



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Sebastián Brauchi U.**  
Instituto de Fisiología  
Facultad de Medicina  
Universidad Austral de Chile

**SEÑALES DE EXPORTACIÓN Y LOCALIZACIÓN NUCLEAR  
COMO DETERMINANTE DE LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DEL  
CANAL DE IONES TRPM1**

Tesis de Grado presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de *Licenciado  
en Bioquímica* y Título Profesional de  
*Bioquímico*

**PAMELA ANDREA SOTELO HITSCHFELD**

**VALDIVIA – CHILE  
2012**

*Esta tesis está dedicada a aquellos que se levantan por las mañanas con la convicción que cada día será mejor que el anterior, a quienes luchan por hacer sus sueños realidad y a los que creen que querer es poder. Esta tesis está dedicada a mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis padres, Cristian Sotelo y Fabiola Hitschfeld, quienes con su ejemplo me han enseñado a nunca darme por vencida y a luchar por alcanzar mis metas. Siempre motivándome a buscarme y desarrollarme como un individuo completo e integral, con una mirada crítica del mundo que me rodea y a no quedarme de brazos cruzados ni conformarme sin esforzarme por lo que quiero. El ser un profesional el día de hoy es gracias a su esfuerzo y constante apoyo, jamás dudaron de mis capacidades y sin ellos no estaría donde estoy ni sería quien soy, les debo todo y más. Infinitas gracias.

Quiero agradecer a mi hermana, Tamara Sotelo, su apoyo ha sido fundamental durante estos años, mis años en la universidad no habrían sido iguales sin ella. Le agradezco por contenerme y apoyarme cuando fue necesario. Quiero agradecer también a Héctor Mancilla, tanto a nivel académico como personal.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos y compañeros: Patricia Ojeda, Magdalena Esparza, Paulina Valenzuela, Juan Pablo Vivar y Pablo Moll, quienes con su alegría, irreverencia e infinita capacidad para escuchar han hecho que estos años sean los que posiblemente recuerde con más cariño. No puedo dejar de mencionar a Daniela Fuentes, quien junto a Patricia fueron un apoyo y pilar fundamental durante los años de ramos.

Agradecer también, de modo muy personal, a Daniel Plaza. Las ganas que le pone a la vida, su empuje y apoyo han sido fuente de inspiración y un impulso extra para terminar esta etapa.

Quiero agradecer de forma muy especial al Dr. Sebastián Brauchi por darme la posibilidad de desarrollarme profesionalmente en su laboratorio, por la confianza impartida en mí, los consejos, la amistad, y por las oportunidades que me ha brindado para poder seguir formándome

científicamente. Quiero mencionar a mis compañeros de laboratorio, Xime, Lucho, Pepe, Jota y especialmente a Jeni y Carlos, a todos ellos agradezco su infinita paciencia, los consejos y discusiones, gracias por hacer que cada día en el laboratorio sea más ameno y un lugar grato para trabajar.

También deseo agradecer al Dr. Carlos González y Dra. Maite Castro, por las facilidades que me otorgaron cuando requerí utilizar algún reactivo o un equipo de sus respectivos laboratorios y que permitieron dar curso a mis experimentos.

Finalmente quiero agradecer a la institución que hace económicamente posible el desarrollo de este trabajo: FONDECYT 11070190.

## INDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN</b>	1
1.1 SUMMARY	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1. Identificación del canal iónico TRPM1.	6
2.2. Distribución celular y tisular de TRPM1	6
2.3. Función de TRPM1	10
2.3.1 Función de TRPM1 en la piel	10
2.3.1.1 TRPM1 en melanoma	10
2.3.1.2 TRPM1 en la pigmentación	12
2.3.2 Función de TRPM1 en la visión	12
2.4 Secuencias de destinación nuclear	15
2.5 Hipótesis	19
2.6 Objetivo general	19
2.7 Objetivos Específicos	19
2.7.1. Identificar secuencias de destinación mediante análisis estructural.	19
2.7.2 Evaluar el efecto provocado por alteraciones en las secuencias de destinación identificadas en del canal TRPM1.	19
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
3.1 Análisis <i>In Silico</i>	20

3.1.1 Alineamiento de secuencias de TRPMs	20
3.1.2 Análisis en línea de secuencias biológicas	20
3.2 Construcción del canal TRPM1 $\Delta$ ex11	20
3.2.1 Diseño Partidores para PCR	20
3.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	22
3.2.3 Extracción y purificación del producto amplificado desde gel de agarosa	22
3.2.4 Ligación DNA	24
3.2.5 Transformación bacteriana por shock térmico	24
3.2.6 Purificación Plasmidial Miniprep de DNA y Midiprep de DNA.	25
3.2.7 Perfil de restricción del fragmento de cDNA purificado	25
3.3 Cultivo celular	26
3.3.1 Cultivo celular línea HEK293T	26
3.3.2 Tratamiento de cubreobjetos Poli-L-Lisina.	26
3.3.3 Transfección DNA	26
3.4 Obtención Extracto Nuclear	26
3.5 Separación Electroforética de Proteínas.	28
3.6 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.	28
3.7 Análisis de Western Blot.	29
3.8 Microscopía	29

3.8.1 Tratamiento con Actinomicina D (ActD) y análisis por Microscopia de Epifluorescencia	30
3.8.2 Inmunoquímica y análisis de microscopía de epifluorescencia	33
3.8.3 Tratamiento con Pregnenolona Sulfato (PS) y análisis por Microscopia de Reflexión Total Interna.	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1 Análisis Bioinformáticos	37
4.2 Localización de TRPM1 en la envoltura nuclear.	40
4.4 Localización Subcelular de TRMP1	45
4.7 Análisis de Western Blot	45
4.8. Estudio de la NLS tras el tratamiento con Actinomicina D.	49
4.9. Análisis de movilidad con Pregnenolona Sulfato.	49
<b>5.0 DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Progresión del Melanoma.	4
<b>Figura 2</b>	Características estructurales de los canales TRPM.	7
<b>Figura 3</b>	Expresión del mRNA de hTRPM1.	8
<b>Figura 4</b>	Representación esquemática de las capas y tipos celulares en una retina de mamífero.	14
<b>Figura 5</b>	El ciclo del transporte nuclear.	18
<b>Figura 6</b>	Esquema de Construcción TRPM1 $\Delta$ ex11.	21
<b>Figura 7</b>	Diseño del <i>Setup</i> de TIRFM	31
<b>Figura 8</b>	Tratamiento de Imágenes.	32
<b>Figura 9</b>	Ángulo crítico y principio de la microscopia de reflexión total interna.	35
<b>Figura 10</b>	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la familia de iones TRPM.	38
<b>Figura 11</b>	Análisis de predicciones de destinación nuclear en TRPM1	39
<b>Figura 12</b>	Análisis de predicción de Localización Nucleolar.	41
<b>Figura 13</b>	Microscopía de Epifluorescencia revela localización perinuclear de TRPM1-GFP.	42 43
<b>Figura 14</b>	Amplificación por PCR del canal TRPM1 delecionando el exón 11	
<b>Figura 15</b>	Perfil de restricción de TRPM1 y TRPM1 $\Delta$ ex11.	44
<b>Figura 16</b>	células HEK-293T sobre expresando TRPM1-GFP (A) y TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP (B).	46
<b>Figura 17</b>	Análisis de la expresión nuclear de TRPM1 en células HEK293T.	48
<b>Figura 18</b>	Actinomicina D retarda el importe nuclear de TRPM1-GFP.	50
<b>Figura 19</b>	Pregnenolona Sulfato estabiliza el canal en la membrana.	52



**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla I</b>	Partidores de clonamiento y parámetros para reacción de PCR.	23
<b>Tabla II</b>	Valores Promedios del valor de pixel.	47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ActD</b>	Actinomicina D.
<b>CSNB</b>	Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita.
<b>ER</b>	Retículo Endoplasmático.
<b>INM</b>	Membrana Nuclear Interna.
<b>MITF</b>	Factor de Transcripción para la Diferenciación de Melanocitos.
<b>NES</b>	Señal de Exportación Nuclear.
<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear.
<b>NPC</b>	Complejo del Poro Nuclear.
<b>ONM</b>	Membrana Nuclear Externa.
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>PS</b>	Pregnenolona Sulfato.
<b>QD</b>	Quantum Dots.
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.
<b>RGP</b>	Fase de Crecimiento Radial.
<b>TIRFM</b>	Microscopía de Reflexión Total Interna.
<b>TRP</b>	Receptor de Potencial Transitorio.
<b>TRPM</b>	Receptor de Potencial Transitorio Melastatin.
<b>TRPM1</b>	Receptor de Potencial Transitorio Melastatin Tipo 1.
<b>VGP</b>	Fase de Crecimiento Vertical.

## 1. RESUMEN

TRPM1, inicialmente llamado *Melastatin*, es el miembro fundador de la subfamilia “M” de los canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés *Transient Receptor Potential*). Fue identificado como una proteína con expresión desregulada en células de melanoma altamente metastásicas. En melanocitos, la expresión de TRPM1 se ha asociado además con la pigmentación de la piel. De entre los 8 miembros que componen la sub-familia TRPM, se identificó una secuencia amino-terminal presente solo en el canal TRPM1. Esta secuencia está descrita como el exón 11. Análisis *in silico* del exón 11 predicen la presencia de una secuencia de exportación nuclear (NES) y la presencia de un motivo que contiene una señal de localización nuclear (NLS). Estas predicciones de algún modo sugieren que el exon11 podría estar relacionado con el mecanismo de distribución sub-celular del canal.

Utilizando técnicas de biología molecular se obtuvo un canal carente del exón 11, se realizaron transfecciones del canal silvestre y la mutante en células HEK293T y se llevaron a cabo experimentos de imagenología. Observamos que la sobre-expresión de TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP en células HEK293T aumenta la cantidad del canal en la periferia nuclear en comparación a TRPM1-GFP de largo completo. Para probar si la NLS es una secuencia activa se trató células transfectadas con TRPM1-GFP de largo completo en presencia de actinomicina D (ActD), conocido por su efecto de retardar el importe nuclear de proteínas con señal NLS. Después de 2 horas de tratamiento fue posible visualizar una distribución intranuclear característica. Los resultados mostrados en esta tesis sugieren la presencia de secuencias activas de exportación y localización nuclear de TRPM1, el mecanismo mediante el cual estas secuencias regulan la función del canal en el núcleo aun debe ser dilucidado.

## 1.1 SUMMARY

Initially dubbed *Melastatin*, TRPM1 is the founding member of the TRPM subfamily of Transient Receptor Potential (TRP) ion channels. It was identified within a pool of downregulated proteins in highly metastatic melanoma cells. In melanocytes, TRPM1 expression has been also associated to pigmentation.

Within the 8 members of the mammalian TRPM channels, we identified an amino-terminal sequence present only in TRPM1. This sequence has been described as exon 11. We ask the question whether exon 11 may be involved in channel's sub-cellular targeting. *In silico* analysis of exon 11 sequence strongly suggest the present of a nuclear export signal (NES) and a sequence that could function as a nuclear localization sequence (NLS).

TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP lacking exon 11 was engineered and obtained through standard molecular biology techniques. Transfections were performed in HEK-293T cells.

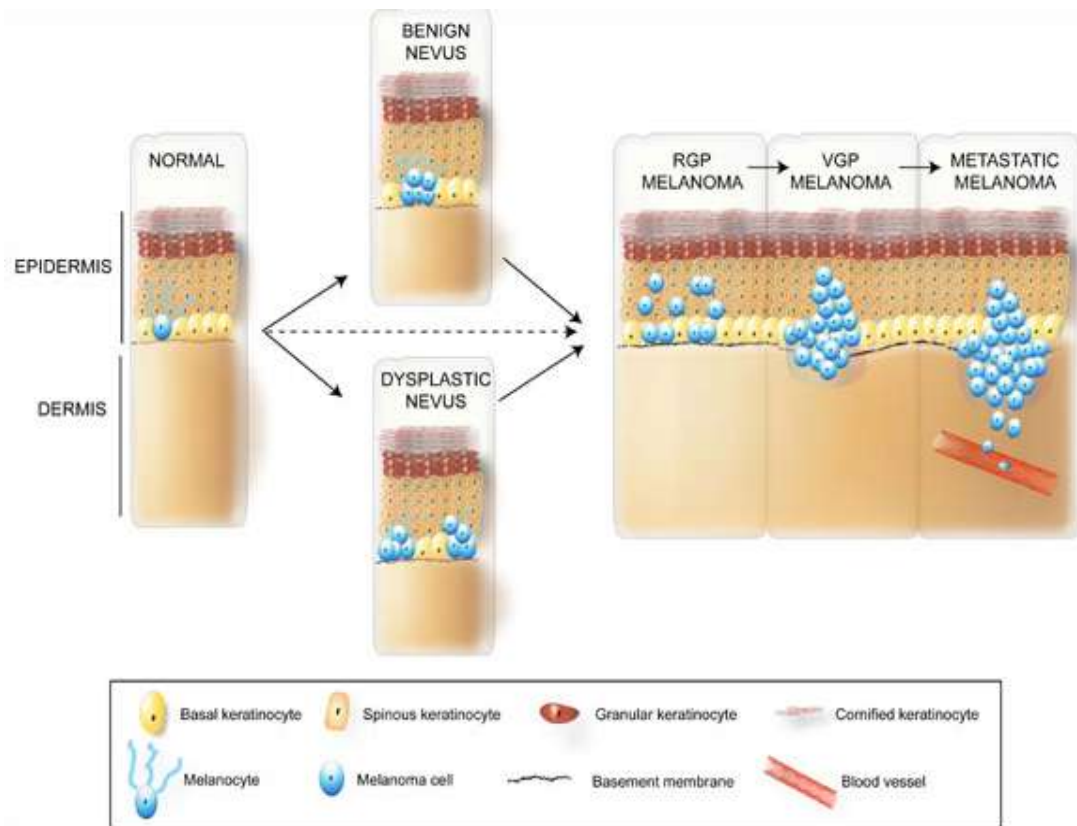
The over-expression of TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP in HEK293T cells enhances the amount of channel in the nuclear periphery in comparison with full length TRPM1-GFP . To probe whether NLS may act as an active sequence, we treated TRPM1-GFP transfected cells with actinomycin D (ActD), known for retarding protein nuclear import. After two hours treatment we were able to see a clear discrete distribution of GFP-tagged channel inside the nucleus. Our results suggest that TRPM1 possess both, functional NES and NLS motifs. Whether these sequences regulates the function of TRPM1 channels and what is the function of TRPM1 in nucleus is still unknown.

## 2. INTRODUCCIÓN

El melanoma maligno es la forma más mortal de cáncer a la piel y su incidencia está aumentando en todo el mundo. En Chile se ha descrito la incidencia anual de cáncer cutáneo en 5 hospitales públicos de la región metropolitana, en estos estudios se evidenció un aumento del 105% en la tasa de ocurrencia del melanoma maligno (Zemelman, 2007).

El melanoma es un tumor de origen melanocítico, se origina a partir de los melanocitos diseminados de las capas basales de la epidermis, desde ahí se dispersa desde los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos regionales y posteriormente por vía sanguínea. Debido a esto el control a tiempo de la enfermedad es extremadamente difícil, en la figura 1 se esquematiza la progresión del melanoma. La naturaleza devastante de esta enfermedad está conectada con el hecho de que puede afectar a gente muy joven y no existen terapias efectivas una vez que el proceso metastásico ha comenzado (Slominski *et al*, 2003).

Los melanocitos son responsables de la producción del pigmento pardo, la melanina, la cual es sintetizada por estas células, empaquetada en melanosomas y transferida a los queratinocitos adyacentes; esta transferencia es crucial para proteger la piel de la radiación ultravioleta (UV). Una mayor producción de melanina se correlaciona con una menor probabilidad de adquirir cáncer cutáneo (Fin and Fisher, 2007). De este modo los melanocitos actúan como células regulatorias del sistema neuroendocrino de la piel. Por lo tanto, no es sorprendente que ellas puedan expresar canales iónicos involucrados en funciones sensoriales - entre otros- canales miembros de la familia TRPM (TRPM, del inglés *Transient Receptor Potencial Melastatin* dentro de los que se destacan los subtipos TRPM1, TRPM7 y TRPM8; Slominski, 2008).



