

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***“VAPA es una proteína que interactúa y regula la actividad del canal TRPC6”***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y  
Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímica**

**por:**

***Camila Andrea Torres Yévenes***

**Director de Tesis: Dr. Oscar Cerda Arancibia**

**Santiago-CHILE**

**Mayo 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

**CAMILA ANDREA TORRES YÉVENEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y al Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Oscar Cerda Arancibia** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Alfonso Paredes** \_\_\_\_\_

**Dr. Mauricio Baez Larach** \_\_\_\_\_

**Dr. Hector Ruberly Contreras** \_\_\_\_\_

**Santiago de Chile, Mayo 2022**

**LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS:**

**Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile, Santiago, Chile.**

**Financiamiento:**

**Millennium Nucleus of Ion Channel-Associated Diseases (MiNICAD)**

**Beca arancel de Magíster otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas, 2019-2021**

## **Presentaciones a Congresos y publicaciones relacionadas con el tema**

1. Saldías, M. P., Maureira, D., Orellana-Serradell, O., Silva, I., Lavanderos, B., Cruz, P., **Torres, C.**, Cáceres, M. & Cerda, O. (2021). TRP channels interactome as a novel therapeutic target in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 1321. doi:10.3389/fonc.2021.621614
2. Orellana-Serradell, O., Lavanderos, B., **Torres, C.**, Silva, I., González M., Rivera, B., Madrid R., González, W., Poblete, H., Vergara-Jaque, A., & Cerda, O. (2022). Molecular determinants of the TRPC6 channel association with VAPA. En preparación.
3. **Torres, C.**, Poblete, H., Vergara-Jaque, A. & Cerda, O. (2020) VAPA es una nueva proteína regulatoria del canal TRPC6. I Congreso de Estudiantes de Posgrado Campus Dra. Eloísa Díaz de la Universidad de Chile.

## **Actividades de Extensión**

1. “Canales en acción”. Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (MiNICAD), Iniciativa Milenio. Fiesta de la Ciencia, Programa Explora, Región Metropolitana, 2019.
2. “Talleres Verano Teletón”. Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (MiNICAD), Iniciativa Milenio. Fundación Teletón, Región Metropolitana, 2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que apoyaron e hicieron posible la realización de este proyecto de tesis.

En primera instancia, agradezco a mi director de tesis, el Dr. Oscar Cerda. Sencillo no ha sido este proceso, pero no podría haber tenido un mejor tutor para apoyarme, guiarme e impulsarme a sacar adelante este proyecto. Agradezco enormemente su compromiso por mi formación y desempeño, y su calidad humana.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Boris, Ian, María Paz y Octavio, por sus consejos, paciencia y colaboración a la hora de enfrentar nuevos desafíos.

A mi mamá, María, a quién está dedicada esta tesis; por ser mi fuente de motivación e inspiración, por darme siempre lo mejor que estuvo a su alcance y por impulsarme a confiar en mis capacidades. Hoy, soy el resultado de su esfuerzo constante, todos mis logros también son los suyos.

A mi hermana, Daniela, por estar presente siempre y ofrecerme su ayuda incondicional.

A mi pareja, Rolando, por ser un apoyo emocional. Gracias por caminar y madrugar junto a mí, por no dejarme caer cuando las fuerzas desaparecían.

A mi Vicente, la estrella que ilumina mi camino. Ha sido un largo camino hasta ahora, me costó, pero volví, y en tu honor sonrío y seguiré luchando.

Y a mí, por salir adelante. Por trabajar duro, por ser fuerte y no rendirme; me agradezco y me felicito.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>1.1. Cáncer de Mama y Señalización Intracelular del Calcio</b>	10
<b>1.2. Superfamilia de Canales TRP</b>	13
<b>1.3. Subfamilia TRPC</b>	16
<b>1.4. Canal TRPC6</b>	17
<b>1.5. VAPA</b>	22
<b>2. HIPÓTESIS</b>	26
<b>3. OBJETIVOS</b>	27
<b>3.1. Objetivo General</b>	27
<b>3.2. Objetivos Específicos</b>	27
<b>3.2.1. Validar la interacción entre TRPC6 y VAPA</b>	27
<b>3.2.2. Determinar el rol de VAPA en la regulación de la actividad de TRPC6</b>	27
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	28
<b>4.1. Metodología</b>	28
<b>4.1.1. Cultivos celulares y transfecciones</b>	28
<b>4.1.2. Plásmidos</b>	28
<b>4.1.3. Ensayos de coinmunoprecipitación</b>	28
<b>4.1.4. Análisis de inmunotransferencia</b>	29
<b>4.1.5. Mediciones de calcio intracelular</b>	30
<b>5. RESULTADOS</b>	32
<b>5.1. VAPA es una Proteína que Interactúa con TRPC6</b>	32
<b>5.2. VAPA Reduce el Influjó de Calcio a Través de TRPC6</b>	33
<b>6. DISCUSIÓN</b>	40
<b>7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES</b>	45
<b>8. ANEXOS</b>	48
<b>8.1. VAPA Disminuye la Migración Mediada por Hiperforina de Células MDA-MB-231</b>	48
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Árbol filogenético humano de la superfamilia de canales TRP.

**FIGURA 2.** Descripción esquemática de la estructura transmembrana de los canales TRP.

**FIGURA 3.** Expresión de los canales TRP en tejido tumoral vs no tumoral y asociación con el pronóstico clínico del cáncer de mama.

**FIGURA 4.** Interacciones proteína-proteína y su asociación con procesos pro tumorales en el cáncer de mama.

**FIGURA 5.** Identificación de proteínas que interactúan con TRPC6.

**FIGURA 6.** VAPA se une a proteínas que contienen un motivo FFAT.

**FIGURA 7.** TRPC6 interactúa con la proteína VAPA.

**FIGURA 8.** VAPA reduce el influjo de calcio inducido por carbacol en células HEK293.

**FIGURA 9.** Validación de la expresión de TRPC6, VAPA y el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup>.

**FIGURA 10.** VAPA reduce el influjo de calcio inducido por carbacol en células MDA-MB-231.

**FIGURA 11.** VAPA reduce el influjo de calcio a través de TRPC6 en células HEK293.

**ANEXO 1.** VAPA disminuye la migración mediada por hiperforina de células MDA-MB-231.

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	<b>Alanina</b>
<b>CCh</b>	Carbacol
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaMKII</b>	Calmodulina quinasa II
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CPP</b>	Péptidos de penetración celular
<b>D</b>	Ácido aspártico
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DPBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
<b>E</b>	Ácido glutámico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ER</b>	Receptor de estrógeno
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>FA</b>	Adhesiones focales
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FFAT</b>	<i>Two phenylalanines (FF) in an Acid Tract</i>
<b>FT</b>	<i>Flow through</i>
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>hBCE</b>	<i>Human Breast Cancer Epithelial primary culture</i>

<b>HER2</b>	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
<b>ICD</b>	<i>Invasive Ductal Carcinoma</i>
<b>IP</b>	Inmunoprecipitado
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor de Inositol (1, 4, 5)-trifosfato
<b>Kv</b>	Canal de potasio dependiente de potencial
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activa por mitógeno
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>MCS</b>	<i>Membrane Contact Sites</i>
<b>MSP</b>	<i>Major Sperm Protein</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaF</b>	Fluoruro de sodio
<b>NaVO<sub>4</sub></b>	Orto vanadato de sodio
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>OAG</b>	1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol; análogo sintético del DAG
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidil inositol (3, 4, 5)-trifosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPI</b>	<i>Protein-Protein Interaction</i>
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático

<b>RSB</b>	Amortiguador reductor de muestra
<b>S (1-6)</b>	Segmento transmembrana (1-6)
<b>SAR</b>	SAR7334, inhibidor de TRPC6
<b>SOCE</b>	<i>Store-Operated Calcium Entry</i>
<b>TNBC</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>TRP</b>	<i>Transient Receptor Potential</i>
<b>TRPA</b>	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin</i>
<b>TRPC</b>	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
<b>TRPC6</b>	<i>Transient Receptor Potential Canonical 6</i>
<b>TRPM</b>	<i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
<b>TRPML</b>	<i>Transient Receptor Potential Mucopilin</i>
<b>TRPP</b>	<i>Transient Receptor Potential Polycistin</i>
<b>TRPV</b>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
<b>VAP</b>	<i>VAMP-Associated Protein</i>
<b>VAPA</b>	<i>VAMP-Associated Protein A</i>
<b>VAPB</b>	<i>VAMP-Associated Protein B</i>
<b>VAPC</b>	<i>VAMP-Associated Protein C</i>
<b>VAPoma</b>	Proteínas que interactúan con proteínas VAP
<b>X</b>	Representa cualquier aminoácido
<b>Y</b>	Tirosina

## RESUMEN

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial y la primera causa de muerte asociada a cáncer entre las mujeres. Diversos estudios han demostrado que la progresión del cáncer de mama implica alteraciones en la dinámica intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , mediada por cambios en la expresión y/o regulación de la actividad de canales iónicos. Entre las diferentes familias de canales iónicos, en el contexto del cáncer de mama, se ha enfatizado el estudio de la superfamilia de canales TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*), ya que ciertos miembros han sido propuestos como marcadores pronósticos en esta patología. Dentro de los miembros de la superfamilia TRP, destaca el canal catiónico no selectivo permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPC6. Estudios en líneas celulares de cáncer de mama, han informado que la expresión de TRPC6 se ve aumentada en células MCF-7 y MDA-MB-231. Consistentemente, TRPC6 está sobre expresado en muestras de adenocarcinomas ductales de mama humanos en comparación con tejido de mama no tumoral. Así mismo, diversos estudios han relacionado la expresión y actividad de TRPC6 con una mayor proliferación, migración e invasión celular en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Por tanto, estudiar los mecanismos que regulan la localización y actividad de TRPC6 pueden ser relevantes en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama. En este sentido, las interacciones proteína-proteína, han surgido como reguladores interesantes, debido a sus efectos en el tráfico, localización y actividad de canales iónicos, lo cual afecta los procesos celulares dependientes de estos. Estudios realizados por nuestro laboratorio, han mostrado por medio de espectrometría de masa que la proteína VAPA (del inglés *VAMP-Associated Protein A*) interactúa con TRPC6.

VAPA es una proteína residente en la membrana del retículo endoplasmático que, a través de su interacción con proteínas que contienen un motivo llamado FFAT (del inglés *two phenylalanines (FF) in an Acid Tract*), participa en el tráfico de vesículas, formación de complejos proteicos y regulación de los niveles de fosfoinosítidos en la membrana plasmática; procesos que están involucrados en la modulación de la actividad de TRPC6. Además, análisis de la secuencia primaria de TRPC6 han sugerido un posible motivo FFAT en el extremo amino terminal, que podría mediar su interacción con VAPA. En base a los antecedentes planteados, este trabajo propone la siguiente hipótesis: “VAPA regula la actividad del canal TRPC6 a través de su unión a un motivo tipo FFAT”. Para poner a prueba esta hipótesis, el objetivo general de este trabajo fue: “Determinar el efecto de la interacción entre TRPC6 y VAPA en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por el canal”. Aquí, validamos la interacción entre TRPC6 y VAPA a través de ensayos de coimmunoprecipitación en células HEK293. Además, demostramos que VAPA es un regulador negativo de la actividad de TRPC6, al reducir el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por carbacol en células HEK293 y MDA-MB-231. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la interacción entre TRPC6 y VAPA, constituye un nuevo mecanismo regulador de la actividad del canal, que presenta a VAPA como una nueva proteína reguladora de TRPC6. Proponemos que, estabilizar la interacción entre TRPC6 y VAPA, podría ser una estrategia novedosa para el tratamiento de patologías asociadas a una ganancia de función de TRPC6, cómo lo es el cáncer de mama.

## ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed cancers worldwide and the leading cause of cancer-related death among women. Various studies have shown that breast cancer progression involves alterations in the intracellular dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$ , mediated by changes in the expression and/or regulation of ion channel activity. Among the different families of ion channels, in the context of breast cancer, the study of the TRP (*Transient Receptor Potential*) channel superfamily has been emphasized since certain members have been proposed as prognostic markers in this pathology. Among the members of the TRP superfamily, the non-selective cation channel permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPC6, stands out. Studies in breast cancer cell lines have reported that TRPC6 expression is increased in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Consistently, TRPC6 is overexpressed in human breast ductal adenocarcinoma samples compared to non-tumor breast tissue. Likewise, several studies have related the expression and activity of TRPC6 with increased cell loss, migration, and invasion in cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Therefore, studying the mechanisms that regulate the localization and activity of TRPC6 may be relevant in the search for new therapeutic targets for the treatment of breast cancer. In this context, protein-protein interactions have emerged as an interesting regulatory mechanism due to their effects on trafficking, localization, and ion channel activity. Mass spectrometry-based assays suggest that the VAPA protein (*VAMP-Associated Protein A*) interacts with TRPC6. VAPA is a protein resident in the membrane of the endoplasmic reticulum that, through its interaction with proteins containing a motif called FFAT (*two phenylalanines (FF) in an Acid Tract*), participates in vesicle trafficking, formation of protein complexes, and regulation of phosphoinositide levels in the plasma

membrane; processes that are involved in the modulation of TRPC6 activity. Furthermore, analysis of the primary sequence of TRPC6 has suggested a possible FFAT motif at the amino terminus, which could mediate its interaction with VAPA. Based on the information presented, this work proposes the following hypothesis: "VAPA regulates the activity of the TRPC6 channel through its binding to an FFAT-type motif". The general aim was: "To determine the effect of the interaction between TRPC6 and VAPA on the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  mediated by the channel". We validated the interaction between TRPC6 and VAPA through co-immunoprecipitation assays in HEK293 cells. Furthermore, we show that VAPA is a negative regulator of TRPC6 activity by reducing carbachol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in HEK293 and MDA-MB-231 cells. Together, our results suggest that the interaction between TRPC6 and VAPA constitutes a new regulatory mechanism of channel activity, presenting VAPA as a new regulatory protein of TRPC6. We propose that stabilizing the interaction between TRPC6 and VAPA could be a novel strategy for treating pathologies associated with TRPC6 gain-of-function, such as breast cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cáncer de Mama y Señalización Intracelular del Calcio

El cáncer de mama es una de las enfermedades diagnosticadas con mayor frecuencia en las mujeres de todo el mundo (Bray *et al.*, 2018) y representa la primera causa de muerte de mujeres en edad reproductiva en Chile (Icaza, Núñez & Bugueño, 2017). Aunque los avances terapéuticos han sido significativos, el cáncer de mama provocó la muerte de 627.000 personas en el año 2018 (Bray *et al.*, 2018). Debido a la alta incidencia, que se prevé continúe aumentando, y mortalidad de esta patología, diversas investigaciones se han centrado en desarrollar nuevas terapias para combatir este problema de salud pública (Bray *et al.*, 2015).

