades va evidenciar que els efectes dels anomenats blocants farmacològics de TTCCs podien tenir un important component "off-target". No obstant, elucidar aquests mecanismes semblava rellevant donat el potencial interès terapèutic d'aquestes drogues, que són capaces de promoure la mort de cèl·lules canceroses de forma molt eficient. A més a més, per estimar la vàlua real dels TTCCs com a dianes quimioterapèutiques en el glioblastoma, calia investigar també els efectes resultants del silenciament gènic d'aquests canals.



**Figura 36: Disponibilitat de canals  $\text{Ca}_v$  en funció dels potencials de membrana.** Entre els efectes "off-target" associats amb l'ús de mibefradil es troba la despolarització. De fet, canvis en els potencials de membrana poden afectar a: (1) La disponibilitat dels canals LVA (TTCCs) i HVA, així com a: (2) La força impulsora d'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  d'acord amb la llei d'Ohm. En la figura podem veure una comparativa entre la disponibilitat dels canals  $\text{Ca}_v3.1$  (corba negra),  $\text{Ca}_v2.3$  (corba blava) (Morita et al., 2002) i  $\text{Ca}_v2.1$  (corba verda) (Wan et al., 2005). Fixem-nos com els corrents finestra de  $\text{Ca}_v2.3$  augmentarien exponencialment per la despolarització en el rang de  $-50$  mV a  $-30$  mV i els de  $\text{Ca}_v2.1$  entre  $-40$  mV i  $-10$  mV.





## **Capítol 2:**

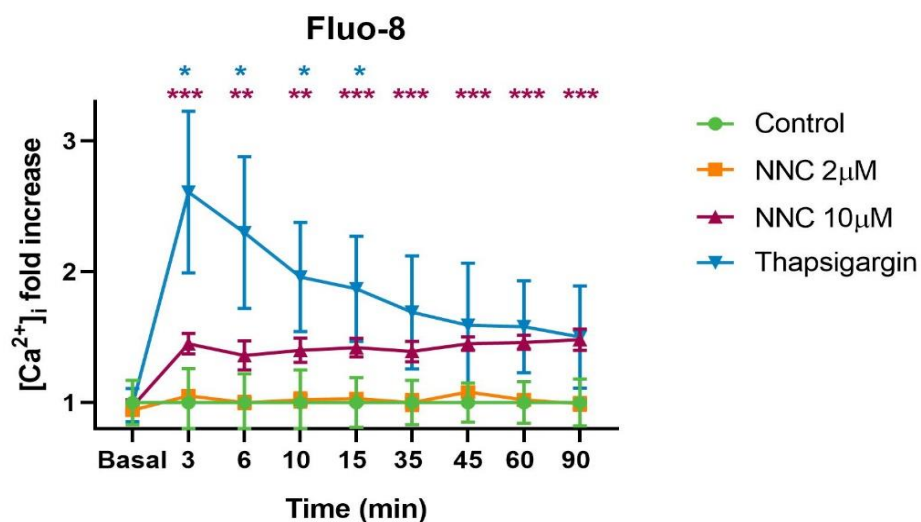
**El NNC indueix apoptosi en cèl·lules de glioblastoma elevant els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$ , activant l'UPR i alterant l'autofàgia.**



## 2.1 NNC indueix l'apoptosi a través de l'elevació de $\text{Ca}^{2+}$ citosòlic.

Els TTCCs proporcionen un mecanisme d'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  clau en aquelles membranes amb potencials negatius com en els que trobem en la majoria de cèl·lules canceroses, jugant una funció essencial en la proliferació cel·lular. La funció dels TTCCs en la progressió del glioblastoma ha rebut una atenció considerable en els últims anys i els efectes citostàtics/citotòxics dels bloquejants de TTCCs descrits tant *in vitro* com *in vivo*, els senyalen com una potencial eina terapèutica per al tractament del glioblastoma. Dades prèvies en el nostre grup demostren com el tractament a una concentració de 10  $\mu\text{M}$ , tant amb mibefradil com amb el seu anàleg NNC, afecten dràsticament la supervivència en les línies cel·lulars de glioblastoma A172 i U87-MG i en cultius primaris, mentre que aquesta no es veu alterada a concentracions inferiors (com 1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ )(Visa, Sallán et al., 2019).

L'estudi de les corbes d'activació i inactivació en estat estacionari i dels potencials efectes "off-target" dels tetralols, ens va portar a l'estudi de les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic quan tractem la línia A172 amb l'anàleg del mibefradil, NNC, a les concentracions de 2  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ . Com a control positiu es va usar la Tapsigargina (Tg), un inhibidor no competitiu de la SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) que acaba provocant un alliberament des del reservori de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE cap al citoplasma.



**Figura 37: Increment del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic pel bloqueig dels TTCCs amb NNC 10  $\mu\text{M}$ .** Mesures realitzades amb el kit Fluo-8- No wash sobre la línia cel·lular de glioblastoma A172. El tractament amb el bloquejant farmacològic de TTCCs NNC s'ha realitzat a les concentracions de 2  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ . Com a control positiu, el tractament amb Tapsigargina (Tg) a una concentració de 5  $\mu\text{M}$ . Els valors corresponen a la intensitat de fluorescència normalitzats respecte als valors basals. Les barres d'error indiquen  $\pm$  s.e.m; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

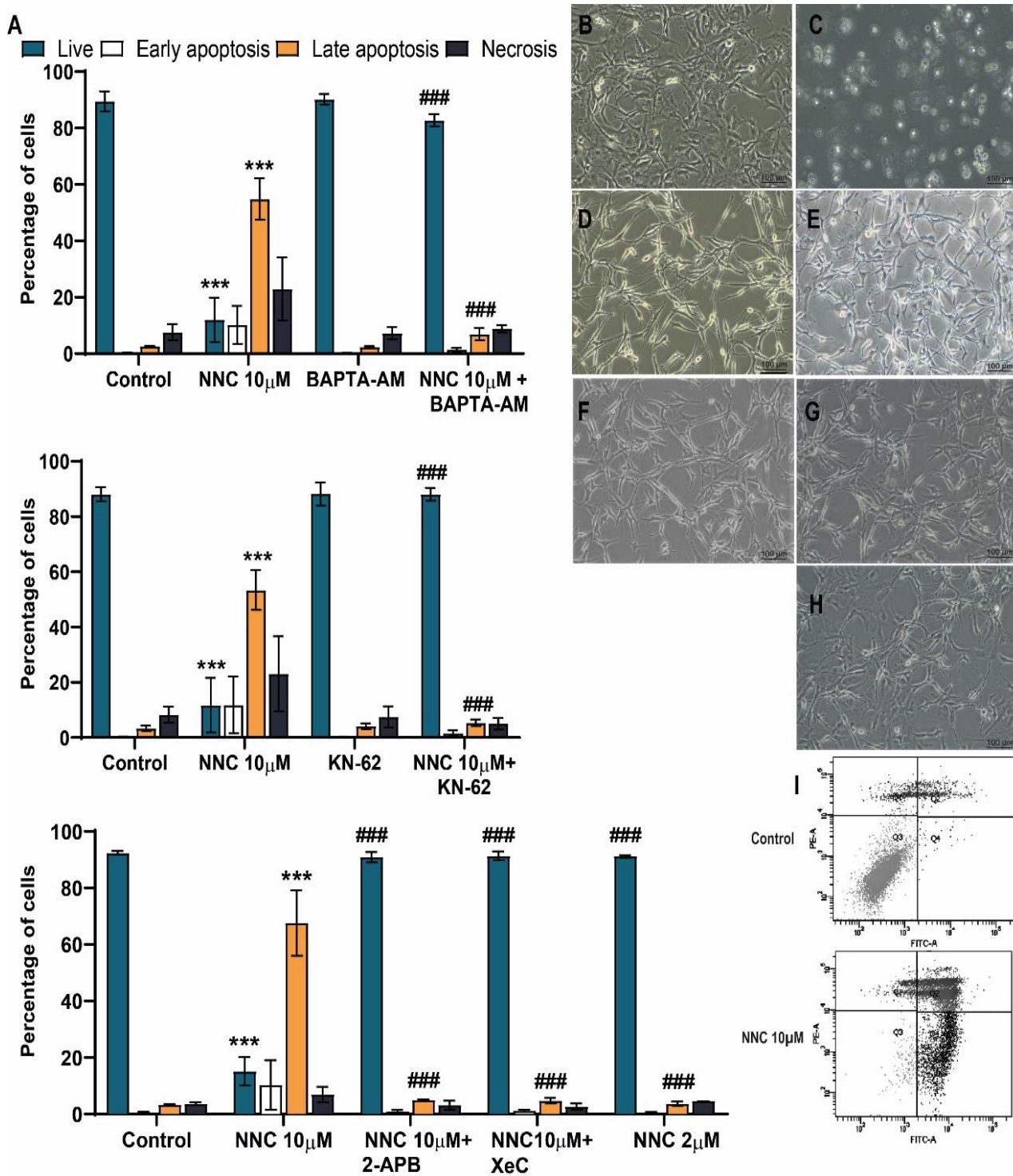
Per a l'assaig del flux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular vam utilitzar la sonda d'alta afinitat Fluo-8 AM que s'uneix al  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular després de ser processada per una esterasa que la fa permeable a través de la membrana. Un cop carregada la sonda i realitzades les lectures basals, es van tractar les cèl·lules A172 amb Tg (com a control positiu), NNC 2  $\mu\text{M}$  i NNC 10  $\mu\text{M}$ .

Els resultats obtinguts indiquen un marcat increment de les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dels 3 minuts des del tractament amb Tg que es manté significativament superior fins als 15 minuts del tractament. Sorprenentment, en el tractament amb NNC 10  $\mu\text{M}$  també es produeix un augment progressiu dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  que es manté significatiu fins a l'última lectura, als 90 minuts des del tractament. Per contra, en el tractament amb NNC 2  $\mu\text{M}$  no s'observen canvis respecte el control durant tot l'assaig (Fig.37).

Com ja s'ha comentat prèviament, un bloqueig dels TTCCs no és compatible amb un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic, fet que porta a pensar en els possibles efectes "off-target" d'aquesta droga a una concentració de 10  $\mu\text{M}$ . Donat que l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  a aquesta concentració es correspon amb la dosi tòxica en les línies de glioblastoma, vam plantejar-nos si la toxicitat produïda per la droga era conseqüència directa de l'increment en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic.

Per aquesta raó, vam aplicar a la línia de glioblastoma A172 el quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM en combinació amb NNC en la concentració citotòxica de 10  $\mu\text{M}$ . Passades 36h del tractament, hi havia una mort massiva de les cèl·lules tractades amb el bloquejant dels TTCCs (Fig.38 A-C), mentre que en el co-tractament de NNC amb BAPTA-AM, on es bloqueja l'excés de  $\text{Ca}^{2+}$ , la majoria de cèl·lules seguien vives (Fig.38 A i D).

Aquests resultats concorden amb la nostra hipòtesi de que les elevacions de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cèl·lula juguen un paper clau en la mort cel·lular. Tanmateix, el bloqueig d'un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmàtica no és compatible amb un increment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic. Per aquest motiu vam qüestionar-nos si la sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic observat amb el NNC era conseqüència d'un buidament del principal magatzem de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cèl·lula: el RE. En aquest orgànul trobem principalment dos canals que permeten l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  des del RE al citosol: els RyRs i els  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . 2-APB (*2-Aminoethoxydiphenyl Borate*) és un inhibidor no específic, però moderadament potent dels canals TRP (*Transient Receptor Potential*), dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , RyRs i SOCE (*Store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) (Ansari et al., 2014; Hu et al., 2015). Donat que inhibia dos de les nostres possibles dianes, vam utilitzar-lo per comprovar que la mort potencialment induïda per l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic provenia del RE. Vam tractar les cèl·lules amb NNC en combinatòria amb 2-APB, tornant a obtenir un rescat pràcticament total de la mort cel·lular (Fig.38 F).



**Figura 38: La modulació de la senyalització per  $Ca^{2+}$  evita la mort per NNC 10  $\mu$ M.** A) Cèl·lules de la línia A172 es van analitzar per AnnexinaV/PI per tal de calcular la població cel·lular viva, en apoptosi propera, tardana i en necrosi. Les cèl·lules es van tractar amb NNC 10  $\mu$ M, BAPTA-AM 5  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M, 2-APB 40  $\mu$ M o XeC 5  $\mu$ M tal i com s'indica durant 36h. B-H) Imatges representatives en contrast de fase de les cèl·lules tractades a les 36h. Barra= 100 $\mu$ m B. Control, C. NNC 10  $\mu$ M, D. NNC 10  $\mu$ M + BAPTA-AM, E. NNC 10  $\mu$ M + KN-62, F. NNC 10  $\mu$ M + 2-APB, G. NNC 10  $\mu$ M + XeC, H. NNC 2  $\mu$ M. I) Imatges significatives dels perfils de citometria de flux (Control, NNC 10  $\mu$ M) amb la tinció per AnnexinaV en l'eix X i la de PI en l'eix Y. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\*\* o ### p<0,001.

Seguidament, donat que 2-APB és un inhibidor més àmpliament descrit i més potent dels IP<sub>3</sub>Rs, vam validar els resultats amb un inhibidor més específic d'aquests com és la XeC (*Xestospongina* C). De la mateixa forma que amb el 2-APB, XeC recuperava la mort induïda pel NNC pràcticament en la seva totalitat senyalant així que la sortida del Ca<sup>2+</sup> des del RE és a través del IP<sub>3</sub>Rs (Fig.38 G).

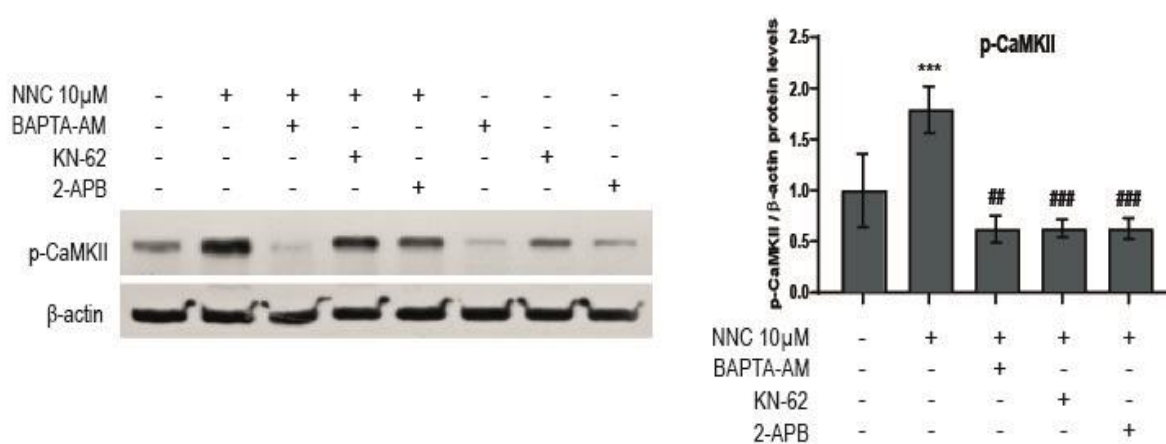
Moltes cascades de senyalització cel·lular estimulades per Ca<sup>2+</sup>, utilitzen la CaM com a intermediari (Brzozowski and Skelding, 2019). Així, un augment de Ca<sup>2+</sup> citosòlic provoca una major unió d'aquest ió a la CaM activant la senyalització per CaMKII, que a la seva vegada pot conduir a la via apoptòtica a través de l'activació de l'UPR (Timmins et al., 2009). Amb la intenció de dilucidar si la senyalització a través de la CaMKII participava en la inducció de l'apoptosi per NNC, vam tractar les cèl·lules amb KN-62, soles o en combinació amb el bloquejant de TTCCs. KN-62 és un inhibidor selectiu de la CaMKII que interacciona amb el lloc d'unió de la calmodulina evitant l'autofosforilació de la CaMKII, i en conseqüència la seva activació. Els resultats obtinguts van ésser molt similars als de la combinatòria amb BAPTA-AM i els inhibidors dels IP<sub>3</sub>Rs: un marcat rescat de la mort induïda per NNC 10 µM (Fig.38 E).

Vam valorar tots aquests rescats mitjançant citometria de flux utilitzant el marcatge amb Annexina V i iodur de propidi (PI) i vàrem calcular el percentatge de cèl·lules vives, en apoptosi inicial, apoptosi tardana o necrosi en cèl·lules tractades amb NNC sol o en combinació amb BAPTA-AM, KN-62, 2-APB o XeC durant 36h. Els resultats van demostrar els efectes observats en contrast de fase: mentre que el tractament amb NNC 10 µM disminuïa les cèl·lules vives en aproximadament un 90%, amb el consegüent augment en cèl·lules apoptòtiques (en fase tardana principalment), les combinatòries de tractament amb BAPTA-AM, KN-62, 2-APB i XeC pràcticament recuperaven els valors de supervivència que trobem en les cèl·lules control. A més a més, també vam corroborar que a una concentració de 2 µM de NNC (on no es produeix l'augment en els nivells citosòlics de Ca<sup>2+</sup>) no hi ha afectació de la supervivència cel·lular, tal com demostra l'assaig d'annexina, on es mantenen uns valors de cèl·lules vives semblants als del control (Fig.38 A i I).

El conjunt de rescats dràstics de la mort cel·lular indica que la sobrecàrrega de Ca<sup>2+</sup> juga un paper clau en la inducció apoptòtica. Per tal de corroborar que la CaMKII participa en aquesta senyalització, vam estudiar mitjançant WB els nivells d'activació d'aquesta proteïna a través de la fosforilació en la treonina 286. Per fer-ho, vàrem tractar durant 8h la línia de glioblastoma A172 amb NNC en combinació amb les drogues utilitzades en l'assaig d'annexina i que ens serveixen d'indicadors dels principals punts del flux d'estudi: BAPTA-AM (quelant de Ca<sup>2+</sup>), KN

(inhibidor de la pròpia CaMKII) i 2-APB (inhibidor dels IP<sub>3</sub>Rs del RE). L'estudi mitjançant WB mostra un significatiu augment de la p-CaMKII en el tractament amb NNC 10 μM a 8h, en relació amb els augments de Ca<sup>2+</sup> observats amb el bloquejant de TTCCs. Per contra, les combinatòries de tractaments de NNC amb la resta d'inhibidors disminueixen l'activació de CaMKII respecte el tractament sol amb NNC de forma significativa (Fig.39).

L'important augment en els nivells de p-CaMKII en presència de NNC, i la seva disminució en les condicions on es recupera la mort cel·lular (en presència de BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB), ens assenyalen que aquesta proteïna juga un paper clau en la inducció apoptòtica per la sobrecàrrega de Ca<sup>2+</sup> provinent del RE.



**Figura 39: NNC activa la CaMKII en el seu mecanisme d'acció.** Es van analitzar els nivells de fosforilació de pThr286-CaMKII en cèl·lules A172 tractades amb NNC 10 μM sol o en combinació amb BAPTA-AM 5 μM, KN-62 10 μM o 2-APB 40 μM durant 8h. La β-actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació de la p-CaMKII es troba normalitzada respecte la β-actina i els resultats de la quantificació es mostren com l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10 μM. \*\*\* o ### p<0,001; ## p<0,01.

## 2.2 La inhibició dels TTCCs per NNC afecta a l'autofàgia.

L'observació en contrast de fase de les cèl·lules tractades amb NNC, mostra una vacuolització massiva des de les primeres hores de tractament. Aquestes vacuoles inicialment més petites però molt abundants augmenten en mida a mesura que passen les hores, ocupant pràcticament tota el citoplasma a les 8 hores de tractament. Per contra, la combinació de NNC amb els diferents inhibidors, disminueix la formació d'aquestes vacuoles en diferents graus: des d'una reducció del nombre en el tractament amb KN-62 (malgrat ser la menys evident), passant per una formació molt menor d'aquestes amb BAPTA-AM, fins a evitar completament la formació de vacuoles en el cas del 2-APB (Fig.40).

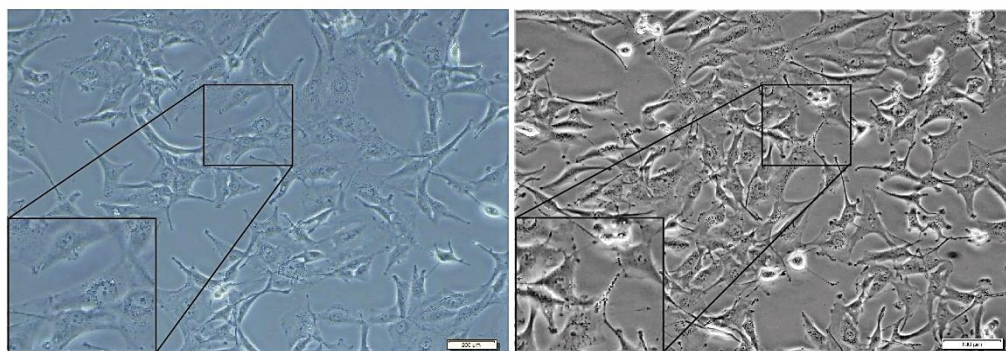


Treatment

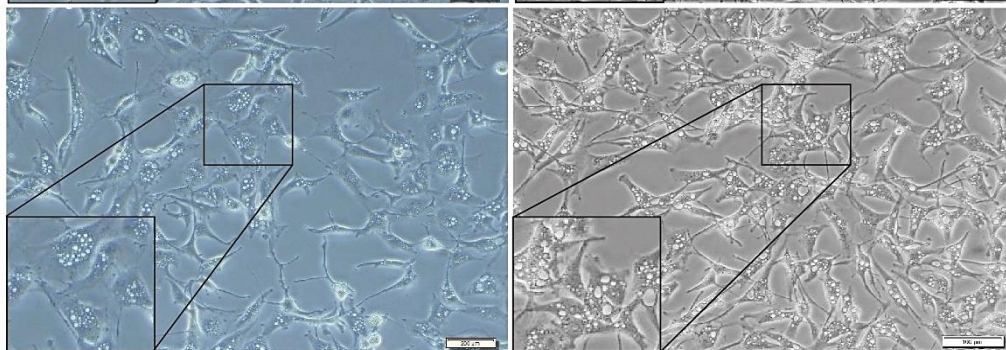
4h

8h

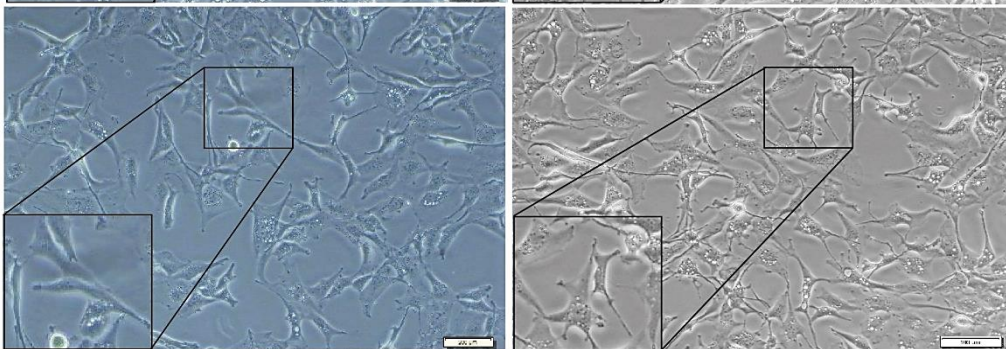
Control



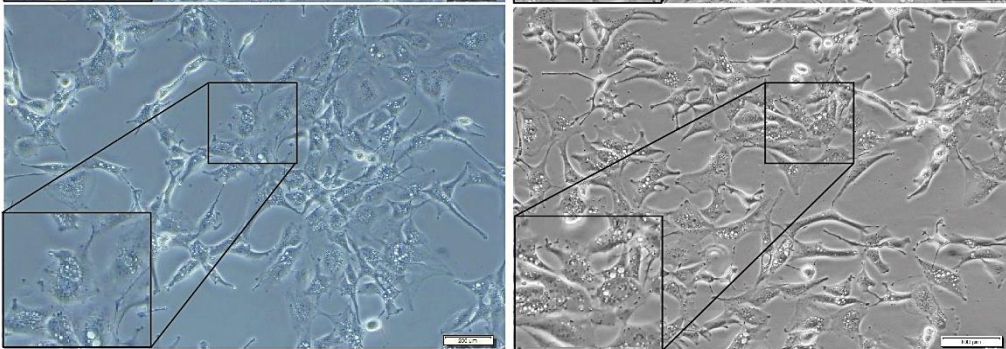
NNC 10 $\mu$ M



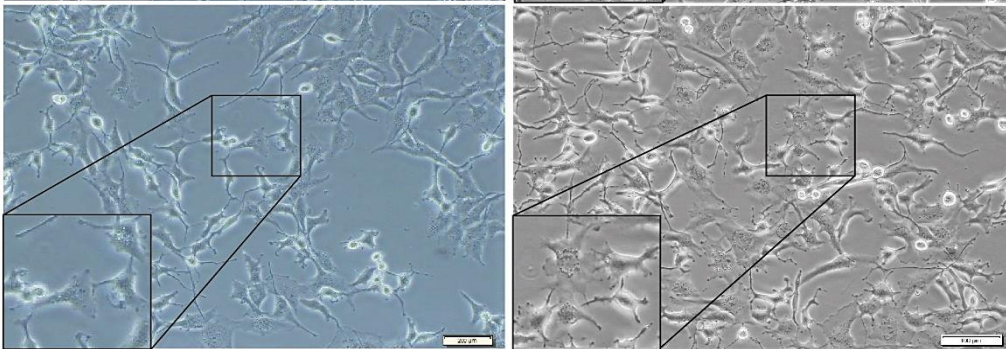
NNC 10 $\mu$ M  
+BAPTA-AM



NNC 10 $\mu$ M  
+KN-62



NNC 10 $\mu$ M  
+2-APB



**Figura 40:** El bloqueig de la senyalització per  $Ca^{2+}$  mitjançant diferents inhibidors evita o disminueix la vacuolització massiva del NNC 10  $\mu$ M. Imatges en contrast de fase representatives dels tractaments de NNC 10  $\mu$ M sol o en combinació amb BAPTA-AM 5  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M o 2-APB 40  $\mu$ M durant 4h o 8h. Barra=100  $\mu$ m.

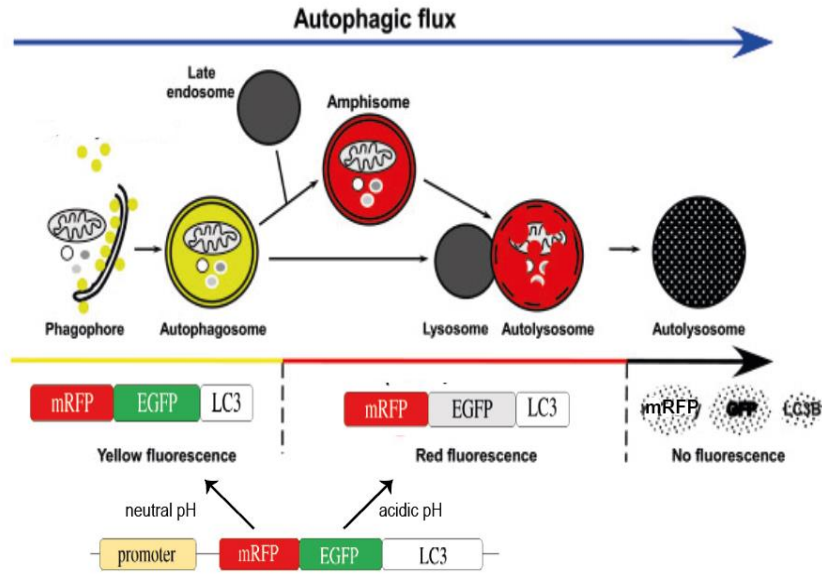
Com que la formació d'aquestes vacuoles podia ésser indicatiu d'una afectació del procés autofàgic, vàrem transfectar amb el plasmidi del tàndem (ptLC3/mRFP-EGFP) per tal de monitoritzar el flux autofàgic (Kimura et al., 2007) en les cèl·lules tractades amb NNC. Es tracta d'una construcció que permet l'expressió d'una proteïna de fusió formada per les proteïnes fluorescents mRFP (*monomeric Red Fluorescent Protein*) i EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) fusionades a la proteïna dels autofagosomes LC3. La proteïna EGFP perd la fluorescència a pH baix, com és el cas dels autofagolisosomes per les seves condicions àcídiques i degradatives. En canvi, la proteïna mRFP és estable en aquestes condicions, el que significa que podrà marcar els compartiments autofàgics abans i després de la fusió amb els lisosomes. En resum, aprofitant aquestes característiques l'assaig permet distingir els autofagosomes, on la fluorescència serà groga degut a la co-localització de la fluorescència verda i roja, mentre que els autofagolisosomes seran rojos degut a la degradació de la proteïna verda (Fig.41 A). El tractament amb Rapamicina (500nM, 24 hores), un inductor ben conegut de l'autofàgia mitjançant la inhibició de mTOR, produeix un increment del nombre de punts rojos (autofagolisosomes) respecte al control. Per contra, una acumulació d'autofagosomes indicarà un bloqueig de l'autofàgia, com passa amb el tractament amb Cloroquina (CQ; 25µM, 24 hores) que produeix un augment dels punts grocs (co-localització punts verds i rojos). De forma similar, el tractament amb NNC mostra una acumulació de puntejat groc petit en les primeres hores (4h) de tractament, mentre que a temps més llargs (8h) hi ha una clara acumulació de puntejat groc. A més a més, els punts són més grans a les 8h (igual que amb les vacuoles observades en contrast de fase). En conjunt, suggereix un bloqueig del flux amb una possible fusió de les vacuoles (autofagosomes) que explicaria l'augment de mida a temps tardans de tractament (Fig.41 B).

D'altra banda també s'ha de tenir en compte que el nombre de vacuoles que es generen en el tractament amb NNC és molt major que amb el tractament amb CQ, suggerint una possible dualitat en el tractament amb NNC: una inducció i un bloqueig a temps finals.

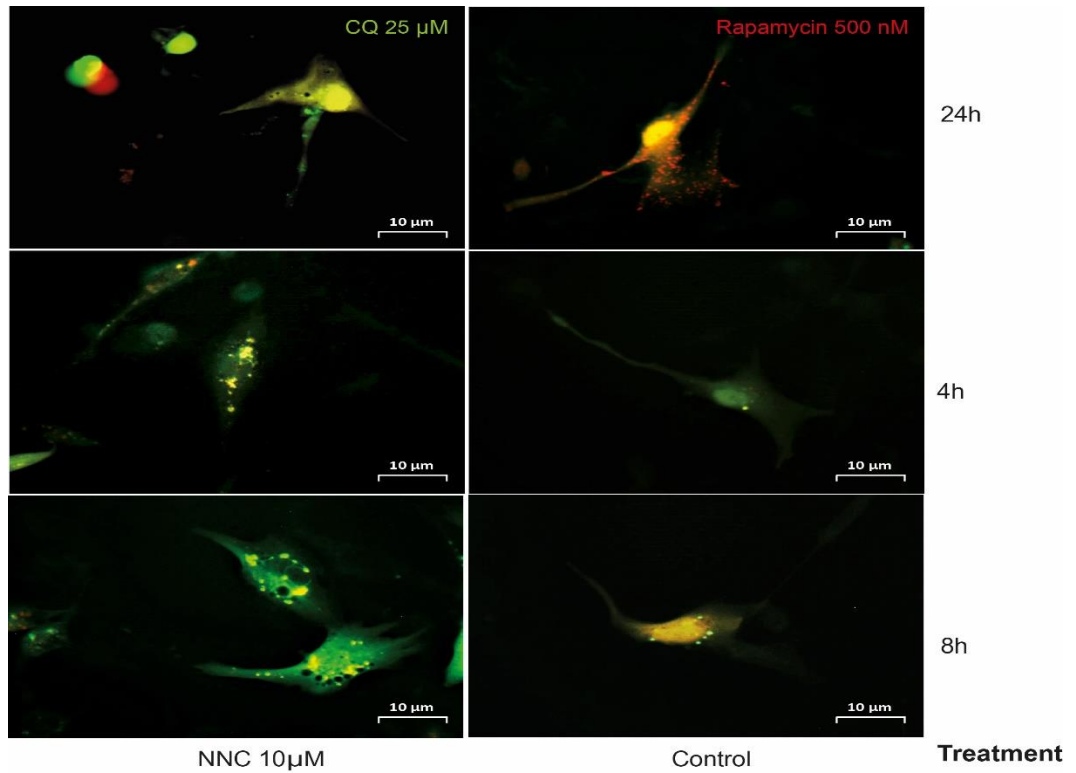
Autofàgia i  $Ca^{2+}$  han estat àmpliament relacionats, ja que existeixen múltiples evidències de que l'ió és necessari en diversos passos del flux autofàgic i pot participar tant en la seva inducció com en la seva inhibició.

A més a més, que els tractaments amb BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB, redueixen o inclús eviten la formació de vacuoles, suggereix que la senyalització a través del  $Ca^{2+}$  alliberat pels  $IP_3Rs$  és necessària per l'alteració de l'autofàgia induïda pel NNC. De fet, un dels mecanismes més ben caracteritzats en la modulació de l'autofàgia que involucra l'activitat de canals de  $Ca^{2+}$  és la via  $IP_3R$ -Beclin-1-Bcl-2 (Kania et al., 2015).

A.



B.



**Figura 41: NNC bloqueja el flux autofàgic en cèl·lules de glioblastoma.** A) Diagrama esquemàtic representatiu del plàsmid mRFP-EGFP-LC3 per tal de monitoritzar el flux autofàgic. Representació del constructe mRFP-EGFP-LC3 i el comportament de la proteïna per la que codifica sota diferents condicions de pH. El senyal verd del GFP es perd quan els autofagosomes es fusionen amb els liososomes per generar autofagolisosomes. Per tant, el senyal verd marca fagògors i autofagosomes però els autofagolisosomes queden només amb senyal vermella. Adaptat de (Hansen and Johansen 2011) B) Imatges representatives de cèl·lules d'A172 transfectades amb el plàsmid ptfLC3 tractades segons condicions i temps indicats. El control positiu CQ (Cloroquina) 25µM mostra un puntejat groc com a conseqüència de la co-localització del puntejat de LC3 de fluorescència roja i verda indicant els autofagosomes. Per contra, la Rapamicina 500 nM mostra un puntejat principalment roig, que indiquen els autofagolisosomes. Barra=10 µm.

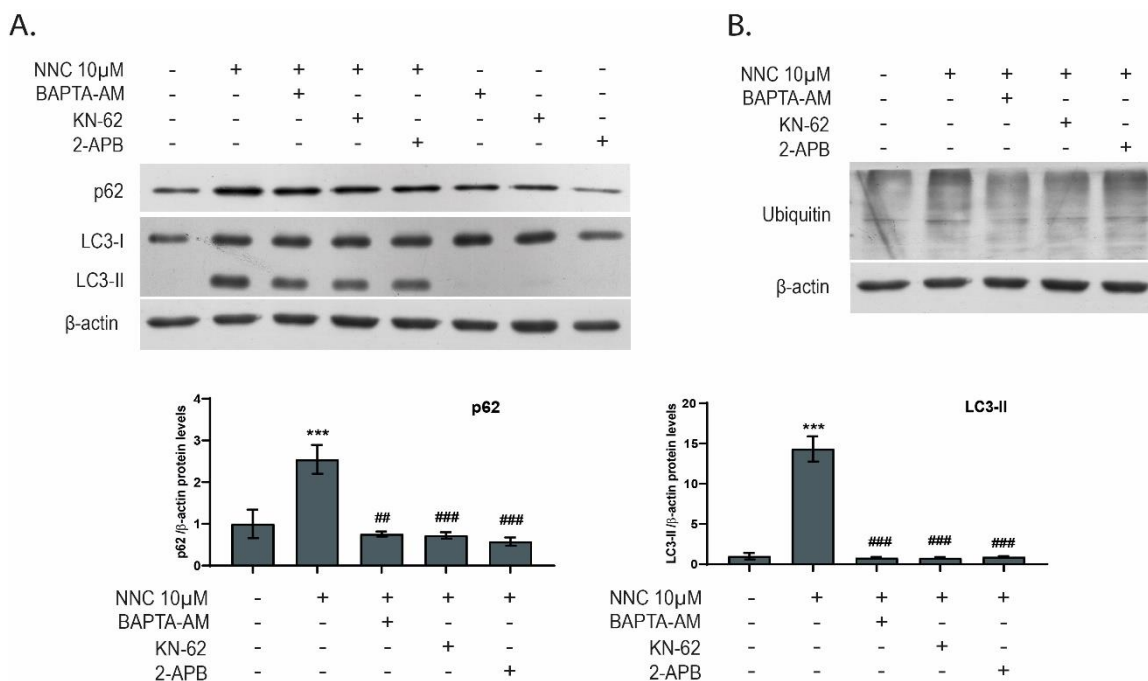
Per tal d'entendre millor quin paper juga l'autofàgia, vam decidir estudiar mitjançant WB els marcadors autofàgics p62, LC3 i ubiquitina. p62 és una proteïna important, que entre d'altres funcions, intervé en el procés autofàgic, concretament com a component dels autofagosomes reconeixent agregats poliubiquitinats i unint-los a LC3, per tal de segrestar-los als autofagosomes i posteriorment degradar-los. Per analitzar aquests marcadors, vam tractar la línia de glioblastoma A172 amb NNC sol o en combinació amb BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB durant 8 hores, donat que és el període en el que s'observa un major nombre de vacuoles potencialment fusionades.

Com era d'esperar, hi ha una marcada conversió i acumulació de la forma LC3-II en cèl·lules tractades amb NNC (quasi unes 15 vegades respecte el control), que es troba reduïda significativament respecte el tractament amb NNC quan afegim els inhibidors (BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB) (Fig.42 A)

Durant el procés autofàgic els components segrestats en els autofagosomes (com les proteïnes ubiquitinades) així com la majoria de maquinària que participa en el propi procés (com el receptor de cargo p62) són degradats i reciclats. Així, l'acumulació que s'observa en el WB de la proteïna p62 (Fig.42 A) i els agregats proteics ubiquitinats (Fig.42 B) en la condició tractada amb NNC, és compatible amb el bloqueig del flux autofàgic observat en l'assaig tàndem, ja que indica que el procés autofàgic no s'ha pogut culminar, i per tant, aquests components no s'han pogut degradar. En canvi, en presència dels diferents inhibidors hi ha una menor acumulació dels tres marcadors autofàgics (LC3-II, p62 i ubiquitina), també en concordança amb les fotos de contrast de fase, on s'observava una menor vacuolització en aquestes condicions respecte el tractament amb NNC sol (Fig.40) suggerint que el flux tendeix a restablir-se.

Considerant que els tractaments aplicats a les cèl·lules afecten la senyalització pel  $Ca^{2+}$  en diferents punts i que tots ells són capaços de modular el flux autofàgic, vam preguntar-nos com els nivells de  $Ca^{2+}$  són capaços de regular aquest procés. Un dels mecanismes pels quals el  $Ca^{2+}$  pot regular l'autofàgia és a nivell transcripcional i un dels reguladors transcripcionals regulats per  $Ca^{2+}$  és CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) que és activat per fosforilació per CaMKII (Ma et al., 2014; Lee, 2016).

Per tal de poder veure l'efecte "net" d'aquests tractaments, els vam aplicar sols. Per un costat, tenim el BAPTA-AM, el 2-APB i el KN-62 que inhibeixen la senyalització per  $Ca^{2+}$  de diferents maneres. Mentre que l'increment de  $Ca^{2+}$  citosòlic es dona en el tractament amb el NNC i amb la Tg, un inhibidor no competitiu de la SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$  -ATPase*) que acaba provocant un buidament de  $Ca^{2+}$  des del reservori del RE cap al citoplasma.



**Figura 42: El NNC incrementa la conversió de LC3-II així com l'acumulació de p62 i agregats poliubiquitinats.** Cèl·lules A172 tractades amb NNC 10  $\mu$ M sol o en combinació amb BAPTA-AM 5  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M o 2-APB 40  $\mu$ M durant 8h, es van analitzar per WB per estudiar els nivells de p62, LC3-II (A) i proteïnes ubiquitinats (B). La  $\beta$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació de p62 i LC3-II es troba normalitzada respecte la  $\beta$ -actina i els resultats de les quantificacions es mostren com l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\*\* o ### p<0,001; ## p<0,01.

L'estudi per WB de l'activació de CREB mostra com aquelles condicions que eleven el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic (NNC i Tg), tenen uns nivells significativament superiors de CREB fosforilada respecte el control. Contràriament, aquells tractaments que inhibeixen la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  tendeixen a tenir una menor activació, malgrat no ser significativa, possiblement degut a que els nivells de p-CREB en les cèl·lules control ja són molt baixos. A més a més, els nivells de p62, de forma paral·lela a l'activació de CREB, són majors en els tractaments amb NNC i Tg, mentre que en BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB són lleugerament menors respecte el control (Fig.43 A).

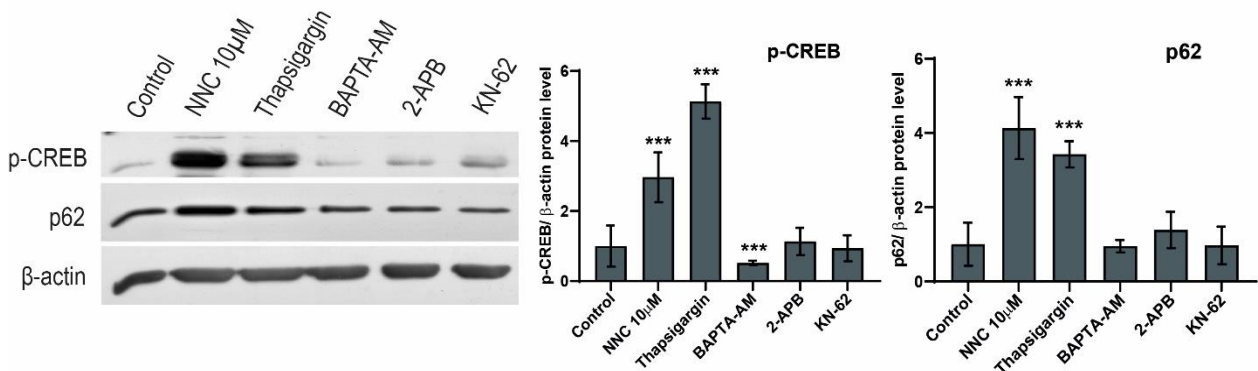
Per tal de validar l'activació del factor de transcripció, també vam realitzar marcatges immunocitoquímics contra la forma fosforilada de CREB en cèl·lules tractades amb NNC i Tg durant 8h i 24h respectivament. Els resultats evidencien com en els dos tractaments hi ha un increment del marcatge nuclear corresponent a la forma activa del factor de transcripció demostrant que quan s'inunden les cèl·lules amb  $\text{Ca}^{2+}$ , aquest es troba actiu (Fig.43 B).

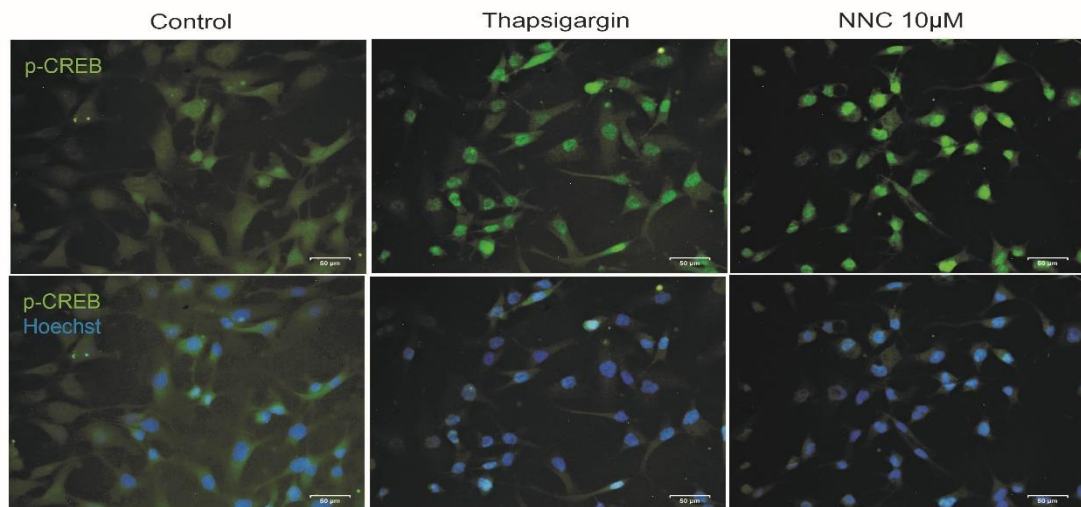
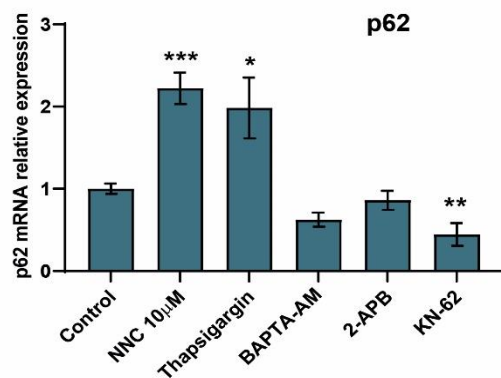
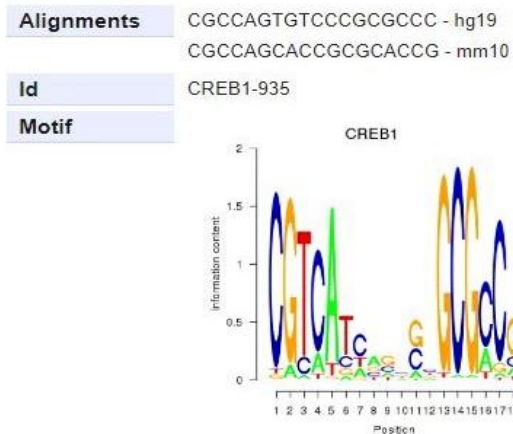
Adicionalment, per corroborar que la regulació de p62 es produeix a nivell transcripcional, vam estudiar l'expressió de p62 per mRNA en les mateixes condicions: BAPTA-AM, KN-62, 2-APB,

NNC i Tg. Sorprenentment, aquelles condicions que eleven el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic (NNC i Tg) presenten uns nivells significativament superiors de *p62* mRNA (quasi 2 vegades d'increment respecte el control). Per contra, aquells tractaments que inhibeixen la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  (BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB) presenten uns nivells lleugerament inferiors respecte el control, també en acord amb els resultats de WB (Fig.43 C)

En conjunt, aquests resultats suggereixen una regulació transcripcional de *p62* a través de p-CREB. En concordança, la base de dades SwissRegulon (<http://swissregulon.unibas.ch>) mostra CREB1 com un dels factors de transcripció que s'uneix a la regió promotora del gen de *p62* (SQSTM1), exactament entre la posició chr5: 179233853 -179233870 de la cadena negativa o reversa (Fig.43 D). Encoratjats per aquests resultats, vam buscar en el promotor de *p62* altres regions d'unió pel factor de transcripció CREB1, la seqüència d'unió consens del qual és TGACGTCA. Malgrat no obtenir cap seqüència completa en el promotor de *p62*, sí que vam trobar algunes seqüències partides que poden funcionar igualment com a lloc d'unió de CREB1 segons la bibliografia (Yamamoto et al., 1988; Mayr and Montminy, 2001; Zhang et al., 2005; Everett et al., 2013). Entre aquestes trobem 3 vegades la seqüència partida CGTCA i 5 vegades la seqüència TGACG. En conclusió, aquests resultats ens fan sospitar amb certa força que hi ha una seqüència d'unió a CREB en el promotor de *p62* i que és responsable, almenys en part, de regular la seva expressió en relació als nivells de  $\text{Ca}^{2+}$ . A més a més, aquests resultats també suggereixen que l'increment del  $\text{Ca}^{2+}$  per NNC, pot induir la transcripció de *p62* i com a conseqüència promoure el flux autofàgic, fomentant així l'efecte dual del NNC en autofàgia (inducció i bloqueig).

**A.**



**B.****C.****D.**

**Figura 43: La senyalització per  $Ca^{2+}$  promou l'expressió de p62 a través del factor de transcripció CREB.** A) Anàlisi per WB dels nivells de pSer133-CREB i p62 en la línia A172 tractada amb NNC 10  $\mu$ M, 2-APB 40  $\mu$ M i KN-62 10  $\mu$ M durant 8h i BAPTA-AM 5  $\mu$ M i Thapsigargina 2,5  $\mu$ M durant 24h.  $\beta$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació de p-CREB i p62 es troba normalitzada respecte la  $\beta$ -actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m.\*\*\* $p$ <0,001 B) Immunotincions contra pSer133-CREB i Hoechst (nuclis) en cèl·lules d'A712. Les cèl·lules van ser tractades amb Thapsigargina 2,5  $\mu$ M i NNC 10  $\mu$ M durant 24h i 8h respectivament. Barra= 50  $\mu$ m. C) Les cèl·lules A172 van ser tractades en les mateixes condicions que el WB (A). Els nivells de mRNA de p62 van ser analitzats per RT-qPCR i els resultats normalitzats respecte als nivells de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivats de tres experiments diferents realitzats en triplicat. \*\*\* $p$ <0,001 \*\*  $p$ <0,01; \*  $p$ <0,05. D) Seqüència d'unió de CREB1 al promotor p62 obtinguda de la base de dades SwissRegulon (<http://swissregulon.unibas.ch>). Localització chr5:179233853..179233870 (- strand), Score=0.57, llargada=18bp. Es mostra l'alineament de la seqüència CGCCAGTGTCCCGCGCCC humana amb la de ratolí i el logo de seqüències d'unió de CREB1 al promotor p62 on es mostra la diversitat de seqüències del motiu CREB1 escalades en funció de la seva freqüència.

## 2.3 La inhibició dels TTCCs per NNC indueix la branca IRE1 $\alpha$ de l'UPR.

La depleció dels magatzems de Ca<sup>2+</sup> del RE té múltiples implicacions directes en l'òrganul, una de les més rellevants és que experimenta estrès de RE i com a conseqüència, activa l'UPR. De fet, una de les drogues més emprades per a la inducció de l'UPR és precisament la Tg, que ho aconsegueix buidant els magatzems de Ca<sup>2+</sup> del RE. Donat que per un costat el NNC pot promoure la sortida de Ca<sup>2+</sup> del RE a través dels IP<sub>3</sub>Rs i que per l'altre, s'ha descrit que l'activació de la pròpia UPR fomenta l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> des del RE, ens vam preguntar si l'activació d'aquestes vies també participen en la inducció de la mort per NNC.

