



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Uso de péptidos competitivos contra la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas End Binding (EB) en la inhibición de la migración e invasión celular.”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**

ISMAEL AGUSTÍN ALDUNATE VARELA

Director del Seminario de Título: DR. OSCAR CERDA ARANCIBIA

Profesor Patrocinante: DR. NICOLAS GUILLIANI

Septiembre 2018

Santiago-Chile

Ismael Aldunate Varela

Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Provengo de Calera de Tango, Región Metropolitana, donde realicé mi enseñanza básica y media. Mis estudios universitarios comenzaron el 2012, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, finalizándolos el año 2017. En el año 2016, me uní al Laboratorio de Proteómica Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Oscar Cerda. Aquí, me interesé en el estudio del canal TRPM4, un miembro de la superfamilia de los canales TRP, y su relación con la invasión de células cancerígenas. Mi tesis que se centró en el estudio de péptidos competitivos contra la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas End Binding (EBs), y su efecto en la invasión celular, principalmente de células cancerígenas. Durante estos años he participado en reuniones científicas nacionales e internacionales. También participé en un curso de Microscopia, donde aprendí diferentes técnicas y usos de la microscopia. Actualmente me encuentro finalizando mi Tesis de pregrado la cual pertenece al proyecto de investigación: "Regulation of the trafficking and activity of TRPM4 by End Binding (EB) Proteins and its role in cell migration (FONDECYT Regular 1160518).

Presentaciones en reuniones científicas

1. Blanco, C., Mogollones, I., Romero, A., **Aldunate, I.**, Canales, J., Rivas, J., Cáceres, M., Cerda, O. **Generating competitive peptides against TRPM4 and End Binding proteins interaction and their use as trafficking regulators.** XXXI Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Reserva Ecológica Huilo-Huilo, Región de Los Ríos, 6 al 9 de Septiembre de 2016.
2. **Aldunate, I.** Blanco, C. Mogollones, I. Cerda, O. **Use of competitive peptides against TRPM4-EBs interaction as inhibitors of cell migration and invasion.** LX Reunión Anual de la sociedad de biología de Chile, XXIV Reunión Anual de la Sociedad Ecología de Chile. Puerto Varas, Región de los Lagos, 21 al 23 de Noviembre de 2017
3. Blanco, C., **Aldunate, I.**, Canales, J., Rivas, J., Riquelme, D., Morales, D., Silva, I., Alvarez, A., Vergara, A., Poblete, H., Romero, A., Leiva-Salcedo, E., González, W., Varela, D., Cáceres, M., Cerda, O. **The Microtubule-associated End Binding proteins regulate the ER exporting and trafficking of TRPM4 channels.** American Society of Cell Biology Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America, 2017.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primera instancia a mi familia por su inagotable paciencia y comprensión durante este fascinante y absorbente proceso.

En segunda instancia quisiera agradecer a mi Profesor Tutor, el Dr. Oscar Cerda por su guía oportuna, disposición y dedicación en mi proceso de formación y como persona, incluso en el contexto de una creciente demanda de funciones y responsabilidades.

Por último, quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio quienes día a día, tras sostenidas discusiones, buen ambiente y un pensamiento crítico, constructivo y cooperativo hicieron también posible el presente trabajo.

Este Seminario de Título se enmarcó en el desarrollo del Proyecto FONDECYT Regular 1160518: “Regulation of the trafficking and activity of TRPM4 by End Binding (EB) Proteins and its role in cell migration”.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| INDICE DE FIGURAS..... | vii |
| INDICE DE TABLAS..... | viii |
| Abreviaturas | ix |
| Resumen..... | xi |
| Abstract | xiii |
| Introducción..... | 1 |
| Migración celular..... | 1 |
| Adhesión celular..... | 3 |
| Canales TRP..... | 4 |
| Subfamilia TRPM | 6 |
| TRPM4..... | 6 |
| End Binding Proteins (EBs)..... | 10 |
| Péptidos penetrantes | 12 |
| Hipótesis..... | 15 |
| Objetivo general | 15 |
| Objetivos específicos..... | 15 |
| Objetivo 1..... | 15 |
| Objetivo 2..... | 16 |
| Materiales y Métodos..... | 17 |
| Cultivo celular..... | 17 |
| Transfección transitoria..... | 17 |
| Péptidos Permeables..... | 17 |
| Inmunofluorescencia..... | 18 |
| Ensayo de cámara transwell | 20 |
| Dinámica de adhesiones focales..... | 20 |
| Análisis estadístico..... | 21 |
| Resultados..... | 22 |
| Efecto de los péptidos competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs como inhibidores de la invasión celular..... | 22 |
| Péptidos permeables competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs y su efecto como fármaco directo en la migración e invasión celular..... | 27 |

Discusión 30
Conclusiones 35
Bibliografía..... 36

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. La superfamilia de canales TRP (obtenido de Nilius y Owsianik, 2011) | 5 |
| Figura 2. Validación de la interacción entre en canal TRPM4 y las proteínas EBs. | 12 |
| Figura 3. El Péptido EGFP-N-TRPM4 ^{WT} genera un aumento tanto en el número como en el tamaño de las FAs. | 24 |
| Figura 4. La expresión del péptido EGFP-N-TRPM4 ^{WT} disminuye la tasa de desensamblaje de las FAs..... | 25 |
| Figura 5. EGFP-N-TRPM4 ^{WT} , disminuye la invasión celular..... | 26 |
| Figura 6. El péptido TAT-TRPM4 ^{WT} genera un aumento tanto el número como en el tamaño de adhesiones focales.. | 28 |
| Figura 7. El péptido TAT-N-TRPM4 ^{WT} reduce la invasión y migración celular en A549.. | 29 |

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados19

Abreviaturas

| | |
|---------|---|
| A549 | : Células de carcinoma de pulmón humano |
| B16-F10 | : Células de melanoma de ratón |
| DMEM | : Medio Eagle modificado por Dulbecco |
| DPBS | : Amortiguador Dulbecco fosfato salino |
| EBs | : Proteínas End Binding |
| ECM | : Matriz Extracelular |
| EGFP | : Proteína fluorescente verde mejorada |
| IB | : Inmunoblots |
| MTs | : Microtúbulos |
| NCZ | : Nocodazol |
| PD | : <i>Pull down</i> |
| FAs | : Adhesiones Focales |
| FBS | : Suero fetal bovino |
| TRP | : Potencial de receptor transitorio |

Resumen

TRPM4 es un canal catiónico no selectivo activado por Ca^{2+} intracelular, permeable a iones monovalentes tales como Na^+ y K^+ . Se encuentra principalmente en los complejos de adhesiones focales (FAs) regulando la entrada de Ca^{2+} , la dinámica de FA y migración celular. TRPM4 participa en diversos procesos fisiológicos tales como la activación de células T, vasoconstricción miogénica, muerte celular y proliferación, secreción de insulina, regulación de las dinámicas de adhesiones focales y migración celular. El nivel de expresión de TRPM4 se encuentra incrementado en eventos fisiopatológicos tales como daño espinal, episodios isquémicos y enfermedades neurodegenerativas. Además, datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que el silenciamiento del canal TRPM4 disminuye la invasión celular en células de melanoma *in vitro* y también favorece el proceso de metástasis *in vivo*. Por tanto, el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión, tráfico y actividad de TRPM4 tienen una alta relevancia biomédica.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que este canal interactúa con las proteínas End-Binding (EBs) a través de un motivo consenso "S/TxIP" localizado en el extremo amino terminal, regulando la exportación y el tráfico de los canales desde el retículo endoplásmico al Aparato de Golgi y a la membrana plasmática. Por otra parte, hemos generado péptidos que afectan competitivamente la interacción del canal TRPM4 con las proteínas EBs (EGFP-N-TRPM4^{WT}), disminuyendo la disponibilidad del canal en la membrana plasmática. Se determinó que la competencia de la interacción TRPM4-EBs, disminuye significativamente el desensamblaje de las adhesiones focales, y en consecuencia a la invasión celular.

Estos datos sugieren que la competencia de la interacción entre TRPM4 y EB puede constituir potenciales herramientas farmacológicas para ser usados como agente anti-metastásico, para su posterior uso en pacientes que padezcan de cáncer.

Abstract

TRPM4 is a non-selective cationic channel, activated by intracellular Ca^{2+} , permeable to monovalent ions such as Na^+ and K^+ , which is mainly found in focal adhesions (FAs). On these complexes, TRPM4 regulates Ca^{2+} entry, FAs dynamics and cell migration. In addition, TRPM4 participates in several physiological processes such as T cell activation, myogenic vasoconstriction, cell death and proliferation, insulin secretion, regulation of FA dynamics and cell migration. On the other hand, it has been shown that their level of expression is increased in several pathophysiological events such as spinal damage, ischemic episodes and neurodegenerative diseases. Moreover, unpublished data from our laboratory suggest that TRPM4 silencing decreases the cellular invasion in melanoma cells and suppresses the process of metastasis *in vivo*. Therefore, the study of the mechanisms of regulation of the expression, trafficking and activity of TRPM4 has high biomedical relevance.

In our laboratory, we have demonstrated that TRPM4 channels interact with End-Binding proteins (EBs) through a "S/TxIP" consensus motif located at the amino terminus, regulating the exporting and trafficking of the channels from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and the plasma membrane. Since TRPM4 channel would be regulated by the "SWIP" motif, we have generated peptides that competitively affect the interaction of the TRPM4 channel with the EBs proteins, decreasing the availability of the channel in the plasma membrane. The functional effect of this competition on cell invasion was determined by transwell chamber assays, and the effect of competition on the distribution of focal adhesion was determined by immunofluorescence and confocal microscopy.

Finally, we determined that a cell penetrating peptide (TAT-N-TRPM4^{WT}) reduces the invasion of A549 cells and also affect the number and the size of FA in both A549 and B16-F10 cell lines. These data suggest that the competition of the interaction between TRPM4 and EB proteins may constitute a potential pharmacological target to be used as an anti-metastatic agent.

