



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Papel del canal catiónico TRPV4 en la actividad transcripcional mediada por
 β -catenina/TCF**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Heidi Gabriela Espadas Álvarez

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directora de Tesis:

Dra. María del Refugio García Villegas

Ciudad de México

Diciembre del 2020

Esta tesis se realizó en el laboratorio 38 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudio Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la **Dra. María del Refugio García Villegas**. Bajo la asesoría de la **Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega** del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Además, se contó con la asesoría del **Dr. Gerardo Contreras Patiño** profesor titular del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudio Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y la **Dra. Diana María Escalante Alcalde** del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca Núm. 262993 y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por otorgarme la beca para el desarrollo del Doctorado.

Dedicatoria

La presente tesis se la dedico a mi familia, a mis padres y hermanos que han aportado grandes cosas a mi vida y representan mi gran motivación.

En especial a mi esposo que estuvo a mi lado en los tiempos más difíciles y por su apoyo incondicional durante la realización de esta tesis, además de que mis logros también son los suyos.

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mi hija Elizabeth.

Agradecimientos

Agradecimientos especiales a mi directora de tesis Dra. María del Refugio García Villegas por sus enseñanzas, orientación, su continua guía durante el desarrollo de este proyecto y formación profesional.

A la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega por su invaluable participación en este proyecto y asesoría durante la realización de esta tesis.

A mis asesores de tesis Dr. Gerardo Contreras Patiño y Dra. Diana Escalante Alcalde por su asesoría constante durante la realización de esta tesis para mejorar este trabajo.

Al Dr. Fanis Missirlis por haber revisado esta tesis, por sus comentarios y sugerencias.

A Óscar Chávez y Gabriela Toribio por su apoyo técnico.

Resumen

El canal TRPV4 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 4*) es un canal catiónico no selectivo capaz de permear Ca^{2+} , Na^+ y Mg^{2+} , es activado por hiposmolaridad, estímulos mecánicos, temperatura (25-37 °C), metabolitos endógenos como endocannabinoides, amidas, ésteres de forbol, ácido araquidónico y ligandos sintéticos como 4 α -forbol 12, 13-didecanoato (4 α -PDD). Se han descrito más de 60 mutaciones que alteran la función del canal TRPV4 causando enfermedades humanas como displasias esqueléticas, artropatías y neuropatías periféricas.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio sugirieron la presencia del canal TRPV4 en el núcleo de células proliferativas RCE1-3T3 de epitelio corneal.

Por otro lado, se ha reportado que el canal TRPV4 se une a β -catenina en el complejo de unión adherente de queratinocitos epidérmicos. β -catenina además de ser un componente esencial de las uniones adherentes es un coactivador transcripcional en varias vías de señalización, incluida la vía Wnt, que es fundamental en el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del canal TRPV4 en el núcleo y su posible participación en la regulación transcripcional dependiente de β -catenina en células MDCK, un modelo celular bien caracterizado de epitelio renal.

Inicialmente, se evidenció la localización de la proteína completa de TRPV4 en el núcleo de células MDCK no polarizadas. La activación del canal con 4 α -PDD 10 μM (agonista selectivo de TRPV4) provoca un aumento del Ca^{2+} nuclear y citoplasmático. El aumento de Ca^{2+} de ambos compartimentos celulares fue bloqueado por RN-1734 30 μM (bloqueador específico de TRPV4) y disminuido al remover el Ca^{2+} extracelular con EGTA. Adicionalmente, observamos que la activación de TRPV4 dispara la translocación del canal fuera del núcleo junto con β -catenina.

Por otro lado, encontramos que la sobreexpresión de TRPV4 inhibe la actividad transcripcional de β -catenina al igual que la mutante TRPV4-M680K que no conduce Ca^{2+} lo que demuestra que el efecto inhibitorio del canal no depende de la entrada

de Ca^{2+} . TRPV4 y β -catenina forman un complejo en el citoplasma y en el núcleo de células MDCK no polarizadas, mientras que, en cultivos polarizados, TRPV4 y β -catenina colocalizan en el dominio de la membrana basolateral, pero no interactúan en las uniones adherentes. Además, la activación de TRPV4 interrumpe su interacción con β -catenina. Nuestros resultados también indican que hay al menos otro sitio de interacción del canal con β -catenina adicional al reportado previamente. De manera importante, el complejo TRPV4/ β -catenina también ocurre en otros modelos celulares no diferenciados de osteosarcoma (Saos-2) y neuroblastoma (SH-SH5Y) de humano que corresponden a tipos celulares de los tejidos afectados en las canalopatías más comunes asociadas a TRPV4. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que TRPV4 participe en la regulación de la diferenciación en varios tipos celulares.

En esta tesis se reportan por primera vez funciones no conocidas del canal TRPV4 como son su localización nuclear, su participación en la regulación de la concentración del Ca^{2+} nuclear además del citoplásmico y su papel como regulador transcripcional de β -catenina a través de una interacción directa modulada por la actividad del canal en células MDCK no polarizadas. Todas estas nuevas funciones del canal deben ser consideradas para entender los diferentes mecanismos por los que mutaciones en TRPV4 estarían causando canalopatías en el humano.

Abstract

TRPV4 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 4*) is a non-selective cationic channel able to permeate Ca^{2+} , Na^{+} and Mg^{2+} . It is activated by hyposmolarity, mechanical stimuli, temperature (25-37 °C), endogenous metabolites such as endocannabinoids, amides, esters, phorbol, arachidonic acid and synthetic ligands such as 4 α -phorbol 12, 13-didecanoate (4 α -PDD). More than 60 mutations have been described that alter the function of the TRPV4 channel causing human diseases such as skeletal dysplasias, arthropathies and peripheral neuropathies. Preliminary results from our laboratory suggested the presence of the TRPV4 channel in the nucleus of proliferating cells RCE1-3T3 of corneal epithelium.

On the other hand, it has been reported that the TRPV4 channel binds to β -catenin in the adherent binding complex of epidermal keratinocytes. β -catenin, in addition to being an essential component of adherent junctions, is a transcriptional coactivator in several signaling pathways, including the Wnt pathway, which is essential in embryonic development and tissue homeostasis.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the presence of the TRPV4 channel in the nucleus and its possible participation in the transcriptional regulation dependent on β -catenin in MDCK cells, a well-characterized cellular model of renal epithelium.

Initially, the localization of the full-length TRPV4 protein in the nucleus of nonpolarized MDCK cells was shown. Activation of the channel with 10 μM 4 α -PDD (specific TRPV4 agonist) causes an increase in nuclear and cytoplasmic Ca^{2+} . The increase in Ca^{2+} of both cell compartments was blocked by 30 μM RN-1734 (specific TRPV4 antagonist) and decreased by removing extracellular Ca^{2+} with EGTA. Additionally, we observed that the activation of TRPV4 triggers the translocation of the channel outside the nucleus together with β -catenin.

On the other hand, we found that the overexpression of TRPV4 inhibits the transcriptional activity of β -catenin just like the Ca^{2+} -impermeable mutant TRPV4-

M680K, which shows that the inhibitory effect of the channel does not depend upon the influx of Ca^{2+} . TRPV4 and β -catenin form a complex in the cytoplasm and nucleus of nonpolarized MDCK cells, whereas, in polarized cultures, TRPV4 and β -catenin colocalize in the basolateral membrane domain but do not interact in adherent junctions. Furthermore, the activation of TRPV4 interrupts its interaction with β -catenin. Our results also indicate that there is at least one other site of interaction of the channel with β -catenin in addition to the one previously reported. Importantly, the TRPV4/ β -catenin complex also occurs in other undifferentiated cell models of human osteosarcoma (Saos-2) and neuroblastoma (SH-SH5Y) that correspond to cell types of tissues affected in the most common associated channelopathies to TRPV4. These findings suggest the possibility that TRPV4 participates in the regulation of differentiation in various cell types.

In this thesis, novel functions for the TRPV4 channel are reported for the first time, such as its nuclear location, its participation in the regulation of nuclear Ca^{2+} concentration in addition to the cytoplasmic, and its role as a transcriptional regulator of β -catenin through a direct interaction modulated by channel activity in nonpolarized MDCK cells. All these novel functions of the channel must be considered in order to understand the different mechanisms by which mutations in TRPV4 cause channelopathies in humans.

Índice

	Página
<u>Dedicatoria</u>	III
<u>Agradecimientos</u>	IV
<u>Resumen</u>	V
<u>Abstract</u>	VII
<u>Índice</u>	IX
<u>Lista de figuras</u>	XII
<u>Lista de tablas</u>	XIII
<u>Lista de abreviaturas</u>	XIV
1. <u>Introducción</u>	1
1.1 <u>Canal catiónico TRPV4</u>	1
1.2 <u>Activación polimodal del canal TRPV4</u>	5
1.3 <u>Modulación de la actividad de TRPV4</u>	6
1.4 <u>Papel fisiológico del canal TRPV4</u>	9
1.5 <u>Canalopatías asociadas a TRPV4</u>	10
1.6 <u>Vía de señalización de Wnt/ β-catenina</u>	12
1.7 <u>Proteínas que interactúan con β-catenina</u>	14
1.8 <u>Estructura del núcleo celular</u>	17
1.9 <u>Canales iónicos que regulan la expresión génica</u>	19
1.10 <u>Antecedentes directos</u>	21
2. <u>Justificación</u>	23
3. <u>Hipótesis</u>	24
4. <u>Objetivos</u>	25
4.1. <u>Objetivo general</u>	25
4.2. <u>Objetivos particulares</u>	25
5. <u>Materiales y métodos</u>	26
5.1. <u>Cultivo celular</u>	26
5.2. <u>Inmunofluorescencia</u>	26
5.3. <u>Transfección de células MDCK</u>	28
5.4. <u>Aislamiento de núcleos</u>	29

5.5. Extracción de proteínas totales	29
5.6. Fraccionamiento celular	30
5.7. Western blot	31
5.8. Medición de Ca²⁺ intracelular en células MDCK por imagen de Ca²⁺ ..	33
5.9. Ensayo de gen reportero para evaluar la actividad transcripcional dependiente de β-catenina	34
5.10. Ensayo de coimmunoprecipitación	36
5.11. Ensayo de ligación por proximidad (Duolink® PLA)	37
5.12. Análisis estadístico	39
6. Resultados	40
6.1. Localización subcelular del canal TRPV4 en células MDCK	40
6.2. Análisis de la localización nuclear de TRPV4	42
6.3. Detección nuclear del canal TRPV4 transfectado	44
6.4. Medición del Ca²⁺ nuclear y citoplásmico en células MDCK subconfluentes	46
6.5. La activación de TRPV4 modifica la localización subcelular de β-catenina	54
6.6. TRPV4 inhibe la actividad transcripcional dependiente de β-catenina	58
6.7. La interacción de TRPV4 y β -catenina es modulada por la actividad del canal	66
6.8. TRPV4 contiene más de un sitio de interacción con β -catenina	72
6.9 El complejo TRPV4/β-catenina también se forma en otros modelos celulares	77
7. Discusión	80
8. Conclusiones	91
9. Perspectivas	92
10. Bibliografía	93
Apéndice	102
A. Cultivos bacterianos, extracción de DNA plasmídico y visualización de geles de agarosa	102
B. Secuenciación automatizada de DNA	102

C.	Construcción del vector vacío pCMV-ΔLuc.	103
D.	Construcción del plásmido pGE-V4-Flag (TRPV4 WT).	106
E.	Construcción del plásmido pGE-M680K-Flag (TRPV4-M680K).	108
F.	Construcción del plásmido pGE-Δ235-Flag.	110
G.	Construcción del plásmido pGE-Δ410-Flag.	114
H.	Construcción de los plásmidos pGE-Flag-235 y pGE-Flag-410.	116

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de la estructura monomérica del canal TRPV4.

Figura 2. Esquema de las isoformas del canal TRPV4.

Figura 3. Esquema de la localización de las mutaciones en TRPV4 asociadas a canalopatías.

Figura 4. Invaginaciones de la envoltura nuclear de células MDCK.

Figura 5. Inmunolocalización del canal TRPV4 endógeno en células MDCK subconfluentes y confluentes.

Figura 6. Detección del canal TRPV4 en la fracción de proteína nucleares en células MDCK subconfluentes y confluentes.

Figura 7. El canal TRPV4 se localiza en la envoltura nuclear.

Figura 8. El canal TRPV4 transfectado es capaz de dirigirse a la envoltura nuclear y después a la membrana plasmática.

Figura 9. Aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplasmático evocado por 4 α -PDD 10 μM .

Figura 10. Falta de correlación entre el tiempo de retardo y la magnitud de la respuesta máxima de la activación del canal TRPV4 por 4 α -PDD en células MDCK subconfluentes.

Figura 11. El aumento de Ca^{2+} evocado por 4 α -PDD es disminuido por EGTA.

Figura 12. El aumento de Ca^{2+} evocado por 4 α -PDD es disminuido por el bloqueador RN-1734.

Figura 13. El aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplasmático evocado por 4 α -PDD se debe a la activación de TRPV4 en células MDCK subconfluentes.

Figura 14. Aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplasmático evocado por ATP 1 μM .

Figura 15. La activación del canal TRPV4 modifica su localización subcelular en células MDCK subconfluentes.

Figura 16. La activación del canal TRPV4 modifica la localización nuclear de β -catenina en células MDCK subconfluentes.

Figura 17. Interferencia de diferentes vectores de expresión en la medición de la actividad transcripcional de β -catenina.

Figura 18. Expresión de las diferentes construcciones del canal TRPV4 en células MDCK.

Figura 19. Comparación de la localización subcelular del canal TRPV4-Flag silvestre, y las diferentes mutantes construidas en este trabajo.

Figura 20. La expresión del canal TRPV4 inhibe la actividad transcripcional de β -catenina independientemente de la posición de epítipo Flag.

Figura 21. TRPV4 inhibe la actividad transcripcional de β -catenina.

Figura 22. El canal TRPV4 interactúa con β -catenina.

Figura 23. TRPV4 interactúa con β -catenina en el citoplasma y en el núcleo celular.

Figura 24. La interacción del canal TRPV4 y β -catenina ocurre únicamente en células MDCK subconfluentes.

Figura 25. La actividad del canal TRPV4 regula la interacción con β -catenina.

Figura 26. Esquema de las regiones del N-terminal del canal TRPV4 evaluadas para la interacción con β -catenina.

Figura 27. Expresión de los diferentes péptidos del canal TRPV4.

Figura 28. Diferentes regiones de TRPV4 inhiben la actividad transcripcional de β -catenina.

Figura 29. TRPV4 contiene más de un sitio de interacción con β -catenina.

Figura 30. Inmunolocalización del canal TRPV4 en células SH-SY5Y y Saos-2.

Figura 31. TRPV4 interactúa con β -catenina en células Saos-2 y SH-SY5Y no diferenciadas.

Figura 32. Modelo para la disrupción del complejo TRPV4/ β -catenina después de la activación de TRPV4.

Lista de Tablas

Tabla 1. Mutaciones letales encontradas en TRPV4

Tabla 2. Proteínas que interactúan con TRPV4

Tabla 3. Proteínas que interactúan con β -catenina

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para Western blot.