**Figura 1: Progresión del Melanoma:** La piel posee tres principales capas: epidermis, dermis e hipodermis, la melanina se ubica en los melanocitos células de la epidermis (representado en azul). Debido a diferentes estímulos, los melanocitos se pueden descontrolar y se agrupan formando una masa irregular, el tejido muestra una fase de crecimiento radial que invade la dermis (RGP, del inglés *Radial Growth Phase*). Las células cancerígenas se siguen multiplicando y el tejido entra en una fase de crecimiento vertical (VGP, del inglés El melanoma maligno es la forma más mortal de cáncer a la piel y su incidencia está aumentando en todo el mundo. En Chile se ha descrito la incidencia anual de cáncer cutáneo en 5 hospitales públicos de la región metropolitana, en estos estudios se evidenció un aumento del 105% en la tasa de ocurrencia del melanoma maligno (Zemelman, 2007).

El melanoma es un tumor de origen melanocítico, se origina a partir de los melanocitos diseminados de las capas basales de la epidermis, desde ahí se dispersa desde los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos regionales y posteriormente por vía sanguínea. Debido a esto el control a tiempo de la enfermedad es extremadamente difícil, en la figura 1 se esquematiza la progresión del melanoma. La naturaleza devastante de esta enfermedad está conectada con el hecho de que puede afectar a gente muy joven y no existen terapias efectivas una vez que el proceso metastásico ha comenzado (Slominski *et al*, 2003).

Los melanocitos son responsables de la producción del pigmento pardo, la melanina, esta es sintetizada por estas células, empaquetada en melanosomas y transferida a los queratinocitos adyacentes, esta transferencia es crucial para proteger la piel de la radiación ultravioleta (UV). Una mayor producción de melanina se correlaciona con una menor probabilidad de adquirir cáncer cutáneo (Fin and Fisher, 2007). De este modo los melanocitos actúan como células regulatorias del sistema neuroendocrino de la piel. Por lo tanto, no es sorprendente que ellas puedan expresar canales iónicos involucrados en funciones sensoriales -entre otros- canales miembros de la familia TRPM (TRPM, del inglés *Transient Receptor Potencial Melastatin* dentro de los que se destacan los subtipos TRPM1, TRPM7 y TRPM8; Slominski, 2008).

*Vertical Growth Phase*) donde se rompe la membrana basal invadiendo la hipodermis. Finalmente, en un proceso llamado metástasis, las células cancerígenas pueden invadir los vasos linfáticos y diseminarse a otras partes del cuerpo. El centro de la actividad de estos canales que se expresan en células de melanoma es un atractivo blanco para el tratamiento médico de melanoma maligno (Yamamura *et al*, 2008)

## 2.1. Identificación del canal iónico TRPM1.

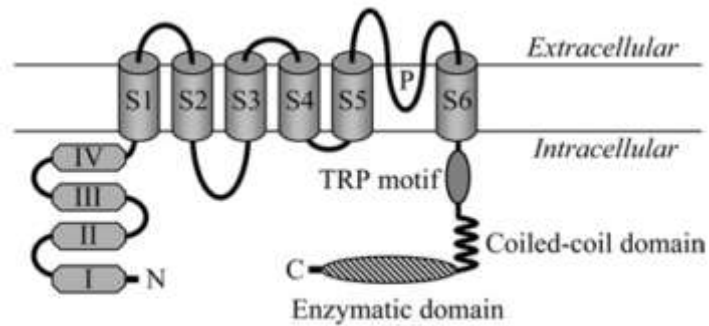
*Melastatin* (MLSN), como fue nombrado el gen que codifica para el canal TRPM, se identificó en una visualización diferencial de cDNA entre dos variantes de una línea celular de melanoma murino que difieren en su capacidad de formar metástasis. La expresión del gen se correlaciona inversamente con la progresión de melanoma y el grosor del tumor melanocítico (Duncan *et al*, 1998).

El cDNA identificado en ratón codifica una proteína de 542 residuos aminoacídicos y representa un gen localizado en el cromosoma 7. (Hunter *et al*, 1998) El gen humano fue identificado poco después gracias a un sondeo en busca del gen MSLN en una biblioteca de retina de ratón. El gen MLSN humano está localizado en el cromosoma 15 y codifica una proteína de 1533 residuos con 6 dominios transmembrana y con homología a la familia de canales iónicos TRP (del inglés *Transient Receptor Channel*) (Fig. 2). MLSN se convirtió en el miembro fundador de la sub-familia “M” de canales TRP la cual se compone de 8 proteínas similares a *melastatin*.

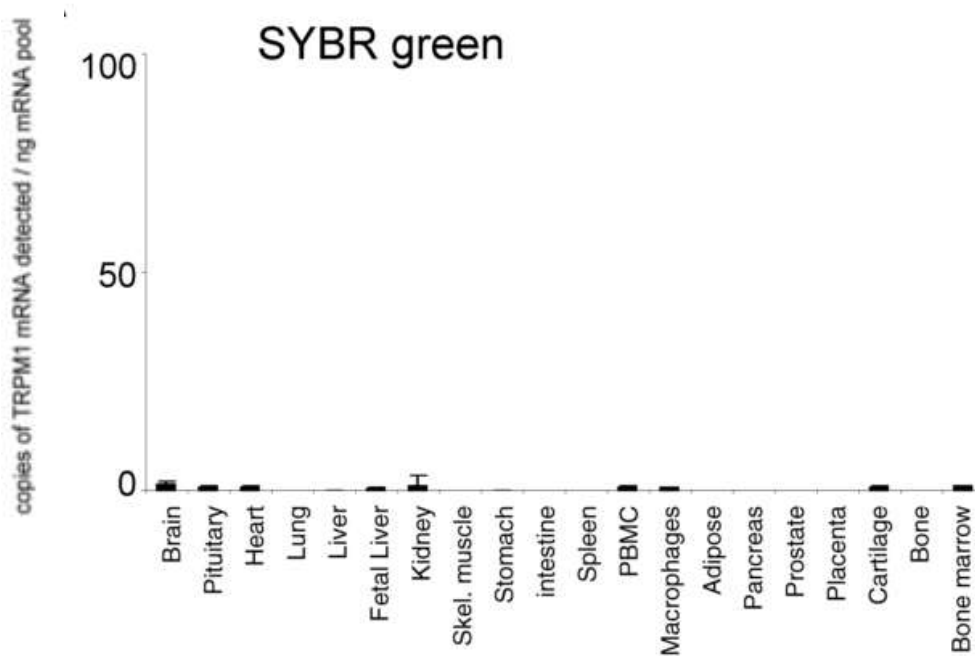
## 2.2. Distribución celular y tisular de TRPM1

Diversos estudios muestran que el mRNA de TRPM1 se encuentra presente en melanocitos (Carlson *et al*, 2005), retina (Bellone *et al*, 2008), corazón y cerebro (Fronfria *et al*, 2006; Kunert-Keil *et al*, 2006). Estudios comparativos utilizando cuantificación por PCR de transcripción reversa (qRT-PCR) mostraron que los niveles de mRNA de TRPM1 son más altos en cerebro y corazón, mientras que la abundancia en melanocitos y retina no pudo ser determinada como se observa en la figura 3 (Fonfria *et al*, 2006).





**Figura 2: Características estructurales de los canales TRPM:** Dibujo esquemático de las subunidades de TRPM, muestra cuatro dominios de alta homología (I a IV) en el extremo N-terminal, seis segmentos transmembrana (S1 a S6), el poro de conducción entre S5 y S6, un motivo TRP y dominio *coiled-coil* ubicados en la porción C-terminal citoplasmática. (adaptado de Jiang, 2007)



**Figura 3: Expresión del ARNm de hTRPM1:** perfiles de ARNm de TRPM1 humano en sistema nervioso central y tejido periférico. Los datos se expresan como copias de ARNm de TRPM1 detectado y normalizados según los ng del *pool* total de ARNm para corregir la cantidad y la integridad del ARN total. (Fonfria *et al*, 2006)

Análisis similares, utilizando la misma técnica en diferentes tejidos y en relación a otros canales TRPM, los niveles de mRNA de TRPM1 son muy bajos. Esto apoya la hipótesis que la expresión de TRPM1 está restringida a distintas sub-poblaciones de células en los diferentes tejidos (Kunnert-Keil *et al*, 2006).

La localización de TRPM1 podría ser un importante factor a la hora de caracterizar su función. Experimentos de hibridación *in situ* muestran la presencia de mRNA del canal en la membrana retinal interna del ojo (Kim *et al*, 2008), mientras que mediante inmunocitoquímica realizada en cortes de retina revelan la presencia de la proteína en células bipolares ON (Koike *et al*, 2010). La localización de TRPM1 parece ser primariamente intracelular, pero la resolución de la microscopía no ha sido suficiente para determinar su localización subcelular (Koike *et al*, 2010; Morgans *et al*, 2009). Estudios utilizando un clon de TRPM1 fusionado a una proteína fluorescente verde muestran que la ubicación del canal es principalmente intracelular y análisis por Microscopía de Reflexión Total Interna (TIRFM) muestran que TRPM1 se encuentra localizado en estructuras vesiculares altamente dinámicas (Oancea *et al*, 2009). Las corrientes registradas para este canal en la membrana plasmática son muy pequeñas, sugiriendo que el canal posee una función predominantemente intracelular o que al menos se encontraría restringido a regiones específicas de la membrana plasmática (Kunnert-Keil *et al*, 2006, Oancea *et al* 2009). Después de la aplicación de pregnenolona sulfato (PS) en células transfectadas con TRPM1 se puede observar un incremento reversible de la actividad eléctrica en modalidad de célula completa (Lambert *et al*, 2011). La PS es un neuroesteroide sulfatado producido en el cerebro, que puede activar rápidamente canales de membrana en las neurona. (Akk and Steinbach, 2000), que bloquea la activación de los receptores  $\gamma$ -aminobutíricos ácido A (GABA<sub>A</sub>) (Majewska *et al*. 1988) y que potencia la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wu *et al*, 1991).

PS activa el canal de iones TRPM3, el más cercano homológamente a TRPM1, provocando un aumento en las corrientes endógenas en células  $\beta$  pancreáticas (Wagner *et al*, 2008). No se ha realizado ningún análisis exhaustivo respecto del efecto de PS sobre la expresión de TRPM1 en la superficie celular.

La ubicación intracelular de TRPM1 no es poco común, muchos canales TRP poseen distribuciones predominantemente intracelulares, y la distribución de estos canales cuando son expresados en sistemas heterólogos imita muchas veces la distribución en sus sistemas nativos (Toro *et al*, 2011). Incluso en casos donde canales parecen tener funciones predominantemente intracelulares, una pequeña porción de estos canales alcanza la membrana plasmática generando una corriente funcional (Bezzerrides *et al*, 2004).

La localización de TRPM1 podría requerir complejos proteicos especializados presentes en melanocitos. Considerando que la abundancia de muchas proteínas está alterada en células de melanoma, este cambio podría estar alterando la ubicación apropiada de las isoformas de TRPM1. Si el canal posee una función intracelular funciona intracelularmente o a nivel de membrana plasmática, o incluso ambas, aún debe ser resuelto (Oancea and Wicks, 2011).

## **2.3. Función de TRMP1**

### **2.3.1 Función de TRPM1 en la piel**

#### **2.3.1.1 TRPM1 en melanoma**

Desde su descubrimiento, se ha propuesto que TRPM1 posee un rol en la metástasis de melanoma. En efecto, los niveles de expresión de TRPM1 se correlacionan inversamente con la agresividad del tumor en melanoma murino y humano, sugiriendo que TRPM1 puede actuar

como un supresor metastásico (Duncan *et al*, 1998; Hammock *et al*, 2006; Duncan *et al*, 2001). A pesar de 15 años de intensiva investigación, la contribución de TRPM1 en la progresión del melanoma permanece incierta (Oancea and Wicks, 2011).

La pérdida de la expresión de TRPM1 se correlaciona con un aumento en la agresividad del melanoma cutáneo primario y melanomas nodulares (Duncan *et al*, 1998; Hammock *et al*, 2006; Erikson *et al*, 2009). Los niveles de expresión de TRPM1 se relacionan también con el tamaño del tumor (Duncan *et al*, 1998; Deeds *et al*, 2000) y afectan la supervivencia de los pacientes operados de melanoma maligno (Miller *et al*, 2004). La relevancia clínica de TRPM1 ha motivado investigaciones en búsqueda de su supuesta función como un supresor de tumores, lo que podría lograrse por inhibición de la proliferación celular o por promoción de la diferenciación. Dos líneas de investigación sugieren que TRPM1 está asociado con esto último: primero, la transcripción de TRPM1 está regulado por MITF, el factor de transcripción necesario para la diferenciación de melanocitos (Miller *et al*, 2004; Zhigi *et al*, 2004) y segundo, su expresión es regulada positivamente tras tratamientos con hexametileno bisacetamida (Fang *et al*, 2000). La evidencia a la fecha permite sugerir que la desregulación de TRPM1 en melanomas agresivos es más un efecto que la causa de la diferenciación: La metástasis de melanoma en la mayoría de los casos está asociado con la desregulación de MITF, lo que resulta en la pérdida de la expresión de TRPM1. Sin embargo, la pregunta si TRPM1 funciona o no como un supresor tumoral aguarda aún respuesta definitiva (Oancea and Wicks, 2011).

### 2.3.1.2 TRPM1 en la pigmentación

Por otra parte, estudios recientes señalan que TRPM1 podría participar del mecanismo asociado con la regulación de la melanogénesis. Por ejemplo, la expresión de TRPM1 se ve disminuida en la piel de caballos Appaloosa (Bellone *et al*, 2008). Un *knock-down* de TRPM1 resulta en una disminución de los contenidos de melanina (Oancea *et al*, 2009). Además, en melanocitos humanos primarios obtenidos de donantes de piel clara se observa una reducción del 80% de la producción de melanina en relación a individuos con la piel oscura (Devi *et al*, 2009). Interesantemente, TRPM1 no colocaliza con proteínas marcadoras de melanosomas, en cambio, se localiza en estructuras vesiculares intracelulares altamente dinámicas en células de melanoma (Oancea *et al*, 2009). Pese a esto, el *knock-down* de TRPM1 resulta en una disminución de la actividad de la tirosinasa y en el contenido intracelular del pigmento melanina (Devi *et al*, 2009, Oancea *et al*, 2009).

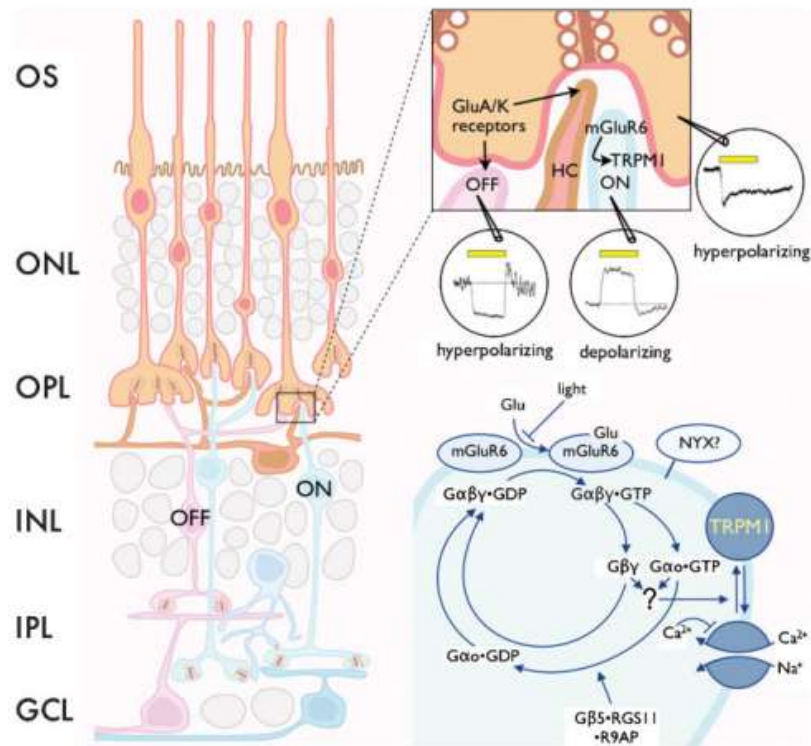
### 2.3.2 Función de TRPM1 en la visión

En caballos Appaloosa, la desregulación de la expresión de TRPM1 ha sido asociada no solo con despigmentación sino que además con ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB, del inglés *Congenital Stationary Night Blindness*), un defecto visual que resulta en una interrupción de la transmisión sináptica en la retina (Bellone *et al*, 2008). Estudios en estos caballos llevaron al grupo de Bellone (2008) a formular la hipótesis que TRPM1 podría jugar un rol importante en las células bipolares ON. Las células bipolares son un tipo de células neuronales que presentan dos ramificaciones por fuera del soma o cuerpo neuronal, estas ramificaciones son: un axón y una dendrita, el axón tiene funciones emisoras de información química, y las dendritas reciben dicha información.