Introducción

La migración y contractilidad celular son procesos fundamentales que están presentes en una gran cantidad de eventos fisiológicos y fisiopatológicos tales como reparación de tejidos, respuesta inmune, remodelamiento de tejidos, fibrosis y metástasis del cáncer. Estos procesos están regulados por una gran variedad de mecanismos como el rearreglo de citoesqueleto, el recambio de adhesiones focales (FAs) y las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Ridle y cols 2003; Cáceres y cols 2015). Además, el citoesqueleto de actina recibe señales de la matriz extracelular (ECM) mediante las FAs, las cuales influyen en la organización del citoesqueleto y la polimerización de actina. Conjuntamente, cuando se produce el recambio de estructuras del citoesqueleto se ve afectada la formación y el desensamblaje de FAs. Entonces, estas señales de adhesión, estrés mecánico, y organización espacial del citoesqueleto, llevan a cambios en la contractilidad y migración celular (Pla y Gkika 2013; Zaidel y cols 2007)

Migración celular.

La migración celular es un proceso fundamental en la vida del organismo. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la migración celular conduce a cambios en la formación de tejidos en el proceso de gastrulación. También participa en la formación del sistema nervioso, donde células de la cresta neural deben migrar a través del embrión (Kulesa y Fraser, 2000). Además, en la respuesta inmune, los leucocitos suelen seguir a bacterias invasoras u otros patógenos y migran a sitios de inflamación (Madri y Graesser, 2000). Los fibroblastos migran al sitio de la herida, contribuyendo de esta manera a su cierre (Midwood y cols., 2004). En el proceso de

angiogénesis se requiere de la migración de células endoteliales (Daniel y Abrahamson, 2000). Por otro lado, la migración de células epiteliales constituye un mecanismo de reparación rápido cuando deben cerrarse heridas en la capa epitelial, que ocurren con frecuencia en el tracto gastrointestinal (Allen y cols., 1993), en el tracto respiratorio (Zahm y cols., 1997), o en el riñón después de una insuficiencia renal aguda (Kartha y Toback, 1992).

Si bien la migración celular juega un rol muy importante en la fisiología, su desregulación puede generar una variedad de patologías tales como, enfermedades vasculares como aterosclerosis, que involucra células migrantes del músculo liso (Louis y Zahradka, 2010), osteoporosis, enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide y esclerosis múltiple (Ridley y cols., 2003) y metástasis del cáncer (Yamaguchi y cols., 2005).

La metástasis es la diseminación de las células cancerígenas del tumor primario a un órgano distante. Además, es la primera causa de muerte en pacientes con cáncer (Devita, V. y cols 1975). Así, la metástasis es el evento más amenazante para la vida en pacientes con cáncer. El proceso se compone de una serie de eventos secuenciales que deben completarse para que la célula tumoral haga metástasis con éxito. Primero ocurre la pérdida de adherencia celular lo cual permite a la célula tumoral disociarse del tumor primario. Segundo, mediante la liberación de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular ocurre la intravasación a vasos sanguíneos o linfático. Luego la célula tumoral disemina por el vaso hacia el órgano blanco. Al llegar al órgano ocurre una extravasación hacia el tejido del órgano blanco donde coloniza y prolifera el tumor. Así, si no ocurriera la pérdida de adherencia, nunca ocurriría el proceso de metástasis

(Martin, T.A. y cols 2013). Luego, la comprensión de su mecanismo cobra una especial importancia y es de gran interés para su uso como blanco terapéutico.

Adhesión celular

La adhesión celular se conoce como la interacción de la célula con la matriz extracelular (ECM). Esta interacción estimula el agrupamiento de integrinas y la formación de pequeños complejos focales, focos iniciales de la adhesión celular. Estos procesos son seguidos generalmente por la formación de adhesiones focales (FAs) más largas y estables, que facilitan el “*cell spreading*” y el fortalecimiento de la unión a la ECM.

La etapa inicial de adherencia de la célula y la formación de los complejos de adhesión están asociadas con la activación de Rho GTPasa, Rac y Cdc42. Estas a su vez estimulan la polimerización de actina y el alargamiento del lamelipodio y filopodio.

Luego el ensamblaje de fibras de estrés y FAs maduras es modulado por efectores bajo la activación de RhoA, tales como mDia1/2 y kinasas asociadas a Rho (ROCK). Además la contracción inducida por Rho contribuye a la transmisión de la tensión a las adhesiones focales, promoviendo la motilidad celular.

La etapa final del ciclo de movimiento celular contempla la interrupción de la interacción de las integrinas con la ECM, el desprendimiento de la célula con el sustrato y la retracción celular. El Desensamblaje de FAs, el “*sliding*” de las FAs, y la contracción celular son posibles procesos que modulan el movimiento y contractilidad celular. La pérdida de adhesiones desde la parte distal de la célula y el reclutamiento de nuevas adhesiones en la parte proximal crea una suerte de deslizamiento celular. Este proceso se ha descrito como la renovación dinámica polarizada y representa el

rápido proceso de ensamblaje y desensamblaje de FAs. Entonces, la pérdida de adherencia de la célula es una consecuencia de los eventos combinados de renovación polarizada, ensamblaje y desensamblaje de FAs y la contracción celular. (Parsons, T, y col, 2010). Estudios recientes han demostrado que el desensamblaje de FAs es afectado por un canal TRP (Cáceres. M y col, 2015).

Canales TRP

Los miembros de la superfamilia de canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) son canales catiónicos que actúan como sensores en la mayoría de los tipos celulares. Los canales TRP se encuentran expresados en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. La mayoría de estos canales son permeables a Ca^{2+} . En consecuencia, contribuyen en la regulación de diversos procesos fisiológicos, dependientes del catión tales como la transcripción de genes y la muerte celular. (Venkatachalam, K., & Montell, C, 2007).

Cada subunidad de los canales TRP está compuesta por seis segmentos transmembrana (S1-6). Además, entre el quinto y el sexto segmento se encuentra su poro. También posee segmentos intracelulares amino-terminal y carboxilo-terminal los cuales son fundamentales para la regulación, modulación de función y tráfico de los canales (Nillus, 2007).

Los canales TRP pueden clasificarse en 7 subfamilias: TRPC (*Canonical*), TRPV (*Vanilloid*), TRPM (*Melastatin*) TRPP (*Polycystin*), TRPML (*Mucolipin*), TRPA (*Ankyrin*) y la subfamilia TRPN presente únicamente en invertebrados (Figura 1) (Venkatachalam & Montell 2007).

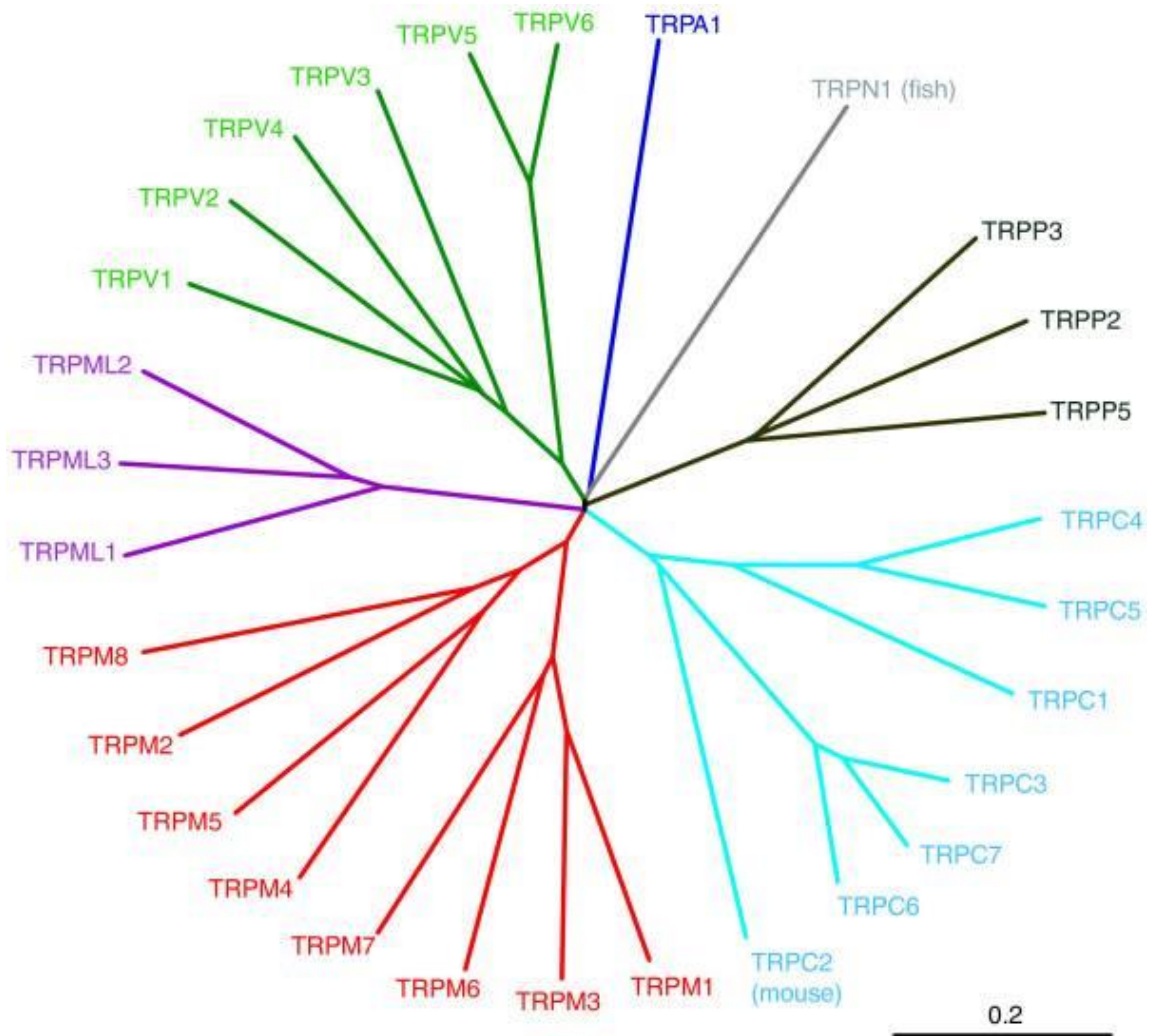


Figura 1. La superfamilia de canales TRP (obtenido de Nilius y Owsianik, 2011)

Recientemente, se ha demostrado que los canales TRP juegan un rol importante en la patogénesis de diversas enfermedades humanas. Tales como degeneración de retina, estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas, hipomagnesemia, policistitis renal, mucopolipidosis, dolor neuropático e inflamatorio y cáncer. (Nilius y col., 2007; Lehen'kyi & Prevarskaya 2011). Más aún, los canales TRP estarían asociados a la migración de células cancerígenas. (Fiore Pla, A., & Gkika, D.

