



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE LAS
PROBABLES SEÑALES DE
LOCALIZACIÓN NUCLEAR (NLS) DEL
CANAL TRPV4**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA

CLAUDIA IVETTE RODRÍGUEZ RAMÍREZ

DRA. MA. DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS
ASESORA



Los Reyes Iztacala. Edo. de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

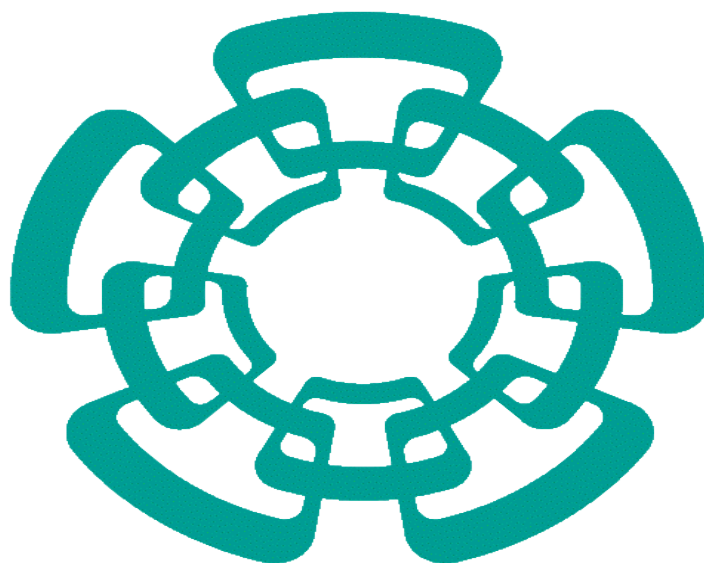


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL DE LA PRESENTE TESIS SE
REALIZÓ EN EL LABORATORIO 38 DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,
BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. MA. DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS, EN COLABORACIÓN DE LOS
REVISORES:**

DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA

DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

MTRA. MARÍA TERESA ORTIZ MELO

Credenda.

Nunca vuelvas atrás la vista, una vez que hayas cerrado tu puerta al deplorable tumulto de la codicia y la ambición... Ama a tu familia y ten muy presente tu ventura. Piensa con cuanto afán la buscarías si no la poseyeras... aprende que el que da con una mano recogerá siempre con las dos... por encima de todo recuerda que se necesita muy poco para llevar una vida feliz. Mira hacia arriba. Camina siempre delante... recorre en silencio tu sendero hacia la eternidad, con caridad y una sonrisa. Cuando partas, todos dirán que tu legado fue dejar un mundo mejor que el que tu encontraste.

A mis padres.

Agradecimientos:

A mis padres: a mi madre **Rosario Ramírez**, por ser la mejor persona en este gran universo, por tu apoyo y amor incondicional, por haberme dado la vida y tu vida misma, jamás podré pagar todo lo que has hecho por mí, el simple hecho de soportarme en los peores momentos, en mi histeria, locura, enojos y mis muchos errores, siempre a mi lado. A mi padre, **Efraín Rodríguez**, por ser mi punto de contrariedad, todos mis esfuerzos te los debo a ti, al final siempre quisiste verme llegar lejos, hiciste de mí una persona compleja, muy similar a ti, llevo conmigo tus consejos y palabras. Sin dudarlo, todo lo que soy y he hecho se los debo a ustedes, gracias por brindarme la oportunidad de tomar mis propias decisiones, aunque muchas veces fueron equivocadas, pero sobre todo por mantener la fe en mí, los amo.

En memoria de mis abuelos **Soledad Flores** y **Froylán Rodríguez**, donde sea que hoy estén siempre los he llevado en mi mente y corazón, me enseñaron lo mucho que vale la humildad en un ser humano y que sin importar cuanto tengas siempre es más feliz el que da sin esperar nada a cambio, me hubiera encantado tenerlos más tiempo conmigo.

Por su puesto, a la **Dra. Refugio García**, por darme la oportunidad, por abrirme las puertas de su laboratorio y por confiar en mí hasta el último momento, sé que no fui una alumna ejemplar, pero sin duda usted siempre fue una excelente asesora una gran científica que me llena de orgullo haber conocido y sobre todo trabajado bajo su cargo.

A mis compañeros del lab. 38: **Gaby E, Gaby T, Susana, Jacqui** y **Arturo**, por compartir conmigo este reto y por su ayuda cuando lo necesité.

A mis sinodales y profesores de la carrera. **Dr. Elías Piedra**, por su apoyo y sus conocimientos, pero sobre todo por la pasión con la que lleva sus conocimientos a nuevas y optimistas personas como yo. **Dra. Martha Salcedo**, por las increíbles clases, su entereza y entrega a sus alumnos y sobre todo por sus palabras de aliento y apoyo incondicional conmigo, es un honor ser considerada por usted. **Mtra. Teresa Ortiz**, profesora, asesora, amiga, siempre con ese entusiasmo y con una sonrisa para todos tus alumnos, contagiaste en mí esas ganas por

compartirle al mundo lo maravillosa que es la biología y sobre todo siempre me diste ánimo para seguir adelante. **Dr. Jorge Campos**, me hubiera encantado tenerlo como profesor, muchas gracias por sus consejos y correcciones.

A mi hermano **Juan Carlos Rodríguez**, por llevar conmigo esta loca vida y enseñarme aquellas lecciones que jamás quise vivir en cabeza propia, aprendí bien de tus errores.

A mi incondicional e inseparable mejor amiga **Josselyn Quiroz** por tantos años juntas, por convertirte en mi familia y adoptarme en la tuya, por tu apoyo incondicional e infinito, por ser mi confidente, psicóloga y compañera de locuras, por siempre tener las palabras correctas y por ayudarme a ser una buena persona. You'll always be my favorite person! I love you.

A mis amigos de la vida: **Lis, Darío y Nalle** por acompañarme desde hace tanto y por grandes momentos de risas. A mis amigos de la universidad: **J.C** gracias por ser el mejor amigo que pudiera existir, somos grandes amigos y sé que tendremos mucho más por vivir y **Yaya** que sin importar cuán tonto pudiese ser algo siempre estuviste para hacerme segunda y sigues estando en todo momento. A ambos, gracias por ser los mejores e indispensables, por su aliento en los peores momentos y por siempre regresarme a la realidad con humor y sarcasmo, siempre serán mi familia encontrada en el camino. **Mony**, siempre estaré feliz de que me hicieras parte de tu vida y me dejes compartir a tu hermosa familia. **Megan, Capi, René** por hacer de ésta, una aventura interminable, compartir con Uds. estos años ha sido la experiencia más alocada del mundo, son indescriptibles, mis clases y reuniones siempre fueron mejor con Uds. **Armando, Ari, Aldo y Marian** por acompañarme cada sábado aun cuando estábamos hartos de tener clases entre semana y de levantarnos temprano, he aprendido mucho de ustedes y compartí grandes momentos en mi vida. Sin duda no terminaría jamás si los nombro a todos, pero cada persona que ha cruzado por mi vida me ha dejado un pedacito de ellos y estaré siempre agradecida, saben que tienen un lugar en mi corazón y siempre llevaré conmigo los momentos que compartimos. Finalmente, a todos esos profesores que se encargaron de mi formación académica, al final de este camino me llevo todo ese conocimiento y experiencias, tuve la fortuna de tener excelencia y calidad en todos mis profesores y siempre estaré agradecida. **INFINITAS GRACIAS.**

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Canales iónicos.	13
1.2. Superfamilia de canales iónicos TRP.	15
1.3. La Subfamilia de canales TRPV.	18
1.4. El canal TRPV4	18
1.5. Señales de localización y exportación nuclear.	23
1.6. Canalopatías producidas por mutaciones en TRPV4.	23
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general.	27
4.2. Objetivos particulares	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Análisis <i>in silico</i> .	28
5.1.1. BLAST de secuencias de proteínas y nucleótidos.	28
5.1.2. Búsqueda de software para identificar señales de localización nuclear en secuencias de proteínas.	30
5.1.3. Alineamiento de secuencias.	32
5.2. Análisis experimental.	34
5.2.1. Mutagénesis dirigida con la técnica del megaprimer.	34
5.2.2. Análisis de DNA por restricción de endonucleasas y electroforesis.	34
5.2.3. Purificación de fragmentos de DNA de gel y ligación.	35
5.2.4. Transformación de bacterias competentes.	35
5.2.5. Purificación de DNA por MIDIPREP con PEG.	35
5.2.6. Extracción con fenol-cloroformo.	36
5.2.7. Secuenciación de DNA.	36

6. RESULTADOS	37
6.1. Resultados <i>in silico</i> .	37
6.1.1. Búsqueda de predictores.	39
6.1.2. Alineamiento de secuencias.	40
6.1.3. Resumen gráfico del análisis de las isoformas deducidas de TRPV4 y sus probables secuencias de localización nuclear	46
6.2. Resultados experimentales.	48
6.2.1. Diseño de la mutante NLS2.	48
6.2.2. Construcción de la mutante NLS2 del canal TRPV4.	48
6.2.2.1. Construcción de los plásmidos que se usaron de templado para la mutagénesis.	49
6.2.3. Amplificación por megaprimer.	55
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES	65
9. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Esquema de un canal iónico.	13
Fig. 2. Filogenia de los canales TRP.	16
Fig. 3. Estructura de los canales TRP.	17
Fig. 4. Estructura e identidad de TRPV4.	20
Fig. 5. Cultivo de células MDCK.	22
Fig. 6. Canalopatías de TRPV4.	24
Fig. 7. Página principal del BLAST.	28
Fig. 8. Buscador del BLAST.	29
Fig. 9. Características de la página de búsqueda del BLAST.	29
Fig. 10. Página principal de cNLS Mapper.	31
Fig. 11. Vista de NTI Vector 6.0 en su opción de alineamiento.	33
Fig. 12. Alineamiento de TRPV4 de humano vs perro.	42
Fig. 13. Alineamiento de TRPV4 de humano y perro con sus isoformas.	43
Fig. 14. Alineamiento de TRPV4 de las isoformas vs las NLS.	46
Fig.15. Esquema de TRPV4, las isoformas y sus principales características.	48
Fig.16. Esquema del sitio de mutagénesis en NLS2.	50
Fig. 17. Electroforesis y mapa del plásmido pCMV-V4DXBRI-.	52
Fig. 18. Electroforesis y mapa del plásmido pV4D-HII.	53
Fig. 19. Electroforesis y mapa del plásmido plJP.	54
Fig. 20. Esquema del megaprimer.	55
Fig.21. Electroforesis, mapa y fragmento del plásmido final pTRPV4-Flag-NLS2	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Revisión bibliográfica de los predictores de NLS.	31
Tabla 2. Secuencias de TRPV4.	38
Tabla 3. Software, NLS y score de predicción.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos	TMD: dominio transmembranal
ANK: repetidos de ankirina	TRP: receptor de potencial transitorio (traducido del inglés Transient Receptor Potential)
Ca ²⁺ : ion de calcio	
Na ⁺ : ion de sodio	TRPV: subfamilia de canales TRP del tipo Vanilloide
NLS: señal de localización nuclear (traducido del inglés Nuclear Localization Signal)	TRPV4: receptor de potencial transitorio vaniloide 4 (del inglés Transient Receptor Potential Vanilloid 4)
PRD: dominio rico en prolina	
RE: retículo endoplásmico	WT: tipo silvestre (Del ingles wild type)
MM: marcador de peso molecular	
SV: variante de slicing (del inglés Slicing Variant)	WB: Western Blot

RESUMEN

El canal TRPV4 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 4*) es un canal iónico no selectivo permeable a Ca^+ que tiene un amplio rango de expresión en todo el cuerpo. Puede ser activado por distintos estímulos externos e internos en la célula como: temperatura, presión osmótica, cambios de pH entre otros, que resultan vitales para el buen funcionamiento de los organismos. Ha sido estudiado en nuestro laboratorio por su inusual localización nuclear, sin embargo, se desconoce su función en este compartimento celular. En el presente trabajo se identificaron *in silico* aquellos sitios en la proteína que podrían ser potencialmente señales de localización nuclear (NLS), y que podrían participar en el direccionamiento del canal al núcleo. Se encontraron 5 probables señales de localización nuclear (NLS) en la secuencia de TRPV4 de humano y 4 probables NLS en la secuencia de perro.

Además, mediante programas bioinformáticos se realizó una extensa revisión de secuencias registradas en el GenBank para identificar secuencias no publicadas del canal TRPV4 con esta estrategia identificamos 5 secuencias nuevas que podrían ser variantes de splicing alternativo del mismo. En el caso del canal TRPV4 de humano se encontraron cuatro secuencias distintas a las descritas con anterioridad, dos de ellas codificarían para proteínas truncadas que llamamos hTRPV4-pT1 y hTRPV4-pT2. Por otra parte, encontramos una variante no reportada de TRPV4 de perro que tiene una inserción de 18 aminoácidos. Para cada nueva variante se ubicaron las NLS eliminadas debido a inserciones o deleciones en la secuencia. Los resultados obtenidos sugieren que las nuevas isoformas encontradas del canal, si se expresan, podrían tener características funcionales diferentes al canal completo o bien presentar cambios en su localización en el núcleo.

Palabras clave: TRPV4, NLS, variantes de splicing, bioinformática

ABSTRACT.

The TRPV4 channel (T_ransient R_eceptor P_otential V_anilloid 4) is a non-selective Ca⁺ permeable ion channel that has a expression range throughout the body, it can be activated by different external and internal stimuli in the cell such as temperature, pressure osmotic, pH changes among others, that are vital for the proper functioning of organisms. It has been studied in our laboratory for its unusual nuclear localization; however its function in this site is unknown. In the present work, we identified in silico, probable sites for nuclear localization (NLS) in the protein which may be involved in the targeting of the channel toward the nucleus. We found 5 nuclear location signals (NLS) in the human TRPV4 protein sequence and 4 NLS in the dog TRPV4 sequence.

In addition, through bioinformatics programs, an extensive sequence review was carried out in the GenBank for non published TRPV4 channel sequences which identified 5 new sequences that correspond to splicing variants of the channel. For human TRPV4, we found four sequences different to those previously described, 2 of them would produced truncated proteins that we called hTRPV4-pT1 and hTRPV4-pT2. On the other hand, a new sequence of the dog TRPV4 was found with an insertion of 18 aminoacids.

In each of the new variants described the NLS eliminated by insertions or deletions in the sequences were indicated.

The results obtained suggest that the new isoforms described of the channel, if they are expressed, could have different functions to the wild type channel, as well as differences in nuclear localization.

Keywords: TRPV4, NLS, splicing variants, bioinformatics

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana permitiendo el pasaje de iones a favor de su gradiente de concentración o de potencial electroquímico. Los canales conforman un poro que provee un ambiente hidrofílico favorable para que los iones atraviesen el medio hidrofóbico de la bicapa lipídica membranal (Hille, 2001).

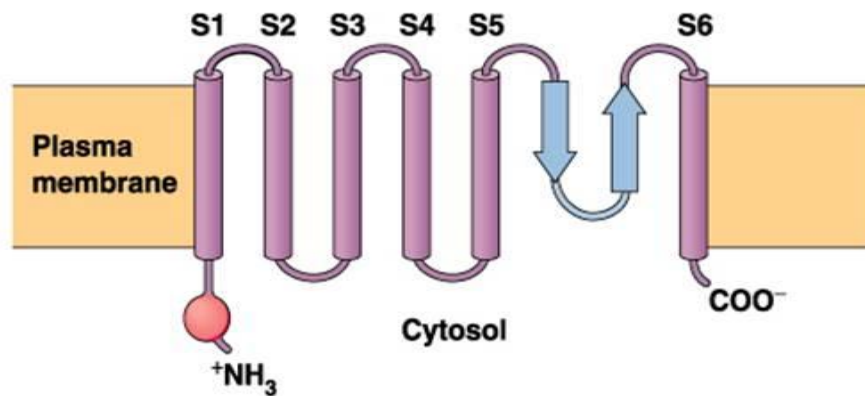


Figura 1. Estructura básica de los canales de potasio activados por voltaje. La proteína está conformada por 6 dominios transmembranales (S1-S6), con las regiones amino y carboxilo terminales hacia el interior celular y el poro de selectividad al ión se forma por un asa entre las regiones S5 y S6. (Tomado de Aidley, 1996).

Cada canal tiene, aunque no siempre, una secuencia de aminoácidos que selecciona los iones que pueden pasar específica o preferencialmente con respecto a otros iones, en función a su carga y disposición espacial, lo cual funciona como un filtro de selectividad. De acuerdo a su carga se clasifican en canales aniónicos, cuando los iones que transporta son de carga negativa y canales catiónicos cuando los iones son de carga positiva. A su vez, cada canal será más o menos selectivo a un cierto ion con respecto a otros canales, a esta capacidad de selección se le denomina permeabilidad (Ramsey, *et al.*, 2006; Everaerts, *et al.*, 2010).

La permeabilidad de un canal confiere propiedades al canal que harán que éste controle la apertura y el cierre del mismo y que hace la diferencia entre un poro

o canal iónico en la membrana celular y un agujero en la misma. Algunos canales estarán más o menos tiempo abiertos y/o cerrados de acuerdo a los estímulos que reciben. Existen distintos estímulos que modifican la apertura de los canales, cómo por ejemplo: temperatura, pH, cambios de presión, voltaje, respuesta a ligandos (neurotransmisores, hormonas, etc.) entre otros (Clapham, 2003; Montell, 2005).

Por las características de los canales iónicos son elementos fundamentales en la excitación eléctrica de las membranas celulares y se presentan en todos los organismos vivos, desde los organismos procariontes hasta los eucariontes de mayor tamaño. La importancia de estos canales es variada y se ha descrito su participación en infinidad de actividades celulares, como la sinapsis, la contracción muscular, la apertura y cierre de estomas en las hojas, el latir del corazón y hasta estímulos eléctricos violentos como el generado por las anguilas y rayas. A nivel celular, el correcto funcionamiento de los canales tiene repercusión en la expresión génica, la transcripción, la proliferación y diferenciación celular. Por el contrario el funcionamiento incorrecto o mutaciones en estos canales pueden causar diversas patologías como arritmias cardiacas, atrofas musculares, epilepsia, migraña, alteraciones en el desarrollo óseo, entre otras (Everaerts, *et al.*, 2010; Nilius y Voets, 2013).

Debido a la gran diversidad de canales iónicos éstos se han clasificado de diversas formas, principalmente por el tipo de ión que permean y por su estructura y/o función de acuerdo a su origen filogenético que se ha descrito en la mayoría de los canales iónicos y que se sabe, tienen un ancestro en común (Clapham, 2003).