El cáncer de mama es heterogéneo, con un amplio espectro de características clínicas, patológicas y moleculares, en la que los tumores individuales pueden exhibir enormes variaciones tanto en la presentación clínica, como en la agresividad de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Carey *et al.*, 2006; Perou *et al.*, 2000). En cuanto al diagnóstico, los tumores de mama se clasifican histológicamente según su origen celular en la glándula mamaria. Si el tumor es originado por una célula epitelial ductal o lobulillar, se denomina carcinoma ductal o lobulillar, respectivamente (Makki, 2015). En términos de pronóstico, el cáncer de mama es clasificado en base a la expresión histológica e inmunohistoquímica de proteínas claves: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación Ki67 (Harbeck *et al.*, 2019). Los tumores que expresan ER y/o PR se denominan “positivos para receptores hormonales” mientras que, aquellos que no expresan ER, PR y HER2 se denominan “triple negativo” (TNBC). Los

TNBC representan alrededor del 10 al 15 % de los casos de cáncer de mama y son los más difíciles de tratar (Harbeck *et al.*, 2019). Dado que este grupo de pacientes no tiene expresión de ER, PR y HER2, no existen tratamientos hormonales efectivos o terapias moleculares disponibles. El tratamiento suele consistir en cirugía seguida de quimioterapia y radioterapia, ya sea de forma individual o combinada (Wahba & El-Hadaad, 2015). Aunque exitosos hasta cierto punto, estos enfoques no siempre son curativos y logran resultados clínicos variables que se atribuyen en gran medida a la heterogeneidad del tumor. Además, la naturaleza sistémica de estos tratamientos trae consigo efectos adversos que afectan a casi todos los órganos del cuerpo, incluidos el corazón, los pulmones, el cerebro y los riñones (Nurgali *et al.*, 2018; Schirrmacher, 2019). Ello ha llevado a la búsqueda de terapias emergentes contra el cáncer, en donde cada paciente pueda ser tratado de forma personalizada de acuerdo con su perfil de expresión tumoral y composición genética, de manera tal que el tratamiento afecte sólo a las células tumorales.

En este contexto, dada la multiplicidad de factores celulares que contribuyen a la progresión del cáncer, se ha hecho necesario desarrollar nuevas terapias moleculares que puedan dirigirse a varios procesos celulares relevantes a la vez. En este sentido, diversos estudios han demostrado que las líneas celulares cancerosas muestran patrones alterados de expresión y funcionalidad de canales iónicos; y que el bloqueo farmacológico de ciertos canales puede inhibir el crecimiento de las células cancerosas (Prevarskaya, Skryma & Shuba, 2018).

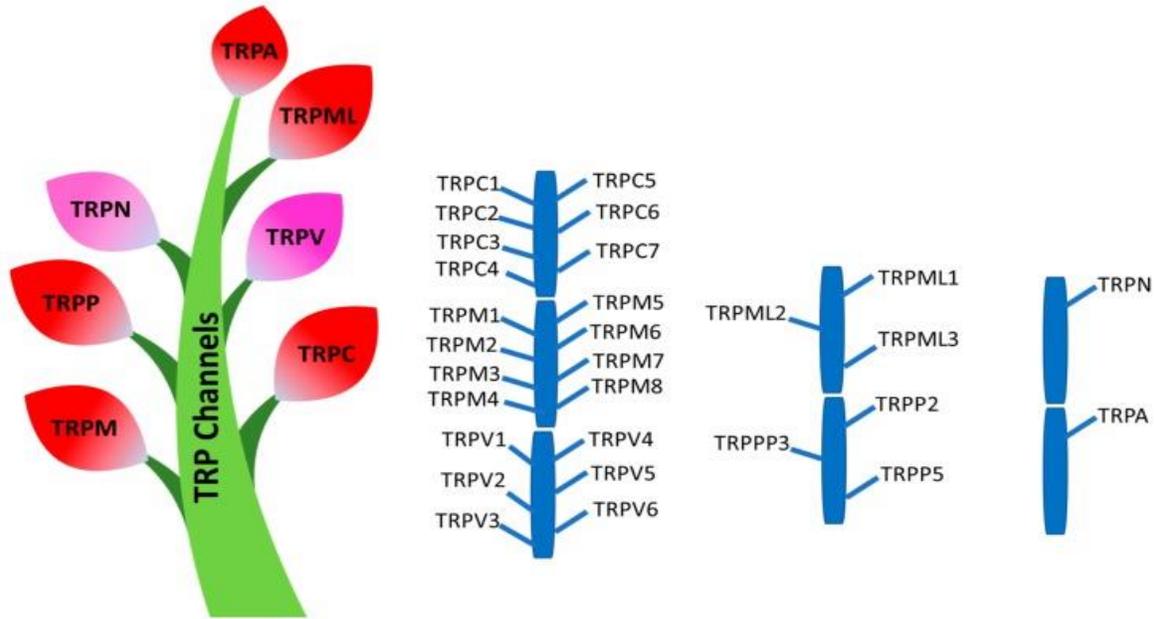
Los canales iónicos son reguladores versátiles de varios mecanismos relacionados con la fisiología y la fisiopatología, incluidos los procesos asociados al

desarrollo y progresión del cáncer, como la proliferación sostenida, la evasión de la apoptosis, la migración e invasión celular, y la quimio resistencia (Saldías *et al.*, 2021). De los canales iónicos considerados importantes en el contexto del cáncer, se ha dado especial interés a aquellos que son permeables a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). El  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como un segundo mensajero universal que interactúa con una gran cantidad de proteínas intracelulares de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , a fin de regular una amplia gama de funciones celulares, que van desde la supervivencia celular hasta la muerte celular (Cheng *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la forma de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  determinan la decisión de la célula de diferenciarse, dividirse o morir. Por ejemplo, las oscilaciones locales de  $\text{Ca}^{2+}$  se han asociado con la supervivencia celular, mientras que una elevación citosólica global sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha relacionado con la muerte celular (Monteith, Prevarskaya & Roberts-Thomson, 2017). Del mismo modo, cambios muy localizados en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol pueden regular la migración direccional (Wei *et al.*, 2009; Zhivotovsky & Orrenius, 2011), mientras que una mayor frecuencia y duración de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden activar diferencialmente distintos factores de transcripción (Di Benedetto *et al.*, 2013; Dolmetsch *et al.*, 1997). En consecuencia, la alteración de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena el desarrollo de diferentes patologías, incluido el cáncer de mama (Cheng *et al.*, 2006; Saldías *et al.*, 2021). En este contexto, se ha demostrado que los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  regulan la progresión del ciclo celular en células de cáncer de mama (Strobl, Wonderlin & Flynn, 1995). Así mismo, el uso de carboxiamida triazol, un inhibidor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  transmembrana, inhibe el crecimiento e induce la apoptosis de células de cáncer de mama (Guo *et al.*, 2006). Estos antecedentes sugieren una relación causal entre la progresión del cáncer de mama y la

homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ ; lo que otorga gran relevancia a la comprensión detallada de los mecanismos que regulan la expresión y funcionalidad de los canales iónicos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . En este contexto, un grupo clave de canales iónicos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  son la superfamilia de canales TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*). Se ha informado que cambios en la expresión y actividad de los canales TRP están directamente relacionados con los procesos celulares que contribuyen a la progresión del cáncer, como la proliferación celular, la diferenciación, la angiogénesis, la migración, la invasión y la resistencia a los tratamientos de quimioterapia (Santoni *et al.*, 2019). Como tal, la expresión de los canales TRP se ha propuesto como una herramienta para el diagnóstico o predicción del pronóstico del cáncer (Nilius, 2007) y han sido sugeridos como un nuevo blanco terapéutico.

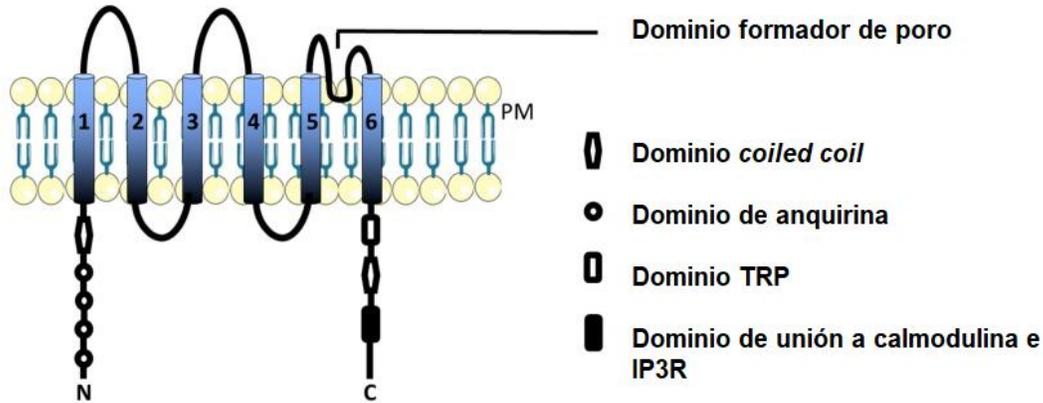
## **1.2. Superfamilia de Canales TRP**

La superfamilia TRP son canales catiónicos no selectivos expresados ubicuamente en diferentes tejidos y órganos. Inicialmente fueron descritos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Cosens & Manning, 1969), pero trabajos posteriores han identificado al menos veintiocho canales TRP en mamíferos, agrupados de acuerdo a su homología estructural, en seis subfamilias: TRPC (canónicos; TRPC1-7), TRPV (vanilloides; TRPV1-6), TRPM (melastatina; TRPM1-8), TRPA (ankirina; TRPA1), TRPP (policistina; TRPP2, TRPP3, TRPP5) y TRPML (mucopolipina; TRPML1-3) (Clapham, 2003; Nilius & Owsianik, 2011; Pedersen, Owsianik & Nilius, 2005) (Figura 1).



**Figura 1. Árbol filogenético humano de la superfamilia de canales TRP.** TRPC (canónico), TRPV (vainilloide), TRPML (mucopolipina), TRPP (policistina), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina) y TRPN (NOMPC). TRPC2 es un pseudogen en humanos. TRPN se expresa en peces. (Adaptado de Asghar & Törnquist, 2020).

Los canales TRP están formados por cuatro subunidades que se ensamblan como homo o heterotetrámeros para formar poros permeables a cationes. Cada subunidad del canal consta de seis segmentos transmembrana (S1-S6), en donde el poro conductor de iones se forma entre los segmentos S5 y S6. Todos los miembros de esta superfamilia poseen extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales ubicados intracelularmente (Cheng, Sun & Zheng, 2010; Nilius & Owsianik, 2011) (Figura 2).



**Figura 2. Descripción esquemática de la estructura transmembrana de los canales TRP.** “1-6” indican los diferentes segmentos de los dominios transmembrana. (Extraído de Asghar & Törnquist, 2020).

Todos los integrantes de la superfamilia TRP son canales catiónicos no selectivos con una mayor permeabilidad para  $\text{Ca}^{2+}$  que para  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \leq 10$ ), a excepción de TRPM4 y TRPM5 que permean solamente iones monovalentes, y TRPV5, TRPV6 que son canales selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$  (Clapham, 2003). En lo que respecta a la activación de los canales TRP, estos son considerados polimodales, ya que pueden activarse ante diversos estímulos químicos y físicos, que incluyen, ligandos endógenos y exógenos, cambios en la temperatura, estrés oxidativo y estímulos mecánicos (Clapham, 2003; Nilius & Owsianik, 2011). De esta manera, estos canales constituyen sensores biológicos capaces de detectar cambios en el medio ambiente y controlar diversos procesos fisiológicos y patológicos.

Generalmente, la apertura de los canales TRP conlleva a un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que activa distintas vías de señalización dependientes de este catión, como por ejemplo las vías  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina quinasa II (CaMKII), proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), las que a su vez, desencadenan la modulación de diversos procesos celulares como la proliferación, la

apoptosis y la migración celular (Cheng *et al.*, 2010; Conus, Hemmings & Pearson, 1998; Minke, 2001, 2006; Naziroğlu, Dikici & Dursun, 2012). En este contexto, diversas publicaciones han identificado la expresión aberrante de los canales TRP en el cáncer de mama, los que además han sido asociados con el pronóstico clínico de esta patología (Figura 3) (Saldías *et al.*, 2021).



Figura 3. Expresión de los canales TRP en tejido tumoral vs no tumoral y asociación con el pronóstico clínico del cáncer de mama. (Modificado de Saldías *et al.*, 2021).

### 1.3. Subfamilia TRPC

La subfamilia canónica de canales TRP (TRPC), consta de seis miembros en humanos (TRPC1, TRPC3-TRPC7). A diferencia de las otras subfamilias de canales TRP, que fueron descubiertas en base a su funcionalidad o vínculo genético en diversas enfermedades, los canales de la subfamilia TRPC en mamíferos, fueron estrictamente identificados debido a su homología de secuencia con las proteínas prototípicas de *Drosophila*, TRP y TRPL, con las que comparten una identidad de secuencia aminoacídica completa del 30-35 % (Wang *et al.*, 2020).

Estructuralmente, el extremo N-terminal de los canales TRPC presenta un dominio *coiled coil* y cuatro dominios de anquirina, lo que facilita tanto las interacciones proteicas, como la tetramerización de las subunidades del canal (Figura 2) (Lepage *et al.*, 2006).

Mientras que el extremo C-terminal presenta un dominio TRP, un dominio *coiled coil*, y un sitio de unión a calmodulina (CaM) y al receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), que regula la activación e inhibición del canal (Birnbaumer, 2009).