2013). En particular, el canal TRPM4, perteneciente a la subfamilia TRPM y relacionado con la migración de diversas células (Cáceres, M. y col, 2015; Barbet, G y cols 2008; Sarmiento, D. y cols 2015; Shimizu, D. y cols 2009), modula la invasión de células de melanoma (Morales y col. En preparación).

Subfamilia TRPM

La subfamilia TRPM consta de 8 miembros, los cuales comparten alrededor de un 20% de identidad en sus secuencia aminoacídica con los canales TRPC. Los canales TRPM tienen dominios conservados TRP en su región C-terminal y un dominio coiled-coil que podría estar participando en la asociación de diferentes TRPM en multímeros. El total de aminoácidos y secuencias de la región C-terminal de esta proteína varían considerablemente (Venkatachalam & Montell 2007). Basado en la similitud de las secuencias aminoacídicas, esta subfamilia se agrupa como TRPM1/3, TRPM4/5, y TRPM6/7. TRPM2 y TRPM8 no están asociados con ningún subgrupo.

Los canales de esta familia tienen patrones de expresión específicos, selectividad iónica, *gating* y mecanismos de regulación los cuales están adaptados para integrar múltiples vías de señalización. Dentro de la subfamilia existen individuos permeables a iones monovalentes como Ca^{2+} (TRPM2/8) y Mg^{2+} (TRPM6/7), además existen otros permeables a cationes monovalentes tales como TRPM4 y TRPM5. (Fleig y Penner 2004).

TRPM4

Dentro de la familia TRPM, se encuentra el receptor de potencial transitorio melastina 4 (TRPM4). TRPM4 es un canal catiónico no selectivo activado por Ca^{2+} que se expresa en varios tejidos humanos tales como músculo esquelético, cerebro,

corazón, pulmón, hígado, placenta, próstata, riñón, tracto gastrointestinal, entre otros (Launay y cols, 2002; Nilius y cols 2004; Nilius y cols 2005). TRPM4 posee 1214 aminoácidos codificado por un gen localizado en el cromosoma 19 del genoma humano (Launay y col., 2002, Nilius y col., 2003). En ratón, está localizado en el cromosoma 7 y codifica una proteína de 1213 aminoácidos (Murakami y col., 2003, Nilius y col., 2003). Existen variantes de splicing del gen TRPM4 encontradas en tejido humano y de ratón. Una corresponde a la variante completa de 1214 aminoácidos denominada TRPM4b, y otra es una variante más corta que carece de los primeros 174 aminoácidos de la región N-terminal llamada TRPM4a (Launay y col., 2002, Nilius y col., 2003). Aunque TRPM4 es impermeable a Ca^{2+} , juega un rol importante en la regulación del Ca^{2+} intracelular en células no excitables, dando a la membrana la despolarización necesaria para el influjo de Ca^{2+} .

TRPM4 juega un rol importante a nivel fisiológico, se ha demostrado que el knockdown de TRPM4 altera las oscilaciones de Ca^{2+} durante la activación de los linfocitos T, llevando a una falla en la secreción de interleucina-2 (Launay, 2014). Además el knock-out de TRPM4 en ratones genera una gran pérdida tanto en la migración de células dendríticas como en la migración de los mastocitos. (Shimizu, 2009; Vennekens, 2007). TRPM4 también ha sido asociado al flujo sanguíneo cerebral y la secreción de insulina de las células pancreáticas- β (Marigo 2009; Stroke 2007). Está involucrado en la regulación de la vasoconstricción miogénica (Earley y col., 2004), muerte y proliferación celular (Armisen y col., 2011), células cebadas (Shimizu y col., 2009) y fibroblastos embrionarios de ratón (Cáceres y col., 2015).

La ganancia de función del canal TRPM4, que se debe a la sobreexpresión del canal en membrana, se ha visto asociadas a numerosas patologías (Gerzanich y cols,

2009; Kruse y cols, 2014; Kruse y cols, 2009; Liu y cols, 2013; Liu y cols, 2010; Schattling y cols, 2012). Por ejemplo, la ganancia de función se ha visto asociada a enfermedades cardíacas e hipertensión (Kruse y cols, 2014; Kruse y cols, 2009; Stallmeyer, 2012). También, 15 mutaciones en el canal han sido asociadas a enfermedades cardiovasculares, de las cuales seis de ellas generan una ganancia de función de TRPM4. También una mutación de sustitución de un aminoácido, E7K (TRPM4^{E7K}), genera un desarrollo en la arritmia familiar progresiva de corazón de tipo de bloqueo I (PFHBI), debido a un incremento en la actividad del canal. La versión mutante TRPM4^{E7K}, presenta propiedades biofísicas idénticas al canal silvestre, sin embargo, su expresión en la membrana plasmática está incrementada, al compararlo con el canal *wild type* (Kruse y col., 2009). Además, se ha observado que el canal TRPM4 a causa de daño en la medula espinal, aumenta su expresión en células endoteliales vasculares, teniendo un rol crítico en la fragmentación capilar, formación de hemorragia petequeal y hemorragia secundaria. (Gerzanich y col., 2009).

Por otra parte, el incremento de su expresión se ha visto relacionado con patologías donde se ven alterados el rearrreglo del citoesqueleto y la migración celular, tales como fibrosis y cáncer. Se demostró que el canal TRPM4 está asociado en la transdiferenciación mesenquimática endotelial, sugiriendo un rol del canal TRPM4 durante el desarrollo de fibrosis. (Echeverría, C y cols, 2015). También se ha visto un incremento mRNA de TRPM4 en cáncer de próstata (Ashida, S y cols., 2004; Liu, P y cols 2006; Singh, J., y cols 2006), y en cáncer cervico uterino (Suguro, M, y cols, 2006). Por otra parte, se ha descrito que el canal TRPM4 es esencial para el proceso de migración de células dendríticas, que es un importante mecanismo para la respuesta inmune (Barbet, G y cols, 2008). También se ha descrito que regula la

migración en mastocitos (Shimizu, D. y cols, 2009) y que es un factor importante en promover la migración de células del endotelio vascular (Sarmiento, D y cols, 2015) y migración de fibroblastos (Cáceres, M. y cols, 2015).

Resultados de nuestro laboratorio, han demostrado por espectrometría de masa que el canal TRPM4 interacciona con alrededor de 124 proteínas, de las cuales 20 son proteínas asociadas a citoesqueleto y 8 relacionadas con FA, sugiriendo que el canal en un componente intrínseco de adhesiones focales. Adicionalmente, la supresión del canal TRPM4 en fibroblastos embrionarios de ratón impacta en el recambio de FA, en el influjo de Ca^{2+} inducido por suero, en la actividad de FAK (Focal adhesión kinase) y en la actividad de Rac, afectando directamente a la regulación del mecanismo de migración celular. Conjuntamente, se ha demostrado que el canal TRPM4 localiza en los complejos de FAs, regulando el Ca^{2+} intracelular y el recambio de FAs (Cáceres y col., 2015). También se ha visto que el silenciamiento de TRPM4 disminuye la invasión celular de células de melanoma, tanto en ensayos *in vitro* como en modelo murino *in vivo*, producto del reordenamiento del citoesqueleto de actina vía activación de cofilina (Morales y col. En preparación). Teniendo en cuenta la importancia del canal TRPM4 en los diversos procesos mencionados anteriormente, resulta de gran interés el estudio de sus mecanismos de regulación del tráfico y actividad. Análisis preliminares de nuestro laboratorio han puesto en evidencia que el canal TRPM4 interacciona con un grupo de proteínas denominadas End Binding. Esta interacción es un potencial candidato como blanco terapéutico para patologías asociadas a la ganancia de función del canal TRPM4, entre estas, la migración en el cáncer.

End Binding Proteins (EBs)

Las proteínas End Binding (EB), miembros de la familia RP/EB, son elementos centrales en la dinámica del tráfico de proteínas. Existen 3 tipos de proteína, EB1, EB2 y EB3, codificados por genes separados. Estas pequeñas proteínas (~35 kD), se unen específicamente al extremo creciente del microtúbulo (MT). Las proteínas EB están involucradas en la regulación de las dinámicas de los microtúbulos, así como también en el reclutamiento de diferentes proteínas al cono de crecimiento. Estas proteínas se encuentran expresadas en gran cantidad en mamíferos y están envueltas en una gran cantidad de procesos tales como ciclo celular, diferenciación, tráfico de proteínas y migración celular. Por otra parte se ha visto un aumento en la expresión de EBs en distintos tipos de cáncer, y la sobreexpresión promueve el crecimiento tumoral. Estudios recientes han determinado que EB2 tiene un papel esencial en la regulación de las dinámicas de adhesiones focales y en la migración celular (Yue y col., 2014, Liu y col., 2015).

Se ha descrito que las proteínas EB interactúan con diferentes proteínas mediante un motivo conservado 'Ser/Thr-x-Ile-Pro' (S/TxIP). El motivo conservado S/TxIP permite la unión de proteínas a EBs mediante un bolsillo hidrofóbico, ubicado en el C-terminal, formado por el dímero de proteínas EB. Dentro de este motivo, los aminoácidos Isoleucina y Prolina ubicados en los residuos 3 y 4 del motivo "SxIP", participan en la interacción hidrofóbica con las proteínas EB, siendo estos los más conservados e importantes. Además, el motivo "SxIP" está frecuentemente rodeado por aminoácidos bases como arginina y lisina. Estos aminoácidos sirven como estabilizadores de la interacción entre proteínas EB y proteínas blancas.