1.2. Superfamilia de canales iónicos TRP

Los canales iónicos TRP (*Transient Receptor Potential*) actúan como moléculas sensoriales de la célula que responden a estímulos como temperatura, osmolaridad, hormonas y estímulos fisiológicos de la célula como fosforilación, entorno lipídico, repuesta a ligandos entre otros (Clapham, 2003; Ramsey, et al 2006). Se describieron por primera vez en *Drosophila melanogaster* en 1969 (Cosens y Manning, 1966) en este estudio se exhibe la respuesta a estímulos de luz entre las moscas mutantes en el gen TRP y se compararon con moscas silvestres.

A partir de entonces se ha encontrado la expresión de canales TRP en diversos organismos desde levaduras que responden a estímulos de hipertoncicidad, nemátodos que usan canales TRP como quimiorreceptores, hasta mamíferos en los cuales sus funciones son variadas. Siendo en éstos últimos donde se han descrito mayor cantidad de funciones reguladas por canales TRP como la olfacción, el gusto, la audición, la visión, la mecano y termosensibilidad así como la respuesta osmótica (Zhang, *et al.*, 2003; Montell, 2005; Moore, *et al.*, 2013).

Como se menciona con anterioridad los canales iónicos pueden ser agrupados de acuerdo a su origen filogenético, en el caso de los canales TRP se han agrupado en 7 subfamilias con base a su secuencia de aminoácidos y a sus principales moléculas activadoras, todos los integrantes de la familia TRP tienen características en común como los dominios ricos en prolina (PRD) en la región amino terminal, los repetidos de ankirina (Ank) y la caja TRP en el carboxilo terminal están conservadas en todos los miembros de la familia TRP (Figura 2) (Nilius y Mahieu, 2006, Everaerts, *et al.*, 2010).

Estas subfamilias se clasificaron según las homologías de sus estructuras primarias, iniciando con los TRPC o clásicos o “canónicos” y posteriormente las 6 subfamilias restantes se clasificaron por su modo de activación o bien sus características únicas: TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPP (polcistina), TRPML (mucolipina), TRPA (ankirina) y finalmente TRPN (sin potencial mecanoreceptor C o NOMPC) (Everaerts, *et al.*, 2010).

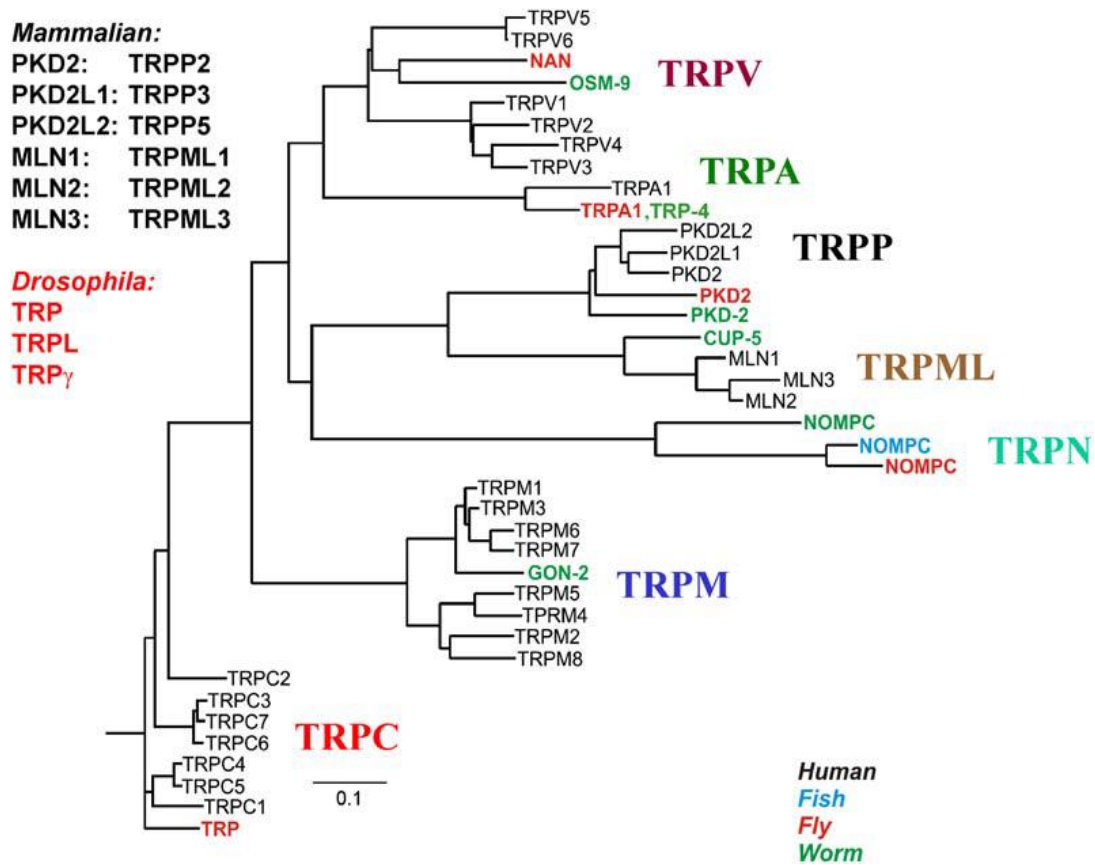


Figura 2. Filogenia de los canales TRP en humano, pez, mosca y nemátodo, marcando con diferentes colores las especies y marcando la relación filogenética de las 7 subfamilias. (Tomada de Nilius y Mahieu, 2006).

La súper familia de TRPs muestra una gran diversidad en la activación e inhibición y son diversos en la selectividad y conductancia iónica. Funcionan mediando el flujo de Na⁺ y Ca⁺ que pasa a través de la membrana citoplásmica y dentro del citoplasma. Además, influyen con muchos procesos celulares como la transcripción, traducción y migración en células no excitables. (Song y Yuan, 2010).

Los canales TRP a semejanza con los canales de potasio activados por voltaje (Figura 1), contienen 6 dominios transmembranales, de los cuales S1 a S4 podrían estar involucrados en la regulación de la apertura y cierre del canal debido a su interacción con ligandos, mientras que S5 y S6 forman el poro que confiere la selectividad del canal. Los dominios amino y carboxilo terminales se encuentran

orientados hacia el citoplasma y son los dominios más variables según el tipo de canal, así mismo, casi todos los miembros de la familia conservan ancestralmente la caja TRP, y otros dominios como los repetidos de ankirina (ANK) y dominios ricos en prolina o PRD (Figura 3) (Clapham, 2003; Ramsey, *et al.*, 2006; Wu, *et al.*, 2010).

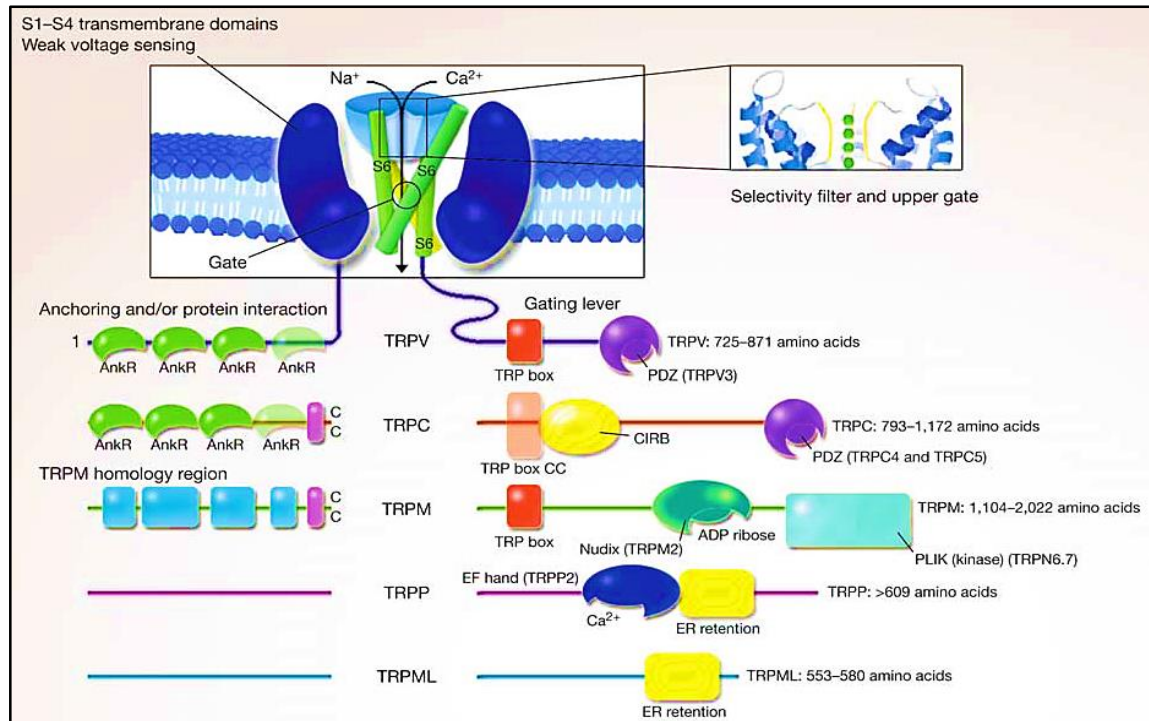


Figura 3. Esquema de la estructura de los canales TRP con sus regiones transmembranales, como se muestran en la imagen, la formación del poro entre S5 y S6 que proporciona la selectividad y otras estructuras conservadas en las distintas subfamilias de los TRPs como la caja TRP, los dominios PDZ, los repetidos de ANK. (Tomada de Clapham, 2003).

1.3. La subfamilia de canales TRPV.

Dentro de la familia de los canales TRP encontramos a los canales TRPV (vaniloide), esta subfamilia tiene relevancia por tratarse de moléculas osmo y termorreguladoras (Clapham, *et al.*, 2003).

Se han descrito seis miembros de esta subfamilia TRPV1 a TRPV6. Los miembros de esta subfamilia contienen de tres a seis repetidos de ankirina en el extremo amino terminal, mientras que el dominio TRP está muy conservado en el extremo C- terminal (Wu, *et al.*, 2010)

TRPV1 a 4 son termosensibles, no selectivos a cationes y modestamente permeables a Ca^{2+} y Na^+ , además son quimiosensores y receptores de ligandos (Clapham, 2003; Wu, *et al.*, 2010)

Por otra parte, los dos miembros restantes TRPV5 y TRPV6 son altamente selectivos a calcio, las propiedades de estos miembros juegan un papel crucial como receptores de calcio en los epitelios, a diferencia de los otros TRPV's éstos responden más lentamente a estímulos de temperatura (Clapham, 2003; Nilius, *et al.*, 2007; Wu, *et al.*, 2010).

1.4. El canal TRPV4

TRPV4 fue descrito por primera vez en el 2000 cuando se observó que es un (VRAC) canal iónico regulador de volumen (Liedtke, *et al.*, 2000) y desde entonces ha sido nombrado de distintas maneras de acuerdo a su respuesta a estímulos: OTRPC4 (Osmosensitive Transient Receptor Potencial), VR-OAC (Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel), VRL-2 (Vanilloid Receptor-Like channel 2), TRP12 (Transient Receptor Potential channel 12); sin embargo en 2002 se observó que el canal responde a distintos estímulos exhibiendo un comportamiento variable (Strotmann, *et al.*, 2000, Liedtke, *et al.*, 2000, Delany, *et al.*, 2001, Nilius, *et al.*, 2001, Watabe, *et al.*, 2003).

El canal TRPV4 es una proteína compuesta de 871 aminoácidos con seis segmentos transmembrana (T1-T6), y cuatro de estas subunidades se ensamblan para formar un canal TRPV4 funcional normalmente ensamblado en homotetrámeros, aunque se han reportado que puede formar heterotetrámeros con otros miembros de la familia TRP como TRPP2 y TRPC1 (White., et. al. 2016) Entre los segmentos T5 y T6 se encuentra el poro permeable, mientras que la región entre T3 y T4 parece constituir un dominio de bolsillo de unión a agonistas, en particular, para los compuestos de ésteres de forbol como el 4 α -PDD que es un activador específico del canal. Este dominio podría también formar parte de la compuerta del canal (Shigematsu, *et al.*, 2010, Stewart, *et al.*, 2010, Nilius y Owsianik 2011). Las regiones amino y carboxilo-terminales situadas del lado citoplasmático contienen una variedad de dominios funcionales importantes y de unión proteína-proteína. Un dominio rico en prolina (PRD) en la región amino citoplásmica se ha implicado en el mecanismo de sensibilización de la actividad del canal TRPV4. Este dominio está seguido de seis repetidos de anquinina (ARD) (Figura 4 A.) En el dominio carboxilo terminal se localiza la caja TRP y un dominio de unión a calmodulina, como se observa en el esquema de la figura 4 A (Arniges, *et al.*, 2006, Nillius y Voets, 2013).

El gen que codifica para el canal TRPV4 en humanos se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.1) y consta de 15 exones, con los que se pueden generar cinco variantes por procesamiento (splicing) alternativo denominadas de TRPV4A a E (Figura 4 B). La variante A (TPRV4-A) corresponde a la proteína completa, y junto con la variante TRPV4-D constituyen las dos únicas variantes que llegan a membrana y son funcionales. Las variantes restantes presentan problemas durante el tráfico a la membrana plasmática y son retenidas en el retículo endoplásmico (RE) (Argines, *et al.*, 2006; Plant y Strotmann, 2007).

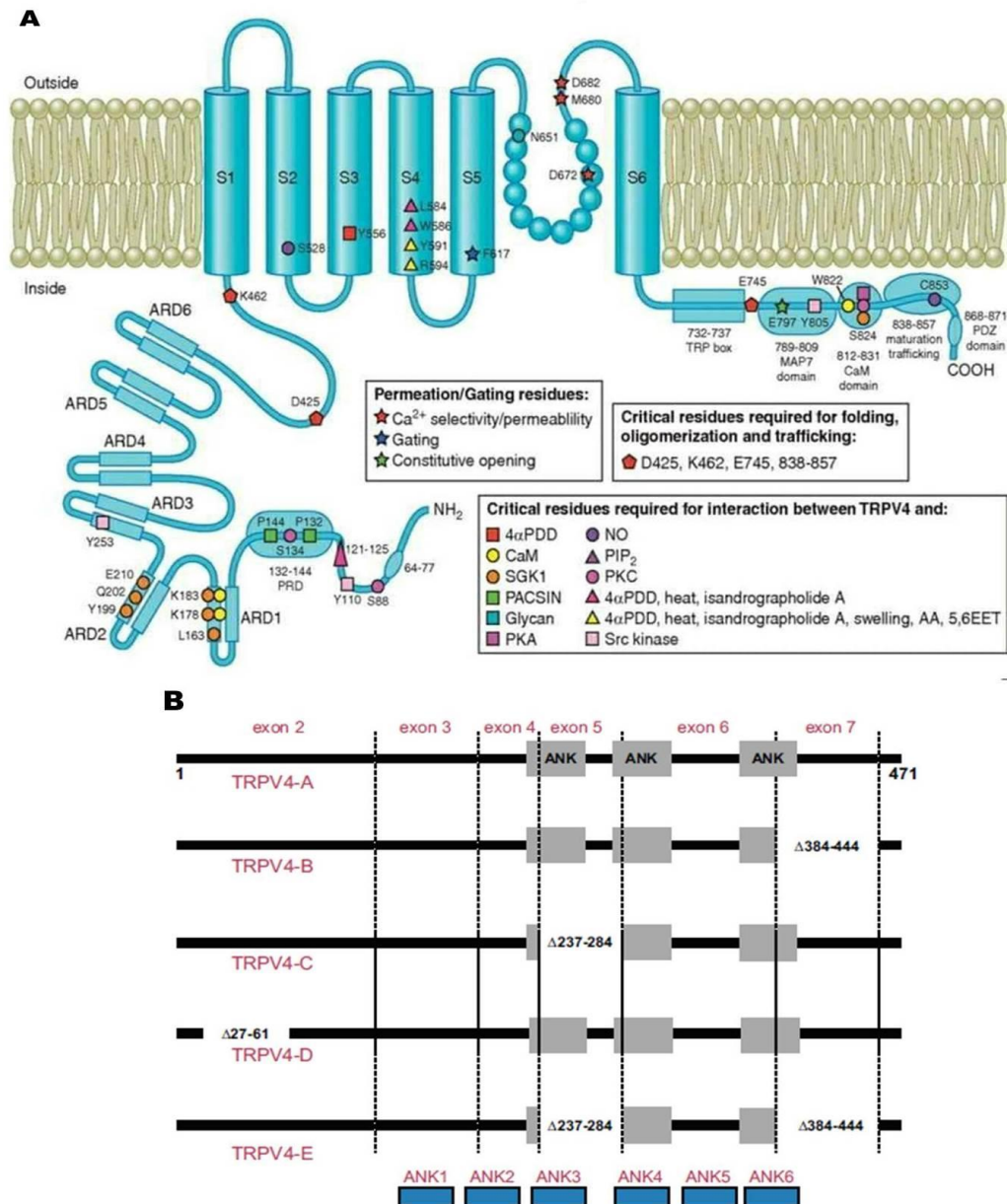


Figura 4. Estructura del canal TRPV4. **A)** La cinta azul representa la estructura de la proteína del canal TRPV4 (871aa), los dominios repetidos de ANK en el extremo amino, la caja TRP en el extremo carboxilo, los seis dominios transmembranales (S1-S6), el poro entre la región S5 y S6, se representan también sitios de interacción del canal importantes como los de tráfico, permeabilidad y de interacción a activadores como 4αPDD, PKA, PKC entre otros. **B)** Representación esquemática de las variantes A, B, C, D y E de TRPV4 identificadas en células epiteliales de traquea de humano indicando las regiones ausentes por procesamiento alternativo en cada isoforma y ubicando los sitios donde se encuentran los repetidos de ANK (Tomado de White, *et al.*, 2016).

El canal TRPV4 se expresa en la membrana celular en distintos tipos de tejidos y juega un papel importante en la homeostasis de la célula.