Los canales TRPC pueden ser activados principalmente por dos tipos de mecanismos intracelulares. Uno de ellos es la vía operada por receptor, en la cual los canales TRPC pueden activarse mediante receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o receptores de tirosina quinasas, que desencadenan la activación de la proteína fosfolipasa C (PLC) y la producción concomitante del segundo mensajero lipídico diacilglicerol (DAG). Por otra parte, en la vía operada por reservorios internos (SOCE, del inglés ***Store-Operated Calcium Entry***), los canales TRPC pueden activarse mediante el agotamiento de las reservas de Ca<sup>2+</sup> en el RE, para mediar la entrada de Ca<sup>2+</sup> operada por depósitos (Ambudkar, 2006; Smyth *et al.*, 2010). Además de los mecanismos mencionados anteriormente, se ha informado que los canales TRPC1, TRPC5 y TRPC6 son mecano sensibles (Gomis *et al.*, 2008; Kerstein *et al.*, 2013; Sharif-Naeini *et al.*, 2008).

#### **1.4. Canal TRPC6**

TRPC6 es un canal catiónico no selectivo que presenta una permeabilidad para el Ca<sup>2+</sup> que es aproximadamente cinco veces mayor que para el Na<sup>+</sup>. Es activado fisiológicamente mediante la producción de DAG y muestra una baja actividad basal (Dryer & Kim, 2018). A nivel estructural, las subunidades TRPC6 contienen diferentes dominios en su región citosólica (Figura 2) que son de gran importancia para el ensamblaje de las subunidades del canal para formar homo o hetero tetrámeros, y para

la interacción del canal con otras proteínas y miembros de la familia TRPC (Lepage *et al.*, 2006).

En humanos, TRPC6 se expresa en gran medida en los pulmones, la placenta, los ovarios y el bazo, y en diversos tipos de células, como las del músculo liso, las epiteliales y las inmunológicas (Dietrich & Gudermann, 2007). Tiene funciones importantes en la regulación del corazón y la vasculatura cardiopulmonar, el funcionamiento de los podocitos en el riñón, diversos procesos neuronales y varias enfermedades neoplásicas (Dietrich & Gudermann, 2014). En este contexto, diversos estudios han reportado un aumento en la expresión de TRPC6 en diversos tipos de cáncer entre los que se incluyen glioma, cáncer hepatocelular, gástrico, esofágico y de mama (Aydar *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018). Los estudios en líneas celulares de cáncer de mama mostraron una alta expresión de TRPC6 en células MCF7 (ER<sup>+</sup> y baja proliferación) y MDA-MB-231 (TNBC), mientras que no se encontró expresión en células epiteliales de mama no tumorales MCF-10A (Aydar *et al.*, 2009). De manera consistente, TRPC6 es el canal TRP que presenta una mayor expresión en carcinoma ductal invasivo (IDC) en comparación con el tejido sano. Pese a que no se ha descrito ninguna correlación entre la expresión de TRPC6 y parámetros clínicos como el grado histológico, el tamaño del tumor, la proliferación o la invasividad (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011), existen estudios que relacionan la expresión y actividad de TRPC6 con la proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (Jardin *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que TRPC6 está involucrado en diversos aspectos de la progresión del cáncer de mama, por lo que identificar nuevos mecanismos que regulen la localización y actividad de TRPC6 puede

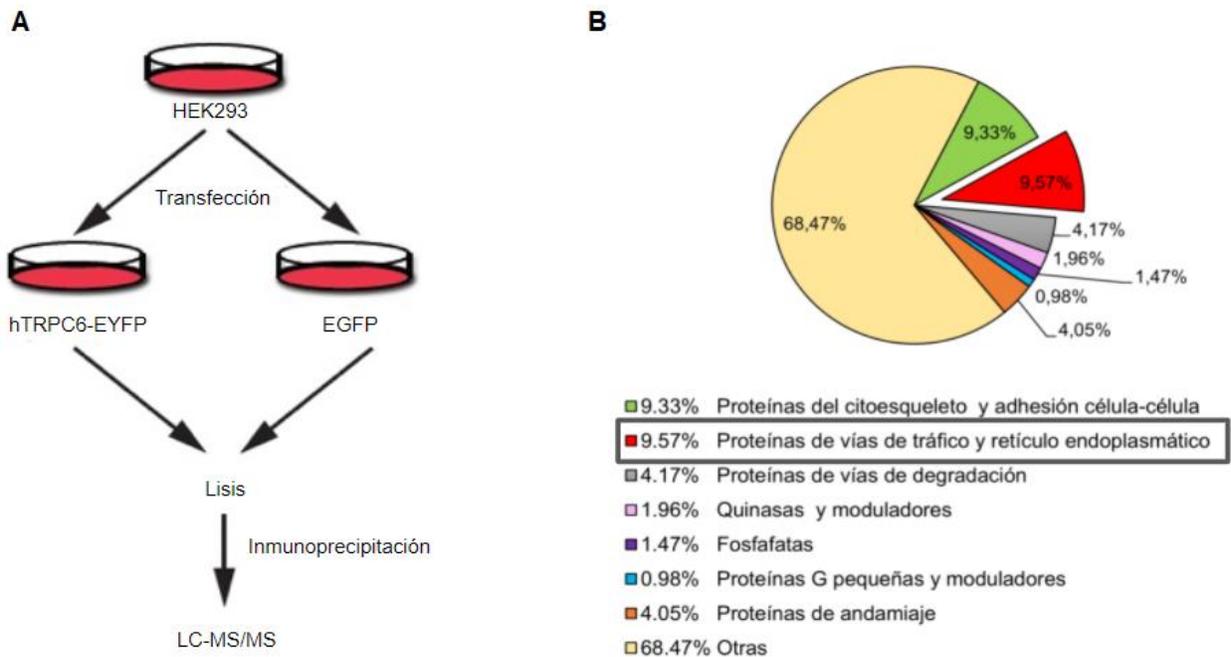
ser relevante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos asociados a patologías en las que la expresión o actividad de TRPC6 esté alterada, cómo lo es en el cáncer de mama.

Los mecanismos que regulan la actividad y localización de TRPC6 son complejos y no han sido dilucidados del todo. El mecanismo más estudiado implica la activación directa por DAG y sus análogos sintéticos de una manera independiente de PLC (Hofmann *et al.*, 1999). Otros mecanismos de modulación incluyen fosfoinosítidos de la membrana plasmática, especialmente el fosfatidil inositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que pueden regular directamente la actividad de TRPC6 mediante la modulación del tráfico y la inserción del canal en la membrana plasmática; y la regulación por Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulina (CaM) (Chaudhuri *et al.*, 2016; Kwon, Hofmann & Montell, 2007). Además, se han informado diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales que incluyen glicosilaciones (Boulay *et al.*, 1997; Talbot *et al.*, 2019; Zhang & Saffen, 2001), acetilaciones (Butler, Staruschenko & Snyder, 2015; Kim, Anderson & Dryer, 2012; Lundby *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015) y fosforilaciones (Hisatsune *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2010; Onohara *et al.*, 2006) en TRPC6 que pueden modificar la actividad, ubicación e interacción proteína-proteína del canal (PPI), modulando en consecuencia la función de éste (Liu, Yao & Tsang, 2020).

Las interacciones Proteína-Proteína (PPI) median y regulan la mayoría de las funciones y procesos celulares (Pawson, Raina & Nash, 2002; Thanasomboon *et al.*, 2020). Además, varias enfermedades son causadas por interacciones aberrantes entre las proteínas y sus reguladores o efectores. En línea con lo anterior, las PPI han despertado gran interés en la modulación de la actividad de los canales iónicos, pues



proteómico basado en espectrometría de masa en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS), para identificar proteínas asociadas a TRPC6. Las proteínas identificadas, se clasificaron en base a su función celular reportada en la base de datos UniProt; lo que indicó que uno de los grupos más representados (9,57% en total) tiene funciones asociadas al RE y vías de tráfico (Figura 5). Dentro de este análisis, destacó la proteína VAPA (del inglés, *VAMP-Associated Protein A*). Debido a su papel en el tráfico celular y la regulación de los niveles de fosfoinosítoles en la membrana plasmática (Lev *et al.*, 2008); procesos que intervienen en la modulación de la actividad de TRPC6 (Chaudhuri *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2007), se decidió estudiar en mayor profundidad la interacción entre VAPA y TRPC6.



**Figura 5. Identificación de proteínas que interactúan con TRPC6.** A. Flujo de trabajo para la identificación de proteínas asociadas a TRPC6. Las células HEK293 se transfectaron con TRPC6-EYFP o EGFP como control. Luego, TRPC6-EYFP se inmunoprecipitó usando nanobodies anti-GFP y los

inmunocomplejos, se corrieron en geles hasta concentrar las proteínas en una banda, que posteriormente fue sometida a análisis de espectrometría de masas en tándem acoplada a HPLC (LC-MS/MS). B. Clasificación de las proteínas asociadas a TRPC6 identificadas por espectrometría de masa en tándem acoplada a cromatografía líquida.

### 1.5. VAPA

El RE es un organelo esencial, capaz de conectar a gran parte de los organelos celulares con el fin de regular su dinámica estructural o funcional. Entre las proteínas integrales del RE, se encuentran las proteínas VAP (del inglés, *Vesicle-associated membrane protein (VAMP)-Associated Protein*); las que han sido evolutivamente conservada en eucariontes, desde levaduras a humanos (Lev *et al.*, 2008). VAP es una proteína integral de membrana tipo II residente en el RE (Kagiwada *et al.*, 1999), de la cual se han identificado tres isoformas en humanos: VAPA (también conocido como VAP33) (Weir *et al.*, 1998), VAPB y VAPC (una variante de *splicing* de VAPB) (Nishimura *et al.*, 1999).

En humanos, el gen para VAPA codifica para una proteína de 249 aminoácidos (27,8 kDa), que se expresa en diversos tejidos y órganos del cuerpo humano; observándose los niveles de expresión más altos en cerebro, testículo, ovario, riñón y músculo esquelético (Lev *et al.*, 2008; Skehel, Fabian-Fine & Kandel, 2000). VAPA es una proteína especializada en la formación de sitios de contacto (MCS, del inglés *Membrane Contact Sites*) entre el RE y otras membranas (Murphy & Levine, 2016). Recientemente, estos MCS han sido descritos como micro dominios de gran importancia para la regulación y ensamblaje de complejos de señalización, transporte de metabolitos y la regulación de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Prinz, Toulmay & Balla, 2020). Estructuralmente, VAPA presenta un dominio transmembrana C-terminal que permite anclar la proteína a la membrana del RE, un dominio *coiled coil* central y un dominio MSP

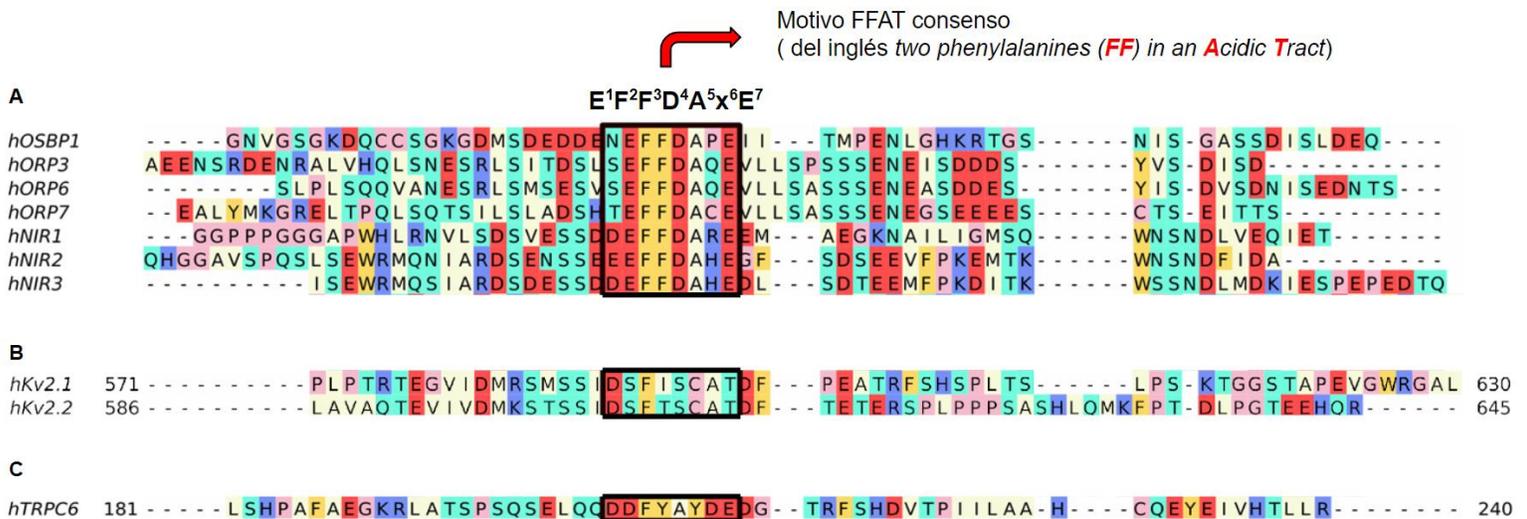
(del inglés, *Major Sperm Protein*) en el extremo N-terminal que está dirigido hacia el citosol (Murphy & Levine, 2016).

A través del dominio MSP, VAPA interactúa con numerosas proteínas que conforman el llamado “VAPoma” (Murphy & Levine, 2016). Las proteínas que interactúan con VAPA se caracterizan por tener un motivo FFAT (del inglés, *two phenylalanines (FF) in an Acid Tract*) (Loewen, Roy & Levine, 2003), formado por una secuencia canónica definida como E<sup>1</sup>-F<sup>2</sup>-F<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-A<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-E<sup>7</sup>, usando el código de aminoácidos de una letra, donde x es cualquier aminoácido; la cual es flanqueada por una región ácida adyacente (Figura 6A) (Loewen *et al.*, 2003). La interacción entre VAPA y sus proteínas blanco, se inicia con el motivo FFAT adoptando una conformación extendida similar a una lámina β; lo que crea una superficie cargada negativamente que luego se une a la superficie cargada positivamente en el dominio MSP (Furuita *et al.*, 2010). Esta unión conlleva interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno mediadas por los aminoácidos ácidos que flanquean el motivo FFAT (Furuita *et al.*, 2010).