Recientemente se ha demostrado el rol de las proteínas EB en la regulación del tráfico y localización de distintos canales iónicos. Por ejemplo, EB1 interactúa con STIM1, una proteína transmembrana de retículo, que es esencial en la regulación de la entrada de Ca^{2+} , mediante la activación de Orai1, ubicado en la membrana plasmática (Grigoriev y col., 2008, Park y col., 2009). EB1 ha sido también descrita como una proteína regulatoria requerida para el tráfico axonal de los canales Kv1.2, mediante su interacción con la subunidad auxiliar Kv β 2 (Gu y col., 2006, Gu & Gu 2010, Vacher y col., 2011). EB1 está también involucrada en el tráfico de desmoplaquinas y la entrega de conexina 43 (Cx43) a las funciones adherentes en cardiomiocitos (Smyth y col., 2010). EB3 también interactúa con el receptor de IP_3 controlando su “clustering”, y señales de Ca^{2+} , bajo la estimulación de α -trombina en células endoteliales (Geyer y col., 2015). EB1 y EB2 regulan la localización y asociación de ACF7 y MAP4K4, afectando el desensamblaje de adhesiones focales (Yue y col., 2014). Por otra parte, se ha reportado que EB2 interacciona con Hax1; proteína que regula el citoesqueleto de actina, dinámicas de adhesión celular y migración celular; y que esta interacción es importante para el recambio de las adhesiones focales y el movimiento celular (Liu y col., 2015)

En nuestro laboratorio, mediante análisis bioinformático de la secuencia primaria de TRPM4 se logró identificar un motivo de interacción “SxIP” con las proteínas EBs entre los residuos Ser9 a Pro12 (⁹SWIP¹²). Además se encontraron varios residuos básicos cerca del motivo “SxIP”. Por lo que se propone que el canal TRPM4 posee un motivo “SxIP” de unión a proteínas EBs. Específicamente el motivo “SWIP”, ubicado en el extremo amino-terminal, que regula el tráfico de los canales desde el retículo hacia el aparato de Golgi y membrana plasmática. En nuestro

laboratorio se demostró, mediante *pull down*, la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas EBs (Figura 2). Es por esto que la interacción entre TRPM4 y las proteínas EBs, es un blanco terapéutico para patologías donde exista ganancia de función del canal TRPM4.

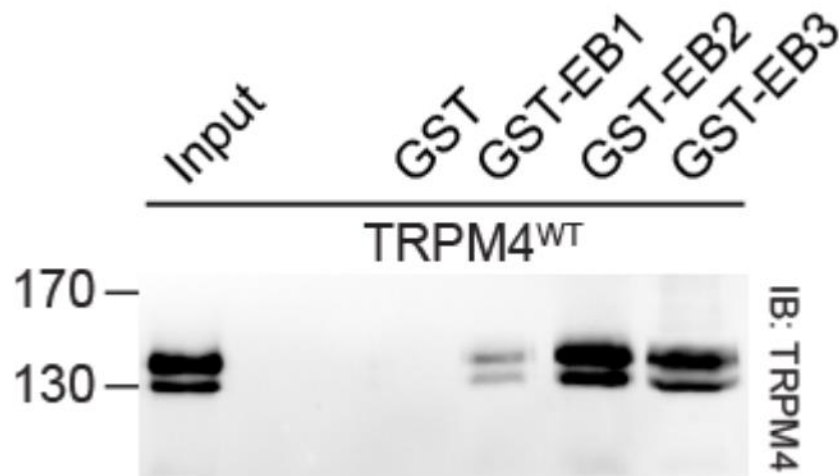


Figura 2. Validación de la interacción entre en canal TRPM4 y las proteínas EBs. Imagen representativa de un ensayo pulldown realizado en lisado de célula TReX293-TRPM4 usando como cebo de la columna GST, GST-EB1, GST-EB2, GST-EB3. (Obtenido de Blanco, C. En preparación)

Péptidos penetrantes

Existe una gran iniciativa para desarrollar nuevas y más eficientes formas de entregar drogas a los pacientes. En el corto periodo se han generado nuevas tecnologías para mejorar la asociación de compuestos terapéuticos en células (Opalinska and Gewirtz, 2002; Järver and Langel, 2004; Glover et al., 2005; Torchilin,

2005; De Fougerolles et al., 2007; Kong and Mooney, 2007). En particular, una serie de estrategias no virales se han propuesto tales como incluir lípidos, policationicos, nanopartículas y formulaciones basadas en péptidos (Morris et al., 2000; Ogris and Wagner, 2002; Järver and Langel, 2004; Torchilin, 2005), pero solo unas pocas de estas tecnologías son eficientemente aplicadas *in vivo* a niveles pre-clínicos o clínicos. Los péptidos permeables (CPPs) corresponden a secuencias pequeñas de 30 aminoácidos y son parte de la estrategia para superar las limitaciones extracelulares e intracelulares de incluir biomoléculas tales como DNA, oligonucleótidos, siRNA, péptido ácido nucleico (PNA), proteínas, péptidos y liposomas. Los CPPs pueden desencadenar el ingreso de un cargo a través de la membrana celular hacia el citoplasma de las células, mejorando la ruta de ingreso y facilitando la interacción con el blanco final. (Derossi y col., 1994; Fawell y col., 1994; Pooga y col., 1998; Wender y col., 2000; Deshayes y col 2005; Meade and Dowdy, 2007; Morris y col., 2008).

En 1988, Frankel y Pabo, mostraron que la proteína trans-activadora TAT del VIH-1 pudo entrar a las células y translocar al núcleo (Frankel and Pabo, 1988). En una primera instancia, se demostró que sólo una porción de los 86 aminoácidos que conforman la proteína era necesaria para entrar a la célula (Green & Loewenstein 1988). Estudios posteriores afirmaron que sólo los aminoácidos 48 al 57 de la estructura primaria de la proteína TAT eran esenciales para la translocación (Vivés y col., 1997). El segundo péptido identificado fue penetratina que entra naturalmente a las células y regula su morfogénesis (Vasconcelos y col., 2013).

La habilidad para introducir drogas y otras biomoléculas activas dentro de la célula permite la investigación del potencial uso de los CPPs como terapia. Un gran número de estudios preclínicos han reportado el éxito del uso de complejos de CPPs

asociados a cargos terapéuticos contra el cáncer, distrofia muscular, cardiologías, enfermedades antiprionicas e infecciones virales y bacterianas.

En la última década se han usado los CPPs para el tratamiento de cáncer, que dirigen bajas concentraciones de drogas toxicas contra tejidos específicos tales como tumores, corazón, etc. También pequeñas moléculas quimioterapéuticas han sido llevadas como cargos por CPPs tales como doxorubicina, metotrexato, ciclosporina A y paclitaxel.

A modo de resumen, análisis bioinformáticos de la estructura primaria de TRPM4 han permitido identificar un motivo de interacción 'SWIP' con las proteínas EBs, localizado en la región amino terminal del canal. Además, en nuestro laboratorio se han realizado ensayos de inmunoprecipitación y pull down que confirman esta interacción. También la delección y mutación puntual del motivo 'SWIP' en el N-terminal del canal TRPM4 afectan la localización y actividad del canal. De acuerdo a esto, las proteínas EBs estarían participando en el tráfico y exportación del canal TRPM4 a la membrana plasmática, modulando su actividad en la célula. Por su parte, dado que el aumento en la expresión de TRPM4 está asociado con diversos estados fisiopatológicos, resulta relevante evaluar nuevos blancos terapéuticos y uso de drogas que interfieran con este mecanismo. Específicamente, cobra importancia determinar si la competición de la interacción TRPM4-EB mediante el uso del péptido competitivo TAT-N-TRPM4^{WT} afecta el tamaño, el número y la tasa de desensamblaje de FAs; y en consecuencia a la invasión celular causante de la metástasis. Sin embargo, esto no ha sido estudiado aún.

Hipótesis

Dado que el aumento de la expresión del canal TRPM4 está asociado a distintos estados fisiopatológicos, además de regular las dinámicas de desensamblaje de adhesiones focales y también de encontrarse asociado al mecanismo de migración de células cancerígenas, resulta de gran importancia investigar posibles fármacos y/o terapias que disminuyan la expresión del canal TRPM4. En nuestro laboratorio se ha identificado mediante análisis bioinformáticos de la estructura primaria de TRPM4 un motivo de unión “SWIP” del canal TRPM4 con las proteínas EBs, localizado específicamente en el extremo amino terminal del canal. Además se ha confirmado esta interacción mediante ensayos de inmunoprecipitación y *pulldown*. También se ha visto que una delección del motivo “SWIP” del canal TRPM4 estaría afectando tanto a la localización como actividad del canal. La evidencia anterior sugiere que las proteínas EBs, estarían regulando la exportación del canal TRPM4 hacia la membrana. En consecuencia se propone que:

“El uso de péptidos competitivos contra la interacción TRPM4-EB disminuye la tasa de desensamblaje de las adhesiones focales y en consecuencia la invasión celular.”

Objetivo general: Evaluar la utilización de péptidos competitivos para la interacción TRPM4 y proteínas EB como inhibidores de la invasión celular.

Objetivos específicos

Objetivo 1.- Determinar el efecto de los péptidos competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs como inhibidores de la migración e

invasión celular. Se emplearán los constructos generados en nuestro laboratorio que contienen el motivo “SWIP” del canal TRPM4 y una proteína EGFP fusionada (EGFP-N-TRPM4^{WT}). Ya que el motivo “SWIP” interacciona con las proteínas EBs, con el uso del constructo se pretende causar un efecto en las dinámicas de las adhesiones focales, provocando una disminución en la invasión y migración celular.

Objetivo 2.- Determinar el efecto de los péptidos penetrantes competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs y su efecto en la distribución de adhesiones focales y en la invasión celular

Se generará un fármaco específico el cual es un péptido competitivo que contiene los primeros 20 aminoácidos del canal TRPM4 dentro de los cuales se encuentra el motivo ⁹SWIP¹², asociado a la secuencia TAT para permitir la penetración directa de los péptidos a las células (TAT-N-TRPM4^{WT}). Además, se sintetizarán dos péptidos más como controles negativos (TAT-N-TRPM4^{ΔSWIP} y TAT-N-TRPM4^{SWNN}).

Se utilizarán los péptidos competitivos TAT-N-TRPM4^{WT}, TAT-N-TRPM4^{ΔSWIP} y TAT-N-TRPM4^{SWNN} contra la interacción TRPM4-EBs y se estudiará su efecto.

Materiales y Métodos

Cultivo celular.

Se trabajó con células A549 y B16-F10, cultivadas a 37 °C y 5% CO₂ en medio DMEM alto en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), respectivamente, suplementadas con suero fetal bovino (SFB) 5% v/v, glutamina 2 mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

Transfección transitoria.

Se preparó el complejo de Lipofectamina LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) en 200 µl de medio RPMI 0%FBS con 1µg de DNA (4 condiciones EGFP, EGFP-N-TRPM4^{WT}, EGFP-N-TRPM4^{ΔSWIP}, EGFP-N-TRPM4^{SWNN}). Posteriormente las células B16-F10 se soltaron usando tripsina. Luego se contaron 200.000 células y se agregaron al complejo de Lipofectamina-DNA. Finalmente se sembraron en placas de 35mm.

Péptidos Permeables.