JNK és una cinasa que es troba implicada en múltiples vies, entre les quals trobem la branca IRE1 $\alpha$  de l'UPR, tot i que també juga un paper central en la regulació apoptòtica. De fet, una activació sostinguda de JNK s'ha implicat en la senyalització per Ca<sup>2+</sup>, no només perquè ambdós són *hallmarks* ben coneguts d'apoptosi (es desencadenen durant el procés apoptòtic, especialment en fases tardanes), també perquè hi ha mecanismes moleculars ben descrits que converteixen els increments de Ca<sup>2+</sup> en activacions de JNK (com la CaMKII o ASK1) i que poden culminar en apoptosi (Timmins et al., 2009; Brnjic et al., 2010; Ikeda et al., 2019). El conjunt d'aquests factors va focalitzar el nostre estudi en la branca IRE1 $\alpha$  de l'UPR. Per fer-ho, vàrem analitzar les activacions d'IRE1 $\alpha$  i JNK per WB en els tractaments de NNC, BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB sols o en combinació.

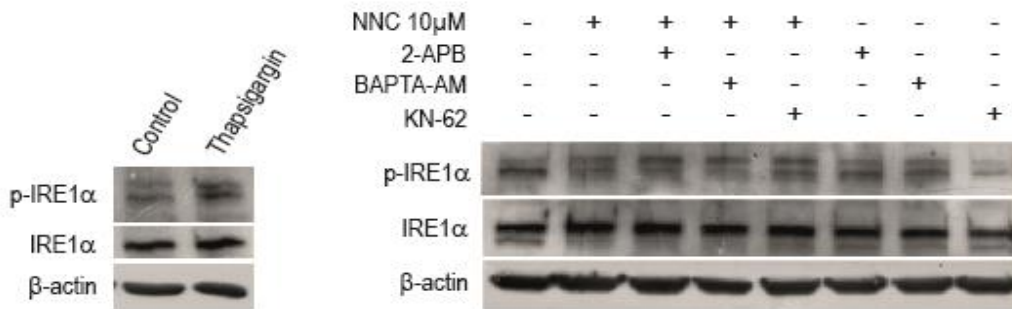
El WB d'activació d'IRE1 $\alpha$  mostra un patró de dues bandes corresponent a la diferent migració entre la proteïna fosforilada (banda superior) i la no fosforilada (banda inferior). Com a control positiu per a l'activació d'IRE1 $\alpha$ , vàrem utilitzar el tractament amb Tg. Així, mentre que en la condició control pràcticament tot l'IRE1 $\alpha$  es troba en la forma no fosforilada, en el tractament amb Tg hi ha un marcat increment d'aquesta proteïna, també en la seva forma fosforilada (banda superior) (Fig.44 A). En el tractament amb NNC es produeix un augment en la fosforilació d'IRE1 $\alpha$ , tant en la condició sola com en combinació amb la resta de tractaments. Per contra, els tractaments sols amb els inhibidors BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB mantenen principalment la forma no fosforilada d'IRE1 $\alpha$  (banda inferior) (Fig.44 A). En conjunt, els resultats indiquen que la fosforilació d'IRE1 $\alpha$  és conseqüència del tractament amb NNC (tant en la condició sola com en les combinatòries) i que els diferents inhibidors no són capaços d'evitar o revertir aquesta activació.

El WB de la forma fosforilada de JNK també mostra un patró de dues bandes corresponent a les diferents isoformes de la proteïna. La banda inferior senyalada amb una fletxa negra correspon a la forma activa de JNK1 (46 KDa), mentre que la superior, senyalada amb una fletxa gris,

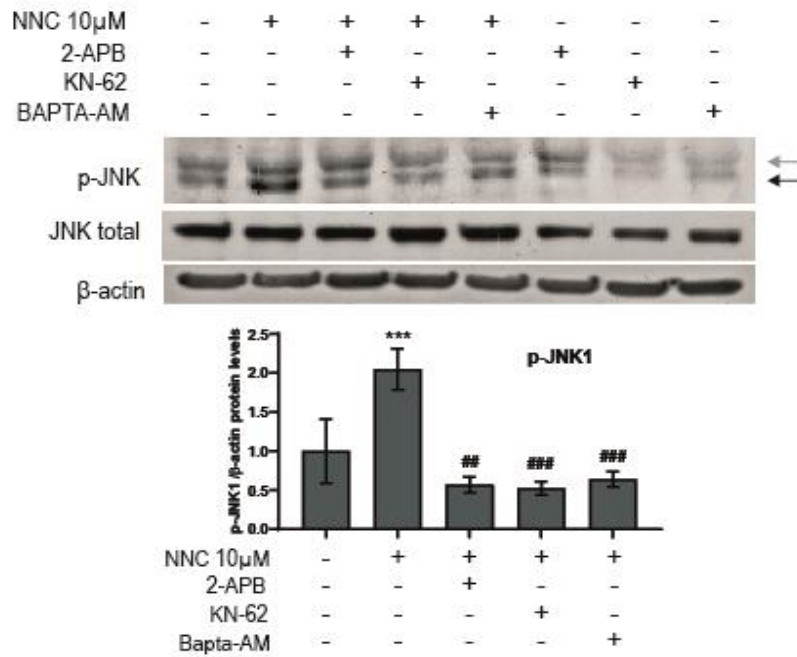


correspon a la de JNK2 (54 KDa). En consonància amb l'activació d'IRE1 $\alpha$  per NNC, els nivells de fosforilació de JNK (en especial de JNK1) també es troben incrementats. Sorprenentment, i al contrari del que passa amb p-IRE1 $\alpha$ , aquí la combinatòria de tractaments de NNC amb els inhibidors sí que disminueixen l'activació de JNK (principalment de JNK1) induïda pel NNC de forma significativa (Fig.44 B).

A.

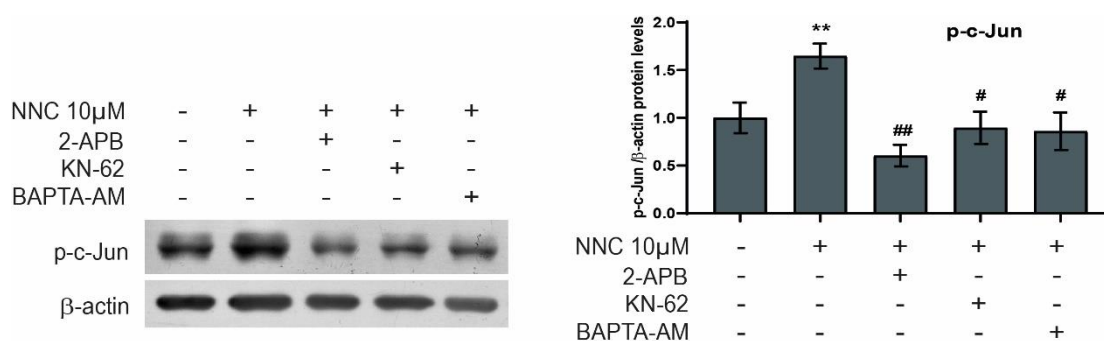


B.



**Figura 44: NNC activa la branca IRE1 $\alpha$  de l'UPR.** La línia A172 es va tractar amb Tg 2,5  $\mu$ M 24h i amb NNC 10  $\mu$ M, 2-APB 40  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M i BAPTA-AM 5  $\mu$ M sols o en combinació durant 8h, els lisats es van estudiar per Western Blot. Els lisats van ser immunoblotats contra A) pSer724 IRE1 $\alpha$  (la banda superior correspon a la forma fosforilada d'IRE1 $\alpha$ ) i IRE1 $\alpha$  total B) pThr183/Tyr185-JNK que dona dues bandes corresponents a l'isoforma activa de JNK1 (banda inferior, fletxa negra; 46 KDa) i JNK2 (banda superior, fletxa gris; 54 KDa); i JNK total.  $\beta$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació de p-JNK1 es troba normalitzada respecte la  $\beta$ -actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\*\* o ### p<0,001; ## p<0,01.

Donat que en els tractaments combinats trobem resultats discrepants en quant als efectors de la via IRE1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$  i JNK), vam voler estudiar elements *downstream* d'aquesta per entendre millor el seu estat d'activació. Per validar, al mateix temps, que és la isoforma JNK1 la que es troba principalment activada per NNC, vam estudiar l'activació d'una de les seves dianes específiques: c-Jun (Dérijard et al., 1994; Sabapathy et al., 2004). En consonància amb els resultats obtinguts amb p-JNK1, hi ha un augment significatiu de la forma fosforilada de c-Jun induïda per NNC, que es veu disminuïda significativament quan es co-tracta amb BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB (Fig.45).

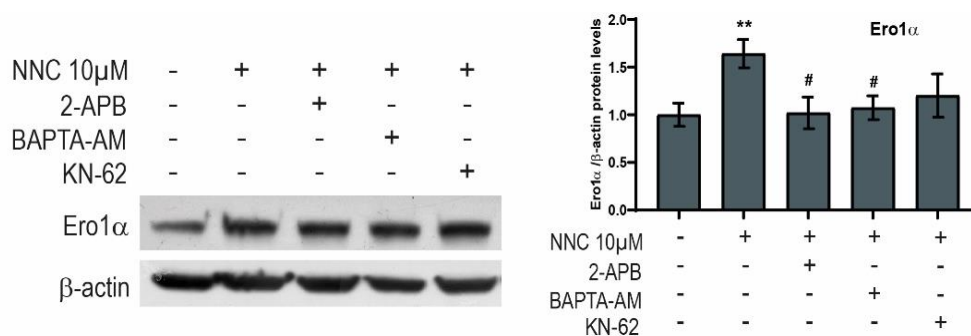


**Figura 45: NNC activa la diana de JNK1, p-c-Jun.** Es van analitzar per WB els nivells de pSer73-c-Jun en lisats de cèl·lules A172 tractades amb NNC 10  $\mu$ M sol o en combinació amb 2-APB 40  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M i BAPTA-AM 5  $\mu$ M durant 8h.  $\beta$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació de p-c-Jun es troba normalitzada respecte la  $\beta$ -actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\* o ## p<0,01; # p<0,05.

## 2.5 CHOP i Ero1 $\alpha$ desencadenants de l'increment de Ca<sup>2+</sup> citosòlic per NNC.

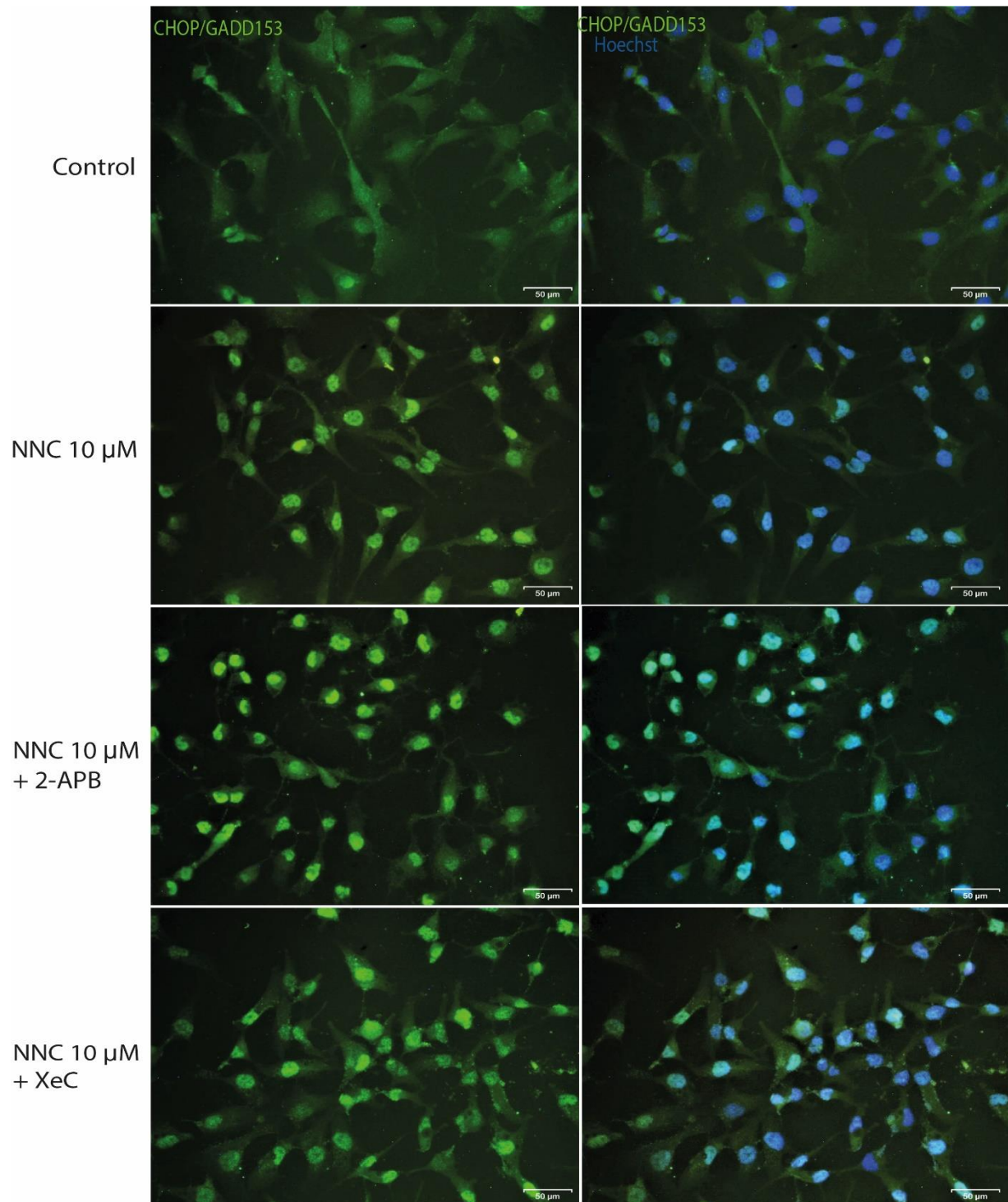
Alternativament a la via canònica de l'UPR, s'ha descrit una apoptosi induïda per estrès de RE on el Ca<sup>2+</sup> citosòlic té un paper crític, ja que mitjançant la CaMKII es produeix una activació de JNK i en el que té una funció essencial CHOP/Gadd153. Clàssicament CHOP s'ha categoritzat com un factor de transcripció induït en etapes finals de l'UPR. Tanmateix, en els últims anys diversos estudis han demostrat que CHOP pot promoure una apoptosi per estrès de RE a través de diversos mecanismes (Tabas and Ron, 2011; Hu et al., 2019). En un dels models descrits per Li et al. 2009, CHOP induïx Ero1 $\alpha$  (una oxidoreductasa del RE) generant un ambient hiperoxidat en el RE que permet la formació de ponts disulfur en el receptor IP<sub>3</sub> i que provoca l'alliberació de Ca<sup>2+</sup> des de l'òrganul (Higo et al., 2005).

D'altra banda, la via activada per NNC no semblava seguir la via canònica d' IRE1 $\alpha$ , ja que mentre l'activació de JNK1 cau en presència dels inhibidors (BAPTA-AM, 2-APB i XeC), no succeeix el mateix amb p-IRE1 $\alpha$ . Aquests resultats en combinació amb la informació bibliogràfica prèvia, ens va portar a decidir estudiar la possible implicació d'Ero1 $\alpha$  i CHOP en el procés.



**Figura 46: NNC activa Ero1 $\alpha$ .** Es van analitzar per WB els nivells d'Ero1 $\alpha$  en cèl·lules A172 tractades amb NNC 10  $\mu$ M sol o en combinació amb BAPTA-AM 5  $\mu$ M, KN-62 10  $\mu$ M o 2-APB 40  $\mu$ M durant 8h.  $\beta$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació d'Ero1 $\alpha$  es troba normalitzada respecte la  $\beta$ -actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\*  $p < 0,01$ ; \*o #  $p < 0,05$ .

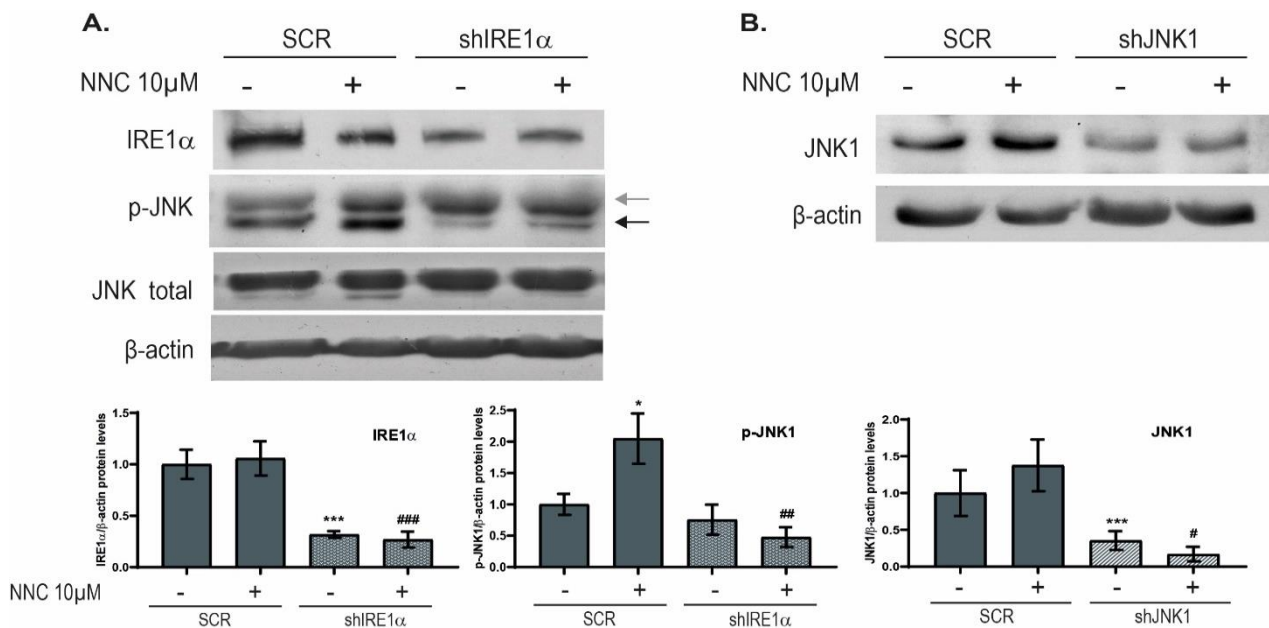
Els estudis per WB d'Ero1 $\alpha$ , mostren un augment dels nivells en el tractament amb NNC respecte el control i una lleugera disminució en els tractaments combinats respecte el tractament amb NNC sol (Fig.46). Aquest resultat suggereix doncs que Ero1 $\alpha$ , possiblement a través de CHOP, poden ser els desencadenants per activar CaMKII i JNK *downstream*. Per tal de corroborar-ho vam realitzar una ICQ contra el factor de transcripció CHOP, que transloca a nucli quan es troba actiu. Els resultats mostren una clara marcatge nuclear en el tractament amb NNC, absent en les cèl·lules control, indicatiu de que el factor de transcripció es troba actiu. Per tal de validar si l'activació de CHOP es troba per sobre o per sota de l'alliberació de Ca<sup>2+</sup> pels IP<sub>3</sub>Rs, també vam realitzar la ICQ en cèl·lules tractades amb NNC en combinació amb XeC o 2-APB (ambdós inhibidors dels receptors IP<sub>3</sub>Rs). Tal com es pot observar en la ICQ, CHOP transloca igualment a nucli malgrat l'aplicació d'inhibidors d'IP<sub>3</sub>Rs en presència de NNC (Fig.47). En conjunt, aquests resultats indiquen que CHOP es troba *upstream* en la via, inclús per sobre de l'activació dels IP<sub>3</sub>Rs i suggereix que la seva activació porta a la d'Ero1 $\alpha$ .



**Figura 47: NNC induïx la translocació nuclear de CHOP.** Immunocitoquímica contra CHOP i Hoechst (nuclis) en cèl·lules A172 tractades amb NNC 10 μM en combinació amb 2-APB 40 μM o XeC 5 μM durant 8h. Barra= 50 μm.

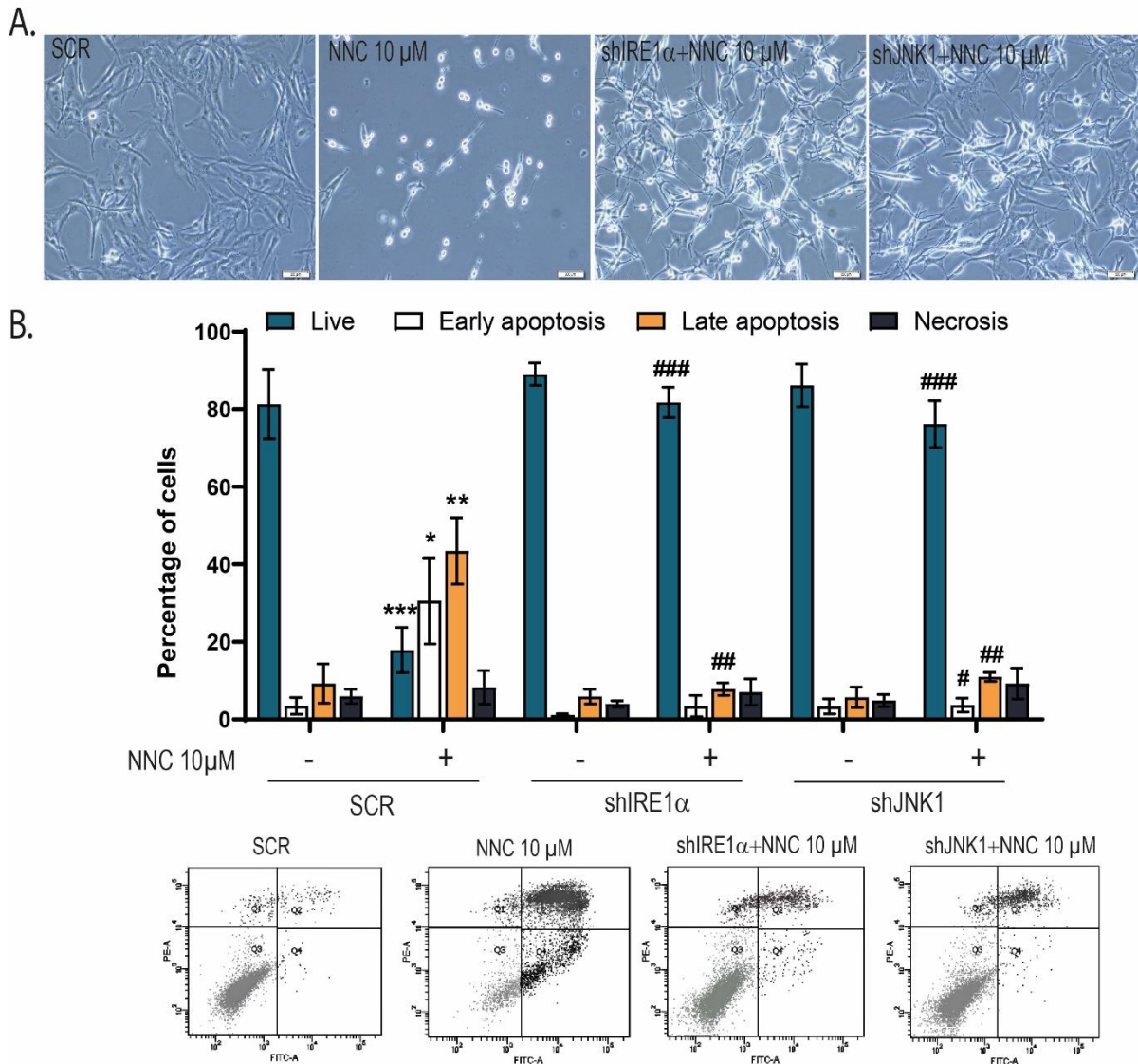
## 2.6 El silenciament d'IRE1α i JNK1 evita la mort per NNC.

Per tal de corroborar que és específicament JNK1 qui juga un paper en la inducció apoptòtica per NNC, vàrem silenciar la línia de glioblastoma A172 amb un shRNA contra aquesta isoforma. A més a més, per discernir si IRE1α també formava part en l'equació (donat que s'activa amb NNC però la seva activació no es rescata pels inhibidors), també vàrem silenciar-lo. Les cèl·lules silenciades tant per JNK1 com per IRE1α van ser tractades amb NNC a la concentració citotòxica de 10 μM. Tal com es pot observar en els WBs hi ha un silenciament força eficient, d'un 70% aproximadament, tant d'IRE1α (Fig.48 A) com de JNK1 (Fig.48 B) respecte les cèl·lules que expressen un shRNA *Scrambled* (SCR) o control. El silenciament d'IRE1α va acompanyat d'una disminució en la fosforilació de JNK1 en presència de NNC, indicant que el seu silenciament és capaç d'inhibir la via (almenys parcialment) i que NNC té un efecte sobre el receptor IRE1α que acaba activant JNK1 (Fig.48 A). A més a més, el tractament amb NNC 10 μM a 36 hores produeix una mort molt inferior en les cèl·lules silenciades (tant per IRE1α com JNK1) tal com s'observa en les fotos en contrast de fase (Fig.49 A).



**Figura 48: Silenciament d'IRE1α i JNK1.** A) Cèl·lules A172 control (shRNA SCR) o silenciades per IRE1α (shRNA IRE1α) van ser tractades amb NNC 10 μM durant 8h. Els lisats es van analitzar per IRE1α, pThr183/Tyr185-JNK on la banda inferior correspon a JNK1 (Fletxa negra, 46 KDa) i la banda superior a JNK2 (fletxa gris, 54 KDa) i JNK total B) Es van analitzar els nivells de JNK1 en cèl·lules A172 control (shRNA SCR) o silenciades per IRE1α (shRNA IRE1α) tractades amb NNC 10 μM durant 8h. En A) i B) la β-actina s'utilitza com a control de càrrega. La quantificació d'IRE1α, p-JNK1 i JNK1 es troba normalitzada respecte la β-actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10 μM. \*\* p<0,001; ## p<0,01 # p<0,05.

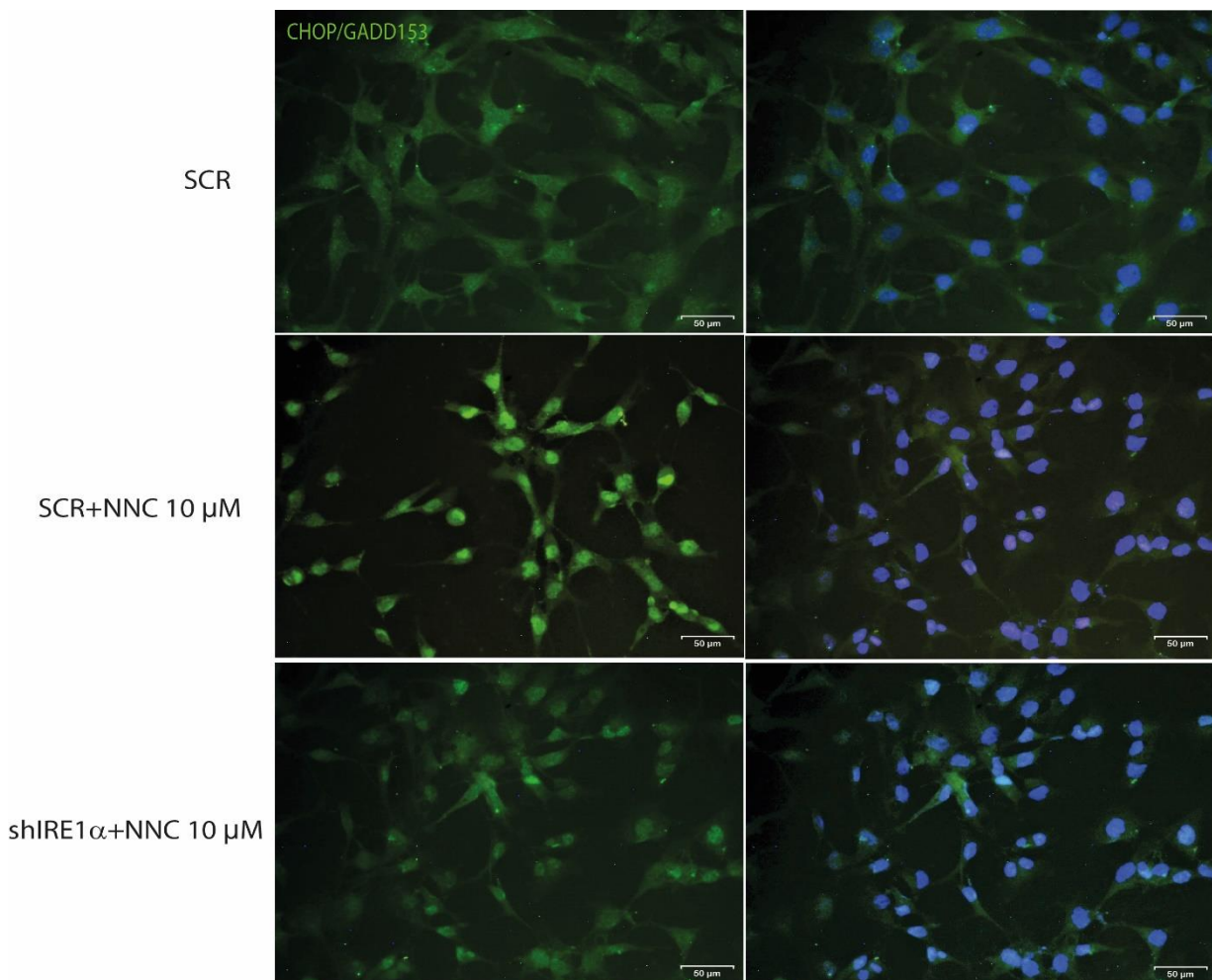
L'anàlisi per citometria de flux amb Annexina V i PI ratifica que a les 36 hores de ser tractades amb NNC 10 $\mu$ M, les cèl·lules transduïdes amb la construcció *Scrambled* (control) no arriben al 20% de vives amb el conseqüent augment en cèl·lules apoptòtiques i necròtiques. Per contra, en absència d'IRE1 $\alpha$  i JNK1 hi ha un 80% i un 75% de cèl·lules vives, respectivament, després del tractament (Fig.49 B). Aquests resultats reforcen la hipòtesi de que la via d'IRE1 $\alpha$  a través de la cinasa JNK (en concret JNK1) participen en el mecanisme apoptòtic provocat pel NNC i els identifiquen com a interruptors moleculars clau en aquest procés.



**Figura 49: IRE1 $\alpha$  i JNK1 són necessaris per a la mort causada NNC.** Cèl·lules de la línia A172 control (shRNA SCR) o silenciades per IRE1 $\alpha$  (shRNA IRE1 $\alpha$ ) o JNK1 (shJNK1) es van tractar amb NNC 10  $\mu$ M durant 36h. A. Imatges representatives en contrast de fase de les cèl·lules tractades a les 36h. Barra= 200  $\mu$ m. B) Les cèl·lules es van analitzar per AnnexinaV/PI per tal de calcular la població cel·lular viva, en apoptosi propera, tardana i necròtiques. També es mostren imatges significatives dels perfils de citometria de flux amb la tinció per AnnexinaV en l'eix X i la de PI en l'eix Y. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10  $\mu$ M. \*\*\* o ### p<0,001, \*\* o ## p<0,01 i \*o # p<0,05.

## 2.7 El silenciament d'IRE1 $\alpha$ evita l'activació del factor de transcripció CHOP.

Els resultats previs indiquen que CHOP i Ero1 $\alpha$  a través de la sortida de Ca<sup>2+</sup> pels IP<sub>3</sub>Rs activen CaMKII i acaben promovent la fosforilació de JNK. Per tal de conèixer la funció d'IRE1 $\alpha$  en la cascada de senyalització, vam tornar a realitzar la ICQ contra CHOP però en cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  i tractades amb NNC. Els resultats mostren un clar marcatge nuclear en el tractament de les cèl·lules SCR (*Scrambled*, o control), mentre que en les cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  els nivells de CHOP nuclear són molt menors (Fig.50). Aquests resultats assenyalen que el silenciament d'IRE1 $\alpha$  evita l'activació i posterior translocació de CHOP a nucli, suggerint que el receptor probablement actuï a nivells *upstream* de CHOP.



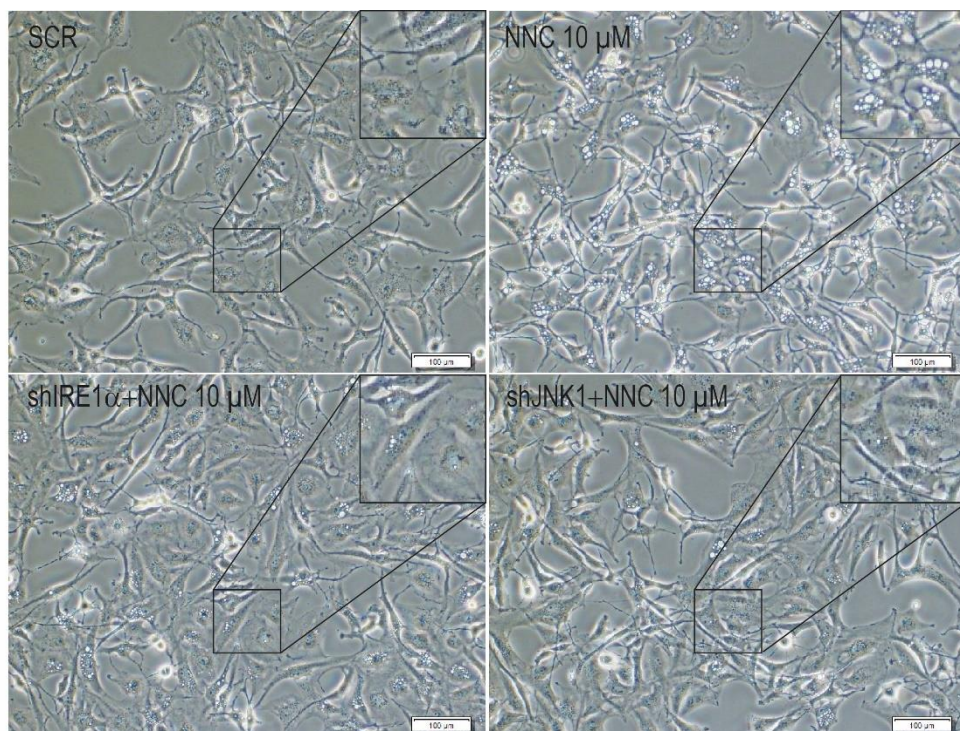
**Figura 50:** IRE1 $\alpha$  és necessari per a la translocació nuclear induïda per NNC 10  $\mu$ M. Immunocitoquímica contra CHOP i Hoechst (nuclis) en cèl·lules A172 control (shRNA SCR) i silenciades per IRE1 $\alpha$  (shRNA IRE1 $\alpha$ ) tractades amb NNC 10  $\mu$ M durant 8h. Barra=50  $\mu$ m.

## 2.8 El silenciament d'IRE1 $\alpha$ i JNK1 evita la desregulació autofàgica provocada per NNC.

Prèviament, mitjançant el co-tractament de NNC amb BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB s'ha mostrat com el Ca<sup>2+</sup> està implicat en l'alteració de l'autofàgia provocada pel NNC. En les imatges de contrast de fase de cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  i JNK1 també s'aprecia una menor formació de vacuoles en presència de NNC (Fig. 51 A) per aquest motiu a través del silenciament d'IRE1 $\alpha$  i JNK1, vam voler validar la implicació d'aquests en el procés autofàgic.

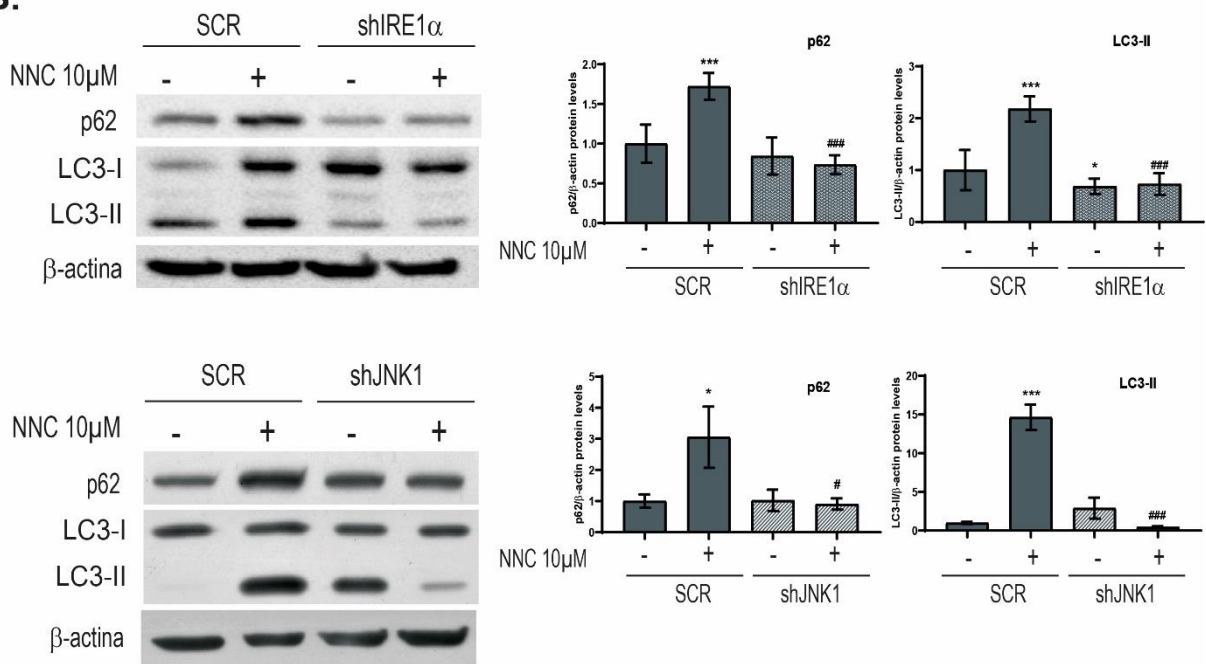
Per fer-ho, vam tractar amb NNC cèl·lules que expressen el shRNA *Scrambled* (control), IRE1 $\alpha$  o JNK1 i vam tornar a estudiar els marcadors autofàgics p62 i LC3 per WB. Un cop més, es produeix un augment dels nivells LC3-II i p62 en el tractament amb NNC de les cèl·lules control (*Scrambled* shRNA). Contràriament, en les cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  i JNK1, no es produeix aquest increment en p62 i LC3-II en presència de NNC (Fig. 51 B), tal com passava amb els inhibidors BAPTA-AM, KN-62 i 2-APB. En conclusió, les dades obtingudes suggereixen que la cascada de senyalització descrita desencadena una alteració de l'autofàgia, possiblement afectada a diversos nivells.

**A.**





**B.**



**Figura 51: IRE1α i JNK són necessaris per a la desregulació de l'autofàgia induïda per NNC 10 μM .** A) Imatges representatives en contrast de fase de la línia cel·lular A172 transduïdes amb el shRNA SCR (Scrambled), IRE1 α o JNK1 tractades amb NNC 10 μM durant 8 hores. S'observa com en les cèl·lules silenciades per IRE1α i JNK1 hi ha una menor formació de vacuoles. Barra=100 μm . B) Els lisats obtinguts a partir de les condicions especificades en (A) es van immunoblotar contra p62, LC3-II i la β-actina s'utilitza com a control de càrrega. Les quantificacions de p62 i LC3-II es troben normalitzades respecte la β-actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el control, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb NNC 10 μM. \*o # p<0,05; \*\*\*o ### p<0,001.

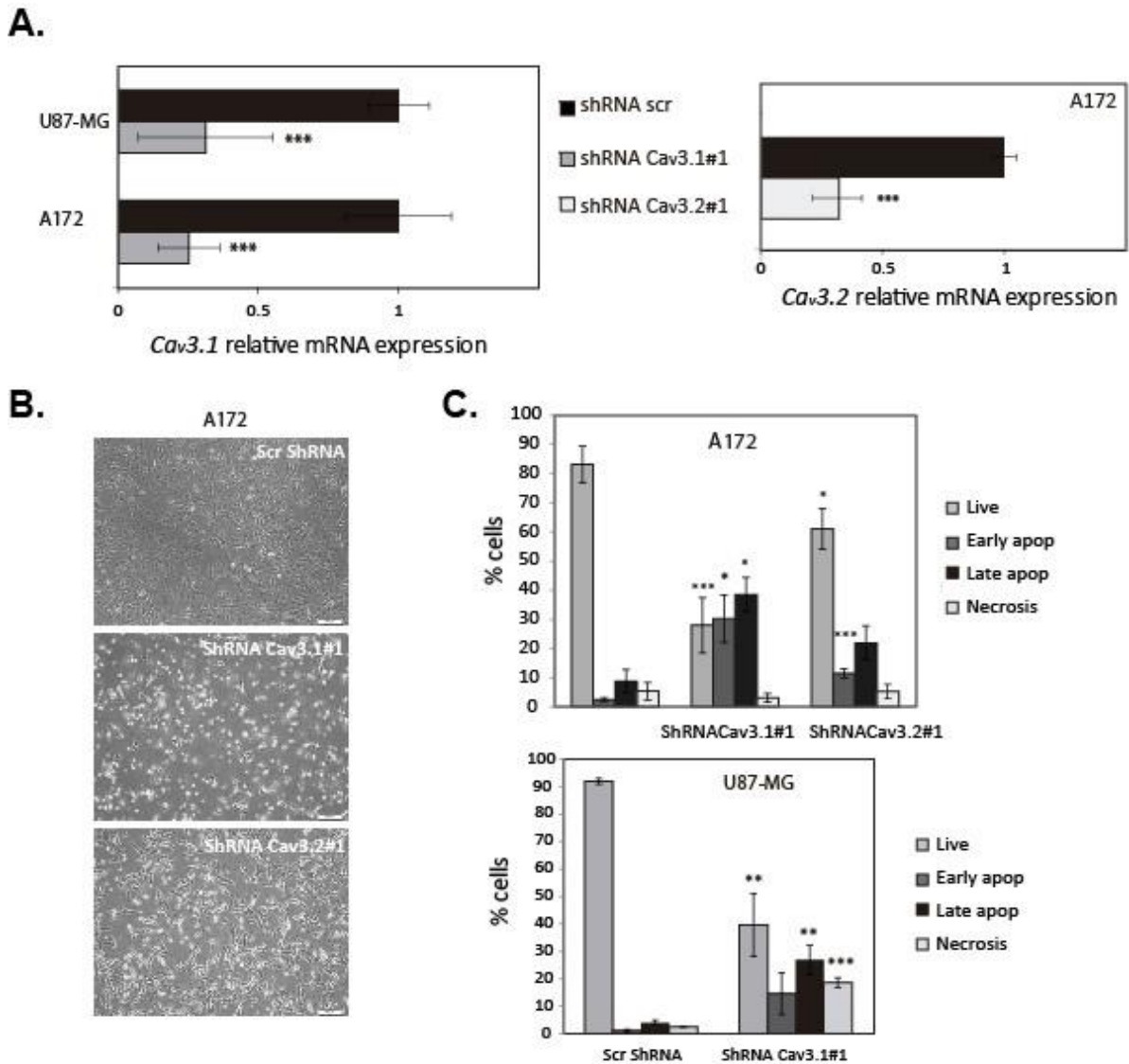
## **Capítol 3:**

**El silenciament gènic de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  promou apoptosi  
en cèl·lules de glioblastoma.**



### 3.1 El silenciament de $Ca_v3.1$ i $Ca_v3.2$ promou apoptosi en cèl·lules adherents i neuroesferes de glioblastoma.

Per tal de comprovar que la mort cel·lular provocada per NNC era deguda a l'efecte sobre els TTCCs i no un possible efecte *off-target*, vam silenciar les línies de glioblastoma A172 i U87-MG amb shRNAs per  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$ . A més a més, vam validar els resultats amb dues seqüències de shRNA diferents, tant per  $Ca_v3.1$  com per  $Ca_v3.2$ , els quals vam anomenar shRNA  $Ca_v3.1\#1$  i

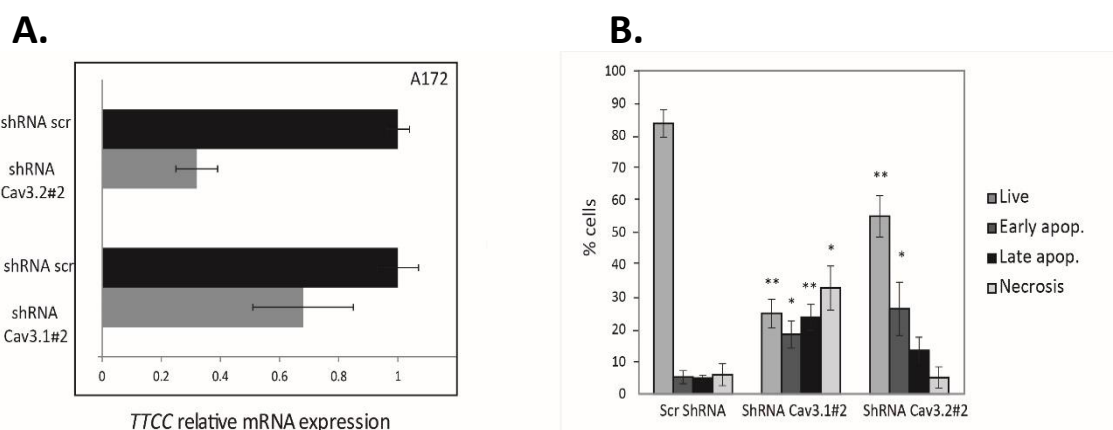


**Figura 52: El silenciament de  $Ca_v3.1$  per shRNAs, i en menor mesura de  $Ca_v3.2$ , indueix mort cel·lular.** A) shRNAs de  $Ca_v3.1\#1$  (esquerra) i  $Ca_v3.2\#1$  (dreta) redueix significativament els nivells de mRNA de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$ , respectivament, en línies cel·lulars de glioblastoma (U87-MG i A172) comparat amb el shRNA SCR, a dia 4 després de la infecció lentiviral. B-C) Fotos de contrast de fase. Barra= 200  $\mu$ m (B) i assaig d'Annexina V/PI (C) indiquen que el silenciament de l'expressió de  $Ca_v3.1$  (utilitzant shRNA  $Ca_v3.1\#1$ ) i, en menor mesura, el silenciament de  $Ca_v3.2$  (shRNA  $Ca_v3.2\#1$ ), indueix apoptosi en comparació amb el control (shRNA Scrambled, SCR) en les línies cel·lulars A172 i U87-MG. L'assaig d'Annexina/PI es va dur a terme després de 6 dies d'infecció. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Ca<sub>v</sub>3.2#1 per la primera seqüència i Ca<sub>v</sub>3.1#2 i Ca<sub>v</sub>3.2#2 per la segona. El shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1 va disminuir entre un 60% i un 80% l'expressió del canal en les línies U87-MG i A172, respectivament (Fig.52 A). D'altra banda, el shRNA de Ca<sub>v</sub>3.2 seqüència 1 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.2#1) només va poder ser testat en la línia de glioblastoma A172, ja que és l'única que presenta expressió d'ambdós canals (en U87-MG només es detecta el Ca<sub>v</sub>3.1) reduint l'expressió del canal fins al 30% aproximadament (Fig.52 A).

Tal com es pot observar en les fotos de contrast de fase (Fig.52 B), el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 va acompanyat d'una marcada mort cel·lular als 6 dies des de la infecció lentiviral amb el shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1 tant en la línia cel·lular A172 com en l'U87-MG. Vam valorar aquests resultats mitjançant citometria de flux utilitzant el marcatge amb Annexina V i iodur de propidi (PI) i vàrem calcular el percentatge de cèl·lules vives, en apoptosi inicial, tardana o necrosi en les cèl·lules que expressaven el shRNA Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 i el SCR (o control). En les cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 hi ha una disminució de cèl·lules vives d'entre un 60% i un 70% respecte les control (SCR) acompanyat d'un augment en apoptosi primerenca i tardana (Fig.52 C). El silenciament de Ca<sub>v</sub>3.2 també va produir mort cel·lular en la línia A172 però en menor mesura, amb una disminució del 30% de cèl·lules vives amb el consegüent augment en cèl·lules apoptòtiques (Fig.52 C).

Tots aquests resultats van ser validats amb la seqüència 2 (#2) d'ambdós canals. El silenciament produït pel shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#2 és menys eficient comparat amb el de la primera seqüència (Ca<sub>v</sub>3.1#1), amb una reducció de l'expressió del canal d'aproximadament el 30% en les cèl·lules A172 (Fig. 53 A). D'altra banda, el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.2#2 és similar al de la primera seqüència

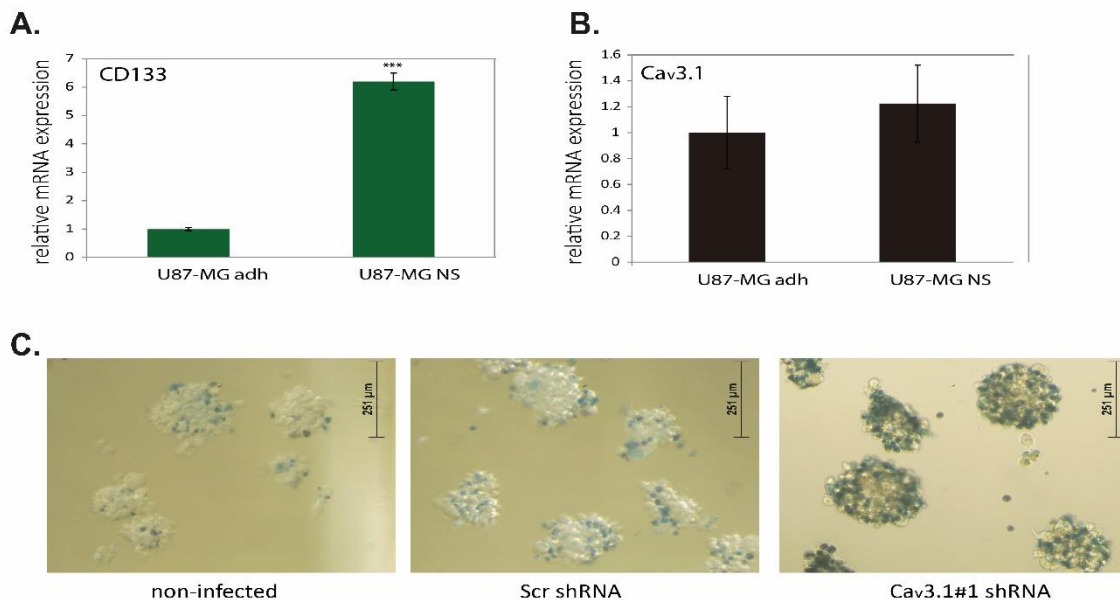


**Figura 53: El silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 per shRNAs, i en menor mesura Ca<sub>v</sub>3.2, indueix mort cel·lular.** A) Els shRNAs de Ca<sub>v</sub>3.1#2 i Ca<sub>v</sub>3.2#2 redueixen l'expressió de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2, respectivament, en la línia A172 en comparació amb el shRNA SCR a dia 4 d'infecció (n=2). B) L'assaig d'Annexina V/PI indica que silenciant l'expressió de Ca<sub>v</sub>3.1 (utilitzant shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#2) i, en menor mesura, Ca<sub>v</sub>3.2 (shRNACa<sub>v</sub>3.2#2), indueixen apoptosi en les cèl·lules A172 en comparació amb els controls (shRNA Scrambled, SCR) a dia 7 de la infecció. \* p<0,05; \*\*, p<0,01.