Si bien el motivo FFAT canónico, EFFDAXE, se encuentra en proteomas humanos y de levadura, la mayoría de los motivos que interactúan con VAPA se desvían del motivo canónico en su núcleo y/o regiones flanqueantes ácidas (Slee & Levine, 2019). De hecho, los motivos FFAT pueden mostrar variaciones en cada uno de los siete elementos centrales (Mikitova & Levine, 2012). Una de las variaciones que aparece con mayor frecuencia en el motivo FFAT, es la sustitución de los residuos ácidos (ácido aspártico o ácido glutámico) por residuos que pueden fosforilarse para obtener una carga negativa, a menudo una serina o una treonina (Di Mattia *et al.*, 2020). Como los motivos FFAT

pueden presentar innumerables variaciones, es esencial que todos los motivos predichos de interacción con VAPA, sean probados experimentalmente.

Recientemente se descubrió que los canales de potasio dependientes de potencial (Kv2.1 y Kv2.2) presentan un motivo similar a FFAT (Figura 6B) y forman MSC entre el RE y la membrana plasmática a través de interacciones con las proteínas VAPA y VAPB (Kirmiz *et al.*, 2018). Al analizar la estructura primaria de TRPC6 se observó una región con un posible motivo FFAT entre los residuos fenilalanina 206 y tirosina 209 (<sup>206</sup>FYAY<sup>209</sup>), dentro de su N-terminal citoplasmático, que podría estar mediando la unión con VAPA (Figura 6C). En base a estos datos y lo observado en el análisis de espectrometría de masa, es posible inferir la asociación entre el canal TRPC6 y VAPA, a través de un motivo similar a FFAT. Por tanto, VAPA podría estar modulando la localización y actividad de TRPC6, haciendo de esta interacción una potencial diana terapéutica para patologías asociadas a una desregulación del canal, cómo el cáncer de mama.



**Figura 6. VAPA se une a proteínas que contienen un motivo FFAT.** A. Proteínas que contienen un motivo FFAT con la secuencia consenso EFFDxE expuesta. B. Secuencia de canales Kv2.1 y 2.2 que señala un motivo tipo FFAT que permite formar uniones RE/ membrana plasmática a través de interacciones con las proteínas VAP. C. Secuencia de TRPC6 que destaca el motivo tipo FFAT que podría estar mediando la interacción con VAPA. Orellana-Serradell *et al.*, 2022 (en preparación).

## **2. HIPÓTESIS**

Los análisis de proteómica basados en LC-MS/MS identificaron a VAPA como una nueva proteína asociada a TRPC6. Mediante herramientas bioinformáticas, hemos identificado un posible motivo similar a FFAT ubicado en la región citoplasmática N-terminal del canal TRPC6, por lo que podría ser una nueva proteína que interactúa con VAPA. Debido al papel regulador que podría tener VAPA sobre la actividad de TRPC6, proponemos la siguiente hipótesis:

**“VAPA es una proteína que interactúa y regula la actividad del canal TRPC6”**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la interacción entre TRPC6 y VAPA en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por el canal.

#### 3.2. Objetivos Específicos

##### 3.2.1. Validar la interacción entre TRPC6 y VAPA.

Para confirmar la interacción entre TRPC6 y VAPA sugerida por la espectrometría de masa y análisis bioinformáticos de la secuencia primaria de TRPC6, se procedió a hacer ensayos de coimmunoprecipitación en células HEK293 transfectadas de manera transitoria con plásmidos que contienen la secuencia para sobre expresar TRPC6 y VAPA.

##### 3.2.2. Determinar el rol de VAPA en la regulación de la actividad de TRPC6.

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular utilizando la sonda Fura-2 AM en cultivos de células HEK293 transfectadas de manera transitoria con plásmidos que contienen la secuencia para sobre expresar TRPC6, VAPA y la mutante de VAPA incapaz de interactuar con motivos FFAT (VAPA<sup>K94D/M96D</sup>).

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1. Metodología

#### 4.1.1. Cultivos celulares y transfecciones.

Se cultivaron células HEK293 y células MDA-MB-231 en medio DMEM con alto contenido de glucosa (12100046; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), suplementado con suero fetal de bovino al 10% v/v (FBS; F9665; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Las células HEK293 fueron transfectadas con los diferentes plásmidos usando el reactivo Lipofectamina 2000 (11668019; Thermo Fisher Scientific). Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina LTX (15338100; Thermo Fisher Scientific). Ambas líneas celulares se cultivaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.2. Plásmidos.

Los plásmidos hTRPC6-YFP, pEGFPC1-hVAP-A y pEGFPC1-hVAP-A<sup>K94D/M96D</sup> fueron adquiridos en Addgene (plásmido Addgene #21084, #104447 y #104449 respectivamente). El plásmido que codifica EGFP fue adquirido de Clontech (6084-1; Mountain View, California, Estados Unidos).

#### 4.1.3. Ensayos de coinmunoprecipitación.

Las células se lavaron en amortiguador salino con fosfato de Dulbecco fría (DPBS, pH 7,4) y se lisaron con amortiguador de lisis frío (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM (pH 8), NaF 5 mM, TritonX-100 1%, PMSF 1 mM, NaVO<sub>4</sub> de sodio 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa 1X) durante 30 minutos a 4°C. Los lisados celulares obtenidos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se incubaron con anticuerpos anti-GFP mAb de ratón isotipos IgG2a e IgG2b (N86/8 y

N86/44 respectivamente; NeuroMab, UC Davis/NIH, EE. UU.) durante 3 horas a 4°C. Luego, los inmunocomplejos se recuperaron mediante la incubación con 70 µL de proteína G-Sefarosa (17061802; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) durante 1 hora en agitación a 4°C. Después de la incubación, los productos de la reacción de inmunoprecipitación se lavaron en amortiguador de lavado (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaF 5 mM, Triton X-100 1% y PMSF 1 mM). Los inmunocomplejos se eluyeron hirviendo las muestras en amortiguador reductor de muestra (RSB) durante 5 minutos y luego se fraccionaron por tamaño en geles SDS-PAGE al 7% y 12%.

#### **4.1.4. Análisis de inmunotransferencia.**

Después del fraccionamiento por tamaño en SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare), que luego se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo (leche descremada al 4% p/v - Tween-20 al 0,1% v/v en solución salina tamponada con Tris (TBS: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) seguido de incubación durante la noche con anticuerpos primarios anti GFP mAb de ratón isotipos IgG2a e IgG2b (NeuroMab) y anti TRPC6 mAb de ratón isotipo IgG1κ (sc515837; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos). Después de 3 lavados con solución de bloqueo cada 10 minutos, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-mouse pAb conjugado con peroxidasa de rábano picante (HAF018; R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) durante 1 hora. Después de 3 lavados con TBS con Tween-20 0,1% v/v, se visualizaron las inmunotransferencias mediante el sustrato de transferencia Western Pierce ECL (34080;

Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se adquirieron con un generador de imágenes MiniHD9 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

#### **4.1.5. Mediciones de calcio intracelular.**

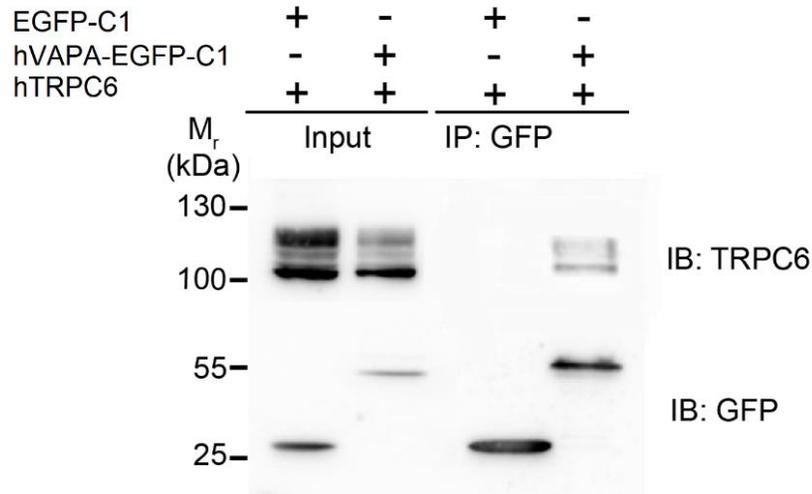
Las células HEK293 fueron transfectadas de manera transitoria con plásmidos que contienen la secuencia para sobre expresar TRPC6, VAPA, el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup> y EGFP como control. Debido a que las células MDA-MB-231 exhiben un aumento en la expresión de TRPC6 (Aydar *et al.*, 2009; Jardin *et al.*, 2018) estas fueron transfectadas con VAPA, el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup> y EGFP como control. Brevemente, las células sembradas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina (200 µg/mL; MilliporeSigma) se cargaron con 5 µM de la sonda Fura-2 AM (Invitrogen) durante 20 minutos a temperatura ambiente en solución extracelular (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM, ajustada a pH 7,4 con NaOH). Los registros fueron realizados en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti2-U (Nikon, Tokio, Japón) controlado con el software Micromanager 1.4 (Vale Lab, Universidad de California, San Francisco, CA, EE. UU.), y equipado con una cámara Chamaleon 3 (PointGray, Richmond, BC, Canadá) y controlador de rueda de filtro Lambda 10B (Sutter instrument, Novato, USA). En cada registro se midió la emisión de la sonda Fura-2 AM cada 5 segundos por excitación alternativa de la luz a 340 y 380 nm, y la emisión se capturó a 510 nm utilizando un objetivo 20x. Los datos se analizaron usando el software ImageJ de NIH. Las gráficas se realizaron utilizando el software Graphpad Prism 8 y se presentan como el cambio en las unidades de relación  $\Delta F/F_{0(340/380)}$ .

Para respaldar la participación de TRPC6 en el efecto de VAPA sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh, se utilizó el inhibidor del canal TRPC6, SAR 7334 (5831; Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) a una concentración de 20 nM (Maier *et al.*, 2015). Las células se preincubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con el inhibidor diluido en solución extracelular previo al comienzo del registro.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. VAPA es una Proteína que Interactúa con TRPC6

Nuestro laboratorio analizó el interactoma de TRPC6 mediante inmunoprecipitación y posterior LC-MS/MS, tras lo cual las proteínas identificadas se clasificaron según su función celular (Figura 5A, B). De manera interesante, la mayoría de las proteínas asociadas estaban relacionadas con el tráfico celular y el RE. Entre las proteínas identificadas, destacó VAPA debido a su papel en el tráfico celular y la regulación de los niveles de fosfoinositoles en la membrana plasmática (Lev *et al.*, 2008); procesos que intervienen en la modulación de la actividad de TRPC6 (Chaudhuri *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2007). Para validar los resultados obtenidos en el análisis de LC-MS/MS, realizamos ensayos de coinmunoprecipitación de las proteínas TRPC6 y EGFP-VAPA coexpresadas en células HEK293 (Figura 7). Utilizando anticuerpos anti-GFP dirigidos contra EGFP-VAPA, se logró inmunoprecipitar esta proteína (~ 55 kDa) y capturar de manera indirecta el canal TRPC6 (~ 120 kDa); el cuál fue detectado utilizando anticuerpo anti-TRPC6. Los datos confirman los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS y permiten observar la interacción de TRPC6 con VAPA (Figura 7).



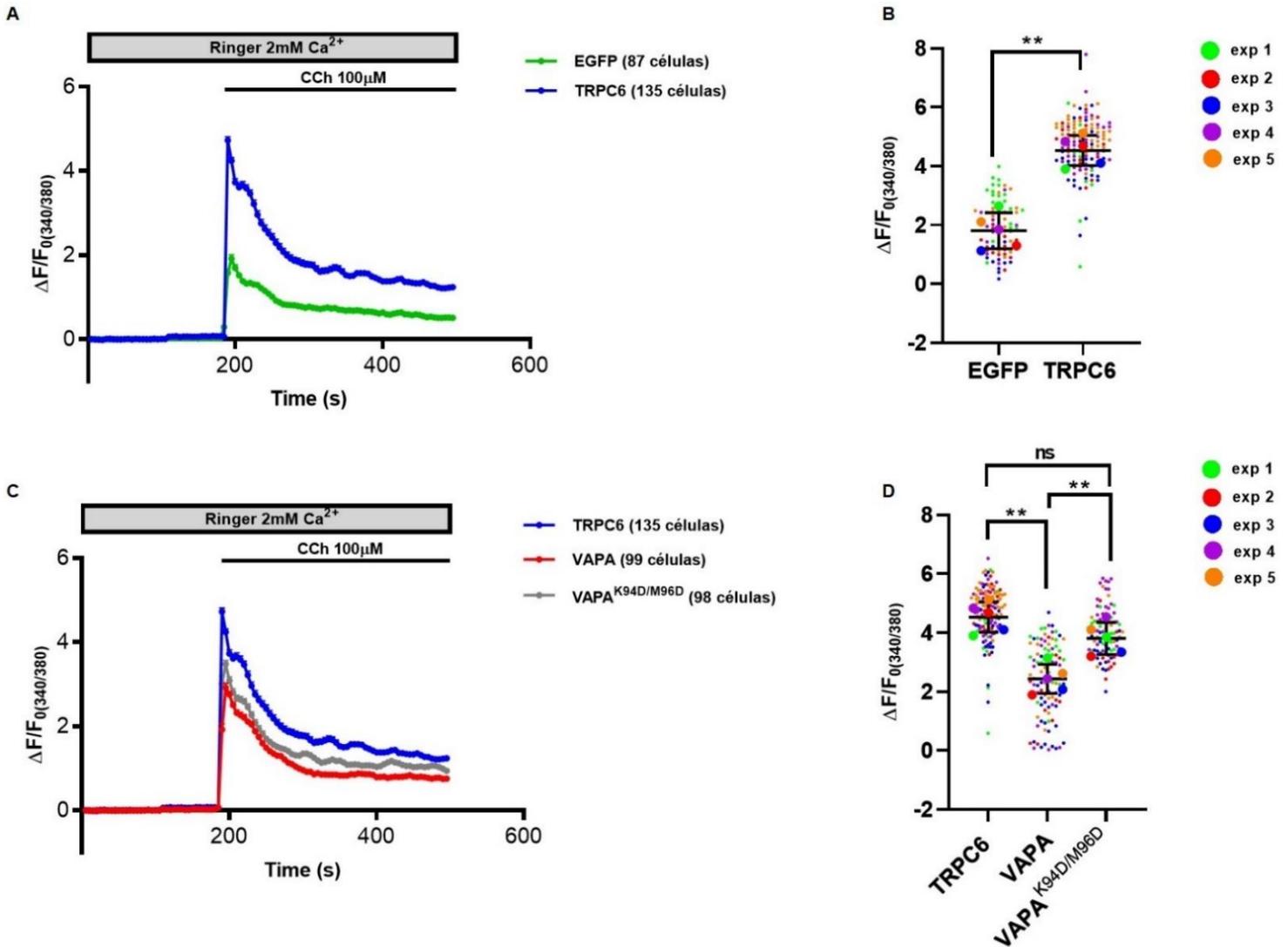
**Figura 7. TRPC6 interactúa con la proteína VAPA.** Inmunoblot representativo de células HEK293 transfectadas con plásmidos que contienen la secuencia para sobre expresar EGFP-C1 como control, hVAPA-EGFP-C1 o hTRPC6. Se inmunoprecipitó hVAPA-EGFP-C1 (~55 kDa) utilizando anticuerpos anti-GFP y se observó la coimmunoprecipitación de TRPC6 (~120 kDa) utilizando anticuerpo anti-TRPC6. A ~25 kDa se observa la banda correspondiente a EGFP-C1. La imagen muestra la inmunotransferencia de los inputs e inmunoprecipitados (IP).

