

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD  
DE CHILE

**Participación del canal iónico TRPC6 en la regulación de la actividad del factor transcripcional YAP mediante las dinámicas del citoesqueleto de actina**

**BORIS JOAN LAVANDEROS ANDRADE**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

**2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**BORIS JOAN LAVANDEROS ANDRADE**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día ..... de ..... de 2022.

**Prof. Dr. Oscar Cerda Arancibia**  
**Director de Tesis**  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DRA. JENNY FLIEDER**

**PROF. DR. MARCOS FUENZALIDA**

**PROF. DR. AGUSTIN MARTINEZ**

**PROF. DR. PABLO CAVIEDES**  
Presidente Comisión de Examen

## INDICE

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>5</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>CONTRACTILIDAD CELULAR</b> .....	<b>13</b>
<b>LA PROTEÍNA RHOA GTPASA ES EL REGULADOR MAESTRO DE LA CONTRACTILIDAD CELULAR</b> .....	<b>14</b>
<b>LA FAMILIA DE CANALES TRP</b> .....	<b>15</b>
<b>EL CANAL IÓNICO TRPC6</b> .....	<b>17</b>
<b>PARTICIPACIÓN DE TRPC6 EN LA REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA</b> .....	<b>18</b>
<b>RHOTEKIN</b> .....	<b>19</b>
<b>PARTICIPACIÓN DEL COACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL YAP EN LA REPARACIÓN DE HERIDAS</b> .....	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>ANTICUERPOS</b> .....	<b>25</b>
<b>ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>INMUNOFLUORESCENCIA</b> .....	<b>26</b>
<b>ENSAYOS DE PULL-DOWN</b> .....	<b>27</b>
<b>ENSAYO DE LIGACIÓN DE PROXIMIDAD</b> .....	<b>27</b>
<b>ENSAYO DE CONTRACTILIDAD</b> .....	<b>28</b>
<b>ENSAYO G-LISA RHOA</b> .....	<b>28</b>
<b>ENSAYO DE PROPAGACIÓN CELULAR</b> .....	<b>29</b>
<b>MEDICIÓN DE Ca<sup>2+</sup> INTRACELULAR</b> .....	<b>29</b>
<b>BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE</b> .....	<b>29</b>
<b>ENSAYO DE PURIFICACIÓN DE ACTINA</b> .....	<b>30</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>30</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>1. DETERMINAR LA PARTICIPACIÓN DE TRPC6 EN LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA RHOA GTPASA.</b> .....	<b>32</b>
<i>TRPC6 regula la actividad de RhoA</i> .....	32
<i>TRPC6 promueve la polimerización de los filamentos de actina</i> .....	34
<i>TRPC6 regula el tamaño de las adhesiones focales</i> .....	36
<b>2. DETERMINAR EL PAPEL DE LA REGULACIÓN DE TRPC6 SOBRE LA CONTRACTILIDAD CELULAR Y EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL YAP</b> .....	<b>36</b>
<i>TRPC6 regula la contractilidad y migración celular</i> .....	36
<i>La sobreexpresión de TRPC6 regula la localización subcelular del factor transcripcional YAP</i> .....	37
<b>3. CARACTERIZAR LA INTERACCIÓN DE TRPC6 CON RTKN Y SU EFECTO FUNCIONAL</b> .....	<b>38</b>
<i>El canal TRPC6 interactúa con el efector de RhoA, RTKN</i> .....	38
<i>El dominio RBD de RTKN interactúa con TRPC6</i> .....	39

<i>RTKN reduce la contractilidad, migración y spreading celular dependientes de TRPC6.....</i>	<i>41</i>
<i>RTKN disminuye la actividad del canal TRPC6.....</i>	<i>42</i>
<i>RTKN disminuye la localización en membrana plasmática: .....</i>	<i>43</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 1: LISTA DE PUBLICACIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 2: PRESENTACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES Y NACIONALES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de proteínas relacionada al citoesqueleto de actina identificadas por espectrometría de masa asociadas a TRPC6 .....	19
Tabla N°2: Lista de Anticuerpos .....	25

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de activación de la GTPasa RhoA .....	15
Figura 2. Estructura del canal TRPC6 .....	18
Figura 3. Mecanismos de regulación del factor transcripcional YAP .....	22
Figura 4. TRPC6 Regula la actividad de RhoA y la morfología del citoesqueleto de actina .....	33
Figura 5. TRPC6 regula la formación de filamentos de actina y adhesiones focales .....	35
Figura 6. TRPC6 promueve la contracción y migración celular .....	37
Figura 7. La sobreexpresión de TRPC6 incrementa la localización nuclear de YAP .....	38
Figura 8. TRPC6 interactúa con el dominio RBD de RTKN .....	40
Figura 9. RTKN previene los efectos dependientes de TRPC6 en contracción, migración y <i>spreading</i> celular .....	41
Figura 10. RTKN reduce la actividad de TRPC6 .....	43
Figura 11. RTKN disminuye la presencia de TRPC6 en la membrana plasmática .....	45
Figura 12. Modelo propuesto de tráfico y señalización de TRPC6 en la contracción celular .....	54



## FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por:

-Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (MiNICAD), Iniciativa Científica Milenio, Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) (Oscar Cerda)

-FONDECYT 1200917, ANID (Oscar Cerda)

-Beca de Doctorado ANID N° 21181611 (Boris Lavanderos)

-Beca de Apoyo de Gastos Operacionales ANID (Boris Lavanderos)

## RESUMEN

La contractilidad celular es un mecanismo implicado en diversos procesos celulares como la cicatrización de heridas y la contracción arterial, entre otros. La actividad de los canales iónicos se ha asociado con la regulación de la contractilidad, a través de la modulación de vías de señalización que regulan propiedades mecánicas y del citoesqueleto de actina, como la proteína RhoA GTPasa. Diversos reportes han relacionado a/ canal catiónico no selectivo permeable a calcio TRPC6 en la reparación de distintos tejidos e incluso en fibrosis. Así mismo, diversas mutaciones de ganancia de función de TRPC6 están asociadas a enfermedades en las que se deterioran el citoesqueleto de actina, afectando la contractilidad celular. De esta manera, el estudio de los mecanismos moleculares por los que se regula la actividad de TRPC6 puede aportar nuevas evidencias para el uso de este canal como posible blanco terapéutico. Aunque el canal TRPC6 se sugiere como un regulador de la dinámica del citoesqueleto de actina, los eventos celulares que se desencadenan tras la activación de este canal han sido poco explorados. La proteína RhoA GTPasa monomérica permite la formación de filamentos de actina y adhesiones focales, modulando así la contractilidad celular y promoviendo la expresión de genes asociados a la contracción a través de la modulación del factor transcripcional YAP. Por lo tanto, la regulación de RhoA podría ser un evento clave para controlar la contractilidad celular. Sumado a esto, empleando espectrometría de masa se identificó que el efector de RhoA, Rhotekin (RTKN) está asociado al canal TRPC6, lo cual podría ser un novedoso regulador de la actividad de este canal. Tomando en consideración estas evidencias la hipótesis de esta tesis señala que: “El canal TRPC6 interactúa con la proteína RTKN y aumenta la actividad de la proteína RhoA y las dinámicas de citoesqueleto de actina, induciendo la activación del factor transcripcional YAP y la contractilidad celular”. Para comprobar esta hipótesis, se emplearon diversas técnicas de biología celular y molecular con el objetivo general de determinar la participación del canal TRPC6 en la regulación de la actividad de YAP dependiente de RhoA y el citoesqueleto de actina en la contractilidad celular y la reparación de heridas. Esta tesis contempla el desarrollo de 3 objetivos específicos:

**1. Determinar la participación de TRPC6 en la activación de la proteína RhoA GTPasa y las dinámicas del citoesqueleto de actina:**

Para determinar el efecto de TRPC6 sobre la activación de RhoA se usaron diversas herramientas de imágenes y bioquímica que permitieron monitorear en tiempo real la actividad de RhoA. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el canal TRPC6 promueve la actividad de RhoA. Así mismo, la modulación de la expresión de TRPC6 regula la formación y disposición de los filamentos de actina y las adhesiones focales, dos componentes celulares requeridos para la contracción de la célula. Los datos obtenidos sugieren que el canal TRPC6 regula la actividad de RhoA, alterando la dinámica de los filamentos de actina y las adhesiones focales.

## **2. Determinar el papel de la regulación de TRPC6 sobre la contractilidad celular y el factor transcripcional YAP:**

Los ensayos de contractilidad en geles tridimensionales de colágeno mostraron que el canal TRPC6 promueve la contracción de células HeLa. De la misma manera, la modulación de la expresión del canal regula la migración celular. Estos datos serían consistentes con los efectos observados en el primer objetivo. Así mismo, la sobreexpresión de TRPC6 aumenta la localización nuclear de YAP, lo cual podría indicar la regulación de este factor por parte del canal. Estos datos proponen a TRPC6 como un regulador de la contracción y la migración celular, sugiriendo un posible efecto sobre la expresión de genes dependientes de YAP

## **3. Caracterizar la interacción de TRPC6 con RTKN y su efecto funcional:**

Combinando diversas aproximaciones bioquímicas y bioinformáticas se confirmaron los datos obtenidos de espectrometría de masa. Específicamente, los datos muestran que RTKN interactúa a través de su dominio RBD con el canal TRPC6. Empleando el uso de diversas sondas para monitorear los cambios en el calcio intracelular se observó que RTKN disminuye la actividad de TRPC6. Los ensayos de biotilación de proteínas de superficie, así como mediciones de microscopía TIRF sugieren que RTKN reduce la abundancia de TRPC6 en la membrana plasmática, aumentando la localización del canal en endosomas tempranos. Estos datos sugieren a RTKN como un nuevo regulador de TRPC6.

En conjunto, los datos obtenidos en este trabajo doctoral proporciona nuevas evidencias sobre el efecto del canal TRPC6 sobre la contractilidad y migración celular, a través de la regulación de RhoA, el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales.

Sumado a esto, a través de distintas herramientas se identificó a la proteína RTKN como nuevo regulador del tráfico retrógrado de TRPC6, afectando la actividad de este canal. Estos hallazgos aportan nuevos datos que permiten posicionar al canal TRPC6 como un interesante blanco para regular procesos fisiológicos dependientes de la contracción celular, así como posibles terapias aplicadas a patologías en las cuales este canal presente una ganancia de función.

## ABSTRACT

Cellular contractility is involved in various cellular processes, such as wound healing and arterial contraction. Ion channels' activity has been associated with regulating contractility through the modulation of signaling pathways that regulate mechanical properties and the actin cytoskeleton, such as RhoA GTPase. Several reports have related to the nonselective calcium-permeable cation channel TRPC6 in repairing different tissues and even fibrosis. Conversely, TRPC6 gain-of-function changes are associated with diseases in which the actin cytoskeleton and cell contractility are impaired. Thus, studying the molecular mechanisms by which TRPC6 activity is regulated may provide new evidence for using this channel as a therapeutic target. Although the TRPC6 channel is suggested as a regulator of the dynamics of the actin cytoskeleton, the cellular events triggered after this channel's activation remain unclear. The monomeric RhoA GTPase allows the formation of actin filaments and focal adhesions, thus modulating cell contractility and promoting the expression of genes associated with contraction through the modulation of the transcriptional factor YAP. Therefore, regulating RhoA could be a key event in controlling cell contractility. Also, we found that Rhotekin (RTKN), a RhoA effector, is associated with the TRPC6 channel using mass spectrometry, which could be a novel regulator of the activity of this channel. Thus, the hypothesis of this thesis suggests that: "The TRPC6 channel interacts with the RTKN protein and increases the activity of the RhoA protein and the dynamics of the actin cytoskeleton, inducing the activation of the transcriptional factor YAP and cell contractility". This thesis considers three specific aims:

**1. To determine the participation of TRPC6 in activating the RhoA GTPase protein and the dynamics of the actin cytoskeleton:** We used imaging and biochemical tools to determine the effect of TRPC6 on RhoA activation, to monitor RhoA activity in real-time. The results obtained suggest that the TRPC6 channel promotes RhoA activity. Conversely, the modulation of the expression of TRPC6 regulates the formation and arrangement of actin filaments and focal adhesions, two cellular components required for cell contraction. The data obtained suggest that the TRPC6 channel regulates the activity of RhoA, altering the dynamics of actin filaments and focal adhesions.

## **2. Determine the role of TRPC6 regulation on cell contractility and the transcriptional factor YAP:**

Contractility assays in three-dimensional collagen gels showed that the TRPC6 channel promotes HeLa cell contraction. Similarly, the modulation of TRPC6 channel expression regulates cell migration. These data would be consistent with the effects observed in the first objective. Likewise, the overexpression of TRPC6 increases the nuclear localization of YAP, which could indicate the regulation of this factor by the channel. These data propose TRPC6 as a regulator of cell contraction and migration, suggesting a possible effect on YAP-dependent gene expression.

## **3. Characterize the interaction of TRPC6 with RTKN and its functional effect:**

We confirmed the data obtained from mass spectrometry by combining several biochemical and bioinformatic approaches. Our data shows that RTKN interacts with the TRPC6 channel through its RBD domain. Also, we observed that RTKN decreases the activity of TRPC6. Surface protein biotinylation assays suggest that RTKN reduces the abundance of TRPC6 at the plasma membrane. These data indicate that RTKN is a new regulator of TRPC6.

The data obtained provide new evidence on the effect of the TRPC6 channel on cell contractility and migration through the regulation of RhoA, the actin cytoskeleton, and focal adhesions. In addition, RTKN protein was identified as a new regulator of TRPC6 retrograde trafficking. These findings provide new data that allow us to position the TRPC6 channel as an interesting target to regulate physiological processes dependent on cell contraction, as well as possible therapies applied to pathologies in which this channel presents a gain of function.

## INTRODUCCIÓN

Diversos procesos fisiológicos requieren cambios celulares, tanto a nivel químico como físico. En este sentido, la contracción celular es uno de los mecanismos que permite dicha adaptación para así preservar la funcionalidad de los tejidos. Por ejemplo, la contracción celular es requerida para el cierre de heridas en diversos tejidos (Gurtner *et al.* 2008), así como también durante la contracción arterial para regular el tono vascular y el flujo sanguíneo (Brozovich *et al.* 2016). Así mismo, la contracción es requerida para la correcta organización de distintos tejidos epiteliales (Hara 2017). Mutaciones o desregulaciones en la maquinaria celular implicada en la contracción celular puede conllevar a diversas patologías tales como problemas en el desarrollo (Jaalouk & Lammerding 2009), así como también síndromes cardíacos y musculares (Tajsharghi & Oldfors 2013) e incluso cáncer (Runel *et al.* 2021). Por lo tanto, comprender las bases celulares y moleculares que gobiernan el proceso de contracción celular no solamente aporta nuevas evidencias si no que permite identificar nuevos blancos terapéuticos para patologías relacionadas a problemas con la contracción celular.

### Contractilidad celular

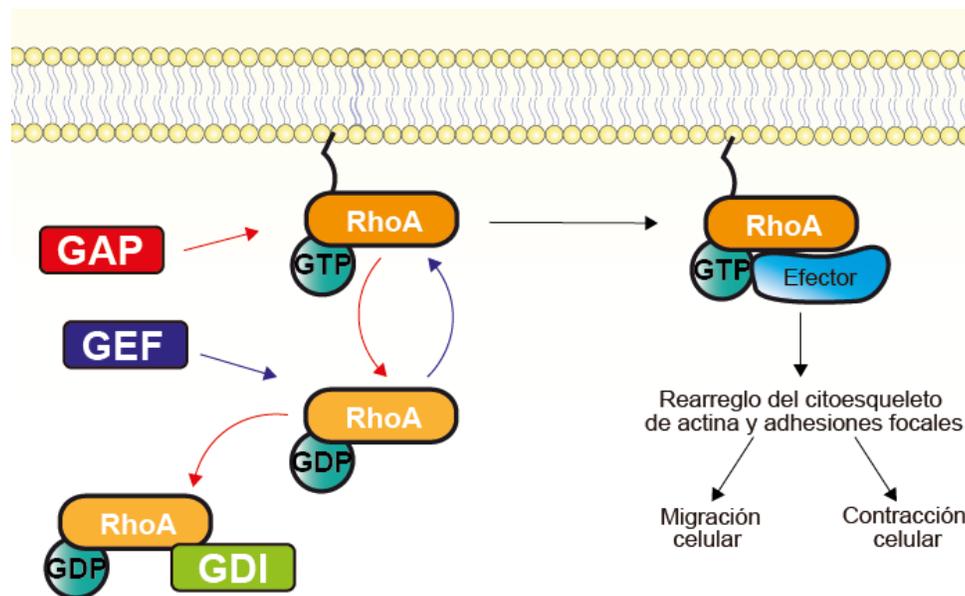
La contracción celular es el proceso por el cual las células ejercen fuerza sobre una superficie como la matriz extra celular (MEC) o sobre otra célula, produciendo una respuesta celular mecánica y/o bioquímica (Boys & Owens 2021). La contracción celular es un proceso complejo en el cual se coordina la acción de diversas proteínas, siendo uno de los componentes más relevantes el citoesqueleto de actina. La fuerza que ejercen los filamentos de actina durante la contracción celular es regulada por la fosforilación de la cadena liviana de la miosina (MLC, del inglés *Myosin Light Chain*). Esta modificación induce un cambio conformacional en la porción que interactúa con los filamentos de actina, permitiendo el desplazamiento y la retracción del citoesqueleto, desencadenando la contracción celular (Rottner *et al.* 2017). Existen dos mecanismos de regulación de la fosforilación de la MLC. Por una parte, un incremento transitorio del  $Ca^{2+}$  intracelular conlleva a la activación rápida de la quinasa de la MLC (MLCK, del inglés MLC *Kinase*), lo cual produce la fosforilación y activación de la MLC

(Burridge & Chrzanowska-Wodnicka 1996), generando un mecanismo rápido para la contracción de los filamentos de actina (Kato *et al.* 2001). Por otro lado, una vía alternativa al mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  implica la GTPasa pequeña RhoA, la cual activa directamente a la quinasa asociada a RhoA (ROCK, del inglés **Rho-associated Kinase**), culminando en una activación sostenida de la MLC (Matthews *et al.* 2006). Por tanto, la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de la GTPasa RhoA podrían ser un mecanismo para regular la contractilidad celular y por ende la reparación tisular.

### **La proteína RhoA GTPasa es el regulador maestro de la contractilidad celular**

La familia Rho de GTPasas monoméricas son proteínas que permiten la transducción de señales a través de su mecanismo de activación cíclica (Hodge & Ridley 2016) (Fig.1). Las proteínas Rho son activadas por los factores intercambiadores de nucleótidos (GEF, del inglés **Guanine nucleotide Exchange Factors**), las cuales permiten la unión de GTP a las proteínas Rho y así la activación de efectores de la señalización. Mediante la acción de las proteínas GAP (del inglés **GTPase-Activating Proteins**) se cataliza la hidrólisis de GTP a GDP, inactivando a las proteínas Rho (Schaefer, Reinhard, & Hordijk 2014). Si bien sus funciones biológicas son diversas, en términos de la contractilidad celular, la GTPasa RhoA es el regulador maestro (Bement, Miller, & Von Dassow 2006; Jackson *et al.* 2011; Paterson *et al.* 1990). A través de la activación de sus efectores, RhoA regula la polimerización de nuevos filamentos de actina (Mizuno & Watanabe 2012), así como también el tamaño de adhesiones focales (Ridley & Hall 1992) y la contracción del citoesqueleto de actina, como se comentó previamente. En conjunto, la activación de los efectores mDia1 y la quinasa ROCK se promueve la retracción de los filamentos de actina, promoviendo la contracción celular. Sumado a esto, se ha descrito que a través de la activación de RhoA y su efecto sobre el citoesqueleto de actina, es posible modular la función de algunos factores de transcripción relacionados a la contracción celular, como el factor YAP (del inglés **Yes Associated Protein**) (Halder, Dupont, & Piccolo 2012). Por tanto, la regulación de RhoA es un punto central en la contractilidad celular. En este sentido, los mecanismos regulatorios de la actividad de RhoA son variados (Buchsbaum 2007).

Mediante diversas aproximaciones se ha podido determinar la regulación que ejercen algunos canales iónicos sobre la activación de RhoA. En este sentido, la activación de los canales iónicos produce aumentos localizados y transitorios de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o depolarizaciones locales (Sato *et al.* 2019; Simon *et al.* 2010), la cual modula entre otros efectos la actividad de RhoA, conllevando el reordenamiento del citoesqueleto de actina (Lavanderos *et al.* 2020) y finalmente la expresión de genes relacionados a la contracción y reparación tisular (Pardo-Pastor *et al.* 2018). Combinando diferentes sondas para monitorear de manera simultánea los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la actividad de RhoA, recientemente se observó que distintos canales mecanosensibles activan a RhoA, dentro de los cuales se encuentran algunos canales de la familia TRP, como TRPC6 (Varadarajan *et al.* 2022). Por tanto, la regulación de los canales iónicos emergen con un blanco interesante para modular la contractilidad celular mediante la activación de RhoA.



**Figura 1. Ciclo de activación de la GTPasa RhoA.** La forma activa de RhoA se une a GTP, el cual se inserta en la membrana plasmática mediante un tallo GPI. Las proteínas GEF estabilizan la unión de GTP a RhoA (flechas azules). RhoA se inhibe por la hidrólisis de GTP a GDP (flechas rojas), mediante las proteínas GAP. Las proteínas GDI impiden el intercambio de GDP a GTP, inactivando a RhoA. El estado activo de RhoA permite la unión de distintos efectos que, entre otras funciones, promueven el reordenamiento del citoesqueleto de actina y las adhesiones focales. El citoesqueleto de actina media múltiples procesos dependiendo de los tipos de células, tales como migración y contracción celular.