(Ca<sub>v</sub>3.2#1) reduint també l'expressió del canal fins al 30% aproximadament (Fig.53 A). Els silenciaments amb la segona seqüència de shRNAs indueixen una mort cel·lular similar a la de la primera seqüència: amb una reducció d'un 70% i un 30% aproximadament de cèl·lules vives pel shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#2 i Ca<sub>v</sub>3.2#2, respectivament (Fig.53 B). En conjunt, aquests resultats mostren la implicació de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 en la supervivència cel·lular en les cèl·lules de glioblastoma.

Adicionalment als cultius adherents de glioblastoma, es van créixer neuroesferes (NS) derivades de cultius adherents d'U87-MG. Aquest model ens permet estudiar el comportament dels TTCCs en cultius de cèl·lules mare. Primerament vàrem confirmar l'expressió del marcador de *stemness* CD133 per RT-qPCR en NS a dia 6 post-infecció, amb un increment de 6 vegades del marcador en NS comparat amb els cultius adherents d'U87-MG (Fig.54 A). L'anàlisi de l'expressió de Ca<sub>v</sub>3.1 per RT-qPCR indica que l'expressió d'aquesta isoforma en NS és similar a la del cultiu adherent (Fig.54 B). A més a més, l'expressió de Ca<sub>v</sub>3.2 es manté indetectable en les NS U87-MG, tal com passa en el cultiu adherent d'U87-MG.

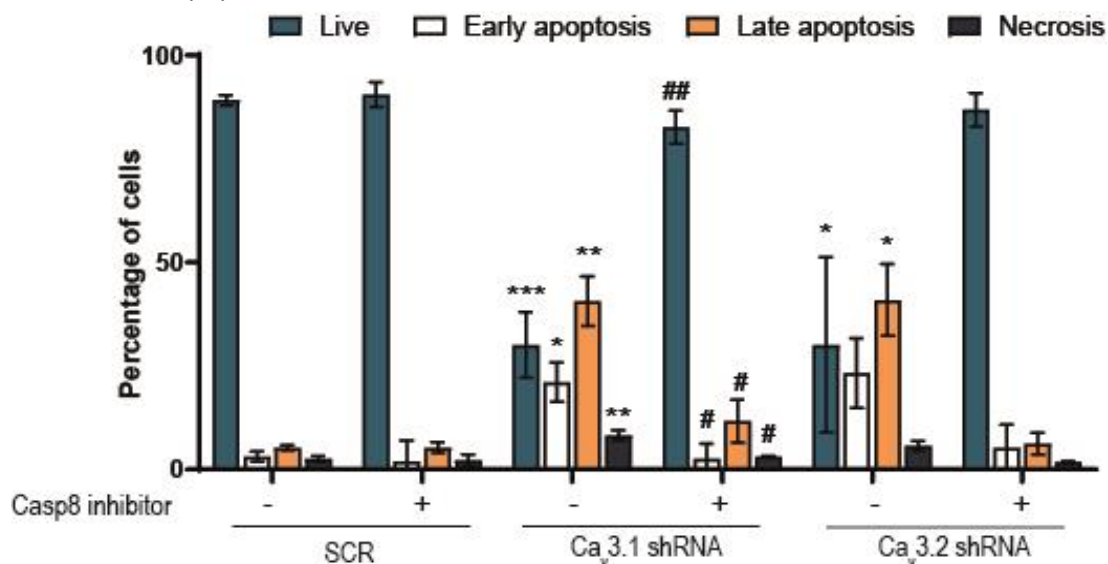
Per avaluar l'efecte del silenciament sobre la viabilitat de les NS, cèl·lules U87-MG transduïdes amb lentivirus que portaven shRNAs SCR o contra Ca<sub>v</sub>3.1#1 es van créixer en flotació per a formar NS durant 7 dies. En aquest punt les cèl·lules mortes es van marcar mitjançant la tinció



**Figura 54: Les neuroesferes (NS) d'U87-MG silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1, mostren una major mort cel·lular.** A) Les NS d'U87-MG presenten uns majors nivells dels transcripats de CD133 detectats per RT-qPCR comparat amb el cultiu d'U87-MG adherent. B) L'anàlisi per RT-qPCR de Ca<sub>v</sub>3.1 en NS d'U87-MG en comparació al cultiu adherent indica que l'expressió de TTCCs no canvia significativament entre els dos cultius (Ca<sub>v</sub>3.2 es manté indetectable en les NS d'U87-MG tal com passa amb la línia adherent; n=5) C) Les NS de cèl·lules no infectades o cèl·lules infectades amb lentivirus que porten la construcció shRNA Scrambled (Scr control) o shRNA de Ca<sub>v</sub>3.1#1 es van tnyir amb Blau tripà després de 7 dies d'infecció. Barra=251 µm.

de Blau de tripà, confirmant que les NS generades a partir de cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 presentaven una major inducció de mort cel·lular que les NS generades a partir de cèl·lules no infectades o infectades amb el lentivirus que contenia el shRNA SCR (*Scrambled* o control) (Fig.54 C). En resum, aquests resultats ressalten la importància del canal Ca<sub>v</sub>3.1 en la viabilitat tant del cultiu de glioblastoma adherent, com en el model que mimetitza el cultiu de cèl·lules mare.

Finalment, per validar que la mort provocada pel silenciament gènic de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 era apoptòtica, vàrem tractar les cèl·lules transduïdes amb la construcció shRNA SCR, Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 amb l'inhibidor de caspasa 8. La caspasa 8 és una cisteïna proteasa que juga un paper crucial en la iniciació de la senyalització apoptòtica per la via extrínseca mitjançant receptors de mort (Kominami et al., 2012). Donat que la mort induïda al sisè dia per la transducció de les construccions shRNACa<sub>v</sub>3.1#1 i shRNACa<sub>v</sub>3.2#1 es caracteritza per ser massiva i abrupta, es vàren tractar les cèl·lules al cinquè dia des de la infecció lentiviral i 24 hores després es va realitzar l'assaig d'Annexina V/PI per citometria de flux. Els resultats indiquen un rescat pràcticament total de la mort provocada pel silenciament dels TTCCs, especialment del Ca<sub>v</sub>3.1 en presència de l'inhibidor de caspasa 8 (Fig.55). En resum, aquests resultats corroboren que la mort induïda pel silenciament dels TTCCs és apoptòtica i acoten que possiblement es produeixen a través de via apoptòtica extrínseca.

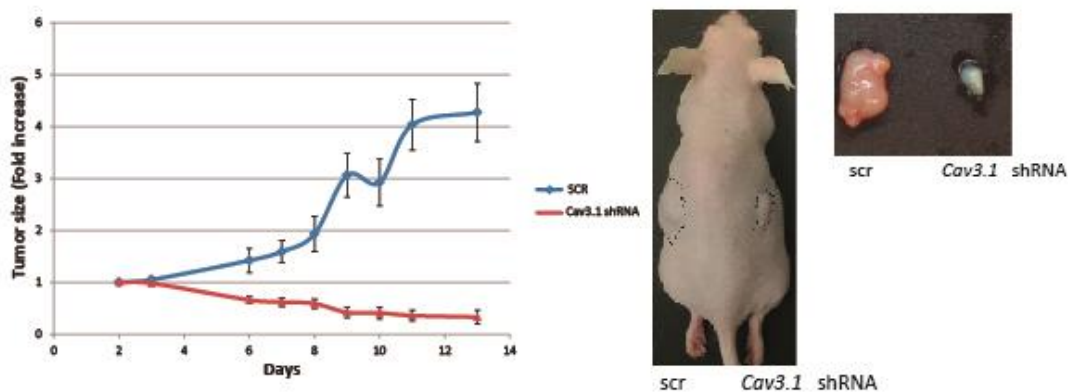


**Figura 55: La mort induïda pel silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 és a través de la via apoptòtica extrínseca.** Cèl·lules de la línia A172 control (shRNA SCR) o silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1) i Ca<sub>v</sub>3.2 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.2#1) es van tractar amb l'inhibidor de caspasa 8 a una concentració de 10 mM al cinquè dia des de la infecció lentiviral. 24h després, es van analitzar per Annexina V/PI per tal de calcular la població cel·lular viva, en apoptòtica, tardana i necròtiques. Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. \* Indica que el valor p es compara respecte el SCR (shRNA Scrambled, control), mentre que amb # el p es compara respecte les cèl·lules silenciades per Cav3.1 \*\*\* p<0,001, \*\* o ## p<0,01 i \*o # p<0,05.

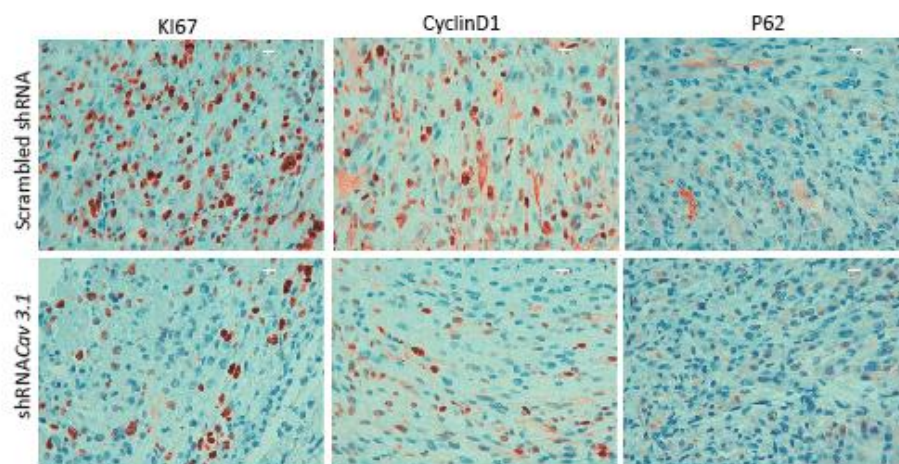
### 3.2 El silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 disminueix el creixement tumoral de glioblastoma in vivo.

A la llum dels efectes observats en la viabilitat cel·lular del glioblastoma quan es silencia l'expressió de Ca<sub>v</sub>3.1, es van realitzar experiments de *xenografts* en ratolins SCID per tal d'avaluar l'efecte de la depleció de Ca<sub>v</sub>3.1 en el desenvolupament tumoral. Per tal de validar *in vivo* els resultats observats *in vitro*, es va utilitzar la línia cel·lular U87-MG que només expressa nivells detectables de Ca<sub>v</sub>3.1. Es van generar tumors a partir de cèl·lules que expressen la construcció shRNA SCR (control) i la construcció shRNA contra Ca<sub>v</sub>3.1 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1), que es van mesurar des del dia 2 fins al dia 15. Els tumors formats a partir de cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 mostren una aturada en el creixement comparat amb els tumors control (expressen un shRNA *Scrambled*, SCR) (Fig.56 A). En consonància, l'immunomarcatge contra els marcadors de proliferació Ki67 i Ciclina D1 en els tumors extrets dels ratolins, posa de manifest una reducció de les cèl·lules positives per Ki67 i Ciclina D1, d'aproximadament el 30%, en els tumors on Ca<sub>v</sub>3.1 es troba deplecionat respecte els tumors control (Fig.56 B). A més, les seccions de tumors que procedien de cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 mostren una reducció de la immunotinció de p62 (Fig.56B), d'acord amb resultats *in vitro* del grup on el silenciament del Ca<sub>v</sub>3.1 en línies cel·lulars de glioblastoma presenten uns menors nivells de p62 en mRNA i proteïna (Visa, Sallán et al., 2019). En conclusió, la reducció de la mida tumoral i els marcadors de proliferació en el model de *xenografts* de ratolí quan Ca<sub>v</sub>3.1 està absent, demostra que Ca<sub>v</sub>3.1 és important per al creixement tumoral *in vivo* i reforça els resultats obtinguts *in vitro*.

A





**B**

**Figura 56: El silenciament de  $Ca_v3.1$  redueix la mida del tumor.** A) Esquerra, gràfic del creixement tumoral al llarg del temps en xenografts de ratolí formats per cèl·lules U87-MG (control o silenciades per  $Ca_v3.1$ ) calculat en funció de la mida del tumor a dia 2 des de la inducció tumoral. Dreta, fotos representatives d'un ratolí al que se li han generat xenografts a partir de cèl·lules U87-MG transduïdes amb la construcció SCR shRNA (control) o el shRNA  $Ca_v3.1\#1$  a cada flanc. Els tumors es van deixar créixer fins a 13 dies. Es mostren exemples representatius dels tumors en cada condició B) Els tumors es van extreure i es van preparar per a la immunotinció. Les immunotincions són contra Ki67, Cyclina D1 i p62 en tumors control (shRNA Scrambled) o silenciats per  $Ca_v3.1$  (shRNA  $Ca_v3.1\#1$ ). Barra= 50  $\mu$ m. Els tumors a partir de  $Ca_v3.1$  deleccionat en cèl·lules U87-MG presenten una menor immunotinció dels marcadors proliferatius, Ki67 ( $72,7 \pm 6,7\%$ ) i Cyclina D1 ( $68,3 \pm 13,5\%$ ), i per p62 ( $29 \pm 12,3\%$ ).

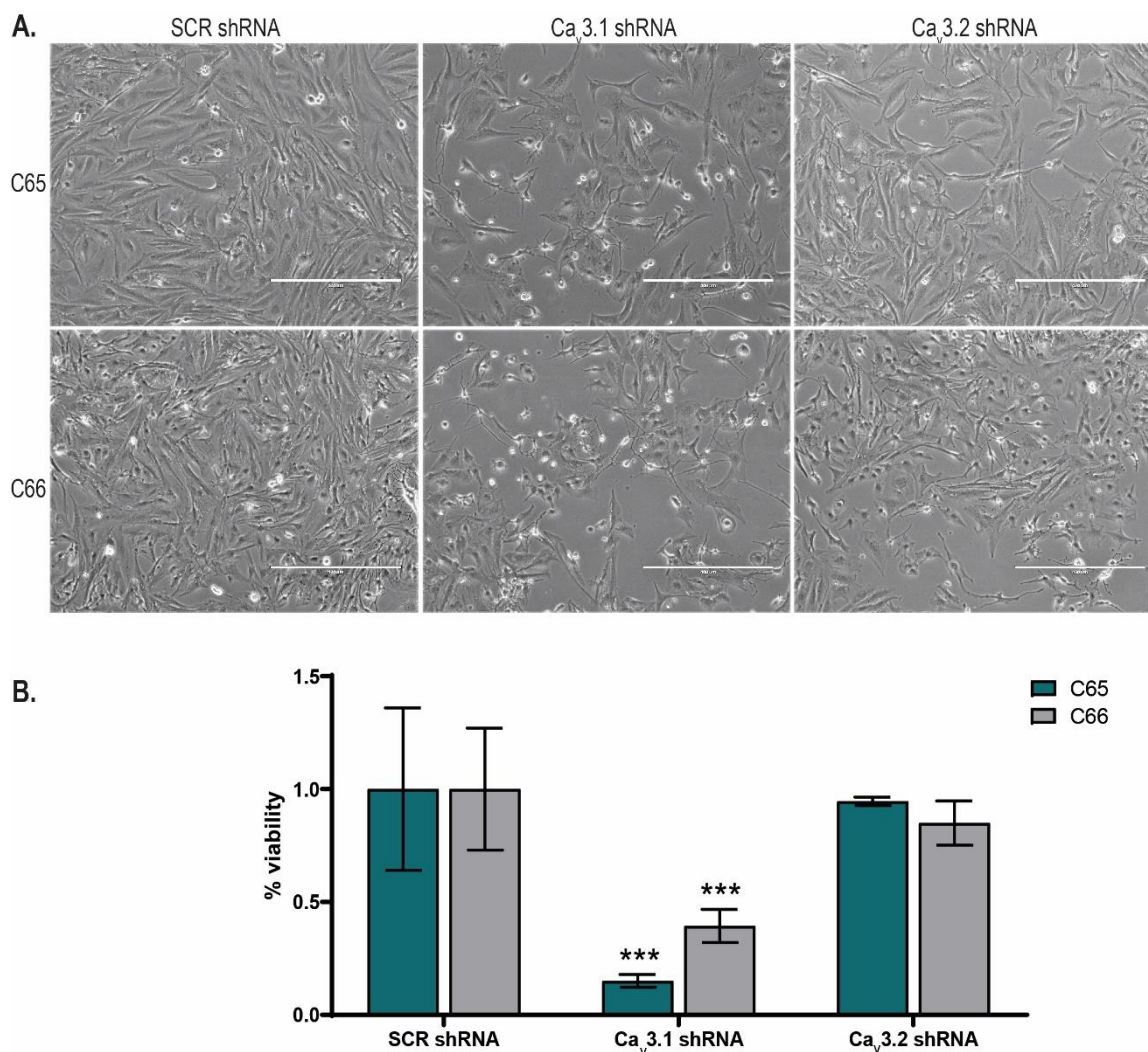
## **Capítol 4:**

**El silenciament gènic de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  en cultius de glioblastoma promou senescència.**



#### 4.1 El silenciament de $Ca_v3.1$ i $Ca_v3.2$ afecten la viabilitat dels cultius primaris de glioblastoma.

En base als resultats previs on el silenciament de  $Ca_v3.1$  (i en menor mesura  $Ca_v3.2$ ) provoquen una mort massiva en les línies de glioblastoma A172 i U87-MG, així com la reducció del creixement tumoral en els experiments *in vivo*, ens va semblar rellevant estudiar el silenciament d'aquests canals en un model més proper a la malaltia, com són els cultius primaris de pacients. El nostre grup va establir un acord amb la Unitat de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV) per a la cessió de mostres de malalts operats d'un glioma. El teixit derivat de la cirurgia és disgregat i posat en cultiu per tal d'establir cultius primaris adherents derivats de biòpsies de pacients.

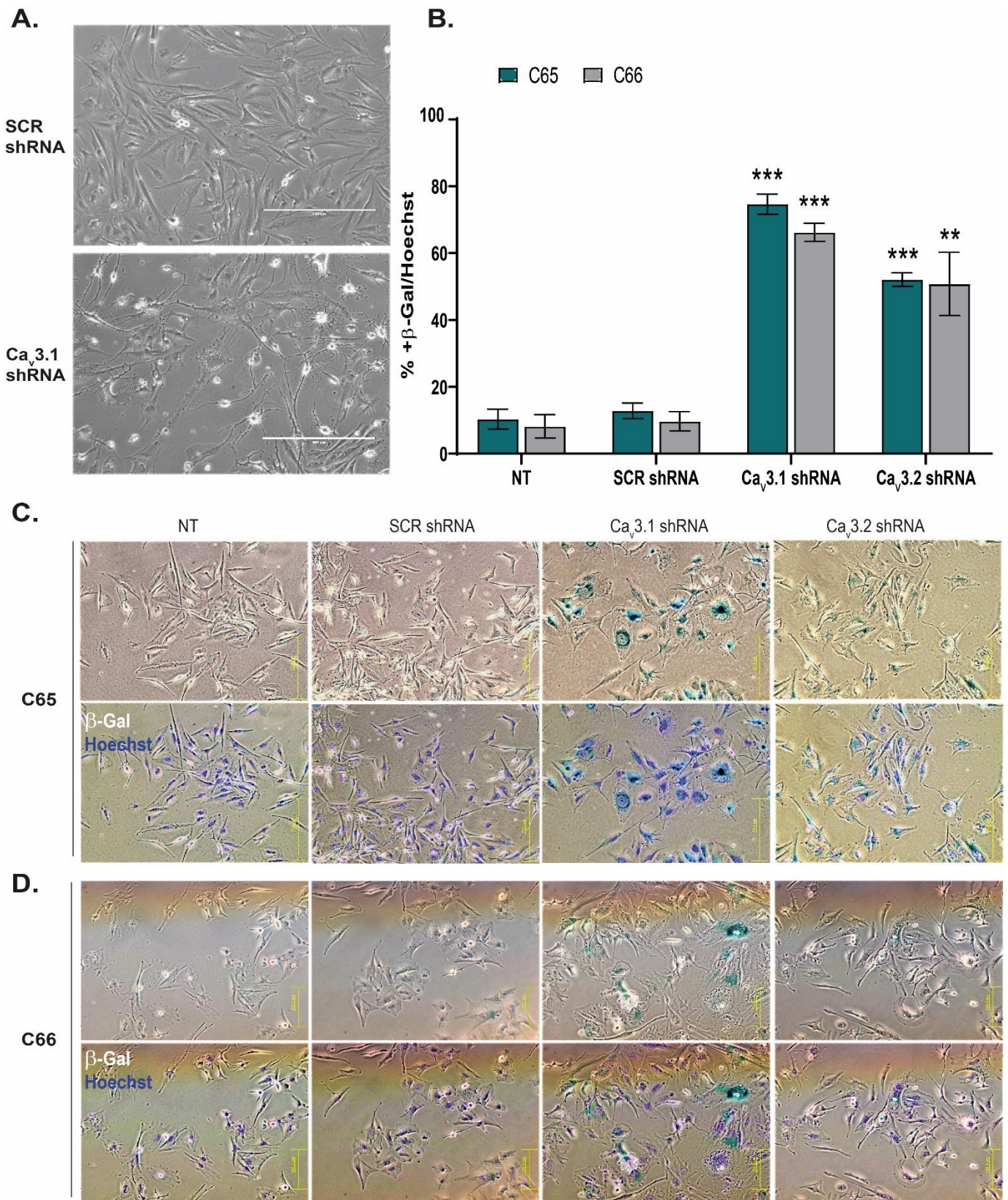


**Figura 57: El silenciament de  $Ca_v3.1$  disminueix la viabilitat en cultius primaris de glioblastoma.** Cultius primaris de glioblastoma C65 i C66 a dia 8 després de la infecció lentiviral amb la construcció shRNA Scrambled (SCR, control), shRNA  $Ca_v3.1\#1$  i shRNA  $Ca_v3.2\#1$ . A) Imatges representatives. Barra=400  $\mu$ m B) Assaig de viabilitat amb el reactiu WST-1. Les barres indiquen mitjana  $\pm$  s.e.m. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Per als següents experiments es van utilitzar dos cultius primaris de glioblastoma que provenen de diferents pacients: el C65 i el C66. Sorprenentment, després de 15 dies d'infecció lentiviral d'aquests cultius no es va produir mort cel·lular en les cèl·lules silenciades pel gen  $Ca_v3.1$  (shRNA  $Ca_v3.1\#1$ ) o  $Ca_v3.2$  (shRNA  $Ca_v3.2\#1$ ) tal com es pot observar en les imatges de contrast de fase (Fig.57 A). Tanmateix, sí que s'aprecia com a partir dels 8 dies, els cultius silenciats pels canals (tant del  $Ca_v3.1$  com del  $Ca_v3.2$ ), presenten una menor confluència respecte el cultiu control (shRNA *Scrambled*, SCR), i el control no transduït (NT) (Fig.57 A). És per aquest motiu que es va realitzar un assaig de viabilitat utilitzant el reactiu Wst-1 als 8 dies d'infecció lentiviral. Els resultats mostren que les cèl·lules silenciades pel gen  $Ca_v3.1$  presenten una marcada disminució de la viabilitat tant en el C65 com en el C66, d'aproximadament un 80% i un 60% respectivament en comparació amb les cèl·lules transduïdes amb la construcció shRNA SCR (*Scrambled*, control) (Fig.56 B). En el cas de les cèl·lules silenciades pel gen  $Ca_v3.2$  hi ha una tendència a una menor viabilitat respecte les cèl·lules que expressen la construcció SCR (*Scrambled*, control), especialment en el C66, malgrat no arriba a ésser significativa (Fig. 57 B). En resum, el silenciament dels TTCCs, principalment de  $Ca_v3.1$ , afecta la viabilitat de cultius primaris de glioblastoma d'acord amb d'altres estudis on es descriu la importància d'aquests canals en la proliferació i viabilitat de cèl·lules tumorals (Panner et al., 2005; Li et al., 2011a; Das et al., 2012; Niklasson et al., 2017; Zhang et al., 2017; Hu et al., 2018; Sallán et al., 2018; Visa, Sallán et al., 2019).

#### 4.2 El silenciament de $Ca_v3.1$ i $Ca_v3.2$ en cultius primaris de glioblastoma produeix un fenotip compatible amb senescència.

Als 15 dies des de la infecció lentiviral, l'afectació de la viabilitat va acompanyada d'un canvi de morfologia amb un pronunciat increment de la mida d'algunes cèl·lules que es tornen més aplanades i vacuolitzades (Fig.58 A). La potencial aturada en la proliferació de les cèl·lules silenciades pels TTCCs (especialment les de  $Ca_v3.1$ ), juntament amb els canvis morfològics com l'augment de mida cel·lular, són característics del fenotip senescent. Cal destacar que la disminució de la proliferació degut a l'arrest cel·lular propi de la senescència és compatible amb la funció descrita pels TTCCs en el cicle cel·lular, on aquests canals poden representar un mecanisme per a l'increment de  $Ca^{2+}$  necessari per la transició  $G_1$ -S (Richard et al., 1992; Kuga et al., 1996; Rodman et al., 2005).



**Figura 58: El silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 promou l'acumulació del marcador de senescència β-gal.** A) Fotos en contrast de fase representatives de la morfologia adquirida en cèl·lules silenciades per shRNACa<sub>v</sub>3.1#1 a dia 15 en el C65. Barra= 400 µm B) Quantificació d'assaig de β-gal en cèl·lules de cultiu primari de glioblastoma C65 i C66 a dia 15 després de la transducció lentiviral amb les construccions shRNA SCR (Scrambled, control), shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1 i shRNA Ca<sub>v</sub>3.2#1 i en cèl·lules no transduïdes (NT). La quantificació representa el percentatge de cèl·lules positives per β-gal en relació al nombre total de cèl·lules tenyides amb Hoechst (nucli). Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. \*\* p<0,01 i \*\*\*p< 0,001. C-D) Imatges representatives de cada condició amb la tinció β-gal amb i sense Hoechst (nucli). Barra =78,4 µm (C),barra =100 µm(D).

El conjunt d'aquests factors ens va portar a l'estudi de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), un marcador característic de senescència. L'assaig es basa en l'activitat d'una variant de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa actiu a pH 6,0 present en les cèl·lules senescentes. L'increment de lisosomes, permet la detecció de la  $\beta$ -gal a un pH subòptim (pH 6,0), que possiblement reflecteix l'augment d'autofàgia en cèl·lules senescentes juntament amb l'augment de mida dels lisosomes (Lee et al., 2006; Young et al., 2009). La presència d'aquest enzim transforma el compost X-gal en un precipitat blau que tenyeix les cèl·lules.

Es va realitzar l'assaig  $\beta$ -gal en cèl·lules del C65 i C66 silenciades durant 15 dies (temps que tarda en aparèixer un fenotip compatible amb senescència) pels TTCCs Ca<sub>v</sub>3.1 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1) i Ca<sub>v</sub>3.2 (shRNA Ca<sub>v</sub>3.2#1), cèl·lules control transduïdes amb el shRNA *Scrambled* (SCR) i no transduïdes (NT). Tant el silenciament del gen Ca<sub>v</sub>3.1 com Ca<sub>v</sub>3.2 produeix un augment en el nombre de cèl·lules positives per  $\beta$ -gal, sent major en les cèl·lules silenciades per canal Ca<sub>v</sub>3.1, amb un increment aproximat del 65% pel C65 i del 55% pel C66 en relació als seus respectius controls (*Scrambled* shRNA, SCR). En les cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.2, hi ha un increment del 40% aproximadament respecte el control en els dos casos primaris (C65 i C66) (Fig.58 B).

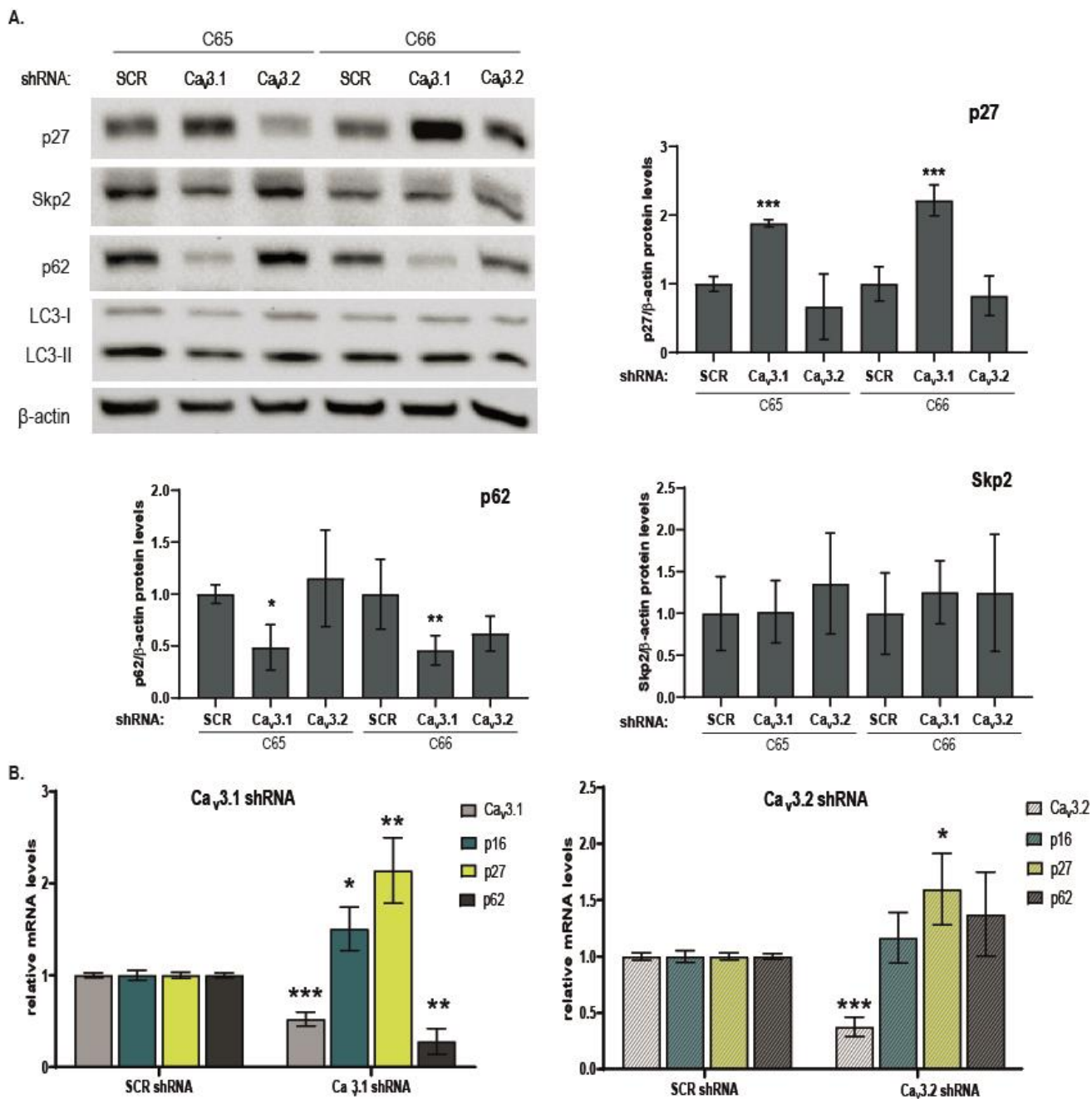
Altres marcadors canònics de senescència que ajuden a identificar cèl·lules senescentes són els inhibidors de CDKs tals com p21, p16 (Nardella et al., 2011; Noren Hooten and Evans, 2017) i en el cas de la senescència induïda per teràpia, especialment p27 (també anomenat com p27<sup>Kip1</sup> o CDKN1B) (Nardella et al., 2011; Patki et al., 2018), un conegut inhibidor del complex CDK1/Ciclina E (Lloyd et al., 1999). L'acumulació de p27, està controlada per un equilibri entre els nivells de traducció (Hengst and Reed, 1996; Nardella et al., 2011) i la seva degradació mediada pel proteasoma a través de l'E3 ubiquitin lligasa, Skp2 (*S phase kinase-associated protein 2*) (Carrano and Pagano, 2001; Wang et al., 2012). Per aquest motiu vam decidir estudiar els nivells de proteïnes de p27 i Skp2 per WB. Addicionalment, donat que autofàgia i senescència han estat àmpliament relacionades (Gewirtz, 2013; Kwon et al., 2017) també vàrem estudiar els nivells de p62 i LC3.

Els resultats mostren uns patrons d'expressió totalment diferents després del silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 en ambdós cultius primaris de glioblastoma (C65 i C66). Mentre que el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 mostra una disminució dels nivells de Skp2 acompanyat d'una acumulació dels nivells de p27, en el *knockdown* de Ca<sub>v</sub>3.2, ni Skp2 ni p27 presenten canvis significatius (Fig.58 A). En relació amb l'autofàgia, malgrat LC3-II no presenta canvis en cap de les condicions, p62 es troba disminuïda en les cèl·lules transduïdes amb la construcció shRNA Ca<sub>v</sub>3.1 i augmentada en la construcció shRNA Ca<sub>v</sub>3.2 (Fig.59 A). p62 és una proteïna a la que se

li han atribuït moltes altres funcions no relacionades amb autofàgia, tals com una correcta transició a mitosis gràcies a la seva fosforilació a través de Cdk1 (Linares et al., 2011) o com a reguladora de l'expressió de p27 (Alza et al., 2020). A més, el silenciament gènic de p62 comporta un fenotip també compatible amb senescència en cèl·lules de glioblastoma (Alza et al., 2020). Per aquest motiu, i donat que la reducció dels nivells proteics de p62 no semblava provocada per la seva degradació a través del propi procés autofàgic (ja que LC3-II no varia), vàrem estudiar els nivells de mRNA de *p62* per validar si els canvis eren a nivell transcripcional. De forma conjunta vam estudiar els nivells de *p27* mRNA, però com que p27 és un inhibidor que també s'ha associat amb un estat quiescent, addicionalment vam estudiar els nivells d'un altre inhibidor més específic i establert de senescència com és p16 (també anomenat p16<sup>INK4A</sup> o CDKN2a) (Campisi and Di Fagagna, 2007; Gorgoulis et al., 2019). L'anàlisi per RT-qPCR de tots dos inhibidors de cicle en les cèl·lules del C65 silenciades pels TTCCs Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 va mostrar una elevació dels nivells de mRNA de *p16* i *p27*, sent especialment significatiu pel shRNA de Ca<sub>v</sub>3.1 (Fig.59 B). En consonància amb els resultats de WB i amb una major tinció de β-gal en les cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 respecte el control (shRNA SCR), aquest augment d'1,5 vegades en els nivells de *p16* i d'unes 2 vegades en els de *p27*, suggereix un arrest del cicle cel·lular compatible amb un fenotip senescent en les cèl·lules deplecionades per aquest canal. A més a més, d'acord amb l'expressió proteica observada en el WB, els nivells de *p62* mRNA es troben disminuïts significativament en les cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1, tant C65 com C66 (resultat prèviament observat en línies de glioblastoma; Visa, Sallan, et al., 2019). Per contra, en les cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.2 hi ha una tendència a un increment en l'expressió de *p62* mRNA, malgrat no arriba a ser significativa. En conjunt, aquests resultats confirmen que la regulació de p62 és a nivell transcripcional (Fig.59 B).

En conclusió, el silenciament dels TTCCs Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 en cultius primaris de glioblastoma suggereix la inducció d'un fenotip senescent caracteritzat per un canvi morfològic, així com un augment de l'activitat de β-gal. En especial, en el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 aquests canvis van acompanyats d'un augment de l'expressió d'inhibidors de cicle p27 i p16 i una disminució dels nivells de p62 que recentment s'ha implicat en la modulació de l'expressió de p27 i senescència (Alza et al., 2020).





**Figura 59: El silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 promou l'acumulació dels inhibidors de cicle p16 i p27 en cultius primaris de glioblastoma.** Els cultius primaris de glioblastoma (C65 i C66) a dia 7 després de la infecció lentiviral amb la construcció shRNA Scrambled (SCR, control), shRNA Ca<sub>v</sub>3.1#1 i shRNA Ca<sub>v</sub>3.2#1 es van analitzar per A) Western Blot per tal d'analitzar els nivells proteics de p27, Skp2, p62, LC3 i β-actina, que s'usa com a control de càrrega. Les quantificacions de p27, Skp2 i p62 es troben normalitzades respecte la β-actina i els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte el SCR. Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. i B) RT-qPCR per analitzar els nivells de mRNA de Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, p16, p27 i p62. Els resultats estan normalitzats respecte els nivells de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivats de tres experiments diferents realitzats en triplicat. \*\*\*p<0,001 \*\*p<0,01; \*p<0,05.

# **DISCUSSION**



Els TTCCs han estat àmpliament descrits en relació a l'excitabilitat de membrana, especialment en el camp neurològic i cardiovascular, degut a les seves propietats caracteritzades per un rang d'activació i inactivació hiperpolaritzats respecte els d'altres canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge. Potser degut a això, els TTCCs constitueixen un mecanisme d'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  crític en cèl·lules no excitables i s'ha descrit un augment de la seva expressió durant la transició  $G_1$ -S de les cèl·lules proliferants (Lory et al., 2006; Gray et al., 2013). En conseqüència, en les últimes dècades han guanyat interès per la seva implicació en la regulació del cicle cel·lular i la supervivència de cèl·lules canceroses (Santoni et al., 2012; Sallán et al., 2018; Antal and Martin-Caraballo, 2019). Això ha provocat una recerca intensiva de la farmacologia contra els TTCCs per tal de trobar bloquejants selectius i específics contra aquests. Així com també en l'establiment de concentracions citotòxiques efectives que, tal com hem mostrat en el treball, es troben molt per sobre de les concentracions inhibidores dels TTCCs.

Entre aquestes molècules que inhibeixen els TTCCs trobem el NNC 55-0396, un anàleg del mibefradil modificat per ser més específic que el seu predecessor. El mibefradil és un antihipertensiu retirat del mercat, que se li va concedir l'estat de medicament orfe per la FDA per tal d'investigar-ne l'eficàcia contra el càncer de cervell, ovari i pàncrees. Ambdós fàrmacs han demostrat reduir la viabilitat de cèl·lules canceroses *in vitro* (Das et al., 2013; Valerie et al., 2013; Huang et al., 2015; Granados et al., 2020) i disminuir el creixement tumoral en *xenografts* de ratolí (Li et al., 2011b; Keir et al., 2013; Sheehan et al., 2013; Zhang et al., 2017; Granados et al., 2020) suggerint que els TTCCs poden ser una diana interessant en el tractament de diversos càncers, entre els quals trobem el glioblastoma. En consonància, els resultats presentats també mostren una inducció d'apoptosis en línies cel·lulars de glioblastoma quan es silencia  $\text{Ca}_v3.1$  i  $\text{Ca}_v3.2$ , així com una disminució del creixement en tumors generats a partir de cèl·lules silenciades per  $\text{Ca}_v3.1$  (Visa, Sallán et al., 2019).

Antecedents del grup realitzats amb els inhibidors NNC 55-0396 i mibefradil, també senyalen en la mateixa direcció. En aquests experiments es va establir una inducció de la mort cel·lular a una concentració citotòxica de  $10 \mu\text{M}$  per ambdues drogues, tant en les línies de glioblastoma com en la línia de glioblastoma resistent al quimioterapèutic TMZ, generada en el nostre laboratori (Visa, Sallán et al., 2019). Tanmateix, poc es coneix del mecanisme darrere d'aquesta mort massiva provocada pel bloqueig farmacològic dels TTCCs en cèl·lules canceroses (Das et al., 2013; Visa, Sallán et al., 2019).

**La baixa afinitat dels bloquejants pels canals que generen els corrents finestra és el principal culpable de la seva promiscuïtat i condueix a les elevacions citosòliques de Ca<sup>2+</sup>.**

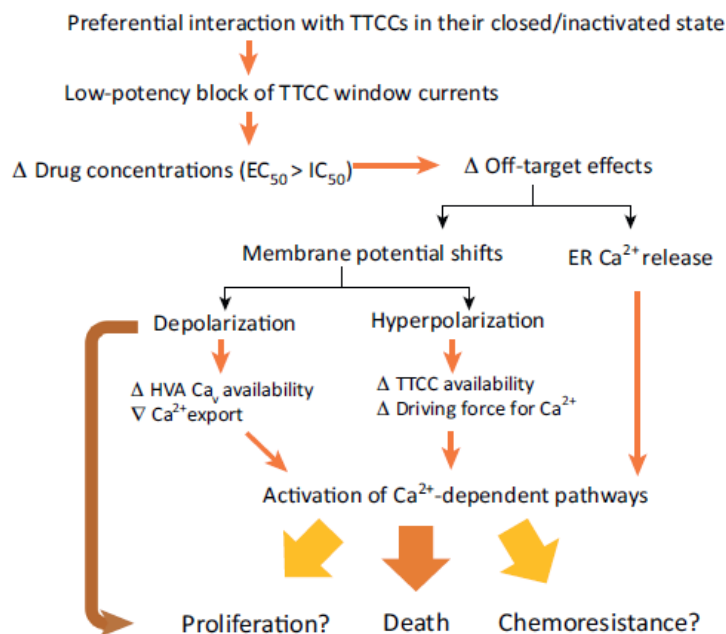
Esbrinar la senyalització de mort mitjançant el bloqueig d'aquests canals, permetria modular, potenciar i/o sinergitzar la seva acció per tal d'aconseguir una mort cel·lular més acotada, controlada i potent en la nostra diana, en aquest cas les cèl·lules de glioblastoma, però amb potencial per extrapolar-ho a altres malalties. Addicionalment, també obra la porta al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques basades en aquest coneixement.

El conjunt d'aquests factors ens va portar a l'estudi de les vies de senyalització involucrades en la mort cel·lular induïda pel bloquejant de TTCCs, NNC 55-0396. Sorprenentment i contra el que cabria esperar, el bloqueig d'aquests canals per NNC 55-0396 produeix una elevació de les concentracions de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular en la línia de glioblastoma A172, d'acord amb experiments previs en línies cel·lulars de leucèmia (Huang et al., 2015), en fibroblasts cardíacs de ratolí i plaquetes humanes (Eberhard et al., 1995). El co-tractament de les cèl·lules amb NNC 55-0396 i BAPTA-AM (un quelant del Ca<sup>2+</sup> lliure citoplasmàtic) evita la mort causada pel NNC 55-0396, senyalant així que l'ió és el desencadenant de la mort cel·lular en les línies de glioblastoma. Aquest fet va portar a plantejar-nos els possibles efectes *off-target* de la droga a les concentracions citotòxiques establertes.

En base a aquesta idea es va realitzar una extensa recerca bibliogràfica, on vam observar que les concentracions citoestàtiques/citotòxiques establertes per la majoria d'autors es troben molt per sobre de les concentracions inhibidores dels canals descrites en experiments electrofisiològics (Visa et al., 2019).

Seguint amb l'anàlisi de dades publicades, vam poder identificar que els corrents produïts pels TTCCs en cèl·lules canceroses estan generats per una petita població de canals (aproximadament un 1%) que es troben permanentment oberts i que generen els anomenats corrents finestra. Donat que tant el mibefradil com el NNC 55-0396 tenen una alta afinitat per l'estat inactiu del canal (Bezprozvanny and Tsien, 1995; Jiménez et al., 2000; Martin et al., 2000; Li et al., 2005; Kuryshv et al., 2014), el bloqueig exercit sobre els canals que participen en els corrents finestra és pobre. El preu a pagar per la baixa afinitat és l'augment de concentració amb els conseqüents efectes *off-target*, i un motiu per les discrepàncies entre les concentracions inhibidores i les citoestàtiques/citotòxiques establertes.

L'elevació de  $\text{Ca}^{2+}$  provocat per l'aplicació de NNC 55-0396 en les nostres línies és probablement degut a un efecte *off-target* d'aquest. En aquesta direcció, alguns dels efectes *off-target* inclouen desplaçaments del potencial de membrana que són responsables d'afectar els fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canals dependents i independents de voltatge, així com la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.60). De fet, l'increment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic observat pot venir per una entrada de l'ió des de l'espai extracel·lular o per un buidament dels reservoris intracel·lulars. Tant els estudis Eberhard et al., 1995 com Huang et al., 2015, conclouen que els increments de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlics provenen de reservoris intracel·lulars, ja que l'absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular no afecta als pics produïts pel mibefradil o el NNC 55-0396. D'entre les possibles dianes *off-target* que poden tenir aquests bloquejants de TTCCs, el RE va sobresortir com el nostre principal candidat. Per un costat perquè constitueix el major reservori de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, i per l'altre, perquè s'ha suggerit un acoblament de l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  amb l'emmagatzematge de  $\text{Ca}^{2+}$  al RE, específicament a través



**Figura 60** Esquema representatiu dels efectes *off-target* provocats com a conseqüència de la baixa afinitat dels inhibidors de TTCCs pels canals implicats en els corrents finestra. La majoria dels bloquejants de TTCCs presenten una baixa eficiència de bloqueig dels canals TTCCs permanentment oberts de les cèl·lules canceroses. Això s'evidencia amb uns concentracions més elevades per reduir la viabilitat cel·lular ( $EC_{50}$ ) respecte els valors necessaris per inhibir els TTCCs ( $IC_{50}$ ). L'aplicació de drogues a altes concentracions s'associa amb un augment dels efectes *off-target*, que es reflexa amb despolaritzacions dels potencials de membrana i mobilitzacions del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. Subseqüentment, l'activació de processos o vies de senyalització dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  poden conduir a una reducció de la proliferació cel·lular o un augment de la mort cel·lular. No obstant, també es pot associar amb un augment de la proliferació, migració i quimioresistència amb conseqüències que no es coneixen per a la progressió tumoral. S'ha vist que la despolarització de membrana pot promoure la proliferació i la migració de cèl·lules cancerígenes independentment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  (Visa et al., 2019).

dels TTCCs (i no d'altres VGCCs) i on també participen els IP<sub>3</sub>Rs (Rossier, 2006). En consonància, Huang i col·laboradors, van observar que l'alliberació de Ca<sup>2+</sup> del RE mitjançant l'aplicació de Tg es veu disminuïda en cèl·lules tractades primerament amb NNC 55-0396, demostrant una depleció prèvia dels reservori per efecte del bloquejant de TTCCs (Huang et al., 2015). Aquests resultats juntament amb els d'Eberhard et al., 1995 reforcen els nostres, que a més acoten que el buidament del RE es produeix a través dels receptors d'IP<sub>3</sub>, ja que la seva inhibició mitjançant 2-APB i XeC eviten la mort per sobrecàrrega de Ca<sup>2+</sup> provocada pel NNC 55-0396.

### **L'eix CHOP-Ero1α-IP<sub>3</sub>R és el desencadenant dels increments de Ca<sup>2+</sup> citosòlics.**

No solament hem descrit que el buidament de Ca<sup>2+</sup> del RE per l'acció del NNC 55-0396 es dona a través dels IP<sub>3</sub>Rs. Les nostres troballes també proposen que l'activació d'aquests receptors es produeix per l'eix CHOP-Ero1α-IP<sub>3</sub>R (Li et al., 2009b). Així, la translocació nuclear de CHOP per efecte de NNC 55-0396 en presència i absència dels inhibidors dels IP<sub>3</sub>Rs (2-APB i XeC) ens assenyalen una funció de CHOP *upstream* dels receptors (Fig.61). Marciniak, 2004 va descriure la peça que ens faltava en aquest procés: Ero1α. Els autors detallen que CHOP indueix Ero1α (una oxidoreductasa del RE) el qual produeix una hiperoxidació del lumen del RE. Aquesta hipòtesi quadra amb les nostres observacions, on l'increment d'Ero1α en presència de NNC 55-0396 no disminueix per l'acció dels diferents inhibidors (2-APB, BAPTA-AM i KN-62). Aquests resultats col·loquen a Ero1α, a l'igual que CHOP, per sobre de l'activació dels IP<sub>3</sub>Rs (Fig.61) que poden ser activats per efecte de l'ambient oxidant (Higo et al., 2005) generat per l'acció d'Ero1α. Finalment, és Li *et al.*, 2009 qui materialitza la hipòtesi de que CHOP, a través d'Ero1α, activa l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> del RE pels receptors IP<sub>3</sub>Rs, el que encaixa perfectament amb els resultats obtinguts amb NNC 55-0396.

Aquesta mobilització del Ca<sup>2+</sup> a través dels IP<sub>3</sub>Rs per efecte del NNC 55-0396 pot desregular un gran ventall de processos cel·lulars, entre els que trobem l'UPR o la macroautofàgia (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Kania et al., 2017).

### **La sobrecàrrega cel·lular de Ca<sup>2+</sup> inicia un efecte dominó mitjançant la CaMKII que culmina amb la mort cel·lular.**

Un dels transductors provats de l'activitat dels TTCCs és la calmodulina (CaM) i el seu efector *downstream* la CaMKII (Welsby et al., 2003; Lee et al., 2017). D'altra banda, la cinasa sensora de Ca<sup>2+</sup>, CaMKII, no solament es relaciona amb els TTCCs a través de la CaM, sinó que també s'ha associat amb l'activitat dels IP<sub>3</sub>Rs. De fet, tant la CaM com la CaMKII tenen regions putatives d'unió al receptor d'IP<sub>3</sub> (Egorova and Bezprozvanny, 2018). Encara més, s'ha descrit una influència mútua entre els IP<sub>3</sub>Rs i la CaMKII, on la cinasa pot modular l'activitat dels IP<sub>3</sub>Rs (Kasri

et al., 2006; Zhang et al., 2011), mentre que el  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat del RE a través dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  pot activar la CaMKII (Ozcan et al., 2012; Dewenter et al., 2017; Egorova and Bezprozvanny, 2018), com sembla que succeeix en el nostre cas (Fig.61). Les nostres dades amb NNC 55-0396 posen de manifest una correlació entre l'activació de la CaMKII i l'elevació del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic provinent del RE, mentre que l'activació de la cinasa cau quan es tampona el propi ió o s'inhibeix la seva senyalització amb BAPTA-AM (quelant de  $\text{Ca}^{2+}$ ), 2-APB (inhibidor d' $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) o KN-62 (inhibidor de CaMKII). De fet, està ben establert que el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic desencadena diferents vies apoptòtiques gràcies a l'activació de la CaMKII (Timmins et al., 2009), d'acord amb els resultats on la inhibició de la CaMKII per KN-62 rescata la mort induïda per NNC 55-0396. Paral·lelament la via formada per CHOP-Ero1 $\alpha$ - $\text{IP}_3\text{R}$ -CamKII també activa Nox2 (*NADPH oxidase 2*) que genera ROS. Aquest ROS no solament és essencial per a l'apoptosi, sinó que també pot amplificar l'activació de la CaMKII com a part de la retroalimentació positiva (Li et al., 2010; Tabas and Ron, 2011).