Se trabajó con 3 péptidos distintos asociados a la secuencia TAT(YGRKKRRQRRR) que contenían los primeros 20 aminoácidos de la estructura primaria del canal TRPM4 (MNVPEKEQSWIPKIFKKKTC) y un epítipo de reconocimiento HA (YPYDVPDYA). Los péptidos permeables denominados TAT-TRPM4^{WT}-HA, TAT-TRPM4^{ΔSWIP}-HA y TAT-TRPM4^{SWNN}-HA se sintetizaron con ayuda de la empresa Pepmic Co., Ltd (China), a través de cromatografía líquida de alto rendimiento. Se alcanzó una pureza superior al 95%. Los péptidos fueron reconstituidos en agua a una concentración de 20 mM y mantenidos a -20°C antes de ser usados.

Inmunofluorescencia.

Se incubaron las células con los péptidos permeables TAT-TRPM4^{WT}-HA, TAT-TRPM4^{ΔSWIP}-HA y TAT-TRPM4^{SWNN}-HA durante 24 horas y se transfectaron las células B16-F10 con los constructos EGFP, EGFP-N-TRPM4^{WT}, EGFP-N-TRPM4^{ΔSWIP}, EGFP-N-TRPM4^{SWNN}. Luego, las células se lavaron con DPBS frío (2,67 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na₂HPO₄·7H₂O) y se fijaron por 15 minutos a 4°C con solución de fijación (4% p/v formaldehído, 4% p/v sacarosa en DPBS pH 7,4). Posteriormente, las células se bloquearon y permeabilizaron con solución de bloqueo (Leche libre de grasas al 4% p/v y 0,1% v/v Tritón X-100 en DPBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células tanto A549 como B16-F10 fueron tratadas con el anticuerpo de ratón IgG1 anti-Vinculin (Sigma). Los anticuerpos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se tiñeron con anticuerpos secundario anti-IgG1 de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (Life technology) para las células A549 y con el fluoróforo Alexa 555 (Life technology) para las células B16-F10, según correspondiera durante una 1 hora a temperatura ambiente. Además las células B16-F10 fueron tratadas con el anticuerpo de ratón anti-EGFP IgG2a. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego el anticuerpo primario IgG2a fue teñido con anticuerpo secundario anti-IgG2a conjugado con el fluoróforo 488 (Life Technology). El anticuerpo secundario fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las células se lavaron 3 veces con DPBS durante 10 minutos. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (200 ng/mL). Finalmente, los cubreobjetos se montaron con el reactivo de montaje ProLong® Gold (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU). Para la adquisición de las imágenes, se empleó un microscopio Spinning Disk. Finalmente, en el análisis y

preparación de las imágenes se utilizó el programa Image J y Adobe Illustrator CC (2017). Los anticuerpos utilizados se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1.- Anticuerpos usados para inmunofluorescencia.

| Anticuerpo | Isotipo | Dilución | Fuente |
|---|----------------|-----------------|-----------------|
| Monoclonal (ratón) anti-Vinculina | IgG1 | 1:200 | Sigma |
| Monoclonal (ratón) anti-EGFP | IgG2a | 1:10 | Life Technology |
| Policlonal (cabra) anti-Ratón IgG1 conjugado con Alexa Fluor 555 | IgG | 1:500 | Life Technology |
| Policlonal (cabra) anti-Ratón IgG1 conjugado con Alexa Fluor 488 | IgG | 1:500 | Life Technology |
| Policlonal (cabra) anti-Ratón IgG2a conjugado con Alexa Fluor 488 | IgG | 1:500 | Life Technology |

Ensayo de cámara transwell

Las células fueron sembradas en las cámaras de transwell (8 μm pore, Corning Costar Corp, Tewksbury, MA, USA). La invasión celular fue inducida agregando medio de cultivo con FBS al 10% v/v en la cámara inferior y sin suero en la cámara superior. Esto generó un gradiente quimio-atrayente, con el cual las células se vieron estimuladas a migrar. Para determinar la capacidad invasora de las células tumorales, fue necesario agregar Matrigel, un mix de proteínas basales de la matriz extracelular (ECM). El mix está compuesto principalmente de lamininas y colágeno IV. Cuando el mix es incubado a 37°C forma una especie de gel semejante en composición a la ECM. Las células que no migraron fueron removidas, y las que migraron fueron fijadas con 0.2% v/v cristal violeta 10% v/v etanol. Las células fijadas se contaron y se expresaron en porcentaje respecto al control.

Dinámica de adhesiones focales.

El proceso de dinámicas de FAs fue estudiado mediante Live-Cell Time-Lapse en células B16-F10 donde se co-transfectó transitoriamente mCherry-Paxillin por un lado, y EGFP o EGFP-N-TRPM4^{WT} o EGFP-N-TRPM4^{ΔSWIP} o EGFP-N-TRPM4^{SWNN} por otro. 48 horas luego de la transfección, las células fueron soltadas sobre cubre objetos incubados con fibronectina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y depletadas por 3 horas con NCZ 10 μM . El desensamblaje de las FAs fue inducido agregando suero 10% v/v en solución Krebs. Las imágenes fueron tomadas cada 30 segundos durante media hora. Las imágenes fueron procesadas usando el servidor Focal Adhesion Analysis Server (FAAS) (Berginski ME, Gomez SM; 2013).

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó t test no pareado. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se considera la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$ (* $p < 0.05$)

Resultados

Efecto de los péptidos competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs como inhibidores de la invasión celular.

El primer objetivo de este trabajo fue probar el constructo generado en nuestro laboratorio que expresa el péptido correspondiente a la secuencia N-terminal del canal TRPM4. El constructo compite con la interacción TRPM4-EBs (EGFP-N-TRPM4^{WT}). Además se generaron dos constructos que actúan como péptidos inactivos o controles. Los cuales corresponden a la misma región N-terminal del canal, pero uno con la delección del motivo “SWIP” (entre el aminoácido 9 y 12) (EGFP-N-TRPM4^{ΔSWIP}) y la otra versión mutante que consiste en una doble sustitución puntual donde los aminoácidos Isoleucina y Prolina del motivo “SWIP” fueron cambiados por asparragina (EGFP-N-TRPM4^{SWNN}). En particular, se buscó determinar cómo afecta el constructo a la invasión celular. Estudios recientes demuestran que la migración e invasión celular requiere una comunicación precisa entre la célula y el medioambiente. Estos procesos son regulados principalmente por las FAs. Las FAs son los sitios principales de comunicación entre las células y la matriz extracelular. Si bien la estructura molecular de los complejos de adhesión focales ha sido bien estudiada (Kanchanawong et al., 2010; Liu et al., 2015), no ha ocurrido así con el estudio del mecanismo de dinámica de FAs. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que el incremento de la actividad del canal TRPM4 estaría afectando el recambio de las FAs, disminuyendo el desensamblaje de éstas. Por esto se quiso estudiar el efecto que tienen los péptidos competitivos sobre la distribución de las adhesiones. Para esto se transfectaron células B16-F10 con el constructo EGFP-N-TRPM4^{WT}. Luego se sembraron en cubre objetos

con fibronectina. Se depletaron durante 3 h con NCZ con el fin de sincronizar el crecimiento de microtúbulos. Finalmente mediante inmunofluorescencia se observó vinculina y se analizaron las adhesiones focales. En estos experimentos, se observó que al transfectar con el constructo EGFP-N-TRPM4^{WT} hay un aumento tanto en el número como en el tamaño promedio de las FAs por célula luego de 45 minutos de lavado del NCZ (figura 3). Esto sugiere que el desensamblaje de las FAs estaría siendo afectado por la competencia del péptido EGFP-N-TRPM4^{WT} en la interacción TRPM4-EBs

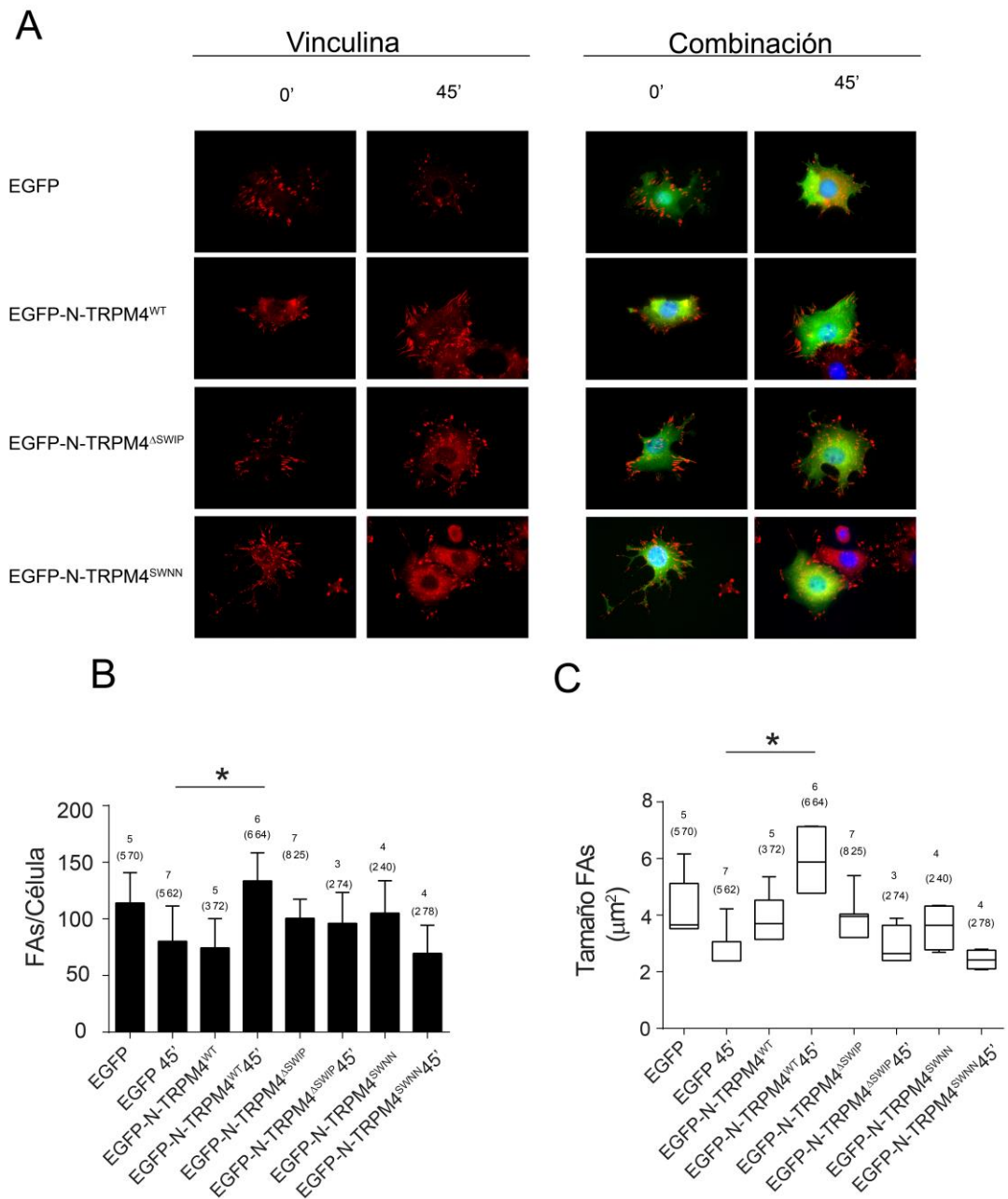


Figura 3. El Péptido EGFP-N-TRPM4^{WT} genera un aumento tanto en el número como en el tamaño de las FAs. A. Células B16-F10 transfectadas transitoriamente con el péptido EGFP-N-TRPM4^{WT} y tratadas con NCZ (10μM) durante 3 h. Se realizó una inmunofluorescencia donde se marcó vinculina (rojo), EGFP (verde) y núcleo (Azul). B. Gráfico representativos del número promedio de adhesiones focales obtenidos en A. C. Gráfico representativo del tamaño promedio de adhesiones focales obtenidas en A. (n=4). La significancia estadística fue analizada por t test no pareado, * p<0,05.