La visión escotópica (percepción visual que ocurre en niveles muy bajos de iluminación) requiere señalización desde fotorreceptores muy sensibles adyacentes a las células bipolares en la retina. Esta vía, denominada vía ON, está formada por los terminales presinápticos de los fotorreceptores y las células bipolares postsinápticas. En la oscuridad, los fotorreceptores liberan glutamato para mantener hiperpolarizado el potencial de membrana en células bipolares ON adyacentes. El incremento en la intensidad de luz produce una disminución de la liberación de glutamato desde los fotorreceptores, lo que provoca que las células bipolares ON se depolaricen en respuesta a esto (Schiller *et al*, 1986). La respuesta de la célula bipolar ON es mediada por un receptor metabotrópico de glutamato (mGluR6) (Nomura *et al*, 1994) acoplado a una proteína G clase G<sub>0</sub> (Nawy, 1999). Esta vía regula negativamente la apertura de TRPM1 que funciona como un canal catiónico no selectivo (Figura 4; Morgan *et al*, 2009, Koike *et al*, 2010).

TRPM1 se acopla negativamente a la cascada mGluR6/Go de modo tal que resulta en el cierre de las conductancias dependientes de potencial en la célula ON. El cierre del canal por la activación de la proteína G en la oscuridad es un paso crítico en el proceso de la señal de transducción en la vía ON (Shen *et al*, 2012). TRPM1, se convierte así en el punto de control en la vía de mGluR6 convirtiéndolo finalmente en el canal responsable de la respuesta sináptica en este circuito visual (Koike *et al*, 2010; Morgans *et al*, 2009; Shen *et al*, 2009). Notablemente, retinas deficientes de TRPM1 (/-) carecen de las corrientes dependientes de mGluR6 (Morgan *et al*, 2009), lo que apoyaría esta hipótesis.

Como un apoyo adicional de la función de TRPM1 en la visión se ha encontrado que las mutaciones del canal se correlacionan con CSNB en humanos (Dryja *et al*, 2005).



**Figura 4: Representación esquemática de las capas y tipos celulares en una retina de mamífero (izquierda).** Los fotorreceptores, conos y bastones (arriba) transducen las señales de luz en una descarga regulada de glutamato en el botón sináptico (arriba, recuadro). Los fotorreceptores responden a la luz hiperpolarizando sus membranas; es el caso de células horizontales y células bipolares OFF, las cuales expresan receptores tipo AMPA – kainato. Células bipolares ON se depolarizan en respuesta a la luz por un mecanismo que involucra mGluR6 y TRPM1. La cascada de señalización de la proteína G activada por mGluR6 está representada abajo a la derecha (Shen *et al*, 2012).



## 2.4 Secuencias de destinación nuclear

Estudios de la secuencia de TRPM1 han llevado a identificar un exón (exón11) que se encuentra presente en todas las variantes de TRPM1, pero que no posee una región homóloga en la secuencia de ningún otro de los miembros de la familia TRPM. Esta región codifica 57 aminoácidos hacia la región citosólica N-terminal del canal. Se ha postulado que esta región codificada por el exón 11 podría reducir las amplitudes de corriente del canal. En efecto en estudios en una mutante que carece del exón se demostró que este constructo posee corrientes mucho más grandes en relación al canal nativo y que ésta llega a incrementarse cerca de 7 veces tras la adición de PS (Lambert *et al*, 2011).

A partir de estos datos hemos inferido que la región codificada por el exón 11 podría estar regulando de algún modo la localización del canal en la célula. Análisis preliminares en esta región nos indican que TRPM1 posee altas probabilidades de poseer señales de localización y exportación nuclear.

Proteínas con tamaños mayores a 60kDa no pueden difundir libremente hacia el núcleo por lo que deben unirse a receptores específicos de proteínas para entrar o salir de este. El extenso tráfico de material entre el núcleo y el citosol ocurre a través del complejo del poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*), quien permite un pasaje directo a través de la envoltura nuclear. Moléculas pequeñas son capaces de difundir libremente a través de los NPCs, pero las de mayor tamaño deben ser transportadas activamente (Alberts *et al*, 2008). La envoltura nuclear consiste en una membrana interna (INM, del inglés *Inner Nuclear Membrane*) y una externa (ONM, del inglés *Outer Nuclear Membrane*). La ONM es continua con la membrana del retículo endoplasmático (ER) y el espacio entre la membrana interna INM es continuo con el lumen del ER. Moléculas de RNA, que son sintetizadas en el núcleo y

subunidades ribosomales, que son ensambladas en el núcleo, son exportadas hacia el citosol. Estas moléculas poseen una señal de exportación nuclear (NES, del inglés *Nuclear Export Signal*) y son activamente exportadas del núcleo a través de los NCPs.; en contraste, todas las proteínas que poseen función en el núcleo son sintetizadas en el citosol y luego son importadas al núcleo, estas proteínas contienen señales de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*) y son transportadas activamente hacia el núcleo a través de los NPCs.

Algunas proteínas, incluyendo receptores de importe y exporte, están continuamente translocándose entre el núcleo y el citosol (Alberts *et al*, 2008).

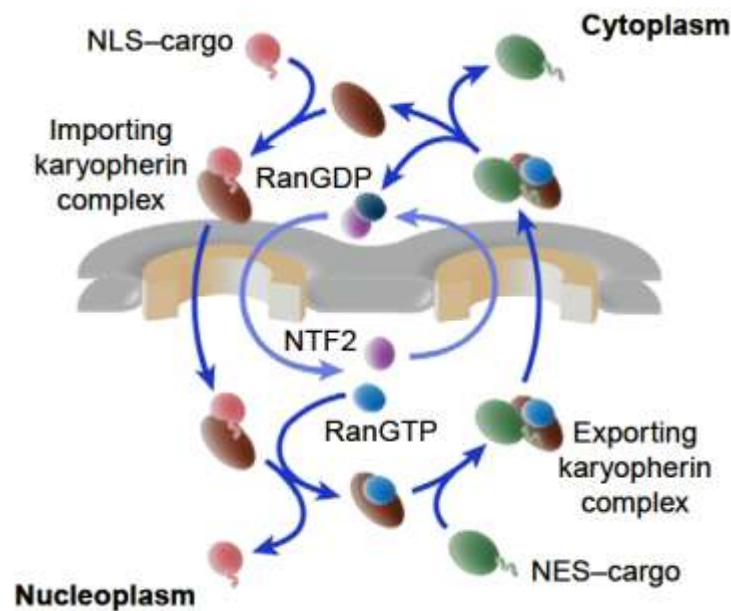
La energía libre y direccionalidad para el transporte nuclear está dado por Ran-GTPasa. La mayoría de las señales de importe y exporte son reconocidas por la familia de  $\beta$ -karioferinas (kap), también conocidas como importinas y exportinas. Una vez que kap se ha unido a su proteína cargo atraviesa el NPC, liberando su carga en el compartimiento de destino y regresa por otra ronda. Debido a que este ciclo es direccional y se pueden acumular *cargos* en contra de un gradiente de concentración, una fuente de energía y direccionalidad son requeridas. Ambas están dadas por una Ran-GTPasa, la cual es controlada por dos reguladores, el factor de intercambio de nucleótidos Ran-Guanosina (RanGEF), y su alter ego, la proteína activadora Ran-GTPasa específica (RanGAP) (Rout *et al*, 2003). Una vez que la kap ha dejado su carga en el núcleo, es transportado a través del NPC hacia el citosol. Aquí, RanGAP lo convierte en Ran-GDP. El receptor de importe queda listo para una nueva ronda de transporte hacia el núcleo. El exporte nuclear ocurre por un mecanismo similar, excepto que Ran-GTP en el núcleo promueve el exporte del receptor, en lugar de disociarlo. Una vez que el receptor de exporte se mueve a través del poro hacia el citosol, Ran-GTP se encuentra con Ran-GAP y hidroliza GTP. Como

resultado, el receptor de exportación libera su cargo y Ran-GDP en el citosol. Los receptores de exportación una vez libres regresan al núcleo para completar el ciclo (Rout *et al*, 2003). En la figura 5 se ilustra el transporte nuclear de macromoléculas.

Las células regulan el transporte de proteínas nucleares y moléculas de RNA a través de los NPCs controlando el acceso de estas moléculas a la maquinaria del transporte. Debido a que las señales de localización o exportación no son removidas, las proteínas pueden ser importadas y exportadas repetidamente, según lo requiera la actividad celular (Alberts *et al*, 2008).

La función de muchas proteínas clave en la señalización celular y ciclo celular, además de factores de transcripción involucrados en el crecimiento celular, son regulados por su localización celular. Esto incluye oncoproteínas y supresores de tumores. La pérdida en la regulación de la localización subcelular de estas proteínas se encuentra involucrada en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, tal como es el caso de p53 o NF- $\kappa$ B (Kau and Silver, 2003). Un 17,3% de proteínas almacenadas en la NESbase 1.0 (base de datos pública de proteínas NES) corresponde a supresores de tumores y oncoproteínas (La Cour *et al*, 2009).

**Los datos preliminares obtenidos en el contexto de esta tesis sugieren que TRPM1 posee secuencias de control de expresión nuclear. Tomando en consideración estos antecedentes, poder determinar la funcionalidad de las secuencias NES o NLS presentes en TRPM1, sería un aporte significativo no solo para entender la función intracelular de TRPM1 sino también para el avance en el estudio de melanomas y otras patologías asociadas a este canal.**



**Figura 5: El ciclo del transporte nuclear.** La importina, karioferina (kap), se une a la *NLS-bearing cargo* en el citoplasma. En el lado nucleoplasmático, RanGTP se une a kap provocando un cambio conformacional que libera la carga. En el nucleoplasma, kaps de exporte se unen a sus cargas en la presencia de RanGTP. Una vez que los complejos están al lado citoplasmático, la hidrólisis de RanGTP es estimulada por RanGAP, resultando en la liberación de la carga. RanGDP es luego reciclada al nucleoplasma por NTF2 y es recargada con GTP para comenzar un nuevo ciclo (Rout *et al*, 2003)

## **2.5 Hipótesis**

Señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES) participan en el mecanismo de control de la localización subcelular del canal de iones TRPM1

## **2.6 Objetivo general**

Identificar determinantes estructurales funcionales que determinen la distribución sub-celular del canal TRPM1.

## **2.7 Objetivos Específicos**

**2.7.1. Identificar secuencias de destinación mediante análisis estructural.**

**2.7.2 Evaluar el efecto provocado por alteraciones en las secuencias de destinación identificadas en del canal TRPM1.**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Análisis *In Silico***

##### **3.1.1 Alineamiento de secuencias de TRPMs**

Las secuencias fueron obtenidas desde la base de datos NCBI con referencia TRPM1 gi: 94538366, TRPM2 gi: 109730277, TRPM3 gi: 123231623, TRPM4 gi: 32487284, TRPM5 gi: 219517806, TRPM6 gi: 37790762, TRPM7 gi: 148612863 and TRPM8 gi: 109689695. Estas secuencias fueron alineadas utilizando Clustal W2, plataforma de análisis para alineamiento de múltiples secuencias disponible en el sitio *web* del Instituto Europeo Bioinformático (EMBL-EBI).

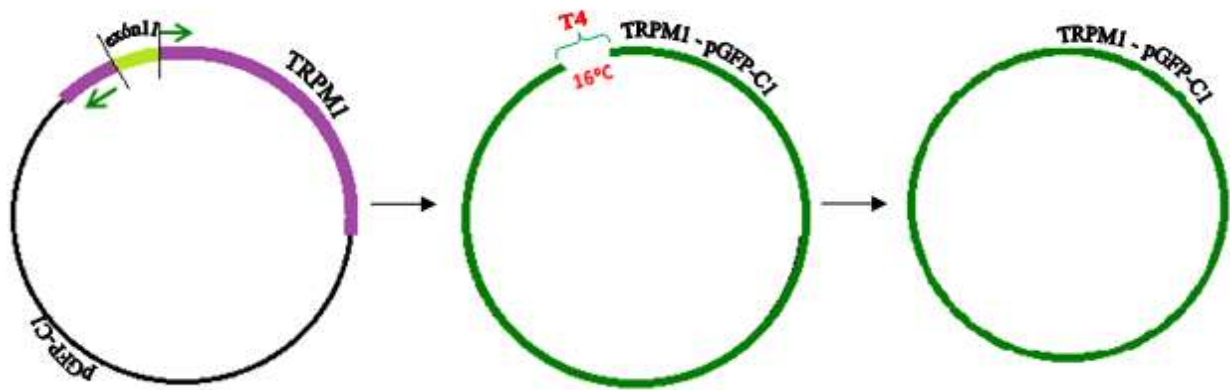
##### **3.1.2 Análisis en línea de secuencias biológicas**

Diferentes análisis fueron llevados a cabo para el canal TRPM1 en el portal web de CBS, entre ellos determinación de sitios de corte, análisis de destinación de proteínas, predicciones de modificaciones post-traduccionales, análisis de función y estructura proteica. Se realizaron predicciones de señalizaciones nucleares usando los servidores NetNES 1.1 para predecir la presencia de NES (La Cour *et al*, 2004), NLStradamus para predecir NLS (Nguyen *et al*, 2009) y NoS para predecir NoLS (Scott *et al*, 2010; Scott *et al*, 2011).

#### **3.2 Construcción del canal TRPM1 $\Delta$ ex11**

##### **3.2.1 Diseño Partidores para PCR**

Utilizando la secuencia aminoacídica del canal se diseñaron los partidores de clonamiento de modo tal que estos flanquean el exón 11 como se muestra en la figura 6. De esta forma el canal



**Figura 6: Esquema de Construcción TRPM1 $\Delta$ ex11:** Los partidores flanquean el exón 11 de forma tal que el canal completo, exceptuando el exón 11, más el vector fue amplificado. Se obtuvo un producto lineal que luego fue religado.

completo, a excepción del exón11, más el vector, pGFP-C1 fueron amplificados. Los partidores utilizados se muestran en la Tabla Ia.

### **3.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para crear el constructo del canal que carezca del exón 11 se sometió el cDNA de TRPM1 a una reacción de PCR de la siguiente manera: En tubo Eppendorf de 0,6mL se mezclaron 2,25 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene), 0,5 unidades de Taq polimerasa (Promega) 100ng/ $\mu$ L de DNA TRPM1; 0,5mM dNTPs mix (Promega), 1mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 5  $\mu$ L de buffer Pfu Ultra II 10X (Stratagene), 0,5mM para el partidador sentido y 0,5mM para el partidador antisentido y se agrego la cantidad suficiente de agua libre de nucleasas (IDT) para llevar la reacción a 5 0 $\mu$ L. La reacción fue realizada en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 PE (Applied Biosystem) según los parámetros que se especifican en la tabla 1b.

### **3.2.3 Extracción y purificación del producto amplificado desde gel de agarosa**

El producto de PCR generado fue sembrado en un gel de agarosa (USBiological) al 1%. Se pesaron 0,4 g en una balanza analítica (Radwag AS/220/C/2), y se disolvieron en 40 ml de TAE 1X y se agregaron 2  $\mu$ L de EtBr (Fisher-Biotech). Una vez que la agarosa gelificó se procedió a sembrar el producto de PCR, y se realizó la electroforesis en una cámara electroforética Mini-Horizontal-Unit FB-SB-710 (Fisher Scientific) conectada a una fuente de poder EC105 (EC Apparatus Corporation) que permitió correr el gel a 100 mV. El gel de agarosa se visualizó en un transiluminador Tran-Lum SOLO (BIOTOP) y se aisló la banda con el producto de PCR. Posteriormente se utilizó un Kit de extracción y purificación desde gel de agarosa (QIAGEN) basado en la purificación a través de una resina de intercambio iónico. Se



**Tabla I: Partidores de clonamiento y parámetros para reacción de PCR.** (A). Se muestra la secuencia de los partidores en sentido 5'→3' utilizados en la PCR, sus temperaturas de fusión (Tm), porcentaje de Guanina y Citosina (%GC) y el largo de la secuencia en pares de bases (pb).

(B) Se muestran los distintos parámetros utilizados detallando el tiempo, la temperatura y el número de ciclos correspondientes según segmento

<b>A</b>				
	Secuencia	Tm	%GC	Largo
FW	5' – GTGAATGCTTTGGAGCAAGCGACCCGGGGTGACCGGC – 3'	63.2°C	64.9	37pb
RV	5' - CTCCAAAGCATTACCGGCCAGTGGGGCCCAAAGAC – 3'	59.1°C	61.1	36pb

<b>B</b>			
Segmento	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-denaturación	1	96°C	5min
Denaturación		96°C	1min
Alineamiento	15	60°C	1min
Elongación		72°C	10min
Elongación Final	2	72°C	15min

siguió el protocolo indicado por el fabricante. Finalmente el DNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas (IDT) y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### **3.2.4 Ligación DNA**

Se utilizaron 20 unidades de T4 DNA ligasa (Promega) para ligar 100ng/ $\mu$ L de DNA, se agregó 2  $\mu$ L del correspondiente buffer 10X, se suplementó la reacción con ATP (Sigma-Aldrich) de modo que alcanzó una concentración final de 2mM ATP, luego se agregó agua libre de nucleasas (IDT) hasta completar una reacción final de 20  $\mu$ L y se incubó a 16°C por 4 horas en una termoplaca 17600 Dri-Bath (Thermolyne).