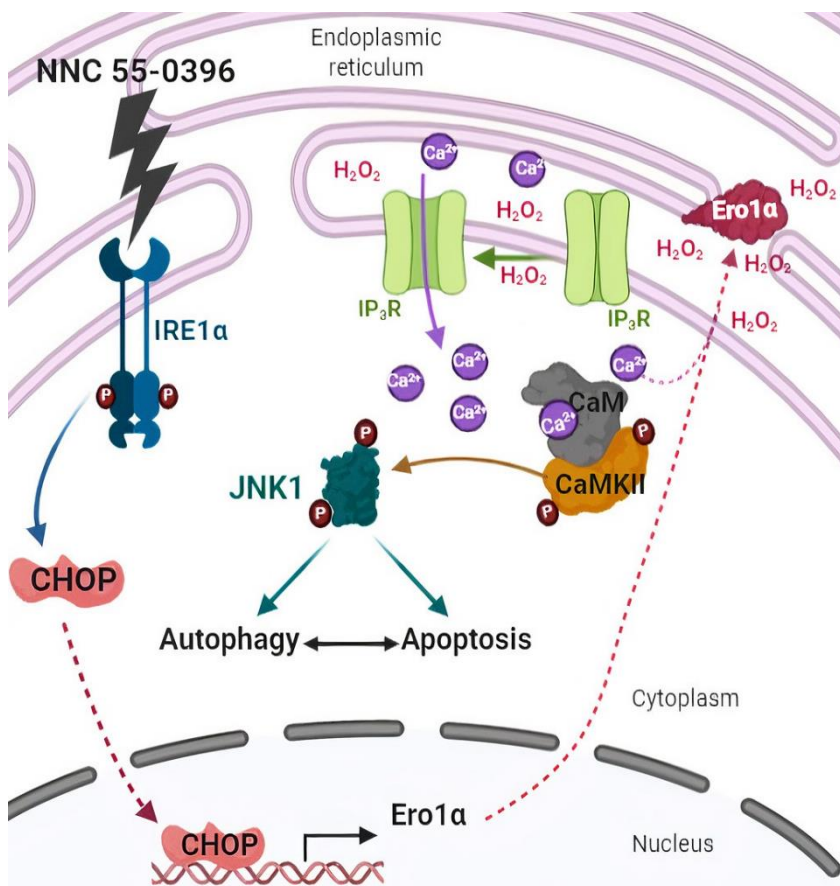
Al seu torn, l'activació de la CaMKII a causa de l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic pot conduir a l'activació de múltiples vies que culminen en apoptosi, entre les quals destaca l'activació de diferents efectors de l'UPR. De fet, s'ha vist una relació causativa entre la CaMKII i l'apoptosi induïda per estrès de RE en cèl·lules exposades a diversos estressors del RE (Li et al., 2009b; Timmins et al., 2009; Tabas and Ron, 2011). Un dels efectors d'UPR que condueixen a apoptosi més ben fonamentats és l'activació sostinguda de JNK (Szegezdi et al., 2006). L'augment dels nivells de forma fosforilada de JNK en presència de NNC 55-0396 apunten en aquesta direcció, especificant que és principalment a través de la isoforma JNK-1 (Fig.61) i la seva diana c-Jun. Aquests resultats han estat validats mitjançant el rescat de la mort cel·lular quan la isoforma JNK-1 és específicament silenciada.

### **L'apoptosi induïda pel NNC 55-0396 implica els elements de la branca IRE1 $\alpha$ , amb JNK i CHOP com a protagonistes.**

En la via canònica de l'UPR, JNK és activat pel receptor IRE1 $\alpha$ . Tanmateix, en base a les nostres dades, IRE1 $\alpha$  no sembla ser l'activador directe de JNK en la senyalització desencadenada per NNC 55-0396: la fosforilació de JNK es troba disminuïda en les condicions tractades amb NNC 55-0396 en combinació amb 2-APB, BAPTA-AM i KN-62 respecte NNC 55-0396 sol. Per contra, en aquests co-tractaments IRE1 $\alpha$  es manté activat per NNC 55-0396. Això demostra que malgrat el receptor IRE1 $\alpha$  juga un paper clau en la via (el seu silenciament rescata la mort provocada per NNC 55-0396), possiblement es troba ubicat en punts anteriors d'aquesta (Fig.61). El shRNA contra IRE1 $\alpha$ , va ser clau per demostrar que IRE1 $\alpha$  és essencial per a l'activació de CHOP, ja que



en les cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  el factor de transcripció no pot translocar a nucli en presència de NNC 55-0396. Per tant, sembla que IRE1 $\alpha$  és capaç d'activar CHOP desencadenant tota la cascada de senyalització, i malgrat no haver elucidat el mecanisme exacte encara, IRE1 $\alpha$  controla una resposta a estrès força diversa i ramificada. Entre alguns dels mecanismes descrits, trobem una activació directa de CHOP per IRE1 $\alpha$  a través d'una possible modificació estructural i/o funcional del RE que acaba amb l'activació de CHOP (Wang et al., 1998) o la regulació transcripcional de CHOP iniciada per IRE1 $\alpha$  (Wang et al., 1998; Lakshmanan et al., 2011).



**Figura 61: Model per a la sortida de Ca<sup>2+</sup> del RE i la seva senyalització induïda per NNC 55-0396.** L'aplicació de NNC 55-0396 promou l'activació i translocació nuclear del factor de transcripció CHOP gràcies a l'acció d'IRE1 $\alpha$ . CHOP, junt amb la senyalització per Ca<sup>2+</sup>, indueixen l'oxidoreductasa Ero1 $\alpha$ . Ero1 $\alpha$  genera un ambient oxidat al RE permetent l'obertura dels canals de Ca<sup>2+</sup> del RE IP<sub>3</sub>R i la conseqüent sortida de Ca<sup>2+</sup> (Higo et al., 2005). El buidament de Ca<sup>2+</sup> del RE desencadena en una senyalització mediada per CaMKII, la qual activa JNK1. Aquesta cascada de senyalització té conseqüències tant en el flux autofàgic com en l'apoptosi, activant i reprimint diversos elements d'ambdues vies. El destí final dependrà de diferents factors, entre els quals hi ha la durada de l'estímul i la intensitat d'aquest.

A més a més, tant IRE1 $\alpha$  com PERK estan enriquits en les zones de contacte entre el RE i el mitocondri anomenades MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*) on es produeix una transferència local de Ca<sup>2+</sup> des del RE a la matriu mitocondrial (Mori et al., 2013; van Vliet and Agostinis, 2017; Carreras-Sureda et al., 2019). Recentment, s'ha descrit una funció no canònica d'IRE1 $\alpha$  regulant la distribució dels IP<sub>3</sub>R (Carreras-Sureda et al., 2019). Concretament IRE1 $\alpha$  funcionaria com andami dels IP<sub>3</sub>R, reclutant-los i acoblant-los per tal de controlar la transferència de Ca<sup>2+</sup>, la comunicació i la bioenergètica entre el RE i el mitocondri (Carreras-Sureda et al., 2019; Urra et al., 2020). Col·locant un cop més, els elements de la via IRE1 $\alpha$  en la regulació de la mobilització del Ca<sup>2+</sup>.

## **JNK1 i CaMKII inductors clau del flux autofàgic com a resposta a l'estrès generat per NNC 55-0396.**

Una de les vies més estretament lligades tant a l'activació de l'UPR com a la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  és l'autofàgia. La primera evidència de que la inhibició dels TTCCs amb NNC 55-0396 afecta l'autofàgia va ser la visible acumulació de vacuoles. Aquestes vacuoles desapareixen quan inhibim l'eix  $\text{IP}_3\text{R}-\text{Ca}^{2+}\text{-CamKII}$ , especialment amb la inhibició dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  amb 2-APB. De fet, prèviament ja s'havia observat que el 2-APB és capaç de suprimir l'autofàgia induïda per mobilitzadors de  $\text{Ca}^{2+}$  com el Bortezomib (Qu et al., 2018). El  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat per aquests canals en condicions basals és captat ràpidament pels mitocondris que es troben juxtaposats, promovent una producció d'ATP i mantenint una autofàgia basal (Cárdenas et al., 2010). Tanmateix, una disminució o un increment de la transmissió de  $\text{Ca}^{2+}$  al mitocondri pot acabar produint una intensificació de l'autofàgia i/o una elevació dels factors pro-apoptòtics (Ansari et al., 2014; Kania et al., 2017). Específicament, un augment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  des dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , tal com passa en el nostre model, promouria l'autofàgia en un primer moment per l'afectació de la bioenergètica mitocondrial, mentre que un increment pronunciat i mantingut en el temps desembocaria en apoptosi (Kiviluoto et al., 2013; Ansari et al., 2014).

Independentment de les propietats en el flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  poden servir per reclutar Beclin-1. Una de les formes més conegudes d'inducció autofàgica dependent de canals de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediat per estrès de RE i activació de l'UPR, és la via  $\text{IP}_3\text{R-Beclin-1-Bcl-2}$  (Vicencio et al., 2009; Decuypere et al., 2011a). D'aquesta manera, la formació del complex promotor d'autofàgia pot ser abolit per una interacció competitiva de Beclin-1 amb els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  o Bcl-2 (Kania et al., 2015). D'altra banda, la unió directa de Beclin-1 als  $\text{IP}_3\text{Rs}$  és capaç de sensibilitzar als receptors i promoure una major senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  des del RE (Fig.61) (Kania et al., 2017). Això significa que Beclin-1 no només podria ser central en l'alteració de l'autofàgia per NNC 55-0396, sinó que provocaria una retroalimentació positiva per a l'alliberació de més  $\text{Ca}^{2+}$  pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , amplificant així l'efecte provocat per NNC 55-0396.

En la condició on l'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  per acció del NNC 55-0396 és tamponat pel quelant BAPTA-AM també es redueix el nombre de vacuoles, d'acord amb Williams et al., 2013. Com era d'esperar, els nostres resultats també mostren una menor acumulació de marcadors autofàgics (LC3-II, p62 i ubiquitina) associat a la reducció del nombre de vacuoles en aquesta condició, i en consonància amb els resultats de Decuypere et al., 2011 que presenten una menor inducció d'autofàgia en presència de BAPTA-AM i XeB (Xestospongina B, inhibidor dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ).

La revalidació de que és la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  la responsable de l'afectació de l'autofàgia arriba amb KN-62, l'inhibidor de CaMKII. Com era esperable, l'aplicació de KN-62 també disminueix el nombre de vacuoles i els marcadors autofàgics (LC3-II, p62 i ubiquitina) en presència de NNC 55-0396. Un dels múltiples efectes de la mobilització del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE al citosol, és promoure l'activació de mediadors tals com la CaMKII, capaç de fosforilar Beclin-1 trencant el complex que forma aquesta amb els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  i Bcl-2 (Li et al., 2017a). L'alliberació de Beclin-1 per la possible fosforilació a través de la CaMKII, torna a posar-la en el punt de mira com iniciadora d'autofàgia per efecte del  $\text{Ca}^{2+}$  provinent del RE.

La participació de la CaMKII en el procés autofàgic en relació als nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  va més enllà dels assenyalats per Beclin-1. Els nostres resultats indiquen una regulació transcripcional de p62 a través del factor de transcripció CREB en funció dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic, suggerint un increment de l'activitat de CREB i conseqüentment de la transcripció de p62 en les condicions en què s'eleva el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic (Fig.61) que no havia estat descrit. Ha estat àmpliament caracteritzat que la fosforilació de CREB que permet la seva activació és dependent de CaMKII (Takeda et al., 2007; Ma et al., 2014; Yan et al., 2016a).

Globalment aquestes dades recolzen la implicació del  $\text{Ca}^{2+}$  en l'autofàgia, que ja ha estat àmpliament fonamentada tant en la iniciació com en la progressió del flux (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Decuypere et al., 2011a; Kania et al., 2015, 2017; Bootman et al., 2018). Tal com s'aprecia, la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  és complexa i del manteniment del seu equilibri dependrà la regulació de vies tant rellevants en el destí cel·lular com l'autofàgia, la senescència o l'apoptosi (Sarkar and Rubinsztein, 2006; Decuypere et al., 2011b; Kania et al., 2015; Borodkina et al., 2016).

Una altra via estretament relacionada amb el  $\text{Ca}^{2+}$  i l'autofàgia és l'UPR. No és estrany, ja que l'autofàgia pot ser un mecanisme útil per a l'eliminació de proteïnes mal plegades que poden ser font d'estrès de RE (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). En concret, la via IRE1 $\alpha$ -JNK s'ha relacionat amb la capacitat d'induir l'expressió tant de Beclin-1 (Cheng et al., 2014), com de p62 (Go et al., 2017), i conseqüentment l'autofàgia (Ogata et al., 2006). En concordança, els nostres resultats apunten que IRE1 $\alpha$  i JNK1 són necessaris per a la modulació del flux autofàgic desencadenat pel NNC 55-0396. Aquest fet s'evidencia amb una menor formació de vacuoles i menor acumulació de marcadors autofàgics (LC3-II i p62) en les cèl·lules silenciades tant per IRE1 $\alpha$ , com per JNK1, i tractades amb NNC 55-0396. Reforçant la nostra hipòtesi, en els tractaments amb NNC 55-0396 s'observa una correlació entre l'activació de JNK1, la formació d'autofagosomes i l'acumulació de marcadors autofàgics. Encara més, l'aplicació de NNC 55-

0396 en combinació amb els diferents inhibidors de la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  (2-APB, BAPTA-AM i KN-62) disminueixen la fosforilació de JNK1, així com l'acumulació de marcadors autofàgics en relació a una menor formació de vacuoles. De forma similar, Klein et al., 2015 ressalten la funció de JNK en la regulació d'una autofàgia mitjançada per virus oncolítics. Cal ressaltar que tant Klein et al., 2015 com d'altres autors (Wei et al., 2008; Tang et al., 2010; Song et al., 2018b) remarquen que és la isoforma JNK1 l'encarregada de fosforilar i trencar el complex Beclin-1-Bcl-2 permetent que la forma lliure de Beclin-1 iniciï l'autofàgia (Fig.62). En conjunt, les dades col·loquen a JNK1 com un potent regulador del flux autofàgic.

D'altra banda, també s'ha descrit que el factor de transcripció dependent de la isoforma JNK1, c-Jun, s'encarrega de transcriure p62 (Fig.62)(Puissant et al., 2010; Go et al., 2017). Aquestes dades es troben en acord amb les nostres, on l'activació de JNK1 i del seu factor de transcripció, c-Jun, es correlacionen amb els nivells de p62 en els co-tractaments de NNC 55-0396 amb els inhibidors (2-APB, BAPTA-AM o KN-62). L'activació de JNK1 i els nivells de p62 també van de la mà en les cèl·lules silenciades per IRE1 $\alpha$  o per la isoforma específica JNK1. De fet, s'ha vist que els factors de transcripció CREB i c-Jun competeixen pel motiu CRE2/AP-1 (Manna and Stocco, 2007), associació que podria explicar la dispersió de les nostres dades en quant a l'activació de CREB per promoure l'expressió de p62 mRNA. En qualsevol cas, CaMKII ja sigui activant CREB o c-Jun (a través de JNK1), promouria l'expressió de p62 i conseqüentment el flux autofàgic.

En general, aquests resultats situen l'eix iniciat per IRE1 $\alpha$ , on participen els IP<sub>3</sub>Rs promovent l'acció de CaMKII i que acaba amb l'activació de JNK, com a predecessora de la modulació del flux autofàgic, possiblement a través de p62 i Beclin-1 (Fig.62).

### **L'excés també és un problema: nivells elevats de $\text{Ca}^{2+}$ bloquegen la fusió autofagosoma-lisosoma.**

El conjunt d'aquests resultats mostren una inducció del flux autofàgic per NNC 55-0396. Tanmateix, l'assaig tàndem amb LC3 fluorescent, clau per entendre el flux autofàgic, mostra un bloqueig compatible amb una acumulació d'autofagosomes en el tractament amb NNC 55-0396. Cal destacar, però, que el nombre d'autofagosomes que observem en aquest assaig en la condició amb NNC 55-0396 és molt major del que s'aconsegueix amb un simple bloqueig autofàgic, per exemple, pel conegut bloquejant d'autofàgia CQ. Una possible explicació pot venir donada per una doble modulació de l'autofàgia: una inducció de l'autofàgia concomitant amb un bloqueig d'aquesta a etapes posteriors, que provocaria una acumulació massiva d'autofagosomes. Aquesta doble regulació també podria explicar una formació de vacuoles petites però abundant inicialment, amb l'acumulació descrita de vesícules engrandides a etapes

més avançades (a partir de les 8h de tractament), potser per la fusió dels autofagosomes acumulats.

De fet, com ja s'ha vist en la caracterització de l'autofàgia a través de l'estudi dels seus marcadors, es produeix una acumulació dels marcadors LC3-II, p62 i proteïnes ubiquïtinitzades en el tractament amb NNC 55-0396. Aquests resultats es poden explicar amb la nostra teoria, on la inducció del flux autofàgic promouria p62 i LC3-II, mentre que el bloqueig evitaria la seva degradació pel propi procés autofàgic així com la de les proteïnes ubiquïtinitzades que tenen com a diana. A més a més, l'increment de p62 mRNA regulat pel  $\text{Ca}^{2+}$  també ens demostra que hi ha una inducció de l'autofàgia i que l'acumulació d'aquesta no és exclusivament per un bloqueig del procés autofàgic.

Globalment, les dades obtingudes semblen indicar que l'eix  $\text{IRE1}\alpha\text{-IP}_3\text{Rs-CaMKII-JNK1}$  promouria el flux autofàgic principalment a través de Beclin-1 i p62. L'opció que pren forma és mitjançant un increment de la seva transcripció a través de CREB i/o c-Jun i per una activació de Beclin-1. Aquesta activació pot venir donada per la dissociació de Beclin-1 de proteïnes que la tenien segregada (com Bcl-2 i els  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) gràcies a la fosforilació produïda per JNK1, CaMKII o ambdues. Addicionalment, Beclin-1 podria retroalimentar i amplificar aquesta senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la seva unió als  $\text{IP}_3\text{Rs}$  promovent una major alliberació de l'ió al citosol (Fig.62).

És rellevant matissar però, que aquest  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic provinent del RE pot participar tant en la inducció com en el bloqueig del flux autofàgic, depenent de l'estat i tipus cel·lular (Decuyper et al., 2013; Kania et al., 2015). De fet, ha estat descrit que elevacions molt pronunciades de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic pot produir un bloqueig de la fusió entre autofagosomes i lisosomes i la subseqüent acumulació del cargo a degradar (Williams et al., 2008; Mauvezin et al., 2015; Liu et al., 2017; Kondratskyi et al., 2018). En consonància amb els nostres resultats, Liu i col·laboradors van descriure que un increment de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic induït per Cadmi, inhibeix el flux autofàgic. Mentre que l'acumulació d'autofagosomes és modulada pel restabliment de la fusió autofagosoma-lisosoma per 2-APB, BAPTA-AM i Tg (Liu et al., 2017). També és interessant que altres bloquejants de TTCCs com pimozida promouen una mort cel·lular associada a una desregulació de l'autofàgia i un acúmulo de vacuoles similar al descrit aquí per NNC 55-0396 (Zielke et al., 2018).

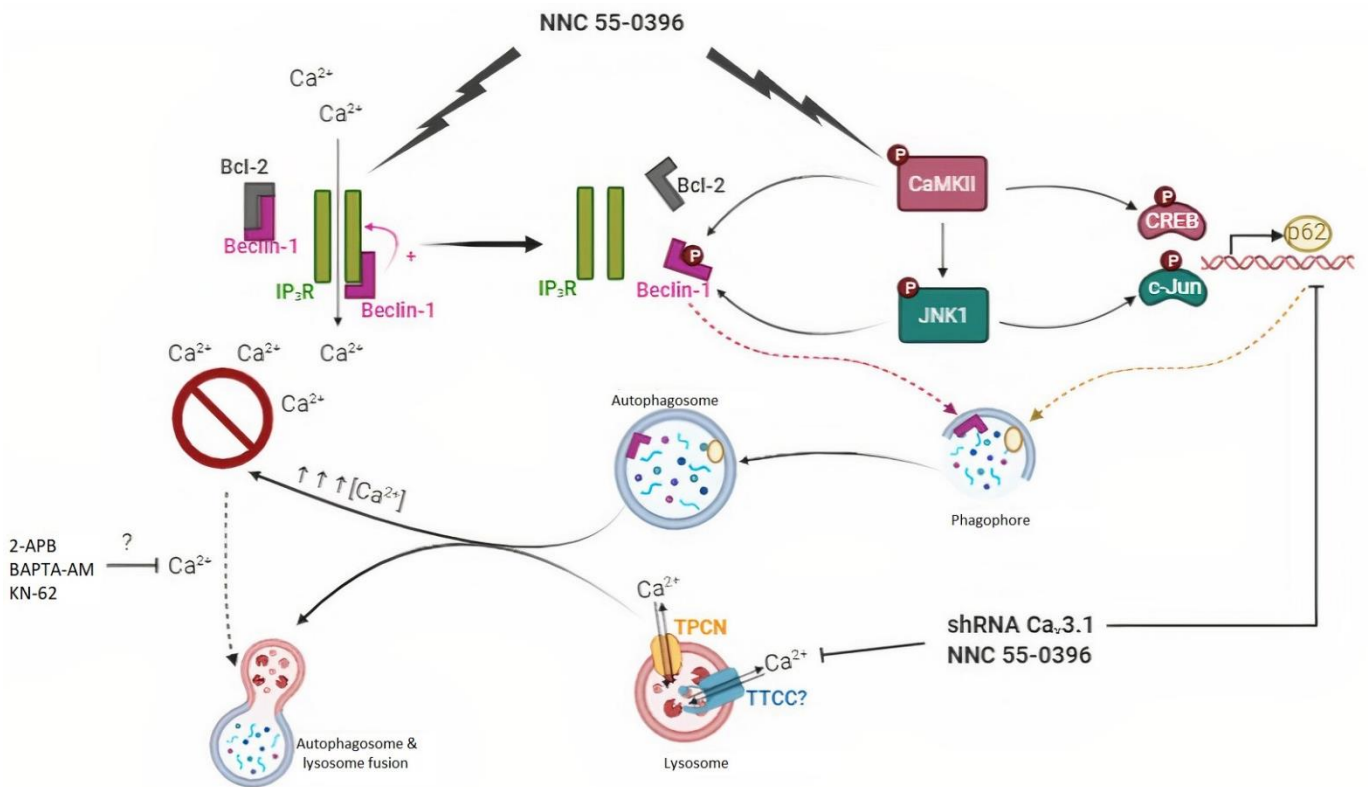
Les nostres dades suggereixen que els co-tractaments que eviten l'augment del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic promogut per NNC 55-0396 normalitzen el flux autofàgic. Un possible mecanisme pel bloqueig autofàgic radica en les connexions estretes entre els lisosomes i el RE, que possibilita un intercanvi ràpid de  $\text{Ca}^{2+}$  entre aquests orgànuls. Això permet als  $\text{IP}_3\text{Rs}$  influenciar en la

concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal i subseqüentment en l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  per l'activació dels canals lisosomals TPCNs (*NAADP-dependent 2 Pore Segment Channels*). A més, l'activació dels propis TPCNs pot promoure la dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  a través del mecanisme conegut com CICR (*Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release*), on petites alliberacions de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels TPCNs provoquen una major alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  amplificant la senyal. De forma interessant, l'activació dels TPCN promou una senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  que inhibeix la fusió entre els lisosomes i els autofagosomes a través d'una alcalinització del pH lisosomal, per un mecanisme poc conegut (Decuyper et al., 2015).

En relació, Vervliet et al., 2017 assenyalen que el  $\text{Ca}^{2+}$  provinent dels RyRs (*Ryanodine Receptors*; que juntament amb els  $\text{IP}_3\text{Rs}$  són els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  més abundants del RE), també poden participar en la supressió del flux autofàgic a nivell dels lisosomes a través del CICR i l'activació dels TPCN. No és estrany donades les similituds entre els dos canals del RE i que els propis RyRs poden ésser activats pel  $\text{Ca}^{2+}$  provinent dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (Seo et al., 2014).

De fet, Atakpa et al., 2018 postula que la ruta de lliurament de  $\text{Ca}^{2+}$  als lisosomes pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  proporciona un mecanisme de segrest de l'ió per part dels lisosomes. Aquest segrest per un costat atenua la senyalització per  $\text{Ca}^{2+}$  evocada pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  i, per l'altre, afecta el control de fusió i fissió de la via endolisosomal. La hipòtesi de que un excés de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic alliberat pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  pot ser captat pels lisosomes, està en acord amb les observacions de Y. Wang et al., 2015 d'una acumulació massiva de vesícules que contenen  $\text{Ca}^{2+}$  de forma concomitant a una activació de l'UPR.

En base a aquesta informació, podem considerar que l'excés de  $\text{Ca}^{2+}$  provinent del RE per l'aplicació del NNC 55-0396 pot ser un mecanisme de bloqueig de la fusió dels lisosomes, probablement a través dels múltiples canals i receptors de  $\text{Ca}^{2+}$  del propi lisosoma (Fig.62). A més a més, el segrest de  $\text{Ca}^{2+}$  per part dels lisosomes a través dels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  seria un mecanisme de la cèl·lula per intentar tamponar l'excés d'aquest al citosol i tractar d'evitar un agreujament de les condicions, a pesar de ser insuficient. No podem descartar una participació dels RyRs en aquest procés, ja que l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  també promou l'activació dels RyRs (Roderick and Knollmann, 2013; Heijman et al., 2014).



**Figura 62: Model sobre l'efecte dual del NNC 55-0396 en el flux autòfag.** Per un costat, l'aplicació de NNC 55-0396 activa les cinases CaMKII i JNK1 que forforilen els factors de transcripció CREB i c-Jun respectivament i promouen l'expressió de p62 induint el flux autòfag. A més, CaMKII i JNK1, també poden induir l'autòfaga a través de la fosforil·lació de Beclin-1, alliberant-la de Bcl-2 i dels IP<sub>3</sub>Rs que la tenien segrestada i permetent que iniciï l'autòfaga. La unió de Beclin-1 als IP<sub>3</sub>Rs sensibilitza als canals promovent una major sortida de Ca<sup>2+</sup>. Per l'altre costat, NNC 55-0396 desencadena una sortida massiva de Ca<sup>2+</sup> del RE a través dels IP<sub>3</sub>Rs, que bloquejaria la fusió autòfagosoma-lisosoma (conduït a la formació de grans vacuoles), ja sigui a través de la senyalització amb canals de Ca<sup>2+</sup> lisosomals com els TPCN (Decuyper et al., 2015) o per un efecte específic del NNC 55-0396 sobre els TTCCs que podrien localitzar-se a nivell lisosomal, com en el cas de *Cacna1a* (Tian et al., 2015). D'acord amb això, el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1 també reprimeix l'expressió de p62, i, per tant, de l'autòfaga. En canvi, BAPTA-AM, 2-APB i KN-62 sembla que serien capaços de restablir el flux.

### **Autòfaga, de protectora a executora final per efectes contraposats en la seva senyalització.**

El fet que NNC 55-0396 afecti el procés autòfag és interessant, ja que una autòfaga basal elevada és característica de diferents tumors, entre els quals trobem el glioblastoma (Chen and White, 2011), esdevenint un procés crític per mantenir el seu elevat metabolisme i els diferents estressos que han d'afrontar. Per aquest motiu s'han suggerit diverses aproximacions modulant l'autòfaga com a possible tractament anticancerigen, ja sigui bloquejant-la (per evitar l'adaptació a l'estrès) o induint-la encara més (fins a uns nivells excessius i incontrolats que indueixi mort cel·lular) (Thorburn et al., 2014). Recentment però, l'estratègia antitumoral més prometedora busca combinar el co-tractament simultani amb un compost inductor i un bloquejant de l'autòfaga (Nagelkerke et al., 2015; Kucharewicz et al., 2018), objectiu que

nosaltres aconseguiríem amb un únic agent, el NNC 55-0396. El fet que NNC 55-0396 sigui capaç d'induir i a la vegada bloquejar el flux autofàgic, implicaria que la cèl·lula no pot adaptar-se als diferents estressos, especialment al de RE, i l'abocaria a la mort. També pot provocar un esgotament energètic extrem per estar induint un procés que no culmina i que agreujarà més l'estrès, conduint a la mort de la cèl·lula tumoral. Addicionalment, l'acumulació de vesícules amb cargo sense degradar i que no es poden reciclar, pot intensificar encara més l'estrès cel·lular i contribuir a una manca de nutrients que s'obtidrien d'aquest reciclatge. Per aquests motius, compostos com el NNC 55-0396 amb un efecte dual en autofàgia són anticancerigens prometedors (Li et al., 2015; Kucharewicz et al., 2018).

### **El silenciament gènic de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 en diferents models demostra la importància dels TTCCs en el curs del glioblastoma.**

Els possibles efectes *off-target* del NNC 55-0396 disseccionats mostren el paper d'aquests en la inducció d'apoptosi en línies cel·lulars de glioblastoma. No obstant això, el silenciament gènic específic d'aquestes línies per Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 (validat per dos shRNAs diferents) també promou una mort cel·lular apoptòtica (Visa, Sallán et al., 2019). Aquest fet torna a posar en el punt de mira als TTCCs com una diana terapèutica rellevant, en concordança amb altres estudis en diferents càncers (Ohkubo and Yamazaki, 2012; Das et al., 2013; Dziegielewska et al., 2014; Zhang et al., 2017; Granados et al., 2020). A més, també ens indica que els efectes observats amb NNC 55-0396 pot ser que no siguin provocats exclusivament per la vessant *off-target* d'aquest, i que els TTCCs juguen un paper més destacat del que podia semblar inicialment. Tian i col·laboradors descriuen que els VGCCs (en concret Ca<sub>v</sub>2.1) localitzats en la membrana lisosomal són necessaris per a la fusió autofagosoma-lisosoma en *Drosophila* (Tian et al., 2015). Aquestes dades juntament amb la possible seqüència LIR (*LC3-interacting region*) que hem identificat en la seqüència de Ca<sub>v</sub>3.1 i Ca<sub>v</sub>3.2 recolzen la hipòtesi i suggereix una possible funció dels TTCCs en la fusió autofagosoma-lisosoma (Fig.62).

El model *in vivo* de xenografts de ratolí corrobora els resultats previs en línies cel·lulars, i reforça la idea de que els TTCCs, especialment Ca<sub>v</sub>3.1, són necessaris per a la viabilitat de les cèl·lules de glioblastoma. A més, el menor creixement tumoral va acompanyat d'una disminució de marcadors de proliferació i una davallada dels nivells de p62 per immunohistoquímica de les mostres de tumor obtingudes dels animals. Els menors nivells de p62 en tumors formats per cèl·lules depleccionades de Ca<sub>v</sub>3.1 reafirmen resultats previs del grup en les línies de glioblastoma (Visa, Sallán et al., 2019) i recolzen els resultats mostrats aquí en cultius primaris de pacients de glioblastoma. En aquests cultius hem vist també que el silenciament de Ca<sub>v</sub>3.1



comporta una menor expressió de p62, tant de RNA com proteïna, resultat que es relaciona amb la possible regulació transcripcional de p62 per CREB i la senyalització per  $Ca^{2+}$  abans comentada. Aquestes dades col·loquen p62 com a peça clau en relació a la funció de supervivència i proliferació de  $Ca_v3.1$  en les cèl·lules de glioblastoma.

D'altra banda, els resultats de mort pel silenciament dels TTCCs han estat validats en un model de cèl·lules mare com són les NS. L'estudi d'aquest model és especialment interessant en un càncer tan heterogeni com el glioblastoma, on aquestes cèl·lules participen en la iniciació i la resistència al tractament (Lathia et al., 2015). Zhang i col·laboradors van descriure que  $Ca_v3.2$  està altament expressat en casos de glioblastoma i en cèl·lules mare de glioblastoma (GSC) i associen la seva expressió a un pitjor pronòstic. També mostren que el bloqueig farmacològic dels TTCCs amb mibefradil redueix el *stemness* i la viabilitat de les GSC. A més, l'administració oral de mibefradil inhibeix el creixement dels *xenografts* murins derivats de GSC, així com també augmenta la supervivència de l'hoste i sensibilitza els tumors al tractament de la TMZ (Zhang et al., 2017). Tanmateix, els autors no estudien l'efecte de  $Ca_v3.1$  que és la isoforma més expressada en les nostres línies de glioblastoma i casos primaris, el silenciament de la qual mostra una afectació de la supervivència més marcada. En el model de NS derivades d'U87-MG presentem que el fenotip de *stemness* no va alterar l'expressió de  $Ca_v3.1$ , ni tampoc va promoure l'expressió de  $Ca_v3.2$  al llindar de detecció per RT-qPCR com ja succeïa en el cultiu adherent d'aquesta línia cel·lular. Tanmateix, sí que veiem una afectació de la viabilitat en NS de cèl·lules silenciades per  $Ca_v3.1$ , indicant que aquest canal segueix sent rellevant en el model de cèl·lules mare de glioblastoma.

En general, que el silenciament de TTCCs, en especial de  $Ca_v3.1$ , afecti a la supervivència de tota aquesta varietat de models posa de manifest que aquest canal juga un paper rellevant en el curs del glioblastoma. Resultats previs del grup en la línia resistent al quimioterapèutic d'ús TMZ també demostren una major expressió de  $Ca_v3.1$  (Visa, Sallán et al., 2019). A més, tant l'ús de mibefradil, com de NNC 55-0396, així com el silenciament específic de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$ , segueixen causant una mort apoptòtica abrupta i massiva en aquest model quimioresistent. Aquests resultats indiquen que especialment  $Ca_v3.1$  juga un paper important en la resistència al tractament i la conseqüent recurrència tumoral en glioblastoma (Visa, Sallán et al., 2019), troballa que es reproduïx en melanoma resistent (Barceló et al., 2020). El conjunt d'aquestes dades sostenen la idea d'atacar els TTCCs (mitjançant l'ús de bloquejants o eines moleculars) ja siguin sols o en combinació amb TMZ, com una aproximació per al tractament del glioblastoma i intentar mitigar l'aparició de recurrències. Per un costat, perquè es poden combatre aquelles cèl·lules resistents al tractament per TMZ, i per l'altre perquè afecta la viabilitat de les GSC, que

són unes de les principals responsables de que apareguin resistències al quimioterapèutic i les consegüents recurrències.

La verificació de que la mort provocada pels silenciament de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  és apoptòtica es confirma gràcies al rescat de la mort cel·lular per la inhibició de la caspasa 8. D'altra banda, com s'ha comentat, autofàgia i apoptosi estan estretament relacionades. Un d'aquests mecanismes que implica l'autofàgia és tant en l'activació com en la degradació de la caspasa 8, on p62 conduiria la caspasa a l'autofagosoma (Huang et al., 2013; Song et al., 2017). Ressaltant un cop més la regulació recíproca de les dues vies i la seva implicació quan s'ataquen els TTCCs.

Col·lectivament, la verificació de l'apoptosi induïda pel silenciament de  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  en diferents models com són les línies cel·lulars de glioblastoma, la línia cel·lular quimioresistent a TMZ, les NS i els experiments *in vivo* amb *xenografts* murins, així com la validació en dues seqüències de shRNA diferents per cadascuna, dóna potència i fiabilitat a la nostra recerca.

### **TTCCs, $Ca^{2+}$ i senescència, la tríada que es perfila en els cultius primaris de glioblastoma.**

Seguint aquesta línia i per tal d'intentar acostar-nos el màxim possible al model de la malaltia humana, vam utilitzar cultius primaris adherents de dos pacients de glioblastoma generats al nostre laboratori, el C65 i C66. Inesperadament, el silenciament dels canals  $Ca_v3.1$  i  $Ca_v3.2$  no va provocar una mort cel·lular immediata com en la resta de models cel·lulars, però sí una afectació de la viabilitat amb una inducció d'estat senescent a dia 8 post-infecció, com suggereix tant la morfologia engrandida i aplanada de les cèl·lules, com la positivitats de l'assaig  $\beta$ -gal a més llarg plaç.

No és estranya aquesta relació entre  $Ca^{2+}$  i senescència, donat que l'ió és cabdal en el control del destí cel·lular a través de processos tan rellevants com proliferació, apoptosi o autofàgia, tots ells relacionats directa o indirectament amb la condició senescent (Harr and Distelhorst, 2010; Farfariello et al., 2014). És concebible que les cèl·lules senescentes estiguin caracteritzades per una signatura de  $Ca^{2+}$  específica que en part, pot ser responsable del seu fenotip (Farfariello et al., 2014).

És precisament la implicació de l'ió en el cicle cel·lular que pot ser crucial per un dels trets essencials de l'estat senescent, com és la parada de la proliferació directament lligada a l'aturada de la progressió del cicle cel·lular. La senyalització per  $Ca^{2+}$  en general, i els TTCCs en concret, juguen un paper important en la regulació del cicle cel·lular en mamífers, participant en la progressió  $G_1$ -S (Das et al., 2013; Huang et al., 2015; Zhang et al., 2017). Com ja s'ha vist, hi ha

nombrosos estudis, inclòs el nostre, que mostren com el silenciament gènic o el bloqueig farmacològic dels TTCCs redueixen la proliferació de cèl·lules tumorals. Tanmateix, pocs proporcionen informació de les vies afectades pel silenciament/bloqueig dels TTCCs. Lu i col·laboradors van reportar que la inhibició farmacològica per mibefradil redueix la proliferació cel·lular a través d'un augment de l'inhibidor de CDKs p21 dependent de p53 (Lu et al., 2008), evitant així la progressió G<sub>1</sub>-S. D'acord amb els resultats de Sankhe *et al.*, 2017, on la disminució de la corrent dels TTCCs pel bloqueig d'aquests amb TTA-A2 eleva els nivells de p21. Tanmateix, els nostres resultats en cultius primaris mostren una elevació dels inhibidors de cicle p16 i p27. Una de les possibles explicacions és que els dos cultius primaris utilitzats són Retinoblastoma (Rb) negatius i les vies de senescència que impliquen p21 són dependents de Rb (Nardella et al., 2011). Per tant, davant la manca de la proteïna Rb, aquestes cèl·lules podrien promoure un estat senescent dependent de p16 i p27. Les nostres dades també suggereixen que en la promoció dels inhibidors de cicle hi pot participar p62, la qual s'ha vist que regula negativament p27 i l'absència de la qual aboca a un fenotip cel·lular compatible amb senescència (Alza et al., 2020). Addicionalment, la menor expressió de p62 i l'augment d'inhibidors de cicle en cultius primaris silenciats per Ca<sub>v</sub>3.1, concorda amb la menor expressió de p62 i marcadors proliferatius en les immunohistoquímiques dels tumors generats per cèl·lules silenciades per Ca<sub>v</sub>3.1 en *xenografts* murins. En canvi, en els cultius primaris silenciats per Ca<sub>v</sub>3.2, els inhibidors de cicle no es troben incrementats significativament i p62 no cau, fet que correspon amb una senescència menys marcada a nivell de morfologia i una menor positivitats per β-gal.

També s'han de tenir present els efectes del Ca<sup>2+</sup> en la regulació de factors de transcripció que són responsables de la proliferació cel·lular (Farfariello et al., 2014), en especial de p53 com a regulador clau en senescència. Un vincle directe entre Ca<sup>2+</sup> i p53 el proporciona Lu et al., que mostra que és p53 qui promou l'augment d'expressió de p21 quan es silencia Ca<sub>v</sub>3.1 en línies cel·lulars de carcinoma esofagial (Lu et al., 2008). Addicionalment, el Ca<sup>2+</sup> pot regular l'habilitat de proteïnes que es poden unir i modular l'activitat de p53 (Delphi et al., 1997; Muellari et al., 2005).

Tanmateix, existeixen altres vincles entre Ca<sup>2+</sup> i senescència menys evidents. Per exemple, tal com es pot observar en els cultius primaris silenciats pels canals TTCCs, les cèl·lules senescentes augmenten el seu volum de forma important, sent una de les característiques més destacades d'aquest fenotip (Lang et al., 1998). A causa de l'inflament hiposmòtic es produeix un increment de la concentració de Ca<sup>2+</sup> citosòlic provinent de fonts intra- i extracel·lulars (Pasantes-Morales and Morales Mulia, 2000). Aquest Ca<sup>2+</sup> pot tenir una funció com a segon missatger per intentar revertir la mida en el que es coneix com *Regulatory Volume Decrease* (RVD) (Altamirano et al.,

1998). En les cèl·lules senescentes, aquest control (RVD) està aparentment modificat, ja que l'increment de volum es manté sense canvis al llarg del temps. És per tant, concebible que les cèl·lules senescentes tinguin una regulació diferent de canals permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que permeten mantenir les seves característiques morfològiques (Farfariello et al., 2014).

D'altra banda, s'ha suggerit que canvis en els potencials de membrana a través dels canals de  $\text{K}^+$  KCNA1, condueixen a senescència (Lallet-Daher et al., 2013). De fet, es coneix que el  $V_m$  té diverses funcions en activitats cel·lulars tals com proliferació o diferenciació (Kondratskyi et al., 2018). D'entre els canals que poden modular el  $V_m$  també es troben els canals de  $\text{Ca}^{2+}$ , malgrat fins al moment no hi havia cap evidència d'uns efectes similars potenciats per una remodelació d'aquests canals. El  $V_m$  a la vegada regula l'activitat dels VGCC en general i els TTCCs en concret, els quals poden proporcionar un altre mecanisme per a l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , afectant a les subseqüents vies de senyalització (Farfariello et al., 2014).

Wiel *et al.*, 2014 en un estudi realitzat amb experiments de pèrdua de funció, observa que la transmissió de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE i el mitocondri, pot ser un potent inductor de la senyal senescent. De fet, l'alteració de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  que presenten les cèl·lules senescentes (Martin and Bernard, 2018), pot venir donat per una alliberació excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  pels  $\text{IP}_3\text{Rs}$  seguit d'una acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial al qual el segueix un procés autofàgic (Farfariello et al., 2014). Eix que ens recorda al provocat pel tractament amb NNC 55-0396 en línies de glioblastoma.

La pròpia UPR s'ha assenyalat que participa en aquest procés, ja que la senescència es considera com un fenotip de resposta a estrès (Abbadie and Pluquet, 2020). Existeixen diverses evidències d'una alteració de l'homeòstasi del RE i la consegüent activació de l'UPR durant la senescència (Druelle et al., 2016; Blazanin et al., 2017) i en la senescència activada per la teràpia (Dörr et al., 2013). De fet, no està clar si l'UPR és causa o conseqüència de la senescència, tot i que probablement ambdós casos siguin certs pels bucles d'autoamplificació (Pluquet et al., 2015). Confirmant-ho, l'UPR pot participar en diversos marcadors de l'estat senescent com: l'augment de la mida cel·lular i el *spreading* (Druelle et al., 2016), en l'activitat  $\beta$ -gal per una inducció de l'autofàgia com a conseqüència de l'UPR (Druelle et al., 2016; Drullion et al., 2018) o la implicació de l'estrès de RE i l'UPR en la composició del secretoma que constitueix el SASP (fenotip secretor).

Justament el SASP també està estretament relacionat amb el  $\text{Ca}^{2+}$ , ja que tant l'ió com els seus canals són reguladors de la secreció de factors solubles (Coppe et al., 2006; Farfariello et al., 2014; Martin and Bernard, 2018). Per exemple, es va observar la implicació de  $\text{Ca}_v3.2$  en la

secreció dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  de cèl·lules neuroendocrines de càncer de pròstata, probablement estimulant el tràfic intracel·lular i l'exocitosi (Gackière et al., 2008).

Finalment, el procés autofàgic que com ja s'ha vist està altament relacionat amb el  $\text{Ca}^{2+}$ , també s'ha vinculat a la senescència. S'ha observat que hi ha una permeabilització de la membrana lisosomal que indueix autofàgia i desencadena en una senescència prematura induïda per estrès i que és reversible per inhibidors d'autofàgia (Patschan et al., 2008). Cal recordar que un dels assajos més àmpliament usats per la determinació de cèl·lules senescent, és un augment de l'activitat de l'enzim lisosomal  $\beta$ -galactosidasa.

Globalment, els resultats obtinguts en els cultius primaris juntament amb les dades bibliogràfiques senyalen una implicació important del  $\text{Ca}^{2+}$  en la senescència. En concret, la menor expressió dels TTCCs en cultius primaris (especialment de  $\text{Ca}_v3.1$ ) pot conduir a una desregulació de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  que explicaria l'aparició de l'estat senescent. A més, moltes de les vies implicades en el bloqueig i/o en el silenciament dels TTCCs en els altres models descrits, estan estretament lligades a la senescència, la qual cosa suggereix que aquestes vies també poden participar en el fenotip senescent. Per aquest motiu, malgrat l'aparent discrepància entre aquest model i els prèviament mostrats en quant a la inducció de la mort cel·lular, és probable que tinguin més punts en comú del que semblava en un inici.

També hem de tenir en compte que les diferències poden venir per diferents factors. Per exemple, s'ha de tenir present que el glioblastoma és un càncer molt heterogeni on cada pacient pot tenir un perfil de mutacions força diferent i per tant, respondre de forma desigual. Un clar exemple, són els dos casos emprats, els quals són Rb negatius, a diferència d'altres que tenim en el laboratori, fet que possiblement condicioni l'expressió d'inhibidors de cicle observats. A part, la zona/cèl·lules on s'ha iniciat el tumor també podria ser determinant.

D'altra banda, seria interessant estudiar l'efecte del silenciament de  $\text{Ca}_v3.1$  i  $\text{Ca}_v3.2$  en NS de cultius primaris de pacient per tal d'observar si mantenen la "resistència" a la mort cel·lular en aquestes condicions no adherents.

A més a més, que el silenciament específic de  $\text{Ca}_v3.1$  i  $\text{Ca}_v3.2$  no indueixi la mort de les cèl·lules de cultius primari ens demostra que aquestes són molt més resistents del que cabria esperar. Precisament, per aquest motiu és important desxifrar formes d'atacar aquestes cèl·lules des de múltiples aproximacions. Malgrat tot, tenir els TTCCs com a diana pot ser una bona estratègia terapèutica ja que diversos estudis indiquen que la inducció de la senescència cel·lular disminueix la proliferació, migració, invasió i metàstasi de cèl·lules canceroses (Zhang & Yang,

2011). Per tant, *a priori* la senescència actuarial d'una forma beneficiosa inhibint, la progressió tumoral.

### **Inhibició farmacològica dels TTCCs: la realitat de la potencial aplicabilitat clínica.**

Globalment, les nostres dades posen de manifest que l'atac *on-target* dels TTCCs pot ésser una diana terapèutica interessant, donat que afecten la viabilitat dels diferents models de glioblastoma mostrats en el present treball (línies, neuroesferes, models de xenograft (Visa, Sallán et al., 2019) i cultius primaris). Aquests resultats són consistents amb estudis *in vivo* on s'ha avaluat l'efecte del mibefradil o el NNC 55-0396, tant en tumors sòlids en general, com del glioblastoma en concret. Per exemple, el NNC 55-0396 redueix el creixement tumoral en xenografts de ratolí generats a partir de la línia de glioblastoma U87. Ho aconsegueix reduint l'angiogènesi gràcies a la desestabilització d'HIF-1 $\alpha$  (Kim et al., 2015). Així mateix, el treball de Sheehan i col·laboradors, demostra que el tractament amb mibefradil té un efecte sinèrgic amb la radioteràpia (comunament aplicada en el tractament del glioblastoma) en un model ortotòpic de rata (Sheehan et al., 2013). També l'administració de mibefradil inhibeix el creixement de GSCs implantades intracranialment en xenografts murins i sensibilitza els tumors en el tractament amb TMZ (Zhang et al., 2017). Els prometedors resultats en models murins, van portar a realitzar els primers assajos clínics amb mibefradil per al tractament del càncer. Per tal d'evitar les interaccions prèviament descrites de l'inhibidor amb altres fàrmacs, es van administrar dosis a curt termini (Krouse et al., 2015). Els diversos assajos clínics realitzats amb el mibefradil mostren resultats positius, amb una bona tolerància i una manca d'efectes secundaris (NCT01550458, NCT01480050 i NCT02202993). La interpretació òbvia d'aquests estudis amb inhibidors era que s'estava actuant sobre els TTCCs.

Les nostres troballes experimentals, predites a partir de l'efecte dels bloquejants sobre les corbes d'inactivació dels TTCCs (Visa et al., 2019), apunten a que aquesta inducció de mort cel·lular pel NNC 55-0396 és provocada per un efecte *off-target*. Hem implicat en aquest procés la sobreactivació de l'UPR, en especial de la branca IRE1 $\alpha$ . IRE1 $\alpha$  juga funcions pro-tumorals en diversos càncers entre els quals trobem el glioblastoma, i una elevada activitat d'IRE1 $\alpha$  s'ha associat amb un pitjor pronòstic (Lhomond et al., 2018; Raymundo et al., 2020). Atès que l'UPR és un mecanisme adaptatiu davant diversos estressos, també s'ha observat una sobreactivació de les seves branques en cèl·lules resistents al tractament, en especial en radioresistents (Graner, 2015; Shah et al., 2019). Malgrat la majoria de dades publicades, suggereixen un paper protector de l'UPR en les cèl·lules tumorals, la inducció de l'UPR també pot provocar mort cel·lular si es traspasa un determinat llindar. Una hipòtesi que està guanyant força en els últims

anys és la inducció de mort cel·lular a través de la interferència de la senyalització de l'UPR (ja sigui incrementant-la o disminuint-la) en cèl·lules tumorals amb una alta dependència per aquesta. En el nostre cas, hem optat per potenciar aquesta via fins a uns nivells insostenibles per a la supervivència de les cèl·lules de glioblastoma. De forma similar, Xipell i col·laboradors ressalten l'efecte antiglioma que té la combinació d'un inductor d'estrès de RE, tal com la Salinomicina, amb el quimioterapèutic d'ús TMZ tant *in vitro* com *in vivo*. En especial, en cèl·lules resistents a la radioteràpia, ja que la inducció d'estrès de RE promou la degradació de proteïnes reparadores del DNA tals com Rad51 (Xipell et al., 2016).