## La familia de canales TRP

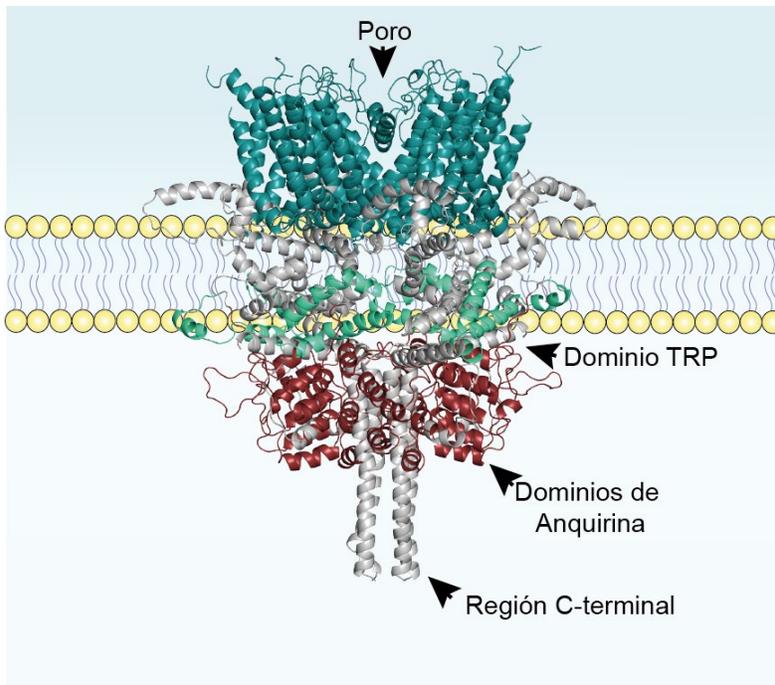
El primer miembro de la familia TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) fue identificada en 1989 en estudios en la mosca de la fruta (Montell & Rubin 1989).

En este sentido, se identificó una mutación en los fotoreceptores que generaba una respuesta transitoria a la luz, distinta a la respuesta sostenida observada en el modelo silvestre (Montell & Rubin 1989). Actualmente, se han identificado 27 miembros en humano (Venkatachalam & Montell 2007), con algunas características en común. Cada subunidad posee 6 dominios transmembrana con los extremos amino (N) y carboxilo (C) orientados hacia el citoplasma. La región del poro de selectividad se ubica entre los dominios transmembrana 5 y 6. Además, el canal funcional se forma mediante la interacción de 4 subunidades (Clapham 2003). A pesar de la alta similitud de los canales TRP en los dominios transmembrana, presentan varias diferencias en los segmentos citoplasmáticos. Es por esto que los canales TRP se divide en 6 subfamilias (TRPC, TRPM, TRPML, TRPV, TRPP y TRPA), dada la presencia de distintos dominios y segmentos que los permiten agrupar. En su mayoría, los canales TRP tienen una permeabilidad no selectiva a cationes (Owsianik *et al.* 2006), con la excepción de TRPM4 y TRPM5 que son permeables solamente a cationes monovalentes pero son activados por  $Ca^{2+}$  (Launay *et al.* 2002; T. Hofmann *et al.* 2003). Debido a la naturaleza polimodal de su activación, los canales TRP son activados tanto por compuestos exógenos (Bandell *et al.* 2004), temperatura (Peier *et al.* 2002), pH (Soyombo *et al.* 2006) y ligandos endógenos como lípidos (Hofmann *et al.* 1999a). Dada la versatilidad de activadores y la expresión de estos canales en los distintos tejidos, las funciones celulares descritas son variadas (Yue & Xu 2021). En terminos del efecto sobre el citoesqueleto de actina y la contractilidad celular, algunos miembros de esta familia han sido relacionados (Lavanderos *et al.* 2020; Canales *et al.* 2019). Usando estrategias de silenciamiento y activación farmacológica, se ha determinado que TRPM8 (Xiong *et al.* 2017), TRPM7 (Su *et al.* 2011) y TRPV4 (McCray *et al.* 2021) aumentan la actividad de RhoA. Por otro lado, otros miembros como TRPC5 (Tian *et al.* 2010) y TRPV2 (Laragione, Harris, & Gulko 2019) inhiben la actividad de RhoA. A pesar de las diversas evidencias en distintos modelos y contextos celulares, los mecanismos moleculares han sido poco explorados. Por una parte, mediante espectometría de masa e inmunoprecipitación se determinó que el canal TRPV4 interactúa con la forma inactiva de RhoA, regulando la retracción del citoesqueleto de actina en neuronas (McCray *et al.* 2021). Por otro lado, usando un modelo de reparación epitelial se observó que la

inhibición de los canales TRP mecanosensibles reducen la actividad de RhoA, en donde se incluye TRPC6 (Varadarajan *et al.* 2022). Sumada las distintas evidencias que sugieren una relación funcional de TRPC6 sobre RhoA (Tian *et al.* 2010; Yang *et al.* 2013) y su participación en procesos fisiológicos relacionados a la contractilidad celular (Hofmann *et al.* 2017; Wu *et al.* 2017), es que este canal adquiere una notoria relevancia.

### **El canal iónico TRPC6**

El sexto miembro de la familia TRPC es un canal catiónico no selectivo permeable mayoritariamente a  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na}=5$ ) que presenta doble rectificación a potencial (Dietrich *et al.* 2005), activado de manera endógena por el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) (Hofmann *et al.* 1999b). Así mismo, diversas publicaciones sugieren que TRPC6 puede ser activado por estímulos mecánicos, principalmente a través de estiramiento de la membrana (Spassova *et al.* 2006). El canal TRPC6 es similar a otros miembros de la familia, con algunos dominios particulares (Tang *et al.* 2018). En el extremo N-terminal, el canal TRPC6 posee 4 dominios repetidos de ankirina y un motivo *coiled coil*. En el extremo C-terminal presenta el dominio CIRPIB (del inglés **Cal**-modulin/IP3 **R**eceptor **P**hosphoinositide-**B**inding) de unión al receptor de IP<sub>3</sub> y calmodulina, ambos mecanismos de regulación de la actividad del canal (Kwon, Hofmann, & Montell 2007). TRPC6 posee dos sitios de glicosilación tipo N (Asn<sup>473</sup> y Asn<sup>561</sup>), las cuales regulan tanto su actividad como su localización en la membrana plasmática (Dietrich *et al.* 2003; Talbot *et al.* 2019). En este sentido, los mecanismos descritos para regular la actividad de TRPC6 son variados e incluyen modificaciones postraduccionales (Bousquet, Monet, & Boulay 2010), lípidos (Chaudhuri *et al.* 2017; Xie *et al.* 2020) e interacciones proteína-proteína (Farmer *et al.* 2019; Eun, Alvarez-Baron, & Dryer 2009). Además, diversas herramientas para modular la actividad del canal se han diseñado, tales como activadores e inhibidores (Leuner *et al.* 2007; Maier *et al.* 2015), lo cual facilita su estudio.



**Figura 2. Estructura del canal TRPC6.** Tetrámero de TRPC6. Se muestra la localización de distintos segmentos relevantes para este canal: El poro de permeabilidad, el dominio TRP, así como los dominios de Anquirina y la región C-terminal. Modelo generado gentilmente por la Dra. Ariela Vergara (Universidad de Talca), utilizando la estructura cristalina reportada para TRPC6.

### Participación de TRPC6 en la regulación del citoesqueleto de actina

La expresión de TRPC6 se ha podido validar en distintos tejidos (Beech, Muraki, & Flemming 2004). A través de modelos *knockout* para la expresión de este canal y el uso de activadores e inhibidores se ha podido establecer la función celular de TRPC6 (X. Chen *et al.* 2020). Además, alteraciones y/o mutaciones de este canal están relacionadas con la aparición de patologías tales como distintos tipos de cancer (Saldías *et al.* 2021), glomerulosclerosis focal segmentada (Winn *et al.* 2005) e incluso fibrosis de distintos tejidos (Hofmann *et al.* 2017). A través de distintos ensayos se ha podido determinar que TRPC6 regula el citoesqueleto de actina en diversos tipos celulares tales como neuronas (Tai *et al.* 2008), cardiomiocitos (Leei *et al.* 2019) y podocitos (Dryer, Roshanravan, & Kim 2019). En mayor detalle, el silenciamiento de TRPC6 en podocitos disminuye el número de filamentos de actina y de adhesiones focales a través de la inhibición de RhoA (Tian *et al.* 2010). Estos antecedentes sugieren a TRPC6 como un participante del mecanismo para regular la contractilidad celular a través de RhoA. En este contexto, la delección de TRPC6 reduce la contractilidad de fibroblastos derivados de pulmón (Hofmann *et al.* 2017). Un efecto similar se ha observado en fibroblastos derivados de piel, en donde la delección de TRPC6 reduce la reparación

tisular en un modelo murino, por un mecanismo que implica una modulación de la diferenciación de fibroblastos al fenotipo contractil miofibroblastos (Davis *et al.* 2012). Por tanto, estos datos sugieren que TRPC6 regula la expresión de genes que promueven la reparación tisular. A pesar de las diversas evidencias, los mecanismos moleculares que gatilla TRPC6 sobre el citoesqueleto de actina y la contractilidad celular han sido poco explorados. En este sentido, con el objetivo de identificar nuevas proteínas interactoras de TRPC6 relacionadas al citoesqueleto de actina, en nuestro laboratorio se realizó un ensayo de espectrometría de masa en células HEK293 (del inglés *Human Embryony Kidney*) que sobreexpresan el canal hTRPC6-YFP. Los resultados permitieron identificar diversas proteínas relacionadas al citoesqueleto, tales como RhoA, ARHGEF38 y Rhotekin (Tabla 1). De esta manera, TRPC6 emerge como un interesante blanco terapeutico para regular la correcta reparación tisular en diversos tejidos.

**Tabla 1: Lista de proteínas relacionada al citoesqueleto de actina identificadas por espectrometría de masa asociadas a TRPC6**

Proteínas	Uniprot	Peptido	Covertura
RhoA	P61586	QEPVKPEEGR	5 %
ARHGEF38	Q9NXL2	NFTNDKVQSEGR	2 %
Rhotekin 1	Q9BST9	RPSDSGPPAER	2 %

### **Rhotekin**

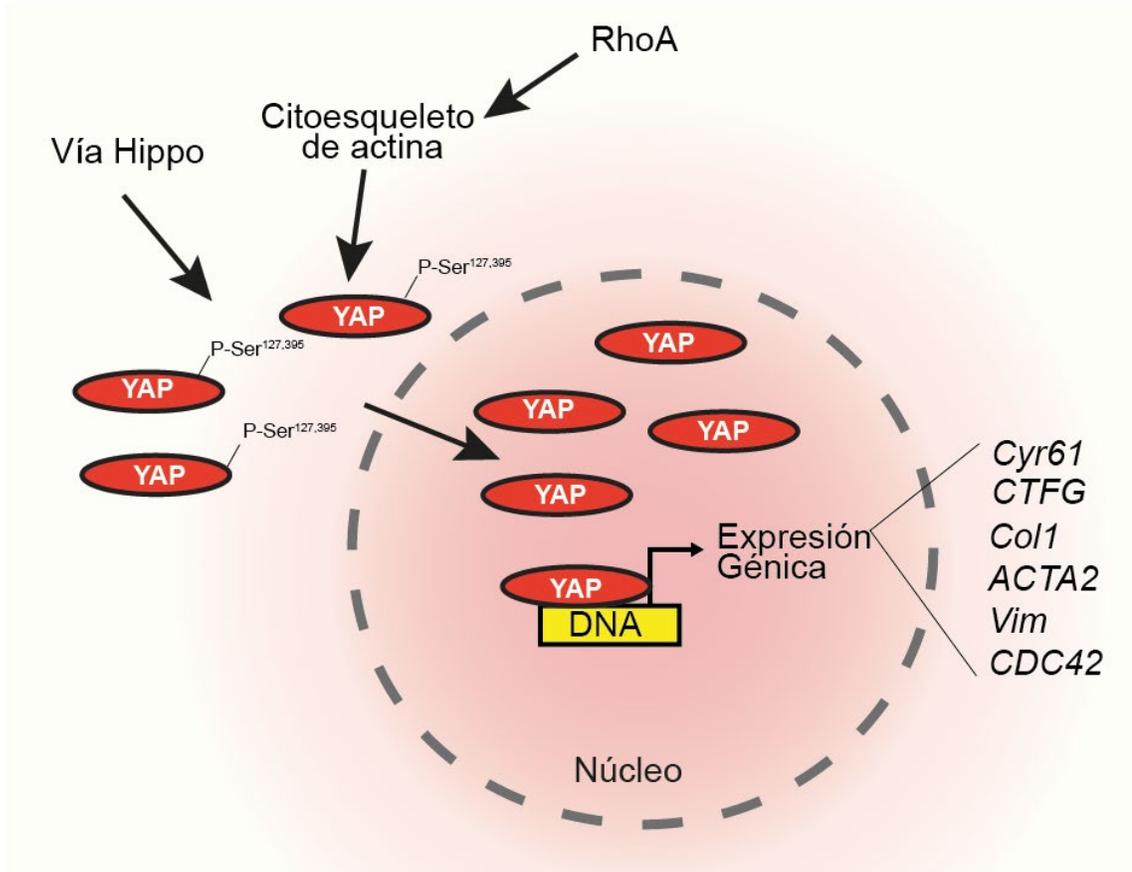
Rhotekin (RTKN) es una de las primeras proteínas descritas como efectoras de RhoA (Reid *et al.* 1996). Las dos isoformas descritas presentan un patron diferencial de expresión. Mientras RTKN-1 se expresa preferencialmente en cerebro (Ito *et al.* 2006), la isoforma 2 (RTKN-2) se expresa principalmente en linfocitos (Collier *et al.* 2004). RTKN se compone de N a C-terminal por los siguientes dominios: el dominio de unión a Rho (RBD, del inglés *Rho-Binding Domain*) que interactúa con la forma activa de RhoA; un dominio de homología Pleckstrin (PH, del inglés *Pleckstrin Homology*) que se une al fosfoinositol PIP<sub>3</sub> y dos motivos ricos en prolina cerca el C-terminal que interactúa con las proteínas que contienen el dominio SH3. Además, RTKN contiene un motivo en la región C-terminal que reconoce las proteínas que contienen el dominio PDZ de clase I (Ito, Morishita, & Nagata 2018). A través del interactoma de RTKN se ha podido determinar la participación en diversos procesos fisiológicos, tales como la

supervivencia y diferenciación de las neuronas (Iwai *et al.* 2012). Además, diversos análisis muestran que RTKN presenta una expresión aumentada en diferentes tipos de modelos de cáncer (Ito, Morishita, & Nagata 2018). A pesar de estas evidencias, la función celular de Rhotekin y su función como efector de RhoA no ha sido estudiada en detalle. Recientemente, se determinó que Rhotekin podría regular la endocitosis de cargos de la membrana plasmática dependiente de los filamentos de actina (Yan *et al.* 2021). El silenciamiento de RTKN reduce el reciclaje basolateral, mientras que la sobreexpresión de RTKN rescata el fenotipo (Yan *et al.*, 2021).

### **Regulación del coactivador transcripcional YAP**

La proteína YAP (del inglés *Yes Associated Protein*) es un regulador transcripcional descrito originalmente como una proteína de interacción a un producto peptídico de un oncogen (Sudol 1994). YAP es el efector final de la vía de señalización Hippo. Esta ruta está compuesta por diversas quinasas que actúan en tandem (quinasas Lats1 y 2, Mst1 y 2) (Noguchi, Saito, & Nagase 2018). La inhibición de la vía Hippo promueve el estado defosforilado de YAP, lo cual permite la translocación al núcleo en donde se une al factor transcripcional TEAD. Esta serie de eventos gatilla la expresión de genes relacionados a diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos tales como el control del tamaño de órganos y la diferenciación de células madre (Moya & Halder 2018), cáncer y la reparación de heridas (Lee *et al.* 2014). Dentro de los blancos transcripcionales descritos para este factor, YAP promueve la expresión de genes ligados a la remodelación del citoesqueleto, la matriz extracelular y diferenciación celular (Mason *et al.* 2019; Piersma *et al.* 2015). A pesar de la relevancia de la vía Hippo, existen otros mecanismos reguladores de YAP asociados principalmente al citoesqueleto de actina y que serían capaces de actuar en paralelo a la vía Hippo (Halder, Dupont & Piccolo 2012). Mediante el uso de inhibidores de la polimerización del citoesqueleto de actina se observó una reducción en la translocación nuclear de YAP (Dupont *et al.* 2011). Este mecanismo es posible debido al aumento de la tensión asociada a los filamentos de actina. De manera interesante, este proceso requiere la activación de RhoA y no depende de Rac1 o los microtúbulos (Halder, Dupont & Piccolo 2012). Utilizando modelos murinos, se observó un retardo en la reparación del tejido dañado cuando se silencia la expresión de YAP, sumado a una disminución en la

contractilidad y síntesis de MEC de los fibroblastos (M. J. Lee *et al.* 2014; Liu *et al.* 2015). Por otro lado, modelos murinos de diabetes han mostrado una disminución en los niveles de la expresión de YAP en fibroblastos cutáneos (Yu *et al.* 2017). De esta manera, la regulación de la actividad de YAP constituye un blanco interesante en la modulación de la contractilidad celular. Recientemente, se ha observado que ciertos canales iónicos participa en la regulación de YAP. Por ejemplo, el canal mecanosensible Piezo1 promueve la acumulación nuclear de, a través de un mecanismo que involucra RhoA y el reordenamiento de los filamentos de actina YAP (Pardo-Pastor *et al.* 2018; Pathak *et al.* 2014). Por otro lado, el canal Orai1 regula la función de YAP a través de un posible mecanismo que involucra los filamentos de actina en un modelo de glioblastomas (Taz *et al.* 2018). Dada la participación de TRPC6 en la regulación del citoesqueleto de actina y la contracción celular, es posible sugerir que exista un mecanismo de regulación de YAP dependiente del canal TRPC6 mediado principalmente por el rearrreglo del citoesqueleto de actina dependiente de RhoA. De esta manera, se pretende dilucidar la contribución de este canal iónico en la contractilidad celular, aportando evidencias acerca de un posible y nuevo mecanismo celular.



**Figura 3. Mecanismos de regulación del factor transcripcional YAP.** La vía de señalización Hippo y los cambios en las propiedades mecánicas dependientes del citoesqueleto de actina y RhoA son los principales reguladores de la actividad de YAP. La fosforilación en los residuos Ser127 y 395 retienen a YAP en el citoplasma. Una vez defosforilado, el factor transloca al núcleo donde se une a regiones del DNA. Se han descrito distintos blancos transcripcionales de YAP dependiendo del tipo celular. En el contexto de contracción celular los más destacados son: *Cyr61* (del inglés **C**ysteine-rich angiogenic inducer **61**), *CTGF* (del inglés **C**onnective **T**issue **G**rowth **F**actor), *Col1* (del inglés **C**ollagen type I), *ACTA2* (del inglés **A**ctin **A**lpha **2**), *Vim* (del inglés **V**imentin) y *CDC42* (del inglés **C**ell **d**ivision control protein **42**).

## **HIPÓTESIS**

La contracción celular es un proceso complejo donde distintas señales son coordinadas, con el fin de preservar la homeostasis y la funcionalidad del tejido. Diversas publicaciones sugieren que el canal TRPC6 está implicado en procesos contractiles de multiples tejidos. Así mismo, la regulación del citoesqueleto de actina a través de la proteína RhoA y sus efectores son un punto central en la modulación de la contractilidad celular. De esta manera, la hipótesis para esta investigación es:

**“El canal TRPC6 interactúa con la proteína RTKN, aumenta la actividad de RhoA y las dinámicas de citoesqueleto de actina, induciendo la activación del factor transcripcional YAP y la contractilidad celular”**

## **OBJETIVO GENERAL**

**“Determinar la interacción de TRPC6 con la proteína RTKN y la participación del canal en la regulación de la actividad de RhoA, las dinámicas del citoesqueleto de actina en la contractilidad celular y el factor transcripcional YAP”.**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Determinar la participación de TRPC6 en la activación de la proteína RhoA GTPasa y las dinámicas del citoesqueleto de actina**
- 2. Determinar el papel de TRPC6 sobre la contractilidad celular y el factor transcripcional YAP**
- 3. Caracterizar la interacción de TRPC6 con RTKN y su efecto funcional**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular y transfecciones

Las células HEK293 y HeLa se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU, catálogo #12100046), complementado con suero fetal bovino al 10 % v/v (FBS; GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EEUU, catálogo #SV30160.03) y 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina. Las células se transfectaron con los diferentes plásmidos usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, catálogo #11668019) y el reactivo Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU, catálogo #15338100) para células HEK293 y HeLa respectivamente.

### Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia, inmunoblot, inmunoprecipitación y los ensayos de ligación por proximidad (PLA; del inglés *Proximity Ligation Assay*) y sus respectivas diluciones de trabajo se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2: Lista de Anticuerpos

Anticuerpo	Isotipo	Técnica	Conc. de uso (µg/mL)	Origen	Tipo	Catálogo	RRID	Purificación
Rabbit anti-TRPC6	IgG	IB	0.5	Sigma-Aldrich	mAb	TA500381	AB_2208624	Asc
Mouse anti-Tubulin	IgG1	IB	0.5	Sigma-Aldrich	mAb	T5168	AB_477579	Asc
Mouse anti-Vinculin	IgG1	IF	Initial Conc. Not Specified by supplier	Sigma-Aldrich	mAb	V4505	AB_477617	Asc
Rabbit anti-Flag	IgG	IB	0.25	Sigma-Aldrich	pAb	F7425	AB_439687	AP
Mouse anti-EGFP	IgG2a	IB/IF/IP	TC Supematant	NeuroMab	mAb	75-132	AB_10672529	-
Mouse anti-EGFP	IgG2b	IB/IF/IP	TC Supematant	NeuroMab	mAb	75-414	AB_2532048	-
Rabbit anti-Actin	IgG	IB	0.25	Cytoskeleton	pAb	AAN01	AB_10708070	AP
Mouse anti-GST	IgG1	IB/IF	TC Supematant	NeuroMab	mAb	N100/13	AB_2877255	-
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-Mouse IgG1	IgG	IF	0.5	ThermoFisher	pAb	A-21121	AB_2535764	AP
Alexa Fluor 647 conjugated goat anti-Mouse IgG1	IgG	IF	0.5	ThermoFisher	pAb	A-32728	AB_2633277	AP
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-Mouse Ig2a	IgG	IF	0.5	ThermoFisher	pAb	A-21131	AB_2535771	AP
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-Mouse IgG2b	IgG	IF	0.5	ThermoFisher	pAb	A-21141	AB_2535778	AP

Asc: del inglés *Ascites* fluids by affinity chromatography; AP: del inglés *Affinity Purified*; mAb: del inglés *monoclonal Antibody*; pAb: del inglés *polyclonal Antibody*; IB: Immunoblot; IF: Inmunofluorescencia; IP: Inmunoprecipitación

### Ensayo de inmunoprecipitación

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los cultivos de células HEK293 se lisaron en un amortiguador de lisis con la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM pH

8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, Triton X-100 1% v/v. Además, se usó un coctel de inhibidores de proteasas y PMSF 1 mM. Los lisados se centrifugaron a 11.000 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-GFP monoclonales de ratón IgG2a y 2b extraídos desde el sobrenadante de hibridomas (Neuromab, Davis, CA, EEUU, clon N86/38 y N86/44, catálogo #75-132 y #75-414 respectivamente), durante 3 horas a 4°C en rotación. Los inmunocomplejos se recuperaron mediante la incubación con 70 µL de proteína G-sefarosa en suspensión al 50 % (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EEUU, catálogo #17061802) durante 1 hora a 4 °C en rotación. Después de la incubación, las muestras se lavaron ocho veces en amortiguador de lavado (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % v/v, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Los inmunocomplejos se eluyeron hirviendo las muestras en amortiguador reductor (Tris-HCl 62,5 mM, SDS al 2 % p/v (MilliporeSigma, catálogo #L5750), glicerol al 10 % v/v (Merck, catálogo #356352) y β-mercaptoetanol al 1 % v/v (Merck, catálogo #8057400250)) durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para su separación por tamaño en una electroforesis SDS-PAGE.

### **Inmunofluorescencia**

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se fijaron durante 15 minutos a 4 °C en solución fijadora [formaldehído al 4 % p/v (recién preparado a partir de paraformaldehído; MilliporeSigma, 4% p/v sacarosa (MilliporeSigma, catálogo #S0389) en PBS de Dulbecco (DPBS), pH 7,4]. Luego, las células se permeabilizaron y bloquearon con una solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1 % v/v, leche descremada en polvo al 4 % p/v en DPBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente, a la dilución de la Tabla 2, disuelto en solución de bloqueo. Las muestras se lavaron 3 veces con solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios se detectaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:1.000 en solución de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 a 200 ng/mL (Thermo Fisher Scientific, catálogo #H3569) disuelto en DPBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces en Triton X-100 al

0,1 % v/v disuelto en DPBS y se montaron con ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, catálogo #P36930). Las imágenes se adquirieron en un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 instalado con una cámara digital mono AxioCam 305, con un objetivo de inmersión en aceite 63X/1.25 NA Plan-Neofluar acoplado al software Zen Blue (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### **Ensayos de pull-down**

Las proteínas de fusión GST y GST-RBD fueron expresada en *Escherichia coli* DH5a. Las bacterias se cultivaron en caldo Luria Bertani durante toda la noche a 37°C en una incubadora con agitación. A continuación, se indujo la expresión de la proteína de fusión GST mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM durante 4 horas a 37°C. Las bacterias fueron centrifugadas y se resuspendieron en amortiguador de lisis (150 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, pH 7,4) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasa y PMSF 1 mM por sonicación. El lisado se centrifugó durante 15 min a 11.000 g a 4 °C, y el sobrenadante se sometió a purificación por afinidad en glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare, #17-0756-01) durante 2 h a 4 °C. La columna se lavó 5 veces con amortiguador de lavado. Para el ensayo de *pull-down*, las proteínas de fusión GST inmovilizadas fueron incubadas con lisados de células HeLa transfectadas con hTRPC6-YFP o EGFP. Las células HeLa se lisaron en amortiguador de lisis que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, Triton X-100 al 1% v/v, PMSF 1 mM y PIC 1X. Los lisados se centrifugaron a 11.000 g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se incubaron con la resina con GST-RBD o GST durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación se lavaron 6 veces en amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, Triton X-100 al 1% v/v) y los complejos se eluyeron con amortiguador de reductor para posteriormente separar las muestras por tamaño en SDS-PAGE.

### **Ensayo de ligación de proximidad**

Los ensayos se llevaron a cabo usando el Kit Duolink in Situ Red Starter Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich, #DUO92101) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se

fijaron y permeabilizaron como se describe en la sección anterior, seguido de una incubación de 1 h a 37 °C en solución de bloqueo. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en una cámara húmeda. Se añadieron anticuerpos primarios anti-GFP IgG2A de ratón (Neuromab, clon N86/38, #75-132) y anti-FLAG de conejo (Sigma-Aldrich, #F7425) y las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados con oligonucleótidos durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados, se añadió la solución de ligación y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, seguido de una incubación de 100 minutos con la solución de amplificación a 37 °C. Las muestras se montaron y las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó con el software Fiji/Image J y se expresó como intensidad de fluorescencia por célula como se describió anteriormente (Rivas *et al.*, 2020). Los ajustes de adquisición fueron idénticos para todas las imágenes.

### **Ensayo de contractilidad**

250000 células HeLa fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de DMEM frío sin suero y se mezclaron con colágeno tipo I (2,5 mg/mL). Las muestras se incubaron en placa de 48 pocillos durante 30 min a 37°C. Al final del tiempo indicado, se añadió DMEM 10% FBS a cada pocillo. Los resultados se expresan como la diferencia del área de gel de colágeno en relación al área total del pocillo.

### **Ensayo G-LISA RhoA**

Para analizar la actividad RhoA GTPasa, se realizó el ensayo G-LISA (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EEUU, catálogo #BK124) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se privaron de suero durante 4 h y se indujo la actividad de Rho GTPasas con FBS al 10 % en diferentes momentos. Se usaron 30  $\mu$ g de proteína total para cada ensayo. Los datos se presentan como la señal de cada condición frente a las células no estimuladas.

## **Ensayo de propagación celular**

Después de la tripsinización, las células se sembraron en placas sobre un cubreobjetos de 12 mm recubierto con fibronectina (10 µg/mL) (MilliporeSigma, catálogo #FC010). Al final del tiempo definido, las células fueron fijadas y fueron sometidas a una inmunofluorescencia según los métodos descritos previamente. El área de las células se midieron utilizando el software Fiji/ImageJ.

## **Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Las células HeLa se sembraron 24 h antes de los experimentos en cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro recubierto con fibronectina (5 µg/mL). Para el registro de calcio, las células se cargaron con 5 µM de Fura-2AM en solución Ringer modificada (en mM: NaCl 140, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, glucosa 10, pH 7,4). Los registros fueron ejecutados en un microscopio invertido Eclipse Ti2-U (Nikon, Tokio, Japón) controlado con el software Micromanager 1.4 (Vale Lab, University of California, San Francisco, CA, EE. UU). Las imágenes se adquirieron cada 5 s mediante la excitación alterna de la luz a 340 y 380 nm, y la emisión se capturó a 510 nm. Solo para los experimentos con Hyperforin, las imágenes se adquirieron cada 2 s. Se calculó la relación entre 340 y 380, y todos los datos se presentan como el cambio en unidades de relación ( $\Delta F = (F - F_0)/F_0$ ).

## **Biotinilación de proteínas de superficie**

Las células HeLa se cultivaron hasta una confluencia del 80%-90% en placas de cultivo de 35 mm. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con DPBS frío a pH 8.0 y se incubaron con 500 µg/mL EZ-link sulfo-NHS-LC-biotina (ThermoFisher Scientific, catálogo #21335) disuelto en DPBS (pH 8,0) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción terminó con solución de bloqueo (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 8,0) y las células se lavaron dos veces con PBS helado. Las células marcadas con sulfo-NHS-biotina se lisaron como se describe en la sección de inmunoprecipitación, y los lisados se incubaron con estreptavidina-agarosa (ThermoFisher Scientific, catálogo #20351) durante la noche a 4°C. Las proteínas

precipitadas se lavaron 5 veces con amortiguador de lisis sin inhibidor de proteasas y se eluyeron con amortiguador reductor y se resolvieron en SDS-PAGE.

### **Ensayo de purificación de actina**

Las células HeLa transfectadas y sembradas en placas de 60 mm fueron depletadas de suero durante 3 h y se estimularon con FBS al 10 % en DMEM durante 30 min. La purificación de la fracción globular (G) y filamentosa (F) de actina se realizó utilizando el G-Actin/F-Actin In Vivo Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, catálogo #BK037) de acuerdo con el protocolo de fabricación. Brevemente, se usaron para cada placa 300  $\mu$ L de amortiguador de lisis precalentado preparado con solución de control potenciadora de actina F, ATP y PIC. Las células se rasparon y los lisados se incubaron durante 10 min a 37°C. Los restos celulares remanentes se descartaron con una centrifugación de 5 min a 300 g. Para precipitar la porción de actina F, se centrifugaron 100  $\mu$ L de cada lisado a 100.000 g durante 1 hora a 37°C. El sobrenadante, que contenía la porción de actina G, se eluyó con amortiguador reductor y el sedimento se resuspendió y se incubó durante 1 h en 100  $\mu$ L de solución fría de despolimerización de actina F. Finalmente, la porción de actina F se eluyó en amortiguador reductor y las muestras se separaron con SDS-PAGE. El control negativo se realizó con un tratamiento de 30 min de las células con 10  $\mu$ M de Latrunculin A (Tocris, catálogo #3973) en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Por otro lado, el control positivo se realizó con un tratamiento de 0,5  $\mu$ M de Jasplakinolide (Tocris, catálogo #2792) en FBS al 10% con DMEM, por 30 min. Los resultados se analizaron por densitometría utilizando el software Fiji/ImageJ

### **Análisis Estadístico**

Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces independientes, como se indica en las leyendas de las figuras. Los datos fueron recolectados, cuantificado y expresado como el promedio junto a su desviación estándar o error estándar. Datos normalizados se compararon con los respectivos controles usando Prism v.9.0 (Software GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.). Previo al análisis estadístico, los grupos de datos fueron analizados mediante test de normalidad, para evaluar la distribución

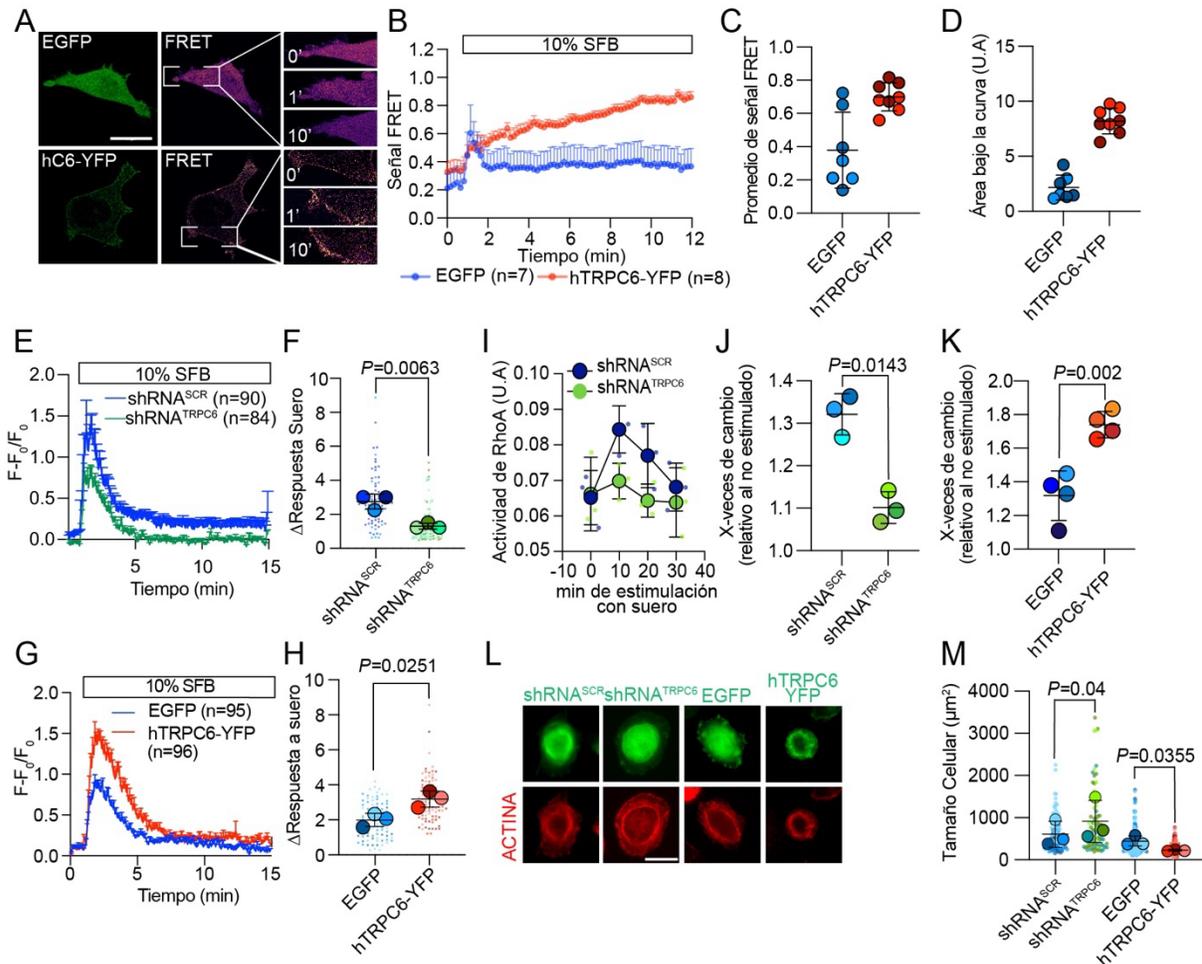
gausiana de los datos (Ghasemi & Zahediasl 2012). Si los datos presentan una distribución normal, se aplicó una prueba T de Student paramétrica no pareado. Por otro lado, para los datos con distribución distinta de la normal, se aplicó una prueba T de Student no paramétrica (prueba de Mann-Whitney). En el caso de los experimentos con más de dos grupos de datos, se aplicó análisis de varianza (ANOVA) siguiendo el mismo criterio de la distribución normal de los datos. Para los datos con distribución distinta de lo normal, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis. Para establecer diferencia significativa entre dos o más grupo de datos, se definió un valor de  $P < 0.05$ . Los datos fueron graficados siguiendo la estructura de un *SuperPlot* (Lord *et al.* 2020), lo cual permite observar la distribución de cada experimento independiente, con su respectivo promedio.

## RESULTADOS

### 1. Determinar la participación de TRPC6 en la activación de la proteína RhoA GTPasa.

#### TRPC6 regula la actividad de RhoA

Las proteínas Rho GTPasas monoméricas son las principales entidades moleculares que regulan la dinámica de la actina y los procesos celulares que dependen de la arquitectura del citoesqueleto (Boulter *et al.* 2012). Entre ellos, RhoA es el “switch” molecular para inducir la adquisición de un fenotipo contráctil (Amano *et al.* 1997). En este contexto, varios autores han propuesto que TRPC6 aumenta la actividad de RhoA en modelos de podocitos (Tian *et al.* 2010; Yang *et al.* 2013). Usando células HeLa y diferentes técnicas para monitorear la actividad de RhoA, confirmamos estas observaciones (Fig.4). El biosensor basado en FRET para monitorear la actividad espaciotemporal de RhoA mostró que la sobreexpresión de TRPC6 aumenta la actividad de RhoA inducida por suero en células previamente deprivadas (Fig. 4A-D). Interesantemente, esta misma estimulación con suero induce un aumento transitorio del  $Ca^{2+}$  intracelular que depende de la expresión de TRPC6, pues el silenciamiento de este canal reduce la señal evocada por suero (Fig. 4E-F). De esta misma manera, la sobreexpresión de TRPC6 aumenta la respuesta de calcio intracelular al tratamiento con suero (Fig.4G-H). Para corroborar estos datos, utilicé un método basado en el ensayo ELISA, para detectar la actividad endógena de RhoA. Siguiendo las recomendaciones de la comisión evaluadora (Anexo 1 y 2), se realizó un análisis temporal de la activación de RhoA mediante la aplicación de suero y se comparó en función de la respuesta de células no estimuladas con suero. De manera consistente, la estrategia basada en shRNA reduce la activación transitoria de RhoA por el suero en una etapa temprana (Fig. 4I-J), lo cual es acorde con la activación transitoria de RhoA (Ridley *et al.* 1992). Por otro lado, la sobreexpresión de TRPC6 aumenta la actividad de RhoA cuando se compara con la condición de control (Fig. 4K). En conjunto, estos datos sugieren la regulación positiva que ejerce TRPC6 sobre RhoA, acorde con reportes previos.



**Figura 4. TRPC6 Regula la actividad de RhoA y la morfología del citoesqueleto de actina.** (A) Imágenes representativas de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Escala: 20  $\mu\text{m}$ . A su derecha, se muestra la señal FRET correspondiente para cada célula y el cambio de la señal a los tiempos indicados. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. (B) Gráfico de la señal FRET normalizada en función del valor máximo ( $\pm$  error estándar) en respuesta a la aplicación de suero fetal bovino (FBS). (C) Señal FRET máxima promedio de dos experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar), graficada en formato de SuperPlot. Círculos corresponden al valor de cada célula registrada en un experimento. El Código de colores indica las células correspondientes al mismo experimento. (D) Gráfico del área bajo la curva ( $\pm$  desviación estándar) de los registros observados en (B). Círculos corresponden al valor de cada célula registrada en un experimento. El código de colores indica las células correspondientes al mismo experimento. (E) Registro del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con la sonda FURA-2AM ( $\pm$  error estándar) en células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados, en respuesta a la estimulación de suero. (F) Gráfico de promedio ( $\pm$  desviación estándar) de la señal de FURA-2AM en respuesta a suero, de tres experimentos independientes. Los datos fueron graficados en formato de SuperPlot. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula registrada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento. (G) Registro del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con la sonda FURA-2AM ( $\pm$  error estándar) en células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados, en respuesta a la estimulación de suero. (H) Gráfico de promedio ( $\pm$  desviación estándar) de la señal de FURA-2AM en respuesta a suero, de tres experimentos independientes. Los datos fueron graficados en formato de SuperPlot. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula registrada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento. (I) Gráfico de la señal ( $\pm$  desviación estándar) de RhoA estimulada con suero medida mediante ensayos de GLISA en células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados y a distintos. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula registrada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento (J) Gráfico ( $\pm$  desviación estándar) de las veces de cambio de la señal de la actividad de RhoA luego de 10 min de estimulación con suero en comparación a células no estimuladas, para células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. Cada círculo corresponde a un experimento independiente. (K) Gráfico ( $\pm$  desviación estándar) de las veces de cambio de la señal de la actividad de RhoA luego de 10 min de estimulación con suero en comparación a células no estimuladas, para

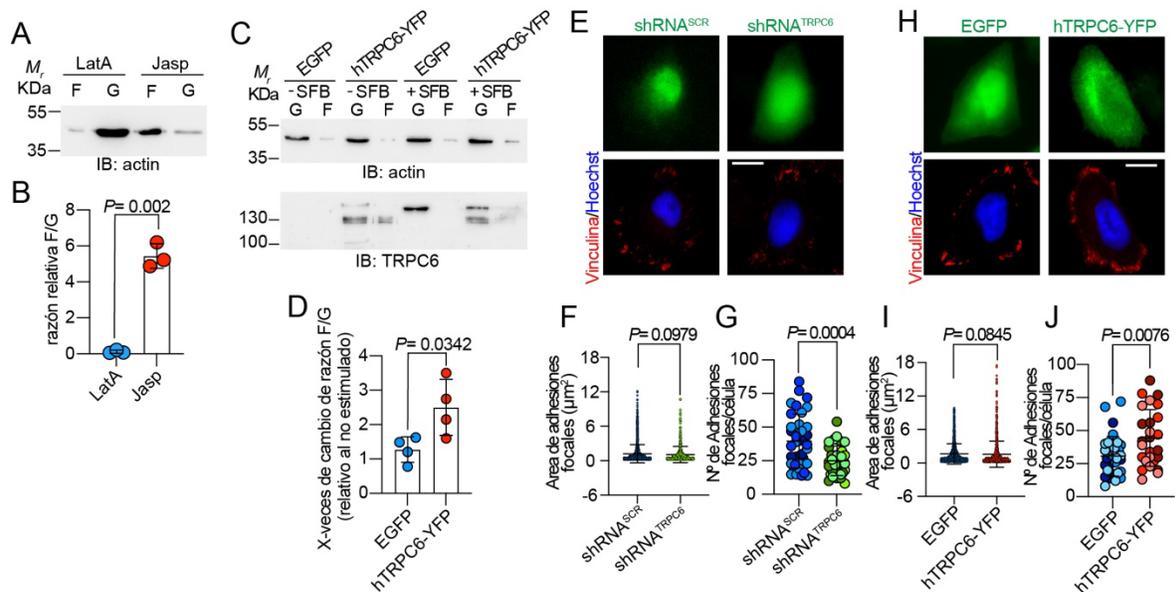
células HeLa transfectadas con EGFP y hTRPC6-YFP. Cada círculo corresponde a un experimento independiente. (L) Imágenes representativas de ensayos de *spreading* en células HeLa transfectadas con EGFP, hTRPC6-YFP, shRNA<sup>SCR</sup> y shRNA<sup>TRPC6</sup>. En rojo se muestra la tinción de actina filamentosa. Escala: 20  $\mu$ m. (M) Gráfico de promedio ( $\pm$  desviación estándar) del tamaño celular medido en los ensayos de *spreading*. Tres experimentos independientes. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula analizada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento.