### **3.2.5 Transformación bacteriana por shock térmico**

Para la transformación de la ligación descrita anteriormente se utilizaron células DH5  $\alpha$  quimiocompetentes comerciales (Invitrogen). La transformación de las bacterias DH5  $\alpha$  fue llevada a cabo por un protocolo de shock térmico. El volumen total de ligación se agregó a 50  $\mu$ L de bacterias DH5  $\alpha$ , contenidas en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La mezcla se incubó en hielo por 30 min, luego el tubo fue incubado en una termoplaca 17600 Dri-Bath, (Thermolyne), previamente equilibrada, a 42 °C por 90 segundos. Posteriormente se incubó en hielo por 2 minutos y se agregó 400  $\mu$ L de medio LB 25 g/L (MO BIO). La mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora a 220 rpm en un incubador con agitación ZHWY-100B (Zhi Cheng). Se prepararon placas con medio LB 25 g/L, agar 15 g/L (Merck) y 100 mg/mL de kanamicina (Calbiochem) como antibiótico de selección. El tubo eppendorf con la mezcla de transformación se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto en una microcentrifuga 5415C, (Eppendorf) y luego se retiraron 300  $\mu$ L de sobrenadante. El pellet fue resuspendido y sembrado en las placas LB/Agar/Kanamicina. Finalmente la placa fue llevada a un incubador (Mettler) y se mantuvo a 37 °C por 16 horas.

### 3.2.6 Purificación Plasmidial Miniprep de DNA y Midiprep de DNA.

De la placa, se picaron varias colonias y fueron sembradas en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB/Ampicilina, los tubos fueron incubados a 37 °C en un agitador con una agitación constante 220rpm entre 16 y 18 horas. Para la miniprep por lisis alcalina, se utilizó el Kit Plasmid Mini Kit (EZNA, OMEGA Bio-Tek), siguiendo las indicaciones del proveedor sin modificaciones, luego se cuantifico en un espectofotometro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para comprobar que el DNA amplificado por bacterias correspondía a la ligación descrita anteriormente, se realizó una doble digestión con las enzimas FspI (New England Biolabs) y AseI (New England Biolabs). Identificado el constructo, se creció a escala en un volumen de 100ml de medio LB/Ampicilina a 37°C, 200 rpm entre 16 a 18 horas. El DNA plasmidial se extrajo usando el Kit Plasmid Midi Kit (EZNA, OMEGA Bio-Tek), siguiendo las indicaciones del proveedor sin modificaciones, luego se cuantifico en un espectofotometro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.2.7 Perfil de restricción del fragmento de cDNA purificado

Al fragmento de DNA purificado que contiene el cDNA de TRPM1 $\Delta$ ex11 se le realizó una doble digestión con FspI y AseI, enzimas de restricción que permiten liberar un *cassete* de 2200pb de TRPM1 donde se encuentra contenido el exón 11. Esto para poder visualizar con mayor facilidad si el producto de PCR posee la delección de dicho exón. El volumen final para cada ensayo de restricción fue 20  $\mu$ L, utilizando las concentraciones de Buffer y BSA recomendadas por el fabricante para cada enzima. Las enzimas de restricción utilizadas se obtuvieron de New England Bio Labs. El ensayo de restricción se realizó a 37°C por 4 horas en una termoplaca previamente calibrada a la temperatura deseada.

### **3.3 Cultivo celular**

#### **3.3.1 Cultivo celular línea HEK293T**

Células HEK293T fueron cultivadas en medio DMEM, suplementadas con 10% de suero fetal bovino (HyClone), Penicilina 50U/ml (HyClone), estreptomicina 50mg/ml (HyClone) y L-glutamina 2mM (GIBCO). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5% y 80% de humedad relativa en una estufa HFsafe-900 (Heal Force).

#### **3.3.2 Tratamiento de cubreobjetos Poli-L-Lisina.**

Los respectivos cubreobjetos (VWR) fueron tratados con una solución 0.01% de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego fueron lavados 3 veces con PBS.

#### **3.3.3 Transfección DNA**

Las células HEK293T fueron transfectadas con TRPM1 o TRPM1 $\Delta$ ex11 usando Mirus (MO Bio) según el protocolo indicado por el fabricante o utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el siguiente protocolo: En un tubo se adicionaron 97  $\mu$ L Optimem (Gibco) y 3  $\mu$ L de Lipofectamina 2000, en un segundo tubo se agregó 1  $\mu$ g de DNA y un volumen de Optimem hasta completar los 100  $\mu$ L. Ambos se dejaron incubar por 10 minutos. Transcurridos este tiempo se mezclaron los contenidos y se dejó incubar por 15 minutos adicionales. Se agregó la mezcla a las células previamente plaqueadas y se trabajó con ellas 48 horas post transfección.

### **3.4 Obtención Extracto Nuclear**

Estas indicaciones corresponden al protocolo de Dignam modificado (Dignan *et al*, 1983). 2 placas de 100mm con una confluencia de 80% de células HEK293T transfectadas con TRPM1

o TRPM1 $\Delta$ ex11, se lavó 2 veces con PBS1X (Calbiochem) sobre hielo, se removieron las células mecánicamente con PBS1X y luego fueron colectadas en un tubo de 15mL. Las células se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos a 4°C en una centrífuga Neofuge 15R (Heal Force) y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó con 15mL de PBS1X, se trasvasió a un tubo de 15mL y se centrifugó a 1800g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se determinó el volumen aproximado del pellet (PVC). El pellet se resuspendió suavemente en 5 volúmenes de solución tampón A (hipotónica: Hepes-KOH 10 mM pH 7,5, KCl 10mM, EDTA 0,2mM pH 8,0, más inhibidores de proteasas: espermina 0,15mM y espermidina 0,7mM) y se incubó durante 5 a 10 minutos sobre hielo. El lisado celular se transfirió al homogenizador Dounce y se le dió 5 golpes suaves con el mortero A estrecho. Luego el homogenizado se transfirió a un tubo de 15mL, donde se lava con solución tampón A para ser transferido al homogenizador Dounce, donde se le da 5 golpes rápidos, y se colectan en el mismo tubo donde se ha colectado el lisado anterior. El tubo conteniendo ambas colecciones juntas se centrifugó a 3000 rpm en centrifuga Neofuge 15R (Heal Force) por 15 minutos a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 5 volúmenes de PVC de solución tampón A, se centrifugó a 12000rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 1 a 3 volúmenes de PVC de solución tampón C (hipertónica: Hepes-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 420mM, EDTA 0,2 mM pH 8,0, glicerol 25%, inhibidores de proteasas: espermina 0,15mM y espermidina 0,7mM) y se transfirió el lisado a un tubo de 1,5mL. Esto se centrifugó a 100000g por 60 minutos, luego se extrajo el sobrenadante y se lavó el pellet con buffer de lisis 1% tritónX100 (Sigma-Aldrich), se centrifugó a 100000g por 45 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ L de buffer C.

### **3.5 Separación Electroforética de Proteínas.**

Las muestras de proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 8%. El gel separador y el espaciador se preparó a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8%.

El gel separador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 10% conteniendo Tris (pH 8,8) 375 mM; SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. Mientras que el gel espaciador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 3,8% incluyendo Tris 125 mM (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,01% persulfato de amonio y 0,04% TEMED. Se tomaron muestras obtenidas en la purificación nuclear y se les agregó tampón de carga (Tris 100mM, 2-mercaptoetanol 2%, SDS 4%, glicerol 20%, azul bromofenol 0,2%, pH 6,8) Las muestras fueron cargadas en el gel realizándose la electroforesis a 90 V por 2 horas en tampón de corrida (Tris-CL 50mM, ditiotreitól 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF.

### **3.6 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.**

Finalizada la electroforesis, las muestras fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno; 0,45 micrones de poro, 100-145  $\mu\text{m}$  de espesor). Sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, metanol 20%, pH 8,3) se depositó secuencialmente: un trozo de papel de filtro (Whatman n° 1), la membrana de PVDF (previa activación de la membrana en metanol por 15 segundos), el gel a transferir, otro papel de filtro y luego otra esponja embebida en el misma tampón. Esto se colocó en una cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón mencionado y se aplicó una intensidad de corriente

de 400 mA por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo la membrana se dejó secar a temperatura ambiente.

### **3.7 Análisis de Western Blot.**

La membrana de PVDF fue incubada con anticuerpo antiGFP (ABcam) 1:1000 en tampón anticuerpo (BSA 1%, Tween-20 0,3% en PBS 0,1 M pH 7,4) por 10 horas en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween (PBS 0,1 M, 0,3% Tween-20, pH 7,4) por 20 minutos cada lavado y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario (anti- IgG de conejo, cabra o ratón) conjugado a peroxidasa (dilución 1:2000, en tampón anticuerpo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween (PBS 0,1 M, 0,3% Tween-20, pH 7,4) por 20 minutos cada lavado más un lavado final con PBS 0,1 M. El revelado del conjugado se realizó utilizando un método de quimioluminiscencia ocupando una solución de peróxido de hidrógeno y luminol. En el caso de revelado clásico, luego de 1 minuto se expuso un film fotográfico sobre la membrana, se reveló con reactivo D72 y se fijó con reactivo U3. En el caso de captura digital del revelado se utilizó el equipo Omega ULTRALUM.

### **3.8 Microscopía**

Para obtener las imágenes se utilizó un láser de diodo (473nm / 532nm) (LaserGlow), que está enfocado en una fibra óptica de 3,5 mm (Oz optics) y es transmitida por la entrada de iluminación trasera de un microscopio Olympus IX71. Un distaprador digital (Vincent Associates) sincronizado mecánicamente controla los tiempos de exposición. La luz emitida por el láser se refleja en un espejo dicróico y pasa a través de un objetivo de gran apertura numérica (60x, 1,49 NA). Para el caso de TIRFM la luz es reflejada internamente por

completo por la interface vidrio-agua. El camino óptico se muestra esquematizado a inmediatamente a continuación en la figura 7.

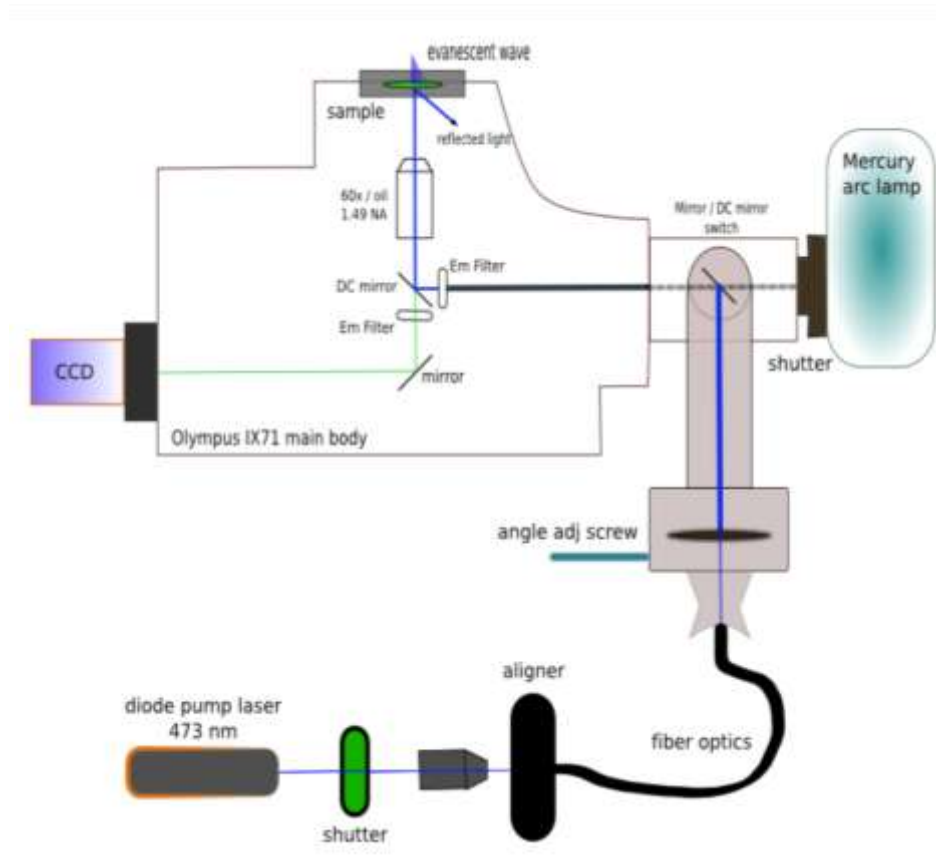
Las imágenes fueron capturadas por una cámara CCD enfriada (ORCA ER II; Hamamatsu) o una EMCCD (iXon 860, Andor) . Se registraron series de hasta 4000 cuadros con exposiciones variable que iban de 100 a 10ms por cuadro utilizando el *plug-in* de ImageJ (NIH), *micro-manager* (Universal Imaging).

Todos los experimentos de microscopía fueron realizados a 20°C en solución ringer (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucosa 10 mM, HEPES 15 mM; pH 7,31; 281mOSM)

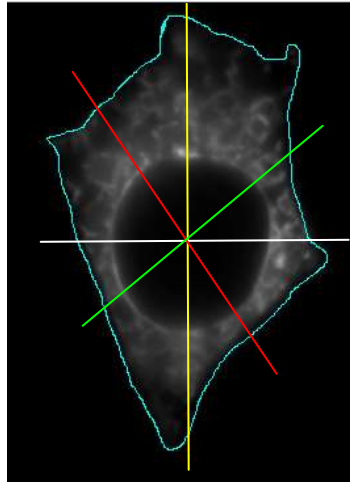
### **3.8.1 Tratamiento con Actinomicina D (ActD) y análisis por Microscopia de Epifluorescencia**

Se tomaron registros a los 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la adición de 100mg/mL de ActD (Sigma-Aldrich). Para normalizar las imágenes se utilizo ImageJ (NIH). Se selecciono el contorno de la célula como muestra la figura 8 a continuación y se calculo el valor correspondiente a la densidad integrada de los pixeles (IntDent), este valor se dividió por 10<sup>5</sup> y el resultado se dividió al valor de pixel total de la imagen. Después de esto se trazaron cuatro líneas a lo largo de la célula como se muestra en la figura 8A y se realizo un perfil de puntos como muestra la figura 8B. El valor de datos obtenidos de los gráficos fue promediado utilizando OriginPro. Ver tabla I. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando un test de anova doble en el software GraphPad 6.0





**Figura 7: Diseño del *Setup* de TIRFM:** Se esquematiza el camino óptico que recorre el haz de luz desde el diodo hasta la muestra donde los fluoróforos son excitados, luego la imagen es capturada por la cámara CCD.



**Figura 8: Tratamiento de Imágenes:** Luego de normalizar la imagen se trazaron cuatro líneas a lo largo de la célula y se realizó un perfil de intensidad. Luego, los máximos fueron promediados, normalizados y graficados.

### **3.8.2 Inmunoquímica y análisis de microscopía de epifluorescencia**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos pre tratados con poli-L-lisina y se fijaron con paraformaldehído 4% (Fluka AG). Se permeabilizaron las membranas celulares con metanol 100% (Merck) por 20min para facilitar la entrada de los anticuerpos que reconocen los epítopes intracelulares. Se utilizó una solución de bloqueo (BSA 5% en PBS 0,1M) por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con anticuerpo primario antiGFP (ABcam) dilución 1:50 y anticuerpo antilamin B1 (Epitomics) dilución 1:50 y se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Como anticuerpos secundarios se ocuparon anti conjugados de Alexa Fluór 488 conjugado con Quantum Dots (QDs) (Lifetechnologies) 1:2500 y Alexa 594 conjugado con QDs (Lifetechnologies) 1:2500 en solución de bloqueo por 4 horas a temperatura ambiente.

Las muestras fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio (Fisherbrand) usando medio de montaje para fluorescencia *prolong antifade* (Molecular Probes) y visualizadas en un microscopio Olympus IX70.