Cal ressaltar que altres aproximacions juguen la carta oposada: inhibir l'UPR basal, amb resultats igualment encoratjadors. És el cas de Le Reste et al., 2019 que utilitzen l'inhibidor de la RNasa d'IRE1 $\alpha$ , MKC8866, en el model murí preclínic de glioblastoma. En aquest, es reproduïx el tractament estàndard dels pacients: inclou una resecció quirúrgica del tumor i la combinació de radioteràpia i quimioteràpia amb TMZ. El seu treball aporta la prova de concepte de que la inhibició farmacològica d'IRE1 $\alpha$  pot ser utilitzada com adjuvant per millorar l'eficàcia de la combinatòria de radioteràpia i quimioteràpia.

El panorama que es dibuixa sembla indicar que el glioblastoma és un tumor que ha d'afrontar una gran varietat d'estressos recolzant la seva supervivència, en gran part, en l'activació de l'UPR. NNC 55-0396 no únicament té com a diana els TTCCs, els quals s'ha vist que participen en processos tant rellevants com supervivència o proliferació, sinó que també és capaç d'alterar l'UPR. El conjunt d'efectes desencadenats pel NNC 55-0396 a una concentració de 10  $\mu$ M *in vitro* provoca una mort dràstica de les cèl·lules de glioblastoma i col·loca, tant el NNC com el seu mecanisme d'acció, com una prometedora aproximació terapèutica per al tractament d'aquest tumor.

**CONCLUSIONS**





**PRIMERA.** Els TTCCs que participen en els corrents de les cèl·lules tumorals, anomenats corrents finestra, es troben permanentment oberts i representen aproximadament un 1% de la població de canals.

**SEGONA.** Els efectes *off-target* dels inhibidors de TTCCs estan provocats per la utilització de concentracions elevades dels compostos, degut a que tenen una baixa afinitat pels canals que participen en els corrents finestra, i per tant un efecte poc potent.

**TERCERA.** L'elevació dels nivells de  $Ca^{2+}$  citosòlic per l'administració de NNC 55-0396, un conegut bloquejant de TTCCs, és el desencadenant de la mort de les cèl·lules de glioblastoma.

**QUARTA.** L'increment de  $Ca^{2+}$  pel tractament amb NNC 55-0396 és una conseqüència *off-target* de la droga que afecta a les mobilitzacions de  $Ca^{2+}$  des del RE.

**CINQUENA.** L'activació d'IRE1 $\alpha$  per NNC 55-0396 promou la senyalització per CHOP que causa un ambient oxidat al RE a través de la inducció d'Ero1 $\alpha$ , que acaba activant els receptors d'IP $_3$  i provocant l'augment de  $Ca^{2+}$  citosòlic des del RE.

**SISENA.** La sortida massiva de  $Ca^{2+}$  del RE promou l'activació de la cinasa sensora de  $Ca^{2+}$  CaMKII, que a la vegada fosforila i activa JNK1.

**SETENA.** El mecanisme de mort per NNC 55-0396 és a través de l'eix IRE1 $\alpha$ -CHOP-IP $_3$ R-CaMKII-JNK1.

**VUITENA.** NNC 55-0396 té un paper dual en l'autofàgia: una inducció concomitant amb un bloqueig a etapes finals.

**NOVENA.** Els nivells de  $Ca^{2+}$  citosòlic regulen la transcripció de p62 a través de l'activació del factor de transcripció CREB per la cinasa sensora de  $Ca^{2+}$  CaMKII.

**DESENA.** JNK1 i CaMKII són reguladors clau de l'autofàgia induïda per NNC 55-0396 modulant p62 .

**ONZENA.** El silenciament dels TTCCs, Ca $_v$ 3.1 i Ca $_v$ 3.2, produeix una mort apoptòtica a través de la caspasa 8 en línies de glioblastoma.

**DOTZENA.** El silenciament de Ca $_v$ 3.1 redueix el creixement tumoral *in vivo* de xenografts murins en concordança amb la davallada de marcadors proliferatius i de p62 en els tumors.

**TRETZENA.** En el model de NS, Ca $_v$ 3.1 és important per a la viabilitat cel·lular malgrat no es troben diferències d'expressió de Ca $_v$ 3.1 i Ca $_v$ 3.2 en NS respecte el cultiu adherent.

**CATORZENA.** El silenciament, principalment de Ca $_v$ 3.1, en cultius primaris de glioblastoma desemboca en un fenotip compatible amb senescència, caracteritzat per augments de l'activitat  $\beta$ -gal i dels inhibidors de cicle p16 i p27 i la baixada en l'expressió de p62.



# BIBLIOGRAFIA



- Abad, M., Moreno, A., Palacios, A., Narita, M., Blanco, F., Moreno-Bueno, G., Narita, M., and Palmero, I. (2011). The tumor suppressor ING1 contributes to epigenetic control of cellular senescence. *Aging Cell* *10*, 158–171.
- Abbadie, C., and Pluquet, O. (2020). Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks. *Trends Biochem. Sci.* *45*, 371–374.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 834–846.
- Allsopp, R.C., Chang, E., Kashefi-Azham, M., Rogaev, E.I., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., and Harley, C.B. (1995). Telomere Shortening Is Associated with Cell Division in Vitro and in Vivo. *Exp. Cell Res.* *220*, 194–200.
- de Almeida, S.F., Fleming, J. V., Azevedo, J.E., Carmo-Fonseca, M., and de Sousa, M. (2007). Stimulation of an Unfolded Protein Response Impairs MHC Class I Expression. *J. Immunol.* *178*, 3612–3619.
- Altamirano, J., Brodwick, M.S., and Alvarez-Leefmans, F.J. (1998). Regulatory volume decrease and intracellular Ca<sup>2+</sup> in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J. Gen. Physiol.* *112*, 145–160.
- Alza, L., Nàger, M., Visa, A., Cantí, C., and Herreros, J. (2020). FAK inhibition induces glioblastoma cell senescence-like state through p62 and p27. *Cancers (Basel)* *12*, 1086.
- Ansari, N., Hadi-Alijanvand, H., Sabbaghian, M., Kiaei, M., and Khodagholi, F. (2014). Interaction of 2-APB, dantrolene, and TDMT with IP3R and RyR modulates ER stress-induced programmed cell death I and II in neuron-like PC12 cells: An experimental and computational investigation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *32*, 1211–1230.
- Antal, L., and Martin-Caraballo, M. (2019). T-type calcium channels in cancer. *Cancers (Basel)* *11*, 1–18.
- Asmara, H., Micu, I., Rizwan, A.P., Sahu, G., Simms, B.A., Zhang, F.X., Engbers, J.D.T., Stys, P.K., Zamponi, G.W., and Turner, R.W. (2017). A T-type channel-calmodulin complex triggers  $\alpha$ CaMKII activation. *Mol. Brain* *10*, 37.
- Atakpa, P., Thillaiappan, N.B., Mataragka, S., Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2018). IP3 Receptors Preferentially Associate with ER-Lysosome Contact Sites and Selectively Deliver Ca<sup>2+</sup> to Lysosomes. *Cell Rep.* *25*, 3180–3193.e7.
- Auf, G., Jabouille, A., Guérit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., et al. (2010). Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15553–15558.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699.
- Barbado, M., Fablet, K., Ronjat, M., and De Waard, M. (2009). Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1793*, 1096–1104.
- Barceló, C., Sisó, P., Maiques, O., García-Mulero, S., Sanz-Pamplona, R., Navaridas, R., Megino, C., Felip, I., Urdanibia, I., Eritja, N., et al. (2020). T-Type Calcium Channels as Potential Therapeutic Targets in Vemurafenib-Resistant BRAFV600E Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *140*, 1253–1265.
- Bartkowiak, K., Effenberger, K.E., Harder, S., Andreas, A., Buck, F., Peter-Katalinic, J., Pantel, K., and Brandt, B.H. (2010). Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients. *J. Proteome Res.* *9*, 3158–3168.

- Bartkowiak, K., Kwiatkowski, M., Buck, F., Gorges, T.M., Nilse, L., Assmann, V., Andreas, A., Müller, V., Wikman, H., Riethdorf, S., et al. (2015). Disseminated tumor cells persist in the bone marrow of breast cancer patients through sustained activation of the unfolded protein response. *Cancer Res.* *75*, 5367–5377.
- Berridge, M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* *32*, 235–249.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* *2*, 326–332.
- Bezprozvanny, I., and Tsien, R.W. (1995). Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol. Pharmacol.* *48*, 540–549.
- Bhardwaj, M., Leli, N.M., Koumenis, C., and Amaravadi, R.K. (2019). Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses. *Semin. Cancer Biol.* *66*, 116–128.
- Birch, J., Barnes, P.J., and Passos, J.F. (2018). Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacol. Ther.* *183*, 34–49.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513–1523.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. pp. 181–197.
- Blagosklonny, M.V. (2011). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Aging (Albany, NY)*. *3*, 685–705.
- Blaustein, M.P., and Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.* *79*, 763–854.
- Blazanin, N., Son, J., Craig-Lucas, A.B., John, C.L., Brech, K.J., Podolsky, M.A., and Glick, A.B. (2017). ER stress and distinct outputs of the IRE1 $\alpha$  RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 9900–9905.
- Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., Wojtala, A., et al. (2013). Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* *12*, 674–683.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Roderick, H.L. (2002). Calcium signalling: More messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* *12*, R563–R565.
- Bootman, M.D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J.B., and Rietdorf, K. (2018). The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium* *70*, 32–46.
- Borodkina, A. V., Shatrova, A.N., Deryabin, P.I., Griukova, A.A., Abushik, P.A., Antonov, S.M., Nikolsky, N.N., and Burova, E.B. (2016). Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging (Albany, NY)*. *8*, 3400–3418.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z. V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. *Dynamics and Metabolic Integration. Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *301*, 215–290.
- Brnjic, S., Olofsson, M.H., Havelka, A.M., and Linder, S. (2010). Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. *Mol. Biosyst.* *6*, 767–774.
- Bruna, A., Darken, R.S., Rojo, F., Ocaña, A., Peñuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., et al. (2007). High TGF $\beta$ -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. *Cancer Cell* *11*, 147–160.
- Brzozowski, J.S., and Skelding, K.A. (2019). The multi-functional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family:

Emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention. *Pharmaceuticals* 12, 8.

- Buchanan, P.J., and McCloskey, K.D. (2016). CaV channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics. *Eur. Biophys. J.* 45, 621–633.
- Bui, P.H., Quesada, A., Handforth, A., and Hankinson, O. (2008). The mibefradil derivative NNC55-0396, a specific T-type calcium channel antagonist, exhibits less CYP3A4 inhibition than mibefradil. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1291–1299.
- Büsselberg, D., and Florea, A.M. (2017). Targeting intracellular calcium signaling ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) to overcome acquired multidrug resistance of cancer cells: A mini-overview. *Cancers (Basel)*. 9.
- Caccese, M., Indraccolo, S., Zagonel, V., and Lombardi, G. (2019). PD-1/PD-L1 immune-checkpoint inhibitors in glioblastoma: A concise review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 135, 128–134.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96.
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.
- Campisi, J., and Di Fagagna, F.D.A. (2007). Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Capiod, T., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007). Calcium signalling and cancer cell growth. *Subcell. Biochem.* 45, 405–427.
- Carbone, E., and Lux, H.D. (1984). A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* 46, 413–418.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.H., Yang, J., Parker, I., et al. (2010). Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca<sup>2+</sup> Transfer to Mitochondria. *Cell* 142, 270–283.
- Cárdenas, C., Müller, M., McNeal, A., Lovy, A., Jaña, F., Bustos, G., Urra, F., Smith, N., Molgó, J., Diehl, J.A., et al. (2016). Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca<sup>2+</sup> Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Rep.* 14, 2313–2324.
- Carrano, A.C., and Pagano, M. (2001). Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153, 1381–1389.
- Carreras-Sureda, A., Jaña, F., Urra, H., Durand, S., Mortenson, D.E., Sagredo, A., Bustos, G., Hazari, Y., Ramos-Fernández, E., Sassano, M.L., et al. (2019). Non-canonical function of IRE1 $\alpha$  determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nat. Cell Biol.* 21, 755–767.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.
- Cerella, C., Diederich, M., and Ghibelli, L. (2010). The Dual Role of Calcium as Messenger and Stressor in Cell Damage, Death, and Survival. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 546163.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J., and Lory, P. (2002). Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ( $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H and  $\alpha$ 1I) to neuronal excitability. *J. Physiol.* 540, 3–14.
- Chen, H.Y., and White, E. (2011). Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev. Res.* 4, 973–983.
- Cheng, X., Liu, H., Jiang, C.C., Fang, L., Chen, C., Zhang, X.D., and Jiang, Z.W. (2014). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 34, 772–781.
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premisrut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 25, 2125–2136.
- Chouabe, C., Drici, M.D., Romey, G., and Barhanin, J. (2000). Effects of calcium



- channel blockers on cloned cardiac K<sup>+</sup> channels I(Kr) and I(Ks). *Therapie* 55, 195–202.
- Cicchini, M., Karantza, V., and Xia, B. (2015). Molecular Pathways: Autophagy in Cancer—A Matter of Timing and Context. *Clin. Cancer Res.* 21, 498–504.
- Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 12, 1509–1518.
- Coe, H., and Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. In *General Physiology and Biophysics*, pp. 651–666.
- Cohen, A.L., Holmen, S.L., and Colman, H. (2013). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 345.
- Collins, K. (2000). Mammalian telomeres and telomerase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 378–383.
- Coppe, J.P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* 281, 29568–29574.
- Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G.M., and Piacentini, M. (2017). Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate. *Front. Oncol.* 7.
- Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* 35, 724–742.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Bettigole, S.E., and Glimcher, L.H. (2017). Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* 168, 692–706.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* (80- ). 273, 501–503.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., and Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 7, 3–17.
- D’Adda Di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
- Das, A., Pushparaj, C., Bahí, N., Sorolla, A., Herreros, J., Pamplona, R., Vilella, R., Matias-Guiu, X., Martí, R.M., and Cantí, C. (2012). Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 200–212.
- Das, A., Pushparaj, C., Herreros, J., Nager, M., Vilella, R., Portero, M., Pamplona, R., Matias-Guiu, X., Martí, R.M., and Cantí, C. (2013). T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, 874–885.
- Decuypere, J.-P., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2012). Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells* 1, 284–312.
- Decuypere, J.P., Bultynck, G., and Parys, J.B. (2011a). A dual role for Ca<sup>2+</sup> in autophagy regulation. *Cell Calcium* 50, 242–250.
- Decuypere, J.P., Welkenhuyzen, K., Luyten, T., Ponsaerts, R., Dewaele, M., Molgó, J., Agostinis, P., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., et al. (2011b). Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and autophagy induction are interrelated. *Autophagy* 7, 1472–1489.
- Decuypere, J.P., Kindt, D., Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Missiaen, L., De Smedt, H., Bultynck, G., and Parys, J.B. (2013). mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *PLoS One* 8, e61020.
- Decuypere, J.P., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2015). ITPRs/inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in autophagy: From enemy to ally. *Autophagy* 11, 1944–1948.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51–64.

- Delphi, C., Huang, K.-P., Scotto, C., Chapel, A., Vincon, M., Chambaz, E., Garin, J., and Baudier, J. (1997). The in Vitro Phosphorylation of P53 by Calcium-Dependent Protein Kinase C. Characterization of a Protein-Kinase-C-Binding Site on p53. *Eur. J. Biochem.* *245*, 684–692.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E.L., and Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *175*, 595–605.
- Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1053–1063.
- Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994). JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* *76*, 1025–1037.
- Deschênes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2014). Cellular senescence and protein degradation: Breaking down cancer. *Cell Cycle* *13*, 1840–1858.
- Dewenter, M., Von Der Lieth, A., Katus, H.A., and Backs, J. (2017). Calcium signaling and transcriptional regulation in cardiomyocytes. *Circ. Res.* *121*, 1000–1020.
- Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 349–364.
- Dolphin, A.C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* *594*, 5369–5390.
- Dolphin, A.C. (2018). Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci. Adv.* *2*, 239821281879480.
- Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* *501*, 421–425.
- Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., et al. (2016). ATF6a regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget* *7*, 67699–67715.
- Drullion, C., Marot, G., Martin, N., Desle, J., Saas, L., Salazar-Cardozo, C., Bouali, F., Pourtier, A., Abbadie, C., and Pluquet, O. (2018). Pre-malignant transformation by senescence evasion is prevented by the PERK and ATF6alpha branches of the Unfolded Protein Response. *Cancer Lett.* *438*, 187–196.
- Dubois, C., Prevarskaya, N., and Vanden Abeele, F. (2016). The calcium-signaling toolkit: Updates needed. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1863*, 1337–1343.
- Duitama, M., Vargas-López, V., Casas, Z., Albarracin, S.L., Sutachan, J.-J., and Torres, Y.P. (2020). TRP Channels Role in Pain Associated With Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* *14*.
- DuRose, J.B., Tam, A.B., and Niwa, M. (2006). Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3095–3107.
- Dziegielewska, B., Brautigan, D.L., Larner, J.M., and Dziegielewski, J. (2014). T-Type Ca<sup>2+</sup> channel inhibition induces p53-dependent cell growth arrest and apoptosis through activation of p38-MAPK in colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.* *12*, 348–358.
- Eberhard, M., Miyagawa, K., Hermeyer, K., and Erne, P. (1995). Effects of mibefradil on intracellular Ca<sup>2+</sup> release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *353*, 94–101.
- Egorova, P.A., and Bezprozvanny, I.B. (2018). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *FEBS J.* *285*, 3547–3565.

- Endo, M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* *89*, 1153–1176.
- Eneyart, J.J., Dirksen, R.T., Sharma, V.K., Williford, D.J., and Sheu, S.S. (1990). Antipsychotic pimozide is a potent Ca<sup>2+</sup> channel blocker in heart. *Mol. Pharmacol.* *37*, 752–757.
- Eneyart, J.J., Biagi, B.A., and Mlinar, B. (1992). Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines. *Mol. Pharmacol.* *42*, 364–372.
- Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells [2]. *Cell Death Differ.* *13*, 1238–1241.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* *25*, 533–535.
- Erwig, L.P., and Henson, P.M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* *15*, 243–250.
- Everett, L.J., Lay, J.L., Lukovac, S., Bernstein, D., Steger, D.J., Lazar, M.A., and Kaestner, K.H. (2013). Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. *BMC Genomics* *14*, 337.
- Fang, L., Gong, J., Wang, Y., Liu, R., Li, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Song, C., Yang, A., et al. (2014). MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *33*, 76.
- Farfariello, V., Iamshanova, O., Germain, E., Fliniaux, I., and Prevarskaya, N. (2014). Calcium homeostasis in cancer: A focus on senescence. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 1974–1979.
- Feng, Y.X., Sokol, E.S., Del Vecchio, C.A., Sanduja, S., Claessen, J.H.L., Proia, T.A., Jin, D.X., Reinhardt, F., Ploegh, H.L., Wang, Q., et al. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 $\alpha$  and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov.* *4*, 702–715.
- Fernald, K., and Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* *23*, 620–633.
- Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E., and Borchard, G. (2002). Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci* *4*, E12.
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H., and Mak, D.O.D. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol. Rev.* *87*, 593–658.
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W., and Kaiser, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* *10*, 203–210.
- Fred Dice, J. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 305–309.
- Füllgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D.-H., and Rubinsztein, D.C. (2016). Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 3059–3066.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* *14*, 355–365.
- Gackière, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoï-Mariot, M.T., Mauroy, B., Prevarskaya, N., et al. (2008). CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 10162–10173.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M., and Kroemer, G. (2010). Mitochondrial gateways to cancer. *Mol. Aspects Med.* *31*, 1–20.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S.,

- Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* *34*, 856–880.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* (80-. ). *333*, 1891–1894.
- Geraldo, L.H.M., Garcia, C., da Fonseca, A.C.C., Dubois, L.G.F., de Sampaio e Spohr, T.C.L., Matias, D., de Camargo Magalhães, E.S., do Amaral, R.F., da Rosa, B.G., Grimaldi, I., et al. (2019). Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends in Cancer* *5*, 46–65.
- Gewirtz, D.A. (2013). Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy* *9*, 808–812.
- Ghosh, R., Lipson, K.L., Sargent, K.E., Mercurio, A.M., Hunt, J.S., Ron, D., and Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One* *5*, e9575.
- Gilbert, H.F. (2011). Protein Disulfide Isomerase and the Catalysis of Oxidative Protein Folding. *Fold. Disulfide Proteins* *133–149*.
- Gilbert, L.A., and Hemann, M.T. (2010). DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* *143*, 355–366.
- Gimple, R.C., Bhargava, S., Dixit, D., and Rich, J.N. (2019). Glioblastoma stem cells: Lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* *33*, 591–609.
- Go, D.H., Lee, Y.G., Lee, D.H., Kim, J.A., Jo, I.H., Han, Y.S., Jo, Y.H., Kim, K.Y., Seo, Y.K., Moon, J.H., et al. (2017). 3-Decylcatechol induces autophagy-mediated cell death through the IRE1 $\alpha$ /JNK/p62 in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* *8*, 58790–58800.
- Goetz, M.E., and Luch, A. (2008). Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* *266*, 73–83.
- Gomez, B.P., Riggins, R.B., Shajahan, A.N., Klimach, U., Wang, A., Crawford, A.C., Zhu, Y., Zwart, A., Wang, M., and Clarke, R. (2007). Human X-Box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *FASEB J.* *21*, 4013–4027.
- Gomora, J.C., Enyeart, J.A., and Enyeart, J.J. (1999). Mibefradil potently blocks ATP-activated K<sup>+</sup> channels in adrenal cells. *Mol. Pharmacol.* *56*, 1192–1197.
- Gomora, J.C., Xu, L., Enyeart, J.A., and Enyeart, J.A. (2000). Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in cortisol-secreting cells. *Undefined*.
- Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., et al. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* *179*, 813–827.
- Graef, M. (2020). Recent advances in the understanding of autophagosome biogenesis. *F1000Research* *9*.
- Granados, D.P., Tanguay, P.L., Hardy, M.P., Caron, É., de Verteuil, D., Meloche, S., and Perreault, C. (2009). ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* *10*, 10.
- Granados, K., Hüser, L., Federico, A., Sachindra, S., Wolff, G., Hielscher, T., Novak, D., Madrigal-Gamboa, V., Sun, Q., Vierthaler, M., et al. (2020). T-type calcium channel inhibition restores sensitivity to MAPK inhibitors in de-differentiated and adaptive melanoma cells. *Br. J. Cancer* *122*, 1023–1036.
- Graner, M.W. (2015). The unfolded protein response in glioblastomas: Targetable or trouble? *Futur. Sci. OA* *1*.
- Gray, L.S., Schiff, D., and Macdonald, T.L. (2013). A model for the regulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in proliferation: Roles in stem cells and cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *13*, 589–595.

- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* *446*, 153–158.
- Guadamillas, M.C., Cerezo, A., and del Pozo, M.A. (2011). Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* *124*, 3189–3197.
- Gump, J.M., and Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* *21*, 387–392.
- Haar, C.P., Hebbar, P., Wallace, G.C., Das, A., Vandergrift, W.A., Smith, J.A., Giglio, P., Patel, S.J., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2012). Drug resistance in glioblastoma: A mini review. *Neurochem. Res.* *37*, 1192–1200.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* *495*, 389–393.
- Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell* *138*, 562–575.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000). Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell* *5*, 897–904.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol. Cell* *11*, 619–633.
- Hardingham, G.E., Arnold, F.J.L., and Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* *4*, 261–267.
- Harr, M.W., and Distelhorst, C.W. (2010). Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a005579.
- Hayashi, T., and Su, T.P. (2007). Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca<sup>2+</sup> Signaling and Cell Survival. *Cell* *131*, 596–610.
- Heijman, J., Voigt, N., Wehrens, X.H.T., and Dobrev, D. (2014). Calcium dysregulation in atrial fibrillation: The role of CaMKII. *Front. Pharmacol.* *5*, 30.
- Hengst, L., and Reed, S.I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* (80- ). *271*, 1861–1864.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 89–102.
- Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* *69*, 169–181.
- Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005). Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* *120*, 85–98.
- Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T., and Mikoshiba, K. (2010). Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP3 Receptor. *Neuron* *68*, 865–878.
- Hogan, P.G., and Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *460*, 40–49.
- Hollenstein, D.M., and Kraft, C. (2020). Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *65*, 50–57.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in

- mammalian cells. *J. Cell Biol.* *186*, 323–331.
- Hong, D.H., Yang, D., Choi, I.W., Son, Y.K., Jung, W.K., Kim, D.J., Han, J., Na, S.H., and Park, W.S. (2012). The T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor mibefradil inhibits voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.* *120*, 196–205.
- Hoppe, U.C. (2010). Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett.* *584*, 1975–1981.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* *6*, 891–900.
- Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* *14*, 1576–1582.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- $\beta$ , and Bcl-2. *Mol. Cell* *25*, 193–205.
- Hsu, S.K., Chiu, C.C., Dahms, H.U., Chou, C.K., Cheng, C.M., Chang, W.T., Cheng, K.C., Wang, H.M.D., and Lin, I.L. (2019). Unfolded protein response (UPR) in survival, dormancy, immunosuppression, metastasis, and treatments of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 2518.
- Hu, H., Tian, M., Ding, C., and Yu, S. (2019). The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front. Immunol.* *9*, 3083.
- Hu, S., Li, L., Huang, W., Liu, J., Lan, G., Yu, S., Peng, L., Xie, X., Yang, L., Nian, Y., et al. (2018). CAV3.1 knockdown suppresses cell proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by inhibiting AKT. *Cancer Manag. Res.* *2018*, 4603–4614.
- Hu, W.Y., He, Z.Y., Yang, L.J., Zhang, M., Xing, D., and Xiao, Z.C. (2015). The Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor 2-APB reverses  $\beta$ -amyloid-induced LTP deficit in hippocampus by blocking BAX and caspase-3 hyperactivation. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 2273–2285.
- Huang, L., Keyser, B.M., Tagmose, T.M., Hansen, J.B., Taylor, J.T., Zhuang, H., Zhang, M., Ragsdale, D.S., and Li, M. (2004). NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-Benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: A New Selective Inhibitor of T-Type Calcium Channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*, 193–199.
- Huang, S., Okamoto, K., Yu, C., and Sinicrope, F.A. (2013). P62/sequestosome-1 Up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J. Biol. Chem.* *288*, 33654–33666.
- Huang, W., Lu, C., Wu, Y., Ouyang, S., and Chen, Y. (2015). T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *34*, 54.
- Huber, A.L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Chilloux, J., Fauvet, F., Payen, L., Kfoury, A., Renno, T., et al. (2013). P58IPK-Mediated Attenuation of the Proapoptotic PERK-CHOP Pathway Allows Malignant Progression upon Low Glucose. *Mol. Cell* *49*, 1049–1059.
- Humeau, J., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Nuñez, L., Villalobos, C., Kroemer, G., and Senovilla, L. (2018). Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium* *70*, 3–15.
- Ikeda, S., Matsushima, S., Okabe, K., Ikeda, M., Ishikita, A., Tadokoro, T., Enzan, N., Yamamoto, T., Sada, M., Deguchi, H., et al. (2019). Blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF- $\kappa$ B pathway. *Sci. Rep.* *9*, 1–14.
- Ito, Y., Hoare, M., and Narita, M. (2017). Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends Cell Biol.* *27*, 820–832.
- Iurlaro, R., and Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum

stress. *FEBS J.* 283, 2640–2652.

- Jahnsen, H., and Llinás, R. (1984). Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J. Physiol.* 349, 227–247.
- Jaud, M., Philippe, C., Di Bella, D., Tang, W., Pyronnet, S., Laurell, H., Mazzolini, L., Rouault-Pierre, K., and Touriol, C. (2020). Translational Regulations in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Cancers. *Cells* 9, 540.
- Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and TNF- $\alpha$  regulate autophagy through c-*jun* N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* 84, 448–454.
- Jia, W., Pua, H.H., Li, Q.-J., and He, Y.-W. (2011). Autophagy Regulates Endoplasmic Reticulum Homeostasis and Calcium Mobilization in T Lymphocytes. *J. Immunol.* 186, 1564–1574.
- Jiménez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Sylvain Richard, Snutch, T.P., and Nargeot, J. (2000). Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology* 39, 1–10.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* 137, 721–735.
- Kang, J.H., and Adamson, C. (2015). Novel chemotherapeutics and other therapies for treating high-grade glioma. *Expert Opin. Investig. Drugs* 24, 1361–1379.
- Kang, T.W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547–551.
- Kania, E., Pająk, B., and Orzechowski, A. (2015). Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res. Int.* 2015, 12.
- Kania, E., Roest, G., Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2017). IP3 receptor-mediated calcium signaling and its role in autophagy in cancer. *Front. Oncol.* 7.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 11, 448–457.
- Kasri, N.N., Török, K., Galione, A., Garnham, C., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2006). Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 8332–8338.
- Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.
- Keir, S.T., Friedman, H.S., Reardon, D.A., Bigner, D.D., and Gray, L.A. (2013). Mibefradil, a novel therapy for glioblastoma multiforme: Cell cycle synchronization and interlaced therapy in a murine model. *J. Neurooncol.* 111, 97–102.
- Kim, K.H., and Lee, M.-S. (2014). Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 322–337.
- Kim, K.H., Kim, D., Park, J.Y., Jung, H.J., Cho, Y.H., Kim, H.K., Han, J., Choi, K.Y., and Kwon, H.J. (2015). NNC 55-0396, a T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor, inhibits angiogenesis via suppression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signal transduction. *J. Mol. Med.* 93, 499–509.
- Kim, T.W., Lee, S.Y., Kim, M., Cheon, C., and Ko, S.G. (2018). Kaempferol induces autophagic cell death via IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells. *Cell Death Dis.* 9, 14.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3, 452–460.
- Kinzler, M.N., Zielke, S., Kardo, S., Meyer, N., Kögel, D., van Wijk, S.J.L., and Fulda, S. (2020). STF-62247 and pimozone induce autophagy and autophagic cell death in

- mouse embryonic fibroblasts. *Sci. Rep.* *10*, 1–15.
- Kiviluoto, S., Vervliet, T., Ivanova, H., Decuypere, J.P., De Smedt, H., Missiaen, L., Bultynck, G., and Parys, J.B. (2013). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1833*, 1612–1624.
- Klein, S.R., Piya, S., Lu, Z., Xia, Y., Alonso, M.M., White, E.J., Wei, J., Gomez-Manzano, C., Jiang, H., and Fueyo, J. (2015). C-Jun N-terminal kinases are required for oncolytic adenovirus-mediated autophagy. *Oncogene* *34*, 5295–5301.
- Kominami, K., Nakabayashi, J., Nagai, T., Tsujimura, Y., Chiba, K., Kimura, H., Miyawaki, A., Sawasaki, T., Yokota, H., Manabe, N., et al. (2012). The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1823*, 1825–1840.
- Komori, T. (2017). The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: The major points of revision. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. *57*, 301–311.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 726–734.
- Kondratskyi, A., Yassine, M., Kondratska, K., Skryma, R., Slomianny, C., and Prevarskaya, N. (2013). Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front. Physiol.* *4*.
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., Klionsky, D.J., and Prevarskaya, N. (2018). Ion channels in the regulation of autophagy. *Autophagy* *14*, 3–21.
- Korolchuk, V.I., Miwa, S., Carroll, B., and von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine* *21*, 7–13.
- Kosmaczewski, S.G., Edwards, T.J., Han, S.M., Eckwahl, M.J., Meyer, B.I., Peach, S., Hesselberth, J.R., Wolin, S.L., and Hammarlund, M. (2014). The RtcB ligase is an essential component of the metazoan unfolded protein response. *EMBO Rep.* *15*, 1278–1285.
- Koukourakis, M.I., Mitrakas, A.G., and Giatromanolaki, A. (2016). Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: Evidence and issues to resolve. *Br. J. Cancer* *114*, 485–496.
- Krebs, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2015). Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *460*, 114–121.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: The story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 1004–1010.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* *40*, 280–293.
- Krouse, A.J., Gray, L., Macdonald, T., and Mccray, J. (2015). Repurposing and rescuing of mibefradil, an antihypertensive, for cancer: A case study. *Assay Drug Dev. Technol.* *13*, 650–653.
- Kucharewicz, K., Dudkowska, M., Zawadzka, A., Ogrodnik, M., Szczepankiewicz, A.A., Czarnocki, Z., and Sikora, E. (2018). Simultaneous induction and blockade of autophagy by a single agent. *Cell Death Dis.* *9*, 1–15.
- Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H., and Takeshita, A. (1996). Cell Cycle-Dependent Expression of L- and T-Type Ca<sup>2+</sup> Currents in Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Primary Culture. *Circ. Res.* *79*, 14–19.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 81–94.
- Kuryshv, Y.A., Brown, A.M., Duzic, E., and Kirsch, G.E. (2014). Evaluating state dependence and subtype selectivity of calcium channel modulators in automated electrophysiology assays. *Assay Drug Dev. Technol.* *12*, 110–119.
- Kwak, D., Choi, S., Jeong, H., Jang, J.-H., Lee, Y., Jeon, H., Lee, M.N., Noh, J., Cho, K., Yoo, J.S.,



- et al. (2012). Osmotic Stress Regulates Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Complex 1 via c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-mediated Raptor Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *287*, 18398–18407.
- Kwon, Y., Kim, J.W., Jeoung, J.A., Kim, M.S., and Kang, C. (2017). Autophagy is pro-senescence when seen in close-up, but anti-senescence in long-shot. *Mol. Cells* *40*, 607–612.
- Lakshmanan, A.P., Thandavarayan, R.A., Palaniyandi, S.S., Sari, F.R., Meilei, H., Giridharan, V. V., Soetikno, V., Suzuki, K., Kodama, M., and Watanabe, K. (2011). Modulation of AT-1R/CHOP-JNK-Caspase12 pathway by olmesartan treatment attenuates ER stress-induced renal apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* *44*, 627–634.
- Lallet-Daher, H., Wiel, C., Gitenay, D., Navaratnam, N., Augert, A., Calvé, B. Le, Verbeke, S., Carling, D., Aubert, S., Vindrieux, D., et al. (2013). Potassium channel KCNA1 modulates oncogene-induced senescence and transformation. *Cancer Res.* *73*, 5253–5265.
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., and Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* *78*, 247–306.
- Lang, F.F., Conrad, C., Gomez-Manzano, C., Alfred Yung, W.K., Sawaya, R., Weinberg, J.S., Prabhu, S.S., Rao, G., Fuller, G.N., Aldape, K.D., et al. (2018). Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* *36*, 1419–1427.
- Lapointe, S., Perry, A., and Butowski, N.A. (2018). Primary brain tumours in adults. *Lancet* *392*, 432–446.
- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* *29*, 1203–1217.
- Latour, I., Louw, D.F., Beedle, A.M., Hamid, J., Sutherland, G.R., and Zamponi, G.W. (2004). Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia* *48*, 112–119.
- Lee, S.Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* *3*, 198–210.
- Lee, S., and Schmitt, C.A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol.* *21*, 94–101.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7448–7459.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* *5*, 187–195.
- Lee, N., Jeong, S., Kim, K.C., Kim, J.A., Park, J.Y., Kang, H.W., Perez-Reyes, E., and Lee, J.H. (2017). Ca<sup>2+</sup> regulation of Cav3.3 T-type Ca<sup>2+</sup> channel is mediated by calmodulin. *Mol. Pharmacol.* *92*, 347–357.
- Lhomond, S., Avril, T., Dejeans, N., Voutetakis, K., Doultinos, D., McMahon, M., Pineau, R., Obacz, J., Papadodima, O., Jouan, F., et al. (2018). Dual IRE 1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol. Med.* *10*.
- Li, D.-D., Wang, L.-L., Deng, R., Tang, J., Shen, Y., Guo, J.-F., Wang, Y., Xia, L.-P., Feng, G.-K., Liu, Q.Q., et al. (2009a). The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene* *28*, 886–898.
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., and Tabas, I. (2009b). Role of ERO1- $\alpha$ -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* *186*, 783–792.
- Li, G., Scull, C., Ozcan, L., and Tabas, I. (2010). NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J. Cell Biol.* *191*, 1113–1125.

- Li, M., Hansen, J.B., Huang, L., Keyser, B.M., and Taylor, J.T. (2005). Towards selective antagonists of T-type calcium channels: Design, characterization and potential applications of NNC 55-0396. *Cardiovasc. Drug Rev.* *23*, 173–196.
- Li, M., Yang, Z., Vollmer, L.L., Gao, Y., Fu, Y., Liu, C., Chen, X., Liu, P., Vogt, A., and Yin, X.-M. (2015). AMDE-1 Is a Dual Function Chemical for Autophagy Activation and Inhibition. *PLoS One* *10*, e0122083.
- Li, W., Zhang, S.L., Wang, N., Zhang, B. Bin, and Li, M. (2011a). Blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest.* *29*, 339–346.
- Li, W., Zhang, S.L., Wang, N., Zhang, B. Bin, and Li, M. (2011b). Blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest.* *29*, 339–346.
- Li, X., Wu, X.Q., Deng, R., Li, D.D., Tang, J., Chen, W.D., Chen, J.H., Ji, J., Jiao, L., Jiang, S., et al. (2017a). CaMKII-mediated Beclin 1 phosphorylation regulates autophagy that promotes degradation of Id and neuroblastoma cell differentiation. *Nat. Commun.* *8*, 1–16.
- Li, X.X., Zhang, H.S., Xu, Y.M., Zhang, R.J., Chen, Y., Fan, L., Qin, Y.Q., Liu, Y., Li, M., and Fang, J. (2017b). Knockdown of IRE1 $\alpha$  inhibits colonic tumorigenesis through decreasing  $\alpha$ -catenin and IRE1 $\alpha$  targeting suppresses colon cancer cells. *Oncogene* *36*, 6738–6746.
- Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., and Chen, Z. (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *46*, 629–640.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* (80-. ). *318*, 944–949.
- Linares, J.F., Amanchy, R., Greis, K., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2011). Phosphorylation of p62 by cdk1 Controls the Timely Transit of Cells through Mitosis and Tumor Cell Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2171–2171.
- Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* *67*, 3117–3126.
- Liu, E.Y., and Ryan, K.M. (2012). Autophagy and cancer - issues we need to digest. *J. Cell Sci.* *125*, 2349–2358.
- Liu, C., Sage, J.C., Miller, M.R., Verhaak, R.G.W., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R.T., Nishiyama, A., Luo, L., et al. (2011). Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* *146*, 209–221.
- Liu, F., Wang, X.Y., Zhou, X.P., Liu, Z.P., Song, X. Bin, Wang, Z.Y., and Wang, L. (2017). Cadmium disrupts autophagic flux by inhibiting cytosolic Ca<sup>2+</sup>-dependent autophagosome-lysosome fusion in primary rat proximal tubular cells. *Toxicology* *383*, 13–23.
- Liu, J.H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C.R., and Bernheim, L. (1999). Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human fusion-competent myoblasts. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 245–250.
- Llaguno, S.R.A., and Parada, L.F. (2016). Cell of origin of glioma: Biological and clinical implications. *Br. J. Cancer* *115*, 1445–1450.
- Lloyd, R. V., Erickson, L.A., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, J.C., and Scheithauer, B.W. (1999). p27(kip1): A multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am. J. Pathol.* *154*, 313–323.
- Logue, S.E., McGrath, E.P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R.M., Oommen, A., Legembre, P., et al. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nat. Commun.* *9*, 1–14.
- Lory, P., Bidaud, I., and Chemin, J. (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* *40*, 135–146.
- Lotshaw, D.P. (2001). Role of membrane depolarization and T-type Ca<sup>2+</sup> channels in angiotensin II and K<sup>+</sup> stimulated aldosterone secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* *175*, 157–

171.

- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* *131*, 803–820.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
- Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., Zhuang, H., Xie, D., and Wu, S. (2008). T-type Ca<sup>2+</sup> channel expression in human esophageal carcinomas: A functional role in proliferation. *Cell Calcium* *43*, 49–58.
- Lu, Y., Liang, F.X., and Wang, X. (2014). A Synthetic Biology Approach Identifies the Mammalian UPR RNA Ligase RtcB. *Mol. Cell* *55*, 758–770.
- Ma, H., Groth, R.D., Cohen, S.M., Emery, J.F., Li, B., Hoedt, E., Zhang, G., Neubert, T.A., and Tsien, R.W. (2014).  $\gamma$ CaMKII shuttles Ca<sup>2+</sup>/CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell* *159*, 281–294.
- Madden, E., Logue, S.E., Healy, S.J., Manie, S., and Samali, A. (2019). The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol. Cell* *111*, 1–17.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527–2539.
- Maklad, A., Sharma, A., and Azimi, I. (2019). Calcium signaling in brain cancers: Roles and therapeutic targeting. *Cancers (Basel)*. *11*, 145–160.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2011). ER stress and its functional link to mitochondria: Role in cell survival and death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1–13.
- Manna, P.R., and Stocco, D.M. (2007). Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: Transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J. Mol. Endocrinol.* *39*, 261–277.
- March, H.N., and Winton, D.J. (2011). mTOR Regulation by JNK: Rescuing the Starving Intestinal Cancer Cell? *Gastroenterology* *140*, 1387–1391.
- Marciniak, S.J. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *18*, 3066–3077.
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., et al. (2013). XBP1 mRNA Splicing Triggers an Autophagic Response in Endothelial Cells through BECLIN-1 Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* *288*, 859–872.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* *21*, 361–370.
- Martin, N., and Bernard, D. (2018). Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* *70*, 16–23.
- Martin, R.L., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Perez-Reyes, E., and Hanck, D.A. (2000). Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *295*, 302–308.
- Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* *36*, 219–234.
- Mauvezin, C., Nagy, P., Juhász, G., and Neufeld, T.P. (2015). Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat. Commun.* *6*, 1–14.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 599–609.
- Merksamer, P.I., and Papa, F.R. (2010). The UPR and cell fate at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 1003–1006.
- Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., Däbritz, J.H.M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J.R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I.A., et al.

- (2018). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* *553*, 96–100.
- Milner, R., Famulski, K., and Michalak, M. (1992). Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* *112*, 1–13.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). *Methods in Mammalian Autophagy Research*. *Cell* *140*, 313–326.
- Monteith, G.R., Prevarskaya, N., and Roberts-Thomson, S.J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 367–380.
- Moreau, K., Ghislat, G., Hochfeld, W., Renna, M., Zavodszky, E., Runwal, G., Puri, C., Lee, S., Siddiqi, F., Menzies, F.M., et al. (2015). Transcriptional regulation of Annexin A2 promotes starvation-induced autophagy. *Nat. Commun.* *6*.
- Moretti, L., Yang, E.S., Kim, K.W., and Lu, B. (2007). Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist. Updat.* *10*, 135–143.
- Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., and Su, T.-P. (2013). Sigma-1 Receptor Chaperone at the ER-Mitochondrion Interface Mediates the Mitochondrion-ER-Nucleus Signaling for Cellular Survival. *PLoS One* *8*, e76941.
- Morita, H., Shi, J., Ito, Y., and Inoue, R. (2002). T-channel-like pharmacological properties of high voltage-activated, nifedipine-insensitive Ca<sup>2+</sup> currents in the rat terminal mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* *137*, 467–476.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P.J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* (80-. ). *354*, aaf4445.
- Muelleri, A., Schäfer, B.W., Ferrari, S., Weibel, M., Makek, M., Höchli, M., and Heizmann, C.W. (2005). The Calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 29186–29193.
- Nagelkerke, A., Bussink, J., Geurts-Moespot, A., Sweep, F.C.G.J., and Span, P.N. (2015). Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: Pharmacological modulation of treatment-induced autophagy. *Semin. Cancer Biol.* *31*, 99–105.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., et al. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* *65*, 3307–3318.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., and Pandolfi, P.P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 503–511.
- Nelson, R. (2003). Small interfering RNAs target HIV. *Lancet* *361*, 2214.
- Niklasson, M., Maddalo, G., Sramkova, Z., Mutlu, E., Wee, S., Sekyrova, P., Schmidt, L., Fritz, N., Dehnisch, I., Kyriatzis, G., et al. (2017). Membrane-Depolarizing Channel Blockers Induce Selective Glioma Cell Death by Impairing Nutrient Transport and Unfolded Protein/Amino Acid Responses. *Cancer Res.* *77*, 1741–1752.
- Nilius, B. (1986). Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca channel. *Biomed. Biochim. Acta* *45*.
- Noren Hooten, N., and Evans, M.K. (2017). Techniques to induce and quantify cellular senescence. *J. Vis. Exp.* *123*.
- Norman, J.M., Cohen, G.M., and Bampton, E.T.W. (2010). The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy* *6*, 1042–1056.
- Oakes, S.A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am. J. Pathol.* *190*, 934–946.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T.,

- Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9220–9231.
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.* *8*, 1–12.
- Ohkubo, T., and Yamazaki, J. (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* *41*, 267–275.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* *24*, 9–23.
- Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F., Campone, M., and Vallette, F. (2010). Hypoxia and the Malignant Glioma Microenvironment: Regulation and Implications for Therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* *2*, 263–284.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.
- Ozcan, L., Wong, C.C.L., Li, G., Xu, T., Pajvani, U., Park, S.K.R., Wronska, A., Chen, B.X., Marks, A.R., Fukamizu, A., et al. (2012). Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. *Cell Metab.* *15*, 739–751.
- Panner, A., Cribbs, L.L., Zainelli, G.M., Origitano, T.C., Singh, S., and Wurster, R.D. (2005). Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium* *37*, 105–119.
- Park, J.T., Lee, Y.-S., Cho, K.A., and Park, S.C. (2018). Adjustment of the lysosomal-mitochondrial axis for control of cellular senescence. *Ageing Res. Rev.* *47*, 176–182.
- Park, K.-J., Lee, S.-H., Lee, C.-H., Jang, J.-Y., Chung, J., Kwon, M.-H., and Kim, Y.-S. (2009). Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *382*, 726–729.
- Parys, J.B., and Vervliet, T. (2020). New Insights in the IP3 Receptor and Its Regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1131*, 243–270.
- Parys, J.B., Decuyper, J.P., and Bultynck, G. (2012). Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup>-release channel in autophagy. *Cell Commun. Signal.* *10*, 17.
- Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 460–473.
- Pasantes-Morales, H., and Morales Mulia, S. (2000). Influence of calcium on regulatory volume decrease: Role of potassium channels. *Nephron* *86*, 414–427.
- Passos, J.F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M.J., Harold, G., Schaeuble, K., et al. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* *5*, 1138–1151.
- Patki, M., McFall, T., Rosati, R., Huang, Y., Malysa, A., Polin, L., Fielder, A., Wilson, M.R., Lonardo, F., Back, J., et al. (2018). Chronic p27Kip1 Induction by Dexamethasone Causes Senescence Phenotype and Permanent Cell Cycle Blockade in Lung Adenocarcinoma Cells Over-expressing Glucocorticoid Receptor. *Sci. Rep.* *8*, 16006.
- Patschan, S., Chen, J., Polotskaia, A., Mendelev, N., Cheng, J., Patschan, D., and Goligorsky, M.S. (2008). Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *294*, H1119-29.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Pedriali, G., Rimessi, A., Sbanò, L., Giorgi, C., Wieckowski, M.R., Previati, M., and Pinton, P. (2017). Regulation of endoplasmic reticulum-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer and its importance for anti-cancer therapies. *Front. Oncol.* *7*, 180.

- Perchenet, L., and Clement-Chomienne, O. (2000). Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *295*, 771–778.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiol. Rev.* *83*, 117–161.
- Pitt, S.J., Reilly-O'Donnell, B., and Sitsapesan, R. (2016). Exploring the biophysical evidence that mammalian two-pore channels are NAADP-activated calcium-permeable channels. *J. Physiol.* *594*, 4171–4179.
- Pluquet, O., Pourtier, A., and Abbadie, C. (2015). The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *308*, 415–425.
- Potocnik, S.J., Murphy, T. V, Kotecha, N., and Hill, M.A. (2000). Effects of mibefradil and nifedipine on arteriolar myogenic responsiveness and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Br. J. Pharmacol.* *131*, 1065–1072.
- Prager, B.C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C.G., and Rich, J.N. (2020). Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer* *6*, 223–235.
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J.-P., Raynaud, S., and Auberger, P. (2010). Resveratrol Promotes Autophagic Cell Death in Chronic Myelogenous Leukemia Cells via JNK-Mediated p62/SQSTM1 Expression and AMPK Activation. *Cancer Res.* *70*, 1042–1052.
- Qu, Y.Q., Gordillo-Martinez, F., Law, B.Y.K., Han, Y., Wu, A., Zeng, W., Lam, W.K., Ho, C., Mok, S.W.F., He, H.Q., et al. (2018). 2-Aminoethoxydiphenylborane sensitizes anti-tumor effect of bortezomib via suppression of calcium-mediated autophagy article. *Cell Death Dis.* *9*, 361.
- Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* (80- ). *330*, 1344–1348.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., and Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 1035–1049.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* *68*, 619–647.
- Ranganathan, A.C., Adam, A.P., Zhang, L., and Aguirre-Ghisso, J.A. (2006). Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: An adaptive advantage for metastatic cells? *Cancer Biol. Ther.* *5*, 729–735.
- Rashid, H.-O., Yadav, R.K., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* *11*, 1956.
- Raymundo, D.P., Doultinos, D., Guillory, X., Carlesso, A., Eriksson, L.A., and Chevet, E. (2020). Pharmacological Targeting of IRE1 in Cancer. *Trends in Cancer* *6*, 1018–1030.
- Reifenberger, G., Wirsching, H.G., Knobbe-Thomsen, C.B., and Weller, M. (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 434–452.
- Le Reste, P.J., Pineau, R., Samal, J., Jégou, G., Lhomond, S., Gorman, A.M., Samali, A., Patterson, J.B., Zeng, Q., Pandit, A., et al. (2019). Development of a novel preclinical glioblastoma mouse model and therapeutic impact of IRE1 inhibition. *BioRxiv* 841296.
- Richard, S., Neveu, D., Carnac, G., Bodin, P., Travo, P., and Nargeot, J. (1992). Differential expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* *1160*, 95–104.
- Rim, H.K., Cho, S., Shin, D.H., Chung, K.S., Cho, Y.W., Choi, J.H., Lee, J.Y., and Lee, K.T. (2014). T-Type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, KYS05090 induces autophagy and apoptosis in A549 cells through inhibiting glucose uptake. *Molecules* *19*, 9864–9875.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 566–578.
- Roderick, H.L., and Knollmann, B.C. (2013).

Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *Circulation* 128, 1273–1275.

- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556.
- Rodman, D.M., Harral, J., Wu, S., West, J., Hoedt-Miller, M., Reese, K.A., and Fagan, K. (2005). The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest* 128, 581S-582S.
- Rodríguez-Gómez, J.A., Levitsky, K.L., and López-Barneo, J. (2012). T-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse embryonic stem cells: modulation during cell cycle and contribution to self-renewal. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C494-504.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.
- Rossier, M.F. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium* 40, 155–164.
- La Rovere, R.M.L., Roest, G., Bultynck, G., and Parys, J.B. (2016). Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium* 60, 74–87.
- Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* 22, R29–R34.
- Ryu, S.Y., Beutner, G., Dirksen, R.T., Kinnally, K.W., and Sheu, S.S. (2010). Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *FEBS Lett.* 584, 1948–1955.
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* 15, 713–725.
- Sakaki, K., and Kaufman, R.J. (2008). Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C. *Autophagy* 4, 841–843.
- Sakaki, K., Wu, J., and Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase C $\theta$  is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 283, 15370–15380.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 28, 99–114.
- Sallán, M.C., Visa, A., Shaikh, S., Nager, M., Herreros, J., and Cantí, C. (2018). T-type Ca<sup>2+</sup> Channels: T for targetable. *Cancer Res.* 78, 603–609.
- Sampson, J.H., Akabani, G., Archer, G.E., Berger, M.S., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Greer, K., Herndon, J.E., Kunwar, S., et al. (2008). Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors. *Neuro. Oncol.* 10, 320–329.
- Sankhe, S., Manousakidi, S., Antigny, F., Arthur Ataam, J., Bentebbal, S., Ruchon, Y., Lecerf, F., Sabourin, J., Price, L., Fadel, E., et al. (2017). T-type Ca<sup>2+</sup> channels elicit proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PSMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 1631–1641.
- Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 3460–3470.
- Santamaría, P.G., Mazón, M.J., Eraso, P., and Portillo, F. (2019). UPR: An Upstream Signal to EMT Induction in Cancer. *J. Clin. Med.* 8.
- Santoni, G., Santoni, M., and Nabissi, M. (2012). Functional role of T-type calcium channels in tumour growth and progression: Prospective in cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1244–1246.
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., and Marks, A.R. (2017). Intracellular calcium release channels: an update. *J. Physiol.* 595, 3041–3051.
- Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2006). Inositol and IP3 levels regulate autophagy: Biology and therapeutic speculations. *Autophagy* 2, 132–134.
- Scarpellino, G., Genova, T., Avanzato, D., Bernardini, M., Bianco, S., Petrillo, S., Tolosano, E., Vieira, J.R. de A., Bussolati, B.,

- Fiorio Pla, A., et al. (2019). Purinergic calcium signals in tumor-derived endothelium. *Cancers (Basel)*. *11*, 766.
- Schäfer, S., Ferioli, S., Hofmann, T., Zierler, S., Gudermann, T., and Chubanov, V. (2016). Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *468*, 623–634.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., et al. (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *EMBO J.* *31*, 3282–3296.
- Scorrano, L. (2003). BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis. *Science (80- )*. *300*, 135–139.
- Seo, M.D., Enomoto, M., Ishiyama, N., Stathopoulos, P.B., and Ikura, M. (2014). Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 1980–1991.
- Shah, S., Rodriguez, G., Musick, A., Walters, W., de Cordoba, N., Barbarite, E., Marlow, M., Marples, B., Prince, J., Komotar, R., et al. (2019). Targeting Glioblastoma Stem Cells with 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) Potentiates Radiation-Induced Unfolded Protein Response (UPR). *Cancers (Basel)*. *11*, 159.
- Sharpless, N.E., and Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 397–408.
- Sheehan, J.P., Xu, Z., Popp, B., Kowalski, L., and Schlesinger, D. (2013). Inhibition of glioblastoma and enhancement of survival via the use of mibefradil in conjunction with radiosurgery. *J. Neurosurg.* *118*, 830–837.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev. Cell* *3*, 99–111.
- Shirahata, M., Ono, T., Stichel, D., Schrimpf, D., Reuss, D.E., Sahm, F., Koelsche, C., Wefers, A., Reinhardt, A., Huang, K., et al. (2018). Novel, improved grading system(S) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* *136*, 153–166.
- Shoshan-Barmatz, V., De, S., and Meir, A. (2017). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1, Ca<sup>2+</sup> transport, apoptosis, and their regulation. *Front. Oncol.* *7*, 1.
- Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F., and Landriscina, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in Drug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 857.
- Smani, T., Shapovalov, G., Skryma, R., Prevarskaya, N., and Rosado, J.A. (2015). Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 1772–1782.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., and Weissman, J.S. (2011). Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science (80- )*. *334*, 1086–1090.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., and Zhang, Q. (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J. Cell. Physiol.* *232*, 2977–2984.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., and Zhang, Q. (2018a). Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J. Cell. Physiol.* *233*, 3867–3874.
- Song, X., Zhu, S., Chen, P., Hou, W., Wen, Q., Liu, J., Xie, Y., Liu, J., Klionsky, D.J., Kroemer, G., et al. (2018b). AMPK-Mediated BECN1 Phosphorylation Promotes Ferroptosis by Directly Blocking System Xc<sup>-</sup> Activity. *Curr. Biol.* *28*, 2388–2399.
- Songtao, Q., Lei, Y., Si, G., Yanqing, D., Huixia, H., Xuelin, Z., Lanxiao, W., and Fei, Y. (2012). IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci.* *103*, 269–273.
- De Stefani, D., Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2016). Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 161–192.



- Stephens, G.J., and Cottrell, G.S. (2019). CACHD1: A new activity-modifying protein for voltage-gated calcium channels. *Channels* 13, 120–123.
- Stock, L., Souza, C., and Treptow, W. (2013). Structural basis for activation of voltage-gated cation channels. *Biochemistry* 52, 1501–1513.
- Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 81, 21–50.
- Sun, F., Xu, X., Wang, X., and Zhang, B. (2016). Regulation of autophagy by Ca<sup>2+</sup>. *Tumor Biol.* 37, 15467–15476.
- Sun, T., Li, D.D., Wang, L.L., Xia, L.P., Ma, J.G., Guan, Z., Feng, G.K., and Zhu, X.F. (2011). C-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Transl. Med.* 9, 161.
- Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T.M., Porter, P., Coleman, I., True, L., and Nelson, P.S. (2012). Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat. Med.* 18, 1359–1368.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885.
- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.
- Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S.I., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., and Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 8, 1291–1297.
- Takeda, H., Kitaoka, Y., Hayashi, Y., Kumai, T., Munemasa, Y., Fujino, H., Kobayashi, S., and Ueno, S. (2007). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of CREB in NMDA-induced retinal neurotoxicity. *Brain Res.* 1184, 306–315.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., et al. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* 190, 881–892.
- Thorburn, A., Thamm, D.H., and Gustafson, D.L. (2014). Autophagy and cancer therapy. *Mol. Pharmacol.* 85, 830–838.
- Tian, X., Gala, U., Zhang, Y., Shang, W., Nagarkar Jaiswal, S., di Ronza, A., Jaiswal, M., Yamamoto, S., Sandoval, H., Duraine, L., et al. (2015). A Voltage-Gated Calcium Channel Regulates Lysosomal Fusion with Endosomes and Autophagosomes and Is Required for Neuronal Homeostasis. *PLoS Biol.* 13, e1002103.
- Timmins, J.M., Ozcan, L., Seimon, T.A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., Backs, T., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Anderson, M.E., et al. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J. Clin. Invest.* 119, 2925–2941.
- Todorovic, S.M., and Lingle, C.J. (1998). Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: Effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* 79, 240–252.
- Urano, F. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* (80-. ). 287, 664–666.
- Urra, H., Henriquez, D.R., Cánovas, J., Villarroel-Campos, D., Carreras-Sureda, A., Pulgar, E., Molina, E., Hazari, Y.M., Limia, C.M., Alvarez-Rojas, S., et al. (2018). IRE1 $\alpha$  governs cytoskeleton remodelling and cell migration through a direct interaction with filamin A. *Nat. Cell Biol.* 20, 942–953.
- Urra, H., Pihán, P., and Hetz, C. (2020). The UPRosome - decoding novel biological outputs of IRE1 $\alpha$  function. *J. Cell Sci.* 133.
- Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stühmer, W., and Pardo, L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130094.

- Valerie, N.C.K., Dziegielewska, B., Hosing, A.S., Augustin, E., Gray, L.S., Brautigan, D.L., Lerner, J.M., and Dziegielewski, J. (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 888–897.
- Vanacker, H., Vettters, J., Moudombi, L., Caux, C., Janssens, S., and Michallet, M.-C. (2017). Emerging Role of the Unfolded Protein Response in Tumor Immunosurveillance. *Trends in Cancer* *3*, 491–505.
- Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vanoevelen, J. (2011). The Ca<sup>2+</sup> Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1–24.
- Varela-Guruceaga, M., Tejada-Solís, S., García-Moure, M., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Patiño-García, A., and Alonso, M.M. (2018). Oncolytic viruses as therapeutic tools for pediatric brain tumors. *Cancers (Basel)*. *10*, 1–17.
- Vaupel, P. (2001). Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin. Oncol.* *28*, 29–35.
- Verfaillie, T., Salazar, M., Velasco, G., and Agostinis, P. (2010). Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *Int. J. Cell Biol.* *2010*, 1–19.
- Vernino, S., Amador, M., Luetje, C.W., Patrick, J., and Dani, J.A. (1992). Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* *8*, 127–134.
- Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2016). Bcl-2 proteins and calcium signaling: Complexity beneath the surface. *Oncogene* *35*, 5079–5092.
- Vervliet, T., Pintelon, I., Welkenhuyzen, K., Bootman, M.D., Bannai, H., Mikoshiba, K., Martinet, W., Nadif Kasri, N., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2017). Basal ryanodine receptor activity suppresses autophagic flux. *Biochem. Pharmacol.* *132*, 133–142.
- Vicencio, J.M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A.W.E., Kepp, O., Galluzzi, L., Joza, N., Vitale, I., Morselli, E., Tailler, M., et al. (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.* *16*, 1006–1017.
- Visa, A., Shaikh, S., Alza, L., Herreros, J., and Cantí, C. (2019). The Hard-To-Close Window of T-Type Calcium Channels. *Trends Mol. Med.* *25*, 571–584.
- Visa, A., Sallan, M.C., Maiques, O., Alza, L., Talavera, E., Lopez-Ortega, R., Santacana, M., Herreros, J., and Cantí, C. (2019). T-type Cav3.1 channels mediate progression and chemotherapeutic resistance in glioblastoma. *Cancer Res.* *79*, 1857–1868.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* *469*, 314–322.
- van Vliet, A.R., and Agostinis, P. (2017). PERK interacts with FLNA to regulate ER-PM contact sites. *Oncotarget* *8*, 106155–106156.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science (80- )*. *334*, 1081–1086.
- Wan, J., Khanna, R., Sandusky, M., Papazian, D.M., Jen, J.C., and Baloh, R.W. (2005). CACANA1A mutations causing episodic and progressive ataxia alter channel trafficking and kinetics. *Neurology* *64*, 2090–2097.
- Wang, G., Chan, C.H., Gao, Y., and Lin, H.K. (2012). Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis. *Chin. J. Cancer* *31*, 169–177.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* *17*, 5708–5717.
- Wang, Y., Kuramitsu, Y., Baron, B., Kitagawa, T., Akada, J., Tokuda, K., Cui, D., and Nakamura, K. (2015). PERK/CHOP contributes to the CGK733-induced vesicular calcium sequestration which is accompanied by non-apoptotic cell death. *Oncotarget* *6*, 25252–25265.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (80- )*. *123*, 309–314.

- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457, 901–905.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol. Cell* 30, 678.
- Weiss, N., and Zamponi, G.W. (2017). Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal*. 1.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., et al. (2015). Glioma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1.
- Welsby, P.J., Wang, H., Wolfe, J.T., Colbran, R.J., Johnson, M.L., and Barrett, P.Q. (2003). A Mechanism for the Direct Regulation of T-Type Calcium Channels by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II. *J. Neurosci.* 23, 10116–10121.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 142–149.
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* 125, 42–46.
- White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 5308–5316.
- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., et al. (2014). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* 5, 1–10.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* 4, 295–305.
- Williams, J.A., Hou, Y., Ni, H.M., and Ding, W.X. (2013). Role of intracellular calcium in proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress, Autophagy, and cell death. *Pharm. Res.* 30, 2279–2289.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 1, e18.
- Wisden, W., and Seeburg, P.H. (1993). Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 291–298.
- Würstle, S., Schneider, F., Ringel, F., Gempt, J., Lämmer, F., Delbridge, C., Wu, W., and Schlegel, J. (2017). Temozolomide induces autophagy in primary and established glioblastoma cells in an EGFR independent manner. *Oncol. Lett.* 14, 322–328.
- Xipell, E., Aragón, T., Martínez-Velez, N., Vera, B., Idoate, M.A., Martínez-Irujo, J.J., Garzón, A.G., Gonzalez-Huarriz, M., Acanda, A.M., Jones, C., et al. (2016). Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. *Neuro. Oncol.* 18, 1109–1119.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Dev. Cell* 13, 365–376.
- Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, W.H., and Montminy, M.R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334, 494–498.
- Yan, M.M., Ni, J.D., Song, D., Ding, M., and Huang, J. (2015). Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance (Review). *Oncol. Lett.* 10, 1959–1969.

- Yan, X., Liu, J., Ye, Z., Huang, J., He, F., Xiao, W., Hu, X., and Luo, Z. (2016a). CaMKII-Mediated CREB phosphorylation is involved in Ca<sup>2+</sup>-Induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation. *PLoS One* *11*, e0162784.
- Yan, Y., Xu, Z., Dai, S., Qian, L., Sun, L., and Gong, Z. (2016b). Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *35*, 23.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010a). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* *12*, 814–822.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010b). Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 124–131.
- Yang, Y., Liu, L., Naik, I., Braunstein, Z., Zhong, J., and Ren, B. (2017). Transcription factor C/EBP homologous protein in health and diseases. *Front. Immunol.* *8*, 1612.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* *6*, 1355–1364.
- Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D.J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell (Graz, Austria)* *3*, 588–596.
- Yoo, H.Y., Zheng, H., Nam, J.H., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Earm, Y.E., and Kim, S.J. (2008). Facilitation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (IKCa1) by mibefradil in B lymphocytes. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *456*, 549–560.
- Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* *23*, 798–803.
- Young, J.S., Prados, M.D., and Butowski, N. (2018). Using genomics to guide treatment for glioblastoma. *Pharmacogenomics* *19*, 1217–1229.
- Yun, C.W., and Lee, S.H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 3466.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* *10*, 285–292.
- Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A.D., Xie, X., Ma, D., et al. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19023–19028.
- Zhang, L., Wang, K., Lei, Y., Li, Q., Nice, E.C., and Huang, C. (2015). Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic. Biol. Med.* *89*, 452–465.
- Zhang, S., Fritz, N., Ibarra, C., and Uhlén, P. (2011). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochem. Res.* *36*, 1175–1185.
- Zhang, X., Odom, D.T., Koo, S.H., Conkright, M.D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., et al. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4459–4464.
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, D., Zhang, D., Qian, Z., Liu, C., and Tao, J. (2012). Inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 1247–1260.
- Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfkühle, J., Gallagher, I., Koeppel, A.F., Hatef, S., Papanicolas, C., et al. (2017). Targetable T-type calcium channels drive glioblastoma. *Cancer Res.* *77*, 3479–3490.
- Zhou, Y.Y., Li, Y., Jiang, W.Q., and Zhou, L.F. (2015). MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway. *Biosci. Rep.* *35*, 1–10.

- Zhu, Y., and Parada, L.F. (2002). The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer* 2, 616–626.
- Zielke, S., Meyer, N., Mari, M., Abou-El-Ardat, K., Reggiori, F., van Wijk, S.J.L., Kögel, D., and Fulda, S. (2018). Loperamide, pimozide, and STF-62247 trigger autophagy-dependent cell death in glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 9, 1–16.
- Zong, H., Verhaak, R.G.W., and Canolk, P. (2012). The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 12, 383–394.
- Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59–69.

**ANNEX**





## PUBLICACIONES.

1. *The Hard-To-Close Window of T-Type Calcium Channels.*  
**Visa, A.**, Shaikh, S., Alza, L., Herreros, J., and Cantí, C.  
2019, Trends Mol. Med. 25, 571–584
2. *T-type Ca<sub>v</sub>3.1 channels mediate progression and chemotherapeutic resistance in glioblastoma*  
**Visa, A.**, Sallán, M.C., Maiques, O., Alza, L., Talavera, E., Lopez-Ortega, R., Santacana, M., Herreros, J., and Cantí, C.  
2019, Cancer Res. 79, 1857–1868
3. *T-type Ca<sup>2+</sup> Channels: T for targetable.*  
Sallán, M.C., **Visa, A.**, Shaikh, S., Nager, M., Herreros, J., and Cantí, C.  
2018, Cancer Res. 78, 603–609
4. *Inhibition of WNT-CTNNB1 signaling upregulates SQSTM1 and sensitizes glioblastoma cells to autophagy blockers.*  
Nàger, M., Sallán, M.C., **Visa, A.**, Pushparaj, C., Santacana, M., Macià, A., Yeramian, A., Cantí, C., and Herreros, J  
2018, Autophagy 14, 619–636
5. *Phosphorylated Tyr<sup>142</sup> β-catenin localizes to centrosomes and is regulated by Syk.*  
Bhardwaj, D., Nàger, M., **Visa, A.**, Sallán, M.C., Coopman, P.J., Cantí, C., and Herreros, J.  
2018, J. Cell. Biochem. 119, 3632–3640





## Opinion

## The Hard-To-Close Window of T-Type Calcium Channels

Anna Visa,<sup>1</sup> Soni Shaikh,<sup>1</sup> Lía Alza,<sup>1</sup> Judit Herreros,<sup>1</sup> and Carles Cantí<sup>1,\*</sup>

**T-Type calcium channels (TTCCs) are key regulators of membrane excitability, which is the reason why TTCC pharmacology is subject to intensive research in the neurological and cardiovascular fields. TTCCs also play a role in cancer physiology, and pharmacological blockers such as tetralols and dihydroquinazolines (DHQs) reduce the viability of cancer cells *in vitro* and slow tumor growth in murine xenografts. However, the available compounds are better suited to blocking TTCCs in excitable membranes rather than TTCCs contributing window currents at steady potentials. Consistently, tetralols and dihydroquinazolines exhibit cytostatic/cytotoxic activities at higher concentrations than those required for TTCC blockade, which may involve off-target effects. Gene silencing experiments highlight the targetability of TTCCs, but further pharmacological research is required for TTCC blockade to become a chemotherapeutic option.**

**Physiological and Pathophysiological Roles of TTCCs**

**Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> (Ca<sub>v</sub>) channels** (see [Glossary](#)) constitute the only biological transducers of electrical into biochemical signals (cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevations) that initiate multiple physiological events. There are ten members of the Ca<sub>v</sub> family in mammals, which are classified into three subfamilies based on sequence homology: Ca<sub>v</sub>1, Ca<sub>v</sub>2, and Ca<sub>v</sub>3 [1]. In a simplified view, Ca<sub>v</sub> channels can adopt three conformational states: resting deactivated (closed and sensitive to depolarizing stimuli), activated (open), and inactivated (nonconducting and refractory to depolarizing stimuli) [2]. Forward/backward transitions between these states (called **gating**) are time and voltage or state dependent (Figure 1A,B). By virtue of their distinctive biophysical properties (i.e., activation near-resting membrane potentials [**low-voltage activation (LVA)**] and slow deactivation kinetics), the three members of the Ca<sub>v</sub>3 subfamily (TTCCs) are suited to the amplification of small depolarizations of the membrane and mediation of Ca<sup>2+</sup> oscillations [3–5]. The expression of TTCCs was initially related to membrane excitability, such as neuron oscillatory firing [6,7] and cardiac pacemaker potentials [8]. More recently, abnormalities in TTCC function or expression levels in neurons have been linked to tremor [9], absence seizures [10], spinocerebellar ataxia [11–13], various types of epilepsy [14], and visceral or neuropathic pain pathophysiology [15–19]. Correspondingly, pharmacological targeting of TTCCs has been shown to be effective in preclinical models of pain (reviewed in [20]) and epilepsy (reviewed in [14]), by reducing hyperexcitability. Nonetheless, TTCCs provide a key pathway for Ca<sup>2+</sup> entry near the resting membrane potential and display augmented expression during the G1–S transition in nonexcitable cells [21–27]. During this period both the availability of TTCCs and the driving force for Ca<sup>2+</sup> entry are also expected to increase, because the plasma membrane is hyperpolarized in correspondence with the overexpression of various types of K<sup>+</sup> channels [28]. The existence of sustained Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-gated channels relies on the overlap between steady-state activation and inactivation, a phenomenon known as **window currents**

**Highlights**

T-Type Ca<sup>2+</sup> channels (TTCCs) play a role in membrane excitability, and the development of selective TTCC pharmacological blockers for neurological conditions such as pain, epilepsy, tremor, ataxia, and insomnia is an active area of research.

TTCCs also enable sustained Ca<sup>2+</sup> entry (known as window currents), which facilitates the G1–S transition and appears necessary for the survival of proliferating cells. Pharmacological targeting of TTCCs is currently being explored as a chemotherapeutic option and various compounds with TTCC-blocking ability have been shown to reduce cancer cell viability *in vitro*.

Two classes of TTCC blockers, tetralols and dihydroquinazolines (DHQs), have been shown to slow glioblastoma progression in mouse models and clinical trials are being performed to assess the optimal dosing and tolerance of tetralol mibefradil in glioblastoma multiforme patients.

A majority of TTCC blockers (including tetralols and DHQs) display state-dependent affinity, which implies low-potency blockade on permanently open TTCCs contributing window currents, and are cytotoxic to cancer cells at higher concentrations than those required for channel blocking. Reported off-target effects of tetralols, including membrane potential shifts and Ca<sup>2+</sup> mobilization from the endoplasmic reticulum, are largely unexplored for other TTCC blockers.

Gene silencing experiments highlight the value of targeting TTCCs in neurological diseases and cancer and can be used to evaluate the pharmacological specificity of current and novel compounds.

(Figure 1C). Window currents are estimated to be contributed by ~1% of TTCCs present in the membrane, involving low-level  $\text{Ca}^{2+}$  entry that may be physiologically relevant because TTCCs are strategically located in microdomains and associated with signaling complexes [29,30]. Cancer cell viability depends on TTCC function [31–34], which is the reason why TTCC pharmacological blockade is a tentative chemotherapeutic strategy (see Clinician's Corner). TTCC 'hyperactivation' has been attempted as an alternative approach to dysregulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis/signaling in cancer cells. The green-tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) proved cytotoxic to cultured mesothelioma [35] and breast cancer [36] cells by a mechanism involving reactive oxygen species (ROS) production and subsequent activation of  $\text{Ca}_v3.2$  channels. However, at the concentrations used in these studies EGCG is known to target several proteins involved in tumor progression [37], so currently TTCC blockade remains the strategy of choice from the viewpoint of specificity.

### Blockade of Voltage-Gated Channels Is Often State Dependent

Various electrophysiological protocols have been developed to study the pharmacological interactions and blocking mechanisms of several **voltage-gated  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v$ ) channel** and  $\text{Ca}_v$  channel blockers, which determine their therapeutic profiles. The term **use-dependent** blockade refers to a positive correlation between frequency of stimulation (i.e., membrane-depolarizing stimuli) and degree of blocking; thus, it is suggestive of drug binding to open and/or inactivated channels. The desired selectivity of local anesthetics and antiarrhythmic and anticonvulsant drugs for excitable membranes is based on their preferential interactions with  $\text{Na}_v$  (or  $\text{Ca}_v$ ) channels in these gating states, which are promoted by repetitive firing of action potentials [38]. By contrast, tonic blockade is experimentally assessed by low-frequency stimulation and is attributable to binding to resting channels. Additional criteria have been proposed to evaluate the **state dependence** of blocking: increased blocking potency at depolarized **holding potentials**, slowing of recovery from inactivation, and hyperpolarizing shift of the steady-state inactivation curve have been interpreted as preferential binding and selective stabilization of the inactivated states [39]. Based on these and other electrophysiological procedures, most tested  $\text{Na}_v/\text{Ca}_v$  blockers have shown greater affinity for channels in their resting or inactivated states from the perspective of the **modulated receptor theory** [40,41]. This feature is likely to hinder blocking of the fraction of channels contributing window currents, which are permanently open.

### The Issue of Selectivity

$\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors have long been applied in clinical practice to tackle diverse cardiovascular and neurological conditions. A number of dihydropyridines, phenylalkylamines, and benzodiazepines are used as antihypertensives and antiarrhythmics because they promote vasodilation and/or negative inotropic or chronotropic effects. Although initially these compounds were regarded as selective for  $\text{Na}_v$  channels or **L-type  $\text{Ca}_v$  channels (LTCCs)**, eventually interactions with different ion channels, including TTCCs, were described for many of them [42]. Similarly, diphenylbutylpiperidines, diphenylpiperazines, succinimides, and trimethadiones, originally used as neuroleptics/antiepileptics based on dopamine receptor or  $\text{Na}_v$  antagonism, were later reported to exert TTCC blockade [43]. Arachnid neurotoxins [44,45] and endogenous modulators such as endocannabinoids were also found to target TTCCs among other channels [46]. In the past 10 years, the arsenal of TTCC modulators has been extended with the development of new agents pursuing TTCC-selective blocking, mainly in the context of pain research [47–49]. However, all voltage-gated channels are traced back a common ancestor and display structural homology, and the discovery of *bona fide* TTCC- (or TTCC isoform-) selective blockers is challenging.

<sup>1</sup>Laboratory of Calcium Cell Signaling, IRBLleida-Universitat de Lleida, Rovira Roure, 80, 25198-Lleida, Spain

\*Correspondence:  
c.canti@mex.udl.cat (C. Canti).

## TTCC Blockers Are Cytotoxic to Cancer Cells at Supramaximal Concentrations

The Most widely used TTCC blockers in cancer research are membrane-permeable benzimidazolyl-substituted tetraline derivatives of phenylalkylamines (tetralols), DHQ derivatives, and diphenylbutylpiperidine pimozone. Some of these compounds have been tested in preclinical *in vivo* models, in which they have been shown to slow tumor growth (see [50] for a recent review).

Mibefradil was released in 1997 as a long-acting  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker for the management of ischemia, angina, and cardiac arrhythmias. Its protective actions and lack of negative inotropic effects were attributed to selectivity for TTCCs over LTCCs [51–54]. Analogs of mibefradil have been synthesized by replacing a methoxyacetyl ester with more lipophilic groups to limit cytoplasmic hydrolysis, and NNC-55-0396 was distinguished by its potent and selective TTCC-blocking properties [24,55].

Both mibefradil and NNC-55-0396 exert poorly reversible blockade consistent with high-affinity binding to the inactivated state, and it is suggested that the drug-binding sites reside within transmembrane domains [56–60]. Slow onset seems to be responsible for notable discrepancies among reported blocking potencies [55]. Other reasons for discrepant  $\text{IC}_{50}$  values are the variable voltage protocols and recording conditions used to measure TTCC currents, such that blockade is enhanced at depolarized holding potentials and with low- $\text{Ca}^{2+}$  solutions [58]. Potency is also affected by temperature, such that the  $\text{IC}_{50}$  for mibefradil on  $\text{Ca}_v3.2$  channels expressed in HEK293 cells was increased up to fivefold at 35 °C compared with room temperature, from 139 to 792 nM [58]. Assuming this variability, significantly lower  $\text{IC}_{50}$  values on TTCCs compared with the effective/growth inhibition concentrations ( $\text{EC}_{50}/\text{GI}_{50}$ ) against cancer cells can still be observed for tetralols (Table 1). In excitable membranes, gating of TTCC occurs with action potential firing, and TTCCs experience all possible conformational states, so high-affinity drug binding to the nonconducting states will prevent channel opening most efficiently. However, at steady, depolarized potentials typical of cancer cells [61], the only TTCCs achieving the open state are a small fraction of inactivation-resistant channels contributing window currents, for which drug potency is reduced (Figure 1). In line with this rationale, phasic use-dependent blocking of  $\text{Ca}_v3.2$  channels by mibefradil was considerably more potent than a tonic blockade [60,62]. Similarly, blocking of  $\text{Ca}_v3.1$  by NNC-55-0396 achieved partial relief at hyperpolarized potentials and was enhanced by increasing the frequency of stimulation [60]. The influence of tetralols on the magnitude of window currents is enigmatic. Gomora *et al.* showed that, in adrenocortical cells, mibefradil shifted the voltage dependence of steady-state inactivation of TTCCs by  $-5.7$  mV without changing the voltage dependence of channel opening [63], an effect that would minimize window currents. Nonetheless, the steady-state inactivation of TTCC currents recorded in DRG neurons [64] and in HEK293 cells expressing  $\text{Ca}_v3.2$  channels [55,65] was flattened by mibefradil and NNC-55-0386, respectively, increasing the area of overlap with activation-voltage ranges. Calculation of channel availability as the product of **steady-state inactivation and activation curves** shows that increasing the slope factor for steady-state inactivation may counteract a blocking effect in the voltage range for window currents (Box 1).

In 2004, Lee *et al.* evaluated the blocking properties of a series of 3,4-DHQs against recombinant  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$  channels, and one of the compounds was found to be equipotent with and more selective than mibefradil [66]. This work was followed by structure–activity relationship studies that led to the synthesis of other DHQs able to block TTCC, which exhibited acute toxicity on cultured cancer cells at supramaximal concentrations [67–69]. In the latter work, KYS05090 had an additional analgesic effect in an acetic acid-induced writhing test that was

## Glossary

**EC<sub>50</sub>:** half-maximal effective concentration; the drug concentration at which 50% of the maximum effect (on viability) is produced. This term is equivalent to  $\text{GI}_{50}$ , as the drug concentration at which 50% of growth inhibition is produced.

**Gating:** refers to the conformational changes experienced by ion channels leading to opening (activation), closing (deactivation), or a nonconductive, refractory state (inactivation).

**Glioblastoma multiforme (GBM):** a brain cancer characterized by high cell proliferation, invasivity, and tumor cell infiltration into the surrounding brain parenchyma and angiogenesis.

**High-voltage activated (HVA):** channels activated by strong depolarization.

**Holding potential:** membrane potential before test pulses, whose values are fixed by the voltage-clamp technique.

**IC<sub>50</sub>:** half-maximal inhibitory concentration; the drug concentration at which 50% of the maximum inhibition/blockade (on  $\text{Ca}^{2+}$  channels in this Opinion article) is produced.

**Low-voltage activation (LVA):** channels activated by weak depolarization, such as TTCCs.

**L-Type  $\text{Ca}_v$  channels (LTCCs):** belong to the  $\text{Ca}_v$  channel family and are activated by strong membrane depolarization.

**Modulated receptor theory:** explains state-dependent blocking by proposing that a drug can bind to the drug receptor regardless of the state of the targeted ion channel, but its binding affinity in each state is different. An alternative explanation is provided by the guarded receptor theory, suggesting that the affinity of drug binding to ion channels is state independent but it is the access of the drug to the binding site that depends on channel conformation.

**State dependence:** when drug affinity/access depends on the gating state of the channel (resting/activated/inactivated).

**Steady-state activation/inactivation curves:** curves illustrating the voltage dependence for channel activation and inactivation under stationary-state conditions

further proved in mouse models of neuropathic and neuroinflammatory pain [70]. These studies were extended with the testing of new DHQs in ovarian cancer [71] and lung adenocarcinoma cells [72]. Again, the concentrations required for channel inhibition and cytotoxic effects were discrepant, with  $IC_{50}$  values 4–30-fold smaller than  $GI_{50}$  values (Table 1). The scant information available for DHQs points nonetheless to use-dependent blocking of TTCCs, similar to tetralols. KYS0590 and a series of fluoro-substituted DHQs shifted the voltage dependence of inactivation of recombinant  $Ca_v3.2$  channels toward negative potentials, suggesting interactions with the inactivated states [70,73].

The antipsychotic drug pimozide has shown tumoricidal activity in a wide range of cancer cells (at micromolar concentrations) and in mouse xenografts, but its actions are principally attributed to inhibition of dopamine, serotonin, epinephrine, and sigma receptors (reviewed in [74]). With regard to TTCCs, pimozide and analogs exert potent state-dependent blocking on the three isoforms (at nanomolar concentrations), indicative of preferential binding to the inactivated states [43], similar to tetralols and DHQs.

### On-Target versus Off-Target Effects of TTCC Blockers on Cancer Cell Viability

From the perspective of TTCCs' contribution to G1–S progression, it would be expected that TTCC blocking would reduce cancer cell viability by decreasing cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations/concentration. However, the anticancer effects of tetralols and DHQs include dysregulation of key homeostatic processes and the induction of caspase-dependent apoptosis (Table 2), for which on-target effects are not obvious.

The analysis of cytotoxic effects becomes *de facto* complex when considering that higher drug concentrations associate to a higher risk of off-targeting. Notorious examples are reported membrane potential shifts that hardly owed to TTCC blockade. Nilius *et al.* described that mibefradil at 10  $\mu$ M hyperpolarized the membrane potential of calf pulmonary artery endothelial cells by  $\sim 13$  mV, an effect that was attributed to blockade of  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  channels [75]. By contrast, 10- $\mu$ M mibefradil depolarized the plasma membrane of smooth muscle cells [76], human lens epithelial cells [77], and glioma-initiating cells [78]. At micromolar concentrations mibefradil has been shown to block various types of  $Ca_v$  channels [60,79,80] and **voltage-gated  $K^+$  ( $K_v$ ) channels** [81–87], including oncogenic  $K_v10.1$  channels [88], and to activate K(Ca) channels [83] and TRPM7 channels [89]. Of note,  $K^+$  channel blocking or cation-permeable TRPM7 channel activation would depolarize the membrane potential, whereas activation of K(Ca) channels would exert a hyperpolarizing effect. We can envisage two different scenarios for  $Ca^{2+}$  entry depending on tetralol's influence on membrane potential: (i) hyperpolarization would involve increased TTCC window currents in most cancer cells (holding membrane potentials  $> -40$  mV) and increased driving force for  $Ca^{2+}$  entry; and (ii) depolarization would result in the reduction of TTCC window currents, but also increased  $Ca^{2+}$  entry through the activation of **high-voltage-activated (HVA)  $Ca^{2+}$  channels** (Box 2). HVA  $Ca_v$  channels, shown to contribute window currents in neurons [90], are widely expressed in cancer cells [91]. Membrane depolarization may also negatively affect the electrochemical gradient necessary to extrude  $Ca^{2+}$  by the  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporter, thereby limiting  $Ca^{2+}$  export [78]. A clear picture is emerging that the biochemical pathways and cellular processes triggered by exposure to tetralols are consistent with elevations of cytosolic  $Ca^{2+}$  (Table 2). Other off-target effects point in this direction: in the early years after the synthesis of mibefradil, Eberhard *et al.* described that, at concentrations above 10  $\mu$ M, mibefradil mobilized  $Ca^{2+}$  from inositol 3-phosphate-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  stores in rat cardiac fibroblasts and human platelets [92]. More recently, mibefradil or NNC-55-0396 exposure increased intracellular  $Ca^{2+}$  levels by

(devoid of time dependence).

Steady-state activation is achieved by applying sufficiently long (typically  $> 50$  ms) depolarizing test pulses (by the voltage-clamp technique) for the channels to reach the open state. Steady-state inactivation is that achieved from the closed state through long-lasting prepulses (voltage pulses applied prior to the test pulse applied with the voltage-clamp technique, typically  $> 1$  s) at subthreshold potentials. Steady-state activation/inactivation curves are fitted by first-order Boltzmann functions.

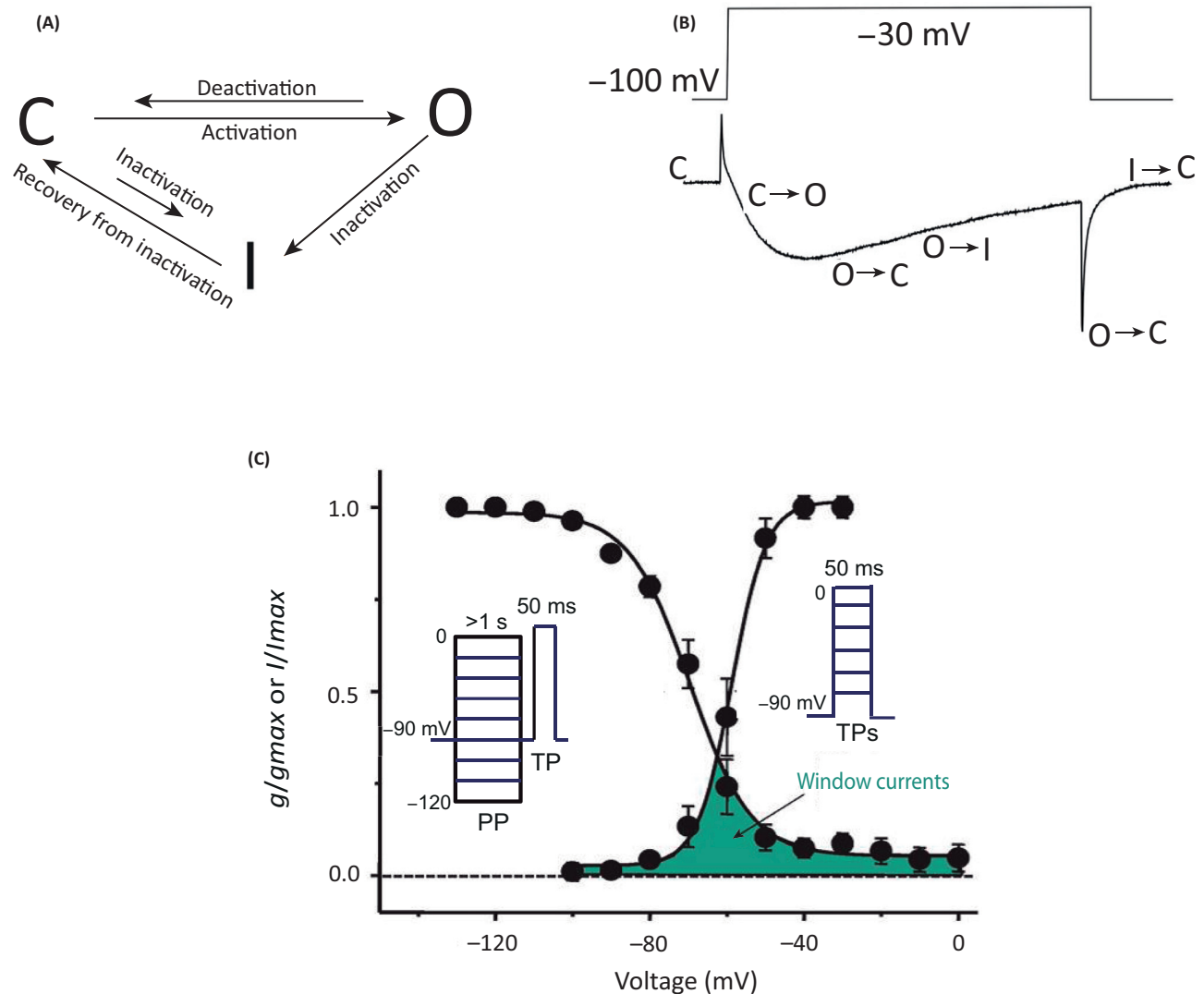
**Use dependence:** when drug affinity/access correlates positively with the frequency of stimulation (i.e., membrane-depolarizing stimuli); thus, it is suggestive of drug binding to open and/or inactivated channels.

**Voltage-gated  $Ca^{2+}$  ( $Ca_v$ ) channels:** activated by membrane depolarization; a large family including  $Ca_v1$  (four isoforms; also called L-type channels),  $Ca_v2$  (three isoforms, including P/Q-type, N-type, and R-type  $Ca^{2+}$  channels), and  $Ca_v3$  channels [three isoforms; also called T-type  $Ca^{2+}$  channels (TTCCs)].

**Voltage-gated  $K^+$  ( $K_v$ ) channels:** activated by membrane depolarization.

**Voltage-gated  $Na^+$  ( $Na_v$ ) channels:** activated by membrane depolarization.

**Window currents:** currents resulting from channels that are permanently open at steady potentials (resting membrane potentials in excitable cells), due to the overlap between steady-state inactivation and activation curves.



## Trends in Molecular Medicine

**Figure 1. Gating of T-Type Calcium Channels (TTCCs) and Steady-State (Window) Currents.** (A) Transitions between activated open (O), closed deactivated (C), and inactivated (I) states are time and voltage or state dependent. Activation is a fast process compared with inactivation. The inactivated state is thermodynamically stable and can be achieved from both open and closed states. (B) TTCC currents elicited by stepping from  $-100$  mV (HP) to  $-30$  mV (TP). Inactivation is evidenced by the progressive current decline during TP. Deactivation is observed by the presence of tail currents after TPs. (C) Voltage protocols for the measurement of steady-state inactivation and activation, and the respective curves. For activation, a range of increasingly depolarizing  $50$  –  $100$ -ms TPs is applied from a fixed negative HP ( $-70$  to  $-120$  mV) and the amplitude of deactivating tail currents is measured after TPs. For steady-state inactivation, long depolarizing prepulses (PP) ( $>1$  s) are applied prior to a depolarizing test pulse. Steady-state activation/inactivation curves for normalized currents are calculated by fitting data to first-order Boltzmann functions. Activation  $I = I_{max} / [1 + \exp((V_{50} - V)/K)]$ , inactivation  $I = I_{max} / [1 + \exp((V - V_{50})/K)]$ , where  $I$  is the current amplitude,  $I_{max}$  is the maximal current amplitude (can be substituted by  $G_{max}$  or maximal conductance),  $V$  is the membrane potential,  $V_{50}$  is the midpoint potential for activation/inactivation (at which half of the channels are open/inactivated), and  $K$  is the slope factor (mV/e-fold change). Window currents are defined by the voltage range of overlap between the inactivation and activation curves. (A,B) Reproduced, with permission, from [123]. (C) Adapted from [124].

Table 1. Potencies of TTCC Blocking and Cancer Cell Viability Reduction by Tetralol and DHQ Derivatives

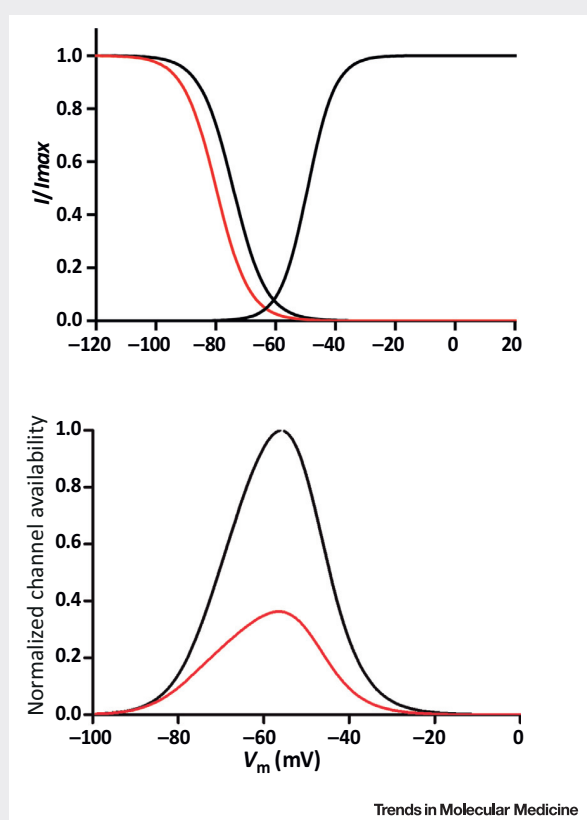
Compound	$IC_{50}$ or $K_d$ ( $\mu$ M)	$GI_{50}$ on cancer cells ( $\mu$ M), 24–72 h
Mibefradil	0.2–1.3 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [71,72,116,117] 0.1–0.9 (Ca <sub>v</sub> 3.2 expressed in HEK293 cells) [58,62,118] 0.1 (native TTCC of rat Purkinje neurons) [119] 0.6 (native TTCC of dorsal root ganglion neuron) [120] 1.0 (native TTCC of bovine adrenal fasciculata cells) [63] 1.2 (native TTCC of pulmonary microvascular endothelial cells) [121]	3.3 (HCT116 colon carcinoma) [104] 3.5 (U251 GBM) [105] 20.5–24.3 (ovarian cancer cell lines) [71] 24.8 (A549 lung adenocarcinoma) [72] 31.4 (A549 lung adenocarcinoma) [116]
NNC-55-0396	<1 (30–60 min)–10.1 (3 min) (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [55]	2.1–2.9 (MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells) [32] 4.8/6.3 (A2780/HO8910 ovarian carcinoma/adenocarcinoma) [33]
KYS05090	0.3 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [72]	4.1 (A549 lung adenocarcinoma) [72]
KYS05090S, KCP10043F	0.5, 0.9 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [116]	4.7, 7.3 (A549 lung adenocarcinoma) [116]
5b, 6b, 6c, BK10040, 8	0.5–1.8 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [72]	2.3–20.7 (A549 lung adenocarcinoma) [72]
KYS05042, KYS05043, KYS05046, KYS05047, KYS05048, KYS05055, KYS05056, KYS05057, KYS05065, KYS05080, KYS05085, KYS05089, KYS05090	0.04–1.0 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [68]	0.17 → 100 $\mu$ M (A549 lung adenocarcinoma) [68]
KYS05090, 6a, 6c, 6d, 6f, 6g, 6h	0.3–0.6 (Ca <sub>v</sub> 3.1 expressed in HEK293 cells) [71]	2.3–9.8 (SK-OV-3 epithelial ovarian cancer) [71]

inducing endoplasmic reticulum (ER) calcium release in Jurkat leukemic T cells [93]. It should be noted that  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathways may promote cell proliferation and/or survival instead of cell death [94–96].

Targets other than TTCCs have not been thoroughly investigated for DHQs beyond reports of a generally less-potent inhibitory action on N-type  $\text{Ca}_v2.2$  channels exerted by some derivatives [72,73,97], although the mechanisms involved in the reduction of cell viability appear to differ

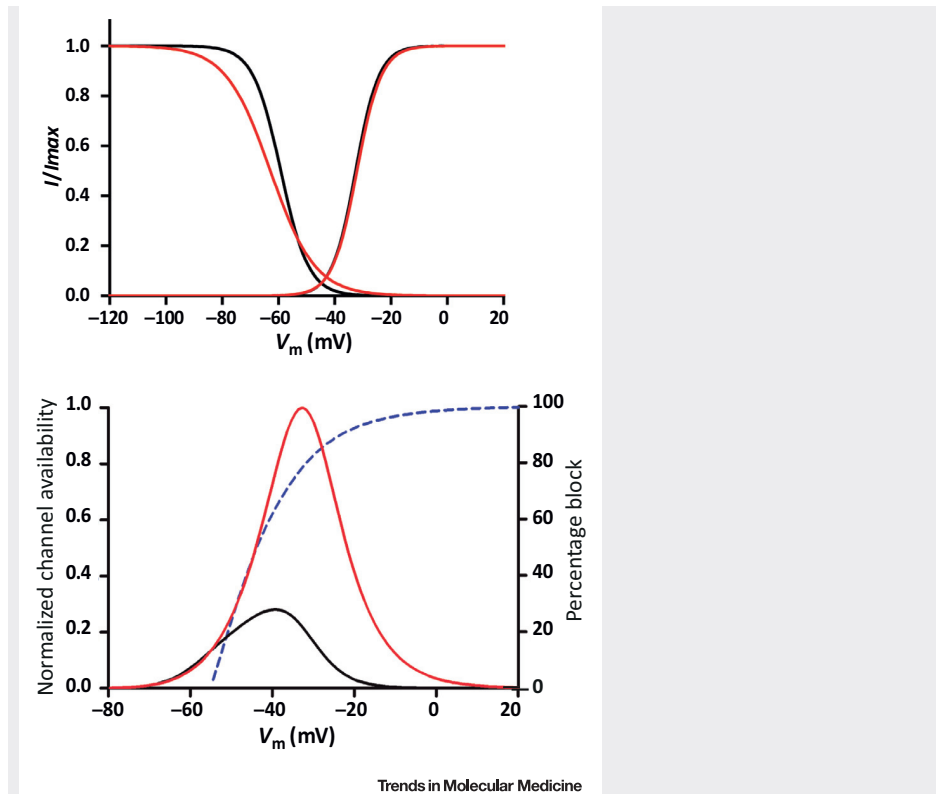
#### Box 1. How Channel Availability Depends on Steady-State Inactivation Parameters

Steady-state inactivation parameters have shown to be modified by drugs targeting TTCCs. A hyperpolarizing shift of the midpoint for inactivation is bound to reduce channel availability (Figure I), whereas an increase of the  $k$  slope factor for inactivation will cause the opposite effect (Figure II). Both effects have been reported for tetralols. Despite scarcity, data available for other blockers including DHQs, diphenylbutylpiperidines, diphenylpiperazines, and succinimides are also indicative of a hyperpolarizing shift of inactivation. Additionally, an increased slope factor for inactivation could be seen for  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -phenylsuccinimide on  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$  channels in [109] and for KYS05090S [70], KCP10060F, and KCP10067F [73] DHQs on  $\text{Ca}_v3.2$  channels, although these data were not quantified.



**Figure I. Hyperpolarizing Shift of Steady-State Inactivation.** Top: Normalized steady-state inactivation/activation curves built from data published in [111] (black curve) and after shifting the midpoint for inactivation by  $-5.7$  mV, an effect described for mibefradil at  $1 \mu\text{M}$  on T-type calcium channel (TTCC) currents [63] (red curve). In the former work, Boltzmann activation parameters were  $V_{50} = -49$  mV and slope  $K$  factor =  $4.6$  mV and inactivation parameters were  $V_{50} = -74.2$  mV and slope  $k$  factor =  $5.5$  mV. In the latter work, Boltzmann parameters for activation did not differ significantly in the presence of mibefradil and the slope factor for inactivation was not reported. Bottom: The fraction of open channels enabling window currents (channel availability) is calculated as the product of the steady-state inactivation and activation curves.





**Figure II. Reduced Slope of Steady-State Inactivation.** Top: Normalized steady-state inactivation/activation curves built from data published in [55] before (black curve) and after (red curve) application of NNC-55-0396 at 8  $\mu\text{M}$ . Activation parameters:  $V_{50} = -32.6$  mV and  $-32.1$  mV for controls and cells treated with NNC-55-0396, respectively; slope  $k$  factor = 4.2 mV in control cells and 4.33 mV in cells incubated with NNC-55-0396. Inactivation parameters:  $V_{50} = -59.2$  mV and  $-62.8$  mV for controls and cells incubated with NNC-55-0396, respectively; slope  $k$  values 4.9 mV for controls and 8.0 mV for cells incubated with NNC-55-0396, respectively. Bottom: Channel availability was calculated as the product of the steady-state inactivation and activation curves. Note that, in the  $-50$  mV to 0 mV range, the fraction of open channels is considerably higher in the presence of NNC-55-0396 (normalized values, left y-axis). The discontinuous blue curve represents the percentage blockade necessary to nullify the increase in window currents due to NNC-55-0396-mediated increase in  $k$  slope value for steady-state inactivation (right y-axis).