## 5.2. VAPA Reduce el Influxo de Calcio a Través de TRPC6

Nuestros hallazgos sugieren que TRPC6 podría ser una proteína que interactúa con VAPA. Por tanto, VAPA podría modular la actividad de TRPC6; lo que es relevante desde el punto de vista del cáncer de mama, en el que la expresión de este canal está aumentada en comparación con el tejido sano (Aydar *et al.*, 2009; Dhennin-Duthille *et al.*, 2011; Ouadid-Ahidouch *et al.*, 2012). TRPC6 es un canal permeable a Ca<sup>2+</sup> que se activa a través de vías de señalización que conducen a la formación de DAG (Dryer & Kim, 2018). Por lo tanto, para evaluar si VAPA regula la actividad de TRPC6, emprendimos un enfoque indirecto estudiando el efecto de VAPA sobre los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> inducidos por carbacol (CCh); un agonista muscarínico que permite la producción del activador fisiológico de TRPC6, DAG (Estacion *et al.*, 2004). Observamos que la estimulación con CCh indujo un aumento de la señal de Ca<sup>2+</sup>

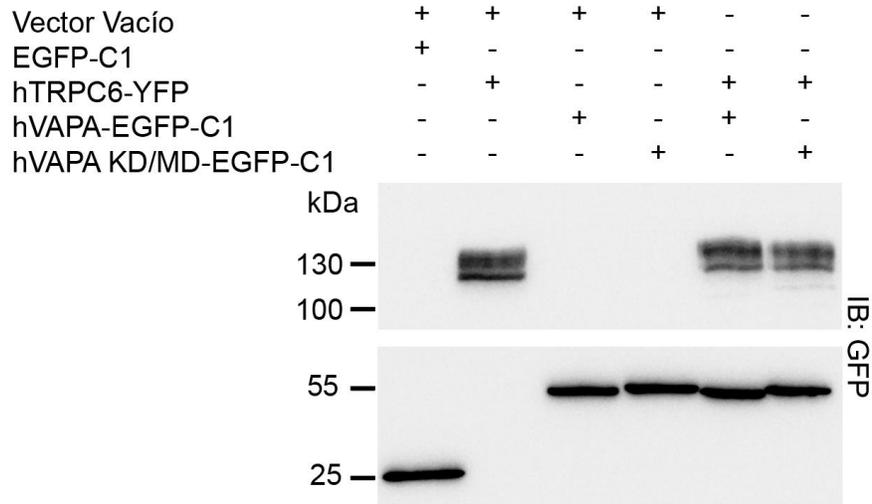
intracelular que fue ~ 65% mayor en células HEK293 transfectadas con TRPC6 en comparación con aquellas transfectadas con EGFP (Figura 8A, B). La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh fue menor en células HEK293 transfectadas con VAPA, en donde el *peak* máximo observado en estas células fue ~54% más bajo que en células transfectadas con TRPC6 (Figura 8C, D). De manera interesante, esta disminución de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh se rescató cuando se transfectó el mutante de VAPA incapaz de interactuar con motivos FFAT (VAPA<sup>K94D/M96D</sup>) (Figura 8C, D). Posteriormente, para aproximarnos al contexto fisiológico de interés para esta tesis, estudiamos la señal máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh en células de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales presentan una expresión aumentada de TRPC6 (Aydar *et al.*, 2009; Jardin *et al.*, 2018). Consistente con lo observado anteriormente, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh fue menor en células MDA-MB-231 transfectadas con VAPA, en donde el *peak* máximo observado en estas células fue ~31% más bajo que en células control transfectadas con EGFP, y un ~24% más bajo en comparación con células transfectadas con el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup> (Figura 10A, B).

En los análisis de Inmunoblot realizados para validar la sobre expresión de EGFP, TRPC6, VAPA y VAPA<sup>K94D/M96D</sup> en células HEK293, observamos que la sobre expresión de VAPA y VAPA<sup>K94D/M96D</sup> no afectó la expresión de TRPC6, conforme con la intensidad de las bandas (Figuras 9). Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de VAPA ejercen un papel modulador específicamente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh, posiblemente a través de TRPC6.

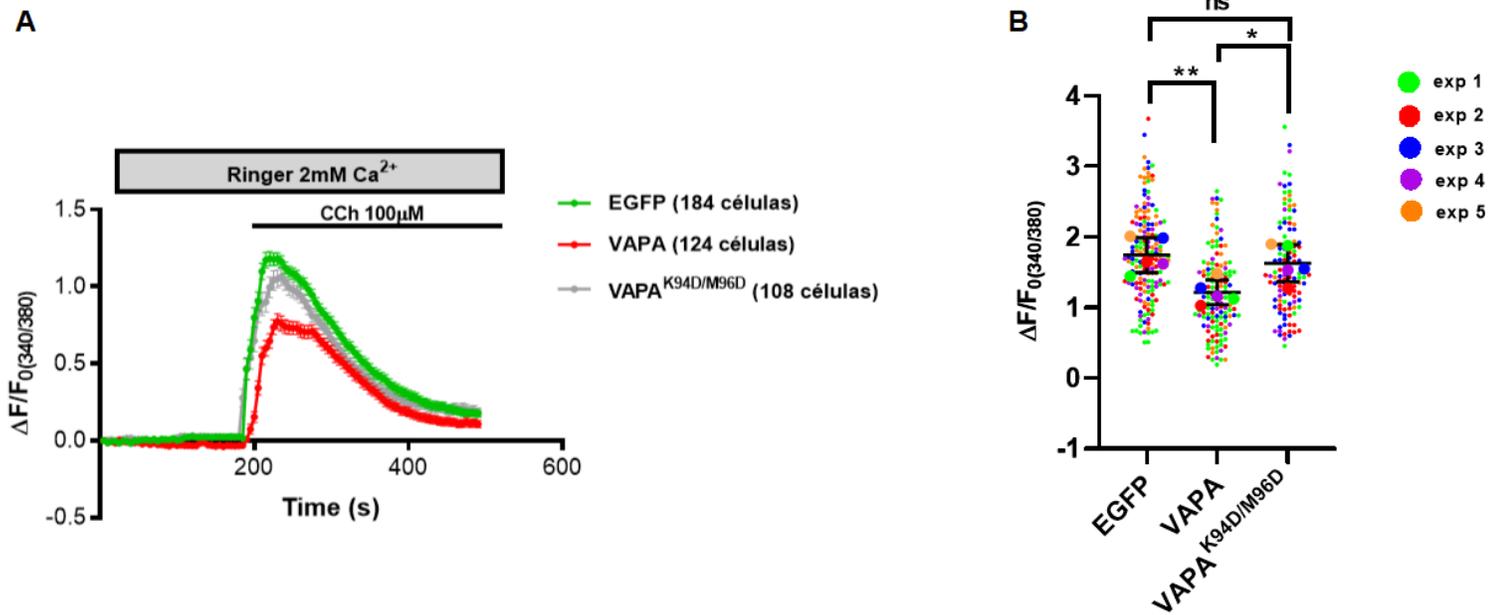


**Figura 8. VAPA reduce el influjo de calcio inducido por carbacol en células HEK293.** (A) Cursos de tiempo de la fluorescencia de la sonda Fura-2 AM en células HEK293 transfectadas con plásmidos que codifican EGFP-C1 + pcDNA/4TO (verde) y hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5 μM y los *peaks* de la sonda de Ca<sup>2+</sup> se indujeron con carbacol (CCh) 100 μM en solución extracelular con 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Cada punto corresponde a la media ± SEM. (B) Gráfico que representa los *peaks* de la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por CCh para cada condición. Cada color representa un experimento independiente, los puntos de mayor tamaño indican la media obtenida en cada experimento y los puntos de menor tamaño indican la respuesta individual de cada célula analizada por experimento. (n=5; Prueba t pareada, \*\* p=0,0019 (entre EGFP y TRPC6)). (C) Cursos de tiempo para la fluorescencia normalizada en células HEK293 transfectadas con hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul), hVAPA-EGFP-C1 + pcDNA/4TO (rojo) y hVAPA-KD/MD-EGFP-C1 + pcDNA/4TO (gris). Las células se cargaron con Fura-2-AM 5 μM y los *peaks* de la sonda de Ca<sup>2+</sup> se indujeron con CCh 100 μM en solución extracelular con 2

mM Ca<sup>2+</sup>. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (D) Gráfico que representa los *peaks* de la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por CCh para cada condición. Cada color representa un experimento independiente, los puntos de mayor tamaño indican la media obtenida en cada experimento y los puntos de menor tamaño indican la respuesta individual de cada célula analizada por experimento. (n=5; ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples Tukey's, \*\* p=0,0092 (entre TRPC6 y VAPA), ns p=0,0972 (entre TRPC6 y VAPA-KD/MD), \*\* p= 0,0078 (entre VAPA y VAPA-KD/MD)).



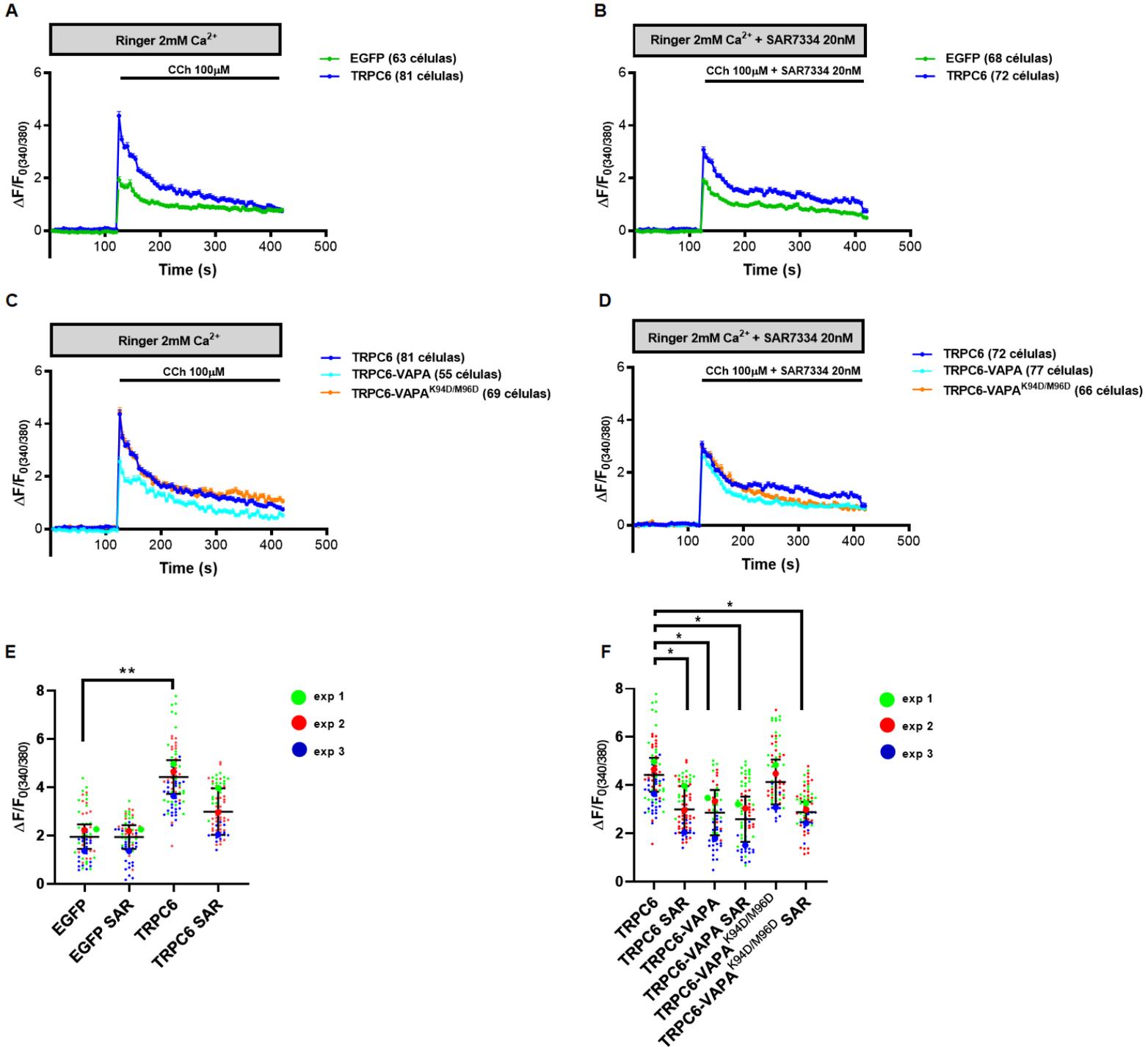
**Figura 9. Validación de la expresión de TRPC6, VAPA y el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup>.** Inmunoblot representativo de células HEK293 transfectadas con plásmidos que contienen la secuencia para sobre expresar EGFP-C1 como control hTRPC6-YFP, hVAPA-EGFP-C1 o el mutante hVAPA<sup>K94D/M96D</sup>-EGFP-C1. Las proteínas fueron identificadas utilizando anticuerpos anti-GFP, las bandas observadas a los ~120 kDa, ~55 kDa y ~ 25 kDa corresponden a hTRPC6-YFP, hVAPA-EGFP-C1 o el mutante hVAPA<sup>K94D/M96D</sup>-EGFP-C1 y EGFP respectivamente.