### **3.8.3 Tratamiento con Pregnenolona Sulfato (PS) y análisis por Microscopia de Reflexión Total Interna.**

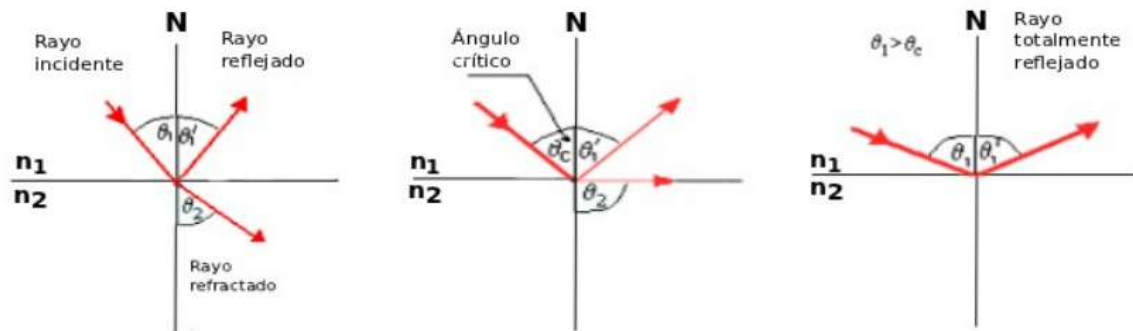
Para excitar selectivamente los canales TRPM1-GFP o TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP en la membrana plasmática inmediatamente adyacente al cubreobjetos, las células fueron visualizadas utilizando microscopia basada en objetivo TIRF.

La microscopía de fluorescencia por reflexión total interna (TIRFM), se basa en el principio de la reflexión de la luz y generación de una onda evanescente. Cuando la luz pasa de un medio con índice de refracción  $n_1$  a otro medio con índice de refracción  $n_2 < n_1$ , con un ángulo de incidencia  $\theta_1$  (Axelrod, 2001), existe cierto ángulo de incidencia llamado ángulo crítico  $\theta_c$ , para el cual el ángulo refractado se hace igual a  $90^\circ$ , es decir, el rayo refractado se desliza a lo largo de la superficie de separación de los medios sin entrar en el segundo medio. Cuando el ángulo de incidencia es mayor  $\theta_c$  entonces la totalidad de la luz será reflejada internamente (Schneckenburger, 2005) (Figura 9).

Un efecto secundario importante de la reflexión interna total es la propagación de la onda evanescente a través de la superficie del límite entre los dos medios donde la luz es reflejada. Aún cuando la onda entera del incidente se refleja internamente, existe una cierta penetración de la onda electromagnética en el segundo medio la que permite la excitación de aquellos fluoróforos cercanos a dicho límite. De este modo, se logra la visualización de un delgado corte óptico en la vecindad (150-200nm) del límite entre los dos medios mencionados anteriormente (Axelrod, 2001).

Se obtuvieron 200 cuadros de 100ms de exposición por cuadro (10Hz) Se tomaron registros de la misma forma a los 0, 1, 5, 10 y 15 minutos tras la adición de 100mg/mL de PS (Sigma-Aldrich).

Las secuencias de imágenes registradas fueron analizadas con ImageJ (NIH). La fluorescencia de fondo fue restada, los eventos de fusión fueron identificados como cambios en la intensidad por encima de cierto nivel, al menos dos veces la intensidad promedio por vesícula sin fusionar, y fueron cuantificados. El número de eventos se normalizó según el área de la célula.



**Figura 9. Ángulo crítico y principio de la microscopía de reflexión total interna (TIRMF).**

Este tipo de microscopía se basa en el principio de la reflexión total y generación de una onda evanescente. Al proyectar un haz de luz (rayo incidente) sobre una superficie constituida de un material transparente con distinto índice de refracción ( $n$ ) es posible encontrar un ángulo de incidencia tal que la totalidad de la luz proyectada es reflejada. Este ángulo se denomina ángulo crítico  $\theta_c$  y es el que produce la reflexión total de la luz incidente que genera una onda electromagnética (la onda evanescente), de igual frecuencia que la luz incidente, que progresa perpendicularmente hacia el lado de opuesto y decae exponencialmente con la distancia de avance. La onda evanescente es capaz de excitar aquellos fluoróforos que se encuentren a una distancia no superior a 200nm de la superficie de reflexión.

Para cuantificar la movilidad de la vesícula, se considera la probabilidad de que solo una partícula se movió. La señal de fluorescencia se filtró para seleccionar partículas cerca de la membrana. El umbral inferior se fijó a 2 desviaciones estándar por encima de la media de la cámara y el ruido de fotón. El límite superior se estableció para eliminar destellos transitorios. Las imágenes tratadas se convirtieron a formato de eventos binarios. La función de movilidad ( $\delta$ ) se calculó para cada píxel de la secuencia de imágenes, usando la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{\sum_1^{n-1} (f_i - f_{(i+1)})^2}{n}$$

Ec. 1

Donde  $f$  es el valor de la amplitud de cada píxel (1 o 0) en la imagen binaria,  $i$  es el número de cuadro y  $n$  es el número total de cuadros. La imagen procesada refleja la movilidad del objeto pixel por pixel (mapa de movilidad) (Brauchi *et al*, 2008)

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis Bioinformáticos

En un estudio previo se ha descrito que el canal TRPM1 posee un exón particular (exón 11) que codifica para una secuencia proteica que carece de una región homologa correspondiente en otros miembros de la subfamilia TRPM (Lambert *et al*, 2011). Esta secuencia corresponde a 57 residuos aminoacídicos en la región citosólica N-terminal del canal. Al realizar los análisis de homología correspondientes con todos los miembros de la subfamilia, se pudo identificar esta secuencia (Fig. 10).

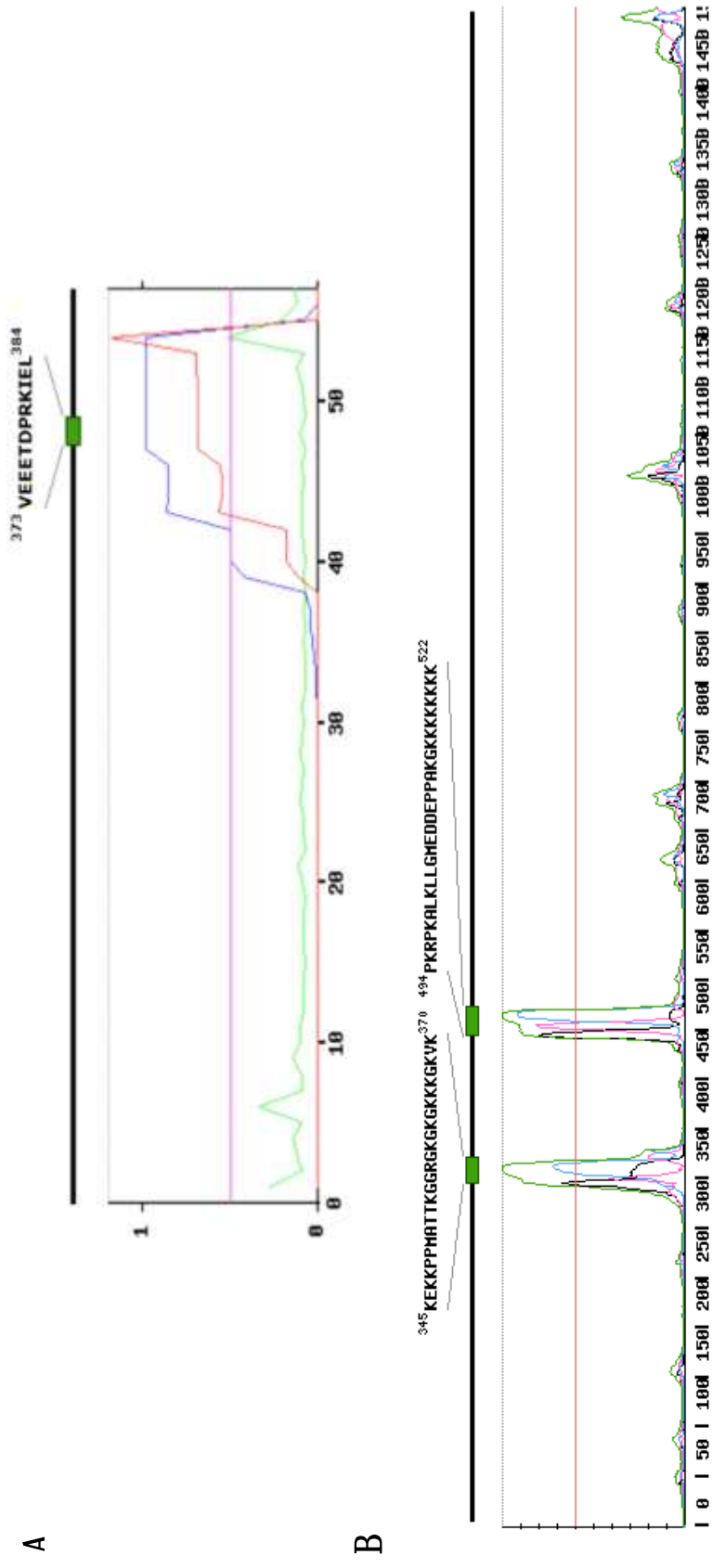
Utilizando las herramientas bioinformáticas disponibles en la página del centro de análisis de secuencias biológicas (CBS del inglés *Center for Biological Sequence analysis*), se analizó la secuencia aminoacídica del exón 11 para modificaciones post-traduccionales, análisis de función y estructura proteica y predicciones de señales de destinación proteica. Gracias a estos análisis *in silico* se determinó que el exón 11 posee una alta probabilidad de constituir una señal de exportación nuclear (NES) entre los residuos <sup>373</sup>VEEETDPRKIEL<sup>384</sup> (Fig. 11A). No es extraño que proteínas que poseen motivos NES posean además una señal de localización nuclear (NLS) lo que les permite mantener un equilibrio entre núcleo y citosol (La Cour *et al*, 2004), por este motivo se sometió a la secuencia aminoacídica del canal a un análisis predictivo para señales NES. El resultado indica una alta probabilidad de que el canal TRPM1 posea dos motivos que podrían constituir NLS funcionales, <sup>345</sup>KEKKPPMATTKGGRGKGGKGGKGGKGGK<sup>370</sup> y <sup>494</sup>PKRPKALKLLGMEDDEPPAKGKKKKKKKK<sup>522</sup> (figura 11B).

Recientemente se ha mostrado que NS1, proteína del virus influenza, posee una NLS que funciona también como una señal de localización nucleolar (NoLS) y que permite la localización



**Figura 10: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la familia de iones TRPM.** Se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los diferentes miembros de la familia TRPM, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 y TRPM8. El exón 11 presente en el canal TRPM1 no se encuentra en ninguno de los otros miembros. Además se muestra la secuencia del constructo TRPM1Δex11, que fue generado por delección de los aminoácidos codificantes para el exón 11.





**Figura 11: Análisis de predicciones de destinación nuclear en TRPM1:** (A) Una señal de exportación nuclear (NES) VEEETDPRKIEL, fue predicha entre los residuos 373 y 384 utilizando el programa de predicción NetNES1.0. (B) Dos señales de localización fueron predichas entre los residuos 345 y 370, y los residuos 495 y 522 utilizando el programa de predicción NLStradamus.

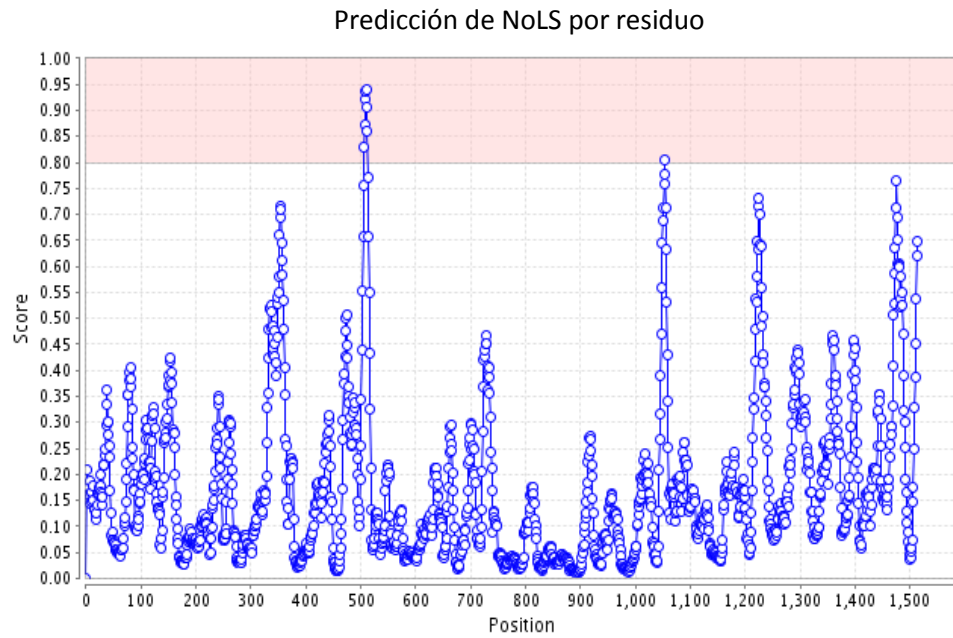
de esta en el nucléolo. Las NoLS son motivos cortos, de naturaleza básica, usualmente ricos en residuos de arginina y lisina, por lo que su señal se sobrepone con NLSs (Melén *et al*, 2012), por ésto se decidió analizar la posibilidad que TRPM1 posea uno de estos motivos. La figura 12 muestra el análisis de predicción para motivos NoLS. El resultado arrojó 95% de probabilidad para la secuencia <sup>506</sup>EDDEPPAKGKKKKKKKKEEEIDIDVD<sup>531</sup> y un 82% para <sup>1053</sup>RLSGRCRKKREGDQEERDRG<sup>1072</sup>.

#### **4.2 Localización de TRPM1 en la envoltura nuclear.**

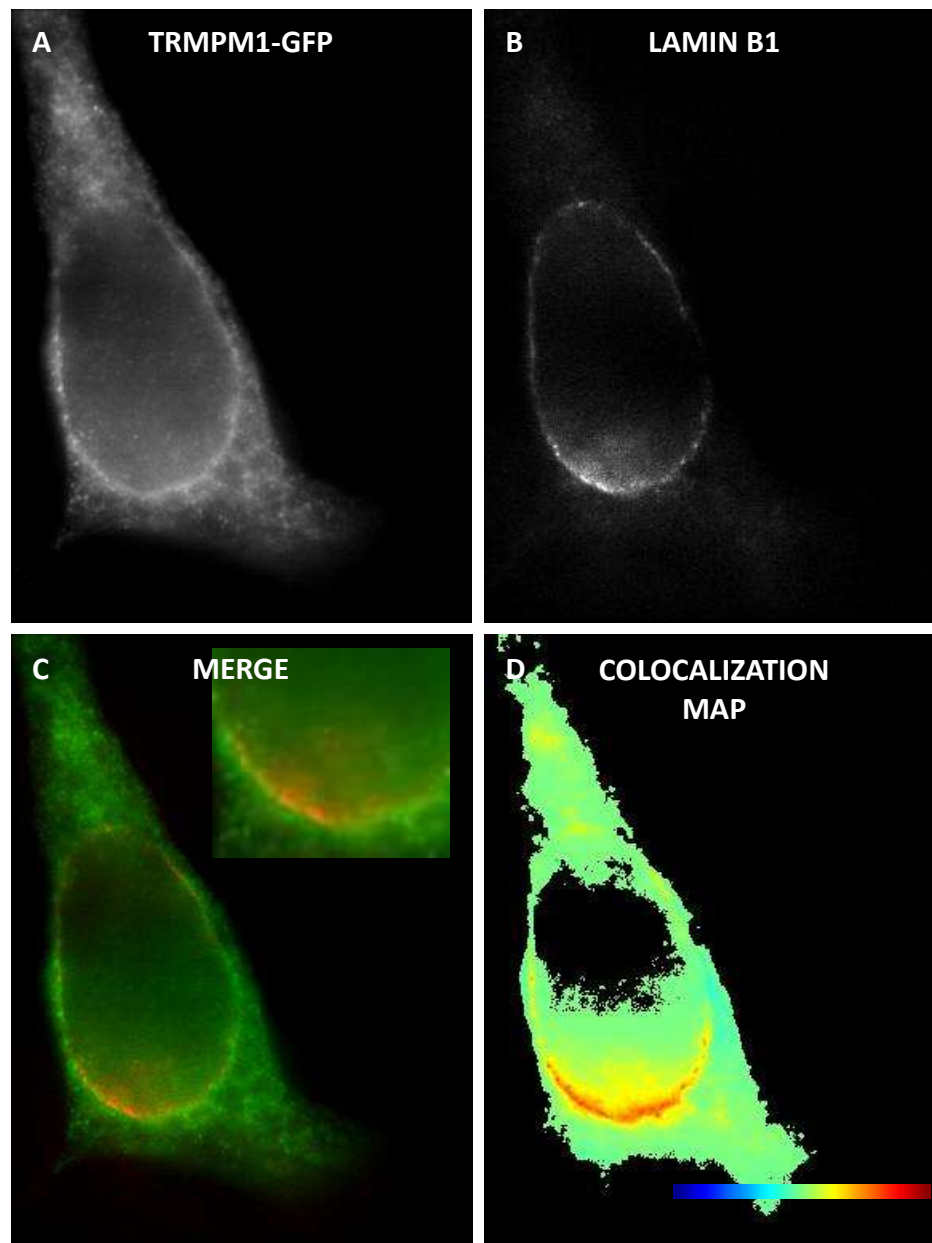
Los análisis *in silico* sugieren fuertemente que TRPM1 podría encontrarse asociado al núcleo celular, para probar ésto se utilizó la técnica de inmunocitoquímica. Utilizamos anticuerpos contra GFP (Fig. 13A) ya que no existen disponibles anticuerpos de buena especificidad contra TRPM1 en el mercado. Adicionalmente y en simultáneo marcamos con anticuerpos contra la lamina nuclear B1 (Lamin B1) (Fig. 13B). Al superponer las imágenes de la expresión de TRPM1 con la de lamin B1 encontramos que ésta colocaliza dando cuenta de la ubicación del canal en la envoltura nuclear como se puede observar en la figura 13C.