El incremento del tamaño y el número de las FAs sugiere que existe una disminución en la tasa de desensamblaje de estas. Por lo que se realizó un experimento para observar la dinámica de las FAs en time laps (figura 4). Al calcular el promedio de la tasa de desensamblaje de FAs se comprobó que en presencia del péptido competitivo el desensamblaje de las FAs disminuye significativamente con respecto a la versión sin péptido. Las condiciones controles tuvieron un comportamiento parecido a la versión sin péptido. Este resultado reafirma la importancia de la interacción TRPM4-EBs para el desensamblaje de las adhesiones focales.

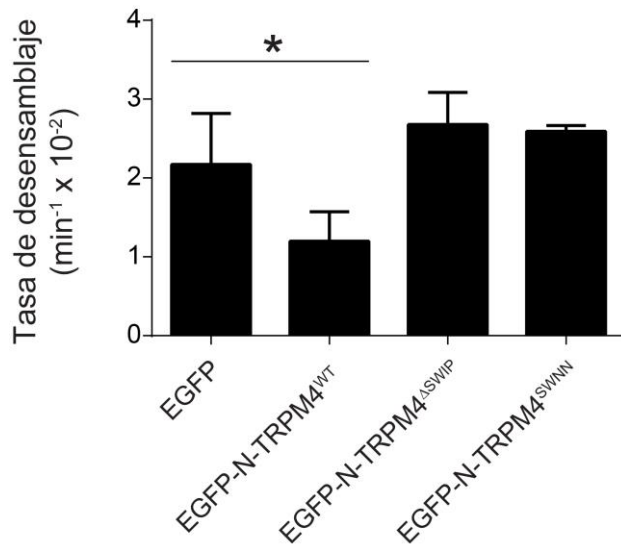


Figura 4. La expresión del péptido EGFP-N-TRPM4^{WT} disminuye la tasa de desensamblaje de las FAs. A. Gráfico representativo de los ensayos de time laps en células B16-F10. (n = 3). La significancia estadística fue analizada por t test no pareado, * p<0,05 EGFP comparada con EGFP-TRPM4^{WT}.

Entonces ya que disminuye la tasa de desensamblaje de las FAs, es de esperar una disminución en la invasión celular. Para corroborar lo anterior se transfectaron células B16-F10 con el constructo EGFP-N-TRPM4^{WT} y se observó la capacidad invasiva de las células mediante ensayos de transwell (figura 5). Se calculó la invasión relativa de las condiciones EGFP-N-TRPM4^{WT}, EGFP-N-TRPM4^{ΔSWIP} y EGFP-N-TRPM4^{SWNN}, considerando EGFP como 100% de invasión. Se determinó que la capacidad invasiva de las células B16-F10 disminuye al transfectar las células con EGFP-N-TRPM4^{WT}. Este resultado sugiere que el péptido estaría compitiendo con la interacción proteína-proteína TRPM4-EBs y causa una disminución en la invasión celular.

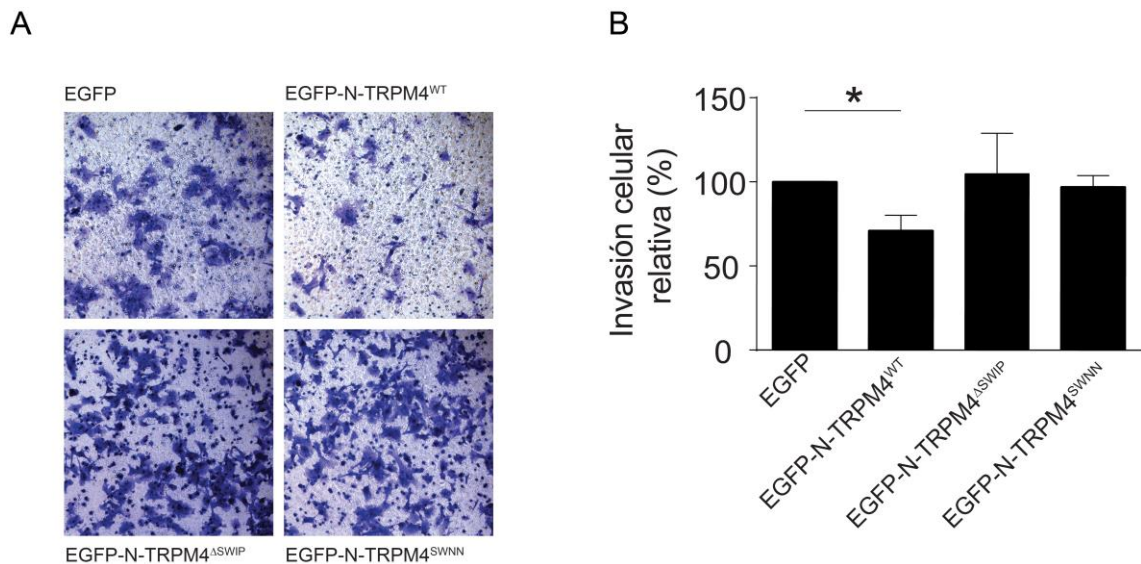


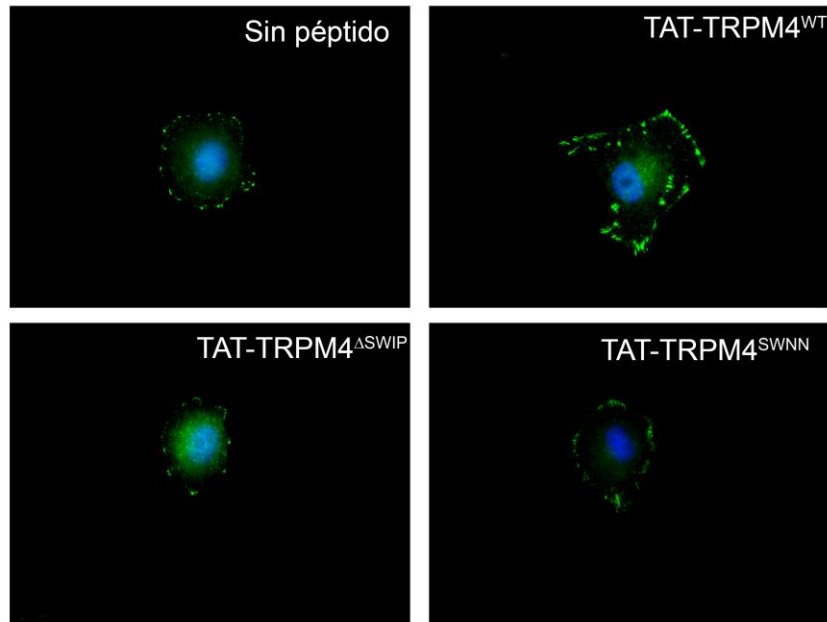
Figura 5. EGFP-N-TRPM4^{WT}, disminuye la invasión celular. A. Ensayo de invasión en cámara transwell de células B16-F10 transfectadas con EGFP-N-TRPM4^{WT}. B. Gráfico representativo de lo obtenido en A (n=3). La significancia estadística fue analizada por t test no pareado, * p<0,05 EGFP comparada con EGFP-TRPM4^{WT}.

Péptidos permeables competitivos contra la interacción entre TRPM4 y proteínas EBs y su efecto como fármaco directo en la migración e invasión celular.

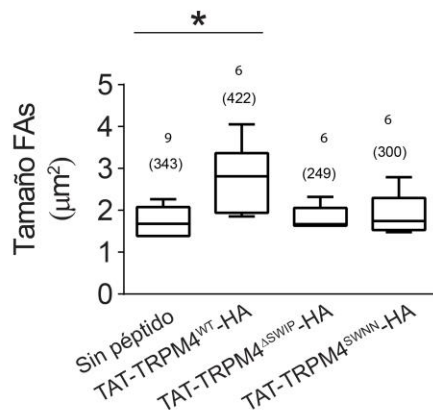
Con el fin de generar un fármaco para competir con la interacción TRPM4-EBs, en nuestro laboratorio se diseñó un péptido permeable capaz de penetrar la célula sin mayores efectos tóxicos. Para esto los primeros 20 aminoácidos de la secuencia del canal TRPM4, dentro de los cuales se encuentra el motivo ⁹SWIP¹², se fusionaron con una secuencia TAT. Esta secuencia permite al péptido ingresar directamente a la célula sin mayores efectos tóxicos en ella. Se emplearon células A549 (Carcinoma de pulmón humano) que presentan una alta expresión del canal TRPM4. Se realizó la incubación del péptido permeable TAT-N-TRPM4^{WT} en células A549. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se observó vinculina, y se determinó que tanto el tamaño como el número de adhesiones focales aumentan (Figura 6B y 6C, respectivamente). Sugiriendo una disminución en el desensamblaje de las FAs. Para apoyar este resultado se realizó un ensayo de invasión en cámara de transwell (figura 7). En el ensayo, las células A549 fueron tratadas con 20 µM del péptido TAT-TRPM4^{WT}. Se observó una disminución de aproximadamente un 25% en la invasión celular relativa. Se sugiere entonces que el péptido permeable TAT-N-TRPM4^{WT} estaría compitiendo con la interacción TRPM4-EBs de forma efectiva, logrando así disminuir la invasión celular.