Tabla 6. Cantidades de plásmidos utilizados para cada transfección

Lista de Abreviaturas

°C	Grados Celcius	IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
μL	Microlitros	IP3R	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato
μM	Micromolar	kDa	kilodaltones
4α-PDD	4α-forbol 12,13-didecanoato	Km ^R	Resistencia para la kanamicina
aa	Aminoácido	pb	Pares de bases
AA	Ácido Araquidónico	PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Amp ^R	Resistencia para la ampicilina	PFA	Paraformaldehído
ANK	Anquirina	PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifisfato
ATP	Adenosina trifosfato	PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
BKCa	Canal de potasio activado por calcio de alta conductancia activado por Ca ²⁺	PKC	Proteína cinasa dependiente de fosfolipasa C
CMV	Citomegalovirus	PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato	PLA	Fosfolipasa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	RE	Retículo endoplasmático
DMSO	Sulfóxido de dimetilo	RYR	Receptor de rianodina
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato	SERCA	Bomba Ca ²⁺ del retículo sarco/endoplásmico
EET	Ácido epoxieicosatrienoicos	STIM 1	Molécula de interacción con el estroma 1

EGTA	Ácido Etilendiaminotetracético	TAE	Amortiguador de Tris-acetato-EDTA
EN	Envoltura nuclear	TA	Temperatura ambiente
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>	TK	Cinasa de tirosina
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	TRPV4	Transient Receptor Potencial Vanilloid 4
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazino-etanosulfónico	TRIS	Trishidroximetilaminometano

1. Introducción

1.1 Canal catiónico TRPV4

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el flujo pasivo de iones, siguiendo sus gradientes electroquímicos. Debido a que el flujo de iones a través de una membrana da lugar a corrientes eléctricas, los canales iónicos juegan un papel clave en la generación del potencial de membrana y en diversas funciones celulares, tales como transducción de señales, liberación de neurotransmisores, contracción muscular, secreción hormonal, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Li, 2017).

Los canales TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) son una familia de canales catiónicos no selectivos permeables a cationes mono y divalentes incluyendo Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , entre otros. Desempeñan un papel importante en la fisiología sensorial de los organismos detectando estímulos mecánicos, térmicos, químicos y cambios en el gradiente osmótico extracelular (Pedersen et al., 2005).

En humano se han encontrado 30 genes *TRP* y más de 100 proteínas de canales de TRP. Se encuentran clasificados en 7 subfamilias que corresponden a las familias de los canales iónicos canónicos (TRPC), vaniloides (TRPV), melastatina (TRPM), polisistina (TRPP), mucolipina (TRPM), anquirina (TRPA) y sin mecanoreceptor (TRPN). La subfamilia canales TRPV tiene 6 miembros TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6. La permeabilidad entre cationes mono o divalentes entre los diferentes miembros varía ampliamente. TRPV1-4 son canales catiónicos no selectivos, termosensibles y se consideran modestamente permeables a Ca^{2+} con un rango de permeabilidad de $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ entre 1 y 10, mientras que TRPV5 y 6 son canales altamente selectivos a Ca^{2+} con un rango de permeabilidad de $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ (Venkatachalam & Montell, 2007).

TRPV4 fue descrito en el año 2000 como un sensor de cambios de osmolaridad del medio extracelular y recibió diferentes nombres *OTRPC4* (*osmosensitive transient receptor potential channel*), *VR-OAC* (*vanilloid receptor-related osmotically activated channel*), *VRL-2* (*vanilloid receptor-like 2*) y *TRP-12* (Delany et al., 2001; Liedtke et al., 2000; Nilius et al., 2001; Wissenbach et al., 2000).

El gen humano de *TRPV4* se encuentra en el cromosoma 12q23-q24.1 y tiene 15 exones. Un monómero consta de 871 aminoácidos (aa), contiene seis regiones transmembranales denominadas de S1 a S6, con un dominio formador del poro entre los segmentos S5-S6 (aa 648-678), mientras que S3 y S4 constituyen el sitio de unión a su activador específico 4 α -forbol 12, 13-didecanoato (4 α -PDD) que interactúa con los residuos L584, T586, Y555 de TRPV4 (Vriens et al., 2007). Presenta ambos extremos amino (N-terminal) y carboxilo (C-terminal) en el lado citoplasmático. Su extremo N-terminal abarca desde el aminoácido 1 al 465 y representa más del 50% de la longitud total del canal, posee 6 dominios repetidos de anquirina (ANK) que son secuencias de 33 residuos importantes para la unión del canal con otras proteínas (ver Figura 1 y Tabla 1) (Doñate-Macián & Perálvarez-Marín, 2014). Una región rica en prolinas (PRD, aa 132-144) se encuentra justo antes del primer dominio de ANK. En el extremo C-terminal se encuentra un motivo PDZ (aa 868-871) y la caja TRP que está altamente conservada en la familia de los canales TRP (aa 732-738), mutaciones en este segmento puede altear la apertura normal del canal (Fig. 1) (White et al., 2016). El dominio C-terminal de TRPV4 juega un papel importante en el plegamiento, maduración y tráfico de la proteína (Becker et al., 2008).

Se han identificado dos aminoácidos que modulan la compuerta (*gating*) del canal, la mutación del residuo F707 localizado en la región transmembranal S6 disminuye la corriente a través de TRPV4 (Watanabe et al., 2003b) y si se muta el residuo E797 localizado en el C-terminal, el canal se torna constitutivamente activo (Fig. 1) (Watanabe et al., 2003b).

Tres aminoácidos han mostrado ser claves para regular la permeabilidad y selectividad de TRPV4: D672, D682 y M680 localizados en la región del poro (aa 663-682) (Fig. 1). La mutación en D682 reduce fuertemente la permeabilidad a Ca^{2+} y Mg^{2+} , la neutralización de la carga del ácido aspártico 672 por alanina (D682A) cambia la selectividad por iones divalentes a monovalentes, mientras que la mutación de ambos D672 y D682 simultáneamente produce un mayor efecto en la disminución de la corriente a través de TRPV4. La mutación de M680 por lisina, ácido aspártico o alanina (M680K/D/A) elimina la permeabilidad a Ca^{2+} del canal. Una posible explicación es que la carga adicional del aa aumenta la afinidad por Ca^{2+} hasta un punto que ya no puede penetrar por el canal (Liedtke, 2003; Voets et al., 2002).

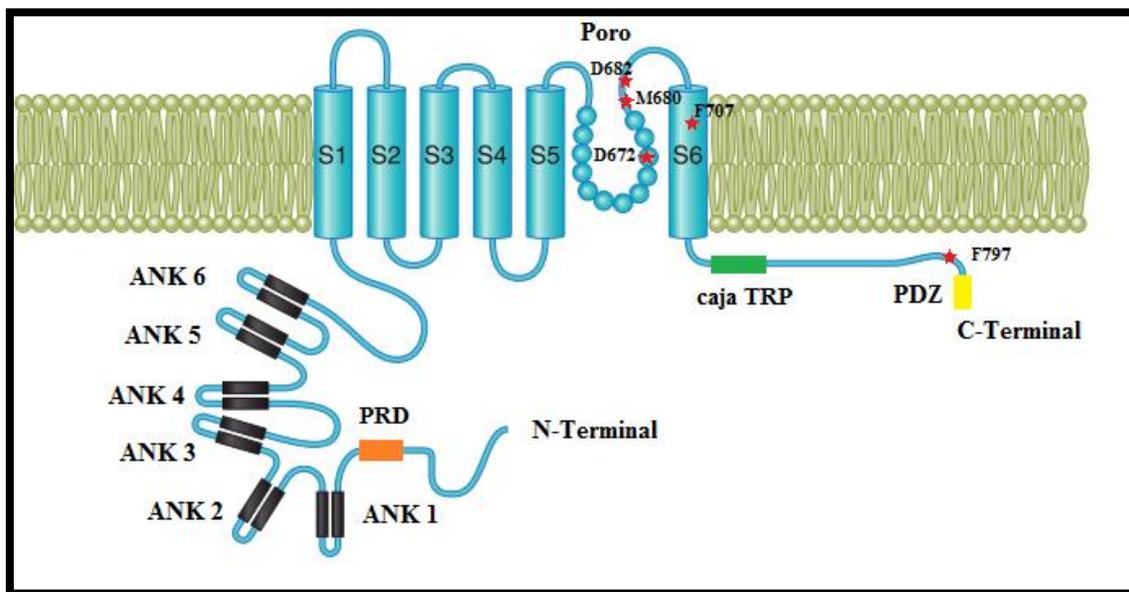


Figura 1. Esquema de la estructura monomérica del canal TRPV4. Se muestra un monómero del canal TRPV4 con sus dominios estructurales, los extremos N y C-terminal son intracelulares, contiene 6 dominios transmembranales S1-S6 y la región del poro se encuentra entre S5 y S6. El N-terminal contiene 6 repeticiones de anquirina ANK 1-ANK 6. En color naranja se muestra la región rica en prolina (PRD, aa 132-144), en verde la caja TRP (aa 732-737) y en amarillo el motivo PDZ (aa 868-871). Con estrellas rojas se indican los aminoácidos que modulan la compuerta (F707 y E797) y los aminoácidos que regulan la

permeabilidad y selectividad (D672, M680 y D682) de TRPV4. Modificado de White et al., 2016.

Arniges et al. (2016), identificaron en células de epitelio de tráquea humano 5 variantes producidas por procesamiento alternativo del RNA mensajero denominadas de TRPV4-A a TRPV4-E. De las cuales, TRPV4-A corresponde a la isoforma completa de 871 aa, mientras que las demás presentan deleciones en el extremo N-terminal: TRPV4-B ($\Delta 384-444$), TRPV4-C ($\Delta 237-284$), TRPV4-D ($\Delta 27-61$) y TRPV4-E ($\Delta 237-284$ y $\Delta 384-444$) (Fig. 2), estas variantes del canal permitieron demostrar que los dominios de ANK son importantes para su oligomerización. Adicionalmente también en este trabajo se demostró que la oligomerización del TRPV4 sucede en el retículo endoplásmico (RE) ya que no se ve afectada por la aplicación de brefeldina A, un inhibidor del transporte desde el RE al aparato de Golgi. TRPV4-A y TRPV4-D se oligomerizan en el RE y se transportan a la membrana plasmática (MP) formando canales funcionales. Mientras que TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E se quedan acumulados en el RE debido a su imposibilidad de oligomerizar lo que coincide con la deleción parcial de algún repetido de ANK (Fig. 2) (Arniges et al., 2006).

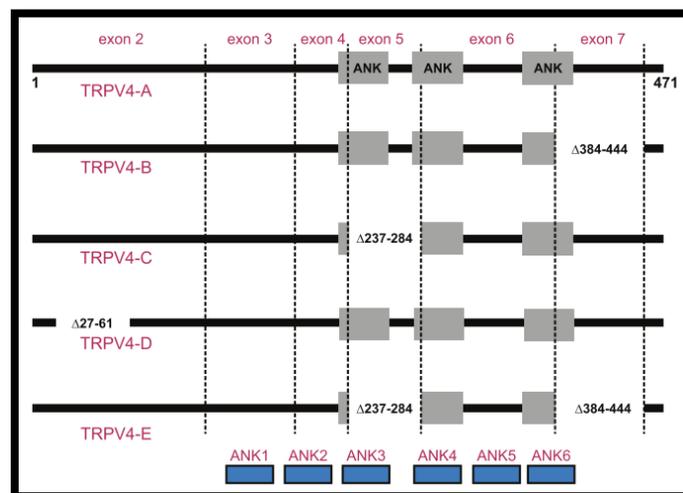


Figura 2. Esquema de las diferentes isoformas descritas del canal TRPV4. En humano se conocen 5 variantes producidas por procesamiento alternativo denominadas de TRPV4-A a TRPV4-E. La isoforma TRPV4-A corresponde a la proteína completa, TRPV4-B tiene

deletado en exón 7 ($\Delta 384-444$), TRPV4-C carece del exón 5 ($\Delta 237-284$), en TRPV4-D se eliminó parte del exón 2 ($\Delta 27-61$) y TRPV4-E carece de los exones 5 y 7 ($\Delta 237-284$ y $\Delta 384-444$). En la parte inferior se muestra la ubicación de los repetidos de anquirina (azul, ANK 1-6). Tomado de White et al., 2016.

1.2 Activación polimodal del canal TRPV4

TRPV4 es un canal catiónico no selectivo de activación polimodal responsivo a estímulos químicos y físicos. Dentro de los estímulos físicos están: temperatura en el rango de 25-37°C, hinchamiento celular, hiposmolaridad del medio extracelular, estrés mecánico, flujo laminar y presión (Kottgen et al., 2008; Phan et al., 2009; Suzuki et al., 2003b). La hiperosmolaridad (330 mOsmol/l) inhibe a TRPV4, mientras que las soluciones hiposmóticas (200-250 mOsmol/l) lo activan (Liedtke et al., 2000). TRPV4 en condiciones fisiológicas permea Ca^{2+} y Mg^{2+} al interior celular aunque también es permeable a cationes monovalentes como Na^+ con una relación de permeabilidad de $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 6$, la secuencia de permeabilidades para cationes divalentes es $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ y monovalentes de $\text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (Nilius et al., 2001; Voets et al., 2002).

Un activador importante de TRPV4 es el Ca^{2+} , tanto el Ca^{2+} intracelular como extracelular modulan la activación del canal. Las curvas I/V (corriente/voltaje) de TRPV4 presentan rectificación entrante y saliente dependiente de la concentración de Ca^{2+} extracelular. El Ca^{2+} intracelular desensibiliza al canal, se ha calculado que la IC_{50} del Ca^{2+} para TRPV4 es alrededor de 400 nM (Voets et al., 2002; Watanabe et al., 2003b).

TRPV4 puede ser activado químicamente por pH ácidos y metabolitos endógenos como endocannabinoides, amidas, ácido araquidónico (AA), ácido epoxieicosatrienoico (EET) y ésteres de forbol incluyendo forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA) (Fan et al., 2009; Gkoumassi et al., 2009; Watanabe et al., 2003a). Entre los agonistas sintéticos específicos para TRPV4 se encuentra el éster de forbol 4 α -forbol 12,13-didecanato (4 α -PDD) con una concentración media efectiva

(EC₅₀) en el rango micromolar y GSK1016790A (GSK101) con una EC₅₀ en el rango nanomolar (Vincent & Duncton, 2011; Willette et al., 2008).

El canal TRPV4 ha sido ampliamente reportado como un regulador del volumen celular (Becker et al., 2005; Benfenati et al., 2011; Pan et al., 2008) junto con acuaporina (AQP) 4 y 5 (Benfenati et al., 2011; Liu et al., 2006). Cuando hay disminución de la osmolaridad el canal es activado a través de su interacción directa con metabolitos del AA. El ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A2 (PLA2), que se sabe se activa por inflamación celular, el AA es metabolizado intracelularmente por las enzimas del citocromo P450 (CYP) epoxigenasa, produciendo EET que se une directamente al canal TRPV4 a través del residuo K535 (Berna-Erro et al., 2017; Vriens et al., 2004). El hinchamiento celular activa al canal TRPV4 (Vriens et al., 2005) que aumenta el Ca²⁺ citosólico para la recuperación del volumen celular (Arniges et al., 2004).

Por otro lado, la actividad eléctrica del canal TRPV4 puede ser bloqueada de manera específica con la sulfonamida RN-1734, con una concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 2.3 μM para el canal de humano (Vincent & Duncton, 2011; Vincent 2009). El rojo de rutenio (RR) y cationes trivalentes como el La³⁺ y el Gd³⁺ bloquean el poro del canal TRPV4 pero no son específicos y pueden inhibir otros canales TRPV (Becker et al., 2005; Gkoumassi et al., 2009).