**Table 2. Effects of Tetralols and DHQs on Cell Pathways/Processes**

Drug	Effect on membrane potential	Effect on intracellular $\text{Ca}^{2+}$	Effect on intracellular pathways/processes
Mibefradil	Hyperpolarization [75] Depolarization [76–78]	Triggered $\text{Ca}^{2+}$ release from ER and increased $\text{Ca}^{2+}$ cytosolic concentration [92,93]	Increase of P38–MAPK signaling [104] Reduction of Akt/PkB signaling [105] Induction of caspase-3/7-dependent apoptosis [104,105] Induction of caspase-3/9-dependent apoptosis [78,103] mTOR inhibition [105,122] Induction of the unfolded protein response [103] Deregulation of macroautophagy [103,122] Upregulation of p27(KIP1) and BAX [122]
NNC-55-0396	N.D.	Triggered $\text{Ca}^{2+}$ release from ER and increased $\text{Ca}^{2+}$ cytosolic concentration [93]	N.D.
KYS05047	N.D.	Decreased cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ concentration [98]	Upregulation of p27(KIP1) [98]
KYS05090	N.D.	Decreased cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ concentration [99]	Generation of ROS and induction of macroautophagy [99] Induction of caspase-3-dependent apoptosis [99]

N.D., not determined.

**Box 2. Effects of Tetralols on Membrane Potential and Their Influence on Ca<sup>2+</sup> Influx**

Off-target effects associated with the use of mibefradil (and unexplored for other blockers) are either plasma membrane hyperpolarization [75] or depolarization [76,78]. In turn, membrane potential shifts are bound to affect the following. (i) TTCC availability, which will increase or decrease depending on membrane potential values before treatment. A majority of cancer cells display depolarized mean membrane potentials (resting between  $-10$  and  $-50$  mV [61]) relative to the peak of window currents measured in 2-mM Ca<sup>2+</sup> (between  $-50$  and  $-70$  mV, approximately, for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2; Figure I). Hence, membrane depolarization will exponentially reduce and, conversely, hyperpolarization will exponentially increase TTCC window currents. (ii) HVA Ca<sub>v</sub> channel availability. By definition, HVA channels activate at higher potentials than LVA channels, but steady-state inactivation is also shifted in the positive direction. Inactivation of HVA Ca<sub>v</sub> channels depends largely on the assembly of  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  accessory subunits with the main pore-forming subunits [112,113]. A comparison between Ca<sub>v</sub>3.1 (black curve) and Ca<sub>v</sub>2.3 (+  $\beta 1b$  +  $\alpha 2\delta 1$ ; blue curve) channels expressed in HEK293 cells and recorded in 10-mM Ba<sup>2+</sup> accounted for +21.2/ + 18.2-mV shifts in V<sub>50</sub> for activation/inactivation [114]. In this example, Ca<sub>v</sub>2.3 window currents will increase exponentially by depolarization in the range between  $-50$  and  $-30$  mV. Available data for Ca<sub>v</sub>2.1 channels coexpressed with auxiliary  $\beta 4a$  and  $\alpha 2\delta 1$  subunits in COS-7 cells and recorded in 10-mM Ca<sup>2+</sup> places midpoints for activation and inactivation further depolarized at  $-1.6$  and  $-21$  mV, respectively [115]. Here, membrane depolarization will increase Ca<sub>v</sub>2.1 window currents exponentially in the  $-40$  to  $-10$  mV range (green curve). (iii) Driving force for Ca<sup>2+</sup> entry, decreasing linearly by depolarization according to Ohm's law [ $I_{Ca} = (V_m - V_{Ca}) \times g_{Ca}$ , where  $I_{Ca}$  is the Ca<sup>2+</sup> current,  $V_m$  the membrane potential,  $V_{Ca}$  the equilibrium potential for Ca<sup>2+</sup>,  $g_{Ca}$  the Ca<sup>2+</sup> conductance, and  $(V_m - V_{Ca})$  the driving force for Ca<sup>2+</sup> entry]. These putative actions at multiple levels make it difficult to predict a net effect of tetralols on Ca<sup>2+</sup> homeostasis/signaling.

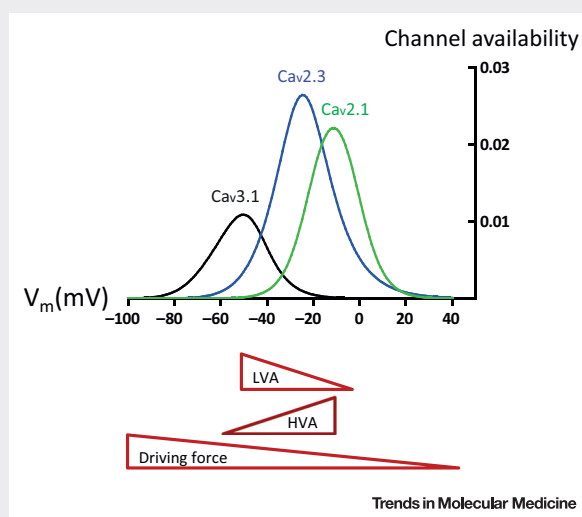


Figure I. Ca<sub>v</sub> Channel Availability Depending on Membrane Potential.

from those of tetralols (Table 2). Rim *et al.* concluded that supramaximal concentrations of KYS05047 induced G1-phase cell cycle arrest by decreasing intracellular Ca<sup>2+</sup> levels [98]. By contrast, KYS05090 led to autophagy and apoptosis of A549 cells through generation of ROS, by inhibiting glucose uptake [99]. Events upstream of oxidative stress were not investigated but, intriguingly, the authors observed that although KYS05090 progressively decreased cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels over a time span of 150 min, this feat was not directly related to KYS05090-induced cell death.

**Effects of Gene Knockout (KO)/Knockdown**

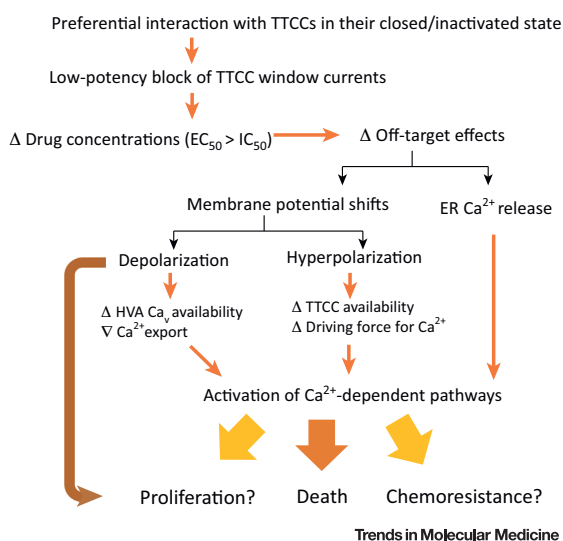
Gene silencing has demonstrated the specificity of TTCC pharmacological blocking in mouse models of neurological disorders. Consistently, amide TTA-A2 promoted slow-wave sleep in wild-type mice but not in mice lacking Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 [100] and did not prevent tonic seizures in Ca<sub>v</sub>3.1-KO mice [101], and its antinociceptive effect on formalin-induced

**Clinician's Corner**

TTCCs play a role in membrane excitability, and increased TTCC function or expression levels have been linked to a range of disorders affecting the central and peripheral nervous systems as well as heart function. TTCC pharmacological targeting is currently an effervescent field of research and, notably, there are several recent developments focused on the amelioration of neuropathic pain.

Nonetheless, TTCCs provide a key pathway for Ca<sup>2+</sup> entry at negative membrane potentials and play a pivotal role in cell proliferation. For this reason, repurposing of TTCC blockers for cancer treatment is under consideration. The role of TTCC in GBM progression has received considerable attention in recent years and the cytostatic/cytotoxic effects of TTCC pharmacological blockers described *in vitro* have given way to studies on murine xenografts and to preliminary clinical trials regarding the safety and optimal dosages of the tetraline derivative mibefradil.

However, currently available blockers are not able to discriminate between TTCC isoforms, a relevant distinction since they play different physiological roles. Furthermore, most compounds display greater affinity for channels in their resting or inactivated states and thus are better suited to blocking TTCCs in the context of action potential firing rather than at steady membrane potentials. Low-potency blocking of TTCCs by tetralols and DHQs in cancer cells is likely to underlie their use at supramaximal concentrations, which in turn increases the risk of off-targeting. Off-target effects reported for mibefradil include membrane potential shifts and Ca<sup>2+</sup> mobilization, with unpredictable consequences at the clinical level. Both the pharmacological profile and the cytotoxicity of TTCC blockers recently developed in the context of neurological research need to be carefully studied to assess their applicability as chemotherapeutics. Gene silencing experiments highlight the value of targeting TTCCs against hyperalgesia/allodynia and cancer, but pharmaceutical research needs to press ahead to block them in a potent and selective manner, particularly in the latter case.



**Figure 2. Scheme Illustrating the Conclusions Attained in This Opinion Article.** The state dependence of most currently available T-type calcium channel (TTCC) blockers implies low-potency blocking of inactivation-resistant, permanently open TTCCs expressed in cancer cells. This is evidenced by higher  $EC_{50}$  values on cancer cell viability compared with  $IC_{50}$  values on TTCC currents elicited by depolarizing voltage steps. The application of high drug concentrations is associated with increased off-target effects, which are evidenced by membrane potential shifts and intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization on application of tetralols, and that are unexplored for other TTCC blockers. Subsequently, activation of  $Ca^{2+}$ -dependent pathways/cell processes may lead to reduced cell proliferation or increased cell death observed *in vitro*, but it could also be associated with increased proliferation, migration, survival, or chemoresistance, with unknown consequences for human tumor progression. Membrane depolarization has shown to promote cancer cell proliferation and migration independently of  $Ca^{2+}$  levels.

mechanical hypersensitivity was lost in  $Ca_v3.2$ -KO mice [102]. Similarly, the analgesic action of DHQ KYS05090 was ablated in  $Ca_v3.2$ -null mice [70], whereas the administration of antisense oligonucleotides against  $Ca_v3.2$  abrogated the antihyperalgesic effects of piperidine TTA-P2 [48] and of mibefradil [55] in diabetic rats, in tune with a prominent role for this isoform in nociception.

Similar approaches have not been attempted in cancer research. Sparse data indicate that *in vitro* knockdown of TTCCs leads to cell cycle arrest and/or apoptosis of cancer cells, although the molecular pathways linking TTCC downregulation and viability are ill defined [103–105]. Nevertheless, gene overexpression/silencing experiments point to the existence of functional differences between  $Ca_v3$  isoforms [106], already inferred from the observation of their differential (in some cases complementary) expression in various cells/tissues [50].

### Concluding Remarks

TTCC pharmacological targeting is being intensively investigated in the neurological and cancer fields. Most blockers target preferentially TTCCs in their nonconducting states and thus appear well suited to tackle TTCCs' contribution toward (hyper)excitability. By contrast, in cancer cells TTCC currents are contributed by a small population of noninactivating TTCCs for which currently used blockers display little affinity. Off-target effects are the price to be paid for low-potency blocking and should be thoroughly investigated to dissect the fundamental functions of TTCCs in cancer (see Outstanding Questions). Mibefradil, for which clinical trials have been conducted in **glioblastoma multiforme (GBM)** patients, induces membrane potential shifts liable to affect  $Ca^{2+}$  fluxes through voltage-dependent and

### Outstanding Questions

Available TTCC blockers exhibit increased affinity for the closed and/or inactivated states; to what extent does it imply low-potency blocking of window currents?

Are there any cytostatic and/or cytotoxic effects on cancer cells of tetralols or DHQs at concentrations compatible with their reported  $IC_{50}$  values?

Are the cytostatic/cytotoxic effects of TTCC blockers used at supramaximal concentrations due to off-target effects?

Can state-dependent, highly-potent TTCC blockers – developed in the context of neurological research – be repurposed for cancer treatment?

Gene silencing experiments show that depletion of  $Ca_v3.1$  or  $Ca_v3.2$  affects negatively the viability of cancer cells *in vitro*; to what extent do the cellular pathways modulated by channel knockdown coincide with those triggered by pharmacological blockers?

What are the effects of the selective knockdown of TTCC isoforms in pre-clinical *in vivo* models?

-independent channels. Reported off-target effects also include  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, which is bound to deregulate multifaceted cellular processes like the unfolded protein response or macroautophagy [107]. Available data suggest that mibefradil may induce paradoxical activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathways/cell processes that have negative consequences for the viability of cancer cells *in vitro* and in murine xenografts, but with unknown effects on tumor progression in human patients (Figure 2). Thus, we propose the cytotoxic evaluation of potent/highly selective state-dependent TTCC blockers developed in the context of neurological research, such as amides TTA-A1/TTA-A2, piperidine TTA-P2 [47], or piperazine-based Z941/Z944 [108]. Alternatively, and resting on the assertion that potent blocking of TTCC window currents is achieved by open-channel blocking, we encourage the evaluation of compounds that enhance inactivation kinetics and/or induce a depolarizing shift of TTCC activation, such as some succinimides [109], cannabinoids [110], and gating modifier neurotoxins [45]. An additional issue and principal end point is the analysis of functional differences between TTCC isoforms, which is beyond the resolution of current pharmacology and can be approached only by gene knockdown strategies.

### Acknowledgments

A.V. was the recipient of a predoctoral fellowship from the University of Lleida. S.S. was funded by the Marie Curie COFUND Programme. This work was supported by Instituto de Salud Carlos III/FEDER (PI13/01980 to J.H.).

### References

- Ertel, E.A. *et al.* (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533–535
- Hering, S. *et al.* (2018) Calcium channel gating. *Pflügers Arch.* 470, 1291–1309
- Chevalier, M. *et al.* (2006) T-Type  $\text{Ca}_v3.3$  calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2321–2329
- Capiod, T. (2011) Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie*, 93, 2075–2079
- Capiod, T. (2013) The need for calcium channels in cell proliferation. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 8, 4–17
- Jahnsen, H. and Llinás, R. (1984) Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol.* 349, 227–247
- Carbone, E. and Lux, H.D. (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* 46, 413–418
- Nilius, B. (1986) Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca channel. *Biomed. Biochim. Acta*, 45, K37–K45
- Miwa, H. and Kondo, T. (2011) T-Type calcium channel as a new therapeutic target for tremor. *Cerebellum*, 10, 563–569
- Chen, Y. *et al.* (2014) The role of T-type calcium channel genes in absence seizures. *Front. Neurol.* 5, 45
- Coutelier, M. *et al.* (2015) A recurrent mutation in CACNA1G alters  $\text{Ca}_v3.1$  T-type calcium-channel conduction and causes autosomal-dominant cerebellar ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 97, 726–737
- Morino, H. *et al.* (2015) A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol. Brain*, 8, 89
- Kimura, M. *et al.* (2017) SCA42 mutation analysis in a case series of Japanese patients with spinocerebellar ataxia. *J. Hum. Genet.* 62, 857–859
- Powell, K.L. *et al.* (2014) Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77, 729–739
- Marger, F. *et al.* (2011) T-Type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11268–11273
- Scanzi, J. *et al.* (2016) Colonic overexpression of the T-type calcium channel  $\text{Ca}_v3.2$  in a mouse model of visceral hypersensitivity and in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 1632–1640
- Lin, S.-F. *et al.* (2016) Expression patterns of T-type  $\text{Ca}_v3.2$  channel and insulin-like growth factor-1 receptor in dorsal root ganglion neurons of mice after sciatic nerve axotomy. *Neuroreport*, 27, 1174–1181
- Sekiguchi, F. *et al.* (2016) Therapeutic potential of RQ-00311651, a novel T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, in distinct rodent models for neuropathic and visceral pain. *Pain*, 157, 1655–1665
- Li, Y. *et al.* (2017) Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels ( $\text{Ca}_v3.2$ ) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Pain*, 158, 417–429
- Weiss, N. and Zamponi, G.W. (2019) T-type calcium channels: from molecule to therapeutic opportunities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 108, 34–39
- Richard, S. *et al.* (1992) Differential expression of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160, 95–104
- Kuga, T. *et al.* (1996) Cell cycle-dependent expression of L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ. Res.* 79, 14–19
- Rodman, D.M. *et al.* (2005) Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ. Res.* 96, 864–872
- Tzeng, B.-H. *et al.* (2012) The  $\text{Ca}_v3.1$  T-type calcium channel is required for neointimal formation in response to vascular injury in mice. *Cardiovasc. Res.* 96, 533–542
- Guo, W. *et al.* (1998) Cell cycle-related changes in the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 1095–1103
- Li, M. *et al.* (2005) T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are involved in high glucose-induced rat neonatal cardiomyocyte proliferation. *Pediatr. Res.* 57, 550–556
- Oguri, A. *et al.* (2010) Involvement of  $\text{Ca}_v3.1$  T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1414–C1423

28. Urrego, D. *et al.* (2014) Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130094
29. Nakayama, H. *et al.* (2009)  $\alpha$ 1G-dependent T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current antagonizes cardiac hypertrophy through a NOS3-dependent mechanism in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3787–3796
30. Asmara, H. *et al.* (2017) A T-type channel–calmodulin complex triggers  $\alpha$ CaMKII activation. *Mol. Brain*, 10, 37
31. Panner, A. *et al.* (2005) Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium*, 37, 105–119
32. Taylor, J.T. *et al.* (2008) Selective blockade of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 267, 116–124
33. Li, W. *et al.* (2011) Blockade of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest.* 29, 339–346
34. Das, A. *et al.* (2012) Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 200–212
35. Ranzato, E. *et al.* (2012) Epigallocatechin-3-gallate induces mesothelioma cell death via  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel opening. *J. Cell Mol. Med.* 16, 2667–2678
36. Ranzato, E. *et al.* (2014) Epigallocatechin-3-gallate elicits  $\text{Ca}^{2+}$  spike in MCF-7 breast cancer cells: essential role of  $\text{Ca}_v3.2$  channels. *Cell Calcium*, 56, 285–295
37. Negri, A. *et al.* (2018) Molecular targets of epigallocatechin-gallate (EGCG): a special focus on signal transduction and cancer. *Nutrients*, 10, 1936
38. Ragsdale, D.S. *et al.* (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9270–9275
39. Freeze, B.S. *et al.* (2006) State-dependent verapamil block of the cloned human  $\text{Ca}_v3.1$  T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Mol. Pharmacol.* 70, 718–726
40. Hille, B. (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug–receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69, 497–515
41. Hondeghem, L.M. and Katzung, B.G. (1977) Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta*, 472, 373–398
42. Godfraind, T. (2017) Discovery and development of calcium channel blockers. *Front. Pharmacol.* 8, 286
43. Santi, C.M. *et al.* (2002) Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *J. Neurosci.* 22, 396–403
44. Chuang, R.S.-I. *et al.* (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* 1, 668–674
45. Ohkubo, T. *et al.* (2010) Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$ . *J. Pharmacol. Sci.* 112, 452–458
46. Chemin, J. *et al.* (2014) Modulation of T-type calcium channels by bioactive lipids. *Pflügers Arch.* 466, 689–700
47. Uebele, V.N. *et al.* (2009) Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists. *Cell Biochem. Biophys.* 55, 81–93
48. Choe, W. *et al.* (2011) TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Mol. Pharmacol.* 80, 900–910
49. Xie, X. *et al.* (2010) Scaffold Hopping Affords a Highly Selective *In Vitro* and *In Vivo* T-Type Calcium Inhibitor Probe Free From IP Issues, US National Center for Biotechnology Information
50. Sallán, M.C. *et al.* (2018) T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: T for targetable. *Cancer Res.* 78, 603–609
51. Clozel, J.P. *et al.* (1997) Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J. Hypertens. Suppl.* 15, S17–S25
52. Brogden, R.N. and Markham, A. (1997) Mibefradil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the management of hypertension and angina pectoris. *Drugs*, 54, 774–793
53. Alpert, J.S. *et al.* (1997) Antianginal and anti-ischemic effects of mibefradil in the treatment of patients with chronic stable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 80, 20C–26C
54. Noll, G. and Lüscher, T.F. (1998) Comparative pharmacological properties among calcium channel blockers: T-channel versus L-channel blockade. *Cardiology*, 89, 10–15
55. Huang, L. *et al.* (2004) NNC 55-0396 (1S,2S)-2-(2-(N-[[3-benzimidazol-2-yl]propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 193–199
56. Bezprozvanny, I. and Tsien, R.W. (1995) Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels expressed in *Xenopus* oocytes by the  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol. Pharmacol.* 48, 540–549
57. Jiménez, C. *et al.* (2000) Determinants of voltage-dependent inactivation affect mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology*, 39, 1–10
58. Martin, R.L. *et al.* (2000) Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 302–308
59. Li, M. *et al.* (2005) Towards selective antagonists of T-type calcium channels: design, characterization and potential applications of NNC 55-0396. *Cardiovasc. Rev.* 23, 173–196
60. Kuryshev, Y.A. *et al.* (2014) Evaluating state dependence and subtype selectivity of calcium channel modulators in automated electrophysiology assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 12, 110–119
61. Yang, M. and Brackenbury, W.J. (2013) Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* 4, 185
62. Lee, T.-S. *et al.* (2006) Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with distinct inhibitory mechanisms. *Pharmacology*, 78, 11–20
63. Gomora, J.C. *et al.* (2000) Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cortisol-secreting cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 96–103
64. Todorovic, S.M. and Lingle, C.J. (1998) Pharmacological properties of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* 79, 240–252
65. Perchenet, L. *et al.* (2000) Pharmacological properties of  $\text{Ca}_v3.2$ , a low voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 361, 590–599
66. Lee, Y.S. *et al.* (2004) 3,4-Dihydroquinazoline derivatives as novel selective T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3379–3384
67. Lee, J.Y. *et al.* (2006) Growth inhibition of human cancer cells *in vitro* by T-type calcium channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 5014–5017
68. Heo, J.H. *et al.* (2008) T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers suppress the growth of human cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 3899–3901
69. Kang, H.B. *et al.* (2012) *In vivo* evaluation of oral anti-tumoral effect of 3,4-dihydroquinazoline derivative on solid tumor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1198–1201
70. M'Dahoma, S. *et al.* (2016) Effect of the T-type channel blocker KYS-05090S in mouse models of acute and neuropathic pain. *Pflügers Arch.* 468, 193–199
71. Jang, S.J. *et al.* (2013) *In vitro* cytotoxicity on human ovarian cancer cells by T-type calcium channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 6656–6662
72. Choi, D.L. *et al.* (2014) Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells by T-type calcium channel antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 1565–1570

73. Kim, J.H. *et al.* (2017) Synthesis and biological evaluation of fluoro-substituted 3,4-dihydroquinazoline derivatives for cytotoxic and analgesic effects. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 4656–4664
74. Elmaci, I. and Altinoz, M.A. (2018) Targeting the cellular schizophrenia. Likely employment of the antipsychotic agent pimozide in treatment of refractory cancers and glioblastoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 128, 96–109
75. Nilius, B. *et al.* (1997) Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of  $Ca^{2+}$ - and volume-activated  $Cl^{-}$  channels in macrovascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 121, 547–555
76. Potocnik, S.J. *et al.* (2000) Effects of mibefradil and nifedipine on arteriolar myogenic responsiveness and intracellular  $Ca^{2+}$ . *Br. J. Pharmacol.* 131, 1065–1072
77. Nebe, B. *et al.* (2004) Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 242, 597–604
78. Niklasson, M. *et al.* (2017) Membrane-depolarizing channel blockers induce selective glioma cell death by impairing nutrient transport and unfolded protein/amino acid responses. *Cancer Res.* 77, 1741–1752
79. Mehrke, G. *et al.* (1994) The  $Ca^{++}$ -channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type  $Ca^{++}$  channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1483–1488
80. Lacinová, L. *et al.* (1995) Interaction of Ro 40-5967 and verapamil with the stably expressed alpha 1-subunit of the cardiac L-type calcium channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 54–63
81. Lotshaw, D.P. (2001) Role of membrane depolarization and T-type  $Ca^{2+}$  channels in angiotensin II and  $K^{+}$  stimulated aldosterone secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 175, 157–171
82. Hong, D.H. *et al.* (2012) The T-type  $Ca^{2+}$  channel inhibitor mibefradil inhibits voltage-dependent  $K^{+}$  channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 196–205
83. Yoo, H.Y. *et al.* (2008) Facilitation of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels (IKCa1) by mibefradil in B lymphocytes. *Pflugers Arch.* 456, 549–560
84. Perchenet, L. and Clément-Chomienne, O. (2000) Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier  $hK_{v}1.5$ . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 771–778
85. Chouabe, C. *et al.* (2000) Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac  $K^{+}$  channels IKr and IKs. *Thérapie*, 55, 195–202
86. Liu, J.-H. *et al.* (1999) Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  currents in human fusion-competent myoblasts. *Br. J. Pharmacol.* 126, 245–250
87. Gomora, J.C. *et al.* (1999) Mibefradil potently blocks ATP-activated  $K^{+}$  channels in adrenal cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 1192–1197
88. Gómez-Lagunas, F. *et al.* (2017) Gating modulation of the tumor-related  $K_{v}10.1$  channel by mibefradil. *J. Cell Physiol.* 232, 2019–2032
89. Schäfer, S. *et al.* (2016) Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflugers Arch.* 468, 623–634
90. Zhu, M. *et al.* (2017) Impact of gabapentin on neuronal high voltage-activated  $Ca^{2+}$  channel properties of injured-side axotomized and adjacent uninjured dorsal root ganglions in a rat model of spinal nerve ligation. *Exp. Ther. Med.* 13, 851–860
91. Phan, N.N. *et al.* (2017) Voltage-gated calcium channels: novel targets for cancer therapy. *Oncol. Lett.* 14, 2059–2074
92. Eberhard, M. *et al.* (1995) Effects of mibefradil on intracellular  $Ca^{2+}$  release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 94–101
93. Huang, W. *et al.* (2015) T-Type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34, 27–35
94. Asati, V. *et al.* (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* 109, 314–341
95. Shou, J. *et al.* (2015) Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer Lett.* 361, 174–184
96. Zhao, F. *et al.* (2016) Triptolide induces protective autophagy through activation of the CaMKK $\beta$ -AMPK signaling pathway in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 7, 5366–5382
97. Seo, H.N. *et al.* (2007) Discovery of potent T-type calcium channel blocker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5740–5743
98. Rim, H.-K. *et al.* (2012) T-Type  $Ca^{2+}$  channel blocker, KYS05047 induces G1 phase cell cycle arrest by decreasing intracellular  $Ca^{2+}$  levels in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 7123–7126
99. Rim, H.-K. *et al.* (2014) T-Type  $Ca^{2+}$  channel blocker, KYS05090 induces autophagy and apoptosis in A549 cells through inhibiting glucose uptake. *Molecules*, 19, 9864–9875
100. Kraus, R.L. *et al.* (2010) *In vitro* characterization of T-TYPE CALCIUM CHANNEL ANTAGONIST TTA-A2 and *in vivo* effects on arousal in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335, 409–417
101. Sakkaki, S. *et al.* (2016) Blockade of T-type calcium channels prevents tonic-clonic seizures in a maximal electroshock seizure model. *Neuropharmacology*, 101, 320–329
102. Francois, A. *et al.* (2013) State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance  $Ca_{v}3.2$  selectivity and support analgesic effects. *Pain*, 154, 283–293
103. Das, A. *et al.* (2013) T-Type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, 874–885
104. Dziegielewska, B. *et al.* (2014) T-Type  $Ca^{2+}$  channel inhibition induces p53-dependent cell growth arrest and apoptosis through activation of p38-MAPK in colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 12, 348–358
105. Valerie, N.C.K. *et al.* (2013) Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 85, 888–897
106. Ohkubo, T. and Yamazaki, J. (2012) T-Type voltage-activated calcium channel  $Ca_{v}3.1$ , but not  $Ca_{v}3.2$ , is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 41, 267–275
107. Kania, E. *et al.* (2015) Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed. Res. Int.* 2015, 352794
108. Tringham, E. *et al.* (2012) T-Type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Sci. Transl. Med.* 4, 121ra19
109. Gomora, J.C. *et al.* (2001) Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol. Pharmacol.* 60, 1121–1132
110. Chemin, J. *et al.* (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* 20, 7033–7040
111. Chemin, J. *et al.* (2002) Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ( $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  and  $\alpha_{1I}$ ) to neuronal excitability. *J. Physiol.* 540, 3–14
112. Cantí, C. *et al.* (2001) Evidence for two concentration-dependent processes for  $\beta$ -subunit effects on  $\alpha_{1B}$  calcium channels. *Biophys. J.* 81, 1439–1451
113. Yasuda, T. *et al.* (2004) Overexpressed  $Ca_{v}3\beta$  inhibits N-type  $Ca_{v}2.2$  calcium channel currents through a hyperpolarizing shift of ultra-slow and closed-state inactivation. *J. Gen. Physiol.* 123, 401–416
114. Morita, H. *et al.* (2002) T-Channel-like pharmacological properties of high voltage-activated, nifedipine-insensitive  $Ca^{2+}$  currents in the rat terminal mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 137, 467–476
115. Wan, J. *et al.* (2005) CACNA1A mutations causing episodic and progressive ataxia alter channel trafficking and kinetics. *Neurology*, 64, 2090–2097

116. Byun, J.S. *et al.* (2016) *In vitro* synergistic anticancer activity of the combination of T-type calcium channel blocker and chemotherapeutic agent in A549 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 1073–1079
117. Monteil, A. *et al.* (2000) Molecular and functional properties of the human  $\alpha_{1G}$  subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275, 6090–6100
118. Perez-Reyes, E. *et al.* (2009) Molecular pharmacology of human  $\text{Ca}_v3.2$  T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: block by antihypertensives, antiarrhythmics, and their analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 621–627
119. McDonough, S.I. and Bean, B.P. (1998) Mibefradil inhibition of T-type calcium channels in cerebellar purkinje neurons. *Mol. Pharmacol.* 54, 1080–1087
120. Obradovic, A.L. *et al.* (2014)  $\text{Ca}_v3.2$  T-type calcium channels in peripheral sensory neurons are important for mibefradil-induced reversal of hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy. *PLoS One*, 9, e91467
121. Wu, S. *et al.* (2003)  $\text{Ca}_v3.1$  ( $\alpha_{1G}$ ) T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels mediate vaso-occlusion of sickled erythrocytes in lung microcirculation. *Circ. Res.* 93, 346–353
122. Zhang, Y. *et al.* (2017) Targetable T-type calcium channels drive glioblastoma. *Cancer Res.* 77, 3479–3490
123. Karmažinová, M. and Lacinová, L. (2010) Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslovaca*, 59 (Suppl. 1), S1–S7
124. Iftinca, M.C. and Zamponi, G.W. (2009) Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 32–40

# T-Type Ca<sub>v</sub>3.1 Channels Mediate Progression and Chemotherapeutic Resistance in Glioblastoma

Anna Visa<sup>1</sup>, Marta C. Sallán<sup>1</sup>, Oscar Maiques<sup>2</sup>, Lía Alza<sup>1</sup>, Elisabet Talavera<sup>3</sup>, Ricard López-Ortega<sup>3</sup>, Maria Santacana<sup>4</sup>, Judit Herreros<sup>1</sup>, and Carles Cantí<sup>1</sup>



## Abstract

T-type Ca<sup>2+</sup> channels (TTCC) have been identified as key regulators of cancer cell cycle and survival. *In vivo* studies in glioblastoma (GBM) murine xenografts have shown that drugs able to block TTCC *in vitro* (such as tetralol derivatives mibefradil/NNC-55-096, or different 3,4-dihydroquinazolines) slow tumor progression. However, currently available TTCC pharmacologic blockers have limited selectivity for TTCC and are unable to distinguish between TTCC isoforms. Here we analyzed the expression of TTCC transcripts in human GBM cells and show a prevalence of *Cacna1g/Ca<sub>v</sub>3.1* mRNAs. Infection of GBM cells with lentiviral particles carrying short hairpin RNA against *Ca<sub>v</sub>3.1* resulted in GBM cell death by apoptosis. We generated a murine GBM xenograft via subcutaneous injection of U87-MG GBM cells and found that tumor size was reduced

when *Ca<sub>v</sub>3.1* expression was silenced. Furthermore, we developed an *in vitro* model of temozolomide-resistant GBM that showed increased expression of *Ca<sub>v</sub>3.1* accompanied by the activation of macroautophagy. We confirmed a positive correlation between *Ca<sub>v</sub>3.1* and autophagic markers in both GBM cultures and biopsies. Of note, *Ca<sub>v</sub>3.1* knockdown resulted in transcriptional downregulation of *p62/SQSTM1* and deficient autophagy. Together, these data identify *Ca<sub>v</sub>3.1* channels as potential targets for slowing GBM progression and recurrence based on their role in regulating autophagy.

**Significance:** These findings identify *Ca<sub>v</sub>3.1* calcium channels as a molecular target to regulate autophagy and prevent progression and chemotherapeutic resistance in glioblastoma.

## Introduction

Gliomas are primary brain tumors classified by the World Health Organization as diffuse astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III), and glioblastoma multiforme (GBM; grade IV; refs. 1, 2). GBMs are the most common and aggressive gliomas, implying a lethal prognosis (3). GBM features include high cell proliferation and invasion capacities, apoptosis resistance, necrosis, and angiogenesis (4). Despite extensive surgery, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide, GBM recurrence is unfortunately very common. Moreover, temozolomide triggers proadaptive cellular responses such as autophagy (5).

Ca<sup>2+</sup> is a ubiquitous second messenger that integrates multiple signal transduction pathways relevant for cell biology (reviewed

in ref. 6). Cancer cells frequently experience a remodeling of the Ca<sup>2+</sup> signaling pathways that facilitates cell proliferation and survival (7). Among them, T-type Ca<sup>2+</sup> channels (TTCC) are often aberrantly expressed in different tumors, including over- and underexpression when compared with untransformed tissues (reviewed in ref. 8).

TTCCs consist of three highly homologous isoforms, *Cacna1g/Ca<sub>v</sub>3.1*, *Cacna1g/Ca<sub>v</sub>3.2*, and *Cacna1g/Ca<sub>v</sub>3.3*, that display approximately 25% amino acid sequence identity compared with other voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (9). TTCC activate at negative membrane potentials, in which there is a high driving force for Ca<sup>2+</sup> entry, and display slow deactivation kinetics (10). By virtue of these distinctive properties, TTCC provide a key pathway for Ca<sup>2+</sup> entry near the resting membrane potential. The expression of TTCC is linked to the cell cycle, increasing during the G<sub>1</sub>-S transition (11–13). A number of reports associate the expression of *Ca<sub>v</sub>3.1* and *Ca<sub>v</sub>3.2* to the proliferation of cancer cells *in vitro* (14–17). Particularly, the role of TTCC in GBM progression has received considerable attention in recent years. Thus, the effects of pharmacologic blockers on halting proliferation and inducing apoptosis of GBM cells *in vitro* led to the development of murine GBM xenografts, in which TTCC pharmacologic blockers reduced tumor growth (18–20). Although currently available blockers cannot discriminate between TTCC isoforms and are also reported to exert off-target actions, some authors have linked TTCC isoform detection with drug effects in what can be considered as a loose target identification. However, the distinction between TTCC isoforms is relevant, because they are associated to different signaling pathways and play different physiologic roles (reviewed in ref. 8).

Recently, Zhang and colleagues have shown that the *Ca<sub>v</sub>3.2* isoform is highly expressed in GBM stem cells (GSC; ref. 20) In this study, treatment with the TTCC blocker, mibefradil,

<sup>1</sup>Calcium Signalling Lab, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain. <sup>2</sup>Centre for Cancer and Inflammation, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, United Kingdom. <sup>3</sup>Cytogenetic Unit, Clinic Lab, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, ICS, Lleida, Spain. <sup>4</sup>Immunohistochemistry Unit, IRBLleida, Lleida, Spain.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Current address for M.C. Sallán: Department of Haemato-oncology, Barts Cancer Institute, London, United Kingdom.

A. Visa and M.C. Sallán contributed equally as co-first authors for this article.

**Corresponding Authors:** Carles Cantí, IRBLleida-University of Lleida, Rovira Roure, 80, Biomedicina I, Lleida, Catalonia 25198, Spain. Phone: 349-7370-2950; E-mail: c.canti@mex.udl.cat; and Judit Herreros, j.herreros@cmb.udl.cat

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1924

©2019 American Association for Cancer Research.



downregulated GSC proliferation and stemness markers, and the authors concluded that Ca<sub>v</sub>3.2 is involved in the maintenance of undifferentiated stem cells, in agreement with ref. 21. However, Niklasson and colleagues found the expression of both Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 in GSC (22). In fact, Ca<sub>v</sub>3.1 appears to be the prevalent TTCC isoform in GBM; according to the Human Protein Atlas, 82% of biopsies expressed Ca<sub>v</sub>3.1 and 27% expressed Ca<sub>v</sub>3.2 (23).

We have previously identified a positive relationship between Ca<sub>v</sub>3.1 expression and autophagy markers in melanoma biopsies (24). Here we set out to investigate the effects of knocking down Ca<sub>v</sub>3.1 in cultured GBM cells and in a murine xenograft model of GBM. In addition, we studied TTCC expression and the autophagic status in a model of temozolomide-resistant GBM, because the induction of macroautophagy (hereafter, autophagy) is a cellular strategy for chemotherapeutic resistance. Our results show that gene silencing of Ca<sub>v</sub>3.1 dramatically reduces the viability of GBM cells and slows tumor progression. In addition, Ca<sub>v</sub>3.1 positively correlates with autophagy markers P62/SQSTM1 and LC3 in GBM, while depletion of Ca<sub>v</sub>3.1 reduces P62 levels. Together, our results pinpoint Ca<sub>v</sub>3.1 channels as molecular targets for tackling GBM growth and recurrence through autophagy deregulation.

## Materials and Methods

### Reagents and antibodies

Biochemical reagents were from the following companies: temozolomide (T2577), rapamycin (R8781), puromycin (P7255), chloroquine (C6628), and mibefradil (M5441) from Sigma-Aldrich; bafilomycin-A (sc-201550) and NNC-55-0396 (sc-203647) from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies used were: Cyclin D1/CCND1 (BD Biosciences, 556470), BECLIN1 (Novus Biologicals, NB110-87318), MAP1LC3A/B (Novus Biologicals, NB100-2331), β-actin/ACTB (Sigma-Aldrich, A5441), P62/SQSTM1 (Novus Biologicals, NBP1-48320), ATG5 (Sigma-Aldrich, A2859), and P-AMPK (Thr172; Biorbyt, orb127615) and Ubiquitin (Santa Cruz Biotechnology, sc-8017).

### Cell culture and biopsies

GBM cell lines A172, U251-MG, and U87-MG were obtained from ATCC. Cells were maintained in Minimal Essential Medium (Lonza, BE12-125F) containing 10% FBS (Gibco, 10270098), penicillin/streptomycin (Gibco, 15140-122), L-glutamine (Gibco, 25030-081), 1% amino acids (Gibco, 11140-035), and 1% sodium pyruvate (Gibco, 11360-039) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. All cell lines were authenticated by short tandem repeat profiling (Stab Vida) following purification of genomic DNA using the Maxwell16 Tissue DNA Kit (Promega, AS1030). RC1 and RC2 temozolomide-resistant cells were obtained from the A172 cell line by exposure to increasing concentrations of temozolomide over several weeks. Resistant cells were cultured in complete media plus 200 μmol/L temozolomide. Both RC1 and RC2 were authenticated as A172 cells (Stab Vida). Cells lines were grown in *Mycoplasma*-free rooms and *Mycoplasma* testing was performed by PCR on parental A172, U87-MG, and U251-MG cells. Cells that tested positive were either discarded or treated with Plasmocin (InvivoGen, ant-mpt-1). Cell lines were passaged for 20–25 passages.

Neurosphere cultures were grown from adherent U87-MG cells in suspension in Neurobasal media (Gibco LS21103049) containing B27 supplement (1:50; Gibco 17504044), penicillin/

streptomycin and L-glutamine, 20 ng/mL bFGF (Gibco, 13256029), and 20 ng/mL EGF (Gibco, PHG0314) for 7 days. Growth factors were refreshed after 3 days.

Paired samples of primary and recurrent GBM from the same patient were obtained through the Biobank Network-Carlos III Health Institute (NavarraBiomed, Toledo, and Basque Biobanks). Studies were conducted in accordance with the Law of Biomedical Research 14/2007 and the guidelines of Declaration of Helsinki. Written informed consents from patients were obtained as part of the Biobancos Network (Carlos III Health Institute, Spain) standard operating procedures. The study was approved by the review board of the different Biobank involved and by the ethical committee of the University of Lleida. Frozen optimal cutting temperature compound sections of 15 μm were used to extract RNAs using Maxwell 16 LEV SimplyRNA Kit (Promega, AS1270). Most patients followed standard treatment consisting of radiotherapy and temozolomide before recurrence, except for P1 who refused it (treatment information for P3 was not available).

### Conventional cytogenetics

Dividing cells were arrested in metaphase by addition of colcemid (Gibco 15212012; 90 minutes, 37°C). Cells were then trypsinized and sedimented before treatment with a hypotonic solution. The nuclei were fixed with Carnoy and stained with Wright–Giemsa. Chromosomes from 4 to 10 metaphases were studied.

### Cell transfection

GBM cells were plated the day before transfection at 80% of confluency. Transfection of tandem fluorescently-tagged LC3A (ptfLC3) plasmid using Lipofectamine-2000 (Invitrogen, 11668-027) was done as described previously (25). The ptfLC3 plasmid, a kind gift from Dr. T. Yoshimori (University of Osaka, Suita, Japan; ref. 26) is a LC3A tandem-flagged construct that codifies for GFP pEGFP-LC3A and red fluorescent protein mRFP-LC3A. After 24 hours of transfection, cells were treated with 25 μmol/L chloroquine or 500 nmol/L rapamycin for 24 hours. At 48 hours, cells were pictured under an epifluorescence microscope and analyzed for colocalization of green and red puncta. Micrographs were obtained using an inverted Olympus IX70 microscope equipped with epifluorescence optics and a camera (Olympus OM-4 Ti) and images were acquired using DPM Manager Software. Quantification of red and green puncta was performed using ImageJ software and pictures were obtained from the EGFP and mRFP channels (about 30 cells were counted/condition from three independent experiments). Autophagy blockade is visualized by similar numbers of red and green puncta. In contrast, autophagy induction involves the predominance of red puncta (reflecting an increase of autolysosomes).

### Western blot analysis

Cells were washed with PBS and lysed in Tris 62.5 mmol/L, pH 6.8 and 2% SDS. Cell lysates were resolved in SDS-PAGE gels and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore, IPVH00010). Membranes were cut to probe different antibodies on the same membrane. Membranes were blocked with 5% BSA (Thermo Fisher Scientific, BP9701-100) or milk and incubated overnight with primary antibodies. Blots were developed using Enhanced Chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific, 32106) or Luminata Forte horseradish peroxidase substrate (Merck Millipore, WBLUF0100).

### Short hairpin RNA–induced gene silencing by lentiviral infection

Lentiviral-based vectors for RNA interference–mediated gene silencing were pLKO.1-puro, containing short hairpin RNAs (shRNA) scrambled (against the sequence 5' CAACAAGATGAA-GAGCACCA 3'), *Ca<sub>v</sub>3.1#1* (Mission-RNA, Sigma-Aldrich; TRCN0000044239), *Ca<sub>v</sub>3.1#2* (TRCN0000430515), *Ca<sub>v</sub>3.2#1* (TRCN0000044209), and *Ca<sub>v</sub>3.2#2* (TRCN0000044210). Lentiviral particles were produced in HEK293T (human embryonic kidney) cells for 72 hours upon transfection of the shRNA vectors together with psPAX2 and pMD2G plasmids using polyethylenimine. Medium was then centrifuged (2,500 rpm) and filtered through 0.45- $\mu$ m membrane. Cells were incubated with medium containing lentiviral particles together with polybrene (1.75  $\mu$ g/mL) for 24 hours. Medium was replaced to allow the knockdown for 4 or more days. As pLKO.1-puro vectors contain a puromycin resistance site, puromycin (4  $\mu$ g/mL) was added to media to select for resistant cells. Silencing was assessed at day 4 after infection. For neurosphere experiments, adherent cells infected with lentiviral particles on the previous day were grown in suspension as neurospheres for 6 days in the presence of puromycin (refreshed after 3 days). Trypan blue (0.2%) staining was performed on the 7th day of infection.

### Real-time PCR

RNA was isolated using a Nucleospin RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, 74095550). RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed (25°C for 10 minutes, 42°C for 1 hour, and 95°C for 5 minutes) using Superscript II Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, 4308228). cDNA was then analyzed by quantitative PCR (qPCR; ABI Prism 7000HT, Applied Biosystems) using TaqMan hydrolysis probes labeled with FAM. Gene-specific probes for human *Ca<sub>v</sub>3.1* (Hs00367969\_m1), *Ca<sub>v</sub>3.2* (Hs00234934\_m1), *P62/SQSTM1* (Hs00177654\_m1), *PROM1/CD133* (Hs01009259\_m1), and *GAPDH* (used as internal control, Hs99999905\_m1) were from Applied Biosystems. Samples were assayed in triplicate for each gene and relative expression calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method (Applied Biosystems).

### Cell viability assay

Cell viability was measured by the WST-1 [4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzene disulfonate; Roche, 05015944001] colorimetric assay. Cells were plated on 96-well plates (5,000 cells/well), treated for 24 hours, and then incubated for 60–120 minutes with 0.5 mg/mL WST-1 after 48 hours of plating. Absorbance was measured at 440 nm using a reference filter at 620-nm wavelength in a microplate reader (Bio-Rad Laboratories). Viability assays were performed in at least three independent experiments, using triplicate measurements per condition.

### Clonogenic assays

For clonogenic assays, 500 cells/well were plated in 6-well plates. Cells were incubated for 12–15 days and stained with MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, 0.5 mg/mL; Sigma, M2128).

### Apoptosis analysis

For Annexin V/propidium iodide (PI) staining, cells were trypsinized, washed in PBS, and centrifuged. In the case of TTCC blockers, experiments were performed after 24 hours of treatment.

Annexin experiments using shRNA-mediated silencing were performed at 4 days (as controls) or at 6–7 of lentiviral infection. Cells were stained (15 minutes, room temperature) with Annexin V-FITC (Immunotools, 31490013) and PI (0.02 mg/mL; Sigma, P4170). The percentage of apoptotic cells was evaluated using FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences). A total of  $1 \times 10^5$  cells were recorded per condition in three independent experiments.

### Xenografts

SCID mice (male, 12-week old; 20–25 g; maintained in specific pathogen-free conditions in the Animal House, UdL-IRBLleida, Lleida, Spain) were subcutaneously injected with *Ca<sub>v</sub>3.1*-deficient or control (scrambled shRNA) U87-MG cells ( $3 \times 10^6$  cells) suspended in 50  $\mu$ L of PBS. All animal care and experimental procedures were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EU guidelines for animal experiments and approved by the Animal Ethics Committee at the University of Lleida (Lleida, Spain; CEEA 06-05/16). The study complies with the ARRIVE guidelines developed by the NC3Rs (27). Tumors were allowed to grow for 13 days and measured every 2 days using a caliper. Tumor size was calculated using the formula: tumor weight (mg) =  $(D \times d^2)/2 = \text{mm}^3$ . Nine (6 males and 3 females) animals were analyzed.

### Tissue microarray and IHC

A tissue microarray (TMA; ref. 25) including 57 samples of formalin-fixed, paraffin-embedded GBMs was used. Samples were obtained with support by IRBLleida-Biobank (B.0000682) and Biobancos Platform (PT13/0010/0014).

Paraffin blocks of xenograft tumors or human biopsies were sectioned and slides were prepared for IHC. The procedure of deparaffinization, rehydration, epitope retrieval, and staining was performed as described previously (25). The primary antibodies used were against P62 (1:3,000 dilution), LC3A/B (1:100 dilution), *Ca<sub>v</sub>3.1* (24), MKI67 (ready to use; DAKO, IR626), and cyclin D1 (ready to use; DAKO, IR83). Immunoreactivity was graded by considering the percentage and intensity of the staining using an automated imaging system ACIS III Instrument (DAKO). For P62 immunostaining quantification, cells showing strong immunopositivity were counted.

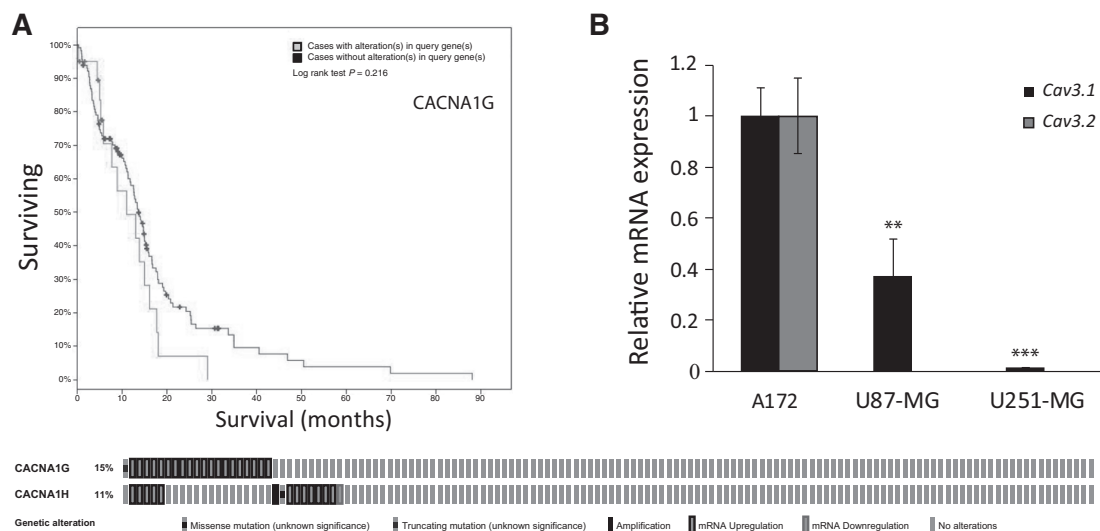
For the relationship among biomarkers in the TMA biopsies, a histologic score was obtained for each sample, ranging from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity; refs. 24, 25). Pearson correlation tests were performed to establish significant relationships.

### Bioinformatics and statistical analysis

The Cancer Genome Atlas (TCGA) data analysis: differential expression of *CACNA1G* (*Ca<sub>v</sub>3.1*) and *CACNA1H* (*Ca<sub>v</sub>3.2*) and its correlation with overall survival Kaplan–Meier estimates were assessed using the cBioPortal platform ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org); ref. 28).

For analysis of expression, the z-score [defined as  $z = (\text{expression in tumor sample} - \text{mean expression in reference sample}) / \text{SD of expression in reference sample}$ ] was set at  $\pm 1$ .