Las proteínas Rho GTPasas contribuyen de manera diferencial a la adhesión celular (Greiner *et al.* 2013). Por lo tanto, el análisis del proceso de adhesión y propagación celular puede ser un método alternativo para evaluar la actividad de las Rho GTPasas. En este sentido, la sobreexpresión de TRPC6 reduce el tamaño de las células HeLa en comparación con la condición de control (Fig. 4L-M). Además, el fenotipo celular de las células que expresan hTRPC6-YFP mostró una alteración del citoesqueleto de actina y una morfología celular más circular en comparación con la condición de control, lo que sugiere una activación prominente de RhoA por encima de otras Rho GTPasas (Ren, Kiosses, & Schwartz 1999). De la misma manera, el shRNA contra TRPC6 aumenta el área celular e induce un fenotipo más lamellipodial (Fig. 4L-M), que es un fenotipo opuesto a la activación de RhoA. En resumen, todos los datos mostraron que TRPC6 aumenta la actividad de RhoA y sugiere un posible efecto sobre la dinámica del citoesqueleto de actina.

#### **TRPC6 promueve la polimerización de los filamentos de actina**

Para la contracción de las células es necesaria la fuerza de tracción generada por las adherencias focales y el citoesqueleto de actina (Tomasek *et al.* 2002). Debido al efecto de TRPC6 sobre la actividad de RhoA, evaluamos el efecto de TRPC6 sobre el citoesqueleto de actina, usando una purificación de actina globular (G) y filamentosa (F) por ultracentrifugación. Para validar la aproximación a utilizar, el inhibidor de la polimerización de actina Latrunculin A (LatA) (Coué *et al.* 1987) y el estabilizador de actina filamentosa Jasplakinolide (Jasp) (Bubb *et al.* 1994) fueron utilizados como control negativo y positivo en células HeLa. De acuerdo con reportes previos (Hak *et al.* 2008), el tratamiento con Jasp incrementó 5 veces la relación actina F/G en comparación con Células tratadas con LatA (Fig. 5A-B). Por otro lado, el tratamiento con LatA induce una reducción en la porción de actina F y un aumento en la actina G, en comparación con el tratamiento con Jasp (Fig. 5A-B). Para evaluar el efecto de TRPC6

sobre el citoesqueleto de actina, se transfectaron células HeLa con la construcción hTRPC6-YFP y EGFP como control. Previa depleción del suero, las células se trataron con FBS al 10 % durante 30 min, lo que da como resultado un aumento de 1,2 veces de la proporción de actina F/G de la condición de control en comparación con su respectiva condición no estimulada (Fig. 5C-D). Por otro lado, la sobreexpresión de hTRPC6-YFP aumenta la proporción de actina F/G en 2,5 veces en comparación con su respectiva condición no estimulada (Fig. 5C-D). Por lo tanto, los datos sugieren que TRPC6 regula la formación de filamentos de actina inducida por la estimulación del suero.



**Figura 5. TRPC6 regula la formación de filamentos de actina y adhesiones focales.** (A) Inmunoblot representativo de 3 experimentos independientes de ensayos de purificación de actina de células HeLa tratadas con LatA o con Jasp. (B) Gráfico ( $\pm$  desviación estándar) de la razón relativa de actina filamentososa (F) versus la actina globular (G). Cada círculo corresponde a un experimento independiente. (C) Inmunoblot representativo de 4 experimentos independientes de ensayos de purificación de actina. Cultivos de células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados fueron estimuladas con suero. En la parte inferior, se muestra la sobreexpresión de TRPC6. (D) Gráfico ( $\pm$  desviación estándar) de la razón de cambio de los niveles de F/G actina relativo al tratamiento no estimulado. Cada círculo representa un experimento independiente. (E) Imágenes representativas de 3 experimentos independientes del análisis de adhesiones focales para células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. Escala: 20  $\mu\text{m}$ . (F) Gráfico del área de adhesiones focales ( $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Cada círculo corresponde a una adhesión focal analizada. (G) Gráfico del número de adhesiones focales por tamaño celular ( $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Cada círculo corresponde a una célula analizada. (H) Imágenes representativas de 3 experimentos independientes del análisis de adhesiones focales para células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. Escala: 20  $\mu\text{m}$  (I) Gráfico del área de adhesiones focales ( $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Cada círculo corresponde a una adhesión focal analizada. (J) Gráfico del número de adhesiones focales por tamaño celular ( $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Cada círculo corresponde a una célula analizada.

### **TRPC6 regula el tamaño de las adhesiones focales**

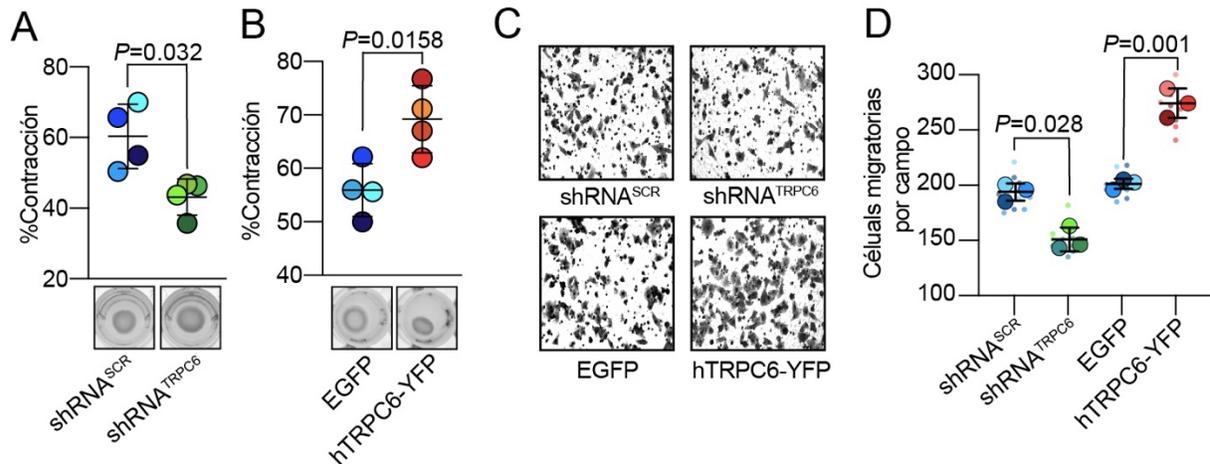
La dinámica de las FAs es un componente intracelular relevante y necesario para la contracción celular (Mishra & Manavathi 2021). Por lo tanto, se evaluó el efecto de TRPC6 sobre el número y tamaño de FA. De manera interesante, las células HeLa transfectadas con shRNA contra el canal TRPC6 muestran un número reducido de FA por célula en comparación con la condición de control de shRNA<sup>SCR</sup> sin alterar el tamaño de las FA (Fig. 5E-G). Por otro lado, la sobreexpresión de hTRPC6-YFP aumenta tanto el tamaño como el número de FA (Fig. 5H-J), lo que sugiere la adquisición de un fenotipo contráctil. En resumen, los resultados indican que TRPC6 regula la actividad de RhoA, afectando la formación de filamentos de actina y FA, lo que sugiere la adquisición de un fenotipo contráctil.

2. Determinar el papel de la regulación de TRPC6 sobre la contractilidad celular y el factor transcripcional YAP

### **TRPC6 regula la contractilidad y migración celular**

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que a través de la regulación de la actividad de RhoA, el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales, el canal TRPC6 podría promover un fenotipo contráctil (Fig. 4-5). Por lo tanto, me propuse a determinar si el canal TRPC6 afecta la contracción y la migración celular, ambos procesos necesarios para la cicatrización de heridas (Desjardins-Park, Foster & Longaker 2018). Evaluamos el efecto de TRPC6 sobre la contracción celular mediante un ensayo 3D basado en colágeno (Grinnell *et al.* 2006). De acuerdo con las observaciones previas en este trabajo, el silenciamiento de TRPC6 disminuye la contracción de las células HeLa en comparación con la condición de control (Fig.6A). Consistente con este resultado, la sobreexpresión de TRPC6 aumenta la contracción en comparación con la condición de control de EGFP (Fig.6B). Se obtuvieron resultados similares cuando se evaluó el efecto de TRPC6 utilizando un ensayo de migración bicamerales Transwell. Mientras que shRNA<sup>TRPC6</sup> reduce la cantidad de células HeLa migratorias en comparación con la condición control shRNA<sup>SCR</sup>, la sobreexpresión de hTRPC6-YFP aumentó la migración de las células en comparación con la condición de control EGFP (Fig. 6C-D). Por lo tanto, estos resultados indican que TRPC6 controla la

contracción y migración de las células. En conjunto estos datos apoyan el papel de TRPC6 sobre la reparación tisular a través del manejo de la contractilidad celular dependiente de la señalización de RhoA.

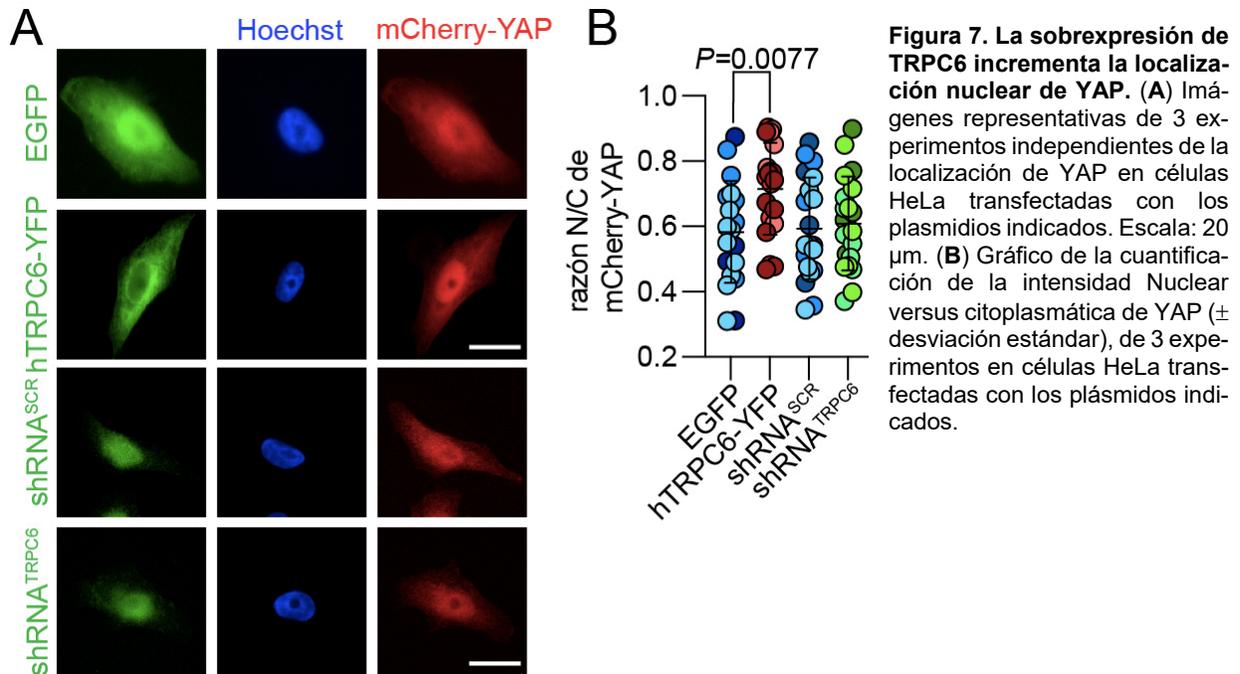


**Figura 6. TRPC6 promueve la contracción y migración celular.** (A) Gráfico de 4 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) de ensayos de contractilidad 3D en matriz de colágeno de células HeLa transfectadas con las condiciones indicadas. Cada círculo representa un experimento independiente. (B) Gráfico de 4 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) de ensayos de contractilidad 3D en matriz de colágeno de células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. Cada círculo representa un experimento independiente. (C) Imágenes representativas de 3 ensayos independientes de migración Transwell bicamerales teñidos con cristal violeta utilizando células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. (D) Gráfico del conteo de células migratorias por campo. 3 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Se contaron 4 campos ópticos por experimento. Los puntos pequeños representan cada campo, mientras que los círculos resumen el promedio de cada experimento.

### La sobreexpresión de TRPC6 regula la localización subcelular del factor transcripcional YAP

El factor transcripcional YAP es una proteína que permite la expresión de genes ligados a la contractilidad celular en el contexto de reparación tisular (Yu *et al.* 2017). De manera interesante, uno de los mecanismos descritos para la regulación del factor YAP, es el efecto ejercido por el citoesqueleto de actina y en particular RhoA (Dupont *et al.* 2011; Seo & Kim 2018). Debido a los datos obtenidos en este trabajo es que se evaluó el efecto de TRPC6 sobre la activación de YAP. En este sentido, la localización nuclear indica la activación del factor YAP, mientras que la retención en el citoplasma señala la inhibición de este factor. Al analizar la localización del sensor mCherry-YAP en células HeLa que sobreexpresan el canal hTRPC6-YFP, se pudo observar un aumento en la localización nuclear versus citoplasmática, en comparación a la condición control EGFP (Fig.7). Sin embargo, el silenciamiento de TRPC6 con el uso de shRNA

no mostró ninguna diferencia significativa en comparación a su control respectivo. Por lo tanto, estos datos sugieren que un aumento de la expresión del canal TRPC6 podría ser un nuevo mecanismo para promover la activación del factor transcripcional YAP.



**Figura 7. La sobreexpresión de TRPC6 incrementa la localización nuclear de YAP.** (A) Imágenes representativas de 3 experimentos independientes de la localización de YAP en células HeLa transfectedas con los plásmidos indicados. Escala: 20  $\mu$ m. (B) Gráfico de la cuantificación de la intensidad Nuclear versus citoplasmática de YAP ( $\pm$  desviación estándar), de 3 experimentos en células HeLa transfectedas con los plásmidos indicados.

### 3. Caracterizar la interacción de TRPC6 con RTKN y su efecto funcional

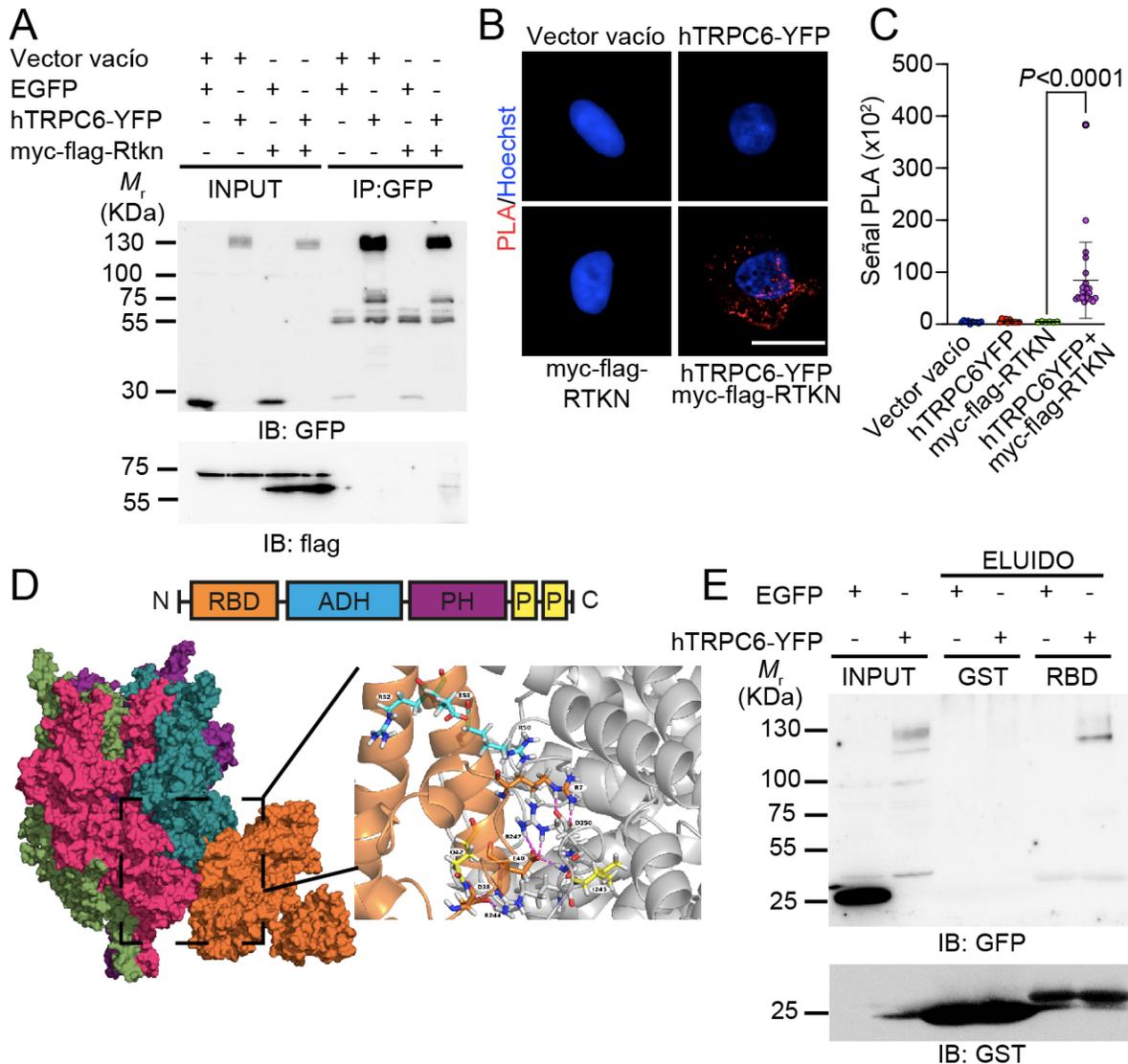
#### El canal TRPC6 interactúa con el efector de RhoA, RTKN

Las interacciones proteína-proteína (PPIs) son uno de los mecanismos que regulan la señalización celular y la actividad de los canales iónicos (Lee *et al.* 2014). Por lo tanto, la identificación de nuevas proteínas asociadas al canal TRPC6 permitirá describir nuevas funciones celulares implicadas. Por lo tanto, se realizó un enfoque proteómico basado en MS/MS para identificar proteínas asociadas a TRPC6 que podrían estar relacionadas con la contracción y el citoesqueleto de actina. Para ello, se inmunoprecipitó hTRPC6-YFP sobreexpresado en células HEK293. De manera interesante, se identificó a la proteína Rhotekin-1 (RTKN) como una potencial proteína de interacción a TRPC6. RTKN es un efector de RhoA con funciones celulares no claras (Ito, Morishita & Nagata 2018). Esta asociación fue validada mediante coimmunoprecipitación de hTRPC6-YFP con myc-flag-RTKN (Fig. 8A). Por otra parte, se realizaron ensayos de ligación por proximidad en células que sobreexpresaron hTRPC6-YFP y myc-

flag-RTKN. De manera consistente, la sobreexpresión de ambas construcciones generó una señal positiva para el ensayo PLA (Fig.8B-C), lo cual sugiere la proximidad de ambas proteínas (Fredriksson *et al.* 2002).