1.3 Modulación de la actividad de TRPV4

La actividad eléctrica del canal TRPV4 puede ser modulada por modificaciones postraduccionales en respuesta a estímulos específicos. La activación con medio hipotónico resulta en la fosforilación en el residuo Y253 por la cinasa Src con la que interactúa físicamente a través del dominio SH2 (del inglés *Src Homology 2*) (Xu et al., 2003). La fosforilación en la Y110 por Src ocurre debido a la activación del canal por estímulos de temperatura e hiposmolaridad pero no al activarse con 4α-PDD y la mutante Y110F aumenta la cantidad del canal en la MP (Wegierski et al., 2009).

La fosforilación en los residuos S162, S189 y T175 por la cinasa de proteína C (PKC) o la cinasa de proteína A (PKA) sensibilizan al canal ante estrés hipotónico (Fan et al., 2009). Mientras que la cinasa serina/treonina inducida por suero/glucocorticoides 1 (SGK1) fosforila la S824 de TRPV4 y promueve su interacción con F-actina aumentando la actividad del canal (Tabla 2) (Shin et al., 2012). También se ha identificado que las cinasas PKA, PKC y SGK1 fosforilan al canal en la S824 (Cao et al., 2018; Peng et al., 2010; Shin, 2015) y la mutante fosfomimética S824D no se une a STIM1 (molécula de interacción con el estroma 1) (Shin, 2015).

Por otro lado, se sabe que la glicosilación influye en el tráfico y/o función de una gran variedad de canales iónicos. El canal TRPV4 de humano presenta cinco asparaginas susceptibles de ser N-glicosiladas: N201, N207, N651, N784 y N835. Los procesos de glicosilación pueden determinar el tráfico de canales a la membrana plasmática. TRPV4 tiene un motivo de glicosilación dentro del asa que forma el poro. En este caso, la glicosilación de la N651 en TRPV4 favorece la retención del canal en el RE. La mutación de este aminoácido a N651Q resulta en el aumento de la expresión del canal en la membrana plasmática (Xu, 2005).

Se han identificado varias proteínas que interactúan directamente con TRPV4 a través de sus dominios N y C-terminal para regular la actividad del canal y su localización subcelular, como se indica en la Tabla 1.

TRPV4 puede interactuar con monómeros de otros miembros de la familia TRP como TRPC1 y TRPP2 para formar heterotetrámeros funcionales con una estequiometría 2:2 (Kottgen et al., 2008; Ma et al., 2011) aunque también ha sido encontrado un complejo heterotetramérico entre TRPV4-TRPC1-TRPP2 formando canales funcionales activados por flujo (Du et al., 2014). Por otro lado, TRPV4 físicamente interactúa con KCa2.3 (canal de potasio de baja conductancia activado por Ca^{2+}) e induce hiperpolarización en células endoteliales en respuesta a GSK1016790A y acetilcolina (He et al., 2017).

Tabla 1. Proteínas que interactúan con TRPV4

Proteína	Sitio de unión	Efecto funcional de la interacción con TRPV4	Referencias
OS-9	N-terminal 438-468	Retiene los monómeros de TRPV4 en el RE, previene su degradación proteosómica.	(Wang et al., 2007)
PACSIN 3	N-terminal 132 to 144	Aumenta la localización TRPV4 en la MP quizá por bloquear la endocitosis mediada por dinamina. La unión inhibe la activación de TRPV4 por temperatura e hiposmolaridad	(Cuajungco et al., 2006; D'Hoedt et al., 2008)
PIP2	N-terminal 148-395	Aumenta la activación del canal por hiposmolaridad y calor	(Garcia-Elias et al., 2013)
β -catenina	N-terminal 1-235	Forma parte del complejo de unión adherente	(Sokabe et al., 2010)
MAP7	C-terminal 785-808	Aumenta la localización de TRPV4 en la membrana plasmática	(Suzuki et al., 2003a)
Actina/ Tubulina	C-terminal 798-809	Regula la activación de TRPV4.	(Goswami, 2010)
STIM1	C-terminal	Disminuye la cantidad de TRPV4 en la MP	(Shin, 2015)
IP3R	C-terminal 812-831	Sensibiliza a TRPV4 para la activación por medio hipotónico	(Garcia-Elias et al., 2008)
Calmodulina	C-terminal 812-831	Está involucrada en la activación dependiente de Ca^{2+} de TRPV4	(Strotmann, 2003)
AKAP79	C-terminal 771-781	Aumenta la actividad de TRPV4	(Mack, 2017)
β -arrestina-1	?	Aumenta la endocitosis y ubiquitinación de TRPV4 inducida por angiotensina	(Shukla et al., 2010)
AQP4/5	?	Regula la activación de TRPV4 por hiposmolaridad	(Benfenati et al., 2011; Liu et al., 2006)
TRPP2 TRPC1	?	Forman heterotetrámeros con TRPV4	(Du et al., 2014)

1.4 Papel fisiológico del canal TRPV4

La expresión ubicua del canal ha sugerido su participación en múltiples procesos fisiológicos entre ellos, como sensor osmótico, en la modulación de la frecuencia de latido ciliar, en la vasodilatación, angiogénesis, adipogénesis, producción y liberación de citocinas, modulación de la secreción de insulina, migración celular, proliferación y diferenciación celular, entre otros procesos (White et al., 2016).

Se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} por TRPV4 participa en la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Masuyama et al., 2008; Suzuki et al., 2013), TRPV4 regula la etapa terminal de diferenciación de osteoclastos, la desfosforilación del factor de transcripción factor nuclear de las células T activadas (NFAT) es dependiente de Ca^{2+} /calcineurina e induce su translocación al núcleo donde regula la expresión de genes (Masuyama et. al 2008). También recientemente se reportó un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación temprana como el factor de transcripción Osterix después de la activación del canal TRPV4 (Hu et al., 2017). La entrada de Ca^{2+} vía TRPV4 es requerida para activar la cascada de señalización Ca^{2+} /calmodulina que promueve la diferenciación de los condrocitos mediada por el factor de transcripción *SRY-Box Transcription Factor 9* (SOX9), el principal regulador de la condrogénesis (Muramatsu et al., 2007).

El canal TRPV4 ha sido ampliamente implicado en la diferenciación de epitelios al regular las uniones estrechas (UEs), como fue evidenciado por la pérdida de la función de barrera y alteración del epitelio en ratones TRPV4^{-/-} (Sokabe et al., 2010; Kida et al., 2012; Kitsuki et. al 2019). El flujo de Ca^{2+} dependiente de TRPV4 promueve el ensamblaje de los complejos de E-caderina y β -catenina que conduce a la maduración de las uniones intercelulares y las UEs (Sokabe et al., 2010).

La activación farmacológica de TRPV4 con 4 α -PDD incrementa la resistencia eléctrica transepitelial (RET) regulando así la hermeticidad de barrera asociada a las UEs, al aumentar la expresión de claudina-4 y ocludina, proteínas estructurales de la UE, en queratinocitos epidérmicos (Akazawa et al., 2013). En células de

epitelio intestinal se reportó que TRPV4 regula la barrera intestinal, la activación de TRPV4 aumenta la permeabilidad y está relacionada con la fosforilación de claudina-7 en la S204 y la S207 (Hu et al., 2017).

El canal TRPV4 participa en la diferenciación del epitelio corneal, es necesario para el establecimiento apropiado de las uniones estrechas y regula su función de barrera. La activación de TRPV4 aumenta la acumulación de claudina-1 y 4 en los bordes celulares (Martinez-Rendon et al., 2017).

Por otro lado, la activación del canal TRPV4 induce la proliferación de células epiteliales del esófago y de células del endotelio cerebral (Hatano, 2013; Ueda 2011).

Aunque se han hecho avances para entender la importancia de TRPV4 en varios procesos fisiológicos, en comparación con otros miembros de la subfamilia TRPV de canales iónicos (por ejemplo, TRPV1), aún se requiere mucho trabajo para dilucidar la importancia de TRPV4 en la fisiología celular.

1.5 Canalopatías asociadas a TRPV4

El canal TRPV4 ha sido ampliamente estudiado dado que existen mutaciones asociadas a displasias esqueléticas, artropatías y neuropatías periféricas que causan varias enfermedades humanas como la braquiolmia (daño en el sistema osteoarticular), atrofia muscular espinal distal congénita, displasias metatróficas no letales y letales (enanismo que involucra extremidades cortas y un tronco largo) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (neuropatía sensoriomotriz) (Nilius & Voets, 2013) (Fig. 3). El grado de afectación de las mutaciones identificadas es muy amplio yendo de leve, a severa e incluso letal a nivel fetal y las mutaciones en TRPV4 causantes de estos defectos están distribuidas a lo largo de toda la proteína enfatizando su importancia fisiológica. Para algunas de las mutaciones letales perinatales de TRPV4 se ha sugerido que alteren la diferenciación de los

condrocitos provocando displasias metatróficas (Camacho et al., 2010). En la Tabla 2 se muestran las mutaciones letales reportadas en TRPV4 y el dominio estructural donde se ubican.

Algunas de las alteraciones en TRPV4 asociadas a enfermedades humanas corresponden a mutaciones de pérdida de función, por ejemplo: P97R, R269H, R271P, F273L y R316C (Auer-Grumbach et al., 2010; Fiorillo et al., 2012; Lamandé et al., 2011) aunque también se han descrito mutantes de ganancia de función que presentan fenotipos más deletéreos que los causados por la pérdida de función, por ejemplo: V620I, P799L, G800D, R269C, I331T y P799S (Camacho et al., 2010; Rock et al., 2008; Sullivan et al., 2015). Se desconoce por qué una ganancia de función de TRPV4 es más letal que una pérdida de función y se sabe poco sobre los mecanismos celulares que resultan afectados en estas mutantes por lo que aún no se ha podido relacionar todos los fenotipos con la pérdida o ganancia de función de TRPV4. En consecuencia, no parece haber una correlación simple entre la actividad del canal y la gravedad de las enfermedades que resultan de su desregulación.

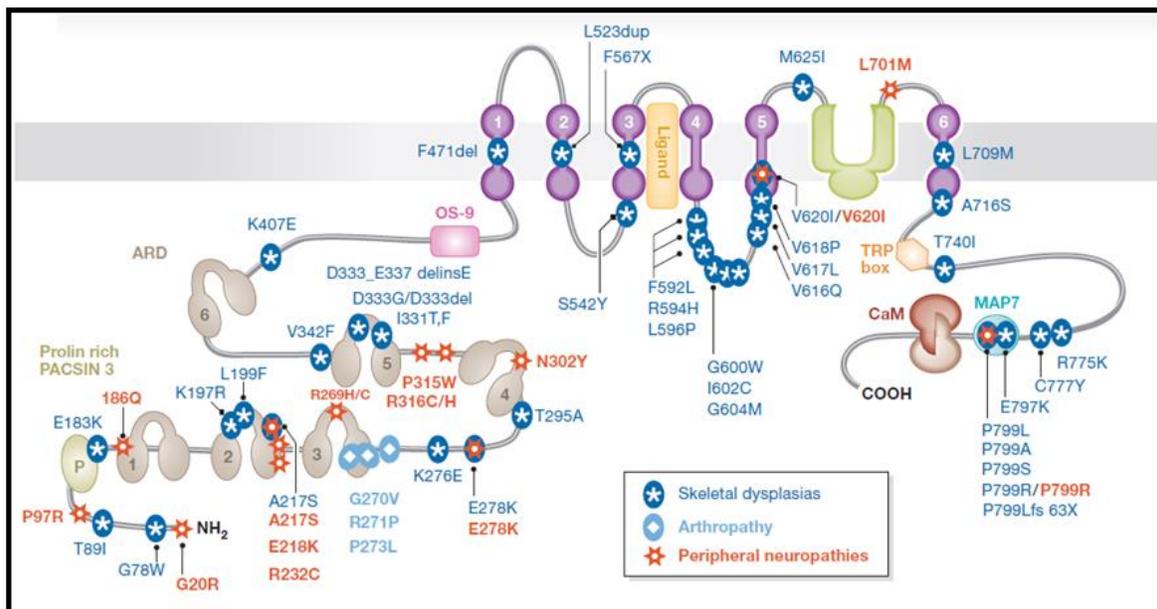


Figura 3. Esquema de la localización de las mutaciones en TRPV4 asociadas a canalopatías. Se muestran los dominios estructurales y de interacción con diferentes proteínas, también se muestran las mutaciones identificadas del canal asociadas a

diferentes enfermedades, cada símbolo indica una mutación asociada a displasias esqueléticas (♣), artropatía (♠) o neuropatías periféricas (✱) hay más de 50 mutaciones reportadas que se extienden por todo el canal. Tomado de Nilius y Voets 2013.

Tabla 2. Mutaciones letales encontradas en TRPV4

N-terminal	ANK 2	ANK 3	S1	Loop4	S5	C-terminal
1-147	190-236	237-282	466-486	594-616	617-637	712-871
G78W (Unger et al., 2011)	K197R (Camacho et al., 2010)	Q239H (Andreucci, 2011)	ΔF471 (Camacho et al., 2010)	I604M (Camacho et al., 2010)	L618P (Camacho et al., 2010)	T740I (Unger et al., 2011)
T89I (Camacho et al., 2010)		K276E (Unger et al., 2011)		R594H (Weinstein et al., 2014)		P799S (Andreucci, 2011)

Por otro lado, experimentos realizados en ratones knockout para (TRPV4^{-/-}) muestran deficiencias en el mantenimiento del equilibrio osmótico en estos animales: ingieren menos agua, tienen una presión osmótica más elevada, los niveles de vasopresina (ADH, hormona antidiurética) están alterados lo que indica un defecto en la percepción osmótica en el individuo (Liedtke & Friedman, 2003; Mizuno, 2003; Suzuki et al., 2003b). Estos ratones TRPV4^{-/-} también presentan afectaciones en la percepción del sonido (Tabuchi et al., 2005), en la percepción del dolor (Alessandri-Haber et al., 2005) y en la percepción del calor (Lee et al., 2005). Debido a que los fenotipos observados en las mutaciones de TRPV4 que producen canalopatías en humano son diferentes a los fenotipos del ratón TRPV4^{-/-} el estudio de este modelo animal no ha sido suficiente para comprender los mecanismos moleculares alterados en las enfermedades humanas, sugiriendo que TRPV4 podría tener algunas otras funciones aún no descritas.

1.6 Vía de señalización de Wnt/β-catenina

La proteína β-catenina, codificada por el gen CTNNB1, es uno de los componentes principales de la vía Wnt/β-catenina. La vía de señalización Wnt/β-catenina regula aspectos fundamentales del desarrollo, incluyendo la proliferación, supervivencia,

diferenciación, migración y morfogénesis, lo que implica la transcripción de genes blanco, tales como ciclina D1, c-Myc, metaloproteinasa de la matriz extracelular-7 (MMP7), moléculas de adhesión e interleucinas, entre otros (Clevers & Nusse, 2012; Valenta et al., 2012).