Correlations between mRNA expression of *Ca<sub>v</sub>3.1/CACNA1G* and *P62/SQSTM1* or *LC3/MAP1LC3* were analyzed in 217 GBM samples of the REMBRANDT dataset through the GlioVis portal (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es>; ref. 29).



**Figure 1.** Prevalence of  $Ca_v3.1$  in GBM cell lines. **A**, Overall survival Kaplan–Meier estimates for patients with GBM presenting alterations in *CACNA1G* gene. Analysis was obtained from TCGA dataset for  $Ca_v3.1$  (*CACNA1G*) and  $Ca_v3.2$  (*CACNA1H*) mRNA expression. Out of 136 GBM samples, 20 cases overexpressed  $Ca_v3.1$  (15%), 13 cases overexpressed  $Ca_v3.2$  (10%), and 5 cases (4%) overexpressed both channels, being the cooccurrence was significant ( $P < 0.05$ ). mRNA expression was quantified using the RNASeq V2.RSEM platform, with a z-score threshold set at  $\pm 1.0$ . Patients with alterations (overexpression) in  $Ca_v3.1$  presented a trend towards shorter overall survival, although there were no statistical differences between the two groups ( $P = 0.216$ ). **B**,  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  mRNA levels as detected by real-time PCR from A172, U251-MG, and U87-MG GBM cell lines.  $Ca_v3.1$  was prevalent, while  $Ca_v3.2$  was only detected in the A172 cell line. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

All experiments are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  unless otherwise indicated). Student *t* test was performed except otherwise indicated (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

## Results

### GBM cells express $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ , being $Ca_v3.1$ predominant

Zhang and colleagues recently reported that the  $Ca_v3.2$  TTCC isoform is highly expressed in GSC, human GBM cell lines, and specimens. The authors also performed an *in silico* genomic analysis of TCGA data that revealed overexpression of  $Ca_v3.2$  in 13 of 136 GBM samples, and that these cases presented a trend toward shorter survival (20). Here we analyzed the TCGA database with identical z-scores, and observed that 20 of 136 tumors overexpressed  $Ca_v3.1$ ; patients with alterations in  $Ca_v3.1$  also showed a tendency toward shorter overall survival, even if devoid of statistical significance (Fig. 1A). We then analyzed the expression of  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ , and  $Ca_v3.3$  mRNAs in established human GBM cell lines (U87-MG, U251-MG, and A172). We found that all GBM cell lines expressed  $Ca_v3.1$  transcripts, whereas only A172 cells expressed detectable levels of  $Ca_v3.2$  transcripts (Fig. 1B).  $Ca_v3.3$  transcripts were undetectable.

### TTCC blockers and gene silencing induces GBM cell death by apoptosis

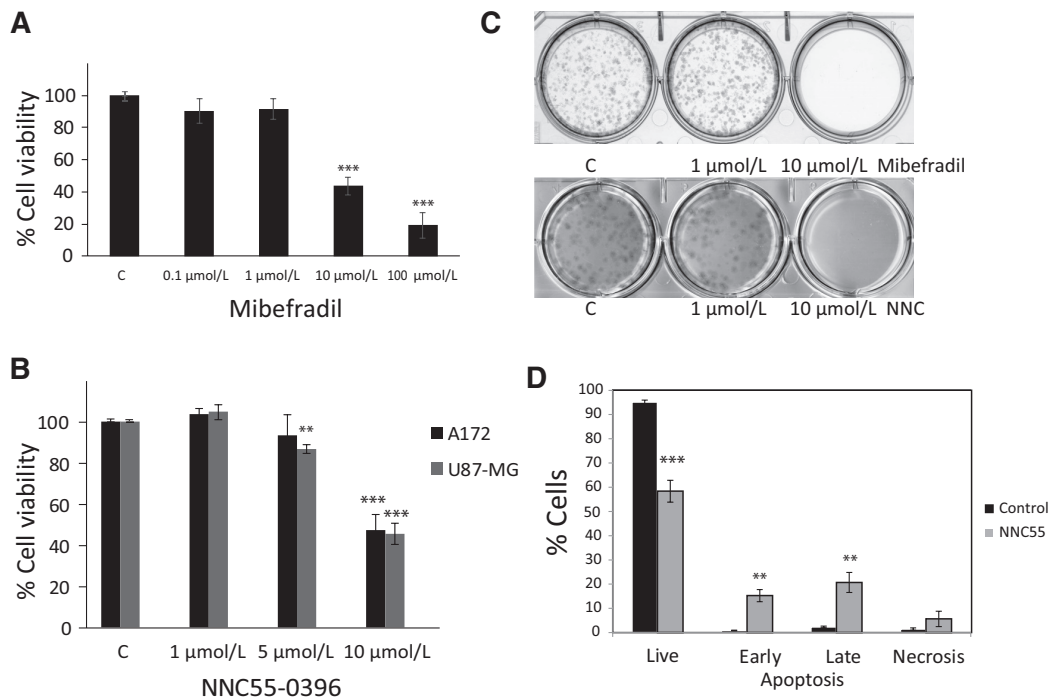
We sought to study the impact of recognized TTCC blockers, tetralol derivative mibefradil, and NNC-55-0396, on the viability of A172 and U87-MG cells in our experimental setting. Both tetralols applied at 10  $\mu\text{mol/L}$  reduced GBM cell viability by approximately 50% after 24 hours of treatment (Fig. 2A and

B), measured by the WST-1 cell viability and proliferation assay. Furthermore, clonogenic assays showed the absence of cell colonies after treatment with 10  $\mu\text{mol/L}$  mibefradil or NNC-55-0396 for a period of 2 weeks (Fig. 2C).

Considering its higher selectivity for TTCC, for the rest of our studies we used NNC-55-0396 in A172 cells that express both  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$ . We performed Annexin V/PI assays to estimate the induction of apoptosis following 24 hours of treatment with NNC-55-0396. The results showed a reduction of approximately 40% in the number of live cells, together with significant increases in early and late apoptosis upon cell treatment with the blocker compared with untreated cells (Fig. 2D).

We next set up to evaluate the consequences of selective TTCC gene silencing in GBM cells to discriminate the involvement of  $Ca_v3.1$  or  $Ca_v3.2$  in the apoptotic process. We tested two specific lentiviral-driven shRNAs for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  (shRNAs $Ca_v3.1\#1$  and  $\#2$ , and shRNAs $Ca_v3.2\#1$  and  $\#2$ , respectively). shRNAs $Ca_v3.1\#1$  efficiently knocked down  $Ca_v3.1$  expression (by  $\sim 60\%$ – $80\%$  in U87-MG and A172 cell lines, Fig. 3A), whereas shRNAs $Ca_v3.1\#2$  was less efficient, with a reduction of approximately 30% in  $Ca_v3.1$  expression in A172 cells (Supplementary Fig. S1A). On the other hand, shRNAs $Ca_v3.2\#1$  and  $\#2$  similarly reduced  $Ca_v3.2$  expression to 30%–40% in A172 cells (Fig. 3A; Supplementary Fig. S1A).

$Ca_v3.1$  silencing resulted in cell death. To monitor this effect, we performed Annexin V/PI assays using lentiviral-driven shRNA- $Ca_v3.1$ - or  $Ca_v3.2$ -silenced cells after 6 days of infection in A172 and U87-MG cell lines. As illustrated by phase contrast micrographs (Fig. 3B), at 6th day of infection the number of live cells was reduced by 60%–70% in cells expressing shRNAs $Ca_v3.1\#1$  compared with control (shRNA scrambled) cells, with concomitant increases in early and late apoptosis (Fig. 3C).

**Figure 2.**

TTCC blockers decrease GBM cell viability and promote apoptosis. **A** and **B**, WST-1 cell viability assays were performed using A172 (**A** and **B**) or U87-MG (**B**) cells untreated or treated with mibefradil or NNC-55-0396 (as indicated) for 24 hours. **C**, Representative images from clonogenic assays performed on A172 cells untreated or treated with mibefradil or NNC-55-0396 (as indicated) for 12–15 days. Both blockers significantly reduced cell viability and colony growth at 10 μmol/L. **D**, Annexin V/PI staining experiments showed that NNC-55-0396 10 μmol/L (24 hours) significantly reduced the number of live cells and promoted apoptosis of A172 cells compared with untreated control cells. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

shRNACa<sub>v</sub>3.1#2 produced similar results (Supplementary Fig. S1B). Silencing Ca<sub>v</sub>3.2 by shRNACa<sub>v</sub>3.2#1 and #2 also promoted A172 cell death but to a lesser extent (Fig. 3C; Supplementary Fig. S1B), with a decrease of about 30% in the number of live cells and increased early apoptosis (Fig. 3C; Supplementary Fig. S1B). Of note, cell death appeared abruptly from day 5 of infection in GBM cell lines (Supplementary Fig. S2). These results show the involvement of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 in promoting GBM cell survival.

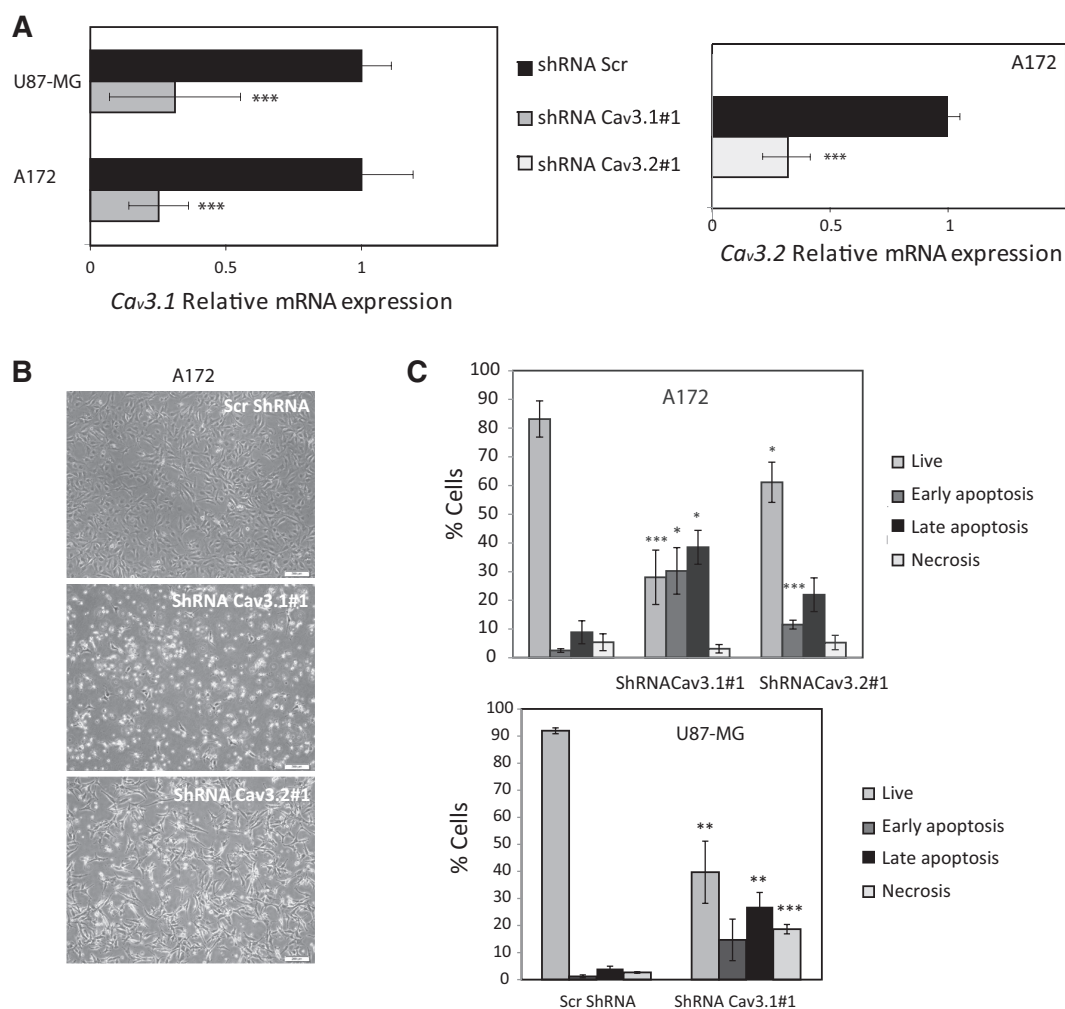
In addition to adherent GBM cultures, we grew neurospheres derived from U87-MG. Increased expression of the CD133 stem cell marker in neurospheres versus adherent cultures was confirmed, as expected (Supplementary Fig. S3A). Next, we studied TTCC expression and the effects of silencing Ca<sub>v</sub>3.1 in neurospheres. Expression analysis of Ca<sub>v</sub>3.1 indicated that the expression of this isoform was similar in neurospheres and adherent cultures (Supplementary Fig. S3B). Of note, Ca<sub>v</sub>3.2 remained undetectable in U87-MG neurospheres, as previously observed in the respective adherent cell line. Interestingly, we confirmed the cell death induced by silencing Ca<sub>v</sub>3.1 in U87-MG neurosphere (Supplementary Fig. S3C). These results highlight the role of this channel in the viability of GBM adherent and stem cell-like cultures.

#### Temozolomide-resistant GBM cells upregulate both TTCC and autophagy

Having established that TTCC play a central position in the regulation of GBM cell survival and given the resilient nature of

GBM, we aimed at analyzing TTCC expression in recurrent GBM. We obtained paired samples of primary and recurrent GBM from 4 patients. Ca<sub>v</sub>3.1 transcripts were overexpressed in the three recurrent tumors compared with their respective primary tumors (Fig. 4A). In contrast, only one recurrence showed overexpression of Ca<sub>v</sub>3.2, while the rest displayed a reduced expression of Ca<sub>v</sub>3.2 compared with the respective primary tumor (Fig. 4A). These findings prompted us to set up an *in vitro* cellular model of temozolomide-resistant GBM, to investigate the effects of TTCC manipulation.

Temozolomide-resistant GBM cells were generated from the A172 cell line by exposure to increasing concentrations of temozolomide over a period of several weeks. Two clones were expanded at a concentration of 200 μmol/L temozolomide (RC1 and RC2). Temozolomide 200 μmol/L severely impaired clonogenic growth of A172 cells (Fig. 4B). In contrast, the capacity of RC2 cells to proliferate in colonies was unaffected by the presence of temozolomide (Fig. 4B). The proliferation rate of resistant cells was similar to that of the parental cell line (Supplementary Fig. S4A). Next, we analyzed TTCC expression in resistant cells. Both RC1 and RC2 cells showed a 4 and 9-fold increase in Ca<sub>v</sub>3.1 transcripts, respectively, compared with the parental A172 cells (Fig. 4C). Expression of Ca<sub>v</sub>3.2 did not significantly increase in RC1 or RC2 compared with A172 cells (Fig. 4C). Karyotype analysis of A172, RC1 and RC2 cells indicated that the cell lines are hyperpolyploid with complex chromosome formulas



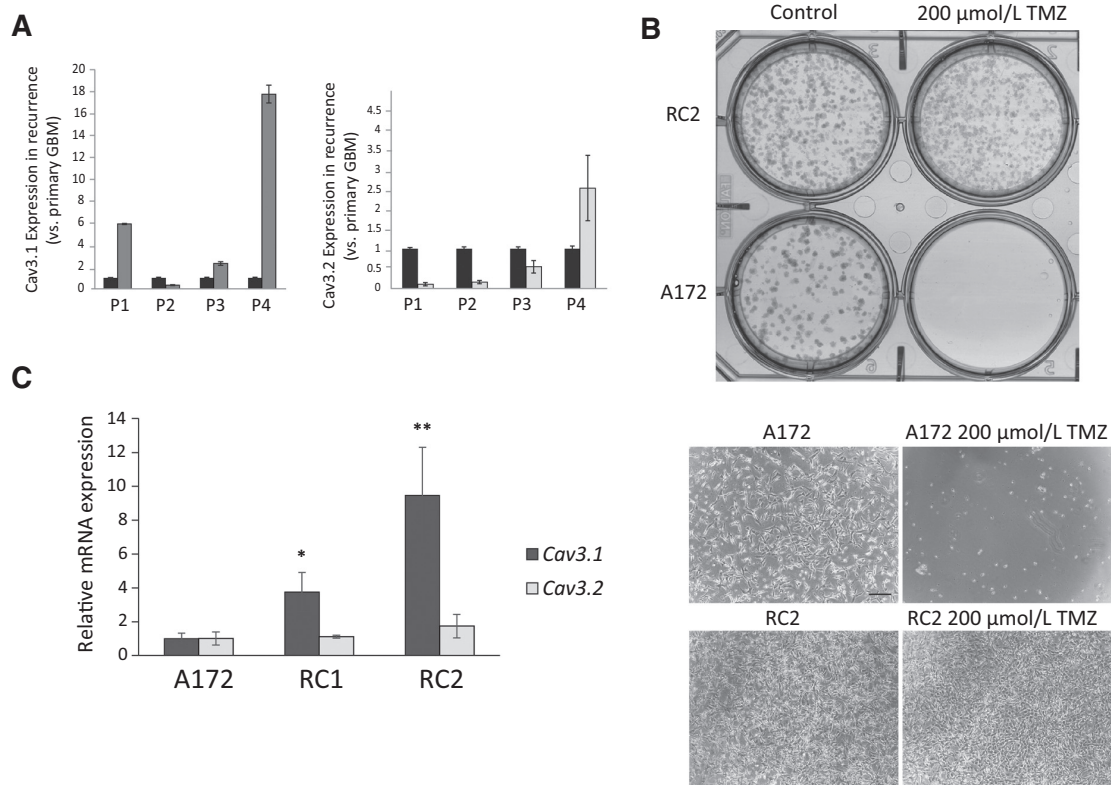
**Figure 3.**

Silencing of *Ca<sub>v</sub>3.1* by shRNA, and to a lesser extent silencing of *Ca<sub>v</sub>3.2*, induces GBM cell death. **A**, shRNAs *Ca<sub>v</sub>3.1#1* (left) and *Ca<sub>v</sub>3.2#1* (right) significantly reduced *Ca<sub>v</sub>3.1* and *Ca<sub>v</sub>3.2* mRNA levels, respectively, in GBM cell lines (U87-MG and A172) compared with scrambled shRNA at day 4 after lentiviral infection. Phase contrast micrographs (**B**) and Annexin V/PI staining experiments (**C**) indicate that silencing *Ca<sub>v</sub>3.1* expression (using shRNA*Ca<sub>v</sub>3.1#1*) and, to a lesser extent silencing of *Ca<sub>v</sub>3.2* (shRNA*Ca<sub>v</sub>3.2#1*), induces apoptosis compared with controls (Scr, shRNA scrambled) in A172 and U87-MG cell lines. Annexin V/PI experiments were performed after 6 days of infection. Scale bar, 200  $\mu$ m. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

(Supplementary Fig. S4B and S4C). No specific chromosomal alterations could be correlated with the resistance to temozolomide by conventional cytogenetic studies. Together, the expression of *Ca<sub>v</sub>3.1* is upregulated in temozolomide-resistant GBM cells and in a fraction of recurrent GBM samples, pointing to a possible involvement of these channels in chemoresistance.

Acute application of temozolomide is a known inducer of autophagy in GBM cells through activation of the ATM/AMP-activated protein kinase (AMPK)/mTOR pathway (30–32). In addition, we had previously found that the expression of the *Ca<sub>v</sub>3.1* isoform and autophagy markers positively correlates in melanoma cells (24, 33). Therefore, we studied whether RC2 or A172 cells treated with temozolomide in acute (6 hours) or chronic (72 hours) treatments display an altered autophagic flux

compared with untreated A172 cells. Temozolomide-treated A172 and RC2 cells showed increased P-AMPK levels, compared with control cells (Fig. 5A). Moreover, the levels of autophagy-related protein, BECLIN1, increased in parallel with ATG5 monomers and ATG5-ATG12 dimers following exposure to temozolomide in RC2 cells. Levels of SQSTM1/P62, a cargo chaperone/receptor of autophagosomes, may reflect simultaneous gene upregulation and protein degradation in a situation of enhanced autophagy (34). Despite P62 protein levels did not show consistent changes upon temozolomide treatment, we found a 2-fold increase of P62 mRNA levels in RC2 (compared with parental A172 cells; Fig. 5B), consistent with an increased autophagosome biogenesis. Finally, we studied the autophagic flux using the ptfLC3A construct (26) and compared RC2

**Figure 4.**

Recurrent/chemoresistant GBM overexpresses  $Ca_v3.1$ . **A**, mRNAs were purified from primary and recurrent GBM biopsies obtained from the same patient, retrotranscribed to cDNA, and  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  transcripts analyzed by real-time PCR. Analysis of paired biopsies of four patients (P1–P4) indicates that recurrent GBMs overexpress  $Ca_v3.1$  (3/4 samples) and downregulate  $Ca_v3.2$  (3/4 samples) compared with their respective primary tumors. Plots represent triplicates from one experiment (due to sample shortage). **B**, Representative images of clonogenic assay (top) and phase contrast micrographs (bottom) comparing A172 cells and the chemoresistant RC2 clone derived from the A172 cell line (grown under control conditions or upon exposure to 200 μmol/L TMZ). Images illustrate the resistance of RC2 cells to temozolomide (TMZ). Scale bar, 200 μm. **C**,  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  mRNAs analysis by qPCR in temozolomide-chemoresistant cultures compared with the A172 parental cell line indicates that the RC1 and RC2 cells upregulate  $Ca_v3.1$ . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

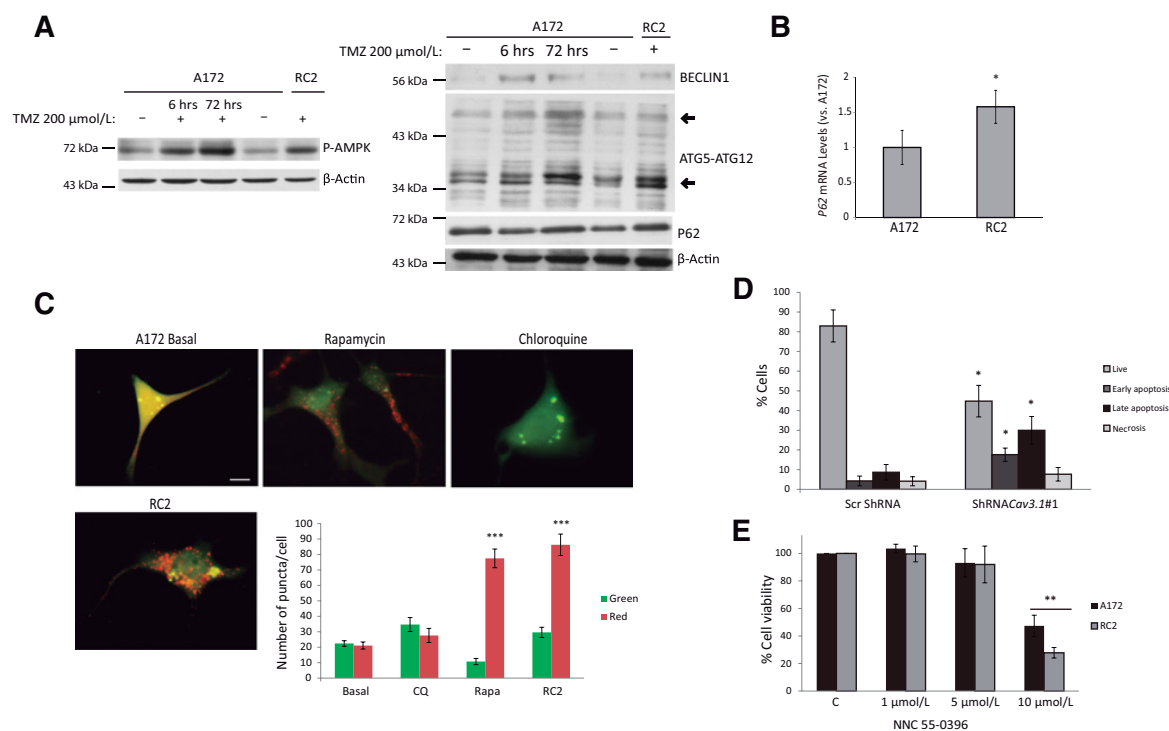
cells with A172 cells. Treatment with the autophagy inducer rapamycin, or blocker chloroquine was also performed as control. In this assay red puncta represent autolysosomes, whereas yellow (red and green) puncta are indicative of autophagosomes. Quantification of puncta demonstrated that RC2 shows a significant increase in the number of red puncta versus green puncta, similar to the effect of rapamycin in A172 cells. In contrast, A172 cells treated with chloroquine showed a balance between green and red puncta (yellow dots), as expected (Fig. 5C). Together, these results confirm that temozolomide-chemoresistant RC2 cells display an enhanced autophagic flux in addition to the upregulation of  $Ca_v3.1$ .

To address the involvement of  $Ca_v3.1$  in the survival of RC2 cells, we silenced the expression of this channel in RC2 cells and then performed Annexin V/PI staining. Results showed a reduction of 46% in the number of live cells upon silencing  $Ca_v3.1$  in RC2 cells (using shRNAC $Ca_v3.1$ #1), a 13% increase of cells in early apoptosis, and a 22% increase of cells in late apoptosis (Fig. 5D), similar to results in the A172 cell line (Fig. 3C). RC2 cells were also sensitive to the TTCC blocker NNC-55-0396 (10 μmol/L, 24 hours), which reduced cell viability by 72% (Fig. 5E).

#### $Ca_v3.1$ channels play a proautophagic function

Previous studies and our results in RC2 cells suggested a proautophagic function of  $Ca_v3.1$ . We further analyzed key components of the autophagy pathway, autophagy-related protein LC3-II, P62, and ubiquitination of proteins (cargo). Surprisingly, P62 levels dropped upon silencing  $Ca_v3.1$  in GBM cells. Interestingly, this decrease in P62 was linked to increased levels of LC3-II and of ubiquitinated proteins, compared with control cells (Fig. 6A). These findings are compatible with a defective autophagy, possibly caused by the lack of the cargo receptor P62. In addition to changes in P62 protein levels, silencing  $Ca_v3.1$  significantly reduced P62 mRNA levels in A172 cells (Fig. 6B). Bioinformatics analysis using the Gliovis platform confirmed a positive relationship between  $Ca_v3.1$  and P62 or LC3A in GBM samples (Fig. 6C). These findings suggest that  $Ca_v3.1$  signaling positively regulates autophagy through the transcriptional regulation of P62.

The association between  $Ca_v3.1$  and autophagic markers was additionally explored in GBM biopsies included in a TMA. Immunostaining results indicated that the expression of  $Ca_v3.1$  positively correlates with that of P62 and LC3 in tumor samples



**Figure 5.** Temozolomide (TMZ)-resistant RC2 cells display upregulated autophagy and are sensitive to TTCC blockade or silencing. **A**, Left, P-AMPK levels increase upon temozolomide treatment (6 or 72 hours) in RC2 compared with the parental A172 cell line (the A172 control sample was loaded twice for better comparison). Right, Beclin1/BECN1 expression, ATG5 monomers (35 kDa), and the ATG5-ATG12 (54 kDa) dimers increased upon temozolomide treatment in RC2 cells compared with A172 cells.  $\beta$ -actin/ACTB was used as a loading control. **B**, P62 transcripts were upregulated in RC2 compared with the parental A172 cell line. **C**, A172 cells transfected with the ptfLC3 plasmid were treated for 24 hours with 25  $\mu$ M chloroquine or 500 nmol/L rapamycin as controls for autophagy blockade and autophagic flux induction, respectively. RC2 cells were compared with untreated A172 cells. RC2 displayed abundant red puncta, indicating increased autophagic flux in basal conditions. Scale bar, 10  $\mu$ m. Plot represents the average number of red and green puncta per cell. A172 cells treated with chloroquine display similar numbers of red and green (yellow) puncta. RC2 cells, similar to A172 cells treated with rapamycin, show increased numbers of red dots. **D**, Annexin V/PI staining experiments indicated that silencing *Ca<sub>v</sub>3.1* (shRNACa<sub>v</sub>3.1#1) induces apoptosis of RC2 cells and decreases the number of live cells compared with control cells. Scr, shRNA scrambled. **E**, WST-1 cell viability assays performed using A172 or RC2 cells untreated (control, C) or treated with NNC-55-0396 (24 hours at the indicated concentration) show an increased sensitivity of RC2 cells to the TTCC blocker compared with A172 cells. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

[Pearson correlation coefficient (PCC) = 0.67,  $P = 7.15 \times 10^{-5}$  for p62; PCC = 0.42,  $P = 0.0017$  for LC3; Fig. 6D and E; Supplementary Fig. S5].

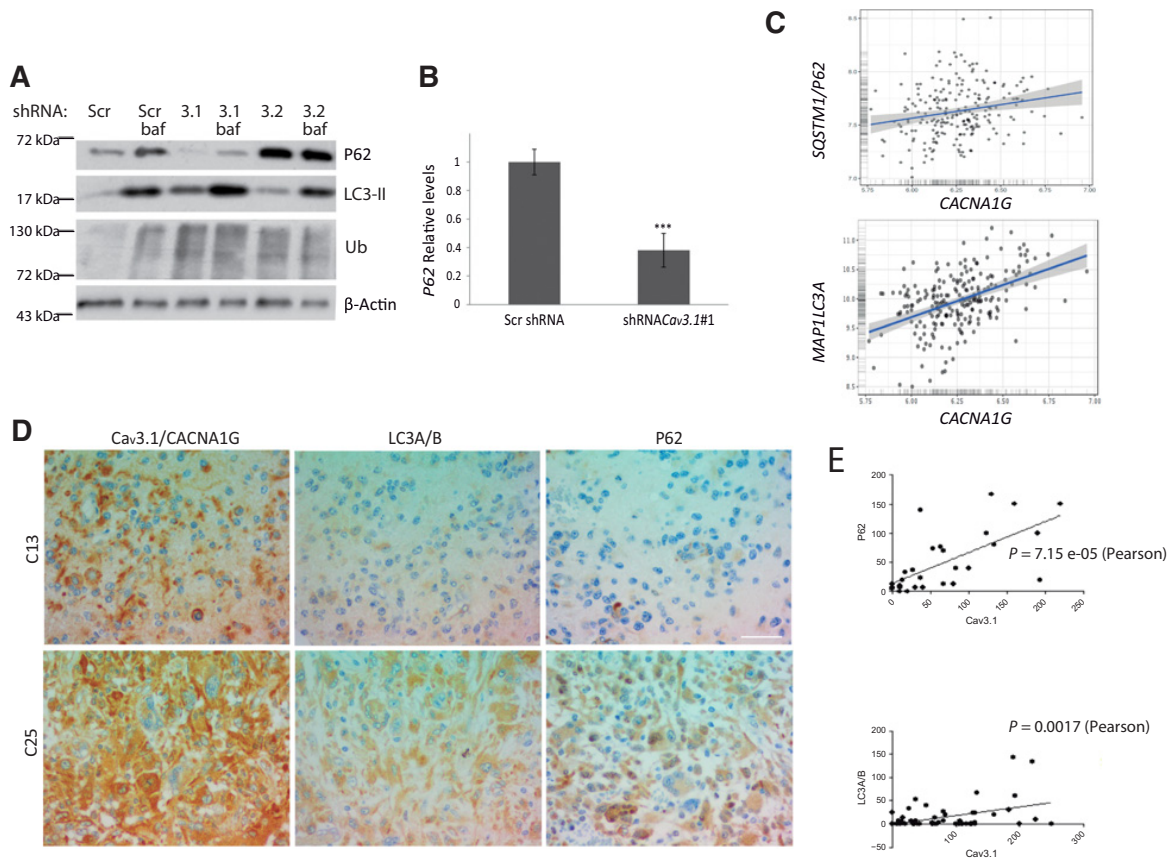
**Silencing *Ca<sub>v</sub>3.1* expression reduces GBM growth *in vivo***

In light of the observed effects on GBM cell viability and the deregulation of autophagy upon silencing *Ca<sub>v</sub>3.1* expression, we performed xenograft experiments to evaluate the effect of depleting *Ca<sub>v</sub>3.1* in tumor development. We used U87-MG cells, a cell line that expresses only detectable levels of *Ca<sub>v</sub>3.1*. We generated tumors using either control (scrambled shRNA) cells or cells expressing a shRNA against *Ca<sub>v</sub>3.1* (shRNACa<sub>v</sub>3.1#1 and measured tumor size from day 2 up to 15 days). Growth was stopped in tumors formed by U87-MG cells depleted of *Ca<sub>v</sub>3.1* compared with control tumors (Fig. 7A). We analyzed proliferation markers (Ki67 and cyclin D1) and the autophagic protein P62 in tumor sections. We observed a reduction of approximately 30% in the number of cells immunostained for both proliferative markers in the tumors formed by cells expressing the shRNA against *Ca<sub>v</sub>3.1*, compared with controls (Fig. 7B). In addition, in agreement with

*in vitro* results, we observed a significant reduction of the immunostaining for P62 in tumors derived from cells depleted of *Ca<sub>v</sub>3.1* (Fig. 7B).

**Discussion**

In this article we show that *Ca<sub>v</sub>3.1* and *Ca<sub>v</sub>3.2* isoforms of TTCC are expressed in GBM cell lines, *Ca<sub>v</sub>3.1* being prevalent at the transcript level. This is in syntony with previous reports from GBM (23, 35–37), but against findings in other cancer types, in which overexpression of *Ca<sub>v</sub>3.2* is common (8). Although *Ca<sub>v</sub>3.2* is reportedly downregulated in human GBM samples (38), recently Zhang and colleagues described that *Ca<sub>v</sub>3.2* was highly expressed in a subset of GBM tumors and in GSC, and that patients with alterations in the *Ca<sub>v</sub>3.2* gene (involving its upregulation) presented a trend towards shorter survival in Kaplan–Meier estimates (20). Furthermore, pharmacologic blockade of TTCC with mibefradil reduced stemness and the viability of GSC, by inhibiting prosurvival pathways while stimulating proapoptotic factors. In addition, oral administration of mibefradil

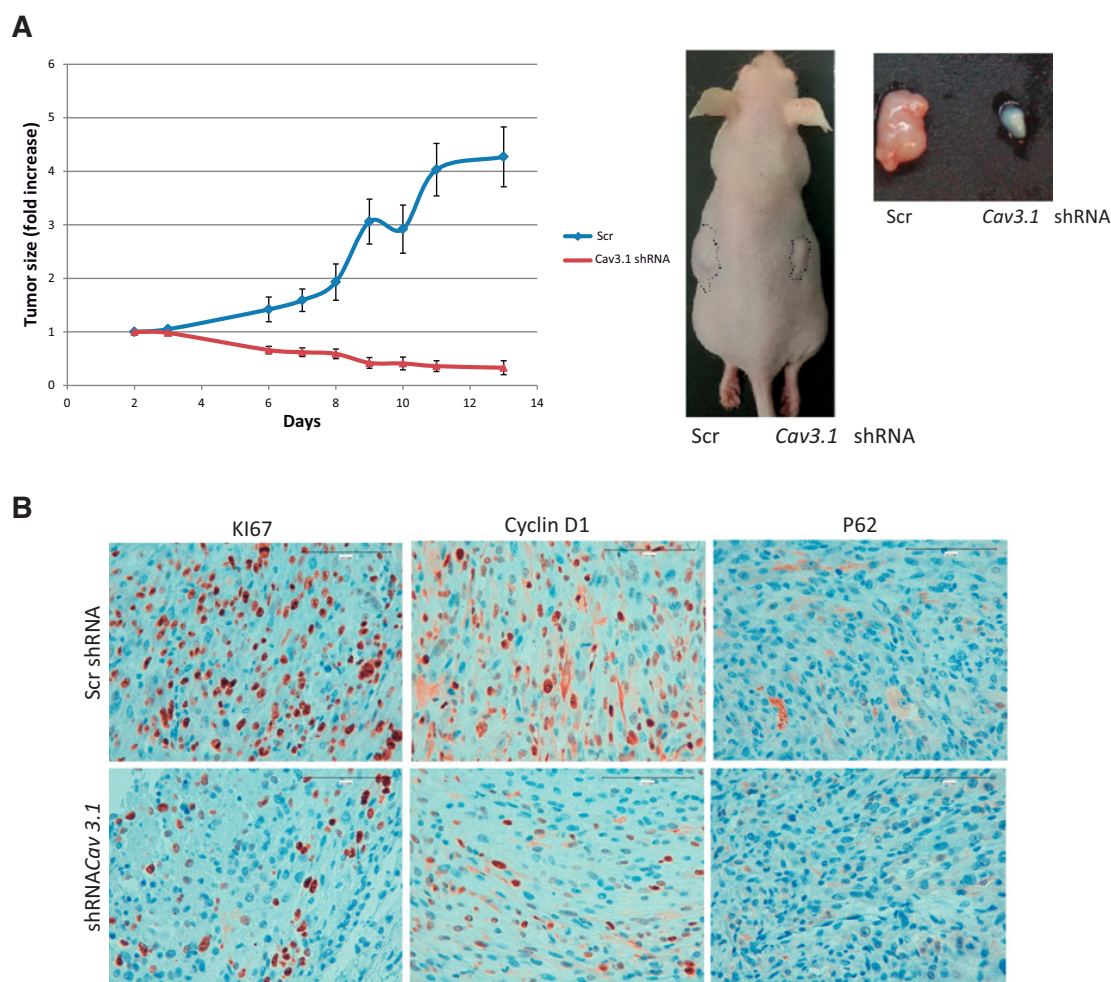


**Figure 6.**  $Ca_v3.1$  regulates autophagy. **A**, A172 cells expressing shRNA $Ca_v3.1$ #1, shRNA $Ca_v3.2$ #1, or scrambled (scr) were analyzed for P62, LC3, or ubiquitinated proteins. Silencing  $Ca_v3.1$  resulted in decreased P62 and increased LC3-II levels, accompanied by increased ubiquitinated proteins, consistent with a defective autophagy. Note that bafilomycin (baf) treatment increased the levels of ubiquitinated proteins by blocking autophagic flux.  $\beta$ -actin was used as a loading control. **B**, P62 mRNA levels decreased upon silencing  $Ca_v3.1$  in A172 cells.  $***, P < 0.001$ . **C**, Positive correlations between  $Ca_v3.1/CACNA1G$  and P62/SQSTM1 (top) or  $Ca_v3.1/CACNA1G$  and LC3A/MAP1LC3A (bottom) mRNA expression as obtained from the GlioVis platform using the Rembrandt dataset (PCC for P62 = 0.206 and PCC for LC3A = 0.46;  $**P < 0.01$ ). **D**, Representative examples of two GBM cases analyzed in a TMA following immunostaining for  $Ca_v3.1$ , P62, and LC3. **E**, Positive correlations between the histocores obtained from the 57 GBM samples included in the TMA for  $Ca_v3.1$  and P62 (PCC = 0.67), or  $Ca_v3.1$  and LC3 (PCC = 0.42), which were significant according to Pearson test (see  $P$  values). Scale bars, 50  $\mu$ m.

inhibited the growth of GSC-derived GBM murine xenografts, prolonged host survival, and sensitized tumors to temozolomide treatment, leading to the claim that  $Ca_v3.2$  blockade was underlying these effects. However, the authors did not analyze the expression of  $Ca_v3.1$  demonstrated in GSC (22). Indeed, our results with U87-MG neurosphere cultures show that stemness neither altered the expression of  $Ca_v3.1$  nor promoted the expression of  $Ca_v3.2$  to the threshold of detection by qPCR. Furthermore, the viability of the neurosphere cells was still compromised by  $Ca_v3.1$  knockdown. In addition, we analyzed the TCGA database under the same stringency  $z$ -scores as in ref. 20, and observed that 20 of 136 tumors presented alterations in the  $Ca_v3.1$  gene involving its upregulation, which also associated to a worse outcome. Nevertheless, in our experimental setting A172 cells additionally expressed  $Ca_v3.2$  channels and were sensitive to both  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  gene knockdown. Hence, it can be concluded that both TTCC isoforms play a role in GBM biology.

TTCC pharmacologic blockers have shown both to halt cell proliferation and induce apoptosis in different cancer types and, specifically, in GBM cells *in vitro*. However, neither currently available blockers are able to discriminate between TTCC isoforms, nor are devoid of off-target effects at cytotoxic concentrations (Visa and colleagues). Accurate target identification is paramount, because of a differential role for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  isoforms demonstrated in different cell systems through (over) expression or gene-silencing experiments. For instance, although both isoforms have been involved in cell-cycle progression and survival, only the expression of  $Ca_v3.1$  shows a positive correlation with autophagic markers in melanoma (24). In contrast  $Ca_v3.2$ , whose expression increases in hypoxic conditions, has been implied in cell growth, stemness, and cancer metastasis (8). Specific gene silencing with lentiviral-driven shRNAs indicated that, in those GBM cell lines in which both TTCC were expressed, silencing of either one induced significant cell death measured in viability and Annexin assays, principally by apoptosis.



**Figure 7.**

Silencing *Ca<sub>v</sub>3.1* reduces tumor growth. **A**, Left, graph of tumor growth over time of SCID mice xenografts formed by U87-MG cells (control or *Ca<sub>v</sub>3.1*-silenced) calculated versus the tumor size at day 2 of tumor induction. Right, representative pictures of a mouse xenografted with control (scr, scrambled shRNA) or *Ca<sub>v</sub>3.1*-silenced U87-MG cells (shRNACa<sub>v</sub>3.1#1) at either flank. Tumors were allowed to grow for 13 days. Representative examples of tumors from each condition are shown. **B**, Tumors were collected and prepared for immunostaining. Immunostainings against Ki67, cyclin D1, and P62 from tumors expressing scrambled shRNA or shRNACa<sub>v</sub>3.1#1. U87-MG tumors depleted of *Ca<sub>v</sub>3.1* showed decreased immunostaining of proliferative markers, Ki67 (72.7% ± 6.7%) and cyclin D1 (68.3% ± 13.5%), and of P62 (29.0% ± 12.3%). Scale bars, 100 μm.

Noticeably, the induction of apoptosis measured at the same time-points was higher for *Ca<sub>v</sub>3.1* knockdown than for *Ca<sub>v</sub>3.2* knockdown.

In line with a differential role, we also describe the upregulation of *Ca<sub>v</sub>3.1* channels in a temozolomide-chemoresistant cell line. Although paired biopsies of primary and recurrent GBM from the same patient are scarce, results from four paired samples are also suggestive of a preferential upregulation of *Ca<sub>v</sub>3.1* in recurrent GBMs. It has been established that temozolomide-dependent DNA damage activates AMPK, thus enhancing autophagy as a response to therapy (30, 39, 40). Consistently, combined applications of temozolomide and autophagy inhibitors synergistically increase GBM cytotoxicity (41–44). Here we found that temozolomide-resistant cells upregulate autophagy in parallel to the overexpression of *Ca<sub>v</sub>3.1*, advocating for the use of TTCC blockers in recurrent GBM.

One important goal of this work was to confirm a relationship between expression of *Ca<sub>v</sub>3.1* and autophagy, identified previously in melanoma cells, by means of gene knockdown in GBM. Indeed, *Ca<sub>v</sub>3.1* gene silencing deregulated autophagy, involving reduction of *P62/SQSTM1* at the transcriptional level and accumulation of ubiquitinated proteins. Further evidence of the *Ca<sub>v</sub>3.1* autophagy association came from the GBM TMA study, displaying positive correlations between *Ca<sub>v</sub>3.1* and LC3/P62. In addition, murine U87-MG xenograft experiments indicated that *Ca<sub>v</sub>3.1* plays a role in GBM growth *in vivo*, such that *Ca<sub>v</sub>3.1* silencing reduced tumor size, concomitant with reductions of proliferation markers (Ki67 and cyclin D1), and of P62. In a similar xenograft model, NNC-55-0396 significantly suppressed GBM tumor growth (19). GBM cell line xenografts show good engraftment and growth rates, but

whether they reflect the biological nature of GBM is unclear (45). Yet, the involvement of Ca<sub>v</sub>3.1 in autophagy regulation warrants its investigation as a chemotherapeutic target particularly in recurrent, temozolomide-resistant GBM, because these tumors display higher levels of both Ca<sub>v</sub>3.1 and autophagy markers compared with primary GBM.

In conclusion, in this article, we provide *in vitro* and *in vivo* evidence for a role of the Ca<sub>v</sub>3.1 isoform of TTCC in GBM proliferation, survival, and autophagy, emphasizing its involvement in recurrent GBM, in which it may provide a pathway for chemotherapeutic resistance.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Authors' Contributions

Conception and design: J. Herrerros, C. Cantí

Development of methodology: A. Visa, M.C. Sallán

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Visa, M.C. Sallán, O. Maiques, L. Alza, R. López-Ortega

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Visa, M.C. Sallán, L. Alza, M. Santacana, J. Herrerros, C. Cantí

Writing, review, and/or revision of the manuscript: J. Herrerros, C. Cantí

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Santacana

Other (provided laboratory support): E. Talavera

### Acknowledgments

Paired biopsies of primary and recurrent GBMs were obtained through Biobank Network from Carlos III Health Institute (NavarraBiomed, Toledo, and Basque Biobanks). This work was funded by Instituto de Salud Carlos III/FEDER ("Una manera de hacer Europa"; PI13/01980 to J. Herrerros). Work was supported by IRBLLeida Biobank (B.0000682) and PLATAFORMA BIOBANCOS PT17/0015/0027/. M.C. Sallán and A. Visa held predoctoral fellowships from University of Lleida.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 22, 2018; revised December 12, 2018; accepted February 7, 2019; published first February 12, 2019.

### References

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- Nager M, Bhardwaj D, Cantí C, Medina L, Nogués P, Herrerros J.  $\beta$ -catenin signalling in glioblastoma multiforme and glioma-initiating cells. *Chemother Res Pract* 2012;2012:192362.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21:2683–710.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215–25.
- Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve. *Br J Cancer* 2016;114:485–96.
- Skupin A, Thurley K. Calcium signaling: from single channels to pathways. *Adv Exp Med Biol* 2012;740:531–51.
- Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium–cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* 2017;17:367–80.
- Sallán MC, Visa A, Shaikh S, Nàger M, Herrerros J, Cantí C. T-type Ca<sup>2+</sup> channels: T for targetable. *Cancer Res* 2018;78:603–9.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000;25:533–5.
- Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a003947.
- Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. Differential expression of voltage-gated Ca(2+)-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1160:95–104.
- Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* 1996;79:14–9.
- Rodman DM, Harral J, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Reese KA, et al. The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest* 2005;128:581S–582S.
- Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Origitano TC, Singh S, Wurster RD. Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium* 2005;37:105–19.
- Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, et al. Selective blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 2008;267:116–24.
- Li W, Zhang S-L, Wang N, Zhang B-B, Li M. Blockade of T-type Ca(2+) channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest* 2011;29:339–46.
- Das A, Pushparaj C, Bahí N, Sorolla A, Herrerros J, Pamplona R, et al. Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:200–12.
- Keir ST, Friedman HS, Reardon DA, Bigner DD, Gray LA. Mibefradil, a novel therapy for glioblastoma multiforme: cell cycle synchronization and interlaced therapy in a murine model. *J Neurooncol* 2013;111:97–102.
- Kim KH, Kim D, Park JY, Jung HJ, Cho YH, Kim HK, et al. NNC 55-0396, a T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor, inhibits angiogenesis via suppression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signal transduction. *J Mol Med* 2015;93:499–509.
- Zhang Y, Cruickshanks N, Yuan F, Wang B, Pahuski M, Wulfskuhle J, et al. Targetable T-type calcium channels drive glioblastoma. *Cancer Res* 2017;77:3479–90.
- Rodríguez-Gómez JA, Levitsky KL, Lopez-Barneo J. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse embryonic stem cells: modulation during cell cycle and contribution to self-renewal. *AJP Cell Physiol* 2012;302:C494–504.
- Niklasson M, Maddalo G, Sramkova Z, Mutlu E, Wee S, Sekyrova P, et al. Membrane-depolarizing channel blockers induce selective glioma cell death by impairing nutrient transport and unfolded protein/amino acid responses. *Cancer Res* 2017;77:1741–52.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347:1260419.
- Maiques O, Macià A, Moreno S, Barceló C, Santacana M, Vea A, et al. Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol* 2017;176:1247–58.
- Nàger M, Santacana M, Bhardwaj D, Valls J, Ferrer I, Nogués P, et al. Nuclear phosphorylated Y142  $\beta$ -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion. *Cell Cycle* 2015;14:3644–55.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosomal maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 2007;3:452–60.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 2010;160:1577–9.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data: figure 1. *Cancer Discov* 2012;2:401–4.
- Bowman RL, Wang Q, Carro A, Verhaak RGW, Squatrito M. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro Oncol* 2017;19:139–41.
- Zou Y, Wang Q, Li B, Xie B, Wang W. Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. *Mol Med Rep* 2014;10:411–6.

31. Würstle S, Schneider F, Ringel F, Gempt J, Lämmer F, Delbridge C, et al. Temozolomide induces autophagy in primary and established glioblastoma cells in an EGFR independent manner. *Oncol Lett* 2017;14:322–8.
32. Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, Harlos C, Pitz M, Hamai A, et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol Ther* 2017;84:13–41
33. Das A, Pushparaj C, Herreros J, Nager M, Vilella R, Portero M, et al. T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26:874–85.
34. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* 2012;2:397–413.
35. Latour I, Louw DF, Beedle AM, Hamid J, Sutherland GR, Zamponi GW. Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia* 2004;48:112–9.
36. Zhang Y, Zhang J, Jiang D, Zhang D, Qian Z, Liu C, et al. Inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 2012;166:1247–60.
37. Valerie NCK, Dziegielewska B, Hosing AS, Augustin E, Gray LS, Brautigam DL, et al. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2013;85: 888–97.
38. Phan NN, Wang CY, Chen CF, Sun Z, Lai MD, Lin YC. Voltage-gated calcium channels: novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett* 2017;14:2059–74.
39. Filippi-Chiela EC, Viegas MS, Thome MP, Buffon A, Wink MR, Lenz G. Modulation of autophagy by calcium signalosome in human disease. *Mol Pharmacol* 2016;90:371–84.
40. Zannotto-Filho A, Braganhol E, Klafke K, Figueiró F, Terra SR, Paludo FJ, et al. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. *Cancer Lett* 2015;358: 220–31.
41. Golden EB, Cho H-Y, Jahanian A, Hofman FM, Louie SG, Schönthal AH, et al. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurg Focus* 2014;37:E12.
42. Lee SW, Kim H-K, Lee N-H, Yi H-Y, Kim H-S, Hong SH, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett* 2015;360:195–204.
43. Hori YS, Hosoda R, Akiyama Y, Sebori R, Wanibuchi M, Mikami T, et al. Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells. *J Neurooncol* 2015;122: 11–20.
44. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:23.
45. Kijima N, Kanemura Y. Mouse Models of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017. Chapter 7.