Han sido descritas algunas otras funciones importantes del canal como la regulación del volumen celular (Lei, *et al.*, 2013) y su interacción con las proteínas β -catenina y e-cadherina en el desarrollo de las uniones célula-célula indispensables para la correcta estructura de los queratinocitos que forman la piel (Sokabe, *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio se reportó que la actividad del canal TRPV4 es necesaria para la correcta formación y la regulación de la hermeticidad de las uniones estrechas en células de epitelio corneal (Martínez-Rendón *et al.*, 2017). Se conocen alrededor de 37 interacciones del canal TRPV4 con otras proteínas, las cuales son importantes para el correcto funcionamiento de la célula (White, *et al.*, 2016). Aunado a las funciones normales del canal en la membrana de la célula y su importancia en las uniones celulares, se ha reportado la presencia inusual del canal en el núcleo. Se ha observado en cardiomiocitos de rata neonata la presencia del canal TRPV4 predominantemente en el núcleo (Zhao, *et al.*, 2012).

En nuestro laboratorio hemos descrito la localización nuclear del canal TRPV4 en células MDCK de epitelio renal y se ha observado que cuando se activa al canal éste se transloca al citoplasma (Martínez-Rendón, resultados no publicados). Por otro lado, Arturo Matamoros (2016) en su tesis de licenciatura analizó por separado las fracciones de proteínas nucleares y citoplásmicas de células MDCK y por Western Blot usando anticuerpos específicos para TRPV4 encontró que el canal está en la fracción nuclear y tiene un peso de 122 kDa que corresponde al tamaño del canal completo aunque el anticuerpo también detecta una proteína de 90 kDa que se localiza en el citoplasma (Matamoros, 2016).

Además, en el laboratorio se confirmó la localización diferencial del canal TRPV4, Gabriela Espadas, transfectó células MDCK con el canal TRPV4 marcado con una bandera de Flag para distinguirlo del canal endógeno y observó que 24 hrs después de transfectar, el canal se encuentra en mayor cantidad en el núcleo mientras que a 48 hrs postransfectar el canal se mueve hacia el citoplasma y la membrana plasmática (figura 5) (G. Espadas, resultados no publicados).

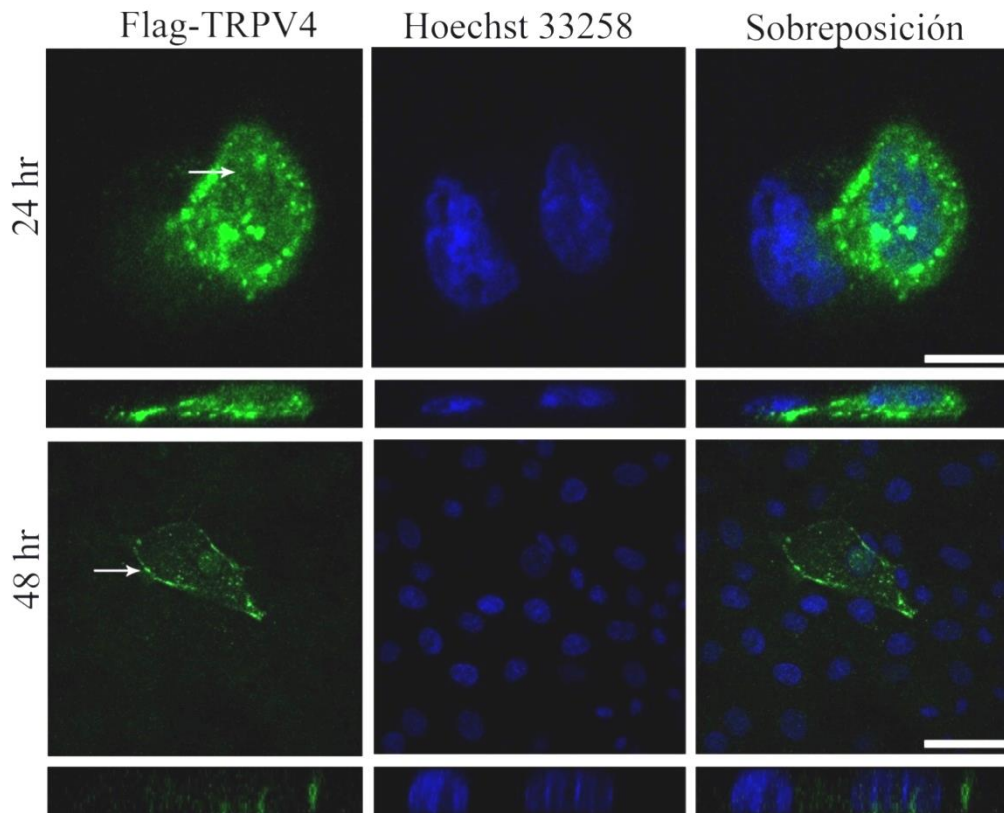


Figura 5. Cultivo de células MDCK transfectadas con el canal TRPV4-Flag a 24 y 48 hrs de expresión. En verde se observa el canal y en azul el DNA teñido con Hoeschst, donde se ve que el canal tiene presencia en el núcleo celular, con mayor aparición a las 24 hrs y menor pero aun presente a las 48 hrs.

Por otra parte, se sabe que todas las proteínas halladas en el núcleo son sintetizadas en el citoplasma y se transportan al núcleo a través de los complejos del poro nuclear. Para que este proceso suceda, las proteínas necesitan una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por las importinas que dirigen su transporte selectivo hacia el núcleo (Katta, *et al.*, 2014).

1.5. Señales de localización y exportación nuclear.

Todas las proteínas halladas en el núcleo son sintetizadas en el citoplasma y se transportan al núcleo a través de los complejos del poro nuclear (NPC). Estas proteínas contienen una señal de localización nuclear (NLS) que dirige su transporte selectivo hacia el núcleo (Ezak y Ferkey 2011). La orientación al núcleo implica esta pequeña secuencia de aminoácidos que corresponde a la señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por una proteína de importación llamada importina que transporta la proteína cargo a través del complejo del poro nuclear. La proteína cargo se acumula en el núcleo mientras que la importina se recicla hacia el citoplasma. Por el contrario, para que una proteína se mueva del núcleo hacia el citoplasma requiere de una secuencia de exportación nuclear (NES) que es reconocida por una proteína de exportación competente llamada exportina, ésta forma un complejo que se transporta a través del canal central del poro nuclear hacia el citoplasma, donde se estimula la hidrólisis de GTP y la exportina es liberada. (Devlin, 2004; Katta S. et al, 2014).

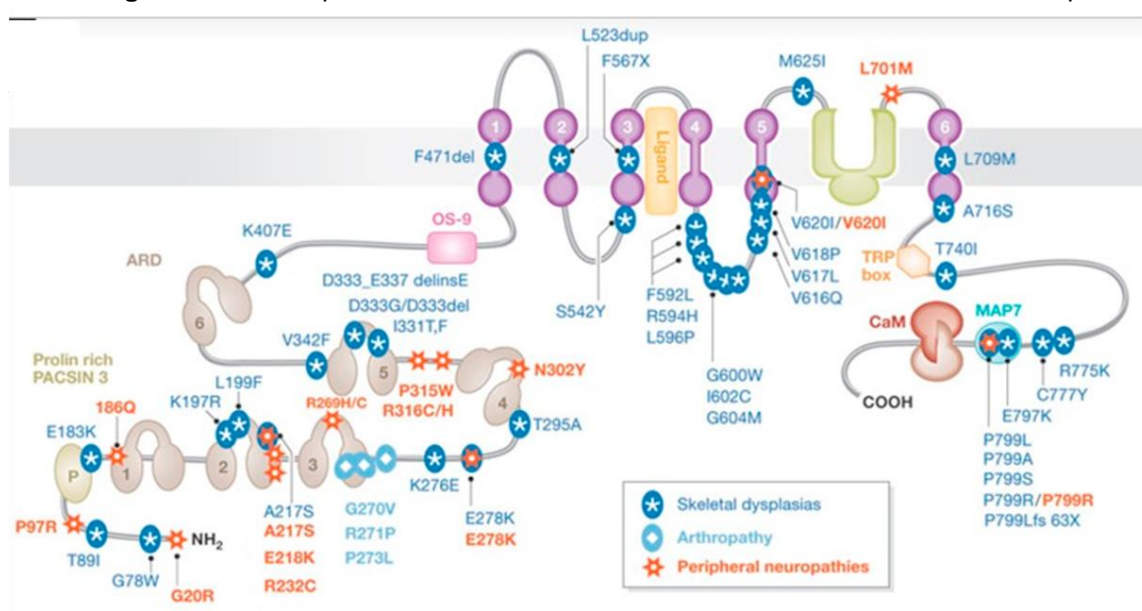
1.6. Canalopatías producidas por mutaciones en TRPV4.

Los canales iónicos al igual que las otras proteínas existentes en los organismos, pueden perder o cambiar de función si se altera su secuencia de aminoácidos. Los trastornos de los canales iónicos son denominados comúnmente canalopatías y son enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en las proteínas de los canales iónicos. Debido a que estos están íntimamente relacionados con la actividad eléctrica de la célula muchas canalopatías se manifiestan como trastornos de los tejidos excitables (nervioso y muscular). Por lo cual ha sido una importante contribución de la biología molecular a la medicina, el análisis de las alteraciones de dichos canales, como diagnóstico de estas enfermedades (Hille, 2001; Everaerts, *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que mutaciones en el canal TRPV4 afectan a los sistemas esquelético y nervioso periférico y pueden causar enfermedades severas incluso en

algunas ocasiones pueden ser letales (Dai, *et al.*, 2010; Nilius, *et al.*, 2003) Las canalopatías descritas de TRPV4 (figura 6) son en general enfermedades osteoarticulares y neurosensoriales como displasia esquelética con estatura baja, defectos en la calcificación del hueso, defectos motores en las extremidades, defectos en el sistema respiratorio, defectos sensoriales, atrofia músculo espinal y desorden muscular progresivo, entre otras (Everaerts, *et al.*, 2010, Nillius y Voets, 2013).

Figura 6. Vista esquemática del canal TRPV4 indicando las mutaciones severas que



ocasionan displasia esquelética, neuropatías y artropatías en humano. Tomado de Nilius y Voets 2013.

Además de las canalopatías descritas se ha relacionado el mal funcionamiento del canal TRPV4 con enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes tipo II, cirrosis, asma, males cardiacos, dificultades auditivas y algunas inflamaciones intestinales. (Everaerts, *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN.

Se ha demostrado la presencia inusual del canal TRPV4 en el núcleo celular, adicionalmente en el laboratorio se ha visto que su localización subcelular cambia cuando se induce la actividad del canal, por ejemplo, poniendo a las células en medio hiposmótico, en estas condiciones el canal se transloca del núcleo al citoplasma. Estas observaciones sugieren que la molécula del canal tenga señales de direccionamiento nuclear que regulen activamente el tránsito núcleo-citoplasma del TRPV4 en respuesta a señales celulares.

La búsqueda *in silico* de secuencias con características de señales de localización nuclear nos dará evidencias teóricas sobre el número y la ubicación de estas señales dentro de la proteína del canal para su posterior comprobación experimental.

3. HIPÓTESIS.

Si el canal TRPV4 es capaz de dirigirse al núcleo celular, esta proteína deberá contener una o más señales de localización nuclear (NLS) funcionales. Por lo que, si construimos una mutante en alguna de las probables señales de localización nuclear, en este caso en la señal 2 (mutNLS2) del canal TRPV4 y ésta es funcional la localización del canal debería verse afectada y no se encontraría en el núcleo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

- Identificar probables señales de localización nuclear (NLS) en la secuencia del canal TRPV4

4.2. Objetivos particulares:

- ✓ La búsqueda *in silico* de probables señales de localización nuclear en la secuencia de aminoácidos del canal TRPV4 de perro y de humano utilizando diferentes programas de libre acceso.
- ✓ Hacer una búsqueda por homología en el GenBank con la finalidad de identificar si existen secuencias diferentes del canal TRPV4 de perro y de humano que pudieran corresponder a isoformas no reportadas del canal.
- ✓ Analizar las isoformas del canal y alinearlas con el canal silvestre para ubicar si alguna carece de las probables señales de localización nuclear.
- ✓ Introducir una mutación en la probable señal de localización nuclear 2 (mutNLS2) en el plásmido pTRPV4-Flag por mutagénesis dirigida.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Con la finalidad de cumplir los objetivos descritos se empleó la siguiente metodología, desarrollada en dos fases:

5.1. Análisis *in silico*.

5.1.1. BLAST de secuencias de proteínas y nucleótidos.

Se realizó una búsqueda de las secuencias de nucleótidos y proteínas del canal TRPV4 de humano y perro reportadas en el GenBank, estas secuencias fueron la base de la investigación *in silico*, una vez obtenidas se hizo una búsqueda mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para proteínas y nucleótidos del canal TRPV4 de humano y perro.

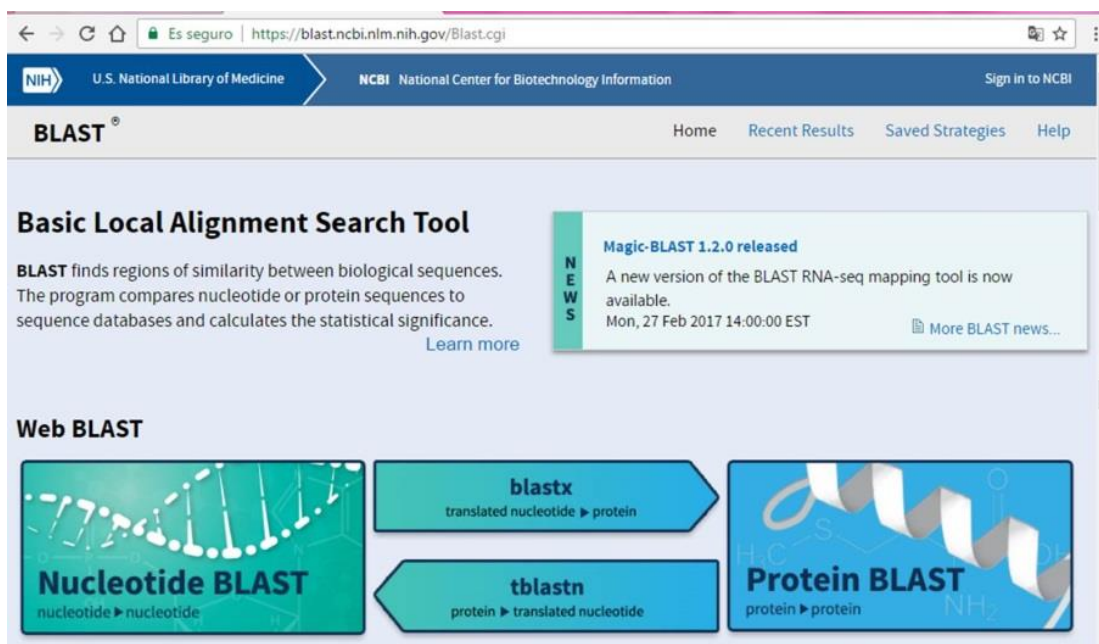


Figura 7. Página principal de la herramienta BLAST, en esta se puede elegir la opción deseada para comparar secuencias de nucleótidos, proteínas, o traducciones de proteínas a nucleótidos y viceversa.

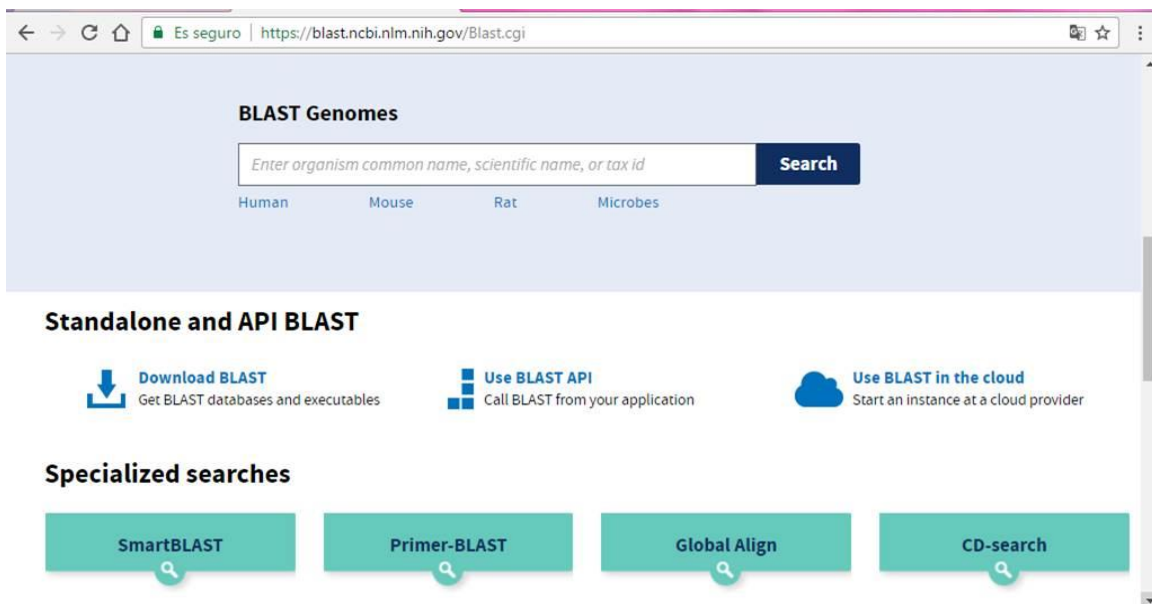


Figura 8. Buscador BLAST. Se incluye también en la página principal un buscador de genoma por especie o nombre científico con la opción de descargar en archivo las secuencias encontradas

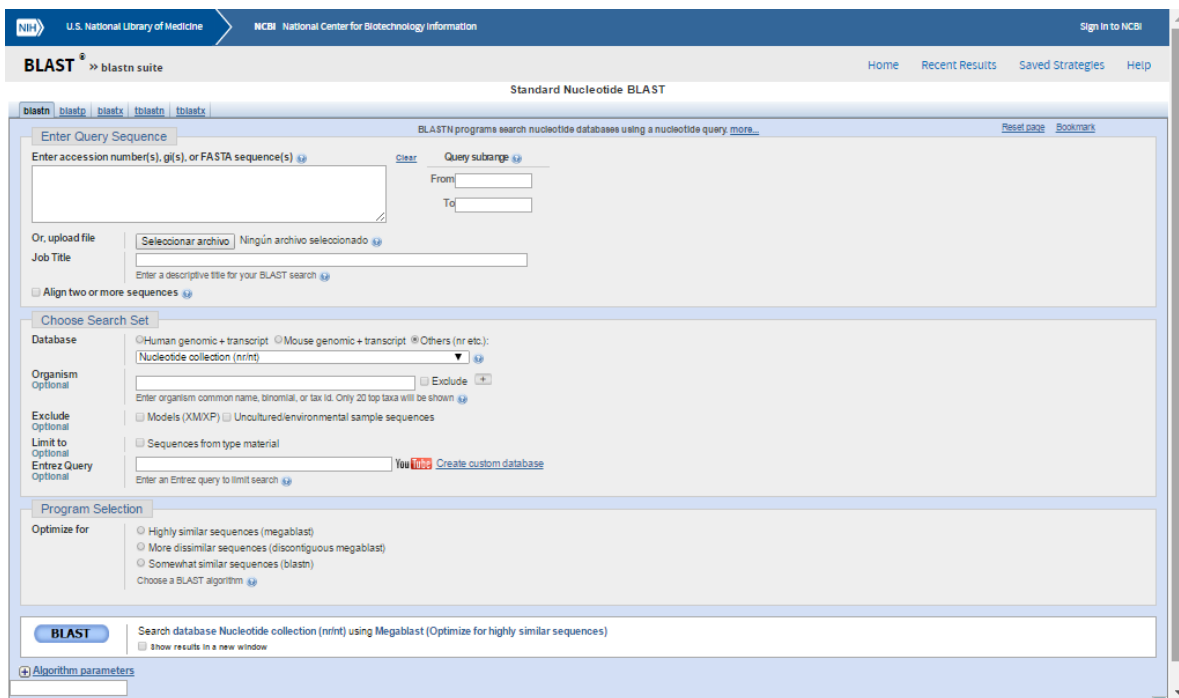


Figura 9. Página de búsqueda nos ofrece una serie de especificaciones para realizar de manera puntual o general la comparación de secuencias, en ella tenemos las opciones de introducir el número de acceso si es que se cuenta con él, copiar la secuencia directamente, o introducir el archivo en terminación .fasta, además de otras especificaciones que nos permiten puntualizar nuestra búsqueda.