A

Vinculina-Hoechst



B



C

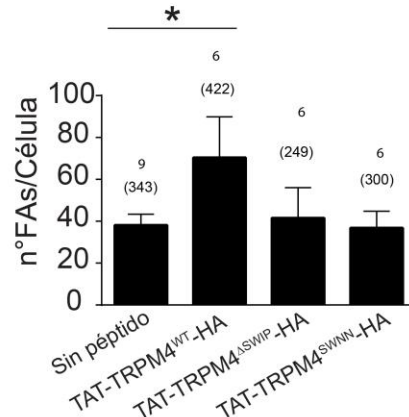


Figura 6. El péptido TAT-TRPM4^{WT} genera un aumento tanto el número como en el tamaño de adhesiones focales. A. Inmunofluorescencia de células A549 tratadas con el péptido permeable TAT-TRPM4^{WT}, TAT-TRPM4^{ASWIP}, TAT-TRPM4^{SWNN}. Las condiciones fueron teñidas con anti-Vinculin (verde) y Hoetsch (azul). B. Gráfico representativos del tamaño de adhesiones focales promedio obtenidos en A. C. o al Gráfico representativo del número de adhesiones focales promedio obtenidas en A. La significancia estadística fue analizada por t test no pareado, * p<0,05 Sin péptido comparada con TAT-TRPM4^{WT}.

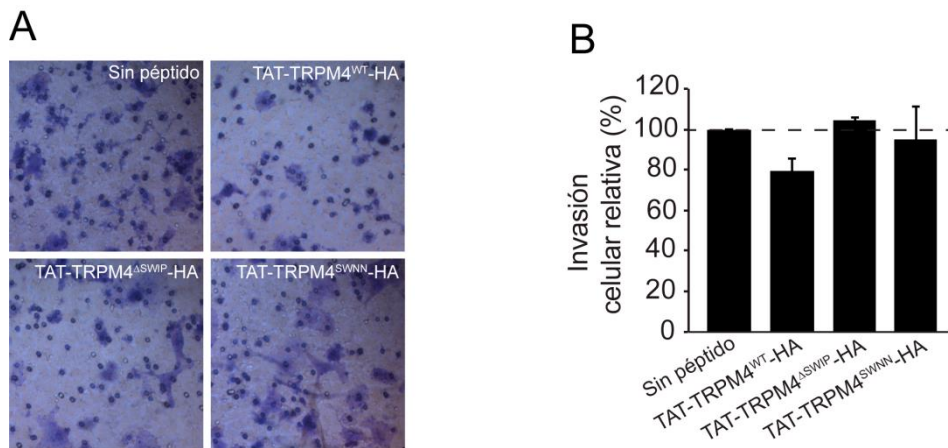


Figura 7. El péptido TAT-N-TRPM4^{WT} reduce la invasión y migración celular en A549. (A) Ensayo de invasión en cámara transwell de células A549 incubadas con 20 μ M del péptido TAT-N-TRPM4^{WT}. B. Gráfico representativo de lo obtenido en A (n=3).

Discusión

La migración y contractilidad celular son procesos fundamentales que están presentes en gran cantidad de eventos fisiológicos y fisiopatológicos tales como reparación de tejidos, respuesta inmune, remodelamiento de tejidos, fibrosis y metástasis del cáncer. Estos procesos están regulados por una gran variedad de mecanismos como el rearreglo de citoesqueleto, el recambio de adhesiones focales (FAs) y las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Ridle y cols 2003, Cáceres y cols 2015). Recientemente, Los canales iónicos han sido estudiados por su participación en la regulación de las dinámicas del citoesqueleto y la mecanotransducción requerida para la migración celular (Fioro Pla, A., & Gkika, D. 2013; Zaidel-Bar, R y cols 2007).

En particular, el canal TRPM4 es un canal catiónico no selectivo activado por Ca^{2+} intracelular e impermeable a Ca^{2+} (Nilius, B., y cols 2005). El canal TRPM4 se encuentra expresado en un extenso rango de tejidos humanos y regula diferentes procesos tales como la muerte y proliferación celular; secreción de insulina, diferenciación de celular T y migración celular. El canal TRPM4 tiene un importante efecto en la regulación de señales intracelulares de Ca^{2+} proporcionando la despolarización necesaria de la membrana para el influjo local de Ca^{2+} .

En particular el canal TRPM4 está asociado a la migración celular. Por ejemplo, se ha visto que el canal TRPM4 regula la migración de las células dendríticas (Barbet y cols., 2008) y la migración de los mastocitos (Shimizu y cols., 2009). Estos efectos son mediados por una regulación del Ca^{2+} intracelular, dependiente del canal TRPM4. Cabe destacar que la regulación del Ca^{2+} es un proceso importante en la señalización asociada a la migración y contractilidad

celular. En este trabajo, se demostró que al utilizar los péptidos competitivos contra la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas EBs, disminuye la invasión y migración celular. Esto ocurre mediante la disminución del desensamblaje de las adhesiones focales. La formación de las adhesiones focales en el frente de la célula, y el desensamblaje en la parte de atrás, es crítica para la migración de muchas células adherentes (Webb, D. J y col. 2002; Sastry, S. K. & Burridge, K. 2000). Por otra parte, los microtúbulos han emergido como candidatos de la estimulación del desensamblaje de las adhesiones focales (Kaverina, I. y col 1999; Small, J. y col, 2002).

En nuestro laboratorio se demostró mediante ensayos de inmunoprecipitación y pulldown la interacción entre el canal TRPM4 y las proteínas EBs, mediante el motivo "SWIP". Con el fin de mediar la expresión y actividad del canal TRPM4, en nuestro laboratorio se generó un péptido competitivo EGFP-N-TRPM4^{WT}, el cual compite con la interacción EBs-TRPM4, afectando la actividad y expresión del canal TRPM4 (Blanco, C. y col. En preparación). El knockdown del canal TRPM4, disminuye la tasa de desensamblaje de las FAs y la invasión celular (Cáceres M. y col 2015). A diferencia del knockdown del canal TRPM4, la competición inhibe el tráfico y la actividad del canal (Blanco y Col. En preparación) posicionándolo como un potencial blanco terapéutico. En consecuencia, cobra importancia determinar si la competición de la interacción TRPM4-EB mediante el uso del péptido competitivo EGFP-N-TRPM4^{WT}, afecta la actividad y la expresión del canal TRPM4, en el tamaño, el número, la tasa de desensamblaje y la invasión celular. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el canal TRPM4 normalmente se encuentra localizado en la membrana plasmática. Sin embargo, al utilizar el

péptido competitivo EGFP-N-TRPM4^{WT} se puede apreciar un cambio en la localización subcelular del canal. La distribución del canal es más citoplasmática y disminuye su presencia en membrana (Blanco, C. y col. En preparación). En el presente trabajo, se observó que en presencia del péptido competitivo EGFP-N-TRPM4^{WT} aumenta el área y el tamaño de FAs. Este aumento podría estar relacionado con una disminución en la tasa de desensamblaje de las FAs, por lo que se decidió realizar un experimento de desensamblaje de FAs. A partir de los resultados del experimento de desensamblaje se determinó que la competencia de la interacción TRPM4-EBs con el péptido EGFP-N-TRPM4^{WT} genera efectivamente una disminución en la tasa de desensamblaje de las FAs.

Al observar por un lado, que el desensamblaje de las FAs disminuye en presencia del péptido competitivo y considerando por otro lado el antecedente que la migración de células está relacionada directamente con la dinámica de las FAs (Wehrle-Haller, B., & Imhof, B. A. 2003), se propuso realizar ensayos de invasión celular *in vitro*, en presencia del péptido competitivo y se observó una disminución cerca de un 40% de la invasión celular relativa. Esto demuestra que efectivamente el péptido competitivo está disminuyendo la invasión celular a través de la disminución de la dinámica de las FAs.

Con el fin de generar un fármaco de fácil penetración y poca toxicidad celular para disminuir la migración de las células cancerígenas, se diseñó un péptido el cual contiene los primeros 40 aminoácidos del amino terminal del canal TRPM4, donde se encuentra el motivo "SWIP", que es el motivo de unión de la interacción TRPM4-EBs. Además se encuentra fusionada una secuencia TAT, la cual permite el ingreso del péptido sin mayores efectos tóxicos para la célula. Se determinó que utilizando una

concentración de 20 μ M del péptido TAT-TRPM4^{WT}, se genera un cambio en la distribución del canal TRPM4 (Blanco, C. y col. En preparación). Considerando lo mencionado anteriormente, se propuso utilizar el péptido TAT, y estudiar los mismos parámetros que con el péptido EGFP-N-TRPM4^{WT}. Se pudo observar que afecta a la distribución de las adhesiones focales, y también disminuye cerca de un 25% la migración celular.

Recientemente, se ha caracterizado estructuralmente TRPM4. Se ha visto que el canal está constituido principalmente por un dominio transmembrana y otro soluble, sin embargo algunas estructuras alejadas del dominio transmembrana no se logran determinar con una buena resolución, esto debido a la gran movilidad que existe en estas estructuras. Se divide primordialmente en tres niveles, el nivel inferior, donde se encuentra el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, los cuales sirven para la tetramerización del canal. Luego el nivel medio, que consiste en secuencias múltiples hélices (LHD1-LHD12), que sirven como link de unión entre el nivel inferior y superior. Y el nivel superior, que está constituido por seis dominios transmembrana (S1-S6), y un dominio adicional entre el segmento S1-S4 una característica que podría ser distinta a la subfamilia TRPM, cabe destacar que el C-terminal de cada subunidad se juntan formando un coiled-coil que está rodeado por un gran dominio entrelazado comprendido por cuatro sub unidades amino-terminal del canal TRPM4. (Autzen, H. y cols, 2018). La región amino-terminal estaría jugando un papel importante tanto en el ensamblaje del canal como en la actividad de este, como por ejemplo que las uniones de ATP en bolsillos específicos en el dominio amino terminal de cada sub-unidad del canal TRPM4, rodeado de aminoácidos básicos que estabilizan la interacción, estarían afectando a la

tetramerización del canal, modulando su actividad. (Guo, J., y cols 2017), Además se ha visto que existe un bolsillo de unión a decavanato en la región amino-terminal del canal TRPM4, lo que sugiere un rol de sensor de estímulos externos. Además se observó una interacción polar entre los aminoácidos S120 y E254, que al parecer, en el canal TRPM6 una disrupción en esta interacción, causa un problema en la tetramerización del canal, lo que sugiere que esta interacción en la región amino terminal del canal TRPM4, estaría jugando un papel importante en el ensamblaje del canal. (Winkler, P. A, y cols 2017). El motivo “SWIP” de interacción del canal TRPM4 con las proteínas EBs, se encuentra entre los aminoácidos 9 y 12 del N-terminal, y se ha asociado con el tráfico del canal hacia la membrana, La disrupción de esta interacción estaría afectando tanto la expresión como actividad del canal TRPM4. (Blanco C. y col. En preparación). Esto sugiere que la región-amino terminal estaría jugando un rol importante tanto en la expresión, tráfico, tetramerización y actividad del canal. Lo que lleva a que la región amino terminal del canal TRPM4 resulte de gran interés para estudios asociados a patologías involucradas en la ganancia de función del canal TRPM4, debido a un aumento en la expresión del canal en membrana.