**Figura 10. VAPA reduce el influjo de calcio inducido por carbacol en células MDA-MB-231.** (A) Cursos de tiempo para la fluorescencia de la sonda Fura-2 AM en células MDA-MB-231 transfectadas con plásmidos que codifican EGFP-C1 + pcDNA/4TO (verde), hVAPA-EGFP-C1 + pcDNA/4TO (rojo) y hVAPA-KD/MD-EGFP-C1+ pcDNA/4TO (gris). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5  $\mu$ M y los *peaks* de la sonda de  $Ca^{2+}$  se indujeron con carbacol (CCh) 100  $\mu$ M en solución extracelular con 2 mM  $Ca^{2+}$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (B) Gráfico que representa los *peaks* de la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por CCh para cada condición. Cada color representa un experimento independiente, los puntos de mayor tamaño indican la media obtenida en cada experimento y los puntos de menor tamaño indican la respuesta individual de cada célula analizada por experimento (n=5; ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey's, \*\*p= 0,0093 (entre EGFP y VAPA), \*p= 0,0387 (entre VAPA y VAPA-KD/MD)).

Para respaldar el efecto inhibitorio de VAPA sobre la entrada de  $Ca^{2+}$  dependiente de TRPC6, inhibimos farmacológicamente la función del canal utilizando SAR 7334; un inhibidor de TRPC6 (Maier *et al.*, 2015). Observamos que el pretratamiento de células HEK293 durante 10 minutos con SAR 7334, parece atenuar la señal máxima de  $Ca^{2+}$  inducida por CCh en la condición en donde se transfectó TRPC6 y TRPC6 junto al mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup> (Figura 11A-F). En contraste, el aumento de la expresión de VAPA pareció abolir el efecto inhibitorio de SAR 7334 (Figura 11 C, D, F). Estos hallazgos

apoyan la idea de que la regulación a la baja de la actividad de TRPC6 podría estar involucrada en los efectos inhibitorios de VAPA sobre el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por CCh.



**Figura 11. VAPA reduce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de TRPC6 en células HEK293.** (A) Cursos de tiempo para la fluorescencia normalizada en células HEK293 transfectadas con plásmidos que codifican EGFP-C1 + pcDNA/4TO (verde) y hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5  $\mu\text{M}$  y los *peaks* de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujeron con carbacol (CCh) 100  $\mu\text{M}$  en solución extracelular con 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (B) Cursos de tiempo para la fluorescencia normalizada en células HEK293 transfectadas con plásmidos que codifican EGFP-C1 + pcDNA/4TO (verde) y hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5  $\mu\text{M}$  y posteriormente fueron incubadas durante 10 minutos con solución extracelular suplementada con el inhibidor farmacológico de TRPC6, SAR7334 20 nM. Los *peaks* de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujeron con carbacol CCh 100  $\mu\text{M}$  en solución extracelular con 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  suplementada con SAR7334 20 nM. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (C) Cursos de tiempo para la fluorescencia normalizada en células HEK293 transfectadas con hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul), hTRPC6-YFP + hVAPA-EGFP-C1 (celeste) y hTRPC6-YFP + hVAPA-KD/MD-EGFP-C1 (morado). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5  $\mu\text{M}$  y los *peaks* de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujeron según lo descrito en A. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (D) Cursos de tiempo para la fluorescencia normalizada en células HEK293 transfectadas con hTRPC6-YFP + pcDNA/4TO (azul), hTRPC6-YFP + hVAPA-EGFP-C1 (celeste) y hTRPC6-YFP + hVAPA-KD/MD-EGFP-C1 (morado). Las células se cargaron con Fura-2 AM 5  $\mu\text{M}$  y los *peaks* de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujeron según lo descrito en B. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM. (E) Gráfico que representa los *peaks* de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh para cada condición. Cada color representa un experimento independiente, los puntos de mayor tamaño indican la media obtenida en cada experimento y los puntos de menor tamaño indican la respuesta individual de cada célula analizada por experimento. (n=3; ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett's, \*\*p=0,0051 (entre EGFP y TRPC6)). (F) Gráfico que representa los *peaks* de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCh para cada condición. Cada color representa un experimento independiente, los puntos de mayor tamaño indican la media obtenida en cada experimento y los puntos de menor tamaño indican la respuesta individual de cada célula analizada por experimento. (n=3; ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett's, \*p=0,0431 (entre TRPC6 y TRPC6 SAR), \*p=0,0186 (entre TRPC6 y TRPC6-VAPA) \*p=0,0128 (entre TRPC6 Y TRPC6-VAPA SAR), \*p=0,0211 (entre TRPC6 y TRPC6-VAPA-KD/MD SAR)).

## 6. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que el aumento en la expresión y actividad de TRPC6 contribuyen a la fisiopatología de diferentes tipos de cáncer (Aydar *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018) y otros estados patológicos (Hofmann *et al.*, 2017; Reiser *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2014). Como tal, los estudios enfocados en dilucidar nuevos mecanismos que regulen la actividad de TRPC6 son de interés desde el punto de vista de la investigación biomédica. En este proyecto de tesis, estudiamos el interactoma de TRPC6. Utilizando proteómica basada en espectrometría de masa y estudios de inmunoprecipitación, identificamos a VAPA como una proteína que interactúa con TRPC6. VAPA, se une a proteínas que presentan un motivo FFAT o tipo FFAT (Loewen *et al.*, 2003; Di Mattia *et al.*, 2020; Mikitova & Levine, 2012; Slee & Levine, 2019). De manera interesante, utilizando herramientas bioinformáticas, identificamos un motivo tipo FFAT, <sup>206</sup>FYAY<sup>209</sup>, ubicado en el extremo N-terminal de TRPC6 que podría estar mediando la unión a VAPA. Investigaciones futuras deberán determinar si esta secuencia de aminoácidos específica está involucrada en la unión entre TRPC6 y VAPA, o si cualquier secuencia adyacente a este motivo serviría para tal propósito; hasta donde sabemos, nunca se ha descrito un motivo FFAT en canales de la superfamilia TRP.

Adicionalmente, demostramos que VAPA tiene un efecto inhibitorio sobre el influjo de Ca<sup>2+</sup> mediado por TRPC6. El mecanismo molecular que subyace a este efecto no ha sido estudiado. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren que VAPA disminuye la expresión de TRPC6 en la MP. Como tal, es posible que VAPA esté interfiriendo en el tráfico anterógrado de TRPC6 o favoreciendo la endocitosis de éste. Además, es importante señalar que los canales TRPC6 son

tetraméricos. En este estudio no investigamos la estequiometría involucrada en la interacción entre TRPC6 y VAPA, pero es probable que un tetrámero TRPC6 pueda unirse a hasta cuatro proteínas VAPA. Además, se ha demostrado que las proteínas VAP pueden existir como dímeros que se unen simultáneamente a dos motivos FFAT (Kaiser *et al.*, 2005; Furuita *et al.*, 2010) lo que podría promover la formación de un complejo proteico en el que proteínas adicionales modulen la actividad de TRPC6. Claramente, se requiere una mayor investigación para comprender el mecanismo mediante el cual VAPA disminuye el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de TRPC6.

Es importante destacar qué, para evaluar el efecto de VAPA en la función de TRPC6, emprendimos un enfoque indirecto estudiando el impacto de VAPA sobre los *peaks* máximos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por CCh, en células que sobre expresaron de manera transitoria TRPC6, VAPA y el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup>. No analizamos las cinéticas de las curvas de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a que, para fines de estos experimentos, utilizamos concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (2 mM). Por lo tanto, inducimos la entrada masiva de este ion. Es probable que, al estudiar las cinéticas de las curvas, no observáramos cambios entre una condición y otra, debido a que estos cambios, si los hubiese, estarían siendo subestimados. Para tal propósito, hubiese sido necesario hacer las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, utilizando concentraciones extracelulares inferiores de este ion. Por otra parte, para evaluar directamente el impacto de VAPA sobre la actividad de TRPC6, hubiese sido necesario hacer experimentos de electrofisiología para determinar el efecto de la sobre expresión de VAPA sobre las corrientes mediadas por este canal.

El rol de TRPC6 en el cáncer de mama ha sido previamente establecido. Aydar *et al.* (2009) demostraron que TRPC6 está sobre expresado en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231 en comparación con la línea epitelial de mama no tumoral, MCF-10A. Además, reportaron que la eliminación de TRPC6 afectó el crecimiento celular de las líneas MCF7 y MDA-MB-231. En adición, Jardin *et al.* (2018) confirmaron estos resultados e informaron que el silenciamiento de TRPC6 redujo la proliferación, migración e invasión exclusivamente de las líneas celulares tumorales de mama. A diferencia de la información existente de TRPC6 y su asociación a diversas enfermedades, las alteraciones en la expresión y/o actividad de VAPA y su contribución a estados patológicos, permanecen sin esclarecer. En lo que respecta al cáncer de mama, VAPB (homólogo de VAPA con el que comparte un 63% de identidad aminoacídica) está sobre expresada en el cáncer de mama; en donde tiene un papel en la promoción de tumores tanto *in vitro* como *in vivo* (Nishimura *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2012). Debido a que nuestros resultados sugieren que VAPA interactúa con TRPC6 e inhibe su actividad, sumado a que diversos estudios sugieren que disminuir la actividad de TRPC6 puede ser una nueva opción de tratamiento en el cáncer de mama (Jardin *et al.*, 2018, 2020, 2021), consideramos relevante estudiar el rol de VAPA en esta patología. En línea con lo anterior, miembros de nuestro laboratorio evaluaron si VAPA está involucrado en la migración de células de cáncer de mama utilizando células altamente migratorias, MDA-MB-231. Las células sobre expresaron transitoriamente VAPA y se evaluó la migración celular inducida por hiperforina 10  $\mu$ M, un activador específico del canal TRPC6 (Leuner *et al.*, 2007), a través de ensayos de reparación de heridas. Observamos que las células que expresan VAPA exógena, presentan una menor

migración en comparación con células control que expresan EGFP y aquellas que expresan el mutante de VAPA<sup>K94D/M96D</sup> incapaz de interactuar con motivos FFAT (Anexo 1). Los mecanismos moleculares que anteceden este efecto no han sido aclarados, para lograr dilucidarlos, es necesario comprender los pasos involucrados en la migración celular. La migración celular es un proceso que consta de ciclos de cinco pasos consecutivos: polarización celular, extensión de la membrana en el borde de ataque, adhesión al sustrato celular, generación de fuerzas de tracción y desprendimiento del borde posterior (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Todos estos eventos, dependen de señales espaciotemporales coordinadas que involucran la actividad de Rho-GTPasas y la señalización del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Ridley *et al.*, 2003). Las Rho-GTPasas están asociadas con la regulación de la extensión de la membrana celular, la adhesión a la matriz extracelular y la generación de fuerzas contráctiles durante la migración (Hall, 1998; Hall, 2012; Mattila & Lappalainen, 2008; Ridley & Hall, 1992; Small *et al.*, 2002). Mientras que el Ca<sup>2+</sup> intracelular está involucrado en los mecanismos moleculares que conducen a la formación de adhesiones focales (FA) nacientes en la parte frontal de las células migratorias y al desmontaje de las FA en la parte posterior (Chan, Bennin & Huttenlocher, 2010; Giannone *et al.*, 2004; Tsai & Meyer, 2012). En este contexto, pueden existir al menos dos razones para explicar el efecto de VAPA, mediado por la disminución en la actividad de TRPC6, sobre la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231: 1) Se ha establecido un vínculo causal entre el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular vía TRPC6 y la activación de RhoA (Singh *et al.*, 2007). RhoA se ha implicado en prácticamente todas las etapas de la progresión del cáncer (Vega & Ridley, 2008). Particularmente en la migración de células tumorales, se ha reportado que RhoA es

responsable de la maduración de las FA y la formación de fibras de estrés. Necesarios para un movimiento celular efectivo (Hall, 2012; Ridley & Hall 1992). 2) Recientemente González *et al.* (2014) sugirieron que, en las células del músculo liso, la estimulación mecánica provoca la activación de TRPC6, lo que desencadena la activación de TRPM4. Curiosamente, la activación de TRPM4 regula la rotación de las FA, y con ello la migración y contractilidad celulares (Cáceres *et al.*, 2015). Como tal, cambios en los niveles de expresión de VAPA, podrían afectar el influjo de  $Ca^{2+}$  a través TRPC6, y con ello las cascadas de señalización sujetas.

En conjunto, nuestros experimentos proporcionan un papel consistente de VAPA actuando como un regulador negativo de la actividad de TRPC6. Además, observamos que VAPA regula la migración de células MDA-MB-231 a través de su acción sobre la actividad de TRPC6. Por lo tanto, comprender los efectos de la interacción entre TRPC6 y VAPA en diversos procesos celulares relevantes en la progresión del cáncer, podría proporcionar nuevas alternativas para ayudar en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