Se utilizó esta herramienta bioinformática Fig. 9 y se introdujo la secuencia completa de TRPV4 de humano reportada en el GenBank (No. de Acc. NM_021625) y se usó la opción de comparación de nucleótidos para buscar por homología las diferentes secuencias reportadas del canal TRPV4 y saber si existen algunas que no hayan sido reportadas anteriormente. De la misma forma se realizó la comparación de las secuencias de proteínas para saber si había secuencias derivadas de las traducciones de las secuencias de nucleótidos o solo existían las secuencias a partir de cDNA.

Una vez realizadas estas búsquedas se llevó a cabo una delimitación de las secuencias encontradas, se tomaron en cuenta aquellas que tuvieran un porcentaje de similitud de entre 80 y 100 por ciento y se eliminaron aquellas que fueran idénticas pero habían sido reportadas por distintos autores dejando únicamente una copia por secuencia encontrada. Después de realizar esta delimitación se descargaron las secuencias en dos tipos de archivos, en archivo de texto y en terminación .fasta, correspondiente al archivo utilizable por otra herramienta bioinformática llamada NTI Vector 6.0 (Invitrogen), el cual se utilizó para realizar las traducciones de las secuencias de nucleótidos que no estaban descritas con anterioridad en el GenBank o que corresponden a secuencias de cDNA.

5.1.2. Búsqueda de software para identificar señales de localización nuclear (NLS) en secuencias de proteínas.

Simultáneamente a la búsqueda de las secuencias del canal TRPV4, se analizaron algunos artículos que hacían referencia a predictores de NLS (señales de localización nuclear) una vez localizados estos software se buscaron en la web para saber cuáles aún están activos y ofrecen la opción de detectar mediante un algoritmo que detecta grupos de aminoácidos básicos consecutivos con lo que podemos obtener una probable NLS (ver sección de Resultados) y de esta forma conocer probables NLS en la secuencia del canal TRPV4 de perro y de humano. De los probables softwares utilizados por otros autores y reportados en la literatura (ver Tabla 1) solo se encontraron tres en funcionamiento.

SOFTWARE	REF DE SOFTWARE	REF USO DE SOFTWARE
NucPred	Brameier, <i>et al.</i> , 2007	Patel <i>et al</i> , 2013
NoD	Scott, <i>et al.</i> , 2001	Raghavendra y Bonham-Smith., 2013
NLStradamus	Nduyen Ba, <i>et al.</i> , 2009	Nduyen Ba <i>et al</i> , 2009
cNLSMapper	Kosugi, <i>et al.</i> ,2009	Kosugi, <i>et al.</i> , 2009
Nuc-PLoc	Shen y Chou, 2007	Heddad, <i>et al.</i> , 2004
NetNES	la Cour, <i>et al.</i> , 2004	Zhengdeng y Yang, 2005
Machine learning & Evolution Laboratory	Lin, <i>et al</i> 2014	Lin <i>et al</i> , 2014
pSORT II prediction	Nakai K y Horton P 1999	Moreno-Altamirano <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Revisión bibliográfica de predictores de NLS. Se reporta el diseñador del predictor y una referencia de uso del mismo software en alguna investigación científica.

Una vez realizada esta búsqueda, se seleccionaron solo aquellos predictores que aún están disponibles en la web, aquellos que son de uso libre y gratuito y finalmente los que ofrecen una predicción de NLS. A su vez se examinaron las especificaciones de estas herramientas para saber cuál es su nivel de predicción y en que se basa el algoritmo predictivo con el que trabaja cada uno.



Figura 10. cNLS Mapper predictor activo actualmente en la web, básicamente funciona introduciendo la secuencia de aminoácidos que deseamos analizar, en ésta podemos copiar y pegar la secuencia, introducir un archivo en terminación .fasta o .row, se puede elegir el porcentaje de confiabilidad de la secuencia y finalmente si se quiere examinar toda la secuencia o solo los 60 aminoácidos terminales.

La fig.10 es un ejemplo de los predictores encontrados, en general todos trabajan de la misma forma que cNLS Mapper por lo que usamos esta herramienta para ejemplificar el uso de un predictor de NLS además de ser de los softwares más completos, sencillos y con mayores especificaciones sobre cómo se realiza la predicción dentro de la secuencia de la proteína.

Con las herramientas bioinformáticas que nos ofrecieron resultados satisfactorios para la predicción de NLS fueron analizadas las secuencias de la proteína del canal TRPV4 en ambas especies y de esta forma obtuvimos las 5 NLS con las que se trabajó durante esta tesis y en algunos otros trabajos dentro del laboratorio.

5.1.3. Alineamiento de secuencias

Después de obtener las secuencias reportadas en el GenBank correspondientes al canal TRPV4 de humano y perro, se realizaron tres alineamientos con el programa Vector NTI 6.0 (Invitrogen), el cual nos ofrece entre algunas otras opciones alinear una o varias secuencias de nucleótidos o aminoácidos para analizar las similitudes entre ellas. Para este trabajo se analizaron las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de ambas especies antes mencionadas.

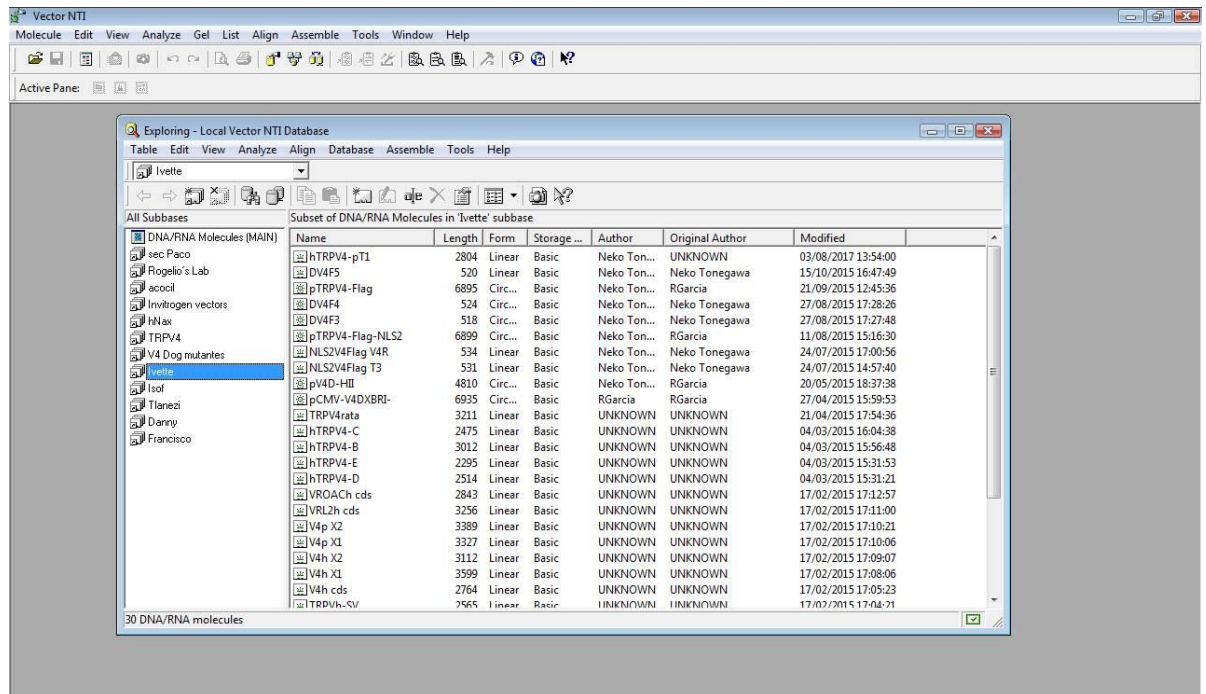


Figura 11. Vector NTI 6.0 en la opción de *alignment*, nos ofrece la posibilidad de introducir la secuencia en archivo .fasta y poder alinear varias secuencias al mismo tiempo

El primero de los alineamientos corresponde a las secuencias de perro y humano, las cuales se analizaron con el objetivo de saber cuál es su porcentaje de similitud, el segundo alineamiento fue de las secuencias reportadas como isoformas del canal TRPV4 y finalmente el tercer alineamiento conjunta las isoformas del canal en ambas especies y ubica las probables NLS encontradas por los predictores web.

5.2. Análisis experimental

5.2.1. Mutagénesis dirigida con la técnica de megaprimer.

Se realizaron dos PCR's para introducir la mutación mutNLS2 en el plásmido que contiene al canal TRPV4 con un epítipo Flag fusionado al extremo carboxilo terminal, pTRPV4-Flag. (Ver esquema en la figura 17).

PCR 1: Se realizó este procedimiento para amplificar el inicio del canal TRPV4 con la mutación (mutNLS2), como templado se utilizó al plásmido (pIJP), se usaron los primers forward (T3: 3'-AATTAACCCTCACTAAGGG-5') y, el primer reverso (mutNLS2R: 5'-CCTGGTCCAGGGCCTGCTGATGGGTGACC-3') y una enzima DNA polimerasa de alta fidelidad PlatinumPfx (Invitrogene), esto se realizó en las siguientes condiciones de amplificación: 5min a 94°C para desnaturalización inicial y 35 ciclos de: 15 seg a 94°C, 30 seg a 50°C, 45 seg a 68°C.

PCR 2: con plásmido templado pTRPV4-D y los primers forward (NLSmut2F: 5'-GCTGACCCATCAGCAGGCCCTGACTGACGAGG-3'), el primer reverso DV4M680KR secuencia 5'-CATCTCCAGGTCCACCCTTGCCG-3', utilizando la enzima de alta fidelidad PlatinumPfx, en las siguientes condiciones de amplificación: 5 min a 94°C, y 35 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 1.30 min a 68°C.

De la clonación de este fragmento amplificado se obtuvo el plásmido pTRPV4-Flag-NLS2.

5.2.2. Análisis de DNA por restricción de endonucleasas y electroforesis.

Para verificar que los fragmentos de PCR obtenidos tuvieran solo los sitios de corte requeridos o bien para subclonarlos en los vectores adecuados, se hizo un análisis de restricción por endonucleasas Not I, EcoRI, y Hinc II, con 3 unidades de enzima por cada microgramo de plásmido. Posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% incluyendo un marcador de peso molecular de referencia. El gel se corrió a 120 volts por 30 minutos y finalmente se observó el patrón de bandas de DNA en un transiluminador de luz UV y se fotografió.

Purificación de fragmentos de DNA de gel y ligación.

Se purificó el DNA obtenido de la mutagénesis en agarosa al 0.8% incluyendo un marcador de peso molecular de referencia. Se corrió el gel a 120 volts por 30 minutos y se observó la migración de bandas de DNA en un transiluminador de luz UV. Después de obtener la banda del peso correspondiente se cortó el gel y purificó con el kit gel and PCR Clean-Up System Promega. Y se ligó el fragmento con el templado usando la enzima ligasa T4 de Roche.

5.2.3. Transformación de bacterias competentes

Se transformaron bacterias competentes DH5- α con 10 ng del plásmido o bien con la mezcla de ligación cuando se construyó algún plásmido. Se aislaron colonias en cajas Petri con medio LB y kanamicina 20 $\mu\text{g/ml}$ dejando incubar a 37°C toda la noche. Posteriormente se inoculó una colonia de estas bacterias en 800 μl de medio LB con antibiótico durante ocho horas para crecer la bacteria y finalmente inocular 500 μl de este cultivo en un matraz con 50 ml de medio LB y kanamicina 20 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó nuevamente a 37°C overnight para purificar el DNA plasmídico.

5.2.4. Purificación de DNA por MIDIPREP con polietilenglicol (PEG).

Después de hacer crecer las bacterias se realizó una purificación de DNA de plásmido por PEG para obtener el DNA y secuenciar.

MIDIPREP con PEG consiste en tres soluciones de lisis con las cuales se obtiene el DNA plasmídico contenido en las bacterias, éste se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol por 10 minutos a T.A se centrifugo a 10,000 rpm durante 15 minutos, se resuspendió el DNA en 1 ml de TE y se incubó con RNAsa A (100 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos a 37°C y se agregó 1 ml de la solución de polietilenglicol 13% en NaCl 1.6 M durante 5 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 200 μl de buffer TE.

5.2.5. Extracción con fenol-cloroformo.

Para eliminar las proteínas de la muestra de DNA se realizó la extracción con fenol: cloroformo: isoamilico (25: 24:1) del cual se recuperó el DNA y se precipitó agregando 0.1 volumen de 3 M acetato de sodio (pH 5.2) y 0.6 volumen de isopropanol y finalmente se disolvió la pastilla en agua Milli Q estéril.

5.2.6. Secuenciación de DNA

Se utilizó la secuenciación automatizada del DNA con el kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) para comprobar si la mutación mutNLS2 se había incorporado al plásmido pTRPV4-Flag.

6. Resultados.

Este estudio se llevó a cabo en dos fases, la primera fase correspondió al análisis *in silico*, la segunda fase al análisis experimental.

6.1. Análisis *in silico*.

El análisis realizado en esta primera fase, consistió en una revisión gradual y conjunta de las diferentes secuencias de la proteína y los nucleótidos del canal TRPV4. Inicialmente la búsqueda de estas secuencias se limitó a la revisión del GenBank y el entendimiento del BLAST de proteínas, para ello se obtuvieron las secuencias del canal TRPV4 correspondiente a los cDNAs de humano (NM_021625) y de perro (NM_00112731), además de las secuencias de las proteínas de TRPV4 de humano (NP_067638) y de perro (NP_001120787). Después de obtener las secuencias básicas de este trabajo se realizó un BLAST de proteínas en el cual se pretendía encontrar las isoformas reportadas del canal TRPV4 (A-E) y saber si existían algunas otras secuencias diferentes a las reportadas con anterioridad, de igual forma se obtuvieron las secuencias de nucleótidos y se analizaron, para finalmente organizar estas secuencias en la tabla 2 donde se resumen las secuencias encontradas: TRPV4 humano (que corresponde a la proteína completa o isoforma A), las secuencias de TRPV4 B, C, D, E correspondientes a las isoformas del canal reportadas por Arniges et al., 2005; hTRPV4-pT1, hTRPV4-pT2 y TRPVh-SV fueron secuencias encontradas en el BLAST pero que no han sido reportadas con anterioridad. TRPV4 perro (corresponde a la secuencia de la proteína completa), TRPV4p-X1 y TRPV4p-X2, corresponden a secuencias no reportadas que denotan interés al corresponder a secuencias de mayor longitud y peso molecular.

Además de organizar las secuencias encontradas se establecieron los números de acceso para proteínas y nucleótidos en el GenBank, con la finalidad de llevar el registro para futuros trabajos, se establecieron las

longitudes de las secuencias proteicas y se calcularon los pesos moleculares para estas mismas secuencias (tabla 2), lo cual resultó de utilidad para el análisis de Western Blot de TRPV4 realizados en otros trabajos del laboratorio.

Secuencia	Tamaño (aa)	PM (kDa)	No. de acceso de la secuencia de proteínas	No. de acceso de la secuencia de nucleótidos	Tamaño (pb)
TRPV4 humano TRPV4-A	871 aa	98.25	NP_067638	NM_021625	3250
TRPV4-B	811 aa	91.25	NP_671737	NM_147204	3012
TRPV4-C (E)	824 aa	92.89	AAZ04918 (NP_001170899)	DQ059644 (NM_001177428)	2475
TRPV4-D	837 aa	94.99	AAZ04919 (NP_001170902)	DQ059645 NM_001177431	2514
TRPV4-E (C)	764 aa	85.87	AAZ04920 (NP_001170904)	DQ059646 (NM_1177433)	2295
hTRPV4-pT1	552 aa	61.80	Traducción a mRNA	BC143307 Clona IMAGE	2804
hTRPV4-pT2	742 aa	83.30	Traducción a mRNA	XM_011538634	3489
TRPVh-SV cDNAh clone	853 aa	96.44	Traducción a mRNA	AB100308 CO687493 Clona EST cDNA	2565 510
TRPV4 perro	871 aa	98.19	NP_001120787	NM_001127315	2616
TRPV4p-X1	889 aa	100.18	XP_005636075	XM_005636018	3333
TRPV4p-X2	889 aa	100.18	XP_005636076	XM_005636019	3458

Tabla 2. Secuencias de proteínas del canal TRPV4 encontradas con la herramienta BLAST, se menciona el tamaño, peso y números de acceso de las secuencias de proteínas y nucleótidos registradas en el GenBank, Las isoformas A-E, corresponden a las descritas en Arniges *et.al.*(2006) conservando el nombre y no. de acc. Asignados originalmente para evitar confusiones. Los números de acceso entre paréntesis corresponden a las secuencias actualizadas en el GenBank y las isoformas entre paréntesis son los nombres de isoformas asignados en el GenBank. Para el caso de las variantes no reportadas anteriormente se realizó la traducción con el programa NTI Vector 6.0. Además se reporta una clona de cDNA encontrada.