El efecto que genera el péptido competitivo TAT-TRPM4^{WT} sobre la interacción TRPM4-EBs, es sobre líneas celulares, donde no se comportan como un organismo vivo. Dado esto, es importante estudiar el efecto de los péptidos competitivos en modelos in vivo o modelos animales para seguir avanzando con la investigación y que estos péptidos puedan ser ocupados en pacientes con patologías asociadas a una ganancia de función del canal TRPM4, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, patologías cardiovasculares, entre otras.

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- El péptido generado EGFP-N-TRPM4^{WT}, disminuye la tasa de desensamblaje de las FAs, y en consecuencia la invasión celular. Esto valida la hipótesis de trabajo.
- La interacción TRPM4-EBs, se presenta como un blanco terapéutico contra patologías asociadas a una ganancia de función del canal TRPM4.
- A modo de generar un fármaco, se generó un péptido penetrante TAT-TRPM4^{WT}, que afecta la distribución de las FAs y disminuyendo el proceso de invasión celular.

Bibliografía

Allen, A., Flemström, G., Garner, A., y Kivilaakso, E. "Gastroduodenal mucosal protection". *Physiological Reviews*, 73.4, 823-857, 1993.

Armisen, R., Marcelain, K., Simon, F., Tapia, J. C., Toro, J., Quest, A. F., & Stutzin, A. (2011). TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 103-109.

Ashida, S., Nakagawa, H., Katagiri, T., Furihata, M., Iizumi, M., Anazawa, Y., ... & Fujioka, T. (2004). Molecular Features of the Transition from Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) to Prostate Cancer. *Cancer Research*, 64(17), 5963-5972.

Autzen, H. E., Myasnikov, A. G., Campbell, M. G., Asarnow, D., Julius, D., & Cheng, Y. (2018). Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc. *Science*, 359(6372), 228-232.

Barbet, G., Demion, M., Moura, I. C., Serafini, N., Léger, T., Vrtovsniak, F., ... & Launay, P. (2008). The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nature immunology*, 9(10), 1148-1156.

Berginski ME, Gomez SM. (2013) The Focal Adhesion Analysis Server: a web tool for analyzing focal adhesion dynamics [v1; ref status: indexed, <http://f1000r.es/yc>] *F1000Research* 2013, 2:68 (doi: 10.3410/f1000research.2-68.v1)

Brooks, J., Watson, A., & Korcsmaros, T. (2017). Omics approaches to identify potential biomarkers of inflammatory diseases in the focal adhesion complex. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(2), 101-109.

Cáceres, M., Ortiz, L., Recabarren, T., Romero, A., Colombo, A., Leiva-Salcedo, E., ... & Campusano, C. (2015). TRPM4 is a novel component of the adhesome required for focal adhesion disassembly, migration and contractility. *PLoS one*, 10(6), e0130540.

Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends in Cell Biology*, 14(5), 241-249.

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.

Daniel, T. O., y Abrahamson, D. "Endothelial signal integration in vascular assembly". *Annual Reviews of Physiology* 62.1: 649-671, 2000.

Devita, V. T., Young, R. C., & Canellos, G. P. (1975). Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer*, 35(1), 98-110.

Echeverría, C., Montorfano, I., Cabello-Verrugio, C., Armisen, R., Varela, D., & Simon, F. (2015). Suppression of transient receptor potential melastatin 4 expression promotes conversion of endothelial cells into fibroblasts via transforming growth factor/activin receptor-like kinase 5 pathway. *Journal of Hypertension*, 33(5), 981-992.

Fioro Pla, A., & Gkika, D. (2013). Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Frontiers in Physiology*, 4, 311.

Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-1193.

- Gerzanich, V., Woo, S. K., Vennekens, R., Tsybalyuk, O., Ivanova, S., Ivanov, A., ... & Freichel, M. (2009). De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nature Medicine*, 15(2), 185-191.
- Guo, J., She, J., Zeng, W., Chen, Q., Bai, X. C., & Jiang, Y. (2017). Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4. *Nature*, 552(7684), 205.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Vol. 507). Sunderland, MA: Sinauer.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323), 580-584.
- Kartha, S., y Toback, F. G. "Adenine nucleotides stimulate migration in wounded cultures of kidney epithelial cells". *Journal of Clinical Investigation* 90.1: 288, 1992.
- Kruse, M., & Pongs, O. (2014). TRPM4 channels in the cardiovascular system. *Current opinion in pharmacology*, 15, 68-73.
- Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G., ... & Pongs, O. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2737.
- Kulesa, P. M., y Fraser, S. E. "In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches". *Development* 127.6: 1161-1172, 2000.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Kinet, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109(3), 397-407.
- Lehen'kyi, V.Y. y Prevarskaya, N. 2011. Oncogenic TRP channels. En Md. Shahidul Islam (ed). *Transient Receptor Potential Channels*. pp. 929-945. Springer Netherlands, Uppsala, Suecia
- Liu, H., Chatel, S., Simard, C., Syam, N., Salle, L., Probst, V., ... & Schott, J. J. (2013). Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel. *PLoS one*, 8(1), e54131.
- Liu, H., El Zein, L., Kruse, M., Guinamard, R., Beckmann, A., Bozio, A., ... & Villain, E. (2010). Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, CIRCGENETICS-109.
- Liu, P., Ramachandran, S., Seyed, M. A., Scharer, C. D., Laycock, N., Dalton, W. B., ... & Moreno, C. S. (2006). Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(8), 4011-4019.
- Louis, S. F., y Zahradka, P. "Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion". *Experimental & Clinical Cardiology* 15.4: e75, 2010.
- Madri, J. A., & Graesser, D. (2000). Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Journal of Immunology Research*, 7(2-4), 103-116.
- Marigo, V., Courville, K., Hsu, W. H., Feng, J. M., & Cheng, H. (2009). TRPM4 impacts on Ca²⁺ signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2), 194-203.

- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. Midwood, K. S., Williams, L. V., y Schwarzbauer, J. E. "Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix". *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1031-1037, 2004.
- Mierke, C. T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D. P., Diez, G., Koch, T. M., Marg, S., ... & Fabry, B. (2010). Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 13121-13130.
- Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 805-812.
- Nilius, B., Mahieu, F., Prenen, J., Janssens, A., Owsianik, G., Vennekens, R., & Voets, T. (2006). The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate. *EMBO Journal*, 25(3), 467-478.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U. y Flockerzi, V. 2003. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 30813–30820
- Nilius, B., Prenen, J., Tang, J., Wang, C., Owsianik, G., Janssens, A., ... & Zhu, M. X. (2005). Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6423-6433.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 633-643.
- Pla, A. F., & Gkika, D. (2013). Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Frontiers in Physiology*, 4.
- Reading, S. A., & Brayden, J. E. (2007). Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke*, 38(8), 2322-2328.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., y Horwitz, A. R. "Cell migration: integrating signals from front to back". *Science*, 302(5651), 1704-1709, 2003.
- Sarmiento, D., Montorfano, I., Cerda, O., Cáceres, M., Becerra, A., Cabello-Verrugio, C., ... & Varela, D. (2015). Increases in reactive oxygen species enhance vascular endothelial cell migration through a mechanism dependent on the transient receptor potential melastatin 4 ion channel. *Microvascular Research*, 98, 187-196.
- Schattling, B., Steinbach, K., Thies, E., Kruse, M., Menigoz, A., Ufer, F., ... & Kneussel, M. (2012). TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 18(12), 1805-1811.
- Shimizu, T., Owsianik, G., Freichel, M., Flockerzi, V., Nilius, B., & Vennekens, R. (2009). TRPM4 regulates migration of mast cells in mice. *Cell Calcium*, 45(3), 226-232
- Singh, J., Manickam, P., Shmoish, M., Natic, S., Denyer, G., Handelsman, D., ... & Dong, Q. (2006). Annotation of androgen dependence to human prostate cancer-associated genes by microarray analysis of mouse prostate. *Cancer Letters*, 237(2), 298-304.
- Stallmeyer, B., Zumhagen, S., Denjoy, I., Duthoit, G., Hébert, J. L., Ferrer, X., ... & Guicheney, P. (2012). Mutational spectrum in the Ca²⁺-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Human Mutation*, 33(1), 109-117.
- Venkatachalam, K. y Montell, C. 2007. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*. Rev. **76**: 387–417.

- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S. E., ... & Freichel, M. (2007). Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nature Immunology*, 8(3), 312-320.
- Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., ... & Condeelis, J. S. (2004). Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Research*, 64(23), 8585-8594.
- Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Segall, J. E., & Condeelis, J. S. (2005). Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends in Cell Biology*, 15(3), 138-145.
- Wehrle-Haller, B., & Imhof, B. A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(1), 39-50.
- Winkler, P. A., Huang, Y., Sun, W., Du, J., & Lü, W. (2017). Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature*, 552(7684), 200.
- Yamaguchi, H., y Condeelis, J. "Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(5), 642-652, 2007.
- Yu, Y. P., & Luo, J. H. (2006). Myopodin-mediated suppression of prostate cancer cell migration involves interaction with zyxin. *Cancer Research*, 66(15), 7414-7419.
- Zahm, J. M., Kaplan, H., Hérald, A. L., Doriot, F., Pierrot, D., Somelette, P., y Puchelle, E. "Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium". *Cell motility and Cytoskeleton* 37.1: 33-43, 1997.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, 9(8), 858-867.