## 7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

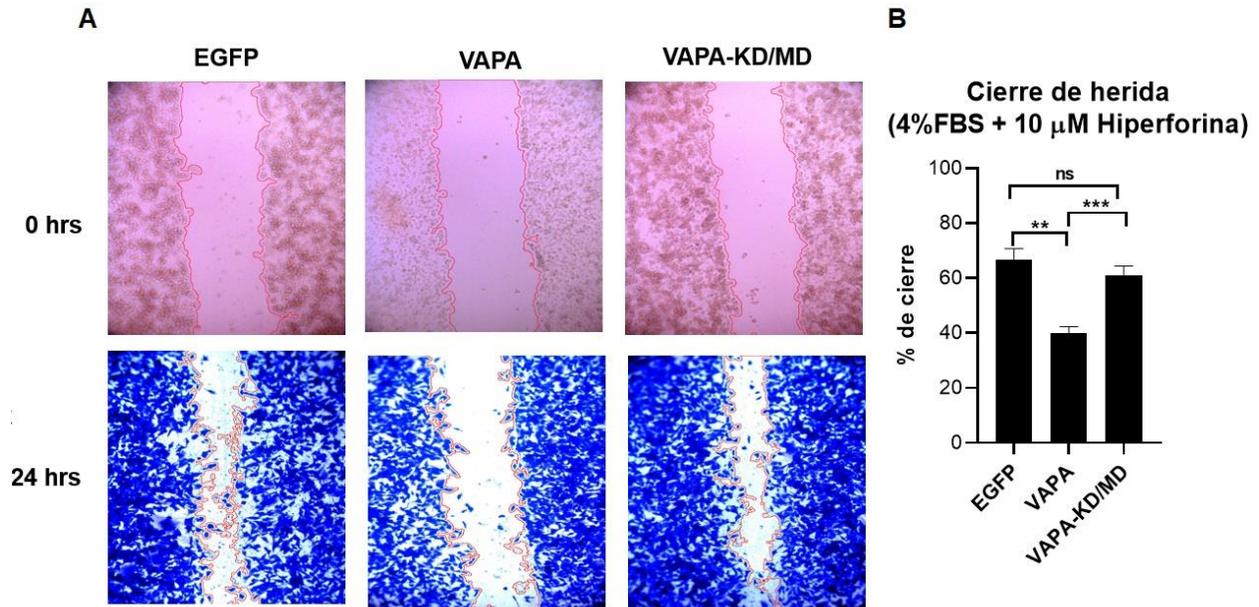
TRPC6 es un canal catiónico no selectivo, que se expresa ubicuamente y está implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Estudios basados en espectrometría de masa y ensayos de coimmunoprecipitación, nos permitieron identificar que VAPA interactúa con TRPC6. Adicionalmente, proporcionamos datos novedosos que sugieren que TRPC6 posee un motivo tipo FFAT dentro del N-terminal citoplasmático, que podría estar mediando la interacción con VAPA. Además, demostramos que VAPA inhibe tanto el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de TRPC6, como la capacidad migratoria dependiente de TRPC6, de células de cáncer de mama MDA-MB-231. Debido a que diversos estudios han demostrado que la desregulación de TRPC6 contribuye a la fisiopatología del cáncer de mama y otros estados patológicos, consideramos relevante estudiar el efecto de esta interacción en diferentes procesos celulares, tales como la proliferación e invasión celular. Es posible que estabilizar o interrumpir la interacción entre TRPC6 y VAPA sea un objetivo terapéutico plausible en el cáncer de mama, al modular la actividad del canal y con ello vías de señalización asociadas. Por lo tanto, investigaciones futuras deberán evaluar si el desarrollo de moduladores de esta interacción reduce la malignidad de células tumorales, al contrarrestar el fenotipo de aumento de expresión y actividad de TRPC6 (Aydar *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018). En este contexto, el uso de moléculas pequeñas, anticuerpos o *nanobodies*, y péptidos miméticos ha despertado gran interés (Saldías *et al.*, 2021). Uno de los principales desafíos a los que se han enfrentado estos moduladores de PPI, es que la mayoría de las interacciones abarcan áreas de contacto relativamente grandes. Sin embargo, estudios actuales han

demostrado que sólo un pequeño subconjunto de aminoácidos, denominados *hotspot*, contribuye con la mayor parte de la energía de unión (Mabonga & Kappo, 2019). La identificación de los *hotspot* ha llevado al diseño de pequeñas moléculas o péptidos que se dirigen a este subconjunto de aminoácidos para modular las PPI. Un ejemplo de ello ha sido el diseño de Tirofiban, un mimético del epítipo tripéptido Arg-Gly-Asp del fibrinógeno que se une a la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  y el Maraviroc dirigido a interacciones CCR5-gp120; ambos medicamentos han sido aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento de afecciones cardiovasculares y VIH, respectivamente (Wishart *et al.*, 2008; Kuritzkes, Kar & Kirkpatrick, 2008). Otro de los desafíos a los que se han enfrentado los moduladores de las PPI, son la baja penetración y especificidad celular. En este contexto, el uso de péptidos de penetración celular (CPP) ha proporcionado una herramienta importante para mejorar estos aspectos. Los CPP son secuencias cortas (de hasta 30 aminoácidos de longitud), generalmente solubles en agua, que pueden acoplarse a moléculas bioactivas para transportarlas al interior de la célula (Tripathi *et al.*, 2018; Vivès *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2020). Se han desarrollado diversas estrategias para que estos CPP tengan la capacidad de dirigirse a células tumorales; por lo que, al ser conjugados con moduladores de PPI, aumentarían la absorción y especificidad celular de estos (Habault *et al.*, 2009; Regberg, Srimanee & Langel, 2012; Jagot-Lacoussiere *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2020). Entre las estrategias desarrolladas para proporcionar especificidad tumoral a los CPP, se encuentran péptidos que se unen a moléculas ubicadas en la superficie de células tumorales (Zhou, N. *et al.*, 2017; Kang, R. *et al.*, 2020), péptidos que permanecen inactivos hasta que son modificados por una proteasa asociada al cáncer o por propiedades del microambiente tumoral (Cheng *et al.*, 2015), y péptidos que

aprovechan los mecanismos celulares desregulados en las células tumorales (Olson et al., 2009). En lo que respecta a la farmacocinética y la semivida corta en el plasma sanguíneo de los CPP, ésta puede mejorarse utilizando aminoácidos no naturales y acoplando CPP y fármacos a vehículos macromoleculares, como liposomas o biopolímeros (Borrelli *et al.*, 2018). Por otra parte, para mejorar la biodisponibilidad de estos péptidos en el tejido diana, particularmente en el cáncer de mama, se ha propuesto la administración local directamente en la mama (Patil *et al.*, 2020). La zona areola-pezón, muestra una buena permeación de fármacos debido a una epidermis más delgada en comparación con el resto de la piel. Adicionalmente, la abertura del conducto del pezón en la superficie de la mama se extiende como un conducto lobulillar terminal, el cual es el sitio principal en donde se origina el cáncer de mama (Dave *et al.*, 2014). Como podemos ver, utilizar CPP es una herramienta importante y estratégica para proporcionar moduladores de PPI con especificidad tumoral y efectos secundarios bajos. En base a estos antecedentes, consideramos que desarrollar moléculas pequeñas capaces de estabilizar o inhibir la interacción entre TRPC6 y VAPA merece mayor investigación.

## 8. ANEXOS

### 8.1. VAPA Disminuye la Migración Mediada por Hiperforina de Células MDA-MB-



231

**Anexo 1. VAPA disminuye la migración mediada por hiperforina de células MDA-MB-231.** A. imágenes representativas de ensayos de cierre de heridas por raspado utilizando células MDA-MB-231 transfectadas con EGFP, VAPA o el mutante VAPA<sup>K94D/M96D</sup>. Las células fueron depletadas durante 6 horas y posteriormente se incubaron con 4% de suero bovino fetal e hiperforina 10  $\mu$ M para estimular la migración dependiente de TRPC6. Las imágenes fueron tomadas a tiempos 0 y 24 horas. B. Gráfico que representa el % de cierre de heridas. Datos correspondientes a 4 experimentos independientes (n=4; ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey's \*\*p=0,0016, \*\*\*p=0,0017).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Ambudkar, I. S. (2006). Ca<sup>2+</sup> signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), 25-32. doi: 10.1016/j.tips.2005.11.008
- Asghar, M. Y., & Törnquist, K. (2020). Transient receptor potential canonical (TRPC) channels as modulators of migration and invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1739-1753. doi: 10.3390/ijms21051739
- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., & Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: A potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell International*, 9(23), 1-12. doi: 10.1186/1475-2867-9-23
- Birnbaumer, L. (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 395-426. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094928
- Borrelli, A., Tornesello, A. L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2018). Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents. *Molecules*, 23(2). doi: 10.3390/molecules23020295
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila Transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G(q) class of g protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29672-29680. doi: 10.1074/jbc.272.47.29672
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Antoni, A., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *International journal of cancer*, 137(9), 2060-2071. doi: 10.1002/ijc.29670
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6),

394-424. doi: 10.3322/caac.21492

- Butler, P. L., Staruschenko, A., & Snyder, P. M. (2015). Acetylation stimulates the epithelial sodium channel by reducing its ubiquitination and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(20), 12497-12503. doi: 10.1074/jbc.M114.635540
- Cáceres, M., Ortiz, L., Recabarren, T., Romero, A., Colombo, A., Leiva-Salcedo, E., Varela, D., Rivas, J., Silva, I., Morales, D., Campusano, C., Almarza, O., Simon, F., Toledo, H., Park, K. S., Trimmer, J. S., & Cerda, O. (2015). TRPM4 is a novel component of the adhesome required for focal adhesion disassembly, migration and contractility. *PLoS One*, *10*(6), e0130540. doi: 10.1371/journal.pone.0130540
- Cai, R., Ding, X., Zhou, K., Shi, Y., Ge, R., Ren, G. Jin, Y., & Wang, Y. (2009). Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *International Journal of Cancer*, *125*(10), 2281-2287. doi: 10.1002/ijc.24551
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, *295*(21), 2492-2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
- Chan, K. T., Bennin, D. A., & Huttenlocher, A. (2010). Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *Journal of Biological Chemistry*, *285*(15), 11418-11426. doi: 10.1074/jbc.M109.090746
- Chaudhuri, P., Rosenbaum, M. A., Sinharoy, P., Damron, D. S., Birnbaumer, L., & Graham, L. M. (2016). Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI3 kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(8), 2110-2115. doi: 10.1073/pnas.1600371113
- Cheng, H. P., Wei, S., Wei, L. P., & Verkhratsky, A. (2006). Calcium signaling in physiology and pathophysiology. *Acta Pharmacologica Sinica*, *27*(7), 767-772. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00399.x
- Cheng, W., Sun, C., & Zheng, J. (2010). Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein & Cell*, *1*(9), 802-810. doi: 10.1007/s13238-010-0108-9

- Cheng, X., Jin, J., Hu, L., Shen, D., Dong, X. P., Samie, M. A., Knoff, J., Eisinger, B., Liu, M. L., Caterina, M. J., Dempsey, P., Michael, L. W., Dlugosz, A. A., Andrews, N. C., Clapham, D. E., & Xu, H. (2010). TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell*, *141*(2), 331-343. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.013
- Cheng, C.J., Bahal, R., Babar, I.A., Pincus, Z., Barrera, F., Liu, C., Svoronos, A., Braddock, D.T., Glazer, P.M., Engelman, D.M., Saltzman, W.M. & Slack, F.J. MicroRNA Silencing for Cancer Therapy Targeted to the Tumour Microenvironment. (2015). *Nature*, *518*(7537):107–110. doi:10.1038/nature13905
- Chun, J. N., Lim, J. M., Kang, Y., Kim, E. H., Shin, Y. C., Kim, H. G., Jang, D., Kwon, D., Shin, S. Y., So, I., & Jeon, J. H. (2014). A network perspective on unraveling the role of TRP channels in biology and disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *466*(2), 173-182. doi: 10.1007/s00424-013-1292-2
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, *426*(6966), 517-524. doi: 10.1038/nature02196
- Conus, N. M., Hemmings, B. A., & Pearson, R. B. (1998). Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(8), 4776-4782. doi: 10.1074/jbc.273.8.4776
- Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, *224*(5216), 285-287. doi: 10.1038/224285a0
- Dave, K., Averineni, R., Sahdev, P., & Perumal, O. (2014). Transpapillary drug delivery to the breast. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0115712
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *28*(5), 813-822. doi: 10.1159/000335795
- Di Benedetto, G., Scalzotto, E., Mongillo, M., & Pozzan, T. (2013). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metabolism*, *17*(6), 965-975. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.003
- Dietrich A, Gudermann T. (2007). TRPC6. *Handb Exp Pharmacol*, (179):125-41. doi:

10.1007/978-3-540-34891-7\_7.

- Dietrich A, Gudermann T. (2014). TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. *Handb Exp Pharmacol*, (222):157–88. doi:10.1007/978-3-642-54215-2\_7
- Di Mattia, T., Martinet, A., Ikhlef, S., McEwen, A. G., Nominé, Y., Wendling, C., Pousin-Courmontagne, P., Voilquin, L., Eberling, P., Ruffenach, F., Cavarelli, J., Slee, J., Levine, T. P., Drin, G., Tomasetto, C., & Alpy, F. (2020). FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *The EMBO Journal*, 39(23). doi: 10.15252/embj.2019104369
- Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D., Cai, R., Jin, Y., Dong, B., Xu, Y., & Wang, Y. (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(14), 1052-1068. doi: 10.1093/jnci/djq217
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., & Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627), 855-858. doi: 10.1038/386855a0
- Dryer, S. E., & Kim, E. Y. (2018). Permeation and rectification in canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) channels. *Frontiers in Physiology*, 9, 1055-1065. doi: 10.3389/fphys.2018.01055
- Estacion, M., Li, S., Sinkins, W. G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C., Westwick, J., & Schilling, W. P. (2004). Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22047-22056. doi: 10.1074/jbc.M402320200
- Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., & Kojima, C. (2010). Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12961-12970. doi: 10.1074/jbc.M109.082602
- Giannone, G., Rondé, P., Gaire, M., Beaudouin, J., Haiech, J., Ellenberg, J., & Takeda, K. (2004). Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28715-28723. doi: 10.1074/jbc.M404054200

- Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., & Viana, F. (2008). Hypoosmotic-and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *The Journal of Physiology*, *586*(23), 5633-5649. doi: 10.1113/jphysiol.2008.161257
- Gonzales, A. L., Yang, Y., Sullivan, M. N., Sanders, L., Dabertrand, F., Hill-Eubanks, D. C., Nelson, M. T., & Earley, S. (2014). A PLC $\gamma$ 1-dependent, force-sensitive signaling network in the myogenic constriction of cerebral arteries. *Science signaling*, *7*(327), ra49-ra49. doi: 10.1126/scisignal.2004732
- Guo, L., Li, Z. S., Wang, H. L., Ye, C. Y., & Zhang, D. C. (2006). Carboxyamido-triazole inhibits proliferation of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, *538*(1-3), 15-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.03.036
- Habault J, Poyet JL. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. (2019). *Molecules* *24*(5), 927. doi: 10.3390/molecules24050927
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, *279*(5350), 509-514. doi: 10.1126/science.279.5350.509
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, *40*(6), 1378-1382. doi: 10.1042/BST20120103
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews Disease primers*, *5*(1), 1-31. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2
- Hisatsune, C., Kuroda, Y., Nakamura, K., Inoue, T., Nakamura, T., Michikawa, T., Mizutani, A., & Mikoshiba, K. (2004). Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18887-18894. doi: 10.1074/jbc.M311274200
- Hofmann, K., Fiedler, S., Vierkotten, S., Weber, J., Klee, S., Jia, Zwickenspflug, W., Flockerzi, V., Storch, U., Yildirim, A. O., Gudermann, T., Königshoff, M., & Dietrich, A. (2017). Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1863*(2), 560-568. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.12.002
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G.