#### **4.3 Construcción de TRPM1 $\Delta$ ex11**

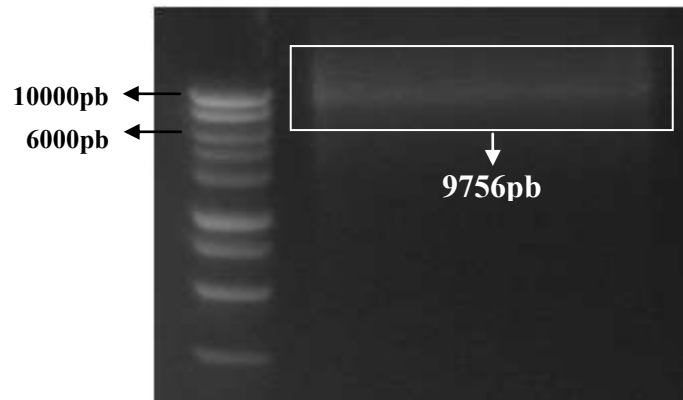
Para probar si el exón 11 efectivamente influye en la localización subcelular de TRPM1 se creó un constructo que careciera de esta secuencia y que denominamos TRPM $\Delta$ ex11. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1% (Figura14). Con motivo de corroborar que el DNA obtenido correspondía al constructo, se realizó un perfil de restricción con dos enzimas de restricción, FspI y AseI (Figura 15).



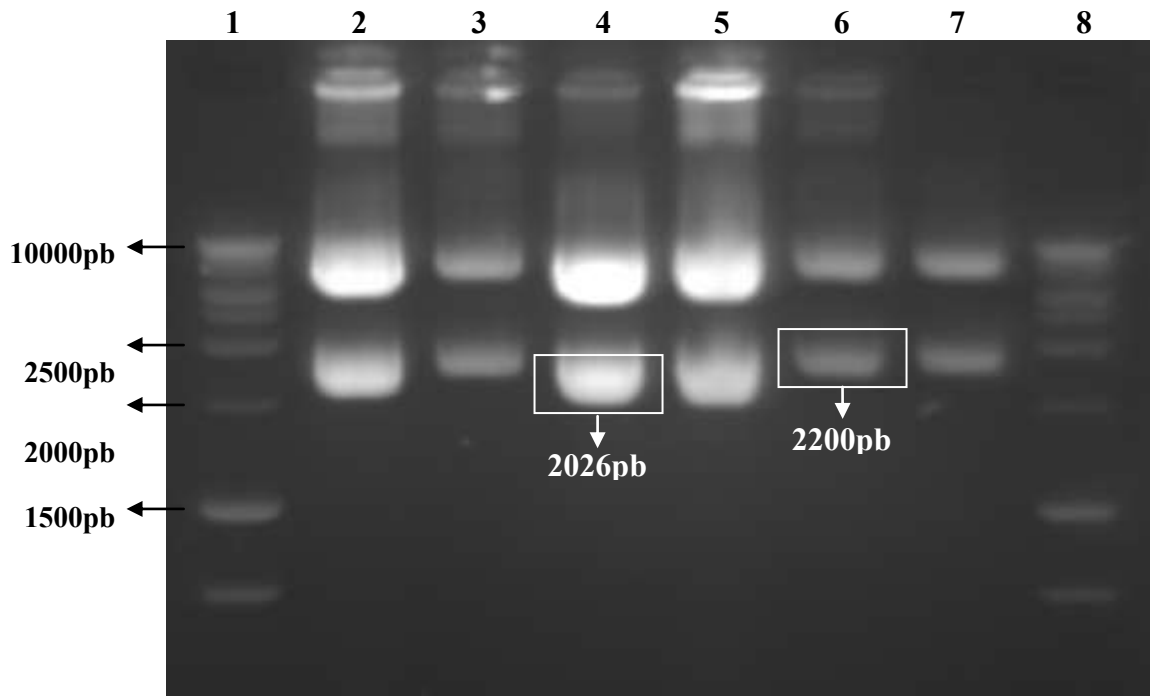
**Figura 12: Análisis de predicción de localización nucleolar.** Dos señales de localización fueron predichas entre los residuos 506 y 531, y los residuos 1053 y 1072. Para esto se utilizó el programa de predicción NoD (Nucleolar localization sequence **D**etector).



**Figura 13: Microscopía de Epifluorescencia revela localización perinuclear de TRPM1-GFP.** Células HEK293T fueron transfectadas con TRPM1-GFP de largo completo y marcadas con anticuerpos anti-LaminB1 (A) y anticuerpos anti-GFP (B). La marca de TRPM1-GFP (verde) se sobrepone con la marca de la lamina nuclear (rojo). (D) muestra un mapa con las intensidades de colocalización, donde azul indica que no existe colocalización.



**Figura 14. Amplificación por PCR del canal TRPM1 delecionando el exón 11.** Banda de 9756pb producto de la estrategia de PCR para flanquear el exón 11 del canal TRPM1, de esta forma el canal completo, a excepción del exón 11, más el vector, pGFP-C1 fueron amplificados.



**Figura 15: Perfil de restricción de TRPM1 y TRPM1 $\Delta$ ex11.** Ensayo de restricción con FspI y AseI del *DNA* de TRPM1 y TRPM1 $\Delta$ ex11. La banda liberada por la doble digestión desde el canal de largo completo mide 2200pb, mientras que la banda de 2026pb, presente en los carriles 2,4 y 5 confirma la deleción del segmento correspondiente al exón11 del canal. Carril 1 y 8: Estándar 1kb Ladder ; Carril 2: Colonia N°1 – TRPM1 $\Delta$ ex11 – doble digestión con FspI y AseI; Carril 3: Colonia N°2 – TRPM1 $\Delta$ ex11 – doble digestión con FspI y AseI; Carril 4: Colonia N°3 – TRPM1 $\Delta$ ex11 – doble digestión con FspI y AseI; Carril 5: Colonia N°4 – TRPM1 $\Delta$ ex11 – doble digestión con FspI y AseI; Carril 6 y 7: TRPM1 WT – doble digestión con FspI y AseI.

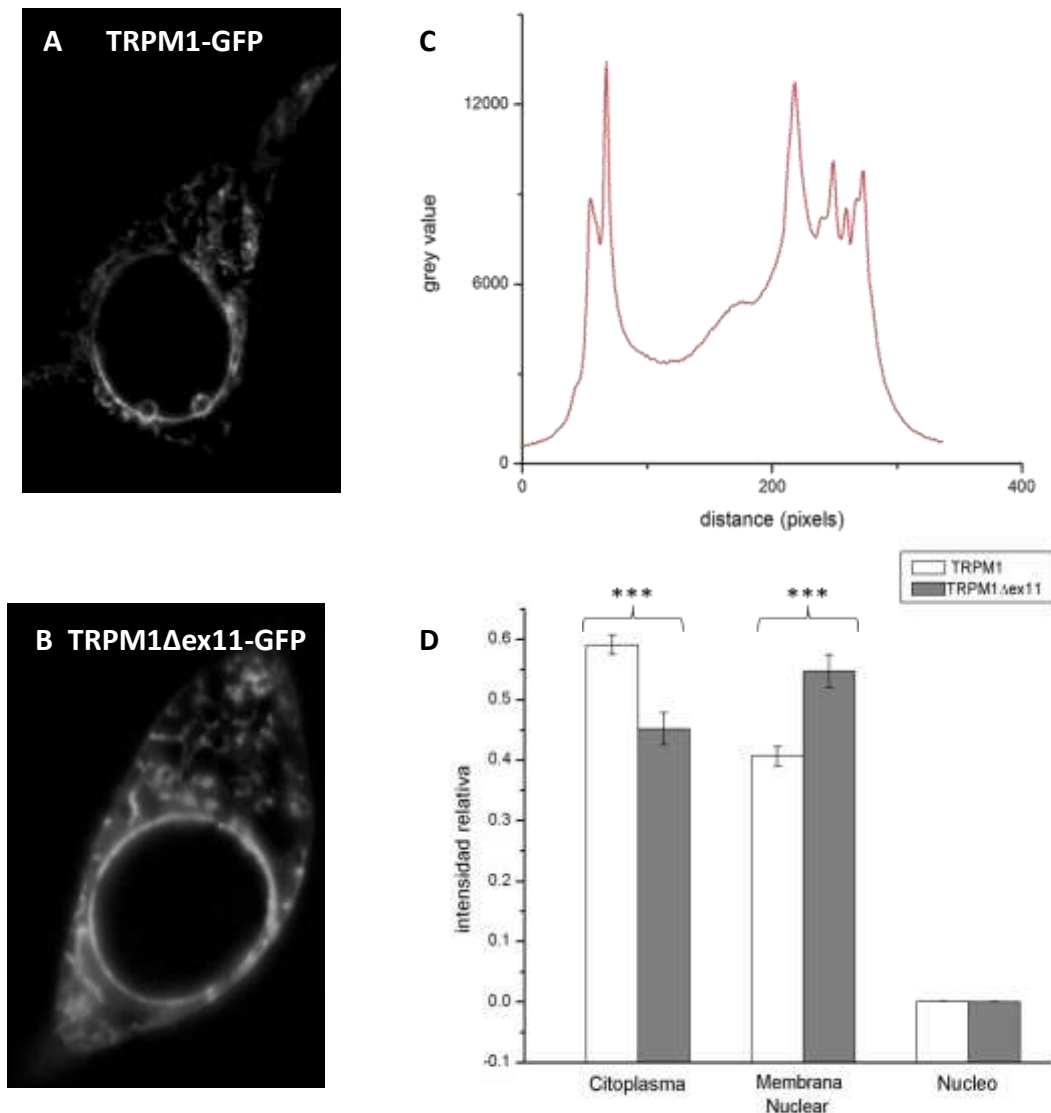
#### 4.4 Localización Subcelular de TRPM1

La presencia de TRPM1 tanto en la membrana nuclear como en el citoplasma plantea la posibilidad que el canal se transloque aleatoriamente entre ambos compartimientos. Para probar esto se estudió en células HEK293T transfectadas el comportamiento de TRPM1 y TRPM $\Delta$ ex11 por microscopía de fluorescencia.

Observaciones en campo TIRF coinciden con lo previamente señalado por Oancea *et al*, 2009, el canal TRPM1 es predominantemente intracelular y al estudiar su comportamiento por microscopía de reflexión total interna (TIRF) el canal se localiza en estructuras vesiculares altamente dinámicas. Al observar la célula por microscopía de epifluorescencia es posible visualizar además partículas altamente dinámicas en la periferia nuclear (Fig.16A). En análisis realizados al constructo TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP se observó un comportamiento similar (Fig. 16B), sin embargo, al hacer estudios comparativos de lo observado en ambos canales, es posible estimar que la cantidad de TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP en la periferia nuclear se ve aumentada en relación al canal nativo, mientras que la porción citosólica se ve discretamente disminuida (Tabla II; Fig. 16C).

#### 4.5 Análisis de Western Blot

Para corroborar que TRPM1 efectivamente se está expresando en la membrana nuclear se realizó un ensayo de Western blot en extractos de membrana nuclear de células HEK293T transfectadas con el canal. Los análisis de Western blot efectivamente mostraron la expresión de TRPM1 en esta región a diferencia de lo observado para el control, células HEK293T sin transfectar (Fig. 17).



**Figura 16: células HEK-293T sobre expresando TRPM1-GFP (A) y TRPM1 $\Delta$ ex11-GFP (B).**

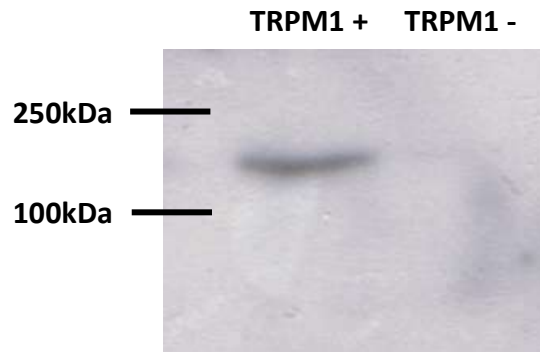
La cantidad del constructo en la periferia nuclear se encuentra aumentada en relación a la cantidad de TRPM1-GFP de largo completo, mientras que la cantidad en la región citosólica esta disminuida (D). No se observaron cambios significativos entre el núcleo o la membrana plasmática (datos no mostrados). Bars=stdv. (C) Muestra las diferentes intensidades a lo largo de un perfil de puntos.



**Tabla II: Valores Promedios del valor de pixel:** Se muestran el promedio del perfil de los puntos obtenido en el tratamiento de imágenes, para cada región de la célula para cada uno de los experimentos llevados a cabo. Al pie se muestran los valores estadísticos de los datos.

TRPM1			TRPM1Δex11		
CITOPLASMA	MEMBRANA NUCLEAR	NUCLEO	CITOPLASMA	MEMBRANA NUCLEAR	NUCLEO
<b>0.6032</b>	0.3958	1.03E-03	0.446	0.5502	3.79E-03
<b>0.561</b>	0.4379	1.13E-03	0.2813	0.7187	0.00
<b>0.6085</b>	0.3908	7.40E-04	0.4936	0.5064	2.47E-05
<b>0.4691</b>	0.5296	1.29E-03	0.5071	0.4905	2.38E-03
<b>0.6002</b>	0.3929	6.91E-03	0.4086	0.5911	2.77E-04
<b>0.4765</b>	0.5196	3.85E-03	0.4848	0.5152	1.84E-05
<b>0.5873</b>	0.4123	3.77E-04	0.4604	0.5394	2.20E-04
<b>0.6328</b>	0.3663	9.49E-04	0.3949	0.6051	0.00
<b>0.5782</b>	0.4205	1.30E-03	0.2508	0.7491	5.79E-05
<b>0.6946</b>	0.3047	7.89E-04	0.5145	0.4854	1.15E-04
<b>0.5742</b>	0.424	1.81E-03	0.5123	0.4871	6.10E-04
<b>0.5583</b>	0.441	6.56E-04	0.5682	0.4313	4.62E-04
<b>0.5911</b>	0.406	3.00E-03	0.5503	0.4478	1.90E-03
<b>0.6801</b>	0.3198	6.89E-05			
<b>0.4859</b>	0.5141	0.00			
<b>0.6274</b>	0.3706	1.96E-03			
<b>0.7015</b>	0.2966	1.85E-03			
<b>0.6126</b>	0.3863	1.05E-03			

Región	Canal	Mediana	Desviación Estándar	Sumatoria	Mínimo	Media	Máximo
CITOPLASMA	TRPM1	0.59125	0.06704	10.6425	0.4691	0.59565	0.7015
	TRPM1Δex11	0.45175	0.09636	5.8728	0.2508	0.4848	0.5682
MEMBRANA NUCLEAR	TRPM1	0.40716	0.06688	7.3288	0.2966	0.4009	0.5296
	TRPM1Δex11	0.54748	0.09668	7.1173	0.4313	0.5152	0.7491
NUCLEO	TRPM1	0.0016	0.00164	0.02877	0	0.00109	0.00691
	TRPM1Δex11	7.58E-04	0.00119	0.00985	0	2.20E-04	0.00379



**Figura 17: Análisis de la expresión nuclear de TRPM1 en células HEK293T.** Western blot realizado desde extractos de membranas nucleares de células HEK293T transfectadas con TRPM1-GFP y reveladas utilizando un anticuerpo anti-GFP.