En ausencia de la proteína Wnt, el nivel de β -catenina libre en el citoplasma es muy bajo, ya que la β -catenina que no se encuentra unida a E-cadherina es fosforilada y posteriormente degradada en el proteosoma. El complejo encargado de la fosforilación de β -catenina está compuesto por la Axina, adenomatosis polyposis coli (APC) y glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3 β) y caseína cinasa 1 α (CK1 α). Primero, la β -catenina libre citoplásmica se une a la Axina y APC, lo que permite la asociación con el resto de los componentes. CK1 α fosforila a β -catenina en la S45, promoviendo la fosforilación secuencial de la T41, S37 y S33 por GSK3 β . Posteriormente, APC conduce a la β -catenina fosforilada para ser ubiquitinada. Para ello, β -TrCP (del inglés, *Beta-transducing repeat containing protein*), una subunidad del complejo de ubiquitinación, reconoce las S33 y S37 fosforiladas y β -catenina es ubiquitinada para posteriormente ser degradada por el proteosoma 26S (Valenta et al., 2012).

Cuando la proteína Wnt se une a su receptor Frizzled (FZD) se asocia la proteína Dishevelled (DVL) al dominio citosólico de FZD por lo que ya no puede ejercer su función que es promover la disociación del complejo de Axina, APC y GSK3 β dejando libre a β -catenina. La β -catenina se transloca al núcleo donde unida a factores de transcripción de la familia *T-cell factor/Lymphoid enhancerbinding factor* (TCF/Lef). Los diferentes TCFs (TCF1, TCF3 y TCF4) y Lef1, guían a β -catenina a varios locus dentro del genoma, donde interaccionan con un motivo específico conocido como "*TCF binding site*" 5'CCTTTGAACT a través del dominio HMG (del inglés, *high-mobility-group*) de TCF (Cadigan & Waterman, 2012).

Se ha demostrado que los primeros 50 aa el N-terminal de TCF4 son necesarios para interactuar con β -catenina (Miravet et al., 2002). Además, en ausencia de β -

catenina, los TCFs actúan como represores transcripcionales al formar un complejo con Groucho. La unión de β -catenina a los TCFs desplaza a Groucho formando un complejo activador (Valenta et al., 2012). La selectividad por uno u otro gen se regula mediante acetilación y asociación con los coactivadores transcripcionales. Por ejemplo, β -catenina puede ser acetilada por CBP (CREB-binding protein) en el residuo K49 para regular la expresión de *c-myc*. Mientras que, la acetilación del residuo K345 por p300 aumenta la afinidad por TCFs y por lo tanto causa un incremento de la actividad transcripcional (Valenta et al., 2012). La fosforilación de β -catenina en la Y654 por la cinasa c-Src reduce drásticamente la unión a E-cadherina, mejorando la actividad transcripcional dependiente de β -catenina (Huber & Weis, 2001). Esta fosforilación puede ser revertida por la fosfatasa PTP1B (proteína-tirosina fosfatasa 1B), favoreciendo la adhesión. La fosforilación de β -catenina en S552 por Akt aumenta su actividad transcripcional (Fang et al., 2007).

Adicionalmente, se han descrito vías de señalización no canónicas que no involucran la estabilización de β -catenina. Entre estas vías se encuentra la vía de Wnt/ Ca^{2+} en la que Wnt se une al receptor Frizzled (FZD) que promueve el incremento de moléculas de señalización intracelular como fosfatidil inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y D-1,2 diacilglicerol (DAG) que desencadena el aumento de Ca^{2+} intracelular activando la cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), la calcineurina o la PKC que conllevan a la inhibición de β -catenina/TCF. Esta vía es fundamental en el desarrollo de la polaridad en vertebrados (Clevers & Nusse, 2012; Slusarski & Pelegri, 2007).

1.7 Proteínas que interactúan con β -catenina

La función de β -catenina es crucial en dos importantes procesos del desarrollo: por un lado, el establecimiento y el mantenimiento de la adhesión celular en las uniones adherentes y, por otro lado, β -catenina se transloca al núcleo en donde participa en la regulación de la expresión génica. En cada una de estas dos funciones β -catenina

debe asociarse con múltiples proteínas para poder desarrollar correctamente su función.

La estructura de β -Catenina (781 aa en humano) se compone de una región N-terminal de 141 aa, un dominio central de 523 residuos dividido en 12 repetidos conocidos como dominios armadillo (ARM denominados R1-R12) y un dominio C-terminal de 117 aa. La región central presenta poca flexibilidad y sirve como dominio de interacción para sus diferentes proteínas de unión, ya sea en membrana, en el citosol o en el núcleo. Los dominios N-terminal y C-terminal son estructuralmente flexibles y pueden unir diferentes moléculas que regulan las interacciones de la región central (Valenta et al., 2012).

Uno de los papeles esenciales del complejo β -catenina/TCF consiste en reclutar co-activadores de la transcripción, así como complejos remodeladores de la cromatina hacia los promotores de los genes sensibles a la activación de la vía de señalización Wnt. Entre las proteínas citosólicas que se han reportado recientemente que modulan la actividad de β -catenina se encuentran Axina, APC, Kank, PAK4, IQGAP1, ZMIZ2 y LZTS2 las cuales interactúan directamente con β -catenina para modular su entrada o salida del núcleo a través de su actividad de exportación o importación nuclear y por consiguiente estas proteínas regulan la actividad transcripcional de β -catenina/TCF (Tabla 3).

Estudios de cristalografía han demostrado que β -catenina comparte dominios de interacción con muchas de las principales proteínas con las que interactúa, de manera que β -catenina no se puede unir simultáneamente a moléculas como E-Cadherina, APC, Axina o TCF, ya que todas estas moléculas se unen en la región que va del R3 al R9 a través de puentes salinos con los residuos K312 y la K435 (Miravet et al., 2002). El dominio C-terminal es esencial para la actividad transcripcional de β -catenina, debido a que la mayoría de los coactivadores transcripcionales como CBP y p300 interactúan con β -catenina a través de este

dominio (Hecht, 2000; Takemaru 2000) y la región N-terminal de β -catenina se une a α -catenina.

Se ha descrito que β -catenina carece de señales de localización nuclear (NLS) y de señales de exportación nuclear (NES) pero sus dominios armadillo interactúan con las importinas (Fagotto, 1998), además la exportación nuclear de β -catenina es independiente de la exportina CRM1 (*Chromosomal Maintenance 1*) como se revela por la falta de respuesta al inhibidor de CRM1, leptomicina B (LMB) (Fagotto, 2001). Por lo que la importación o exportación de β -catenina del núcleo puede ser regulada por las NLS y NES de las proteínas con las que interactúa (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas que interactúan con β -catenina

Proteína	Localización subcelular del complejo con β-catenina	Efecto transcripcional	# de sitios de unión a β-catenina	Referencias
LZTS2	Sale del núcleo	↓	1	(Thyssen et al., 2006)
APC	Sale del núcleo	↓	10	(Henderson, 2000)
Axina	Sale del núcleo	↓	1	(Cong & Varmus, 2004)
Kank	Entra al núcleo	↑	1	(Wang, 2006)
PAK4	Entra al núcleo	↑	1	(Li et al., 2012)
IQGAP1	Entra al núcleo	↑	1	(Briggs et al., 2002)
ZMIZ2	Entra al núcleo	↑	1	(Lee et al., 2013)
ICAT	Sale del núcleo	↓	2	(Domingues et al., 2017; Tago 2000)
Chibby	Sale del núcleo	↓	1	(Li et al., 2010)

Menin	Sale del núcleo	↓	2	(Cao et al., 2009)
KCTD1	Sale del núcleo	↓	1	(Li et al., 2014a)

El motivo consenso de unión a β -catenina de proteínas como APC, Axina, TCF, E-cadherina e inhibidor de β -catenina y TCF (ICAT) es **DX $\theta\theta$ X Φ X₂₋₇E**, donde θ es un aminoácido hidrofóbico alifático, Φ un residuo aromático (principalmente fenilalanina) y X₂₋₇ de 2 a 7 aminoácidos cualquiera, mientras que D y E son aminoácidos conservados (Cadigan & Waterman, 2012; Domingues et al., 2017). Algunas proteínas tienen varios sitios de unión a β -catenina, por ejemplo, APC tiene 3 consenso y 7 repetidos de 20 aminoácidos más, capaces de unirse a β -catenina de manera independiente (Rubinfeld et al., 1995; Su et al., 1993). ICAT posee un dominio consenso de unión a β -catenina en su extremo carboxilo que se une del R5 al R9 de β -catenina mientras que su extremo N terminal sirve de ancla para unirse del R10 al R12 (Domingues et al., 2017) y la Menina también tiene más de un sitio de unión a β -catenina (Cao et al., 2009).

1.8 Estructura del núcleo celular

La envoltura nuclear (EN) está formada por una doble membrana y se puede dividir morfológicamente y bioquímicamente en tres estructuras, la membrana nuclear externa (MNE), la membrana nuclear interna (MNI) y el complejo del poro nuclear (CPN). La MNE es continua con el RE, contiene ribosomas y una gran cantidad de proteínas en común con el RE (Malhas, 2011). El CPN (complejo de 120 MDa) contiene alrededor de 30 nucleoporinas coordina la interacción con la cromatina (Nup53) y regula el transporte de moléculas del citoplasma al núcleo, el CPN forma un canal con 40 nm de diámetro interno y 100 nm de diámetro externo. La MNI contiene distintas proteínas que están en contacto con la lámina nuclear (red de filamentos que se encuentra en la cara interna de la EN) y la cromatina, contiene proteínas necesarias para mantener la estructura nuclear, para la organización de

los cromosomas, la reparación del DNA y el control transcripcional como emerina, SUN y el receptor a lamina B (Katta et al., 2014).

Se ha observado que la EN forma invaginaciones, como se ilustra en la Figura 4 que muestra las invaginaciones nucleares en núcleos de células MDCK polarizadas (Collado Hilly et al., 2010). Las invaginaciones pueden presentar MNI y MNE o solo MNI. También reciben el nombre de retículo nucleoplasmático y permiten un mayor contacto entre el nucleoplasma y el citoplasma (Malhas, 2011). Las invaginaciones con MNE contienen componentes del RE como la bomba de calcio de retículo sarco/endoplásmico (SERCA) y el receptor de inositol trisfosfato (IP3R) (Collado Hilly et al., 2010).

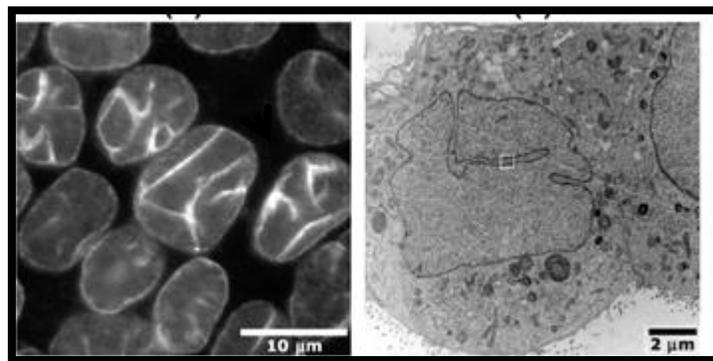


Figura 4. Invaginaciones de la envoltura nuclear de células MDCK. La imagen de la izquierda muestra una inmunofluorescencia contra emerina, una proteína asociada a la MNI. La imagen de la derecha corresponde a una imagen de microscopía electrónica de células MDCK con invaginaciones de la EN que penetran el núcleo. El cuadro señala la invaginación. Tomado de Mauger, 2012.

La EN, aísla el nucleoplasma del citoplasma y almacena Ca^{2+} alrededor del núcleo. La EN contiene todas las moléculas de las cascadas de señalización que conducen a la movilización del Ca^{2+} lo cual permite que el Ca^{2+} sea regulado de forma autónoma (Leite et al., 2003), aunque los transitorios de Ca^{2+} del citoplasma pueden propagarse dentro del núcleo a través del complejo del poro nuclear. Las variaciones en la concentración nuclear de Ca^{2+} son importantes para controlar la

transcripción y la estructura de la cromatina, así como para la progresión del ciclo celular (Gomes et al., 2006; Mauger, 2012).

1.9 Canales iónicos que regulan la expresión génica

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero directamente relacionado con la actividad transcripcional celular, los canales de Ca^{2+} son actores directos en este proceso. La regulación del Ca^{2+} nuclear tiene un papel crítico en muchos procesos celulares como apoptosis y transcripción de genes. La envoltura nuclear es un reservorio celular de Ca^{2+} y la liberación del Ca^{2+} nuclear es controlada por una variedad de canales iónicos (Mellström, 2008).

A continuación, se describen canales iónicos que se han encontrado en el núcleo celular y que se han relacionado con la regulación transcripcional:

Canales iónicos de Ca^{2+}

- El canal $\text{Ca}_v1.2$, un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje fue el primer canal de Ca^{2+} implicado directamente en regular la transcripción, su extremo C-terminal produce un péptido capaz de translocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción para modular directamente la expresión de una amplia variedad de genes neuronales, este péptido llamado CCAT se traduce a partir de un promotor interno en el gen CACNA1C (Gomez-Ospina et al., 2013; Gomez-Ospina et al., 2006)
- La subunidad β_1 $\text{Ca}_v\beta_{1a}$, una proteína auxiliar reguladora de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se transloca al núcleo y regula la expresión de miogenina en células progenitoras de musculo esquelético (Taylor et al., 2014).
- La subunidad β_4 del canal de calcio activado por voltaje CACNB4 se asocia a Ppp2r5d (una subunidad reguladora de la fosfatasa PPA2) y se translocan al núcleo donde se asocian al promotor del gen de tirosina hidroxilasa, PPA2 desfosforila histonas que inhiben la expresión de este gen, la inhibición es mediado por la actividad eléctrica del CACNB4 (Tadmouri et al., 2012).

Canales iónicos de K⁺

- Recientemente se describió que el canal de potasio activado por Ca²⁺ de alta conductancia (BKCa) se localiza en la envoltura nuclear y bloquear al canal BKCa de manera indirecta produce la entrada de Ca²⁺ al núcleo a través del receptor de rianodina regulando la expresión de genes relacionados con el factor de transcripción *cAMP response element-binding* (CREB) y la diferenciación neuronal (Li et al., 2014b).
- El canal Kv10.1 (canal de potasio activado por voltaje) se ha demostrado que se localiza en la MNI, se desconoce su función nuclear pero se ha propuesto que regula la homeostasis de K⁺ nuclear (Chen et al., 2011).
- El Kv1.3 (canal de K⁺ activado por voltaje) se localiza en el núcleo de varios tipos de líneas celulares cancerosas y de células del cerebro humano donde es capaz de regular la activación de factores de transcripción tales como CREB y c-Fos (Jang et al., 2015).

Canales iónicos de la familia TRP

- En *Caenorhabditis elegans*, se ha encontrado que un canal iónico de la subfamilia TRPV OCR-2 posee una señal de localización nuclear (NLS) funcional que regula su translocación al núcleo, no se encontró una relación directa entre la NLS y la expresión de genes pero conjeturan que regula la transcripción de genes neuronales (Ezak & Ferkey, 2011).
- El canal TRPM7 (también llamado chanzima) posee una región carboxilo terminal con actividad de cinasa la cual es proteolíticamente escindida de manera sitio-especifica del resto de la proteína de manera dependiente de Zn²⁺ y viaja al núcleo donde es capaz de fosforilar histonas en serina/treonina, regulando así la estructura de la cromatina, la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Krapivinsky et al., 2014).

Estas evidencias ponen de manifiesto la participación de los canales iónicos como moduladores de la actividad transcripcional celular.

1.10 Antecedentes directos

En el laboratorio estamos interesados en el estudio de los canales iónicos que regulan la proliferación y la diferenciación de células epiteliales. Nuestros estudios nos llevaron a identificar que el canal TRPV4 es necesario para el establecimiento de las uniones estrechas en la línea celular RCE1-3T3, un modelo celular del epitelio corneal y además regula su función de barrera en combinación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y por consecuencia la diferenciación (Martínez-Rendón et al., 2017).