#### **El dominio RBD de RTKN interactúa con TRPC6**

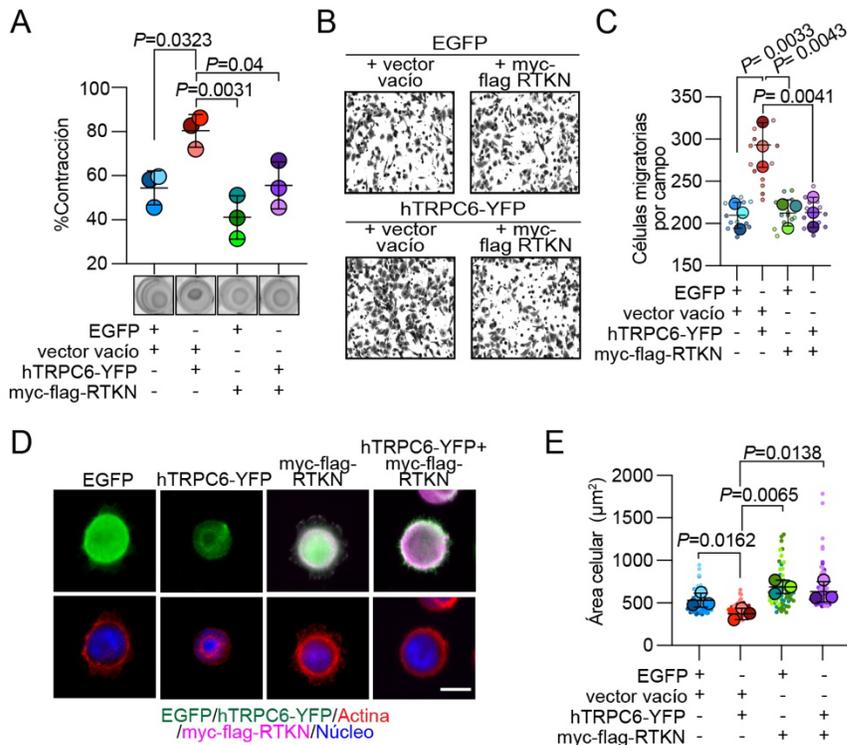
Para obtener información sobre los dominios que podrían ser relevantes para la interacción TRPC6-RTKN, se realizaron predicciones de contactos interproteicos mediante análisis de acoplamientos evolutivos (EC, del inglés *Evolutionary Coupling*) combinados con modelado *in silico* de ambas proteínas. Entre los dominios evaluados, la mayor probabilidad de formar un complejo fue la región N-terminal proximal de TRPC6 con el dominio RBD de RTKN (Fig. 8D). Debido a que no hay una estructura cristalográfica de RTKN, se usó la estructura cristalográfica de otras proteínas que contienen RBD como ROCK (Narumiya & Thumkeo 2018) para modelar el dominio RBD de RTKN. Para validar el modelo de interacción obtenido, se realizó un ensayo de *pull-down* utilizando columnas que contienen glutatión-GST-RBD. De acuerdo con el modelo, el canal hTRPC6-YFP se retuvo de manera específica en las columnas que contenían la construcción GST-RBD, pero no en la resina que contenía el control GST (Fig. 8E). En resumen, los datos revelan que RTKN es una proteína novedosa que se asocia a TRPC6 a través del dominio RBD.



**Figura 8. TRPC6 interactúa con el dominio RBD de RTKN.** (A) Inmunoblot representativo de la coimmunoprecipitación entre hTRPC6-YFP y myc-Flag-Rhotekin. Imágenes representan resultados de 4 experimentos independientes. Flechas indican bandas correspondientes a cada proteína detectada. (B) Imágenes representativas de ensayos de ligación por proximidad (PLA), correspondientes a 3 experimentos independientes en células HEK293 que fueron transfectadas con los plasmidios hTRPC6-YFP y myc-flag-Rtkn. Las condiciones experimentales se indican en cada imagen. La marca positiva para la ligación por proximidad se muestra en rojo. Escala: 20  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la intensidad de la marca positiva ( $\pm$  desviación estándar) para el ensayo PLA en cada condición. Círculos corresponden a cada célula analizada de 3 experimentos independientes. (D) Modelado de la interacción entre tetramero de TRPC6 y el dominio RBD de RTKN (naranja). En la parte superior, se esquematiza la estructura lineal de RTKN con sus dominios respectivos. De izquierda a derecha: RBD, del inglés *Rho Binding Domain*; ADH, del inglés *Anillin Domain Homology*; PH, del inglés *Pleckstrin Homology Domain*; P, dominios ricos en *Prolina*. A la derecha se muestra una ampliación de la región de interacción con los residuos involucrados para ambas proteínas. (E) Inmunoblot representativo de 4 experimentos de ensayo de *pull-down* en columnas GST y GST-RBD de lisados de células HEK293 sobrepresadas con hTRPC6-YFP y EGFP.

## RTKN reduce la contractilidad, migración y spreading celular dependientes de TRPC6

RTKN es un efector de la proteína RhoA-GTPasa. Por tanto, la primera predicción es que RTKN esté ejerciendo el efecto de TRPC6 sobre los distintos procesos ensayados en este trabajo tales como contracción, migración y *spreading* celular. Por tanto, la sobreexpresión de RTKN, debería potenciar el efecto dependiente de TRPC6 en aquellos procesos mencionados. Sin embargo, se observó que la sobreexpresión de RTKN evita el aumento en la contracción dependiente de la sobreexpresión de TRPC6 (Fig.9A). De la misma manera, un efecto similar se observó en ensayos de migración bicamerales (Fig.9B-C). Además, la sobreexpresión de RTKN conjunta a TRPC6 evita la disminución en el área celular observado en los ensayos de *spreading* celular (Fig.9D-E). De esta manera, estos datos sugieren un efecto negativo de RTKN sobre la actividad de TRPC6, contrario a las predicciones.



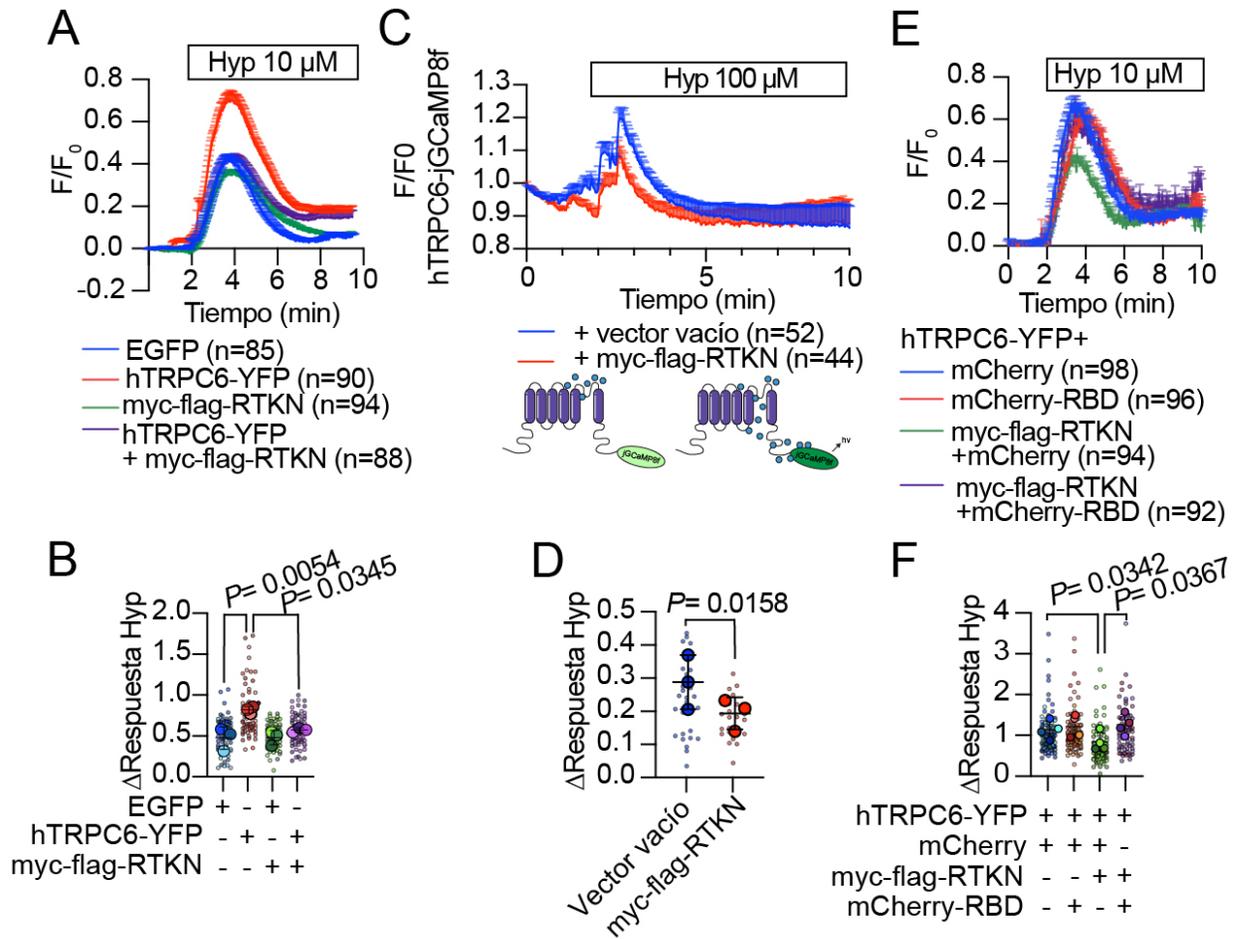
**Figura 9. RTKN previene los efectos dependientes de TRPC6 en contracción, migración y *spreading* celular.**

(A) Gráfico de 3 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) de ensayos de contractilidad 3D en matriz de colágeno de células HeLa transfectadas con las condiciones indicadas. Cada círculo representa un experimento independiente. (B) Imágenes representativas de 3 ensayos independientes de migración Transwell bicamerales teñidos con cristal violeta utilizando células HeLa transfectadas con los plásmidos señalados. (C) Gráfico del conteo de células migratorias por campo. 3 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Se contaron 4 campos ópticos por experimento. Los puntos pequeños representan cada campo, mientras que los círculos grandes representan el promedio de cada experimento. (D) Imágenes representativas de ensayos de *spreading* en células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados. En rojo se muestra la tinción de actina filamentosa. Escala: 20  $\mu$ m. (E) Gráfico de promedio ( $\pm$  desviación estándar) del tamaño celular medido en los ensayos de *spreading*. Tres experimentos independientes. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula analizada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento.

los resumen el promedio de cada experimento. (D) Imágenes representativas de ensayos de *spreading* en células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados. En rojo se muestra la tinción de actina filamentosa. Escala: 20  $\mu$ m. (E) Gráfico de promedio ( $\pm$  desviación estándar) del tamaño celular medido en los ensayos de *spreading*. Tres experimentos independientes. Los círculos pequeños corresponden al valor de cada célula analizada en un experimento. Los círculos grandes corresponden al promedio de cada experimento.

### **RTKN disminuye la actividad del canal TRPC6.**

Para determinar el efecto funcional de RTKN sobre la actividad de TRPC6, se realizaron mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando FURA-2AM. Para observar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por la activación de TRPC6, se utilizó el activador específico Hyperforin (Hyp) (Leuner *et al.* 2007). De manera interesante, la sobreexpresión de myc-flag-RTKN en células HeLa que expresan hTRPC6-YFP disminuye la entrada de calcio provocada por Hyp 10  $\mu\text{M}$  en comparación con células que solo sobreexpresan hTRPC6-YFP (Fig. 10A-B). Complementaria a esta aproximación, se generó un sensor genético de calcio jGCaMP8f (Zhang *et al.* 2020) acoplado al C-terminal de hTRPC6. Un tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Hyp de células HeLa da como resultado un aumento rápido en la señal de jGCaMP8f y una disminución de casi 2 minutos hasta la condición basal (Fig. 10C). La sobreexpresión de myc-flag-RTKN mostró una reducción en la actividad de hTRPC6-jGCaMP8f provocada por 100  $\mu\text{M}$  de Hyp (Fig. 10C-D). Por lo tanto, estos resultados concuerdan con los experimentos de imágenes de calcio (Fig. 10A-B), y sugieren que RTKN es un nuevo regulador negativo de TRPC6. En conjunto a los datos previamente mostrados (Fig.8), los datos sugirieron que la interacción de RTKN a través del dominio RBD reduce la actividad de TRPC6. Para aclarar esta hipótesis, se empleó un dominio RBD soluble como disruptor de la interacción TRPC6-RTKN. De acuerdo a las predicciones realizadas, la presencia del dominio RBD anula la inhibición de la actividad TRPC6 inducida por RTKN (Fig.10E-F). En resumen, los enfoques empleados en este objetivo proporcionan evidencia de un nuevo regulador negativo de TRPC6.



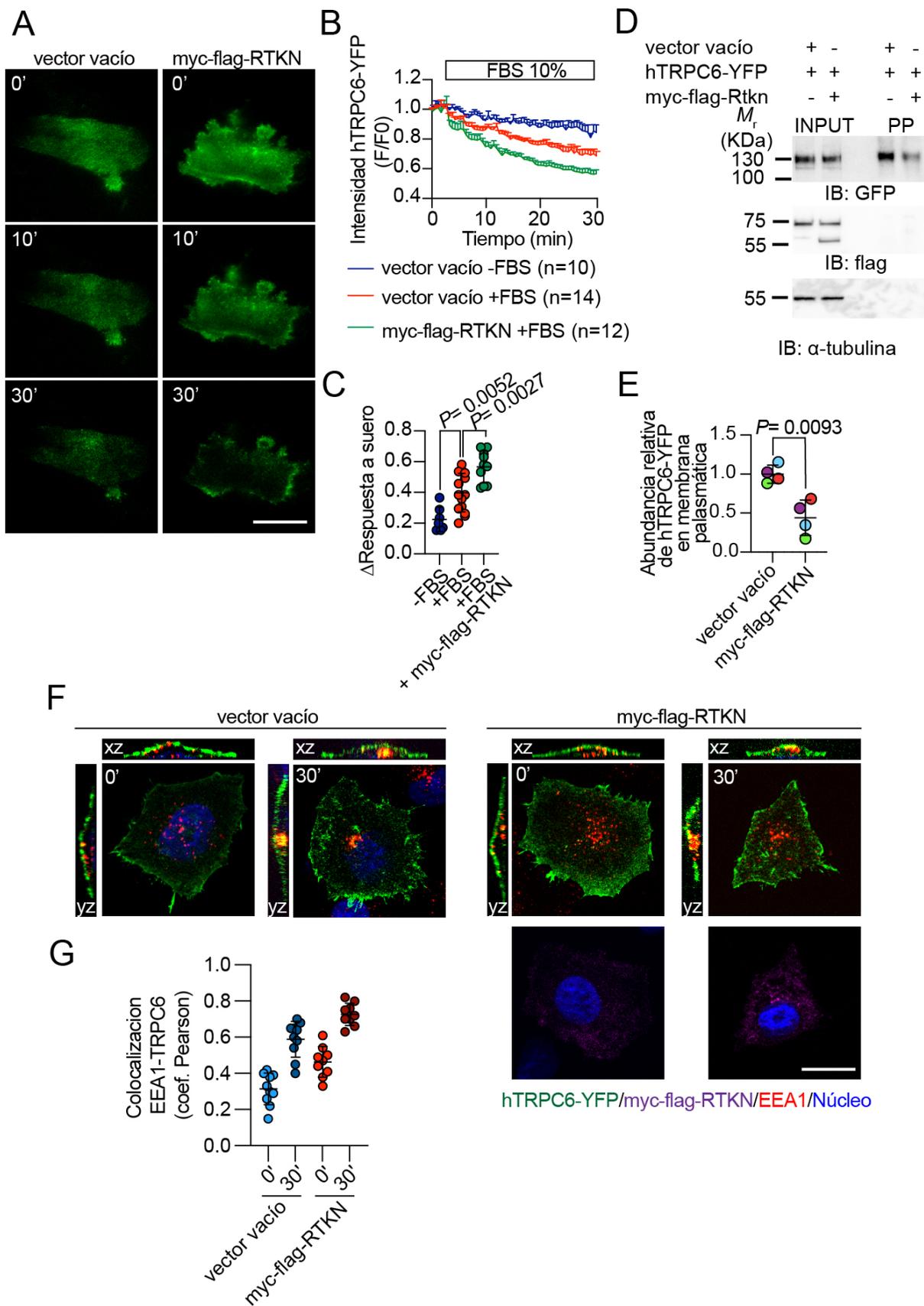
**Figura 10. RTKN reduce la actividad de TRPC6.** (A) Registro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular evocado por Hiperforina 10  $\mu\text{M}$  con la sonda FURA 2-AM en células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Curvas corresponden a la suma de 3 experimentos independientes ( $\pm$  error estándar). (B) Gráfico del promedio de la respuesta inducida por Hiperforina ( $\pm$  desviación estándar), obtenido desde los trazos en (A). Los Círculos pequeños representan cada célula analizada mientras que los círculos grandes representan el promedio para cada experimento independiente. (C) Registros del sensor hTRPC6-jGCaMP8f activado con 100  $\mu\text{M}$  de Hiperforina transfectado en células HeLa en ausencia o no de myc-flag-RTKN. En la parte inferior, se esquematiza el funcionamiento del sensor, el cual aumenta su fluorescencia en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . (D) Gráfico del promedio de la respuesta del sensor hTRPC6-jGCaMP8f ( $\pm$  desviación estándar) de los registros en (C) Los Círculos pequeños representan cada célula analizada mientras que los círculos grandes representan el promedio para cada experimento independiente. (E) Registro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular evocado por Hiperforina 10  $\mu\text{M}$  con la sonda FURA 2-AM en células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. Curvas corresponden a la suma de 4 experimentos independientes ( $\pm$  error estándar). (F) Gráfico del promedio de la respuesta inducida por Hiperforina ( $\pm$  desviación estándar), obtenido desde los trazos en (E). Los Círculos pequeños representan cada célula analizada mientras que los círculos grandes representan el promedio para cada experimento independiente.

#### RTKN disminuye la localización en membrana plasmática:

La actividad de los canales iónicos está determinada principalmente por las propiedades biofísicas y el número de canales en la membrana plasmática (Zheng & Trudeau, 2015). En este sentido, recientemente se observó que RTKN está implicado en la regulación del tráfico retrogrado de vesículas (Yan *et al.* 2021). Por tanto, un posible mecanismo del efecto negativo de RTKN sobre TRPC6 es la regulación del

tráfico del canal. En línea con esta hipótesis, se utilizó microscopía TIRF para evaluar la presencia de TRPC6 en la membrana plasmática. Se observó que el tratamiento de suero disminuye la intensidad de fluorescencia del sensor hTRPC6-YFP (Fig.11A-C). De manera interesante, la sobreexpresión de RTKN acentúa esta disminución (Fig.11A-C). Para corroborar estos resultados, se realizaron ensayos de biotilización de proteínas de superficie. Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de RTKN disminuye la expresión de TRPC6 en la membrana plasmática (Fig.11D-E).

Como se comentó previamente, evidencia reciente sugiere a RTKN como un regulador del tráfico endosomal. Para determinar si los efectos observados de RTKN sobre la abundancia en membrana del canal TRPC6, se realizaron marcajes para determinar la colocalización de TRPC6 con endosomas tempranos, utilizando el marcador EEA-1 (del inglés *Early Endosome Antigen 1*), una proteína andamio de endosomas tempranos (Kornilova 2014). En línea con los resultados obtenidos, la estimulación con suero por 30 min incrementa la colocalización de TRPC6 con EEA-1, sugiriendo una disminución de la abundancia de este canal en la membrana plasmática (Fig.11F-G). De manera interesante, al sobreexpresar RTKN la colocalización de TRPC6 con EEA-1 se vio aumentada. De esta misma manera, al estimular las células con suero, la presencia de TRPC6 en endosomas tempranos aumentó al sobreexpresar RTKN (Fig.11F-G). En conjunto, estos datos apoyan los resultados obtenidos y sugieren a RTKN como un regulador del tráfico retrógrado del canal TRPC6.



**Figura 11. RTKN disminuye la presencia de TRPC6 en la membrana plasmática.** (A) Imágenes representativas de microscopía TIRF de células HeLa transfectadas con los plasmidios indicados, estimuladas con FBS 10%. Cada imagen corresponde al tiempo señalado. Escala: 20  $\mu$ m. (B) Gráfico curso-temporal de la intensidad de fluorescencia (4 experimentos independientes,  $\pm$  error estándar) de la construcción hTRPC6-YFP en función de la fluorescencia inicial. Los datos fueron analizados a partir de imágenes de microscopía TIRF. (C) Gráfico del promedio del cambio de fluorescencia del sensor hTRPC6-YFP inducida por suero ( $\pm$  desviación estándar), obtenido desde los trazos en (B). Los círculos representan cada célula analizada. (D) Inmunoblot representativo de 4 experimentos independientes de biotilación de proteínas de membrana plasmática en células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas. PP corresponde a la fracción de proteínas marcadas con biotina. (E) Gráfico Cuantificación de la abundancia relativa de hTRPC6-YFP en la membrana plasmática ( $\pm$  desviación estándar). La densidad de la banda de los carriles PP fue comparada en función de la abundancia en INPUT. Cada círculo representa un experimento independiente. El código de colores representa los experimentos realizados el mismo día. (F) Imágenes representativas de 3 experimentos independientes de células HeLa transfectadas con las condiciones señaladas en presencia de FBS 10% por 30 min o en condiciones basales (0 min). A cada imagen para la señal de TRPC6 se agregó una vista ortogonal de la célula en las coordenadas indicadas. Escala: 20  $\mu$ m. (G) Cuantificación de la colocalización de la señal de EEA1 con respecto de la señal de la proteína fusión hTRPC6-YFP, expresada mediante el coeficiente de Pearson ( $\pm$  desviación estándar). Cada círculo corresponde a una célula analizada y el código de colores agrupa aquellas células correspondientes al mismo experimento.

## DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo proporcionan un mecanismo novedoso de regulación de TRPC6 en el contexto de la señalización de RhoA y la contracción celular. Al combinar distintas técnicas de imagen con métodos bioquímicos, se observó que TRPC6 regula la activación de RhoA inducida por suero. Este efecto es consistente con reportes previos observados en otros modelos celulares como podocitos (Tian *et al.* 2010) y células endoteliales pulmonares (Singh *et al.* 2007). Sumado a esto, a través del registro simultáneo de la actividad de RhoA y  $Ca^{2+}$  intracelular se sugirió que los canales TRP mecanosensibles podrían regular la activación de RhoA, dentro de los cuales se incluye a TRPC6 (Varadarajan *et al.* 2022). En mayor detalle, Miller y cols. mostró una coordinación temporal de ambas señales (Varadarajan *et al.* 2022). Los datos que obtuve respaldan la coordinación de ambas señales, ya que las mediciones con el sensor hTRPC6-jGCaMP8f muestra una señal rápida (Fig. 9C-D) que es temporalmente previa a la activación de RhoA observada por el sensor basado en FRET usado (Fig. 4A-D). De manera interesante, la sobreexpresión de TRPC6 provoca un cambio en la curva de activación de RhoA en los ensayos de microscopía FRET. Este comportamiento persistente ha sido reportado mediante la estimulación con histamina (Zhang *et al.* 2020). Así mismo, se ha observado que la activación persistente de RhoA se compone de dos fases, las cuales son requeridas para activar factores de transcripción como el MTFR (Zhang *et al.* 2020). Por lo cual, el efecto de TRPC6 sobre la activación persistente de RhoA podría ser un mecanismo para promover la activación de YAP, entre otros factores. A pesar de esto, el mecanismo preciso por el cual TRPC6 regula RhoA es poco conocido. En otras familias de GTPasas pequeñas se han descrito reguladores de la actividad que son directamente sensibles al  $Ca^{2+}$ , tal es el caso de los GEF de Rap1b, CalDAG (Cook *et al.* 2018). En el caso de RhoA y la familia Rho GTPasas, no existe una proteína similar relacionada con ningún motivo de unión o sensible a  $Ca^{2+}$ , que de cuenta de la transducción de la señal de calcio ejercida por un canal iónico. Uno de los mecanismos propuesto para la regulación de RhoA por  $Ca^{2+}$  incluye la modulación por fosforilación de proteínas GEF por quinasas activadas por  $Ca^{2+}$  (Haws, McNeil, & Hansen 2016). De acuerdo con esta hipótesis, la quinasa CaMKII modula la actividad de RhoA en neuronas (Murakoshi, Wang, & Yasuda 2011).

Sumado a esto, se ha descrito que la quinasa PKC fosforila el GEF de RhoA, P115 (Peng *et al.* 2011). Así mismo, el cambio de la concentración iónica extracelular permitió identificar que la proteína GEF-H1, activador de RhoA, es regulado por la despolarización de la membrana (Waheed *et al.* 2010). Debido a la falta de herramientas para analizar la activación de GEF y GAP, resulta difícil identificar la proteína precisa relacionada con el mecanismo. Recientemente se han diseñado herramientas para activar proteínas GEF mediante optogenética (Mahlandt *et al.* 2022), así como sensores basados en microscopía FRET para GEF-H1 (Azoitei *et al.* 2019). A pesar de estos avances, los enfoques proteómicos podrían ayudar a identificar reguladores de RhoA que interactúan con TRPC6. En este sentido, se ha observado la interacción de RhoA con otros canales TRP, como es el caso de TRPV4 (McCray *et al.* 2021). Por otro lado, el canal TRPM7 forma un complejo proteico mediante la interacción con diversos componentes del citoesqueleto de actina tales como actina y  $\alpha$ -actinina (Turlova *et al.* 2016; Middelbeek *et al.* 2016). Experimentos preliminares a este trabajo doctoral mostraron la asociación de TRPC6 con RhoA y su activador ARHGEF38 (Tabla 1). Si bien estos datos necesitan ser corroborados, estos hallazgos podrían sugerir la formación de un complejo proteico dependiente de TRPC6 para promover la activación de RhoA. A pesar que los estudios se enfocan en los aspectos conductores de los canales iónicos, estas proteínas también pueden actuar de manera independientes de su capacidad de permear iones a través de la membrana plasmática, actuando como proteínas de andamiaje para promover macrocomplejos de señalización adosados en la membrana plasmática (Lee *et al.* 2014; Kirmiz *et al.* 2018). Por lo tanto, experimentos empleando mutaciones del poro de TRPC6 podrían ser interesantes para disectar si el efecto sobre RhoA requiere las propiedades conductoras del canal.

Además del efecto de TRPC6 sobre RhoA, los datos obtenidos sugieren que TRPC6 promueve la adquisición de un fenotipo contráctil. Estudios previos en podocitos y células de músculo liso están en línea con nuestra observación (Park *et al.* 2017; Tian *et al.* 2010). Tanto la actina filamentosa como las adhesiones focales están regulados por RhoA (Burrige & Guilly 2016) y son componentes celulares clave para la contracción. Además, TRPC6 está implicado en la migración y contracción en varios modelos celulares como cardiomiocitos (Lin *et al.* 2019), fibroblastos dérmicos (Davis

*et al.* 2012), podocitos (Wu *et al.* 2017) y otros tejidos. Sumado a esto, la regulación al alza de la expresión de TRPC6 también se correlaciona con la alta invasividad de diferentes tumores (Jardin *et al.* 2018), y diversas mutaciones de ganancia de función del canal producen enfermedades fibróticas como FSGF (Winn *et al.* 2005). Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo doctoral se condicen con estudios previos y proporcionan datos novedosos sobre el mecanismo por el cual TRPC6 promueve la migración y contracción celular. Así mismo, el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales son elementos relevantes para regular las propiedades mecánicas de la célula, ya que permiten propagar y sensar la tensión mecánica que ejerce la interacción entre matriz extracelular y la célula (Burrige & Wittchen 2013). Teniendo en consideración los datos obtenidos en este trabajo, se podría sugerir la participación de TRPC6 en la regulación de las propiedades mecánicas de la célula. Distintos experimentos podrían ser empleados para dilucidar si TRPC6 regula las propiedades mecánicas de la célula, tales como la microscopía TFM (del inglés **Traction Force Microscopy**). Esta metodología permite cuantificar la fuerza que genera la célula al perturbar una matriz fluorescente (Bergert *et al.* 2016). Otras aproximaciones para determinar la capacidad contractil de la célula es el uso de sensores FRET de adhesiones focales (Grashoff *et al.* 2010).

Los datos obtenidos sugieren que la sobreexpresión del canal TRPC6 favorece la localización del factor transcripcional YAP en el núcleo, indicando un aumento de la actividad de este factor. A través de diversos modelos, se ha descrito que el canal TRPC6 regula otros factores de transcripción, principalmente sensibles a  $Ca^{2+}$ , como es el caso del factor NFAT y el factor CREB (Leei *et al.* 2019; Tai *et al.* 2008). En conjunto a los datos obtenidos en los otros objetivos, se podría sugerir que el canal TRPC6 regula el factor YAP a través de la modulación de la actividad de RhoA. Este mecanismo ha sido descrito previamente, en donde se observó que RhoA regula al factor YAP a través de la modulación de las propiedades mecánicas de la célula dependiente del citoesqueleto de actina (Halder, Dupont, & Piccolo 2012; Dupont *et al.* 2011; Kim *et al.* 2018). En este sentido, diversos artículos han determinado el efecto de otros canales iónicos sobre el factor YAP (Pathak *et al.* 2014; Pardo-Pastor *et al.* 2018; Taz *et al.* 2018). De manera interesante, todos los canales iónicos descritos

permean  $\text{Ca}^{2+}$ . En conjunto a los datos obtenidos en este trabajo, estos antecedentes suponen un papel relevante del  $\text{Ca}^{2+}$  como modulador del factor YAP. Sin embargo, más experimentos son necesarios para dilucidar los blancos transcripcionales de YAP que son afectados por la regulación de TRPC6. En terminos de contractilidad celular, el factor transcripcional YAP regula la expresión de colageno tipo 1, la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, del inglés **Smooth Muscle Actin**), entre otros (Noguchi, Saito, & Nagase 2018). Por lo tanto, sería interesante evaluar la expresión de estos genes dependientes de TRPC6. El factor YAP es considerada una proteína mecanosensible, puesto que su activación depende en gran medida de las propiedades mecánicas de la célula (Chuan *et al.* 2014). Por tanto, tanto los datos obtenidos de translocación de YAP apoyaría la hipótesis de que el canal TRPC6 regula las propiedades mecánicas de la célula.

Usando un enfoque proteómico MS/MS, se identificó que TRPC6 está asociado al efector RhoA, RTKN. A pesar de la falta de evidencia que indique la función celular de RTKN, estudios previos dilucidaron los procesos en los cuales esta proteína está involucrada, a través de la identificación de nuevas proteínas asociadas a RTKN. De manera interesante, se describió recientemente que RTKN regula el reciclaje endocítico a través del desensamblaje de los endosomas asociados a los filamentos de actina, mientras que la depleción de RTKN afectó el reciclaje normal basolateral (Y. Yan *et al.* 2021). El análisis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con FURA-2 AM y los registro del sensor jGCaMP8f mostró que RTKN reduce la actividad de TRPC6 (Fig.10). Estos resultados podrían sugerir la endocitosis de TRPC6 dependiente de RTKN como posible mecanismo. De manera interesante, la sobreexpresión de RTKN disminuye la abundancia de TRPC6 en la membrana plasmática (Fig.11). En este contexto, diversos mecanismos se han descrito para el tráfico y reciclaje de TRPC6. Por una parte, se ha establecido que la asociación con calmodulina inducida por lisofosfatidilcolina regula la translocación a membranas plasmáticas (Chaudhuri *et al.* 2016, 2008). Por otro lado, el dominio C-terminal de TRPC6 interactúa con Rab9, que en combinación con Rab11 regula el tráfico de TRPC6 hacia de diferentes compartimentos intracelulares (Cayouette *et al.* 2010). Otros mecanismos incluyen la inserción de TRPC6 en la membrana plasmática a través de DAG y  $\text{Ca}^{2+}$  (Riazanski *et al.* 2015; Xie *et al.* 2020). Los datos obtenidos

en este trabajo sugieren que RTKN reduce la abundancia de TRPC6 en la membrana plasmática, promoviendo la endocitosis del canal (Fig.11). En este sentido, los destino de las vesículas de la vía endocítica pueden ser múltiples, los cuales incluyen mecanismos de inserción rápida en la membrana plasmática, degradación por lisozomas, entre otros (Estadella *et al.* 2020). Por lo tanto, la evaluación de otros marcadores de la vía de endocitosis podrán dar luces acerca del tráfico anterograde de TRPC6. En este sentido, los ensayos de “*feeding*” para observar la internalización de vesículas (Fletcher-Jones *et al.* 2019) aportarían detalles del mecanismo de internalización de TRPC6. En conjunto, los datos obtenidos podrían sugerir un nuevo mecanismo de regulación del tráfico anterograde del canal TRPC6 dependiente de la interacción con RTKN. Esto podría sugerir un mecanismo de retroalimentación negativa dependiente del eje RhoA-RTKN para disminuir la actividad de TRPC6, y de esta manera evitar la sobreactivación de RhoA y por ende la contracción exacerbada.

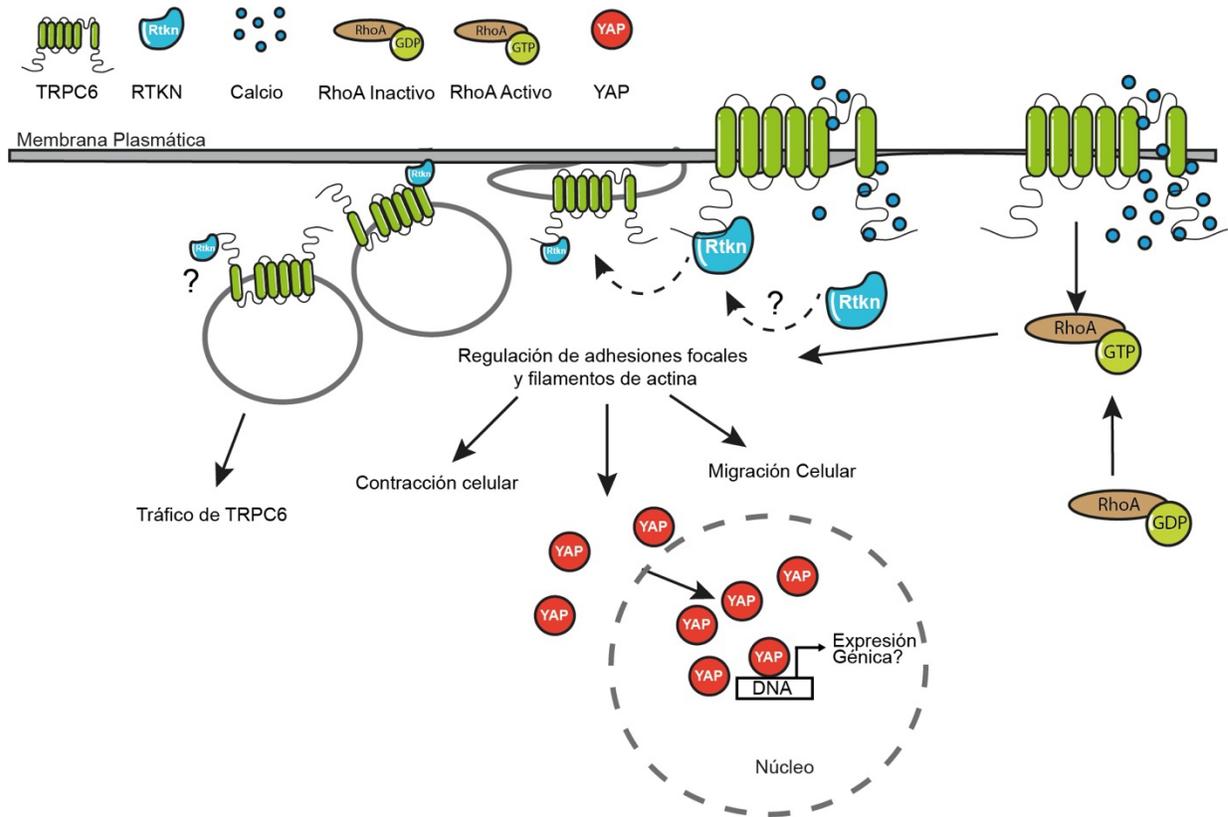
Por otro lado, al combinar el modelado *in silico* y los ensayos bioquímicos, se observó la asociación del dominio RBD de RTKN y el N-terminal de TRPC6. El dominio RBD es un componente clave para la activación de los efectores RhoA (Bishop & Hall 2000; Dvorsky *et al.* 2004). Sin embargo, la evidencia sugiere que los efectos de RTKN sobre la endocitosis es independiente del dominio RBD (Yan *et al.* 2021). En este sentido, RTKN interactúa a través del dominio RBD con la proteína de unión a  $Ca^{2+}$ , S100A4 (M. Chen, Bresnick, & O'Connor 2013). En mayor detalle, se observó que RTKN y S100A4 forma un complejo con RhoA, lo que permite la regulación de los efectos sobre el citoesqueleto de actina (M. Chen, Bresnick, & O'Connor 2013). Estos antecedentes podrían sugerir un mecanismo de interacción entre distintas proteínas, a fin de transducir la señal de  $Ca^{2+}$  dependiente de TRPC6 y la activación de RhoA. En este sentido, reportes previos mostraron la interacción del C-terminal de TRPC6 con la proteína S100A1 (Bily *et al.* 2013), sin caracterización funcional de esta asociación. Sin embargo, se necesitan más experimentos para aclarar la interacción de TRPC6 con S100A4 y sus consecuencias sobre la señalización de RTKN-RhoA. Considerando la alta homología que presenta el dominio RBD entre los efectores de RhoA, TRPC6 podría interactuar con diversas proteínas que contengan dominio RBD, tales como ROCK y mDia1 (Dvorsky *et al.* 2004; Mizuno & Watanabe 2012). Además del dominio

RBD, RTKN también contiene un dominio PH para unir fosfatidilinositol 3,4,5-bisfosfato (PIP<sub>3</sub>) y 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) (Ito, Morishita, & Nagata 2018; McLaughlin & Murray 2005). Sumado a esto, la interacción de PIP<sub>3</sub> con TRPC6 reduce la actividad del canal (Kwon, Hofmann, & Montell 2007). Por lo tanto, estos antecedentes sugiere que la distribución de la interacción TRPC6-RTKN podría tener lugar en dominios ricos en fosfatidilinositoles. Como se mencionó anteriormente, el análisis *in silico* sugiere que el N-terminal de TRPC6 forma parte de la asociación con RTKN. los enfoques de EC sugieren que la región más probable en el N-terminal involucrada en la interacción se encuentra en la posición 240-300 aa, que se ubica al comienzo del dominio pre-S1 (Tang *et al.* 2018). Este dominio se une en parte a PIP<sub>2</sub>, también un regulador negativo de TRPC6 (Mori *et al.* 2022). Por lo tanto, otra posibilidad para la hipótesis endocítica dependiente de RTKN para la reducción de la actividad de TRPC6 es que RTKN promueve la localización del canal iónico en dominios ricos en PIP<sub>3</sub>.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que RTKN previene los efectos de TRPC6 sobre la contractilidad y la migración celular, así como también sobre el spreading celular (Fig.9). Experimentos futuros y el uso de modelos animales aclararán la relevancia biológica de la interacción TRPC6-RTKN en procesos contráctiles como la cicatrización de heridas, el tono vascular y otros. Dada la falta de moléculas para inhibir o bloquear la actividad de RTKN, el uso de la interacción entre TRPC6 y RTKN como blanco para el diseño de moléculas que permitan bloquear dicha asociación (Stoilova-McPhie, Ali & Laezza 2013), ayudaría a estudiar la importancia biológica de esta asociación. Una de las estrategias posibles para desarrollar bloqueadores de la interacción TRPC6-RTKN es el *screening* de moléculas pequeñas mediante herramientas bioinformáticas (Scott *et al.* 2016). Estas herramientas han sido usadas para canales, específicamente para bloquear la interacción de TRPM4 con el receptor de NMDA (Yan *et al.* 2020). Otra herramienta para el diseño de bloqueadores de la interacción TRPC6-RTKN es el diseño de péptidos permeables. Esta estrategia consiste en el desarrollo de péptidos pequeños (no más de 30 aminoácidos), al cual se le agrega una secuencia aminoacídica que permite la penetración de la membrana plasmática (Saldías *et al.* 2021). En el contexto de canales iónicos, esta metodología ha sido probada en diversos modelos (Zhan *et al.* 2020; Schultze *et al.* 2020), incluso en

canales TRP. Específicamente, nuestro laboratorio diseñó péptidos para bloquear la interacción de TRPM4 con las proteínas EB (del inglés *end-binding*), evitando el tráfico de este canal (Blanco *et al.* 2019). Si bien estudios estructurales y funcionales son requeridos para comprender en mayor detalle la relevancia biológica de la proteína RTKN, la superficie de interacción de TRPC6-RTKN podría ser un blanco interesante para el futuro diseño de bloqueadores.

En resumen, este trabajo doctoral propone dos mecanismos relacionados al canal TRPC6, los cuales se muestran en la Figura 12. Por una parte, esta tesis proporciona nuevas evidencias sobre el efecto del canal TRPC6 sobre la contractilidad y migración celular, a través de la regulación de RhoA y componentes intracelulares. Por otra parte, la identificación de RTKN como nuevo regulador de TRPC6 sugiere un novedoso mecanismo de regulación del tráfico retrógrado del canal.



**Figura 12. Modelo propuesto de tráfico y señalización de TRPC6 en la contracción celular.** TRPC6 interactúa con RTKN, lo cual podría regular la inserción de este canal por un mecanismo aun desconocido. Por otro lado, TRPC6 promueve la activación de RhoA, provocando la polimerización de filamentos de actina y la regulación de

las adhesiones focales. Esta ruta de señalización regula la contractilidad y la migración celular. Además, el canal TRPC6 incrementa la localización nuclear de YAP, sugiriendo el efecto sobre la expresión de genes relacionados con la reparación tisular.

## CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis propuesta para esta tesis doctoral. Los datos obtenidos a través de los tres objetivos propuestos muestran que TRPC6 promueve la activación de RhoA, afectando la polimerización de filamentos de actina y el tamaño de las adhesiones focales. Así mismo, TRPC6 regula la contractilidad y migración celular, afectando la translocación del factor transcripcional YAP. El análisis proteómico mediante MS/MS en combinación con diferentes enfoques para validar la interacción, permitió identificar RTKN como un nuevo regulador negativo del canal TRPC6. En resumen, estos datos aportan novedosa evidencia acerca de los mecanismos implicados y regulatorios de TRPC6, el cual emerge como un interesante blanco para regular procesos dependientes de la contractilidad celular.