6.1.1. Búsqueda de predictores.

Para realizar esta búsqueda se utilizaron dos fuentes, la primera consistió en el análisis de artículos publicados en los cuales se utilizó alguna herramienta bioinformática que señala posibles señales de localización nuclear en secuencias de proteínas, la segunda parte fue la búsqueda en línea de estas herramientas digitales, descartando aquellos fuera de servicio o que solo ofrecían literatura del proceso de predicción. Después de esta revisión concluimos que solo tres softwares de los reportados continúan en funcionamiento NLStradamus (Nduyen Ba., *et al* 2009), cNLS Mapper (Kosugi., *et al* 2009) y pSORT II (Moreno-Altamirano, *et al.*, 2012). NLStradamus el cual tiene un score de predicción que va en un rango de 0.1-0.9, CNLS Mapper que tiene un rango de predicción de 7.0- 2.0 y pSORT II que tiene un rango de (0.75- 0.45) además se encontró en un link adicional a estos softwares un programa que predice NES y se introdujeron en la tabla para futuras referencias.

En la tabla 3 se muestran los nombres de los predictores, la probable secuencia de localización nuclear (NLS) identificada en la secuencia de TRPV4 y el score de precisión del predictor, además de probables señales de exportación nuclear, que pudieran ser utilizadas para futuros trabajos. Con este análisis se identificaron 5 probables señales de localización nuclear en la secuencia del canal TRPV4 de humano y 4 en la secuencia de TRPV4 de perro. Estas señales se enumeraron del 1 al 5 en dirección del extremo amino al extremo carboxilo, siendo 1 la NLS más cercana y 5 la más lejana al extremo amino.

SOFTWARE	SECUENCIA	Score
NLStradamus	121 - KRWRKKII- 128 bipartita 124 - RKK – 126 monopartita	0.6
CNLS Mapper	98 GPKKAPMDSLFDYGYRHHSSDNKRWRKKII } ①	5
	121KRWRKKIIEKQPQSPKAPAPQPPPILKVFNRP	5.9
	175THKKRLTDEEFREPSTGKTCLPKALLNLSN ②	4.1
	727KESKHIWKLQWATTILDIERSFPVFLRKAF ④	4
pSORT II	RREVTDEDTRHLSRKFK at 391 ③ pat4: HKKR (3) at 176 pat7: PRKWRTD (5) at 861 ⑤	0.64
NET-NES	Sequence-355-R	0.561
	Sequence-356-L	0.536
	Sequence-358-P	0.524
	Sequence-518-L	0.538
	Sequence-675-K	0.937
	Sequence-676-L	1.010
	Sequence-677-T	0.592
	Sequence-678-I	1.182
	Sequence-680-M	0.633

Tabla3.Lista de softwares utilizados para la búsqueda de NLS en la secuencia del canal TRPV4 de humano y perro. Se muestran los NLS identificados por cada programa indicando sus coordenadas de número de aminoácido. La columna a la derecha muestra el score de confiabilidad para cada uno de ellos. Los números en círculos azules indican la numeración que se dio a las secuencias NLS 1-5 de acuerdo a su posición en el canal de la región amino al carboxilo. Además, se anexan algunas probables señales de exportación nuclear (NES) encontradas con el programa NET-NES.

6.1.2. Alineamiento de secuencias.

Después de identificar las 5 NLS teóricas en la secuencia de TRPV4 se procedió a realizar un alineamiento de todas las secuencias de TRPV4 encontradas en este trabajo (enlistadas en la tabla 2) con el programa Vector NTI 6.0, iniciando con la comparación de las secuencias de la proteína completa de humano y perro (Figura 12), de donde se obtuvo un 97.7% de similitud y 97.4% de identidad entre ambas secuencias lo cual nos indica que probablemente el canal TRPV4 funcione de forma muy similar en ambos organismos.

El siguiente análisis corresponde al alineamiento de todas las secuencias de proteínas de ambas especies reportadas en este trabajo. Con este análisis se pudo observar las diferencias entre las isoformas B, C, D y E de TRPV4 ya descritas en la literatura y las secuencias que encontramos en este trabajo que no se habían reportado con anterioridad (Figura 13). A partir de estos alineamientos se evidencia que las isoformas B, C, D y E corresponden a variantes de procesamiento alternativo (splicing) que producen proteínas más cortas mientras que hTRPV4-pT1 y hTRPV4-pT2 corresponden a variantes de procesamiento que incluirían secuencias extra que introducirían un codón de paro de traducción por lo que se esperaría la producción de proteínas truncadas (pT1 y pT2) en el extremo carboxilo terminal., TRPV4-SV corresponde a un cambio de diez aminoácidos en la secuencia (\neq 855 RHLCRVRRKR) y por último, TRPV4p-X1 con una inserción de 18 aminoácidos en fase (Ins 130 PAFPLYFLAVCISFHLAL) que produciría una proteína un poco más larga.

Finalmente se realizó un alineamiento de las secuencias de ambas especies con las diferentes señales de localización nuclear (NLS) y se analizó cuales señales están presentes en cada secuencia, lo cual podría influir en la localización subcelular de las isoformas del canal TRPV4 (Figura 15). Con este alineamiento se observa que la NLS1 se interrumpe debido a la inserción en la secuencia TRPV4p-X1, la **NLS2** está presente en todas las secuencias, NLS3 se elimina en las secuencias de las isoformas TRPV4-B y E, la NLS4 no estaría en la hTRPV4-pT1 se interrumpe en la secuencia hTRPV4-pT2 y la NLS5 no estaría en las secuencias TRPV4-SV, ni en las proteínas truncadas hTRPV4-pT1 y hTRPV4-pT2.



Figura 12. Alineamiento de las secuencias de TRPV4 de perro y humano, realizado con el programa Vector NTI 6.0. Se obtiene un 97.7% de similitud entre ambas especies.

	(1)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	145
hTRPV4	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-B	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-C	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-D	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-E	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-pT1	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-pT2	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
hTRPV4-SV	(1)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
pTRPV4	(1)	MADP	SEGG	PHT	GPGEV	AE	T	PG	DE	SG	TP	GS	E	A	F
pTRPV4-X1	(1)	MADP	SEGG	PHT	GPGEV	AE	T	PG	DE	SG	TP	GS	E	A	F
pTRV4-X2	(1)	MADP	SEGG	PHT	GPGEV	AE	T	PG	DE	SG	TP	GS	E	A	F
Consensus	(144)	MADSS	SEGG	RA	GPGEV	AE	LP	GD	ES	GT	PG	GE	AF	PL	SS
		144	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270
hTRPV4 (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-B (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-C (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-D (96)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-E (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-pT1 (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-pT2 (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
hTRPV4-SV (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
pTRPV4 (130)	---	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
pTRPV4-X1 (144)	HLAL	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
pTRV4-X2 (144)	HLAL	KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
Consensus (144)		KQ	QSP	K	A	P	A	F	Q	P	P	P	I	L	K
	(289)	289	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
hTRPV4 (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
hTRPV4-B (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
hTRPV4-C (238)	---	G	E	L	P	L	S	L	A	A	C	T	N	Q	P
hTRPV4-D (237)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
hTRPV4-E (238)	---	G	E	L	P	L	S	L	A	A	C	T	N	Q	P
hTRPV4-pT1 (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
hTRPV4-pT2 (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
hTRPV4-SV (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
pTRPV4 (271)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
pTRPV4-X1 (289)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
pTRV4-X2 (289)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
Consensus (289)	---	R	F	F	Q	K	D	E	G	G	Y	F	Y	F	G
	(434)	434	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
hTRPV4 (416)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
hTRPV4-B (385)	---	N	R	H	E	M	L	A	V	E	P	I	N	E	L
hTRPV4-C (389)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
hTRPV4-D (382)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
hTRPV4-E (338)	---	N	R	H	E	M	L	A	V	E	P	I	N	E	L
hTRPV4-pT1 (416)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
hTRPV4-pT2 (416)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
hTRPV4-SV (416)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
pTRPV4 (416)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
pTRPV4-X1 (434)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
pTRV4-X2 (434)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A
Consensus (434)	---	S	S	I	L	S	S	L	D	T	C	G	E	E	A


```

(579) 579          590          600          610          620          630          640          650          660          670          680          690          700          710          723
hTRPV4 (561) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-B (501) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-C(514) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-D(527) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-E(454) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-pT1 (553) -----
hTRPV4-pT2(561) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
hTRPV4-SV(561) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
pTRPV4(561) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCSEDHTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
pTRPV4-X1(579) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCSEDHTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
pTRV4-X2(579) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCSEDHTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
Consensus(579) IVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQLFKDLFRFLVLYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRDSETFSTFLLDLFLKLTIGMGDLEMLSSSTKYPVVFILLVITYIII
(724) 724          730          740          750          760          770          780          790          800          810          820          830          840          850          868
hTRPV4 (706) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLESMGN
hTRPV4-B (646) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLESMGN
hTRPV4-C(659) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLESMGN
hTRPV4-D(672) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLESMGN
hTRPV4-E(699) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLESMGN
hTRPV4-pT1 (553) -----
hTRPV4-pT2(706) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQSERRRI-----
hTRPV4-SV(706) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVRHLCRVR
pTRPV4(706) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKSENYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLENMGN
pTRPV4-X1(724) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKSENYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLENMGN
pTRV4-X2(724) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKSENYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLENMGN
Consensus(724) TFVLLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRDRWSSVVPRVVELNKNSNPDEVVVPLELMGN
(745) 7 870          889
hTRPV4(727) NERCDGHQQGYPRKWRTDDAPL
hTRPV4-B(667) NERCDGHQQGYPRKWRTDDAPL
hTRPV4-C(680) NERCDGHQQGYPRKWRTDDAPL
hTRPV4-D(683) NERCDGHQQGYPRKWRTDDAPL
hTRPV4-E(620) NERCDGHQQGYPRKWRTDDAPL
hTRPV4-pT1(553) -----
hTRPV4-pT2(727) -----
hTRPV4-SV(727) RRKR-----
pTRPV4(727) NERCDGHQQSYPPKWRTDDAPL
pTRPV4-X1(745) NERCDGHQQSYPPKWRTDDAPL
pTRV4-X2(745) NERCDGHQQSYPPKWRTDDAPL
Consensus(745) NERCDGHQQ YP KWRTDDAPL

```

Figura 13. Alineamiento con el programa Vector NTI 6.0 de las secuencias de TRPV4 encontradas en el BLAST, reportadas como hTRPV4 y las secuencias de las isoformas de humano de A-E así como las secuencias hTRPV4pT1, hTRPV4pT2y hTRPV4-SV, correspondiendo estas últimas a variantes de la proteína no reportadas anteriormente y descritas en este trabajo. Por otra parte las secuencias de las proteínas correspondientes a un perro fueron pTRPV4, la reportada en el GenBank y las secuencias pTRPV4-X1, pTRPV4-X2, las variantes no reportadas antes de este trabajo.

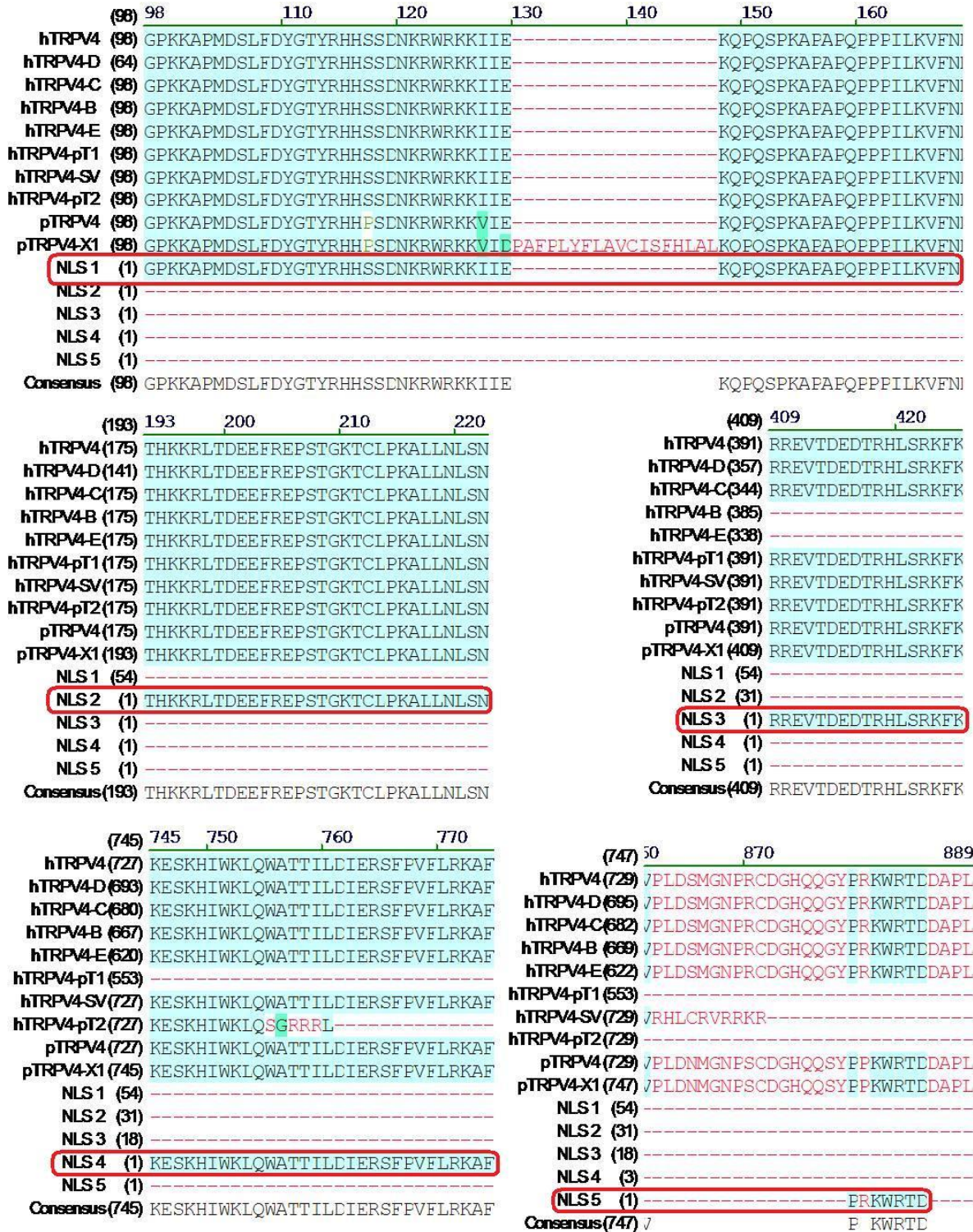
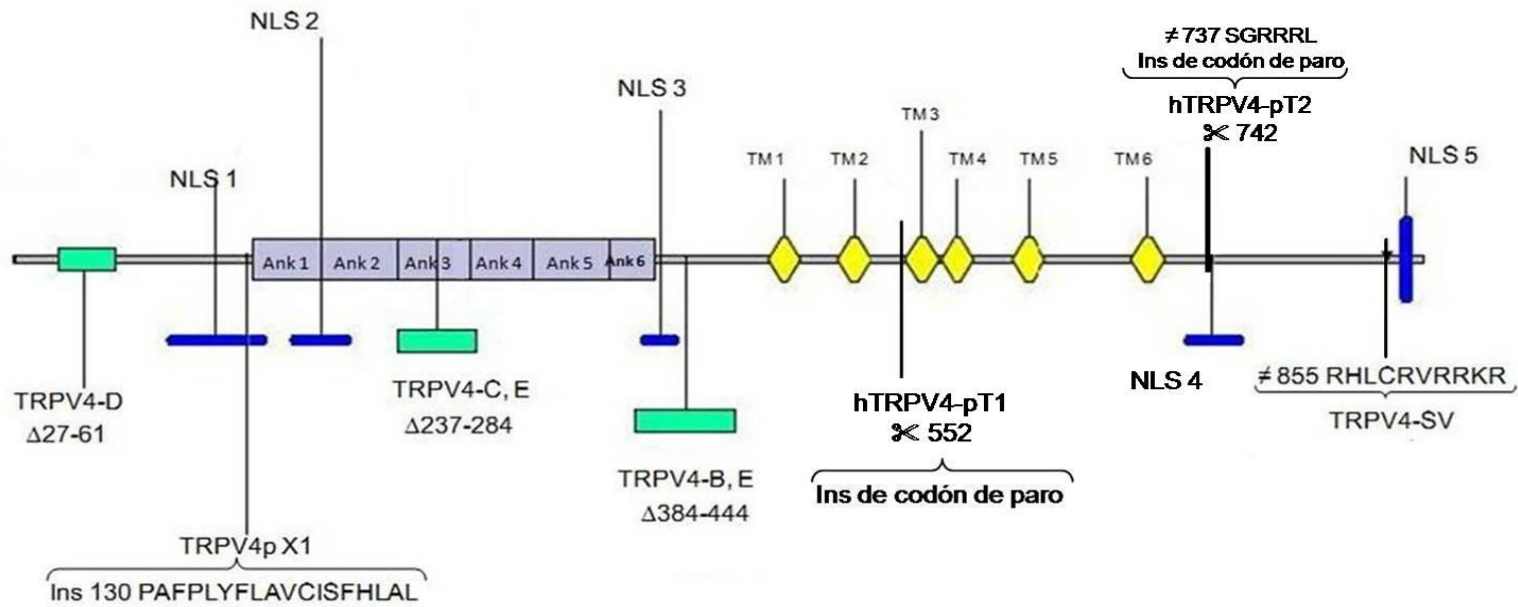


Figura 14. Alineamiento realizado con el programa Vector NTI 6.0, se reporta la comparación entre las secuencias encontradas para la proteína TRPV4 de humano con cinco señales y perro con las cuatro señales de localización nuclear obtenidas del análisis con los predictores.

6.1.3. Resumen gráfico del análisis de las isoformas deducidas de TRPV4 y sus probables secuencias de localización nuclear.