Adicionalmente, observamos una localización inusual del canal TRPV4 en el núcleo de células RCE1-3T3 proliferativas y conforme el cultivo se va diferenciando el canal sale del núcleo y se localiza en el dominio apical de la capa más superficial del epitelio estratificado (Martínez-Rendón, 2016). Este cambio de localización subcelular nos pareció relevante porque sugería una función nuclear de TRPV4 que no había sido reportada. Inicialmente evaluamos si la detección del canal TRPV4 en el núcleo celular era real o si se trataba de algún artefacto experimental por lo que se decidió evaluar la localización nuclear de TRPV4 utilizando otra estrategia.

En las células de epitelio de riñón canino MDCK, TRPV4 se expresa en la membrana basolateral y en el cilio (Kottgen et al., 2008). En esta línea celular se confirmó que cuando se crecen a baja densidad celular y cuando no se han polarizado, el canal TRPV4 detectado por inmunofluorescencia se localiza en el núcleo celular. Al fraccionar proteínas citoplásmicas y nucleares de estos cultivos y analizarlas por western blot con 2 anticuerpos diferentes, uno que reconoce al extremo N-terminal y otro a un dominio extracelular del poro, se detectó con ambos anticuerpos una proteína de 122 kDa en las proteínas nucleares, sugiriendo que TRPV4 se encuentra completo en el núcleo (Matamoros-Volante, 2016).

Por otra parte, hay un reporte en la literatura donde se observa a TRPV4 en el núcleo celular de miocitos cardíacos de rata neonata en cultivo y después de ser

expuestos a un estímulo hipotónico, el canal se observa fuera del núcleo, sin embargo, en este trabajo no se explican por qué hay un cambio de localización subcelular del canal (Zhao et al., 2012).

Adicionalmente, se ha reportado que en los contactos de adhesión celular en queratinocitos epidérmicos, TRPV4 interactúa directamente con β -catenina a través de los primeros 235 aa del canal (Sokabe et al., 2010). β -catenina es una proteína que se transloca de las uniones adherentes al núcleo en donde se asocia al factor de transcripción TCF/LEF y regula la transcripción génica (Behrens et al 1996; Valenta et al 2012). La localización nuclear y citoplásmica de TRPV4 nos sugirió que el canal podría estar interactuando con β -catenina también en el núcleo.

2. Justificación

TRPV4 es un canal de activación polimodal que regula una gran variedad de eventos celulares dependientes de Ca^{2+} , incluyendo proliferación, migración y diferenciación.

Más de 60 mutaciones asociadas a enfermedades humanas han sido descritas a lo largo de la proteína de TRPV4, aunque no se ha podido relacionar de manera simple la actividad eléctrica del canal, con todos los fenotipos producidos por las mutaciones en TRPV4 lo que sugiere que el canal pudiera tener otras funciones celulares que aún no se han descrito por lo que es necesario estudiar en qué otro proceso celular estaría involucrado el canal TRPV4 para entender mejor las causas de dichas enfermedades.

Resultados de nuestro laboratorio sugirieron la presencia de TRPV4 en el núcleo en células RCE1-3T3 de epitelio corneal de conejo cuando las células están proliferando. Sin embargo, esta observación debía ser corroborada y de ser cierta, implicaba que TRPV4 tendría una función nuclear que no había sido reportada. Por lo que era importante demostrar fehacientemente la localización nuclear del canal TRPV4 y explorar su función en el núcleo celular. Así mismo, evaluar su posible relación funcional con β -catenina y, en consecuencia, con la regulación de la expresión génica.

3. Hipótesis

El canal TRPV4 interactúa directamente con β -catenina en el núcleo celular y regula su actividad transcripcional en células MDCK.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar el papel de TRPV4 en la actividad transcripcional dependiente de β -catenina.

4.2. Objetivos particulares

1. Demostrar la localización nuclear del canal TRPV4.
2. Investigar si el canal TRPV4 es funcional en células MDCK subconfluentes.
3. Evaluar el posible efecto de TRPV4 sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina.
4. Analizar si TRPV4 interactúa directamente con β -catenina.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo celular

Los experimentos se llevaron a cabo en la línea celular de epitelio renal MDCK (Madin Darby canine kidney) CCL-34TM derivadas de epitelio de riñón de perro, osteosarcoma humano Saos-2 (HTB-85TM) y neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266TM) provenientes de la ATCC® (American Type Culture Collection). MDCK y SH-SY5Y se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, No. de Catálogo 12100046, Gibco). El medio DMEM para MDCK fue suplementado con 25 mM de HEPES (Sigma). Las células Saos-2 fueron cultivadas en medio McCoy's 5A. Los cultivos celulares fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (No. de Catálogo 16000044, Gibco) y estreptomicina-penicilina (1X) (No. de Catálogo 15140122, Gibco). Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, bajo una atmósfera con 5 % de CO₂ y se cosecharon con una mezcla de tripsina-EDTA (No. de Catálogo 180206, In vitro) para las células MDCK y Saos-2 y tripsina-EDTA Gibco (No. de Catálogo 25200056,) para las SH-SY5Y. Las células MDCK se sembraron a una densidad de 2 x 10⁴ células/cm² y se analizaron 24 h después (cultivos subconfluentes no polarizados) o bien, donde se indica, se dejaron 7 días después del sembrado para obtener cultivos confluentes y polarizados.

5.2 Inmunofluorescencia

Se utilizó inmunofluorescencia indirecta para detectar la expresión y localización subcelular del canal TRPV4, tanto el endógeno como el transfectado. Las células MDCK fueron sembradas a 2 x 10⁴ células/cm² sobre cubreobjetos y fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% durante 10 min (en PBS y sacarosa 0.03M; pH 7.4) después de 24 h de cultivo (cultivos subconfluentes) o después de 7 días de cultivo (cultivos confluentes). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.05% en PBS durante 5 min. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon

incubando las células con Power Block 1X (No. de Catálogo HK083-5K, BioGenex) durante 5 min, posteriormente se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario indicado en cada experimento (Tabla 4). Después de la remoción del anticuerpo primario por 3 lavados con PBS, se incubaron durante 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4), y se lavaron 3 veces con PBS. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (1 µM) (No. de Catálogo H3569, Molecular Probes) durante 5 min y los cubreobjetos fueron montados con Vectashield (No. de Catálogo H-1000, Vector Laboratories) para ser observados en un microscopio confocal multifotónico Leica TCS SP8, (Leica Microsystems, Alemania) con el objetivo 63X. Se obtuvieron de 20 a 30 rebanadas ópticas consecutivas en el plano xy de 0.2-0.5 µm y 10 rebanadas ópticas transversales de 0.07 µm en el plano xz. Las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop CS3 para la construcción de las figuras.

En los experimentos indicados, el anticuerpo primario anti-TRPV4 C-terminal (No. de Catálogo ACC034, Alomone) fue incubado con el péptido bloqueador (No. de Catálogo BLP-CC034) en una relación de 1 µg por cada µg del anticuerpo en PBS durante toda la noche a 4°C. Para evaluar el cambio en la localización subcelular del canal TRPV4 al ser activado, las células MDCK fueron sembradas a subconfluencia (2×10^4 células/cm²) sobre cubreobjetos y 24 h después se activó al canal TRPV4, para esto, las células MDCK fueron incubadas durante 45 min en una solución hipotónica (210 mOsm/L, pH 7.4, en mM: 105 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa) o bien en una solución isotónica como control (300 mOsm/L, pH 7.4, en mM: 105 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa y 80 manitol). Alternativamente, las células MDCK fueron tratadas con el activador específico del canal TRPV4 4α-PDD (No. de Catálogo P8014, Sigma) a 10 µM (diluido en DMEM completo a partir de un stock 30 mM en DMSO) durante 30 min o con el vehículo 0.1% DMSO como control. Para inhibir la activación del canal, las células MDCK fueron pre-tratadas con el bloqueador específico del canal TRPV4, RN-1734 (No. de Catálogo R0658, Sigma) a 30 µM (preparado en DMEM a partir de una solución stock de 50 mM en DMSO) durante 10 min y posteriormente fueron tratadas con la solución hipotónica con bloqueador a la misma concentración. Al final de los

tratamientos, las células fueron lavadas 3 veces con PBS a TA y fijadas con PFA 4% para su análisis por inmunofluorescencia.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

MDCK		
Anticuerpo primario (especie)	No. de catálogo y marca	Dilución utilizada
Policlonal anti-TRPV4 que reconoce al C-terminal, (conejo)	ACC034; Alomone Labs	1:200
Policlonal anti-TRPV4 que reconoce al dominio extracelular, (conejo)	ACC124; Alomone Labs	1:50
Monoclonal anti-Flag, (ratón)	F1804; Sigma	1:500
Monoclonal anti- β -catenina, (ratón)	138400; Invitrogen	1:50
Policlonal anti-ZO1, (conejo)	QG215365; Life Technology	1:100
Policlonal anti-Lamina A/C, (conejo)	SC-20681; Santa Cruz Biotechnology	1:50
Saos-2 y SH-SY5Y		
Policlonal anti-TRPV4 que reconoce al C-terminal, (conejo)	ACC034; Alomone Labs	1:50
Policlonal anti-TRPV4 que reconoce al dominio extracelular, (conejo)	ACC124; Alomone Labs	1:50
Monoclonal anti- β -catenina, (ratón)	138400; Invitrogen	1:50
Anticuerpos secundarios		
Anti IgG de conejo hecho en cabra marcado con Alexa 488	A-11008; Thermo Fisher Scientific	1:200
Anti IgG de conejo hecho en cabra marcado con Alexa 594	A-111012; Thermo Fisher Scientific	1:200
Anti IgG de ratón hecho en pollo marcado con Alexa 488	A-21200; Thermo Fisher Scientific	1:200

5.3 Transfección de células MDCK

Las células MDCK fueron sembradas a 2×10^4 células/cm² en cajas de 35 mm de diámetro y 24 h después fueron transfectadas transitoriamente con 6 μ l de Lipofectamina 2000 (No. de Catálogo 11668-019, Invitrogen) y 4 μ g de DNA con las

diferentes construcciones del canal TRPV4 (ver Tabla Suplementaria 4). El DNA plasmídico se obtuvo por midiprep con el kit QIAGEN® *Plasmid Midi Kit* y se cuantificó por fluorimetría usando el kit DNA Quantitation (BioRad) con Hoechst 33258, la fluorescencia se midió en un Fluorómetro VersaFlour™ (BIO-RAD).

Las células transfectadas fueron fijadas con PFA 4% para su análisis por inmunofluorescencia o bien, lisadas para su análisis por Western blot después de 1, 2 y 3 días de transfección.

La expresión del canal TRPV4 transfectado fue evaluada utilizando un anticuerpo contra el epítipo Flag. En el experimento de inmunofluorescencia, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.5% en PBS por 5 min a TA.

5.4 Aislamiento de núcleos

Para evaluar la localización nuclear del canal TRPV4 se aislaron núcleos de células MDCK subconfluentes. Brevemente, las células crecidas a subconfluencia se recolectaron con tripsina como se mencionó anteriormente, las células fueron lisadas con buffer de lisis NP-40 [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40 y el coctel de inhibidor de proteasas Complete (1X No. de Catálogo 11836153001, Roche)] a 4°C y se homogenizaron pasando la muestra a través de una aguja calibre-27, por lo menos 20 veces a 4°C, para después ser centrifugadas a 1000 rpm por 10 min. La pastilla obtenida correspondió a los núcleos aislados (Fedorenko et al., 2010). Para los estudios de inmunofluorescencia, los núcleos fueron lavados y resuspendidos en PBS a 4°C y goteados sobre cubre objetos para permitir su adhesión incubando durante 30 min a 4°C, posteriormente se fijaron con PFA 4% a TA durante 5 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% en PBS durante 5 min a TA. Se realizaron experimentos solo con núcleos intactos y libres de contaminación de retículo endoplásmico.

5.5 Extracción de proteínas totales

Para verificar la expresión del canal TRPV4 transfectado así como para estimar su peso molecular se obtuvieron extractos de proteínas totales. Brevemente, se lavaron las células con PBS a 4 °C y se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% de NP-40, inhibidor de proteasas Complete 1X, pH 8.0) se homogenizó pasando el lisado a través de una jeringa de insulina al menos 15 veces y la muestra fue centrifugada a 13 000 rpm por 3 min, se recuperó el sobrenadante y se midieron las proteínas con el reactivo Coomassie Plus Protein Assay Reagent (No. de Catálogo 23236, Thermo scientific) y una curva estándar de 1 a 20 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) (No. de Catálogo 23209, Thermo scientific) en un espectrofotómetro (DU®650, Beckman, USA) a 595 nanómetros. Finalmente, las proteínas fueron mezcladas con el buffer de muestra 6X (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0.6M DTT y 0.02% azul de bromofenol) para obtener una concentración final de 1X, hervidas 5 min y separadas en geles de poliacrilamida-SDS.

5.6 Fraccionamiento celular

Para evaluar la localización nuclear y el peso molecular del canal TRPV4 presente en el núcleo celular, 2×10^6 células crecidas a subconfluencia o a confluencia fueron fraccionadas utilizando el kit NE-PER (No. de catálogo 78833, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del proveedor como se describe previamente por (Li et al., 2014b). Brevemente, las células fueron incubadas en hielo durante 10 min y despegadas con tripsina-EDTA, la pastilla celular se lavó 2 veces con 1.5 ml de PBS y se resuspendió en 200 µL de buffer CER I (frio) más 20 µL de inhibidor de proteasas Complete 10X durante 15 segundos en vórtex y a velocidad máxima, enseguida, se incubó 10 min en hielo. Se adicionaron 11 µl de buffer CER II y se agitó en vórtex 5 segundos seguido de una incubación en hielo por 1 minuto. La muestra se volvió a agitar en vórtex 5 segundos y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y correspondió al extracto

citoplasmático. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de buffer NER más 10 μ L de inhibidor de proteasas 10X (frio), se mezcló en vórtex a velocidad máxima durante 15 segundos, seguido de una incubación en hielo durante 10 min, se repitió la agitación cada 10 min hasta un total de 40 min a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min y el sobrenadante correspondió al extracto nuclear. Para fines comparativos, el extracto de proteínas totales se obtuvo a partir de 2×10^6 células por el método descrito anteriormente y se concentraron en un volumen final de 200 μ l de buffer de lisis de NP-40. Para el análisis de las proteínas se emplearon 5 μ g de proteínas nucleares (ej. 12.8 μ l), el doble del volumen para las proteínas citoplasmáticas (ej. 25.6 μ l) y un volumen equivalente para las proteínas totales (12.8 μ l). Las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE en geles al 8%, transferidas a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (No. de Catálogo 162-0177, Bio-Rad) y analizadas por Western blot.

5.7 Western blot

Se ocuparon un total de 20 μ g de proteínas totales para ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8 o 12% y bajo condiciones desnaturalizantes en buffer de corrida (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina y 0.1 % SDS). La integridad de las proteínas se verificó tiñendo el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie (Azul de Coomassie 0.2%, metanol 45%, ácido acético glacial 10%) durante 30 min. El exceso de colorante se lavó con solución desteñidora (metanol 45%, ácido acético glacial 10%).