## Anexo 1: Lista de Publicaciones

- i. **Lavanderos B**, Silva I, Cruz P, Orellana-Serradell O, Saldías MP, Cerda O. TRP Channels Regulation of Rho GTPases in Brain Context and Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Nov 10. doi: 10.3389/fcell.2020.582975
- ii. Rivas J, Díaz N, Silva I, Morales D, **Lavanderos B**, Álvarez A, Saldías MP, Pulgar E, Cruz P, Maureira D, Flores G, Colombo A, Blanco C, Contreras HR, Jaña F, Gallegos I, Concha ML, Vergara-Jaque A, Poblete H, González W, Varela D, Trimmer JS, Cáceres M, Cerda O. KCTD5, a novel TRPM4-regulatory protein required for cell migration as a new predictor for breast cancer prognosis. *FASEB J.* 2020 Jun;34(6):7847-7865. doi: 10.1096/fj.201901195RRR.
- iii. Saldías MP, Maureira D, Orellana-Serradell O, Silva I, **Lavanderos B**, Cruz P, Torres C, Cáceres M, Cerda O. TRP channels interactome as a novel therapeutic target in breast cancer. *Front. Oncol.* 2021 June 10. doi: 10.3389/fonc.2021.621614.
- iv. González M, Zúñiga S, Silva I, **Lavanderos B**, Robinson F, Rosales-Rojas R, Durán F, González W, Cáceres M, Cerda O, Vergara-Jaque A. PPI-MASS: an interactive web server to identify protein-protein interactions from mass spectrometry-based proteomics data. *Front. Mol. Biosci.* 2021 July 01. doi: 10.3389/fmolb.2021.701477
- v. Rivera B, Moreno C, **Lavanderos B**, Hwang J, Fernandez-Trillo J, Orio P, Viana F, Madrid R, Pertusa M. Constitutive phosphorylation as a key regulator of TRPM8 channel function. *Journal of Neuroscience.* 2021 August 26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0345-21.2021.
- vi. López-Moncada F, Torres M, **Lavanderos B**, Cerda O, Castellon E, Contreras H. Secreted protein acidic and rich in cysteine induces E-cadherin repression and enhances prostate cancer cell migration through integrin  $\alpha v \beta 3$  and the transcription factor ZEB1. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 May 24. doi: 10.3390/ijms23115874

## Anexo 2: Presentación en Congresos Internacionales y Nacionales

- López-Moncada F, Torres MJ, **Lavanderos B**, Cerda O, Cerda J, Montecinos VP, Castellón EA, Contreras HR. SPARC induces epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells through an integrin AVB3/ZEB1 signaling pathway. Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción, 2019.

- **Lavanderos B**, González M, Vergara-Jaque A, Cerda O. TRPC6 channel controls RhoA activity. CellBio Virtual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2021.

- **Lavanderos B**, González M, Vergara-Jaque A, Cerda O. TRPC6 channel interacts with the RBD domain of Rhotekin and regulates RhoA activity. 66th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Francisco, United States, 2022.

- **Lavanderos B**, González M, Vergara-Jaque A, Cerda O. Regulation of the actin cytoskeleton and RhoA activity through the TRPC6 channel and its interaction with Rhotekin. XII Seminario Internacional en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquía. Colombia, 2022.

- Cruz P, **Lavanderos B**, Maureira D, Cerda O. KCTD5 modulates store-operated  $Ca^{2+}$  entry through SARAF ubiquitination. XII Seminario Internacional en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquía. Colombia, 2022.

- Silva I, **Lavanderos B**, López J, Ruiz T, Vergara A, Cáceres M, Cerda O. TRPM4 modulates SOCE and cellular migration in a TRPC1-dependent manner. XII Seminario Internacional en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquía. Colombia, 2022

## REFERENCIAS

- Amano, Mutsuki, Mutsuki Chihara, Kazushi Kimura, Yuko Fukata, Nao Nakamura, Yoshiharu Matsuura, and Kozo Kaibuchi. 1997. "Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-Kinase" 275 (February): 1–4.
- Azoitei, Mihai L., Jungsik Noh, Daniel J. Marston, Philippe Roudot, Christopher B. Marshall, Timothy A. Daugird, Sidney L. Lisanza, et al. 2019. "Spatiotemporal Dynamics of GEF-H1 Activation Controlled by Microtubule- and Src-Mediated Pathways." *The Journal of Cell Biology* 218 (9): 3077–97. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812073>.
- Bandell, Michael, Gina M Story, Sun Wook Hwang, Veena Viswanath, Samer R Eid, Matt J Petrus, Taryn J Earley, and Ardem Patapoutian. 2004. "Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin." *Neuron* 41 (6): 849–57. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00150-3).
- Beech, D. J., K. Muraki, and R. Flemming. 2004. "Non-Selective Cationic Channels of Smooth Muscle and the Mammalian Homologues of Drosophila TRP." *Journal of Physiology* 559 (3): 685–706. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068734>.
- Bement, William M., Ann L. Miller, and George Von Dassow. 2006. "Rho GTPase Activity Zones and Transient Contractile Arrays." *BioEssays* 28 (10): 983–93. <https://doi.org/10.1002/bies.20477>.
- Bergert, Martin, Tobias Lendenmann, Manuel Zündel, Alexander E. Ehret, Daniele Panozzo, Patrizia Richner, David K. Kim, et al. 2016. "Confocal Reference Free Traction Force Microscopy." *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12814>.
- Bily, Jan, Lenka Grycova, Blanka Holendova, Michaela Jirku, Hana Janouskova, Kristyna Bousova, and Jan Teisinger. 2013. "Characterization of the S100A1 Protein Binding Site on TRPC6 C-Terminus." *PLoS ONE* 8 (5): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062677>.
- Bishop, Anne L., and Alan Hall. 2000. "Rho GTPases and Their Effector Proteins." *Biochemical Journal* 348 (2): 241–55. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480241>.
- Blanco, Constanza, Danna Morales, Ignacio Mogollones, Ariela Vergara-Jaque, Carla Vargas, Alhejandra Álvarez, Denise Riquelme, et al. 2019. "EB1- and EB2-Dependent Anterograde Trafficking of TRPM4 Regulates Focal Adhesion Turnover and Cell Invasion." *FASEB Journal* 33 (8): 9434–52. <https://doi.org/10.1096/fj.201900136R>.
- Boulter, Etienne, Soline Estrach, Rafael Garcia-Mata, and Chloé C. Féral. 2012. "Off the Beaten Paths: Alternative and Crosstalk Regulation of Rho GTPases." *The FASEB Journal* 26 (2): 469–79. <https://doi.org/10.1096/fj.11-192252>.
- Bousquet, Simon M., Michaël Monet, and Guylain Boulay. 2010. "Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) on Serine 448 Causes Channel Inhibition." *Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40534–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160051>.
- Boys, Alexander J., and Róisín M. Owens. 2021. "Measuring Cellular Contraction: Current Progress and a Future in Bioelectronics." *APL Materials* 9 (4). <https://doi.org/10.1063/5.0040953>.
- Brozovich, F. V., C. J. Nicholson, C. V. Degen, Yuan Z. Gao, M. Aggarwal, and Kathleen G. Morgan. 2016. "Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders." *Pharmacological Reviews* 68 (2): 476–532. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010652>.
- Bubb, Michael R., Adrian M.J. Senderowicz, Edward A. Sausville, Kimberly L.K. Duncan, and Edward D. Korn. 1994. "Jasplakinolide, a Cytotoxic Natural Product, Induces Actin Polymerization and Competitively Inhibits the Binding of Phalloidin to F-Actin." *Journal of Biological Chemistry* 269 (21): 14869–71.
- Buchsbaum, Rachel J. 2007. "Rho Activation at a Glance." *Journal of Cell Science* 120 (7): 1149–52. <https://doi.org/10.1242/jcs.03428>.
- Burrige, Keith, and Magdalena Chrzanowska-Wodnicka. 1996. "Focal Adhesions, Contractility, and Signaling." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12: 463–519. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.463>.
- Burrige, Keith, and Christophe Guilly. 2016. "Focal Adhesions, Stress Fibers and Mechanical Tension." *Experimental Cell Research* 343 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>.
- Burrige, Keith, and Erika S. Wittchen. 2013. "The Tension Mounts: Stress Fibers as Force-Generating Mechanotransducers." *Journal of Cell Biology* 200 (1): 9–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210090>.
- Canales, Jimena, Diego Morales, Constanza Blanco, Jose Rivas, Nicolas Diaz, Ioannis Angelopoulos, and Oscar Cerda. 2019. "A Tr(i)p to Cell Migration: New Roles of Trp Channels in Mechanotransduction and Cancer." *Frontiers in Physiology* 10 (JUN):

- 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00757>.
- Cayouette, Sylvie, Simon M. Bousquet, Nancy Francoeur, Emilie Dupré, Michaël Monet, Hugo Gagnon, Youssef B. Guedri, Christine Lavoie, and Guylain Boulay. 2010. "Involvement of Rab9 and Rab11 in the Intracellular Trafficking of TRPC6." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803 (7): 805–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.010>.
- Chaudhuri, Pinaki, Scott M Colles, Manjunatha Bhat, David R Van Wagoner, Lutz Birnbaumer, and Linda M Graham. 2008. "Elucidation of a TRPC6-TRPC5 Channel Cascade That Restricts Endothelial Cell Movement." *Molecular Biology of the Cell* 19 (8): 3203–11. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0765>.
- Chaudhuri, Pinaki, Michael A. Rosenbaum, Lutz Birnbaumer, and Linda M. Graham. 2017. "Integration of TRPC6 and NADPH Oxidase Activation in Lysophosphatidylcholine-Induced TRPC5 Externalization." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 313 (5): C541–55. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00028.2017>.
- Chaudhuri, Pinaki, Michael A. Rosenbaum, Pritam Sinharoy, Derek S. Damron, Lutz Birnbaumer, and Linda M. Graham. 2016. "Membrane Translocation of TRPC6 Channels and Endothelial Migration Are Regulated by Calmodulin and PI3 Kinase Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8): 2110–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600371113>.
- Chen, M., A. R. Bresnick, and K. L. O'Connor. 2013. "Coupling S100A4 to Rhotekin Alters Rho Signaling Output in Breast Cancer Cells." *Oncogene* 32 (32): 3754–64. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.383>.
- Chen, Xingjuan, Gagandeep Sooch, Isaac S. Demaree, Fletcher A. White, and Alexander G. Obukhov. 2020. "Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now." *Cells* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/cells9091983>.
- Chuan, Boon, Catherine Qiurong, G V Shivashankar, Alexander Bershadsky, Marius Sudol, and Michael Sheetz. 2014. "YAP / TAZ as Mechanosensors and Mechanotransducers in Regulating Organ Size and Tumor Growth." *FEBS Letters* 588 (16): 2663–70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.012>.
- Clapham, David E. 2003. "TRP Channels as Cellular Sensors." *Nature* 426 (6966): 517–24. <https://doi.org/10.1038/nature02196>.
- Collier, F. M., C. C. Gregorio-King, T. J. Gough, C. D. Talbot, K. Walder, and M. A. Kirkland. 2004. "Identification and Characterization of a Lymphocytic Rho-GTPase Effector: Rhotekin-2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (4): 1360–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.205>.
- Cook, Aaron A., Wei Deng, Jinqi Ren, Renhao Li, John Sondek, and Wolfgang Bergmeier. 2018. "Calcium-Induced Structural Rearrangements Release Autoinhibition in the Rap-GEF CalDAG-GEFI." *Journal of Biological Chemistry* 293 (22): 8521–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002712>.
- Coué, Martine, Stephen L Brenner, Ilan Spector, and Edward D. Korn. 1987. "Inhibition of Actin Polymerization by Latrunculin A." *FEBS Letters* 2 (2): 316–18.
- Davis, Jennifer, Adam R Burr, Gregory F Davis, Lutz Birnbaumer, and Jeffery D Molkentin. 2012. "A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo." *Developmental Cell* 23 (4): 705–15. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.017>.
- Desjardins-Park, Heather E., Deshka S. Foster, and Michael T. Longaker. 2018. "Fibroblasts and Wound Healing: An Update." *Regenerative Medicine* 13 (5): 491–95. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0073>.
- Dietrich, Alexander, Michael Mederos Y Schnitzler, Jens Emmel, Hermann Kalwa, Thomas Hofmann, and Thomas Gudermann. 2003. "N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity." *Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 47842–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302983200>.
- Dietrich, Alexander, Michael Mederos y Schnitzler, Maik Gollasch, Volkmar Gross, Ursula Storch, Galyna Dubrovskaya, Michael Obst, et al. 2005. "Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6  $-/-$  Mice ." *Molecular and Cellular Biology* 25 (24): 11191–11191. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.24.11191.2005>.
- Dryer, Stuart E., Hila Roshanravan, and Eun Young Kim. 2019. "TRPC Channels: Regulation, Dysregulation and Contributions to Chronic Kidney Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1865 (6): 1041–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.001>.
- Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giullitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. "Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction." *Nature* 474 (7350): 179–83. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.

- Dvorsky, Radovan, Lars Blumenstein, Ingrid R. Vetter, and Mohammad Reza Ahmadian. 2004. "Structural Insights into the Interaction of ROCK1 with the Switch Regions of RhoA." *Journal of Biological Chemistry* 279 (8): 7098–7104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311911200>.
- Estadella, Irene, Oriol Pedrós-Gámez, Magalí Colomer-Molera, Manel Bosch, Alexander Sorkin, and Antonio Felipe. 2020. "Endocytosis: A Turnover Mechanism Controlling Ion Channel Function." *Cells* 9 (8): 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells9081833>.
- Eun, Young Kim, Claudia P. Alvarez-Baron, and Stuart E. Dryer. 2009. "Canonical Transient Receptor Potential Channel (TRPC) 3 and TRPC6 Associate with Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> (BK<sub>ca</sub>) Channels: Role in BK<sub>ca</sub> Trafficking to the Surface of Cultured Podocytes." *Molecular Pharmacology* 75 (3): 466–77. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051912>.
- Farmer, Louise K., Ruth Rollason, Daniel J. Whitcomb, Lan Ni, Alexander Goodliff, Abigail C. Lay, Lutz Birnbaumer, et al. 2019. "TRPC6 Binds to and Activates Calpain, Independent of Its Channel Activity, and Regulates Podocyte Cytoskeleton, Cell Adhesion, and Motility." *Journal of the American Society of Nephrology* 30 (10): 1910–24. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018070729>.
- Fletcher-Jones, Alexandra, Keri L. Hildick, Ashley J. Evans, Yasuko Nakamura, Kevin A. Wilkinson, and Jeremy M. Henley. 2019. "The C-Terminal Helix 9 Motif in Rat Cannabinoid Receptor Type 1 Regulates Axonal Trafficking and Surface Expression." *eLife* 8: 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.44252>.
- Fredriksson, Simon, Mats Gullberg, Jonas Jarvius, Charlotta Olsson, Kristian Pietras, Sigrún Margrét Gústafsdóttir, Arne Östman, and Ulf Landegren. 2002. "Protein Detection Using Proximity-Dependent DNA Ligation Assays." *Nature Biotechnology* 20 (May): 473–77. <https://www.wakopyrostar.com/blog/post/the-detection-of-endotoxins-via-the-lal-test-the-chromogenic-method/>.
- Ghasemi, Asghar, and Saleh Zahediasl. 2012. "Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians." *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 10 (2): 486–89. <https://doi.org/10.5812/ijem.3505>.
- Grashoff, Carsten, Brenton D. Hoffman, Michael D. Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T. Yang, Mark A. McLean, et al. 2010. "Measuring Mechanical Tension across Vinculin Reveals Regulation of Focal Adhesion Dynamics." *Nature* 466 (7303): 263–66. <https://doi.org/10.1038/nature09198>.
- Greiner, Alexandra M., Hao Chen, Joachim P. Spatz, and Ralf Kemkemer. 2013. "Cyclic Tensile Strain Controls Cell Shape and Directs Actin Stress Fiber Formation and Focal Adhesion Alignment in Spreading Cells." *PLoS ONE* 8 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077328>.
- Grinnell, Frederick, Lenaldo B. Rocha, Cristina Iucu, Sangmyung Rhee, and Hongmei Jiang. 2006. "Nested Collagen Matrices: A New Model to Study Migration of Human Fibroblast Populations in Three Dimensions." *Experimental Cell Research* 312 (1): 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.001>.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and Michael T Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *Nature* 453 (May). <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- Hak, Rim Kim, Cynthia Gallant, Paul C. Leavis, Susan J. Gunst, and Kathleen G. Morgan. 2008. "Cytoskeletal Remodeling in Differentiated Vascular Smooth Muscle Is Actin Isoform Dependent and Stimulus Dependent." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 295 (3): 768–78. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00174.2008>.
- Halder, Georg, Sirio Dupont, and Stefano Piccolo. 2012. "Transduction of Mechanical and Cytoskeletal Cues by YAP and TAZ." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (9): 591–600. <https://doi.org/10.1038/nrm3416>.
- Hara, Yusuke. 2017. "Contraction and Elongation: Mechanics Underlying Cell Boundary Deformations in Epithelial Tissue." *Development Growth and Differentiation* 59 (5): 340–50. <https://doi.org/10.1111/dgd.12356>.
- Haws, Hillary J., Melissa A. McNeil, and Marc D.H. Hansen. 2016. "Control of Cell Mechanics by RhoA and Calcium Fluxes during Epithelial Scattering." *Tissue Barriers* 4 (3): 1–15. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1187326>.
- Hodge, Richard G., and Anne J. Ridley. 2016. "Regulating Rho GTPases and Their Regulators." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (8): 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>.
- Hofmann, Katharina, Susanne Fiedler, Sarah Vierkotten, Jonas Weber, Stephan Klee, Jie Jia, Wolfgang Zwickenpflug, et al. 2017. "Classical Transient Receptor Potential 6 (TRPC6) Channels Support Myofibroblast Differentiation and Development of Experimental Pulmonary Fibrosis." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1863 (2): 560–68.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.002>.
- Hofmann, Thomas, Vladimir Chubanov, Thomas Gudermann, and Craig Montell. 2003. "TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca<sup>2+</sup>-Activated Monovalent Selective Cation Channel." *Current Biology* 13 (13): 1153–58. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00431-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00431-7).
- Hofmann, Thomas, Alexander G. Obukhov, Michael Schaefer, Christian Harteneck, Thomas Gudermann, and Günter Schultz. 1999a. "Direct Activation of Human TRPC6 and TRPC3 Channels by Diacylglycerol." *Nature* 397 (6716): 259–63. <https://doi.org/10.1038/16711>.
- . 1999b. "Direct Activation of Human TRPC6 and TRPC3 Channels by Diacylglycerol." *Nature* 397 (6716): 259–63. <https://doi.org/10.1038/16711>.
- Ito, Hidenori, Ikuko Iwamoto, Kosuke Mizutani, Rika Morishita, Takashi Deguchi, Yoshinori Nozawa, Tomiko Asano, and Koh Ichi Nagata. 2006. "Possible Interaction of a Rho Effector, Rhotekin, with a PDZ-Protein, PIST, at Synapses of Hippocampal Neurons." *Neuroscience Research* 56 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.06.014>.
- Ito, Hidenori, Rika Morishita, and Koh Ichi Nagata. 2018. "Functions of Rhotekin, an Effector of Rho Gtpase, and Its Binding Partners in Mammals." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072121>.
- Iwai, Takashi, Akiyoshi Saitoh, Misa Yamada, Kou Takahashi, Eri Hashimoto, Wataru Ukai, Toshikazu Saito, and Mitsuhiko Yamada. 2012. "Rhotekin Modulates Differentiation of Cultured Neural Stem Cells to Neurons." *Journal of Neuroscience Research* 90 (7): 1359–66. <https://doi.org/10.1002/jnr.23029>.
- Jaalouk, Diana E., and Jan Lammerding. 2009. "Mechanotransduction Gone Awry." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (1): 63–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2597>.
- Jackson, Ben, Karine Peyrollier, Esben Pedersen, Astrid Basse, Richard Karlsson, Zhipeng Wang, Tine Lefever, et al. 2011. "RhoA Is Dispensable for Skin Development, but Crucial for Contraction and Directed Migration of Keratinocytes." *Molecular Biology of the Cell* 22 (5): 593–605. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-10-0859>.
- Jardin, Isaac, Raquel Diez-Bello, Jose J. Lopez, Pedro C. Redondo, Ginés M. Salido, Tarik Smani, and Juan A. Rosado. 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. <https://doi.org/10.3390/cancers10090331>.
- Katoh, Kazuo, Yumiko Kano, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Keigi Fujiwara. 2001. "Stress Fiber Organization Regulated by MLCK and Rho-Kinase in Cultured Human Fibroblasts." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280 (6 49-6): 1669–79. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.c1669>.
- Kim, Jae Gyu, Rokibul Islam, Jung Y. Cho, Hwalrim Jeong, Kim Cuong Cap, Yohan Park, Abu J. Hossain, and Jae Bong Park. 2018. "Regulation of RhoA GTPase and Various Transcription Factors in the RhoA Pathway." *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6381–92. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>.
- Kirmiz, Michael, Nicholas C. Vierra, Stephanie Palacio, and James S. Trimmer. 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): 7562–84. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-18.2018>.
- Kornilova, E. S. 2014. "Receptor-Mediated Endocytosis and Cytoskeleton." *Biochemistry (Moscow)* 79 (9): 865–78. <https://doi.org/10.1134/S0006297914090041>.
- Kwon, Young, Thomas Hofmann, and Craig Montell. 2007. "Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6." *Molecular Cell* 25 (4): 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.021>.
- Laragione, Teresina, Carolyn Harris, and Percio S. Gulko. 2019. "TRPV2 Suppresses Rac1 and RhoA Activation and Invasion in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes." *International Immunopharmacology* 70 (January): 268–73. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.051>.
- Launay, Pierre, Andrea Fleig, Anne Laure Perraud, Andrew M. Scharenberg, Reinhold Penner, and Jean Pierre Kinet. 2002. "TRPM4 Is a Ca<sup>2+</sup>-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization." *Cell* 109 (3): 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00719-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00719-5).
- Lavanderos, Boris, Ian Silva, Pablo Cruz, Octavio Orellana-Serradell, María Paz Saldías, and Oscar Cerda. 2020. "TRP Channels Regulation of Rho GTPases in Brain Context and Diseases." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (November): 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.582975>.