Finalmente el análisis *in silico* concluyó organizando toda la información obtenida de forma gráfica en un esquema del canal TRPV4 indicando las isoformas, las señales de localización nuclear y las características relevantes de la estructura del canal, las cuales se representan en la Figura 15 y se organizan de la siguiente manera: la estructura básica del canal TRPV4 con sus 871 aa, las seis regiones transmembranales, los seis repetidos de ankirina (Ank), las cinco isoformas reportadas por Arniges *et al.* (2006) indicando específicamente las diferencias en la secuencia de cada una en cuanto a los dominios ausentes en las proteínas. La isoforma TRPV4-A corresponde a la proteína completa, TRPV4-B y E carecen de la secuencia del aa 384 al 444 (Δ 384-444), en las isoformas TRPV4-C y E faltan los aa de 237 a 284 (Δ 237-284) y en la isoforma TRPV4-D faltan los aa 27 a 61 (Δ 27-61), (Arniges *et al.*, 2006). De las variantes descritas en este trabajo la proteína truncada 1, hTRPV4-pT1, tiene un codón de paro debido a una inserción de un codón de paro después del aa 552 (Ins de codón de paro), la proteína truncada 2, hTRPV4-pT2, tiene una inserción que cambia el marco de lectura después del aa 736 y agrega 6 aa diferentes a partir del aa 337 al 742 y un codón de paro (\neq 737 SGRRL). La secuencia TRPV4-SV tiene diferencias en la secuencia a partir del aa 855 con diez aminoácidos diferentes (\neq 855 RHLCRVRRKR) con respecto a la secuencia de TRPV4-A y por último, de las secuencias de perro TRPV4p-X1 y TRPV4p-X2, solo se esquematiza la X1 debido a que después del análisis se determinó que corresponden a secuencias idénticas en el sitio que codifica la proteína, en esta secuencia se encontró una diferencia de 18 aminoácidos adicionales que corresponden a una inserción a partir del aminoácido 130 (Ins 130 PAFPLYFLAVCISFHLAL).

En el esquema se indican las 5 NLS y su ubicación dentro de la proteína para mostrar cuáles son las regiones que podrían ser responsables del tráfico de esta proteína al núcleo, así mismo de cuáles isoformas tendrían estas señales y cuantas de ellas.



871 aa

Figura 15. Esquema del canal TRPV4 y sus isoformas. Se indican las características estructurales más relevantes del canal, además de las variantes del canal reportadas previamente en la literatura y las encontradas en este trabajo así como la localización de las probables señales de localización nuclear. En morado, se observan los repetidos de Ank 1-6, los rombos amarillos corresponden a las regiones transmembranales 1-6, el rectángulo verde indica las secuencias del canal ausentes en las isoformas indicadas de TRPV4. Con líneas azules se indican las probables señales de localización nuclear y finalmente las secuencias no reportadas se marcan en la figura indicando Ins: inserción, ≠ secuencia diferente y ⊗ corte de la secuencia. Más detalles en el texto.

6.2. Análisis experimental.

6.2.1. Diseño de la mutante NLS2.

En la secuencia del canal TRPV4 de perro se encontraron 4 NLS que se denominaron de la 1 a la 4 en el orden del amino al carboxilo terminal. En este trabajo se propuso realizar la mutante de la NLS2 mencionada con anterioridad y siguiendo la estrategia descrita a continuación.

6.2.2. Construcción de la mutante NLS2 del canal TRPV4.

Resultados previos del laboratorio mostraron que cuando las células MDCK se crecen a baja densidad celular el canal TRPV4 se localiza en el núcleo celular (Matamoros, 2016). Esta observación sugiere que la proteína del canal tenga secuencias de localización nuclear que la direccionen de forma activa a través de los poros de la envoltura nuclear. La pregunta a resolver con el análisis bioinformático de la secuencia de TRPV4 fue identificar probables sitios NLS. El análisis descrito en la sección anterior nos arrojó la presencia de 4 NLS teóricos en la secuencia de TRPV4 de perro. Para empezar a validar experimentalmente si estas NLS son funcionales se utilizó un plásmido que expresa al canal TRPV4 con una etiqueta Flag fusionada al extremo carboxilo terminal (TRPV4-Flag) para de esta manera poder expresar al canal en células MDCK y detectarlo con la etiqueta Flag para distinguirlo del canal endógeno y además seguir su localización subcelular.

En este trabajo se escogió al sitio NLS2, para verificar experimentalmente si era funcional para lo cual se diseñaron oligonucleótidos con la mutación deseada para eliminar la señal NLS2 como se describe en la figura 16 en la cual se describe como se diseñó una mutación en la NLS2. Se muestra la secuencia consenso de una NLS formada por 2 aminoácidos con carga positiva K (lisina) o R (arginina), un espaciador de 10 a 12 aminoácidos cualquiera seguidos de una secuencia de 5 aminoácidos en donde al menos 3 tienen carga positiva (Fig. 16 A).

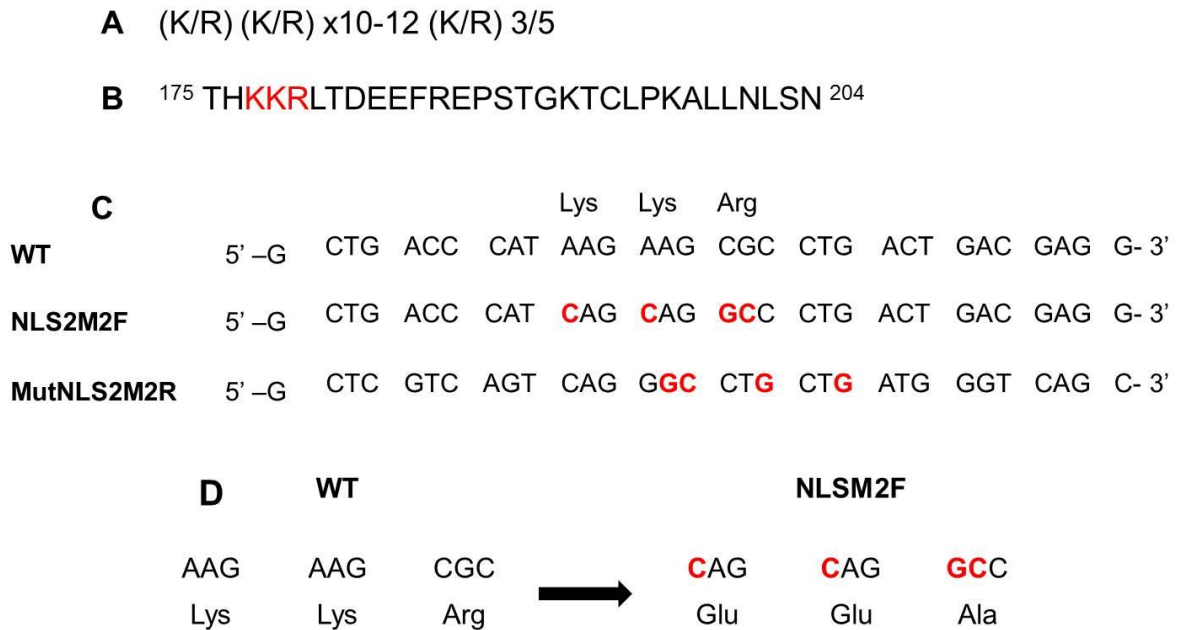


Figura 16. Mutagénesis del sitio NLS2. **A)** Secuencia consenso de una NLS bipartita teórica **B)** Secuencia de aminoácidos del canal TRPV4 de perro del 174 al 204 marcando en rojo se indican 3 aminoácidos con carga positiva que serían afectados por la mutación propuesta. **C)** Secuencia de nucleótidos del canal TRPV4: secuencia silvestre (WT), y las secuencias de los oligos NLS2mutF (forward) y NLS2mutR (reverso) diseñados para introducir los cambios de los 3 aminoácidos indicados en la parte superior, mostrando en rojo los nucleótidos cambiados para producir la mutación. **D)** Codones afectados por la mutación indicando el cambio de los aminoácidos entre el silvestre y el mutante.

6.2.1.1. Construcción de los plásmidos que se usaron de template para la mutagénesis.

La construcción partió de diseñar un plásmido intermediario para la mutagénesis por la técnica de megaprimer a partir del plásmido pCMV-V4DXBRI⁻ existente en el laboratorio el cual fue cortado inicialmente con la enzima de restricción Eco RI para verificar su identidad. En la Figura 17 se observa que se obtuvo el patrón esperado de 2 bandas de 5292 y 1643 pb. Posteriormente este plásmido se cortó con la enzima Hinc II que produce 3 fragmentos de 4810, 1764 y 361 pb. Después de cortar el plásmido se religó para recircularizar el fragmento de 4810 pb y construir el

plásmido pV4D-HII. Con esta estrategia se eliminó la mayor parte de la secuencia de TRPV4 y un sitio Eco RI. En la fig. 18 se muestra el mapa del plásmido pV4D-HII al cual se le destruyó el sitio Eco RI cortando el plásmido con esta enzima y posteriormente reparando la molécula con la enzima Klenow. Después fue religado para producir un nuevo plásmido final llamado pIJP (fig.19). Este plásmido se realizó con la finalidad de obtener un plásmido intermediario para la amplificación por megaprimer que tuviera solo el inicio de la proteína del canal TRPV4 de perro y que no tuviera ningún sitio de corte para la enzima Eco RI.

Posteriormente el plásmido construido (pIJP) se transformó en bacterias competentes DH5 α y se purificó para finalmente usar este templado en la primera PCR de la amplificación por megaprimer siguiendo la estrategia mostrada en la fig. 20.

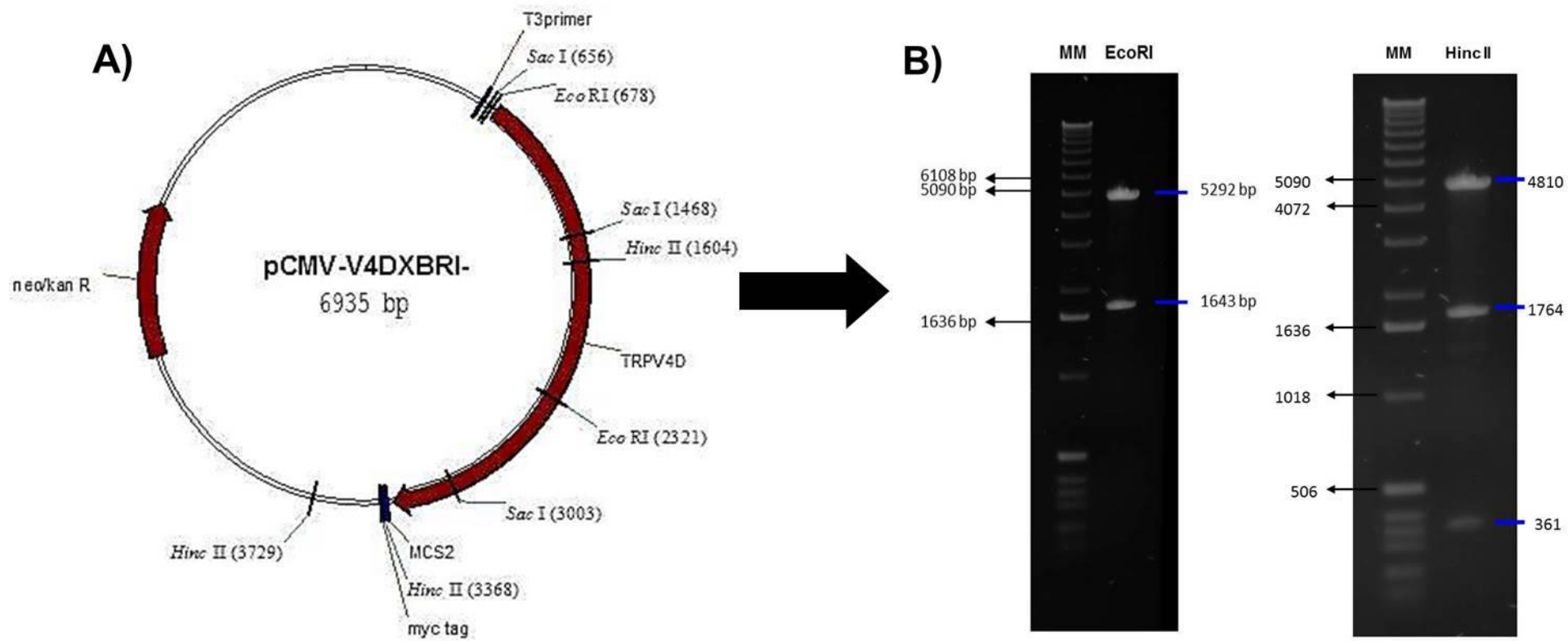


Figura 17. A) mapa del plásmido pCMV-V4DXBRI donde se muestran algunos sitios de restricción, se observan dos sitios *Eco* RI y tres sitios *Hinc* II que se usaron en las siguientes subclonaciones. **B)** Verificación de los sitios *Eco* RI. El patrón electroforético nos indica la presencia de dos bandas del tamaño esperado de *Eco* RI: 1643 bp y 5292bp y tres bandas para *Hinc* II a 361 bp, 1764 bp y 4810 bp, se realizó la comparación de las muestras vs el marcador de peso molecular (MM) de 1kb

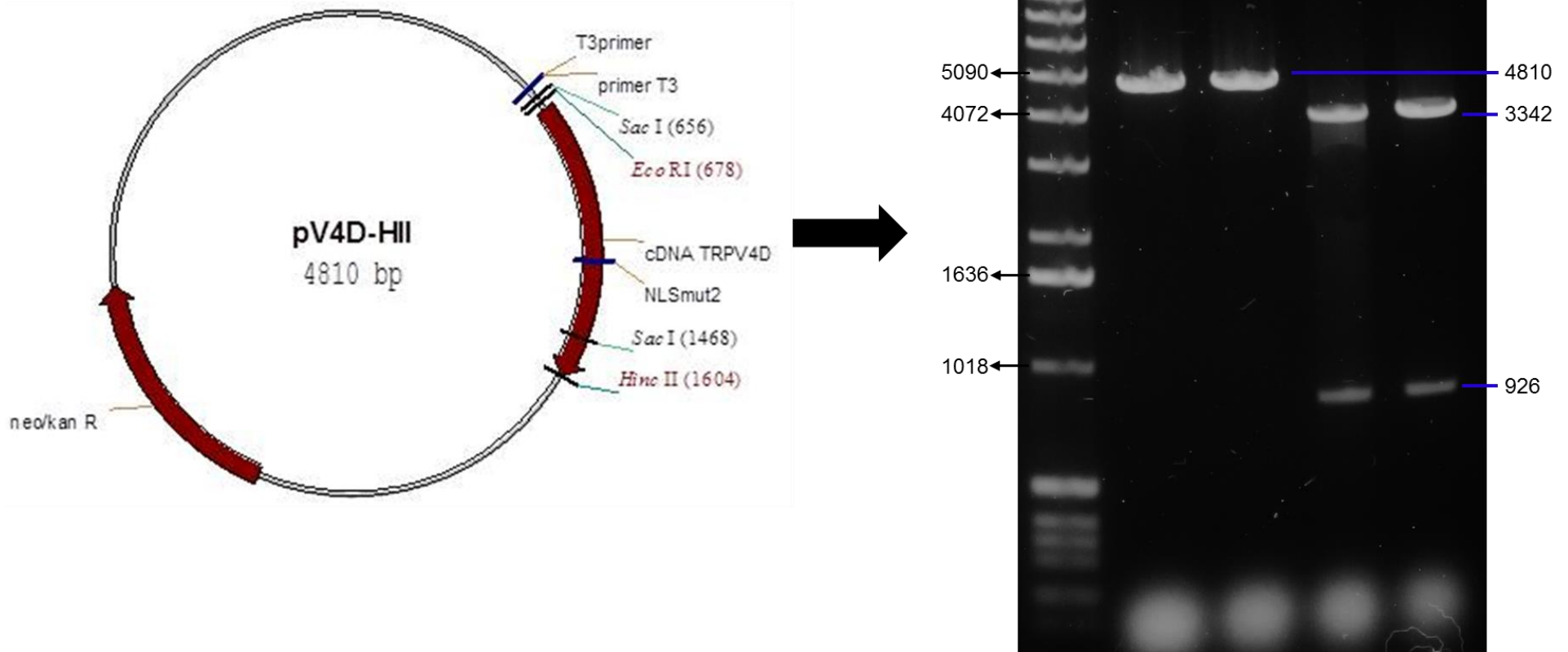


Figura 18. Verificación de sitio Eco RI en el plásmido pV4D-HII. **A)** Mapa del plásmido pV4D-HII, se observa que el plásmido solo tiene un sitio Eco RI, un sitio Hinc II y 2 sitios Sac I. **B)** Análisis electroforético del sitio de restricción con Hinc II que debería producir una banda 4810 el cual coincide al hacer la comparación con el MM y Sac I a 926 bp y 3342 bp usada como referencia.