Las proteínas a analizar se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF preequilibrada con metanol durante 1 minuto. Las proteínas se transfirieron a 400 mA y 100 V durante 2 h a 4°C en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 0.02% SDS y 5% de metanol).

Se confirmó la correcta transferencia tiñendo la membrana con rojo de Ponceau (0.1% p/v en ácido acético 5%), la membrana se destiñó con NaOH 0.1% durante máximo 1 min y se lavó con agua bidestilada, para después bloquear la membrana con una solución de leche libre de grasas al 10% en buffer TBS-T (Tris base 100

mM, NaCl 1.5 M y Tween 20 al 0.1%, pH 8) por 1 h a TA. Después de lavar la membrana 10 min a TA con TBS-T se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T-leche 5% y a la dilución indicada en la Tabla 5, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Después, se lavó la membrana con TBS-T en 6 ocasiones durante diez min cada vez y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 5) diluido en TBT-T-Leche 5% a TA. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-T en 6 ocasiones durante diez min cada vez. El revelado se realizó mediante el uso del kit de quimioluminiscencia (No. de catálogo sc: 2048, Santa Cruz Biotechnology) en una relación 1:1 y de placas autoradiográficas (No. de Catálogo 8609893, Carestream MXB Film).

Cuando fue necesario, la membrana se rasuró (eliminación de anticuerpos unidos) con la solución (SDS 10%, Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 y β -mercaptoetanol 0.8%) a 50°C durante máximo 10 min. La membrana se lavó 2 veces con TBS-T por 10 min, y posteriormente se bloqueó e incubó con el anticuerpo primario correspondiente como se describió previamente.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para Western blot

Anticuerpo primario (especie)	Cat. y marca	Dilución utilizada
Policlonal anti-TRPV4 que reconoce el C-terminal, (conejo)	ACC034; Alomone Labs	1:4000
Monoclonal anti-Flag, (ratón)	F1804; Sigma	1:1000
Policlonal anti-Myc, (conejo)	C3956; Sigma	1:1000
Monoclonal anti-GAPDH, (ratón)	Sc-32233; Santa Cruz Biotechnology	1:30 000
Monoclonal anti-Lamina A/C, (ratón)	sc-398927; Santa Cruz Biotechnology	1:500
Anticuerpos secundarios (especie)		
Anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa	626520; Invitrogen	1:5000

Anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa	656120; Invitrogen	1:5000
--	--------------------	--------

5.8 Medición de Ca²⁺ intracelular en células MDCK por imagen de Ca²⁺

Los cambios transitorios en el nivel del Ca²⁺ intracelular se midió con el indicador fluorescente de Ca²⁺ Fluo-4 AM (No. de catálogo F14201, Molecular Probes). Un día antes de la medición de Ca²⁺ intracelular, se sembraron 3 x10⁴ células/cm² en cajas de 35 mm con fondo de cristal (No. de catálogo P35G 1.514C, Mat Tek.). Para los registros de Ca²⁺ inicialmente, las células se lavaron tres veces con solución salina HBSS (en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 10 glucosa y 10 HEPES, pH7.4, 300 mOsm/L), se cargaron durante 30 min a 37°C con 5 µl del indicador fluorescente Fluo-4 AM (stock 1 mM, diluido en DMSO y ácido plurónico al 5%) en HBSS en un volumen final de 1 mL. Posteriormente se lavaron con HBSS tres veces, se mantuvieron en 1 mL de HBSS y se analizaron inmediatamente.

La actividad del canal TRPV4 se indujo perfundiendo por gravedad una solución salina HBSS con el activador específico 4α-PDD a 10 µM. Para bloquear la actividad del canal se usó el bloqueador específico de TRPV4, RN-1734 a 30 µM y/o el quelante de Ca²⁺ EGTA a 2 mM (stock 250 mM, 10 mM HEPES, pH 8.0) como se especifica en cada experimento.

En otra serie de experimentos se utilizó ATP 1 µM para evocar el aumento de Ca²⁺ intracelular previamente descrito en células MDCK (Collado Hilly et al., 2010) lo cual se usó como indicador de la viabilidad de las células.

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal (Zeiss LSM510 META, Alemania) con el objetivo 63X en una rebanada óptica de 1.6 µm. Se registró una imagen cada 10 segundos y un total de 120 imágenes (20 min de registro). Para la captura de las señales de Ca²⁺ fueron seleccionadas las Regiones de Interés (ROI) en el núcleo (ROI_n) y citoplasma (ROI_c) para medir los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula. Seleccionamos el ROI_n en el área central del núcleo y un ROI_c del mismo tamaño en el área del citoplasma a cierta distancia del núcleo

para asegurar que las señales de Ca^{2+} registradas se originaran principalmente del núcleo o citoplasma de la misma célula. Los tiempos de activación y bloqueo con los fármacos probados se describen en cada figura.

El análisis de imágenes se realizó con el programa Image J Fiji (Schindelin et al. 2012). Se usó la herramienta “*ROI Manager*” para medir la fluorescencia en la misma área seleccionada para la serie de imágenes (120 imágenes) de manera automática. Para la medición de los cambios de Ca^{2+} nuclear y citoplásmico se calculó la fluorescencia basal (F_0) que correspondió al promedio de la fluorescencia (F) de las primeras 5 imágenes antes de aplicar el estímulo. Los niveles de Ca^{2+} intracelular se expresaron como F/F_0 que corresponden a la fluorescencia (F) después de sustraerle la fluorescencia basal (F_0). Se graficó F/F_0 con respecto al tiempo de registro. ΔF corresponde al valor de la fluorescencia máxima de respuesta al pico en cada registro, después de sustraerle la fluorescencia basal (F_0) (Martinez-Rendon et al., 2017).

5.9 Ensayo de gen reportero para evaluar la actividad transcripcional dependiente de β -catenina

Se midió la actividad transcripcional dependiente de β -catenina utilizando el sistema de plásmidos pTOPFlash (wtTCF, plásmido reportero con la secuencia silvestre de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF) que expresa el gen reportero luciferasa y pFOPFlash (mutTCF, plásmido reportero con la secuencia mutante del sitio de unión de β -catenina/TCF). Brevemente, se cultivaron células MDCK (3×10^4 células/cm²) en placas de 12 pozos y 18 h después se transfectaron con 2 μl de Lipofectamina 2000 y 1 μg de DNA. La mezcla de plásmidos fue: el plásmido pTOPFlash o pFOPFlash, cotransfectado con β -catenina (WT o dominante activa), y cantidades crecientes referidas como 1X, 10X y 20X del plásmido que expresa al canal pGE-V4-Flag (tamaño, 5.9 kb) o de los plásmidos de los mutantes o el vector vacío en relación molar con respecto al plásmido de pGE-V4-Flag (Tabla Suplementaria 4). Para normalizar la eficiencia de transfección, se incluyó en la

mezcla el plásmido de luciferasa de Renilla (pRL-TK). La cantidad total de DNA usada en cada transfección fue ajustada a 1 µg con el plásmido pGEM®-T Easy que no interfiere con la medición del gen reportero.

Se evaluó también el efecto de la actividad transcripcional de β-catenina de diferentes vectores de expresión para seleccionar aquel que no inhibiera la actividad transcripcional de β-catenina de manera inespecífica. Para esto, se utilizaron cantidades crecientes referidas como 1X y 5X (ver apéndice Tabla Suplementaria Suplementaria 2).

En la Tabla 6 se muestran las cantidades de DNA de cada plásmido en cada condición experimental indicado en cada experimento. Los detalles y características de los plásmidos utilizados estos experimentos se encuentran en el apéndice Tabla Suplementaria 2 y 3.

Tabla 6. Cantidades de plásmidos utilizados para cada transfección

Plásmido	ng							
	1X, ng	5X, ng	10X, ng	20X, ng	1X, ng	5X, ng	10X, ng	20X, ng
pTOPFLASH o pFOPFLASH	400							
pRL-TK	25							
pMyc-β-catenina o pMyc-ΔN-β-catenina	50				pGEMT-Easy			
Plásmido	1X, ng	5X, ng	10X, ng	20X, ng	1X, ng	5X, ng	10X, ng	20X, ng
pGL4.10 luc2	100	500			425	25		
pcDNA3.1+	100	500			425	25		
pCMV-Tag 4A	100	500			425	25		
pGE-V4-Flag	25		250	500	500		275	25
pV41L-Flag	25		250	500	500		275	25
pGE-M680K-Flag	25		250	500	500		275	25
pGE-Δ235-Flag	22		220.3	440.7	503		304.7	84.3
pGE-Flag235	16.5		165.3	330.5	508.5		359.7	194.5
pGE-Δ410-Flag	19.9		199.2	398.3	505.1		325.8	126.7
pGE-Flag410	18.6		186.4	372.9	506.4		338.6	152.1
pCMV-ΔLuc	13.1		131.4	262.7	511.9		393.6	262.3

Se utilizaron dos preparaciones independientes de cada plásmido y cada transfección se hizo por duplicado en cada experimento.

La actividad de luciferasa se midió 24 h después de la transfección, las células se lisaron con 150 μ l de buffer pasivo de lisis 1X y se agregaron secuencialmente el sustrato para luciferasa de luciérnaga y posteriormente el de luciferasa de renilla, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dual Luciferase Reporter Assay System, No. de Catálogo E1910, Promega). Las muestras se analizaron en un luminómetro (Turner Designs TD-20/20). Se obtuvo el cociente de la actividad de luciferasa de luciérnaga entre la de luciferasa de Renilla para cada condición. Los datos son presentados como la media \pm error estándar del cociente pTOPFlash/pFOPFlash y normalizado con el promedio de pFOPFlash de cada condición experimental de al menos tres experimentos independientes y por cuadruplicado.

5.10 Ensayo de coimmunoprecipitación

Para evaluar la interacción del canal TRPV4 con β -catenina, se sembraron células MDCK (3×10^4 células/cm²) en cajas de 60 mm de diámetro y 18 h después fueron cotransfectadas con 10 μ g de DNA y 20 μ l de Lipofectamina 2000. Para la transfección se usó una mezcla del plásmido pMyc- β -catenina con cada uno de los diferentes plásmidos de TRPV4 ensayados o bien, el vector vacío en una relación molar de 3:1; 24 h después, las células fueron lisadas en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40 e inhibidor de proteasas Complete 1X).

Para la coimmunoprecipitación, 20 μ l de perlas de agarosa unidas a Proteína G recombinante (rProteínaG) (No. de Catálogo 15920-010, Invitrogen) fueron pre-incubadas con 2 μ g de anticuerpo anti-Flag o anti-Myc en 500 μ l de buffer de lisis por 2 h a 4°C en agitación rotatoria, posteriormente las perlas fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante un minuto para recuperar las perlas con el Ab unido. Por otro lado, aproximadamente 300 μ g de proteínas totales fueron pre-aclaradas con 30 μ l de perlas rProteínaG por 2 h a 4°C en agitación rotatoria. Posteriormente el lisado

fue centrifugado a 13 000 rpm 30 segundos para remover las perlas. El lisado pre-aclarado fue incubado con las perlas de rProteínaG que tenían unido al anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4°C con agitación rotatoria. Después de la incubación, las perlas fueron lavadas 3 veces con 1 mL de buffer de lisis por 5 min mantenidas en hielo y 2 veces con PBS también en hielo y centrifugando cada vez por 30 segundos a 13 000 rpm. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas fueron eluidas de las perlas en 20 µl de buffer de muestra 2X (100 mM Tris pH 6.8, 40 mM DTT, 2% SDS, 20% glicerol, 0.2% azul bromofenol) hirviendo por 5 min. El 100% de las proteínas eluidas y 15 µg del lisado total (*input*) fueron separados por electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF para su análisis por WB.

5.11 Ensayo de ligación por proximidad (Duolink® PLA)

Para evaluar la interacción in situ del canal TRPV4 y β -catenina se utilizó la técnica de Duolink. Se usó el kit comercial, Duolink™ *proximity ligation assay* (PLA®) (No. de catálogo DUO92101, Sigma). Para ello células MDCK (2×10^4 células/cm²) se sembraron en cajas de 35 mm con cubreobjetos de 1 cm², y a los tiempos indicados en cada experimento las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 min a TA., posteriormente se lavó una vez con PBS. Inmediatamente después se permeabilizaron con Tritón X-100 0.5% durante 10 min y se lavó 2 veces con PBS durante 5 min cada lavado. Enseguida se incubó durante 1 h con la solución de bloqueo a 37°C en una cámara húmeda y posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-TRPV4 C-terminal (1:150, Alomone) ó con el anti-TRPV4 Extracelular (1:50) a 4°C toda la noche y se lavaron 3 veces por 5 min con PBS. Después del último lavado las células se incubaron con el anticuerpo anti- β -catenina (1:50) durante toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS, cada lavado por 5 min. Después del último lavado, las células se incubaron con las sondas del kit diluidas 1:10 (ó 1:5 para la Figura 30) en buffer de dilución del kit. Todas las siguientes incubaciones fueron en un volumen final de 40 µl para 1 cm². Las sondas reconocen anticuerpos primarios de conejo (anti-conejo Plus, No.

de catálogo DUO92002, Sigma) y de ratón (anti-ratón Minus, No. de catálogo DUO92004, Sigma).

Después de 60 min de incubación de las sondas a 37°C en cámara húmeda las células se lavaron con 2 ml de la solución A 1X dos veces durante 5 min cada lavado. Posteriormente, las sondas se ligaron con 1U de Ligasa (Duolink kit) a 37°C en una cámara húmeda durante 30 min, seguido de 2 lavados con 2 ml de solución A 1X dos veces durante 2 min. Posteriormente las sondas se amplificaron con la polimerasa del kit (0.5 U) a 37°C en una cámara húmeda durante 100 min, después de lo cual, se lavaron 2 veces con 2 ml de la solución B 1X durante 10 min cada lavado. Finalmente se hizo un lavado con 2 mL de la solución B a 0.01 X por un min. En algunos casos, al término del PLA, las muestras se contrastaron por inmunodetección con el anticuerpo anti- ZO1 (1:100) incubando durante toda la noche a 4°C para evidenciar los bordes celulares, el anticuerpo se lavó 3 veces con PBS por 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 (1:200) por 1 h a 37 °C, se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada lavado y se dejaron secar las células a temperatura ambiente para posteriormente montar las muestras con Vectashield con DAPI. Para los datos de la cinética de la señal de PLA, los cubreobjetos fueron observados en un microscopio confocal multifotónico Leica (TCS SP8, Leica Microsystems, Alemania). Para el análisis cuantitativo de imágenes de PLA, la cantidad relativa de la señal fue comparada entre los grupos experimentales. En este caso, las imágenes fueron adquiridas usando el microscopio confocal multifotónico Leica (TCS SPE, Leica Microsystems, Alemania) con el objetivo 63X y la proyección máxima fue cuantificada con el programa Image J FIJI (Schindelin et al., 2012). Todas las imágenes RGB fueron convertidas a 8 bits con “*split channels*” para dividir los canales de fluorescencia y medir solo la fluorescencia en rojo, después de invertir los píxeles de blanco a negro, se cuantificaron los píxeles negros con la herramienta “*histogram*”, el valor máximo del histograma “*mode*” fue sustraído del valor “*count*” (valor del fondo), el valor obtenido como intensidad de fluorescencia fue normalizado con el control negativo que

correspondió a células incubadas sin el anticuerpo anti-TRPV4 o sin el anticuerpo anti- β -catenina.