- Lee, Amy, Bernd Fakler, Leonard K. Kaczmarek, and Lori L. Isom. 2014. "More than a Pore: Ion Channel Signaling Complexes." *Journal of Neuroscience* 34 (46): 15159–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3275-14.2014>.
- Lee, Min Jung, Mi Ran Byun, Makoto Furutani-Seiki, Jeong Ho Hong, and Han Sung Jung. 2014. "YAP and TAZ Regulate Skin Wound Healing." *Journal of Investigative Dermatology* 134 (2): 518–25. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.339>.
- Leei, Brian, Damian Matera, Julia F Doerner, Nan Zheng, Sumita Mishra, Hong Bian, Angela Berry, et al. 2019. "In Vivo Selective Inhibition of TRPC6 by Antagonist BI 749327 Ameliorates Fibrosis and Dysfunction in Cardiac and Renal Disease." <https://doi.org/10.1073/pnas.1815354116>.
- Leuner, Kristina, Victor Kazanski, Margarethe Muller, Kirill Essin, Bettina Henke, Maik Gollasch, Christian Harteneck, and Walter E. Müller. 2007. "Hyperforin—a Key Constituent of St. John's Wort Specifically Activates TRPC6 Channels." *The FASEB Journal* 21 (14): 4101–11. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8110com>.
- Lin, Brian Leei, Damian Matera, Julia F. Doerner, Nan Zheng, Donato Del Camino, Sumita Mishra, Hong Bian, et al. 2019. "In Vivo Selective Inhibition of TRPC6 by Antagonist BI 749327 Ameliorates Fibrosis and Dysfunction in Cardiac and Renal Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (20): 10156–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815354116>.
- Liu, Fei, David Lagares, Kyoung Moo Choi, Lauren Stopfer, Aleksandar Marinkovi, Vladimir Vrbanc, Clemens K Probst, et al. 2015. "Mechanotransduction through YAP and TAZ Drives Fibroblast Activation and Fibrosis" 55906: 344–57. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00300.2014>.
- Lord, Samuel J., Katrina B. Velle, R. Dyché Mullins, and Lillian K. Fritz-Laylin. 2020. "SuperPlots: Communicating Reproducibility and Variability in Cell Biology." *Journal of Cell Biology* 219 (6). <https://doi.org/10.1083/JCB.202001064>.
- Mahlandt, Eike K, Sebastián Palacios Martínez, Janine J G Arts, Simon Tol, and Jaap D Van Buul. 2022. *Opto-RhoGEFs: An Optimized Optogenetic Toolbox to Reversibly Control Rho GTPase Activity on a Global to Subcellular Scale, Enabling Precise Control over Vascular Endothelial Barrier Strength.*
- Maier, T., M. Follmann, G. Hessler, H. W. Kleemann, S. Hachtel, B. Fuchs, N. Weissmann, et al. 2015. "Discovery and Pharmacological Characterization of a Novel Potent Inhibitor of Diacylglycerol-Sensitive TRPC Cation Channels." *British Journal of Pharmacology* 172 (14): 3650–60. <https://doi.org/10.1111/bph.13151>.
- Mason, Devon E, Joseph M Collins, James H Dawahare, Trung Dung Nguyen, Yang Lin, Sherry L Voytik-harbin, and Pinar Zorlutuna. 2019. "YAP and TAZ Limit Cytoskeletal and Focal Adhesion Maturation to Enable Persistent Cell Motility."
- Matthews, Benjamin D., Darryl R. Overby, Robert Mannix, and Donald E. Ingber. 2006. "Cellular Adaptation to Mechanical Stress: Role of Integrins, Rho, Cytoskeletal Tension and Mechanosensitive Ion Channels." *Journal of Cell Science* 119 (3): 508–18. <https://doi.org/10.1242/jcs.02760>.
- McCray, Brett A., Erika Diehl, Jeremy M. Sullivan, William H. Aisenberg, Nicholas W. Zaccor, Alexander R. Lau, Dominick J. Rich, et al. 2021. "Neuropathy-Causing TRPV4 Mutations Disrupt TRPV4-RhoA Interactions and Impair Neurite Extension." *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21699-y>.
- McLaughlin, Stuart, and Diana Murray. 2005. "Plasma Membrane Phosphoinositide Organization by Protein Electrostatics." *Nature* 438 (7068): 605–11. <https://doi.org/10.1038/nature04398>.
- Middelbeek, Jeroen, Kirsten Vrenken, Daan Visser, Edwin Lasonder, Jan Koster, Kees Jalink, Kristopher Clark, and Frank N. van Leeuwen. 2016. "The TRPM7 Interactome Defines a Cytoskeletal Complex Linked to Neuroblastoma Progression." *European Journal of Cell Biology* 95 (11): 465–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.06.008>.
- Mishra, Yasaswi Gayatri, and Bramanandam Manavathi. 2021. "Focal Adhesion Dynamics in Cellular Function and Disease." *Cellular Signalling* 85 (May): 110046. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110046>.
- Mizuno, Hiroaki, and Naoki Watanabe. 2012. "MDia1 and Formins: Screw Cap of the Actin Filament." *Biophysics (Japan)* 8: 95–102. <https://doi.org/10.2142/biophysics.8.95>.
- Montell, Craig, and M Rubin. 1989. "Molecular Characterization of the Drosophila Trp Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction" 2: 1313–23.
- Mori, Masayuki X, Ryo Okada, Reiko Sakaguchi, Hideharu Hase, Yuko Imai, Onur K Polat, Satoru G Itoh, Hisashi Okumura, Yasuo Mori, and Yasushi Okamura. 2022. "Critical Contributions of Pre - S1 Shoulder and Distal TRP Box in DAG - Activated TRPC6 Channel by - PIP 2 Regulation." *Scientific Reports*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14766-x>.

- Moya, Iván M., and Georg Halder. 2018. "Hippo–YAP/TAZ Signalling in Organ Regeneration and Regenerative Medicine." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0086-y>.
- Murakoshi, Hideji, Hong Wang, and Ryohei Yasuda. 2011. "Local, Persistent Activation of Rho GTPases during Plasticity of Single Dendritic Spines." *Nature* 472 (7341): 100–106. <https://doi.org/10.1038/nature09823>.
- Narumiya, Shuh, and Dean Thumkeo. 2018. "Rho Signaling Research: History, Current Status and Future Directions." *FEBS Letters* 592 (11): 1763–76. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13087>.
- Noguchi, Satoshi, Akira Saito, and Takahide Nagase. 2018. "YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): 3674. <https://doi.org/10.3390/ijms19113674>.
- Owsianik, G., D. D'Hoedt, T. Voets, and B. Nilius. 2006. "Structure-Function Relationship of the TRP Channel Superfamily." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 156 (January): 61–90. <https://doi.org/10.1007/s10254-005-0006-3>.
- Pardo-Pastor, Carlos, Fanny Rubio-Moscardo, Marina Vogel-gonzález, Selma A Serra, Alexandros Afthinos, Sanela Mrkonjic, Olivier Destaing, et al. 2018. "Piezo2 Channel Regulates RhoA and Actin Cytoskeleton to Promote Cell Mechanobiological Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (8): 1925–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718177115>.
- Park, Soonbum, Sanghoon Lee, Eun Jung Park, Min Ji Kang, Insuk So, Ju Hong Jeon, and Jung Nyeo Chun. 2017. "TGFβ1 Induces Stress Fiber Formation through Upregulation of TRPC6 in Vascular Smooth Muscle Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 (1): 129–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.179>.
- Paterson, H. F., A. J. Self, M. D. Garrett, I. Just, K. Aktories, and A. Hall. 1990. "Microinjection of Recombinant P21(Rho) Induces Rapid Changes in Cell Morphology." *Journal of Cell Biology* 111 (3): 1001–7. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.1001>.
- Pathak, Medha M, Jamison L Nourse, Truc Tran, Jennifer Hwe, Janahan Arulmoli, Dai Trang, and T Le. 2014. "Stretch-Activated Ion Channel Piezo1 Directs Lineage Choice in Human Neural Stem Cells" 111 (45): 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409802111>.
- Peier, Andrea M., Aziz Moqrich, Anne C. Hergarden, Alison J. Reeve, David A. Andersson, Gina M. Story, Taryn J. Earley, et al. 2002. "A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol." *Cell* 108 (5): 705–15. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9).
- Peng, Jing, Fang He, Ciliu Zhang, Xiaolu Deng, and Fei Yin. 2011. "Protein Kinase C-α Signals P115RhoGEF Phosphorylation and RhoA Activation in TNF-α-Induced Mouse Brain Microvascular Endothelial Cell Barrier Dysfunction." *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-28>.
- Piersma, Bram, Saskia De Rond, Paul M.N. Werker, Stellar Boo, Boris Hinz, Marike M. Van Beuge, and Ruud A. Bank. 2015. "YAP1 Is a Driver of Myofibroblast Differentiation in Normal and Diseased Fibroblasts." *American Journal of Pathology* 185 (12): 3326–37. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.011>.
- Reid, Tim, Tomoyuki Furuyashiki, Toshimasa Ishizaki, Go Watanabe, Naoki Watanabe, Kazuko Fujisawa, Narito Morii, Pascal Madaule, and Shuh Narumiya. 1996. "Rhotekin, a New Putative Target for Rho Bearing Homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rho-philin in the Rho-Binding Domain." *Journal of Biological Chemistry* 271 (23): 13556–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13556>.
- Ren, Xiang Dong, William B. Kiosses, and Martin Alexander Schwartz. 1999. "Regulation of the Small GTP-Binding Protein Rho by Cell Adhesion and the Cytoskeleton." *EMBO Journal* 18 (3): 578–85. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.578>.
- Riazanski, Vladimir, Aida G. Gabdoulkhakova, Lin S. Boynton, Raphael R. Eguchi, Ludmila V. Deriy, D. Kyle Hogarth, Nadège Loaëc, et al. 2015. "TRPC6 Channel Translocation into Phagosomal Membrane Augments Phagosomal Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (47): E6486–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518966112>.
- Ridley, Anne J., and Alan Hall. 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): 389–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7).
- Ridley, Anne J., Hugh F. Paterson, Caroline L. Johnston, Dagmar Diekmann, and Alan Hall. 1992. "The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling." *Cell* 70 (3): 401–10. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90164-8).

- Rottner, Klemens, Jan Faix, Sven Bogdan, Stefan Linder, and Eugen Kerkhoff. 2017. "Actin Assembly Mechanisms at a Glance." *Journal of Cell Science* 130 (20): 3427–35. <https://doi.org/10.1242/jcs.206433>.
- Runel, Gaël, Noémie Lopez-ramirez, Julien Chlasta, and Ingrid Masse. 2021. "Biomechanical Properties of Cancer Cells." *Cells* 10 (4): 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells10040887>.
- Saldías, María Paz, Diego Maureira, Octavio Orellana-Serradell, Ian Silva, Boris Lavanderos, Pablo Cruz, Camila Torres, Mónica Cáceres, and Oscar Cerda. 2021. "TRP Channels Interactome as a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer." *Frontiers in Oncology* 11 (June): 1–25. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.621614>.
- Sato, Daisuke, Gonzalo Hernández-Hernández, Collin Matsumoto, Sendoa Tajada, Claudia M Moreno, Rose E Dixon, Samantha O'Dwyer, et al. 2019. "A Stochastic Model of Ion Channel Cluster Formation in the Plasma Membrane." *Journal of General Physiology* 151 (9): 1116–34. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912327>.
- Schaefer, Antje, Nathalie R. Reinhard, and Peter L. Hordijk. 2014. "Toward Understanding RhoGTPase Specificity: Structure, Function and Local Activation." *Small GTPases* 5 (2). <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.968004>.
- Schulie, Anthony J., Chung Yang Yeh, Bailey N. Orang, Olivia J. Pa, Madelynn P. Hopkin, Aubin Moutal, Rajesh Khanna, Dandan Sun, Jason A. Justic, and Elias Aizenman. 2020. "Targeted Disruption of Kv2.1-VAPA Association Provides Neuroprotection against Ischemic Stroke in Mice by Declustering Kv2.1 Channels." *Science Advances* 6 (27). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz8110>.
- Scott, Duncan E., Andrew R. Bayly, Chris Abell, and John Skidmore. 2016. "Small Molecules, Big Targets: Drug Discovery Faces the Protein-Protein Interaction Challenge." *Nature Reviews Drug Discovery* 15 (8): 533–50. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.29>.
- Seo, Jimyung, and Joon Kim. 2018. "Regulation of Hippo Signaling by Actin Remodeling" 51 (3): 151–56.
- Simon, Felipe, Elías Leiva-Salcedo, Ricardo Armisen, Ana Riveros, Oscar Cerda, Diego Varela, Ana Luisa Eguiguren, Pablo Olivero, and Andrés Stutzin. 2010. "Hydrogen Peroxide Removes TRPM4 Current Desensitization Conferring Increased Vulnerability to Necrotic Cell Death." *Journal of Biological Chemistry* 285 (48): 37150–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155390>.
- Singh, Itender, Nebojsa Knezevic, Gias U. Ahmmed, Vidisha Kini, Asrar B. Malik, and Dolly Mehta. 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): 7833–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608288200>.
- Soyombo, Abigail A., Sandra Tjon-Kon-Sang, Youssef Rbaibi, Enkelejda Bashllari, Jill Bisceglia, Shmuel Muallem, and Kirill Kiselyov. 2006. "TRP-ML1 Regulates Lysosomal PH and Acidic Lysosomal Lipid Hydrolytic Activity." *Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7294–7301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508211200>.
- Spassova, Maria A., Thamara Hewavitharana, Wen Xu, Jonathan Soboloff, and Donald L. Gill. 2006. "A Common Mechanism Underlies Stretch Activation and Activation of TRPC6 Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44): 16586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606894103>.
- Stoilova-McPhie, Svetla, Syed Ali, and Fernanda Laezza. 2013. "Protein-Protein Interactions as New Targets for Ion Channel Drug Discovery." *Austin Journal of Pharmacology and Therapeutics* 1 (2): 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25485305> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4255474>.
- Su, Li Ting, Wei Liu, Hsiang Chin Chen, Omayra González-PAGÁN, Raymond Habas, and Loren W. Runnels. 2011. "TRPM7 Regulates Polarized Cell Movements." *Biochemical Journal* 434 (3): 513–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20101678>.
- Sudol, M. 1994. "Yes-Associated Protein (YAP65) Is a Proline-Rich Phosphoprotein That Binds to the SH3 Domain of the Yes Proto-Oncogene Product." *Oncogene* 9(8): 2145-2152.
- Tai, Yilin, Shengjie Feng, Ruiliang Ge, Wanlu Du, Xiaoxing Zhang, Zhuohao He, and Yizheng Wang. 2008. "TRPC6 Channels Promote Dendritic Growth via the CaMKIV-CREB Pathway." *Journal of Cell Science* 121 (14): 2301–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.026906>.
- Tajsharghi, Homa, and Anders Oldfors. 2013. "Myosinopathies: Pathology and Mechanisms." *Acta Neuropathologica* 125 (1): 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1024-2>.
- Talbot, Brianna E., David H. Vandorpe, Brian R. Stotter, Seth L. Alper, and Johannes S. Schlondorff. 2019. "Transmembrane

- Insertases and N-Glycosylation Critically Determine Synthesis, Trafficking, and Activity of the Nonselective Cation Channel TRPC6." *Journal of Biological Chemistry* 294 (34): 12655–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008299>.
- Tang, Qinglin, Wenjun Guo, Li Zheng, Jing-xiang Wu, Meng Liu, Xindi Zhou, Xiaolin Zhang, and Lei Chen. 2018. "Structure of the Receptor-Activated Human TRPC6 and TRPC3 Ion Channels." *Cell Research*, no. April: 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0038-2>.
- Taz, Y A P, Zhijun Liu, Yiju Wei, Lei Zhang, Patricia P Yee, Martin Johnson, Xuexin Zhang, et al. 2018. "Induction of Store-Operated Calcium Entry ( SOCE ) Suppresses Glioblastoma Growth by Inhibiting the Hippo Pathway." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0425-7>.
- Tian, D., S. M.P. Jacobo, D. Billing, A. Rozkalne, S. D. Gage, T. Anagnostou, H. Pavenstaedt, et al. 2010. "Antagonistic Regulation of Actin Dynamics and Cell Motility by TRPC5 and TRPC6 Channels." *Science Signaling* 3 (147): 1–14. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3147er11>.
- Tomasek, James J., Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier, and Robert A. Brown. 2002. "Myofibroblasts and Mechano: Regulation of Connective Tissue Remodelling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (5): 349–63. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
- Turlova, Ekaterina, Christine Y.J. Bae, Marielle Deurloo, Wenliang Chen, Andrew Barszczyk, F. David Horgen, Andrea Fleig, Zhong Ping Feng, and Hong Shuo Sun. 2016. "TRPM7 Regulates Axonal Outgrowth and Maturation of Primary Hippocampal Neurons." *Molecular Neurobiology* 53 (1): 595–610. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9032-y>.
- Varadarajan, Saranyaraajan, Shahana A. Chumki, Rachel E. Stephenson, Eileen R. Misterovich, Jessica L. Wu, Claire E. Dudley, Ivan S. Erofeev, Andrew B. Goryachev, and Ann L. Miller. 2022. "Mechanosensitive Calcium Flashes Promote Sustained RhoA Activation during Tight Junction Remodeling." *Journal of Cell Biology* 221 (4). <https://doi.org/10.1083/jcb.202105107>.
- Venkatachalam, Kartik, and Craig Montell. 2007. "TRP Channels." *Annual Review of Biochemistry* 76: 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>.
- Waheed, Faiza, Pam Speight, Glenn Kawai, Qinghong Dan, András Kapus, and Katalin Szászi. 2010. "Extracellular Signal-Regulated Kinase and GEF-H1 Mediate Depolarization-Induced Rho Activation and Paracellular Permeability Increase." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298 (6). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00408.2009>.
- Winn, Michelle P., Peter J. Conlon, Kelvin L. Lynn, Merry Kay Farrington, Tony Creazzo, April F. Hawkins, Nikki Daskalakis, et al. 2005. "A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis." *Science* 308 (5729): 1801–4. <https://doi.org/10.1126/science.1106215>.
- Wu, Yueh Lin, Jian Xie, Sung Wan An, Noelynn Oliver, Nestor X. Barrezueta, Mei Hsiang Lin, Lutz Birnbaumer, and Chou Long Huang. 2017. "Inhibition of TRPC6 Channels Ameliorates Renal Fibrosis and Contributes to Renal Protection by Soluble Klotho." *Kidney International* 91 (4): 830–41. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.039>.
- Xie, Jian, Sung Wan An, Xin Jin, Yuan Gui, and Chou Long Huang. 2020. "Munc13 Mediates Klotho-Inhibitable Diacylglycerol-Stimulated Exocytotic Insertion of Pre-Docked TRPC6 Vesicles." *PLoS ONE* 15 (3): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229799>.
- Xiong, Shiqiang, Bin Wang, Shaoyang Lin, Hexuan Zhang, Yingsha Li, Xing Wei, Yuanting Cui, et al. 2017. "Activation of Transient Receptor Potential Melastatin Subtype 8 Attenuates Cold-Induced Hypertension through Ameliorating Vascular Mitochondrial Dysfunction." *Journal of the American Heart Association* 6 (8): 1–17. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005495>.
- Yan, Jing, C. Peter Bengtson, Bettina Buchthal, Anna M. Hagenston, and Hilmar Bading. 2020. "Coupling of NMDA Receptors and TRPM4 Guides Discovery of Unconventional Neuroprotectants." *Science* 370 (6513). <https://doi.org/10.1126/science.aay3302>.
- Yan, Yanling, Shuai Liu, Can Hu, Chaoyi Xie, Linyue Zhao, Shimin Wang, Wenjuan Zhang, et al. 2021. "RTKN-1 / Rhotekin Shields Endosome-Associated F-Actin from Disassembly to Ensure Endocytic Recycling" 220 (5).
- Yang, He, Bo Zhao, Chang Liao, Rui Zhang, Kexin Meng, Jia Xu, and Jundong Jiao. 2013. "High Glucose-Induced Apoptosis in Cultured Podocytes Involves TRPC6-Dependent Calcium Entry via the RhoA/ROCK Pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (2): 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.087>.
- Yu, Jinyeong, Sanghyuk Choi, Jihyun Um, and Ki Sook Park. 2017. "Reduced Expression of YAP in Dermal Fibroblasts Is

- Associated with Impaired Wound Healing in Type 2 Diabetic Mice." *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 14 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1007/s13770-016-0019-9>.
- Yue, Lixia, and Haoxing Xu. 2021. "TRP Channels in Health and Disease at a Glance." *Journal of Cell Science* 134 (13): 2–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.258372>.
- Zhan, Xiaoqin, Hadhimulya Asmara, Ning Cheng, Giriraj Sahu, Eduardo Sanchez, Fang Xiong Zhang, Gerald W. Zamponi, Jong M. Rho, and Ray W. Turner. 2020. "FMRP(1–297)-Tat Restores Ion Channel and Synaptic Function in a Model of Fragile X Syndrome." *Nature Communications* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16250-4>.
- Zhang, Jason Z., Andy H. Nguyen, Shigeki Miyamoto, Joan Heller Brown, Andrew D. McCulloch, and Jin Zhang. 2020. "Histamine-Induced Biphasic Activation of RhoA Allows for Persistent RhoA Signaling." *PLoS Biology* 18 (9): 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000866>.
- Zhang, Y, M Rózsa, D Bushey, J Zheng, D Reep, G J Broussard, A Tsang, et al. 2020. "JGCaMP8: A New Suite of Fast and Sensitive Calcium Indicators," 8.
- Zheng, Jie, and Matthew C. Trudeau. 2015. *Handbook of Ion Channels. Handbook of Ion Channels*. <https://doi.org/10.1201/b18027>.