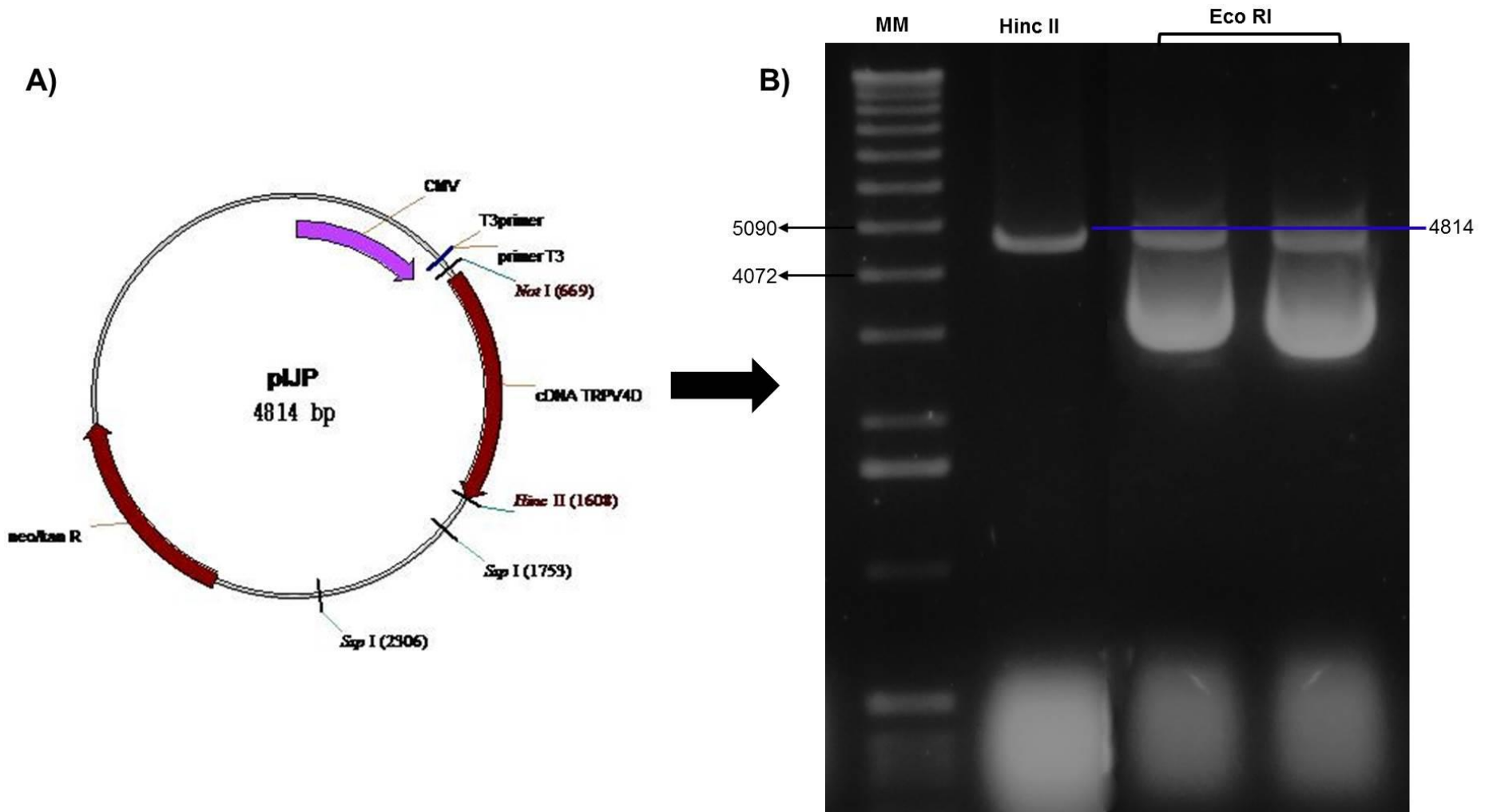


Figura. 19. Verificación del plásmido pLJP. **A)** Mapa del plásmido. **B)** Análisis electroforético de la restricción Hinc II y Eco RI vs el MM, donde se ve que el sitio Eco RI no tiene corte, por el contrario con HincII se observa una banda a 4810bp,

Mutagénesis para la construcción del plásmido pNLS2-Flag (TRPV4) por megaprimer

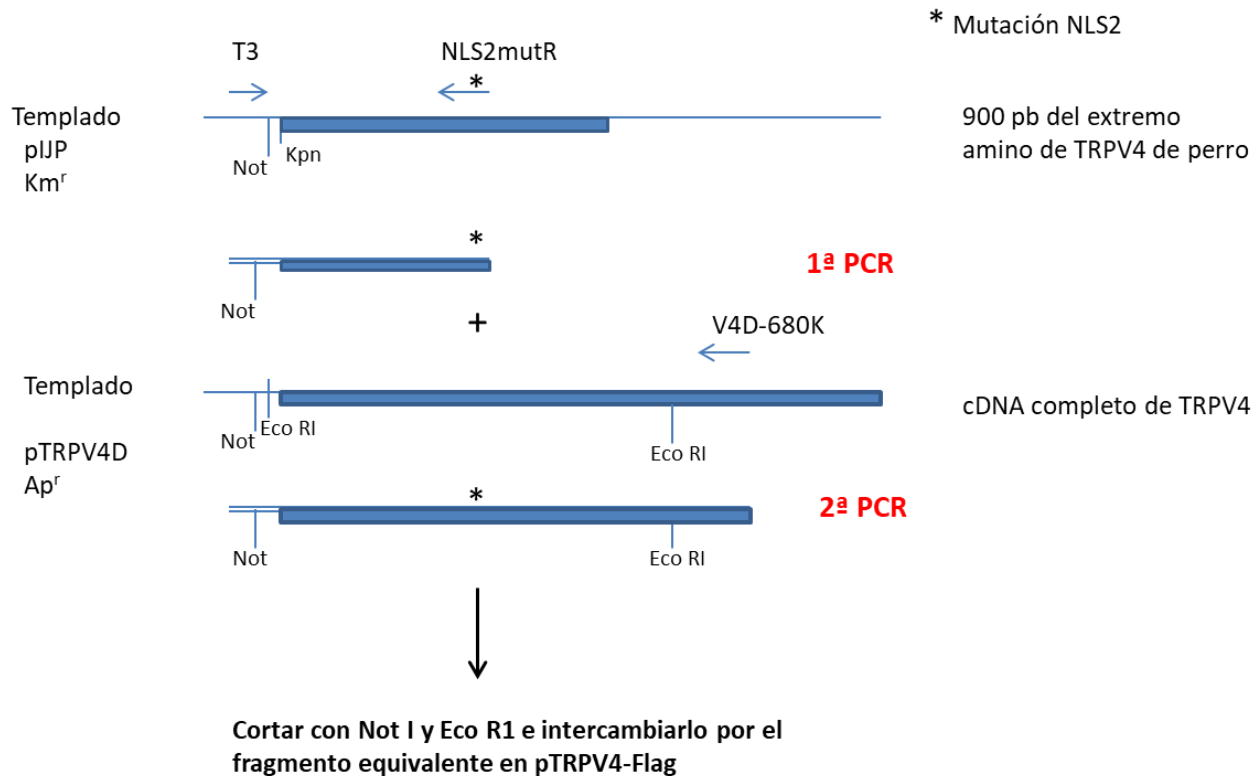


Figura 20. Esquema de la mutagénesis. 1ra PCR se inserta la mutante reversa (NLS2mutR) en un templado intermedio pIJP. En la 2da PCR se inserta el cDNA TRPV4 completo en el templado pTRPV4D para obtener el megaprimer.

6.2.2. Amplificación por megaprimer.

La mutagénesis del sitio NLS2 de TRPV4 se realizó por PCR con la técnica de megaprimer siguiendo el esquema que se describe en la figura 20

Se realizó la amplificación de la región inicial del canal TRPV4 a partir del plásmido templado pIJP y utilizando los oligos T3 (directo) y NLS2mutR (reverso) que contiene los cambios en la secuencia que se querían introducir con lo cual esperábamos obtener un fragmento de 600 bp (1ª PCR) mostrado en la figura 21 A.

El fragmento de 600 pb corresponde al megaprimer y se usó en la segunda PCR agregando el oligo reverso V4D-680K y el DNA templado pTRPV4D.

En la segunda PCR se esperaba la amplificación de un fragmento de 2185 pb, Figura 21 B. Este fragmento se purificó de gel y posteriormente se cortó con las enzimas Not I y Eco RI para intercambiarlo por el fragmento NotI-EcoRI del plásmido pTRPV4-Flag Figura 21 C.

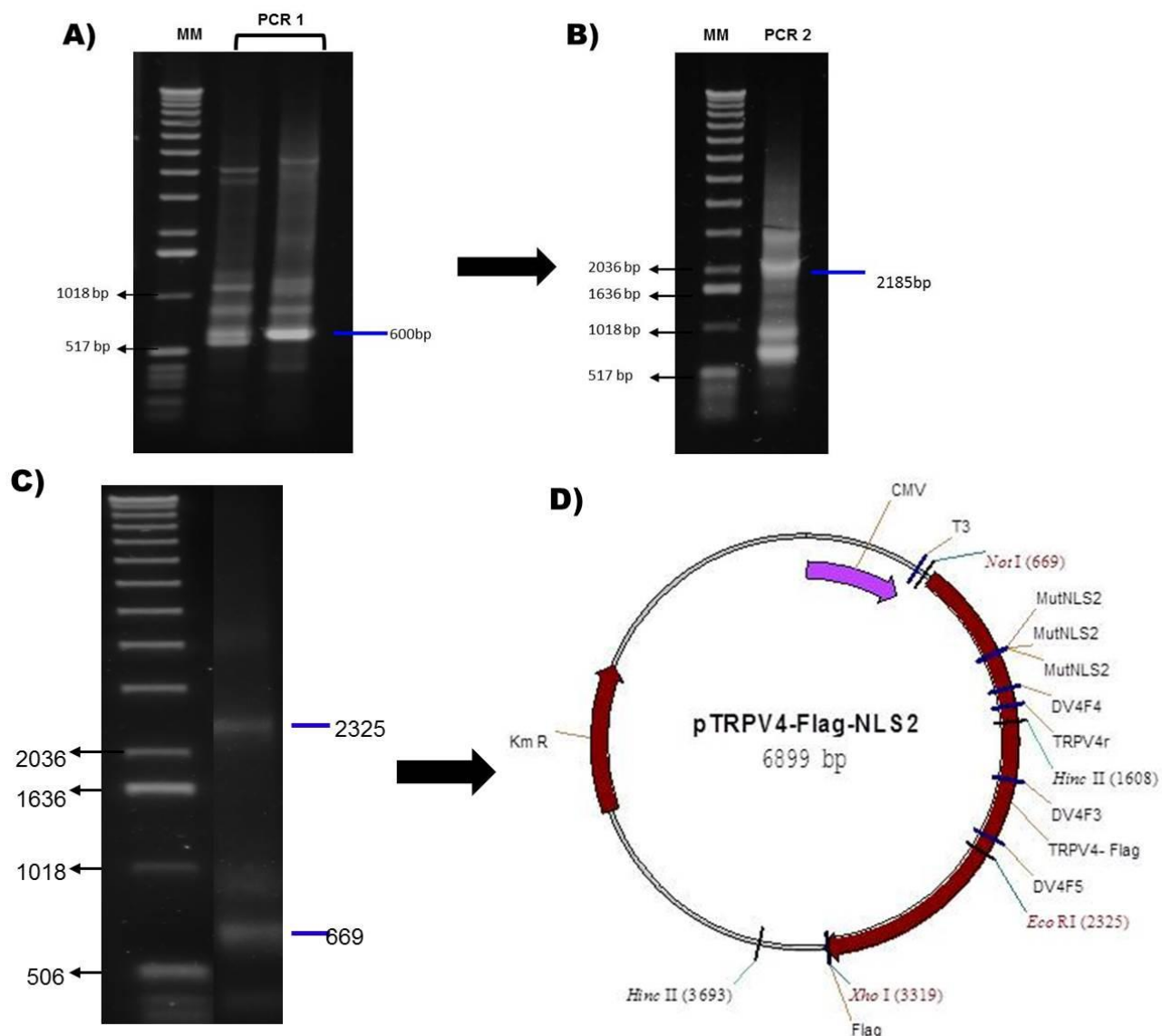


Figura 21. Construcción de la mutante TRPV4 NLS2 Verificación del megaprimero. **A)** Electroforesis de la PCR 1 del proceso de megaprimero donde se obtuvo una banda de 600 bp **B)** Electroforesis de la PCR 2, se obtuvo una banda de 2185 bp y algunas otras bandas inespecíficas. **C)** Restricción con NotI y EcoRI del fragmento de la PCR2 purificado de gel. **D).** Mapa del plásmido final pTRPV4-Flag-NLS2 que se intentó construir, en este se denota con una flecha roja la proteína del canal TRPV4, se encuentran señalados el sitio que correspondería a la mutación NLS2 y la etiqueta Flag en el extremo carboxilo terminal.

De esta construcción se secuenciaron 3 clones pero desafortunadamente no tenían incorporada la mutación del sitio NLS2 y correspondieron a la secuencia silvestre.

7. DISCUSIÓN.

La membrana celular mantiene separada la célula del medio que la rodea y regula la entrada y salida de sustancias. Los canales iónicos atraviesan la membrana permitiendo el pasaje de iones, la selectividad de cada uno de los canales regula la entrada y salida de las sustancias existentes en el medio, lo que mantiene a la célula estable, pues sin estos mecanismos no podría sobrevivir. Sin embargo algunas proteínas de canales iónicos pueden translocarse al núcleo, estas observaciones son recientes, puesto que hasta hace unos años se creía que los canales solo se encargaban del transporte selectivo a nivel de la membrana plasmática (Curtis y Schnbek, 2007).

La presencia sumamente inusual del canal TRPV4 en el núcleo, reportada por primera vez por Zhao y col. (2012), describe el canal TRPV4 en el núcleo de miocitos ventriculares de rata neonata, TRPV4 se presenta como una proteína que se transloca al núcleo al poner a las células en medio hipotónico y podría tener en el núcleo funciones distintas a las descritas para los canales en la membrana plasmática. Adicionalmente, por resultados obtenidos en nuestro laboratorio sabemos que el canal TRPV4 se encuentra en el núcleo en células MDCK de epitelio renal, aunque todavía se desconoce su función en este compartimento celular, esto resulta interesante desde el punto de vista molecular ya que se han descrito algunos canales iónicos que se localizan en el núcleo y que regulan la transcripción como es el caso del canal de potasio BK activado por calcio y voltaje (Li, *et al.*, 2014). Sin embargo, por la poca información sobre la existencia de canales iónicos en el núcleo, nos es difícil inferir cuál sería la función del canal TRPV4 en el núcleo celular. Una primera aproximación es identificar si tiene alguna señal de localización nuclear en su secuencia y así poder identificar dominios de la proteína que sean importantes para su direccionamiento activo hacia el núcleo.

De esta forma suponemos que la presencia de TRPV4 en el núcleo debe estar relacionada con la presencia de una o varias secuencias de localización nuclear, por esa razón en este trabajo se buscaron estas señales y se encontraron 4 probables sitios NLS en la secuencia de TRPV4 de perro y cinco señales en la

secuencia de humano que podrían ser funcionales (tabla 3). Se sabe que una señal de localización nuclear funcional es reconocida por las importinas en el citoplasma, las cuales son responsables de dirigir e importar proteínas del citoplasma al núcleo. Existe un reporte del canal iónico OCR-2 de *Caenorabditis elegans* que pertenece a la familia de los canales TRPV en donde se describe que éste se encuentra en el núcleo de células neuronales y tiene una señal de localización nuclear que al ser mutada evita la llegada del canal al núcleo, aunque en este trabajo no se logra demostrar la función que tendría esta molécula en el núcleo (Ezak y Ferkey, 2011). Con la intención de saber si el canal TRPV4 de perro aislado de células MDCK cuenta con una o varias señales de localización nuclear que expliquen su inusual localización en este compartimento celular, se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia de esta proteína mediante el uso de herramientas bioinformáticas, las cuales ofrecen a la ciencia un sin número de opciones para realizar investigaciones de manera mucho más eficiente; entre ellos se destacan la gestión de datos en el laboratorio, la automatización de experimentos, el ensamblaje de secuencias contiguas, la predicción de dominios funcionales en secuencias génicas, el alineamiento de secuencias, las búsquedas en bases de datos de estructuras, la determinación y predicción de la estructura de macromoléculas, la evolución molecular y los árboles filogenéticos (Ligeya, *et al.*, 2003).

La identificación de secuencias dentro de una proteína es actualmente una de las técnicas bioinformáticas más utilizadas cuando se busca una secuencia funcional. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron las probables señales de localización nuclear (NLS) de la proteína del canal TRPV4 con la ayuda de estas herramientas, iniciando con la búsqueda de predictores que utilizaran algoritmos matemáticos para identificar NLS (tabla 1). Estas pequeñas secuencias de aminoácidos modulan el transporte de una proteína al núcleo y están directamente relacionadas con la localización de una proteína en el núcleo, los residuos de estas secuencias forman una interacción crítica con las α -importinas las cuales son el primer adaptador de importancia en el núcleo (Ezak y Ferkey, 2011). Aunque para el canal TRPV4 no se han reportado funciones de estas secuencias otros autores que utilizan herramientas bioinformáticas han determinado la presencia de

proteínas núcleo-citoplásmicas en levaduras a partir de secuencias de NLS predichas por la herramienta bioinformática cNLS Mapper, al igual que en este trabajo, ellos dirigen su atención a las predicciones del programa y después experimentan con estas proteínas para encontrar dichas secuencias (Kosugi, *et al.*, 2009).

Al igual que Kosugi, *et al.*, 2009, probamos los predictores a los que tuvimos acceso, se compararon las secuencias y se homogenizaron las mismas para poder determinar cuáles secuencias podrían ser funcionales en el transporte de la proteína al núcleo. En su estudio ellos comparan PSORT II con cNLS Mapper para determinar proteínas núcleo-citoplásmicas en levaduras, PSORT II es utilizado también para realizar un análisis basado en secuencias genómicas para detectar factores de virulencia de *Micobacterium tuberculosis* y en el caso de este trabajo se utilizó para determinar posibles NLS en el canal TRPV4 (Moreno-Altamirano, *et al.*, 2012).

Se sabe que las secuencias probables para formar una NLS funcional son secuencias ricas en aminoácidos básicos usualmente lisinas (K) y argininas (R) y estas pueden ser monopartitas o bipartitas dependiendo del contenido de residuos básicos. Nduyen, *et al.*, 2009 utilizan este análisis para implementar un predictor NLStradamus que calcula mediante un algoritmo matemático cuales secuencias pudieran ser una NLS, según los autores y creadores de estos software, la secuencias se dividen en: monopartitas; las secuencias que contienen solo un grupo de residuos básicos y a su vez se dividen en dos subclases, básicos consecutivos con al menos cuatro aminoácidos básicos consecutivos y básicos representados por $K(K/R) x (K/R)$ con una secuencia consenso donde x indica cualquier aminoácido y por otra parte las secuencias bipartitas que son secuencias que contienen dos grupos de residuos básicos separados por un enlazador de 10-12 aminoácidos definida como $(K/R) (K/R) x_{10-12} (K/R)$ 3/5 donde x es cualquier aminoácido y (K/R) es al menos 3 lisinas o argininas de 5 aminoácidos (Nduyen, *et al.*, 2009, Raghavendra y Bonham-Smith, 2013). Después de entender cuál es el algoritmo que utilizan los predictores de NLS se realizó la búsqueda de estos

softwares de libre acceso (tabla 1) de los cuales solo se encontraron activos cNLS Mapper, PSORT II y NLStradamus. Dado que las herramientas bioinformáticas trabajan en conjunto se utilizaron los resultados del BLAST que se realizó con anterioridad en el que no solo encontramos las variantes de TRPV4 reportadas previamente, sino también de otras secuencias no reportadas y de las que se realizó el alineamiento para saber cuáles eran las diferencias entre las mismas (fig. 13) y finalmente con los resultados que obtuvimos de las 5 probables NLS en la secuencia de TRPV4 de humano, se realizó otro alineamiento final en el que se observa con mayor claridad en qué variantes de TRPV4 se encuentran presentes las NLS predichas por los softwares (fig. 14). Sabíamos de ante mano que no podíamos experimentar con todas las NLS obtenidas por lo cual se decidió que se enumerarían en un orden lógico del extremo amino al carboxilo de esta forma se podría probar experimentalmente las secuencias y poder tener un orden en la experimentación y así determinar cuáles de estas NLS son funcionales para el direccionamiento de TRPV4 al núcleo.