5.12 Análisis estadístico

Los datos experimentales se expresaron como la media \pm el error estándar y se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Se utilizó la prueba t de Student's cuando se compararon dos grupos de datos. En los experimentos donde se compararon más de 2 grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $P > 0.05$ se consideró no significativo y $P < 0.01$ (*), $P < 0.001$ (**) y $P < 0.0001$ (***) se consideraron estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1 Localización subcelular del canal TRPV4 en células MDCK

Para evaluar la localización subcelular del canal TRPV4 endógeno en la línea celular MDCK, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Se exploró la localización del canal en las células MDCK tanto en condiciones de subconfluencia 24 h después de sembrar 2×10^4 células/cm², como en condiciones de confluencia, después de 7 días de cultivo. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.05% e incubadas con el anticuerpo anti-C-terminal de TRPV4 que reconoce la región entre los aminoácidos 853-871 (ACC-034; Alomone Labs) y, por otro lado, con el anti-TRPV4 extracelular que reconoce la región del poro (aminoácidos 647-662, ACC-124; Alomone Labs). En la Figura 5 se muestran imágenes de microscopia de confocal de un corte óptico en xy de 0.5 μ m, donde se puede observar al canal TRPV4 en el núcleo con ambos anticuerpos en células crecidas a subconfluencia, la localización nuclear es más evidente en los cortes laterales en xz donde se observa al canal en el núcleo celular (Figura 5A). En cultivos confluentes el canal se observa principalmente en el citoplasma y en los bordes celulares, como ha sido reportado previamente (Wegierski et al., 2009). Adicionalmente, se puede observar que al preincubar las muestras con el péptido bloqueador del anticuerpo anti-C-terminal se elimina la señal de TRPV4 demostrando así la especificidad de la inmunotinción (Figura 5A y 5B). Con el anticuerpo anti-TRPV4 extracelular el canal se observa principalmente afuera del núcleo en el citoplasma en células confluentes (Figura 5B).

Estos resultados indican que cuando las células están proliferando el canal se localiza en el núcleo y posteriormente cuando alcanzan la confluencia y forman una monocapa madura, el canal TRPV4 se observa principalmente fuera del núcleo. El desarrollo epitelial de las células MDCK parece estar acompañado de un cambio en la distribución subcelular del canal TRPV4 al igual que lo observado en células de epitelio corneal RCE1-3T3.

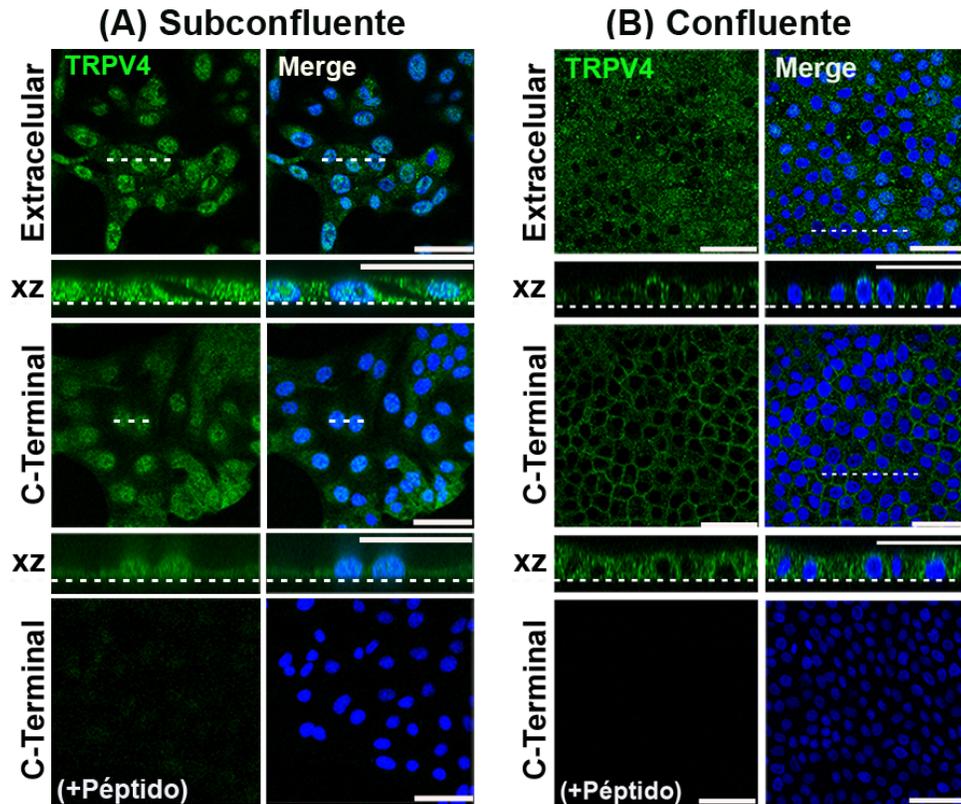


Figura 5. Inmunolocalización del canal TRPV4 endógeno en células MDCK subconfluentes y confluentes. Las células MDCK se sembraron a 2×10^4 células/cm², 24 h o 7 días después, se fijaron para tener cultivos subconfluentes (A) y confluentes (B) respectivamente. Se muestran imágenes de microscopía confocal de un corte óptico de células MDCK no polarizadas. TRPV4 (verde) fue detectado con 2 diferentes anticuerpos que reconocen al dominio cercano al poro (Extracelular) o bien al dominio C-terminal, en células no polarizadas el canal se observa principalmente en el núcleo y poca señal en el citoplasma celular. En las células polarizadas el canal se observa principalmente en el citoplasma y en los bordes de las células. En presencia del péptido bloqueador (+Péptido) del anticuerpo que reconoce el C-terminal de TRPV4 se elimina la señal fluorescente evidenciando la especificidad del anticuerpo. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Las imágenes corresponden a una rebanada óptica (xy) de 0.5 μ m. En el corte transversal se muestra la colocalización de la señal del canal con los núcleos. Se realizaron rebanadas ópticas laterales en el plano xz de 0.07 μ m y las imágenes corresponden a la

proyección de 10 cortes ópticos. La línea discontinua indica el nivel del corte lateral en xy y en los cortes xz, la línea punteada corresponde a la parte basal del epitelio. Barra = 50 μm

6.2 Análisis de la localización nuclear de TRPV4

Para evaluar si el canal TRPV4 nuclear correspondía a la proteína completa se aislaron proteínas a partir de cultivos de células MDCK y se separaron las proteínas de la fracción nuclear y de la fracción citoplasmática para su análisis por western blot. Se analizaron las proteínas de cultivos subconfluentes y confluentes. Para la inmunodetección del canal se utilizó el anticuerpo anti C-terminal. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos, en proteínas totales se observa claramente la banda de 98 kDa (correspondiente al canal no glicosilado) y la banda de 122 kDa (correspondiente al canal glicosilado) (Martinez-Rendon et al., 2017). En la fracción nuclear de células subconfluentes (Figura 6A), se observa la banda de 98 kDa que parece ser más abundante que la de 122 kDa, ambas bandas fueron también observadas en la fracción citoplasmática. En los extractos de células confluentes se observaron resultados similares (Figura 6B). Las muestras se analizaron posteriormente con los anticuerpos anti-Lámina A/C y anti-GAPDH como control de la pureza de la fracción nuclear y citoplasmática respectivamente. Estos resultados indican que la proteína TRPV4 se encuentra completa en el núcleo. Además, no se encontraron diferencias en la cantidad de proteína del canal en la fracción nuclear en células subconfluentes y confluentes.

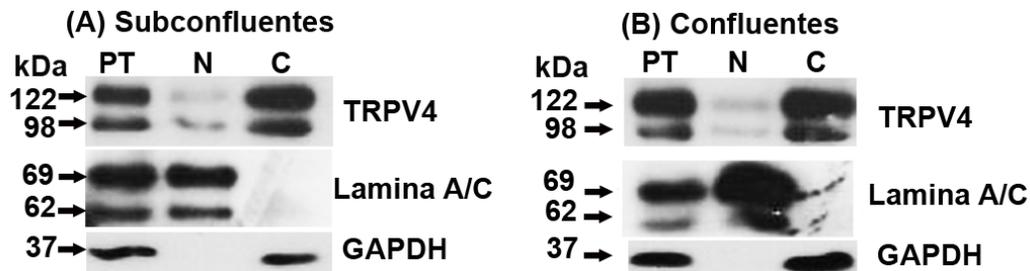


Figura 6. Detección del canal TRPV4 en la fracción de proteína nucleares en células MDCK subconfluentes y confluentes. Células MDCK se sembraron a 2×10^4 células/cm²,

24 h o 7 días después se lisaron para obtener proteínas totales o bien, para fraccionar las proteínas en nucleares y citoplásmicas para posteriormente analizarlas por Western blot con el anticuerpo anti-TRPV4-C-terminal. (A) Extractos de células subconfluentes y (B) extractos de células confluentes; PT, proteínas totales., N fracción nuclear y C fracción citoplásmica. Las 2 bandas observadas corresponden a TRPV4 y su forma glicosilada de 98 y 122 kDa respectivamente. Lámina A/C y GAPDH fueron inmunodetectadas como controles de pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas respectivamente.

Para confirmar la localización nuclear del canal TRPV4 endógeno en células MDCK, se aislaron núcleos para inmunodetectar al canal TRPV4 con el anticuerpo que reconoce el extremo carboxilo del canal. Las células fueron sembradas a 2×10^4 células/cm² y se aislaron núcleos de células crecidas en condiciones de subconfluencia. En la Figura 7 se observa que el canal TRPV4 presenta un patrón de distribución similar al de la envoltura nuclear, incluidas las invaginaciones de la membrana nuclear (Figura 7B) (Collado Hilly et al., 2010; Malhas, 2011). En la Figura 7A se muestra un esquema de la EN para facilitar la interpretación de la imagen de la Figura 7B.

Estos resultados en su conjunto, demuestran que el canal TRPV4 se localiza en la envoltura nuclear y está completo.

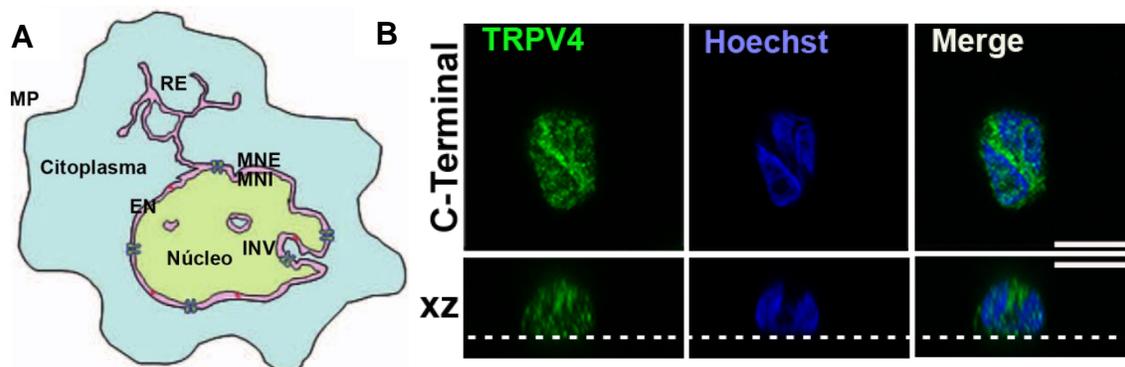


Figura 7. El canal TRPV4 se localiza en la envoltura nuclear. (A) Esquema de la estructura del núcleo celular donde se muestra la envoltura nuclear y las invaginaciones que puede formar. MP: membrana plasmática; RE: retículo endoplásmico; EN: envoltura nuclear, MNI: membrana nuclear interna; MNE: membrana nuclear externa; INV invaginación. Se muestra una célula completa esquematizando la conexión entre el RE y la

EN. La EN presenta invaginaciones (hendiduras) compuestas de una sola membrana MNE o compuesta por las dos membranas (interna y externa). Tomado de Malhas *et. al*/2011 (B) Imagen representativa de un núcleo aislado de una célula en cultivo subconfluyente donde se observa la presencia del canal TRPV4 detectado con el anticuerpo anti-TRPV4-C-terminal. Los núcleos fueron permeabilizados con Tritón X-100 0.2% y teñidos con Hoechst. La sección óptica transversal (xz) de 0.6 μm muestra la señal de TRPV4 en un zurco del núcleo formado por las invaginaciones de la envoltura nuclear. Barra = 10 μm

6.3 Detección nuclear del canal TRPV4 transfectado

Para demostrar que la proteína del canal TRPV4 es capaz de direccionarse al núcleo celular se clonó la secuencia completa del canal y se le fusionó un epítipo Flag en el extremo C-terminal (plásmido pGE-V4-Flag, Tabla Suplementaria 4). Las células MDCK fueron sembradas a 2×10^4 células/cm² y 24 h después fueron transfectadas con esta construcción. La Figura 8A muestra la localización de TRPV4-Flag después de 24 h de expresión se observa el canal TRPV4 alrededor del núcleo y en las invaginaciones de la envoltura nuclear además de algo de señal en el citoplasma.

En la Figura 8B se documenta la localización subcelular del canal TRPV4-Flag 48 y 72 h postransfección. Se puede observar que el canal TRPV4 al segundo día de expresión se acumula dentro de la célula y se comienza a ver en los bordes celulares, esta localización en la periferia celular es más evidente al tercer día de expresión, sin embargo, se observan menos células expresando al canal TRPV4. Estos resultados en conjunto demuestran que la proteína completa del canal TRPV4 transfectada es capaz de llegar al núcleo de células MDCK subconfluentes al igual que el canal endógeno. Además, nuestros resultados sugieren que el canal primero se dirige al núcleo celular y posteriormente a la membrana plasmática.

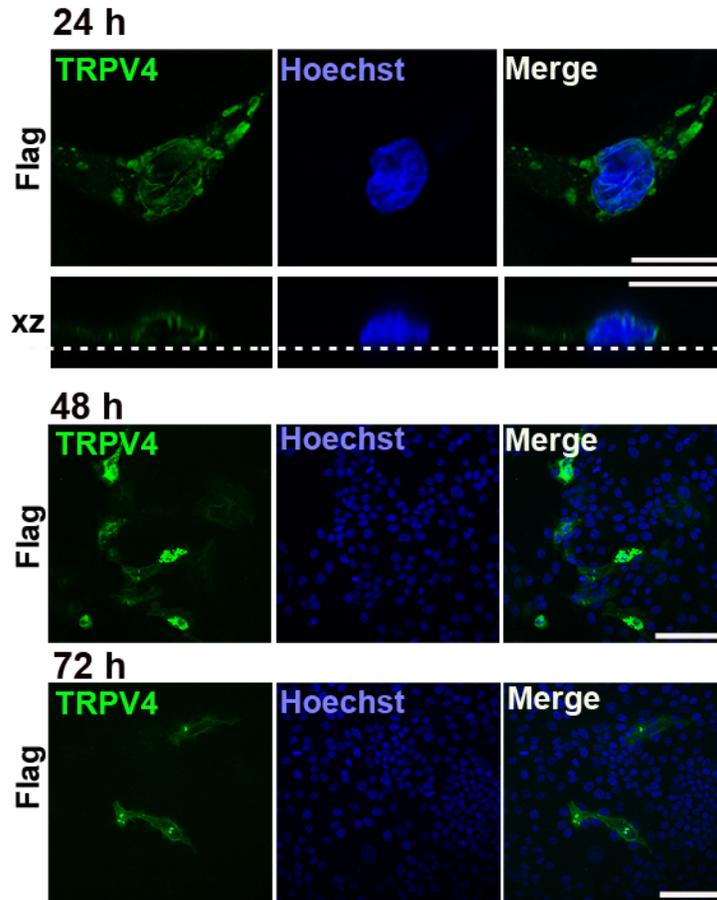


Figura 8. El canal TRPV4 transfectado es capaz de dirigirse a la envoltura nuclear y después a la membrana plasmática. El canal TRPV4 se marcó fusionándole un epítipo Flag en el extremo carboxilo terminal (pGE-V4-Flag) y fue transfectado transitoriamente en células MDCK subconfluentes, 24, 48 y 72 h después las células fueron fijadas y permeabilizadas con Tritón-X100 0.5%. EL canal transfectado se detectó con un anticuerpo anti-Flag. El canal se detectó en el núcleo 24 h postransfección, en el corte transversal (xz) se observa el canal alrededor del núcleo lo que sugiere que el canal se encuentra en la EN en estructuras que corresponderían a invaginaciones de la EN. Se muestra un corte óptico de 0.2 μm . Barra = 25 μm . A 48 h postransfección, el canal está mayoritariamente en el citoplasma mientras y a 72 h la señal se concentra en los bordes celulares sugiriendo la localización del canal en la membrana plasmática. Las imágenes corresponden a la proyección máxima de 25 cortes consecutivos de 0.5 μm obtenidos por microscopia confocal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barra = 50 μm .