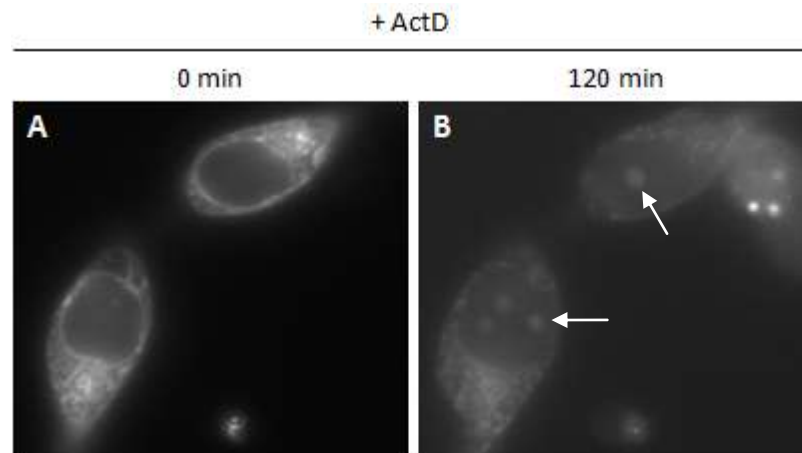
#### **4.6. Estudio de la NLS tras el tratamiento con Actinomicina D.**

El análisis de la secuencia aminoacídica de TRPM1 reveló la presencia de dos secuencias candidatas a ser NLS. Para probar si efectivamente estas señales se encuentran activas y son las responsables del importe de TRPM1 hacia el núcleo se probó un tratamiento con actinomicina D (ActD), un inhibidor de la transcripción que inhibe la RNA polimerasa II. Ha sido descrito que actinomicina D es capaz de impedir la asociación nucleolar e importación nuclear de Rev, una proteína lentiviral con motivos NLS y NES bien caracterizados, a través de un mecanismo aún por definir (Rodríguez y Henderson, 2000).

Tras el tratamiento con ActD, TRPM1 se relocaliza en forma de un patrón discreto dentro de la región nuclear (Fig. 18b, n=2).

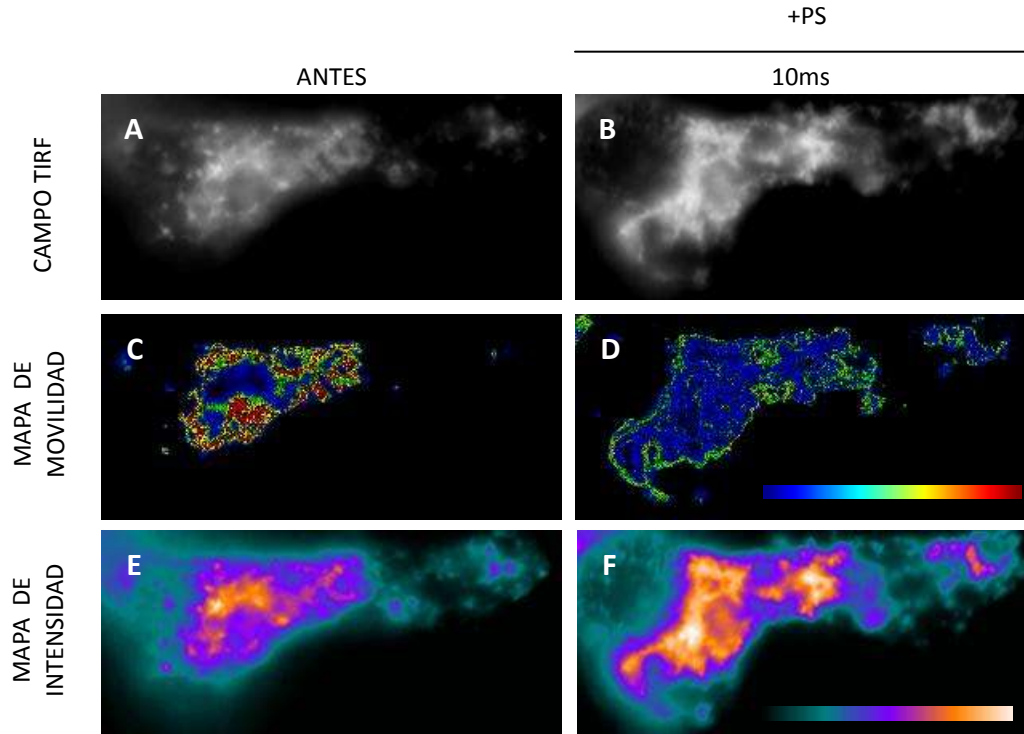
#### **4.7. Análisis de movilidad con Pregnenolona Sulfato.**

Se ha demostrado recientemente que el neuroesteroide pregnenolona sulfato (PS), es capaz de provocar un incremento reversible en las corrientes de entrada y salida en células HEK293T transfectadas con TRPM1. La densidad de esta corriente sin embargo es muy pequeña y solo levemente mayor cuando se incrementa la concentración de PS. Al probar PS en el constructo TRPM1 $\Delta$ ex11 la amplitud de corriente se vió incrementada 7 veces en relación a TRPM1 nativo (Lambert *et al*, 2011). No se ha descrito cual es el mecanismo que lleva a TRPM1 a aumentar sus corrientes en presencia de PS, sin embargo, el curso temporal del aumento en la respuesta sugiero que estaría asociado a un aumento en la densidad de canales en la membrana plásatica. Por esta razón realizamos estudios de las dinámicas del canal tras la aplicación de 100 $\mu$ M de PS bajo iluminación TIRF.



**Figura 18: Actinomicina D retarda el importe nuclear de TRPM1-GFP.** Células HEK293T transfectadas con el canal TRPM1-GFP de largo completo, fueron tratadas por 2 horas con ActD (100ug/mL). ActD induce un patrón característico de distribución intranuclear del canal después del tratamiento.

En la figura 19 se observan los cambios tras la aplicación de PS, en el canal nativo, TRPM1-GFP, se puede apreciar un aumento de la fluorescencia al poco tiempo (10ms) de agregar el neuroesteroide (Fig. 19b) en relación a la célula antes del tratamiento (Fig19a). Al confeccionar mapas de movilidad, para estudiar la dinámica del canal, se observó que antes del tratamiento con PS el canal posee una alta movilidad (Fig. 19c) y que ésta se ve reducida tras adicionar 100 $\mu$ M de PS (Fig. 19d). (n=3). Los mapas de intensidad muestran que tras el tratamiento con PS (Fig.18f) la intensidad de fluorescencia aumenta en comparación a la célula sin tratamiento (fig. 19e).



**Figura 19: Pregnenolona Sulfato estabiliza el canal en la membrana.** Células HEK293T transfectadas con el canal TRPM1-GFP sometidas a tratamiento con PS. Inmediatamente, tras la adición de PS, el canal disminuye su movilidad en la membrana citoplasmática, aumenta color azul (D) la vez que su intensidad en la membrana se ve aumentada, indicado por un aumento de color naranja hacia blanco (E y F)

## 5. DISCUSIÓN

Existe evidencia que muestra que muchas proteínas son multifuncionales, a veces los diferentes roles que pueden desempeñar se encuentran conectados, como en el caso de Nucleolina, que posee actividad helicasa para DNA y RNA, además funciona como proteína de unión a RNA y actúa como factor de transcripción específico en células B (Tujeta and Tujeta, 1998), mientras que otras veces los papeles parecen ser independientes como el caso de CAM-quinasa que posee funciones en citoplasma y núcleo (Srinivasan *et al*, 1994). La Hexoquinasa 2 de *Saccharomyces cerevisiae* fue una de las primeras enzimas metabólicas descrita como una proteína multifuncional. Funciona como enzima glicolítica en el citoplasma y como un regulador en la transcripción de genes en el núcleo (Randez-Gil *et al*, 1998).

Los canales TRP también presentan más de una función. El canal TRPV2 por ejemplo, posee dos distintos roles según la etapa del desarrollo en el humano; en embriones regula el crecimiento axonal de neuronas mientras que en la etapa adulta sus funciones están vinculadas a la termosensación y nocicepción (Shibasaki *et al*, 2010). TRPM7 por otro lado además de funcionar como canal iónico, posee un dominio catalítico, una quinasa funcional que puede ser disociada sin alterar su actividad fosfotransferasa, inclusive aumentando la actividad de TRPM7 como canal iónico (Desai *et al*, 2012).

La utilización de proteínas para diferentes procesos intracelulares o extracelulares y la capacidad para distribuir la cantidad correcta a la ubicación apropiada, en el momento correcto, parece ser una propiedad intrínseca a cada proteína (Tujeta and Tujeta, 1998; Srinivasan *et al*, 1994).

Mientras que algunos canales TRP residen en diferentes vesículas esperando señales para ser reclutados a la membrana plasmática, otros cumplen su función como canales iónicos intracelulares, siendo por lo tanto excluidos de la superficie celular. Los mecanismos que conllevan a que ciertos canales TRP sean transportados, pueden ser dilucidados tomando en cuenta como ejemplo otros receptores, transportadores y canales iónicos, los cuales exhiben cambios dinámicos en su localización subcelular. Numerosos estudios han demostrado la presencia de canales TRP localizados exclusivamente en membranas intracelulares o compartimientos vesiculares, tal es el caso de miembros de las subfamilias mucolipina (TRPML), melastatina (TRPM) y vaniloide (TRPV). Interesantemente, algo similar se ha descrito para el único canal TRP de levadura (TRPY), el cual se encuentra localizado en vacuolas, un equivalente ancestral de los lisosomas mamíferos, lo que sugiere un rol ancestral para los canales TRP en cuanto a la regulación de intercambio iónico vesicular (Toro *et al*, 2011).

Incluso en compartimientos subcelulares, tales como el núcleo, una sola proteína puede participar en variados procesos, y por lo tanto debe ser capaz de sublocalizarse al lugar correcto en el momento adecuado (He *et al*, 2000).

El transporte nuclear, un proceso esencial de las células eucarióticas, juega un rol crítico en la diferenciación y en el desarrollo, así como también en enfermedades virales y oncogénesis, haciendo que las moléculas involucradas en este proceso sean muy interesantes, no solo para su investigación, sino también para el tratamiento de diversas enfermedades (Luo *et al*, 2011).

Dentro de este contexto, se quiso estudiar la localización sub celular del canal de iones TRPM1. Hay pruebas microscópicas (Oancea *et al*, 2009) y electrofisiologías (Oancea *et al*, 2009; Lambert *et al*, 2011) que TRPM1 es una canal que bajo ciertas circunstancias y contexto



celular, alcanza la membrana plasmática y es capaz de generar una corriente funcional. Sin embargo, observaciones *in vivo* de TRPM1 acoplado a GFP en células HEK293T revelan una localización perinuclear de la proteína en el 100% de las células observadas (n=53) en forma de una delgada línea compatible con la envoltura nuclear. Para confirmar esta observación se realizaron experimentos de colocalización de TRPM1-GFP con lámina B1. Se pudo observar que existe una colocalización de las estructuras que marcan la envoltura nuclear con el canal de iones en estudio. Para corroborar la presencia del canal en la envoltura nuclear se realizaron extractos nucleares de las células transfectadas y se realizaron análisis por Western blot; éstos confirman la presencia de la proteína en esta región.

Adicionalmente, se determinó mediante análisis *in silico*, que el canal TRPM1 posee un exón que no alinea con ningún otro miembro de la familia de canales TRPM y que esta secuencia muestra una alta probabilidad de poseer señales NES, NLS y NoLS. Se confeccionó un constructo delecionando este exón para probar si este exón influenciaba efectivamente en la localización perinuclear de TRPM1. Era de esperarse que en presencia de sólo una secuencia NLS, la mutante con la deleción, TRPM1 $\Delta$ ex11, se localizara solo en la envoltura nuclear, sin embargo aún existe presencia del canal en la región citoplasmática, a pesar de ello el porcentaje se redujo en un 23,5% en el citoplasma, mientras que aumentó 34,5% su expresión en la membrana nuclear. Sugiriendo, que la señal NES se encuentra activa y aunque con una baja afinidad, determina la ubicación perinuclear del canal.

Los análisis de predicción muestran además dos posibles secuencias a actuar como NLSs. Para probar si estas se encuentran activas, se utilizó ActD, un inhibidor de la transcripción. Tras el tratamiento el canal se relocalizó en forma de un patrón discreto característico, localizado en el

núcleo. Esto ha sido observado en prelinas tales como Rev, proteína viral del VIH (Wolff *et al.*, 1997), subunidad B56 $\alpha$  de la fosfatasa 2A (Flegg *et al.*, 2009), el factor de transcripción c-myc (He *et al.*, 2000), LET-756, un factor de crecimiento de fibroblasto (He *et al.*, 2000) y la proteína BRCA1 (Rodríguez and Henderson, 2000). La formación de diferentes compartimientos subnucleares es a menudo dependiente del estado transcripcional de la célula. La inhibición de la transcripción tras el tratamiento con drogas, tales como ActD, altera las propiedades del tráfico en proteínas en estado estacionario entre el nucléolo y el nucleoplasma modificando la localización de muchos factores nucleares (Popovici *et al.*, 2006). Podría ser entonces que la secuencia predicha como NLS se encuentre activa permitiendo que el canal localizarse en la envoltura nuclear.

TRPM1 presenta múltiples posibles sitios de corte proteolítico, esto no sería inusual, el canal TRPM7 es cortado por caspasas en el residuo D1510, disociando su dominio quinasa del poro sin alterar la actividad fosfotransferasa de la quinasa liberada y aumentando la actividad como canal de TRPM7 (Desai *et al.*, 2012). Es posible que bajo la presencia de ciertos estímulos, el dominio N-terminal del canal sea escindido permitiéndole ingresar al núcleo para cumplir algún tipo de función. Eventos de fosforilación podrían estar controlando la localización subnuclear de esta versión corta del canal. Podría ser incluso que el motivo predicho como NoLS esté dirigiendo a la proteína al nucléolo. Un ejemplo muy conocido de vía de señalización regulada por el secuestro nucleolar es la del supresor de tumores p53, y el de su regulador, Mdm2, (Lohrum *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 1999). Quizás pueda existir una relación entre esta actividad y su potencial rol como supresor de tumores en melanomas.

La distribución perinuclear que hemos observado no ha sido reportada anteriormente para algún canal TRP y podría implicar nuevas funciones para el canal. Nuestras observaciones sugieren que TRPM1 poseería un sistema de tráfico intranuclear complejo, lo que podría a su vez sugerir un rol transcripcional para la proteína, esta situación apoyaría hipótesis presentes en la literatura. (Chen *et al*, 2011). Es importante realizar estos experimentos en condiciones nativas para descartar que la distribución observada sea un artefacto de la sobreexpresión en el sistema heterólogo. Estudiar la distribución en un sistema nativo además nos permitiría dar un contexto funcional a la ubicación de TRPM1 en la periferia nuclear.

No sería extraño encontrar un canal en la envoltura nuclear cuya función esté relacionada a cáncer. Recientemente se ha demostrado que el canal  $K_v10.1$  se encuentra presente en la INM (Chen *et al*, 2011).  $K_v10.1$  es un canal de potasio activado por voltaje que se expresa de modo casi exclusivo en el sistema nervioso central de mamíferos y se ha demostrado que este canal juega un rol importante en la transformación oncogénica maligna de sarcomas (Mello de Queiroz *et al*, 2006) y leucemias (Agarwal *et al*, 2010). Además la proliferación de las células cancerígenas dependería de la expresión de este canal, aunque su función exacta aún permanece en misterio (Chen *et al*, 2011).

Es importante destacar que para realizar los experimentos electrofisiológicos que localizan a  $K_v10.1$  en la membrana nuclear es esencial usar  $Zn^{2+}$  en la solución de registro, el cual se utiliza para bloquear las corrientes nucleares endógenas. TRPM1 es un canal que se bloquea por  $Zn^{2+}$  (Lambert *et al*, 2009), lo que constituye una evidencia indirecta que apoyaría nuestros resultados.

La función de TRPM1 en esta locación solo puede ser especulativa; pero perfectamente podría formar parte de las propiedades oncogénicas que se le atribuyen al canal (Duncan *et al*,

1998; Hammock *et al*, 2006; Duncan *et al*, 2001; Erikson *et al*, 2009). Proteínas de la envoltura nuclear juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, sea por secuestro de factores de transcripción, represores u otros reguladores, o por la acción directa con la cromatina (Hessen and Fornerod, 2007).