De las cinco probables señales de localización nuclear se experimentó mutando la NLS2 debido al orden en el que se asignó la numeración, es decir del extremo amino al carboxilo, (tabla 2) cabe resaltar que esta señal es la única de las cinco que está presente en todas las variantes registradas para el canal TRPV4 tanto de perro como de humano (fig. 12).

Sin embargo y a pesar de que esta señal está presente en todas las variantes de TRPV4 encontradas, se sabe que solo la isoforma A (proteína completa) y la D son funcionales en la membrana plasmática, las otras isoformas (C, D y E) son retenidas en el retículo endoplásmico (Arniges, *et al.*, 2006). Aunque ninguna se ha reportado que alcance el núcleo. Aunado a estas variantes de splicing, en este trabajo se encontraron cuatro más que no habían sido reportadas con anterioridad y en las cuales también se encuentra presente esta señal de localización nuclear.

El uso de programas como Vector NTI 6.0 (fig. 11) nos permitió encontrar no solo las diferentes secuencias del canal TRPV4 si no también comparar la secuencia de humano con otras especies, tomando con mayor importancia la de

perro debido al origen de las células que usamos como modelo experimental (MDCK). La profundización de este estudio nos responde algunas preguntas sobre el canal TRPV4, pues se analizaron las variantes del canal y se conocen sus pesos moleculares, pero además sabemos que los dominios del carboxilo terminal son críticos para la maduración de la misma, por ejemplo, si se realiza una delección de la región 837- 857 se verá afectada la maduración de la proteína y su transporte a través de la célula (Lei, *et al.*, 2013). De la misma manera la pérdida o eliminación de los dominios del amino terminal obtenidas por procesamiento alternativo (variantes de splicing) puede provocar alteraciones con las interacciones del canal con otras proteínas. La importancia de la completa y correcta maduración de la proteína del canal TRPV4 se liga directamente a que una sola mutación puede derivar en un déficit funcional, por ejemplo, una simple mutación en el aminoácido E797 del COOH- terminal resulta en la apertura constitutiva del canal (Shigematsu, *et al.*, 2010) a su vez la interacción del canal con otras proteínas resulta indispensable para el correcto funcionamiento de la célula al corresponder a una proteína polimodal, se conocen cerca de 37 proteínas que interactúan con el canal dentro de las cuales se encuentra el grupo de las proteínas que modifican la localización de TRPV4 (White, *et al.*, 2016).

En el caso de TRPV4 se ha visto que en células MDCK en crecimiento el canal se localiza preferentemente en el núcleo y posteriormente en células crecidas a alta densidad celular el canal ya no se ve en el núcleo y se localiza en los bordes celulares (Matamoros, 2016 y Martínez-Rendón, resultados no publicados). Por lo cual es necesario saber cuál de las NLS presentes en el canal es la responsable de este movimiento inusual, así como saber si todas las señales son funcionales o solo algunas de las presentes son las involucradas. Sin embargo, el haber identificado cinco diferentes NLS en la secuencia de TRPV4 nos deja un precedente importante para abordar el tema de la migración inusual del canal TRPV4 entre el núcleo y el citoplasma y así poder estudiar más a detalle su función.

Al ser TRPV4 un canal iónico activado por un gran número de estímulos, su función y expresión en diversos órganos y tejidos es imprescindible pues una simple

alteración podría ocasionar problemas en sistemas como el cardiovascular; donde controla la resistencia vascular de varios tejidos, el sistema respiratorio, el urinario, el sistema musculo esquelético, digestivo, el sistema nervioso central y periférico y en muchas de las células endoteliales presentes en el ser humano. Actualmente se realizan estudios enfocados a las enfermedades causadas por alteraciones en la expresión de las proteínas que codifican para los canales iónicos, las cuales se les conoce como canalopatías, en el caso del canal TRPV4, se han descrito con mayor importancia las displasias esquelética, atrofas musculares, neuropatías, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y finalmente la muerte, todas causadas por mutaciones en el canal (Güler, *et al.*, 2002, Nilius, *et al.*, 2013, Everaest, *et al.*, 2010)

Los resultados *in silico* de este trabajo pueden sustentar el hecho de que la proteína que se ha encontrado en el núcleo corresponde a la proteína completa de acuerdo a los pesos moleculares identificados de 122 kDa, pero además, de acuerdo a los resultados obtenidos en el Western Blot (Matamoros, 2016) podrían encontrarse fragmentos o variantes del canal en el núcleo de acuerdo a los pesos moleculares de bandas de 90 y 50 kDa que también se han identificado. Aunque aún se desconoce, cuál sería la función de estas isoformas y cuáles de estas señales de localización nuclear son funcionales para el tráfico del canal TRPV4 al núcleo, se siguen investigando en nuestro laboratorio la funcionalidad de las NLS encontradas en este trabajo.

La síntesis del DNA abre el camino para la producción de cantidades importantes de fragmentos de DNA. Mediante la incorporación de un DNA recombinante en un sistema celular que permita la replicación del DNA recombinante, puede conseguirse la amplificación del DNA. Para ello se utiliza un DNA portador, denominado vector de clonación. Los plásmidos bacterianos son ideales como vectores de DNA recombinante (Biggs, 2007).

Muchas bacterias contienen un único cromosoma circular de aproximadamente cuatro millones de pares de bases y moléculas de DNA minicircular denominadas plásmidos (Schleif, 2000).

Los plásmidos o construcciones plasmídicas son moléculas de DNA extracromosomal, circulares y de doble hebra que se pueden replicar en una bacteria, están compuestos normalmente de unas pocas pares de bases y raramente asociados con la gran molécula cromosómica. Los genes contenidos en el plásmido cumplen varias funciones; entre ellas la capacidad de conferir a la bacteria resistencia a los antibióticos, una característica útil para la selección de colonias específicas en una bacteria (Lodish, 2005, Biggs, 2007). Debido a su capacidad de replicación independiente a la replicación cromosomal, estas construcciones son ampliamente utilizadas en técnicas de DNA recombinante para integrar fragmentos de información genética específica que se pretende amplificar en una bacteria con la finalidad de construir proteínas recombinantes o con mutaciones específicas prediseñadas que permitan el estudio de dominios funcionales de proteínas de interés (Schleif, 2000). En el caso de la biología molecular, las construcciones plasmídicas que producen proteínas marcadas con epítomos (etiquetas) son altamente utilizadas para la búsqueda de la localización intracelular de proteínas (Devlin, 2004).

El análisis molecular actualmente provee de respuestas claves sobre cómo funcionan los organismos a nivel proteico y cómo estos procesos interactúan con la célula y a su vez con otras proteínas, para formar complejos mecanismos en el ser vivo. Existen métodos aplicables a muchos organismos experimentales los cuales involucran el uso de mutantes, en donde se comparan los fenómenos ocurridos en un modelo celular silvestre (WT) y un modelo mutante. En conjunto con el uso de plásmidos con mutaciones específicas se realizan infinidad de investigaciones sobre la función de las proteínas y su repercusión sobre los procesos celulares (Devlin, 2004; Lodish, 2005).

Por otra parte, los resultados experimentales no fueron exitosos al no poder construir la mutante TRPV4-NLS2. Después de trabajar en la mutagénesis dirigida y experimentar sobre las condiciones idóneas para la misma, al secuenciar nuestra construcción observamos que no se logró introducir la mutación que se deseaba.

Sin embargo, la relevancia sobre el tráfico núcleo-citoplásmico del canal TRPV4 y sus variantes continúa siendo una pregunta a resolver y este trabajo sienta las bases para empezar a validar cada una de las probables señales de localización nuclear del canal TRPV4 y además para explorar experimentalmente la presencia de las isoformas de TRPV4 que se identificaron en este trabajo y que no han sido reportadas.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron cinco probables NLS en la secuencia del canal TRPV4 de humano y cuatro NLS en la secuencia de TRPV4 de perro. Las cuales deberán ser validadas experimentalmente.
- ✓ En este trabajo se reportan 4 isoformas probables del canal TRPV4 no reportadas anteriormente las proteínas truncadas pT1 y pT2 de 552 y 742 aa respectivamente, una proteína más larga TRPV4pX1 de 889 aa y una proteína de 865 aa con 10 aa del extremo carboxilo diferente con respecto al canal silvestre de 871 aa.
- ✓ Algunas de las NLS propuestas se eliminan en algunas variantes de canal TRPV4 pudiendo originar variantes con diferente localización nuclear y citoplásmica.
- ✓ No todas las isoformas tienen las mismas NLS debido a inserciones o deleciones en los extremos amino o carboxilo terminales.
- ✓ Finalmente, con la inserción de la mutNLS2 no obtuvimos resultados positivos pues después de secuenciar nuestro plásmido se observó que no tenía la mutación que deseábamos.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Aidley J. Ion Channels: Molecules in Action. 1st ed. University of Cambridge 1996.
- Arniges M., Fernandez F. J. M., Albrecht N., Schaefer M., y Valverde M. A. 2006. Human TRPV4 channel splice Variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J. Biol. Chem.* **281**: 1580-1586.
- Biggs A. *Biología*. 3ra ed. Estados Unidos de América: McGraw-Hill 2007.
- Brameier M., Krings A., y MacCallum R.M. 2007. NucPred-predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*. 1;23(9):1159-60. Epub 2007 Mar 1.
- Clapham, D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **426**: 517-524.
- Cosens D.J., y Manning A. 1966. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature*. **224**: 285 – 287.
- Curtis H. y Schnbek A. *Biología*. 7ma ed. Panamericana. 2007.
- Dai J., Kim O.H., Cho T.J., Schmidt-Rimpler M., Tonoki H., Takikawa K., Haga N., Miyoshi K., Kitoh H., Yoo W. J., Choi I. H., Song H. R., Jin D. K., Kim H. T., Kamasaki H., Bianchi P., Grigelioniene G., Nampoothiri S., Minagawa M., Miyagawa S. I., Fukao T., Marcelis C., Jansweijer M. C., Hennekam R.C., Bedeschi F., Mustonen A., Jiang Q., Ohashi H., Furuichi T., Unger S., Zabel B., Lausch E., Superti-Furga A., Nishimura G., y Ikegawa S. 2010. Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. *J. Med. Genet.* 47: 704–709.
- Delany N.S., Hurle M., Facer P., Alnadaf T., Plumpton C., Kinghorn I., See C. G., Costigan M., Anand P., Woolf C. J., Crowther D., Sanseau P., y Tate S.N. 2001. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL2. *Physiol Genomics* 4:165–174.
- Devlin T M. *Bioquímica, libro de aplicaciones clínicas*. 4ta ed. Reverté S. A. 2004.

- Everaerts W. B., Nilius G., y Owsianik. 2010 .The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: From structure to disease. *Progress in Bioph. and Mol. Biol.* **103** 2-17.
- Ezak J. M., y Ferkey M. D. 2011. A functional nuclear localization sequence in the C. elegans TRPV Channel OCR-2. *Plos one* 6:1-8
- Güler A., Lee H., Shimizu I., y Caterina M. J. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 (VR-OAC). *J.Neurosci.* 22: 6408–6414.
- Heddad A., Brameier M., MacCallum R.M. 2004. Evolving Regular Expression-Based Sequence Classifiers for Protein Nuclear Localisation. In: Raidl G.R. et al. (eds) Applications of Evolutionary Computing. EvoWorkshops 2004.LNCS, vol 3005. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hille B. Ion channels of excitable membranes. 3a ed. SInauer Associates. Massachusetts, EUA. 2001.
- Katta S., Smoyer C. J., y Jaspersen S. L. 2014. Destination: inner nuclear membrane. *Cell Biol.* **24**: 221-229.
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., y Yanagawa H.2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs.*ProcNatlAcadSciU S A.*; 106(25):10171-6. doi: 10.1073/pnas.0900604106.
- la Cour T., Kierner L., Mølgaard A., Gupta R., Skriver K., y Brunak S. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel.* 2004 Jun;17(6):527-36. Epub 2004 Aug 16.
- Lei L., Cao X., Yang F., Jing Shi D., Tang Y. Q., Zheng J., y Wang K. 2013. A TRPV4 Channel C- terminal folding recognition domain critical for trafficking and function. *J. Biol. Chem.***288**: 10427-10439.
- Li b., Jie W., Huang I., Wei p., Li S., Luo Z., Friedman A. K., Meredirh A. L., Han M. H., Zhu X. H., y Gao T. M 2014. Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling. *Nat. Neurosci* 17(12): 1841
- Liedtke W., Choe Y., Marti-Renom M. A., Bell A. M., Denis C. S., Sali A., Hudspeth A.J., Friedman J.M., y Heller S. 2000. Vanilloid receptor-related

osmotically activated channel (VROAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525–535.

- Lin J. R., Liu Z., y Hu J. 2014. Computational identification of post-translational modification-based nuclear import regulations by characterizing nuclear localization signal-import receptor interaction. *Proteins*. 2014 Oct;82(10):2783-96. doi: 10.1002/prot.24642. Epub 2014 Jul 31.
- Lodish H. Biología celular y molecular. 5ta ed. Ed Panamericana. 2005.
- Matamoros -Volante, J. A. 2016. Análisis de la localización nuclear inusual del canal iónico TRPV4 en células de epitelio renal (MDCK). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of ion channels. *Sci. STKE*. 272:re3.
- Moore C. F., Cevikbas H. A., Pasolli Y., Chen W., Kong C., Kempkes P., Parekh S. H., Lee N., Kontchou I., Yeh N. M., Jokerste E., Fuchs M., Steinhoff, y W. B. Liedtke. 2013. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *PNAS*. 110(38): E3225–E3234.
- Moreno-Altamirano M.M., Paredes-González I.S., Espitia C., Santiago-Maldonado M., Hernández-Pando R., Sánchez-García F.J. 2012. Bioinformatic identification of Mycobacterium tuberculosis proteins likely to target host cell mitochondria: virulence factors? *Microb Inform Exp*. 2012 Dec 22;2(1):9. doi: 10.1186/2042-5783-2-9.
- Martínez-Rendon., J., 2016. Papel del canal TRPV4 en el establecimiento y regulacion de las unions estrechas de las celulas de epitelio corneal RCE1 (5T5). Tesis de doctorado Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV).
- Martínez-Rendón, J., E. Sánchez-Guzmán, A. Rueda, J. González, R. Gullías-Cañizo, G. Aquino-Jarquín, F. Castro-Muñoz ledo, **R. García-Villegas**. 2017. TRPV4 regulates tight junctions and affects differentiation in a cell culture model of the corneal epithelium. **J Cell Physiol** 232: 1794-1807.



- Nakai K., y Horton P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *TrendsBiochem. Sci.* 1999 Jan;24(1):34-6.
- Nduyen Ba A.N., Pogoutse A., Provart N., y Moses A.M. 2009. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction.*BMC.Bioinformatics.* 2009 Jun 29;10:202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202.
- Nilius B., y Mahieu. 2006. A road map for TRP(I)Ps. *Mol Cell.* 22, 297-307.
- Nilius B., Droogmans G., Wondergem R. 2003. Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium* 10: 5–15.
- Nilius B., Owsianik G., Voets T., y Peters A. J. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol.* Vol. 87 no. 1, 165-217 DOI: 10.1152/physrev.00021.2006.
- Nilius B., Prenen J., Wissenbach U., Bödding M., y Droogmans G. 2001. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflügers Arch* 443: 227–233.
- Nilius B., y Owsianik G. 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *GenomeBiol.* 12: 218.
- Nilius B., y Voets T. 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports.* 14:153-63.
- Patel N., Itakura T., Gonzalez J.M. , Schwartz S.G., y Fini M.E. 2013. GPR158, an orphan member of G protein-coupled receptor Family C: glucocorticoid-stimulated expression and novel nuclear role. *PLoS One.* 8(2):e57843. doi: 10.1371/journal.pone.0057843. Plant T.D., y Strotmann R., 2007. Trpv4. *Hand Exp.Pharmacol.*, 189e205.
- Raghavendra R. P., y Bonham-Smith P. C. 2013. Charge versus sequence for nuclear/nucleolar localization of plant ribosomal proteins. *Plant Mol Biol.* 2013 Mar;81(4-5):477-93. doi: 10.1007/s11103-013-0017-4. Epub 2013 Jan 29.

- Ramsey I., Delling M., y Clapham, D. 2006. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev Physiol.* 68 (2): 619-47.
- Schleif R. 2000 Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in gen.* **16**: 559-565.
- Scott K., Brady R., Cravchik A., Morozov P., Rzhetsky A., Zuker C., y Axel R. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104(5): 661--673.
- Shen H. B., y Chou K. C. 2007. Gpos-PLoc: an ensemble classifier for predicting subcellular localization of Gram-positive bacterial proteins. *Protein Eng Des Sel.* 2007 Jan;20(1):39-46. Epub 2007 Jan 23.
- Shigematsu H., Sokabe T., Daney R., Tominaga M., y Nagayama K. 2010. A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *J BiolChem.* 285: 11210–11218.
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M. 2010. The TRPV4 Channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **285**: 18749-18758.
- Song M. Y., y Yuan J. X. 2010. Introduction to TRP Channels: Structure Function, and Regulation. Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation, *AEME*, Vol. 661, DOI 10.1007/978-1-60761-500-2_6.
- Stewart A. P., Smith G. D., Sandford R. N., y Edwardson J. M., 2010. Atomic force microscopy reveals the alternating subunit arrangement of the TRPP2-TRPV4 heterotetramer. *BiophysJ* 99: 790–797.
- Strotmann R., Harteneck C., Nunnenmacher K., Schultz G., y Plant T.D. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.* 2: 695–702.
- Watanabe H., Vriens J., Janssens A., Wondergem R., Droogmans G., y Nilius B. 2003. Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺. *Cell Calcium* 33: 489–495.

- White J. P., Cibelli M., Urban L., Nilius B., McGeown J.G., y Nagy I. 2016. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol Rev.* 2016 Jul; 96(3):911-73. doi: 10.1152/physrev.00016.2015.
- Wu L.J., Sweey T.B., y Clapham D.E. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62(3):381-404.
- Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C., y Ryba N.J. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell.* 112(3):293-301.
- Zhao Y., Huang H., Jiang Y., Wei H., Liu P., Wang W., y Niu W. 2012. Unusual localization of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *Eur. J. Histochem.* **56**: 201-207.
- Zhengdeng Lei, y Yang Dai. 2005. An SVM-based system for predicting protein subnuclear localizations. *BMC Bioinformatics.* 2005; 6: 291. Published online 2005 Dec 7. doi: 10.1186/1471-2105-6-291