- (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259-263. doi: 10.1038/16711
- Icaza, G., Núñez, L., & Bugueño, H. (2017). Descripción epidemiológica de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en Chile. *Revista Médica de Chile*, 145(1), 106-114. doi: 10.4067/S0034-98872017000100014
- Jagot-Lacoussiere L, Kotula E, Villoutreix BO, Bruzzoni-Giovanelli H. Poyet JI. A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death. (2016). *Cancer Res*, 76(18):5479–90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0302
- Jardin, I., Diez-Bello, R., Lopez, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M., Smani, T., & Rosado, J. A. (2018). TRPC6 channels are required for proliferation, migration and invasion of breast cancer cell lines by modulation of Orai1 and Orai3 surface exposure. *Cancers*, 10(9), 331-348. doi: 10.3390/cancers10090331
- Jardin, I., Nieto, J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2020). TRPC6 channel and its implications in breast cancer: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(12), 118828. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118828
- Jardin, I., Diez-Bello, R., Falcon, D., Alvarado, S., Regodon, S., Salido, G. M., Smani, T., & Rosado, J. A. (2021). Melatonin downregulates TRPC6, impairing store-operated calcium entry in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 296. doi: 10.1074/jbc.RA120.015769
- Kaiser, S. E., Brickner, J. H., Reilein, A. R., Fenn, T. D., Walter, P., & Brunger, A. T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure*, 13(7), 1035-1045. doi: 10.1016/j.str.2005.04.010
- Kagiwada, S., Hosaka, K., Murata, M., Nikawa, J. I., & Takatsuki, A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1700-1708. doi: 10.1128/jb.180.7.1700-1708.1998
- Kang, RH., Jang, JE., Huh, E., Kang, SJ., Ahn, DR., Kang, JS., Sailor, MJ., Yeo, SG., Oh, MS., Kim, D. & Kim, HY. (2020). A Brain Tumor-Homing Tetra-Peptide Delivers a Nano-Therapeutic for More Effective Treatment of a Mouse Model of Glioblastoma. *Nanoscale Horiz*, 5(8):1213–25. doi: 10.1039/D0NH00077A

- Kerstein, P. C., Jacques-Fricke, B. T., Rengifo, J., Mogen, B. J., Williams, J. C., Gottlieb, P. A., Sachs, F., & Gomez, T. M. (2013). Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *Journal of Neuroscience*, *33*(1), 273-285. doi: 10.1523/jneurosci.2142-12.2013
- Kim, E. Y., Anderson, M., & Dryer, S. E. (2012). Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *302*(3), 298-307. doi: 10.1152/ajprenal.00423.2011
- Kirmiz, M., Vierra, N. C., Palacio, S., & Trimmer, J. S. (2018). Identification of VAPA and VAPB as Kv2 channel-interacting proteins defining endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions in mammalian brain neurons. *Journal of Neuroscience*, *38*(35), 7562-7584. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0893-18.2018
- Kuritzkes, D., Kar, S., & Kirkpatrick, P. (2008). Maraviroc. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(1). doi: 10.1038/nrd2490
- Kwon, Y., Hofmann, T., & Montell, C. (2007). Integration of phosphoinositide-and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Molecular Cell*, *25*(4), 491-503. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.021
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359-369. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5
- Lepage, P. K., Lussier, M. P., Barajas-Martinez, H., Bousquet, S. M., Blanchard, A. P., Francoeur, N., Dumaine, R., & Boulay, G. (2006). Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(41), 30356-30364. doi: 10.1074/jbc.M603930200
- Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., & Müller, W. E. (2007). Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal*, *21*(14), 4101-4111. doi: 10.1096/fj.07-8110com
- Lev, S., Halevy, D. B., Peretti, D., & Dahan, N. (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology*, *18*(6), 282-290. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.006
- Liu, X., Yao, X., & Tsang, S. Y. (2020). Post-translational modification and natural

- mutation of TRPC channels. *Cells*, 9(1), 135. doi: 10.3390/cells9010135
- Loewen, C. J., Roy, A., & Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal*, 22(9), 2025-2035. doi: 10.1093/emboj/cdg201
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B. T., Bekker-Jensen, D. B., Secher, A., Skovgaard, T., Lundby, C., & Olsen, J. V. (2012). Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Reports*, 2(2), 419-431. doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.006
- Mabonga, L., & Kappo, A. P. (2019). Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophysical reviews*, 11(4), 559-581. doi: 10.1007/s12551-019-00570-x
- Maier, T., Follmann, M., Hessler, G., Kleemann, H. W., Hachtel, S., Fuchs, B., Rütten, H., & Strübing, C. (2015). Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol sensitive TRPC cation channels. *British Journal of Pharmacology*, 172(14), 3650-3660. doi: 10.1111/bph.13151
- Makki J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*, 8:23–31. doi: 10.4137/CPath.S31563
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6), 446-454. doi: 10.1038/nrm2406
- Mikitova, V., & Levine, T. P. (2012). Analysis of the key elements of FFAT-like motifs identifies new proteins that potentially bind VAP on the ER, including two AKAPs and FAPP2. *PLoS One*, 7(1). doi: 10.1371/journal.pone.0030455
- Minke, B. (2001). The TRP channel and phospholipase C-mediated signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 21(6), 629-643. doi: 10.1023/A:1015191702536
- Minke, B. (2006). TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*, 40(3), 261-275. doi: 10.1016/j.ceca.2006.05.002
- Monteith, G. R., Prevarskaya, N., & Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium–cancer signalling nexus. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 373-380. doi: 10.1038/nrc.2017.18
- Murphy, S. E., & Levine, T. P. (2016). VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica Et*

- Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8), 952-961. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.02.009
- Naziroğlu, M., Dikici, D. M., & Dursun. Ş. (2012). Role of oxidative stress and Ca<sup>2+</sup> signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochemical Research* 37(10), 2065-2075. doi: 10.1007/s11064-012-0850-x
- Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 805-812. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.02.002
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 1-11. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218
- Nishida, M., Watanabe, K., Sato, Y., Nakaya, M., Kitajima, N., Ide, T., Inoue, R., & Kurose, H. (2010). Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 13244-13253. doi: 10.1074/jbc.M109.074104
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., & Tanaka, T. (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(1), 21-26. doi: 10.1006/bbrc.1998.9876
- Nurgali, K., Jagoe, R. T., & Abalo, R. (2018). Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Frontiers in pharmacology*, 9, 245. doi: 10.3389/fphar.2018.00245
- Olson, ES., Aguilera, TA., Jiang, T., Ellies, LG., Nguyen, QT., Wong, EH., Gross, LA. & Tsien, RY. (2009). In Vivo Characterization of Activatable Cell Penetrating Peptides for Targeting Protease Activity in Cancer. *Integr Biol (Camb)*, 1(5-6):382–93. doi: 10.1039/b904890a
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, 25(22), 5305-5316. doi: 10.1038/sj.emboj.7601417
- Orellana-Serradell, O., Lavanderos, B., Torres, C., Silva, I., González, M., Rivera, B., Madrid, R., González, W., Poblete, H., Vergara-Jaque, A., & Cerda, O. (2022).

Molecular determinants of the TRPC6 channel association with VAPA. En preparación.

- Ouadid-Ahidouch, H., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Sevestre, H., & Ahidouch, A. (2012). TRP calcium channel and breast cancer: expression, role and correlation with clinical parameters. *Bulletin du Cancer*, *99*(6), 655-664. doi: 10.1684/bdc.2012.1595
- Patil, A., Narvenker, R., Prabhakar, B., & Shende, P. (2020). Strategic consideration for effective chemotherapeutic transportation via transpapillary route in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, *119563*. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119563
- Pawson, T., Raina, M., & Nash, P. (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS letters*, *513*(1), 2-10. doi: 10.1016/S0014-5793(01)032926
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, *38*(3-4), 233-252. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028
- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Renshaw, C. A., Brown, P.O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. doi: 10.1038/35021093
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies?. *Physiological Reviews*, *98*(2), 559-621. doi: 10.1152/physrev.00044.2016
- Prinz, W. A., Toulmay, A., & Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(1), 7-24. doi: 10.1038/s41580-019-0180-9
- Regberg J, Srimanee A & Langel U. Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies. (2012). *Pharmaceuticals (Basel)*. *5*(9):991–1007. doi: 10.3390/ph5090991
- Rao, M., Song, W., Jiang, A., Shyr, Y., Lev, S., Greenstein, D., Brantley-Sieders, D., & Chen, J. (2012). VAMP-associated protein B (VAPB) promotes breast tumor growth by modulation of Akt activity. *PLoS ONE* *7*(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046281
- Reiser, J., Polu, K. R., Möller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R.,

- Mundel, P., Smith, P. R., Clapham, D. E., & Pollak, M. R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics*, *37*(7), 739-744. doi: 10.1038/ng1592
- Ridley, A. J., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, *70*(3), 389-399. doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parson, J. T., & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709. doi: 10.1126/science.1092053
- Saldías, M. P., Maureira, D., Orellana-Serradell, O., Silva, I., Lavanderos, B., Cruz, P., Torres, C., Cáceres, M., & Cerda, O. (2021). TRP channels interactome as a novel therapeutic target in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, *11*, 1-25. doi: 10.3389/fonc.2021.621614
- Santoni, G., Maggi, F., Morelli, M. B., Santoni, M., & Marinelli, O. (2019). Transient receptor potential cation channels in cancer therapy. *Medical Sciences*, *7*(12), 108. doi: 10.3390/medsci7120108
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International Journal of Oncology*, *54*(2), 407–419. doi:10.3892/ijo.2018.4661
- Schulien, A. J., Yeh, C. Y., Orange, B. N., Pav, O. J., Hopkins, M. P., Moutal, A., Khanna, R., Sun, D., Justice, J. A., & Aizenman, E. (2020). Targeted disruption of Kv2. 1-VAPA association provides neuroprotection against ischemic stroke in mice by declustering Kv2.1 channel. *Science Advances*, *6*(27). doi: 10.1126/sciadv.aaz8110
- Seo, K., Rainer, P. P., Hahn, V. S., Lee, D. I., Jo, S. H., Andersen, A., Liu, T., Xu, X., Willette, R. N., Lepore, J. J., Marino Jr, J. P., Birnbaumer, L., Schnackenberg, C. G., & Kass, D. A. (2014). Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(4), 1551-1556. doi: 10.1073/pnas.1308963111
- Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., Nilius, B., & Honoré, E. (2008). TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial

- myogenic response. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(3), 529-540. doi: 10.1007/s00424-007-0432-y
- Shin, Y. C., Shin, S. Y., Chun, J. N., Cho, H. S., Lim, J. M., Kim, So, I., Kwon, D., & Jeon, J. H. (2012). TRIP database 2.0: a manually curated information hub for accessing TRP channel interaction network. *PLoS ONE* 7(10), 2–8. doi: 10.1371/journal.pone.0047165
- Singh, I., Knezevic, N., Ahmmed, G. U., Kini, V., Malik, A. B., & Mehta, D. (2007). Gαq-TRPC6-mediated Ca<sup>2+</sup> entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 7833-7843. doi: 10.1074/jbc.M608288200
- Skehel, P. A., Fabian-Fine, R., & Kandel, E. R. (2000). Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1101-1106. doi: 10.1073/pnas.97.3.1101
- Slee, J. A., & Levine, T. P. (2019). Systematic prediction of FFAT motifs across eukaryote proteomes identifies nucleolar and eisosome proteins with the predicted capacity to form bridges to the endoplasmic reticulum. *Contact*, 2, 1-21. doi: 10.1177/2515256419883136
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., & Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology*, 12(3), 112-120. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02237-1
- Smyth, J. T., Hwang, S. Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C., & Putney, J. W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2337-2349. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01168.x
- Strobl, J. S., Wonderlin, W. F., & Flynn, D. C. (1995). Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *General Pharmacology: The Vascular System*, 26(8), 1643-1649. doi: 10.1016/0306-3623(95)00062-3
- Talbot, B. E., Vandorpe, D. H., Stotter, B. R., Alper, S. L., & Schlondorff, J. S. (2019). Transmembrane insertases and N-glycosylation critically determine synthesis, trafficking, and activity of the nonselective cation channel TRPC6. *Journal of Biological Chemistry*, 294(34), 12655-12669. doi: 10.1074/jbc.RA119.008299
- Thanasomboon, R., Kalapanulak, S., Netrphan, S., & Saithong, T. (2020). Exploring

- dynamic protein-protein interactions in cassava through the integrative interactome network. *Scientific reports*, 10(1), 1-15. doi: 10.1038/s41598-020-63536-0
- Tsai, F. C., & Meyer, T. (2012). Ca<sup>2+</sup> pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Current Biology*, 22(9), 837-842. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.037
- Vega, F. M., & Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters*, 582(14), 2093-2101. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.039
- Wahba, H. A., & El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer biology & medicine*, 12(2), 106. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030
- Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., & Zhu, M. X. (2020). TRPC channels: structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & Therapeutics*, 209, 107497. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107497
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L. S., & Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 457(7231), 901-905. doi: 10.1038/nature07577
- Weir, M. L., Klip, A., & Trimble, W. S. (1998). Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochemical Journal*, 333(2), 247-251. doi: 10.1042/bj3330247
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B. & Hassanali, M. (2008). DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_1), D901-D906. doi: 10.1093/nar/gkm958
- Xu, J., Yang, Y., Xie, R., Liu, J., Nie, X., An, J., Wen, G., Liu, X., Jin, H., & Tuo, B. (2018). The NCX1/TRPC6 complex mediates TGF $\beta$ -driven migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 78(10), 2564-2576. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2061
- Yu, H., Diao, H., Wang, C., Lin, Y., Yu, F., Lu, H., Xu, W., Li, Z., Shi, H., Zhao, S., Zhou, Y., & Zhang, Y. (2015). Acetyl Proteomic Analysis Reveals Functional Implications of Lysine Acetylation in Human Spermatozoa (sperm)\*[S]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(4), 1009-1023. doi: 10.1074/mcp.M114.041384

- Zhang, L., & Saffen, D. (2001). Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms: molecular structures and functional characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 13331-13339. doi: 10.1074/jbc.M008914200
- Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, 50(3), 211-221. doi: 10.1016/j.ceca.2011.03.003
- Zhou, N., Wu, J., Qin, YY., Zhao, XL., Ding, Y., Sun, LS., He, T., Hung, XW., Liu, CB. & Wanf, H. (2017). Novel Peptide MT23 for Potent Penetrating and Selective Targeting in Mouse Melanoma Cancer Cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 120:80–8. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.08.011