La determinación de la localización de TRPM1 es un factor importante a la hora de caracterizar su función, comprender las dinámicas del canal nos podrían ayudar a estudiar ésto, sea por electrofisiología, imagenología de calcio, microscopía o bioquímica. Se ha descrito que PS provoca un aumento reversible en las corrientes de entrada y salida del canal en células transfectadas con TRPM1 (Lambert *et al*, 2011). En células transfectadas con TRPM1-GFP y tras la aplicación del neuroesteroide se pudo observar que el canal disminuye su movilidad inmediatamente después del estímulo en comparación a la célula antes del tratamiento, esto nos estaría dando cuenta que el canal se estabiliza en la membrana lo que provocaría un aumento en las amplitudes de corrientes descritas con anterioridad. El aumento en la intensidad de fluorescencia nos estaría dando cuenta del tiempo de permanencia del canal en la membrana, indicando que éste es mayor tras el tratamiento. Podría ser también que PS esté provocando un mayor reclutamiento de la proteína a la membrana. Esto debe ser estudiado en mayor detalle para dilucidar si efectivamente está aumentando el número de partículas. En resumen, nuestros experimentos con PS, no solo permiten explicar los resultados obtenidos por Lambert y cols (Lambert et el 2011) en términos de dinámica y translocación del canal, sino que además permiten contar con un modelo de translocación que hace sentido con los datos experimentales publicados.

Futuras proyecciones de este trabajo sería realizar estudios electrofisiológicos en extractos de membrana nuclear, mediante la técnica de bicapas planas (Chen *et al*, 2011) lo que nos permitiría obtener registros de la corriente del canal, permitiendo determinar si el canal se encuentra funcionalmente activo en la envoltura nuclear. En contraste con las ideas tradicionales, la envoltura nuclear es vista como una barrera permeable a los iones. Generalmente se cree que el NPC es responsable de la mayor parte de la permeabilidad de la envoltura nuclear, pero no existe una correlación entre la densidad del NPC y la resistividad de la envoltura nuclear (Chen *et al*, 2011). La envoltura nuclear contiene canales iónicos (Mazzanti *et al*, 1990) y sitios específicos para la unión de insulina, tiroxina y hormonas esteroideas, así como también un sistema de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP (Tabares *et al*, 1991). Si en canal se encontrara activo podría ser que se encuentre involucrado de algún modo en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  nucleoplasmática.

La expresión de TRPM1 y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son significativamente menores en melanocitos rápidamente proliferantes comparados con aquellos de crecimiento lento, es decir, melanocitos diferenciados. Estudios de *knockdown* de TRPM1 mediante técnicas de shRNA resulta en una disminución de las concentraciones intracelulares y de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Altos niveles de expresión de mRNA de TRPM1 y bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se correlacionan con una reducida proliferación y un fenotipo mucho más diferenciado. Además, en condiciones de cultivo que disminuyen la expresión de TRPM1 existe una marcada proliferación de melanocitos. (Devi *et al*, 2009). Estudios de *knockdown* utilizando melanocitos de un solo donador en diferentes condiciones de cultivo sugieren que la actividad de TRPM1 está asociada tanto con el crecimiento como con la diferenciación de los melanocitos. Esto es consistente con la

desregulación o la pérdida de la expresión de TRPM1 en células de melanoma de crecimiento rápido y menos diferenciadas.

La función de muchas proteínas y reguladores transcripcionales están regulados por señalización de calcio en el núcleo. El rol del calcio nuclear como un activador de la expresión génica fue revelado por el análisis de regiones promotoras de los genes *c-fos* (Hardingham *et al*, 1997). Análisis en estas regiones revelaron que CRE, quien también está presente en las regiones promotoras de muchos genes, funciona como un elemento cuya respuesta depende de calcio. Varios miembros de la familia de factores de transcripción CREB, tales como CREB, CREm y ATF1 han demostrado unirse a CRE también (Benstson and Bading, 2012). Podría ser que TRPM1 se encuentra en mecanismos involucrados que ayudan a mantener o promover la función de diferenciación, por ejemplo la síntesis del pigmento de melanina.

Se han detectado transcritos de TRPM1 en cerebro (Fonfria *et al*, 2006), la locación exacta y el rol que juega el canal aquí es un misterio. Pero basados en la expresión de TRPM1 en melanocitos y su rol en pigmentación, sería interesante determinar si las neuronas dopaminérgicas que contienen neuro-melanina en la sustancia *nigra* expresan TRPM1. Existe una correlación entre el contenido de neuro-melanina y la vulnerabilidad a morir de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (Hirsch *et al*, 1988). Estudios más acabados de la ubicación del canal y su función podrían ser de gran utilidad en el avance de las investigaciones de esta enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal J., Griesinger F., Stuhmer W. and Pardo L. (2010). The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer.*, 9, 18.
- Akk G. and Steinbach J.H. (2000). Activation and block of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors by pentobarbitone: a single-channel study. *British J Pharmacol.*, 130. 249-258.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2008). *Molecular Biology of the cell.* 5a Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 712.
- Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic.*, 2, 764–774.
- Bellone R., Brooks S., Sandmeyer L., Murphy B., Forsyth G., Archer S., Bailey E. and Grahn B. (2008) Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics.*, 179:1861–1870.
- Bengtson C. P and Bading H. (2012). Nuclear Calcium Signaling. *Analysis* , Chapter 17, 377-405.
- Bezzerrides V., Ramsey S., Kotecha S., Greka A and Clapham D. (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.*, 6,709–720.
- Bimal DN, Krapivinsky G, Navarro B., Krapivinsky L., Carter B.C., Febvay S., Delling M, Penumaka A., Ramsey I.S., Manasian Y. and Clapham D.E. (2012). Article Cleavage of

- TRPM7 Releases the Kinase Domain from the Ion Channel and Regulates Its Participation in Fas-Induced Apoptosis. *Dev Cell.*, 22, 1149-1162.
- Brauchi S., Krapivinsky G., Krapivinsky L., and Clapham D. (2008). TRPM7 facilitates cholinergic vesicle fusion with the plasma membrane. *PNAS.*, 105, 8304-8308.
- Carlson J.A., Ross J.S., Slominski A., Linette G., Mysliborski J., Hill J. and Mihm M.Jr. (2005). Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol.*, 52, 743–775.
- Chen Y., Sánchez A., Rubio M.E., Kohl T., Pardo L. and Stühmer W. (2011). Functional K<sub>v</sub>10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PloS one.*, 5, 19257.
- Clapham D. (2003) . TRP channels as cellular sensors. *Nature.*, 426, 517 - 524.
- Deeds J., Cronin F. and Duncan L.M. (2000). Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors. *Hum Pathol.*, 31, 1346–1356.
- Devi S., Kedlaya R., Maddodi N., Bhat K., Weber C., Valdivia H. and Setaluri V. (2009). Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 297, 679 – 687.
- Dhingra A, Jiang M., Wang T.L., Lyubarsky A., Savchenko A., Bar-Yehuda T., Sterling P., Birnbaumer L. and Vardi N. (2002) Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of Gao. *J Neurosci.*, 22, 4878–4884.
- Dhingra A, Lyubarsky A., Jiang M., Pugh E.N. Jr., Birnbaumer L., Sterling P. and Vardi N. (2000) The light response of ON bipolar neurons requires Gao. *J Neurosci.*, 20, 9053–9058.



- Dignam J.D., Lebovitz R.M and Roeder R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, 11, 1475-1489.
- Dryja T.P., McGee T.L., Berson E.L., Fishman G.A., Sandberg M.A., Alexander K.R., Derlacki D.J. and Rajagopalan A.S. (2005) Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102, 4884–4889.
- Duncan L., Deeds J. and Hunter J. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.*, 58, 1515–1520.
- Duncan L.M., Deeds J., Cronin F.E., Donovan M., Sober A.J., Kauffman M. and McCarthy J.J. (2001). Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol.*, 19, 568–576.
- Duncan L.M., Deeds J., Hunter J., Shao J., Holmgren L.M., Woolf E.A., Tepper R.I. and Shyjan A.W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.*, 58, 1515–1520.
- Erickson L.A., Letts G.A., Shah S.M., Shackelton J.B. and Duncan L.M. (2009). TRPM1 (Melastatin- 1/MLSN1) mRNA expression in Spitz nevi and nodular melanomas. *Mod Pathol.*, 22, 969–976.
- Fang D. and Setaluri V. (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanomametastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 279, 53–61

- Flegg Cameron, Sharma M., Medina-Palazon C., Jamieson C., Galea M., Brocardo M., Mills K., and Henderson B. (2010). Nuclear Export and Centrosome Targeting of the Protein Phosphatase 2A Subunit B56 $\alpha$ . *J Biol Chem.*, 285, 18144 -18154.
- Fonfria E., Murdock P., Cusdin F., Benham C., Kelsell R. and McNulty S. (2006) Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.*, 26,159–178.
- Frangioni J. and Neel B. (1993). Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal. *J Cell Sci.*, 105, 481-488.
- Hammock L., Cohen C., Carlson G., Murray D., Ross J.S., Sheehan C., Nazir T.M. and Carlson J.A. (2006). Chromogenic in situ hybridization analysis of melastatin mRNA expression in melanomas from American Joint Committee on Cancer stage I and II patients with recurrent melanoma. *J Cutan Pathol.*, 33, 599–607.
- He L., Weber A., and Levens D. (2000) Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4558-4565.
- Heessen S. and Fornerod M. (2007). The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.*, 8, 914 - 919.
- Hirsch E., Graybiel A.M. and Agid Y.A. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature.*, 334, 345–348
- Hunter J.J., Shao J., Smutko J.S., Dussault B.J., Nagle D.L., Woolf E.A., Holmgren L.M., Moore K.J. and Shyjan A.W. (1998) Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics.*, 54, 116–123

- Jiang L.H. (2007). Subunit interaction in channel assembly and functional regulation of transient receptor potential melastatin (TRPM) channels. *Biochem Soc T.*,35, 86-88.
- Kau T. and Silver P. (2003). Nuclear transport as a target for cell growth. *Drug Discov Today.*, 8, 78-85.
- Kim D.S., Ross S.E., Trimarchi J.M., Aach J., Greenberg M.E. and Cepko C.L. (2008) Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol.*, 507, 1795–1810.
- Koike C., Obara T., Uriu Y., Numata T., Sanuki R., Miyata K., Koyasu T., Ueno S., Funabiki K., Tani A., Ueda H., Kondo M., Mori Y., Tachibana M. and Furukawa T (2010) TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107, 332–337.
- Koike C., Sanuki R. and Miyata K.(2007). The functional analysis of TRPM1 in retinal bipolar cells. *Neurosci Res.*, 58, S41.
- Kunert-Keil C., Bisping F., Kruger J. and Brinkmeier H. (2006) Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics.*, 7, 159-173.
- La Cour T, Kierner L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K and Brunak S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des.*, 17, 527-36.
- Lambert S, Drews A, Rizun O, Wagner T, Liz A, Mannebach S, Plant S, Portz M, Meissner M., Philipp St. and Oberwinkler J. (2011). *JBC.*, 286, 12221-12233.
- Lin J. Y. and Fisher D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.*, 445, 843 - 850.

- Lohrum M. A., Ashcroft M., Kubbutat M. H. and Vousden K. H. (2000). Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat. Cell Biol.*, 2, 179-181.
- Luo M., Zhang Q.C. and Lu Z.G. (2012). An efficient high-throughput screening assay against nuclear transport. *Yi Chuan.*, 34, 927 - 934.
- Majewska M.D., Demirgoren S., Spivak C.E. and London E.D. (1990). The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA<sub>A</sub>. *Neurosci Lett.*, 90, 90, 143–146.
- Mello de Queiroz F., Suarez-Kurtz G., Stuhmer W. and Pardo L.A. (2006). Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer.*, 5, 42.
- Miller A.J., Du J., Rowan S., Hershey C.L., Widlund H.R. and Fisher D.E. (2004). Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res.*, 64, 509–516.
- Morgans C.W., Zhang J., Jeffrey B.G., Nelson S.M., Burke N.S., Duvoisin R.M. and Brown R.L. (2009). TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 19174–19178.
- Nawy S. (1999). The metabotropic receptor mGluR6 may signal through G(o), but not phosphodiesterase, in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 19:2938–2944
- Nguyen A.N., Pogoutse A., Provart N. and Moses A.M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics.*, 29 ,10(1):202.
- Oancea E. and Wicks N. (2011) TRPM1: New Trends for an Old TRP. *Adv Exp Med Biol.*,704, 135-145.

- Oancea E., Vriens J., Brauchi S., Jun J., Splawski I. and Clapham D. (2009). TRPM1 Forms Ion Channels Associated with Melanin Content in Melanocytes. *Science Signaling.*, 2, ra21.
- Popovici C., Fallet M., Marguet D., Birnbaum D., and Roubin R. (2006). Intracellular trafficking of LET-756, a fibroblast growth factor of *C.elegans*, is controlled by a balance of export and nuclear signals. *Mutagenesis* 2, 1-12.
- Randez-Gil F., Herrero P., Sanz P., Prieto J. A., and Moreno F. (1998). Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 425, 475–478
- Rodriguez J., and Henderson B. (2000). Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. *Biochemistry.*, 49, 38589-38596.
- Rout M.P., Aitchison J.D., Magnasco M.O. and Chait B.T. (2003) Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *TRENDS Cell Biol.*, 13, 622-628
- Rout M.P., Aitchison J.D., Magnasco M.O. and Chait B.T. (2003) Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.*, 13, 622-628.
- Schiller P.H., Sandell J.H. and Maunsell J.H. (1986) .Functions of the ON and OFF channels of the visual system. *Nature.*, 322, 824–825.
- Schneckenburger H. (2005).Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 13–18.
- Scott M.S., Boisvert F.M., McDowall M.D., Lamond A.I. and Barton GJ (2010) Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.*, 38, 7388-7399
- Scott M.S., Troshin P. and Barton G. (2011) NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics.*, 12, 317.

- Shen Y., Ann M., Rampino F., Carroll R.C. and Nawy S. (2012). G-protein mediated inhibition of the Trp channel TRPM1 requires the G $\beta$  $\gamma$  dimer. *PNAS.*, 22, 8752–8757.
- Shen Y., Heimel J.A., Kamermans M., Peachey N.S., Gregg R.G., Nawy S. (2009). A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci.*, 29, 6088–6093.
- Shibasaki K., Murayama N., Ono K., Ishizaki Y. and Tominaga M. (2010). TRPV2 Enhances Axon Outgrowth through Its Activation by Membrane Stretch in Developing Sensory and Motor Neurons. *J Neurosci.*, 30, 4601-4612.
- Slominski A. (2008). Cooling skin cancer: menthol inhibits melanoma growth. Focus on “TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 295, 293–295.
- Slominski A. and Wortsman J. (2003). Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Rev.*, 21, 457–487.
- Tabares L., Mazzanti M. and Clapham D. Chloride Channels in the Nuclear Membrane. (1991). *J Membrane Biol.* 123, 49 – 54.
- Toro C.A., Arias L.A., and Brauchi S. (2011). Sub-Cellular Distribution and Translocation of TRP Channels. *Current:* 12-23.
- Veliz L., Toro C., Vivar J., Arias L., Villegas J., Castro M., and Brauchi S. (2010). Near-Membrane Dynamics and Capture of TRPM8 Channels within Transient Confinement Domains. *Plos One.*, 10, e13290.
- Voets T. and Nilius B. (2003). TRPs Make Sense. *Cell.*, 8, 1-8.

- Wagner T, FJ, Loch S., Lambert I., Mannebach S., Mathar I. and Düfer M. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol.*, 10, 1421 – 1430.
- Weber J. D., Taylor L. J., Roussel M. F., Sherr C. J. and Bar-Sagi D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.*, 1, 20-26.
- Wolff B., Sanglier, J.J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.*, 4, 139–147.
- Wu F.S., Gibbs T.T. and Farb D.H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol.*, 40, 333–336
- Yamamura H., Ugawa S., Ueda T., Morita A. and Shimada S. (2008). TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 295, 296–301.
- Zemelman V. (2007). Radiación ultravioleta, epidemiología del cáncer cutáneo y factores de riesgo. *Rev Hosp Cl Univ Chile.*, 18, 239 – 46.
- Zhiqi S., Soltani M.H., Bhat K.M., Sangha N., Fang D., Hunter J.J. and Setaluri V. (2004). Human melastatin 1 (TRPM1) is regulated by MITF and produces multiple polypeptide isoforms in melanocytes and melanoma. *Melanoma Res.*, 14, 509–516.