6.4 Medición del Ca²⁺ nuclear y citoplásmico en células MDCK subconfluentes

Se ha reportado que el canal TRPV4 es funcional en células MDCK polarizadas (Kottgen et al., 2008), sin embargo, se desconocía si era funcional en células MDCK subconfluentes. Para evaluarlo, se analizaron cultivos subconfluentes de células MDCK (cuando el canal TRPV4 esta principalmente en el núcleo) y se midieron los cambios en el Ca²⁺ intracelular por imagen de Ca²⁺ con microscopia confocal. Para ello, se sembraron 3 x10⁴ células/cm² en cajas petri con fondo de cristal y se cultivaron durante 24 h, después de este tiempo fueron cargadas durante 30 min con el indicador de calcio Fluo-4 AM (5 μM).

Las imágenes se obtuvieron seleccionando una rebanada óptica de 1.6 μm posicionada al centro de los núcleos celulares para asegurar que se estuvieran midiendo cambios de fluorescencia dentro del núcleo. En la Figura 9, se muestra la dinámica de Ca²⁺ en las células MDCK subconfluentes cargadas con el indicador Fluo-4 AM y perfundidas con el activador específico de TRPV4 4α-PDD a 10 μM. La Figura 9A ilustra las Regiones de Interés (ROI) seleccionadas en el área central del núcleo (ROI_n, rojo) y una ROI del mismo tamaño en el área del citoplasma (ROI_c, azul) alejada del núcleo para asegurar que las señales de Ca²⁺ registradas no se traslaparan y pudieran registrarse los datos del cambio de fluorescencia del núcleo o del citoplasma de la misma célula. La Figura 9 B muestra un trazo representativo de los cambios de Ca²⁺ en el núcleo y citoplasma registrados simultáneamente durante la perfusión de 4α-PDD (10 μM), la amplitud del transitorio de Ca²⁺ (F/F₀) aumentó tanto en el núcleo celular (gráfica roja) como en el citoplasma (gráfica azul). El tiempo que tarda en obtenerse la magnitud máxima de aumento de Ca²⁺, es decir el tiempo de retardo, fue de varios segundos (520) posteriores a la aplicación del activador, la disminución del Ca²⁺ fue lenta y no retornó a los niveles basales en el tiempo registrado (20 min) en ambos núcleo y citoplasma. La gráfica de barras de la Figura 9 C muestra el promedio de la respuesta máxima (ΔF/F₀) del transitorio de Ca²⁺ de 27 células analizadas, el aumento fue de mayor magnitud en

el núcleo, 5.3 ± 0.5 veces que en el citoplasma 2.2 ± 0.2 veces con respecto a los niveles basales.

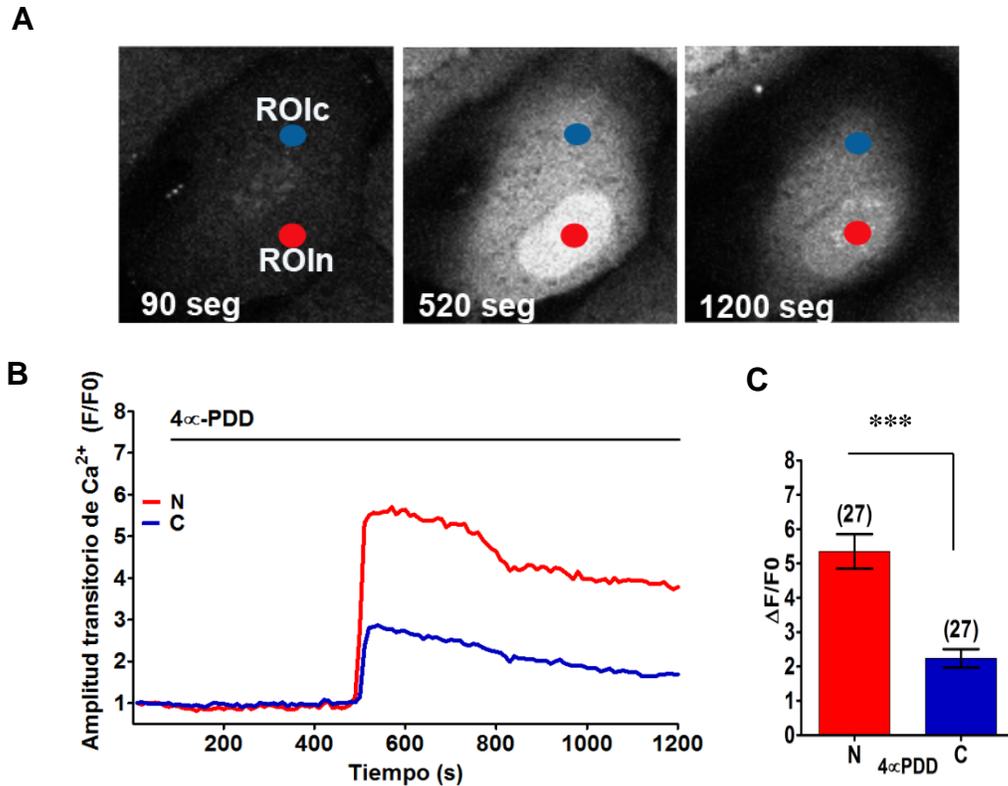


Figura 9. Aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplasmático evocado por 4α -PDD $10 \mu M$. Las células MDCK se sembraron a una densidad de 3×10^4 células/cm² y 24 h después se midieron los niveles de Ca^{2+} en el núcleo y en el citoplasma. Las células fueron cargadas con el indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM durante 30 min a 37°C y perfundidas con 4α -PDD en solución salina (HBSS) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En A se ejemplifican las regiones de interés (ROI) para el núcleo (ROIIn, rojo) y para el citoplasma (ROIc, azul). Izquierda, imagen obtenida antes de la aplicación de 4α -PDD (90 segundos), en medio, se muestra la imagen observada al pico de la respuesta (520 segundos) evocada por la aplicación de 4α -PDD y a la derecha la imagen correspondiente al final del registro (1200 segundos). (B) Trazos representativos del aumento de Ca^{2+} en el núcleo (N, gráfica roja) y en el citoplasma (C, gráfica azul) evocado por la perfusión de 4α -PDD $10 \mu M$ a los 100 segundos del inicio del registro, la línea superior indica la duración del estímulo. (C) Gráfica de los valores promedio del cambio máximo en la fluorescencia inducido por 4α -PDD $10 \mu M$ con respecto a la fluorescencia basal en el núcleo (N, barra roja, 5.3 ± 0.5) y el

citoplasma (C, barra azul, 2.2 ± 0.2). Los valores corresponden a la media \pm error estándar y los números sobre las barras indican el número de células registradas en cada condición. Se utilizó la prueba t de Student's para el análisis estadístico, $P < 0.0001$ (***)).

EL 100% de las células registradas respondieron al activador 4α -PDD $10 \mu\text{M}$ y lo hicieron de manera heterogénea, la magnitud de la respuesta máxima fue diferente en cada célula como lo muestra el histograma de la Figura 10 (A, C), generando aumentos de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) con diferentes magnitudes tanto en núcleo (Figura 10 A) como en citoplasma (Figura 10 C). De igual manera el tiempo de retardo para alcanzar la respuesta máxima fue heterogéneo por lo que se evaluó si el tiempo de retardo estaba relacionado con la magnitud de la respuesta máxima ($\Delta F/F_0$). En la Figura 10 se muestra una gráfica de dispersión de $\Delta F/F_0$ de cada célula con respecto al tiempo de retardo, donde se puede observar que no existe una correlación entre la magnitud de respuesta y el tiempo de retardo en el núcleo (Figura 10 B) ni en el citoplasma (Figura 10 D). Estas diferencias de magnitud de respuesta de las células podrían estar relacionadas con las diferencias de la cantidad de canales expresados en el núcleo y/o membrana plasmática.

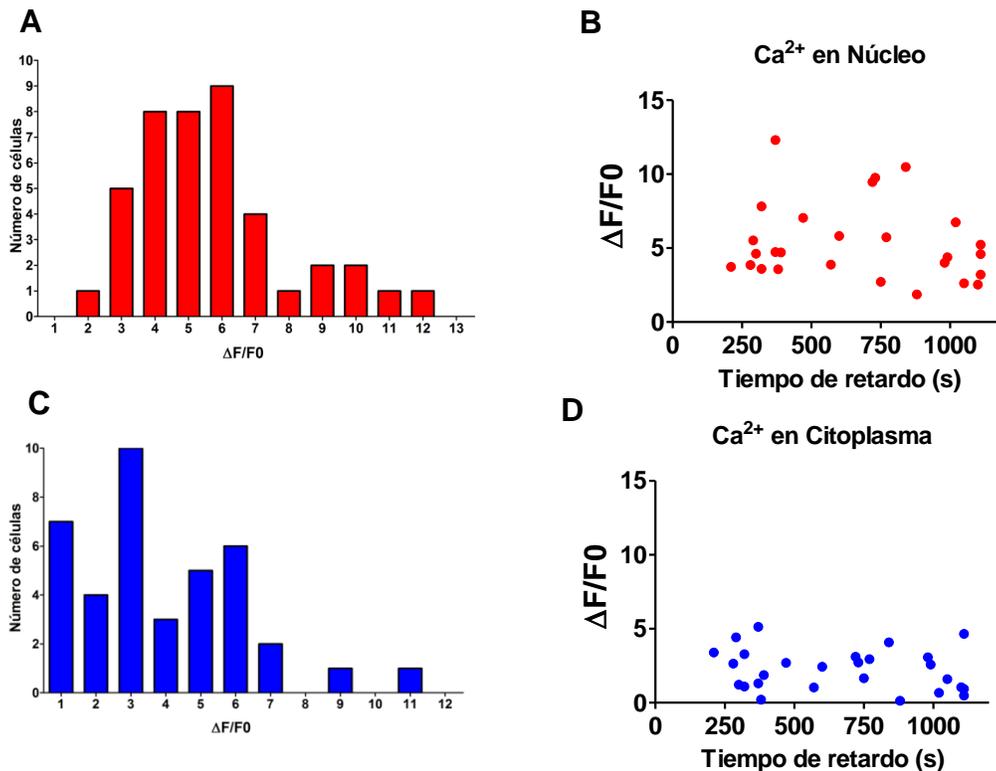


Figura 10. Falta de correlación entre el tiempo de retardo y la magnitud de la respuesta máxima de la activación del canal TRPV4 por 4 α -PDD en células MDCK subconfluentes. (A y C) Histograma de la respuesta máxima ($\Delta F/F_0$) del incremento de Ca^{2+} en el núcleo y citoplasma respectivamente de las 27 células de los datos de la Figura 9 en presencia del activador del canal TRPV4 4 α -PDD 10 μ M. (B y D), Gráficas de la distribución del tiempo de retardo para observar la respuesta máxima a 4 α -PDD en el núcleo y en el citoplasma respectivamente.

Por otro lado, se pudo observar que la entrada de Ca^{2+} al núcleo y al citoplasma inducidos por 4 α -PDD requiere del Ca^{2+} extracelular ya que la presencia de EGTA (2 mM) redujo la señal de Ca^{2+} en ambos compartimentos celulares (Figura 11 A), la gráfica de barras muestra el porcentaje de respuesta máxima remanente después de la adición de EGTA y al final del registro (20 min) en el núcleo (rojo) 20.2 ± 2.7 y 23.1 ± 4.0 % en el citoplasma (azul) (Figura 11 B).

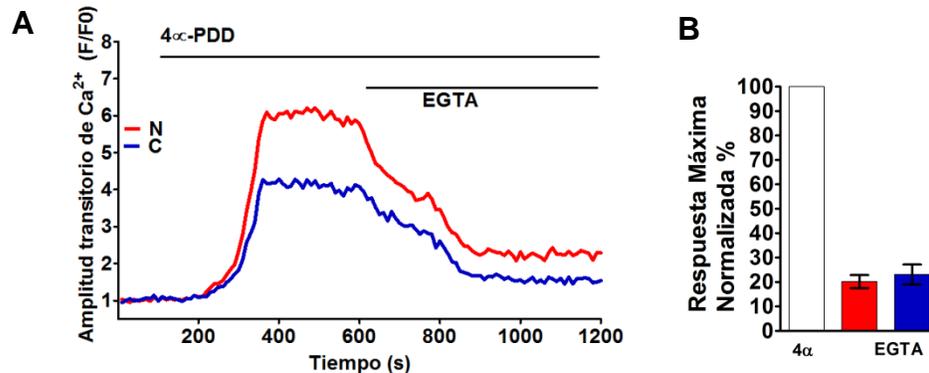


Figura 11. El aumento de Ca^{2+} evocado por 4 α -PDD es disminuido por EGTA. Células MDCK subconfluentes fueron estimuladas con la perfusión de 4 α -PDD 10 μ M para inducir el aumento de Ca^{2+} intracelular y posteriormente se agregó el quelante de Ca^{2+} EGTA a 2 mM en el medio extracelular. (A) Trazos representativos de la señal de Ca^{2+} en el núcleo (gráfica roja) y en el citoplasma (gráfica azul) en respuesta a la adición de 4 α -PDD y el efecto de la subsecuente adición de EGTA, las líneas en la parte superior indican la presencia de los fármacos durante el registro. (B) Gráfica que resume los datos cuantitativos del % de la respuesta máxima remanente después de la aplicación de EGTA, se graficaron

los datos de 33 células registradas. Se confirmó que se requiere la entrada del ion Ca^{2+} a la célula para inducir el aumento de Ca^{2+} tanto citoplasmático como nuclear.

Por otro lado, se pudo observar que la entrada de Ca^{2+} al núcleo y al citoplasma inducida por 4 α -PDD es bloqueada parcialmente por la presencia de RN-1734 30 μM , el bloqueador RN-1734 redujo la señal de Ca^{2+} tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 12), la gráfica de barras muestra el porcentaje de respuesta máxima remanente después de la adición del RN-1734 y al final del registro (20 min) en el núcleo (rojo) 38.4 ± 3.7 y 37.6 ± 3.4 % en el citoplasma (azul) (Figura 12 B).

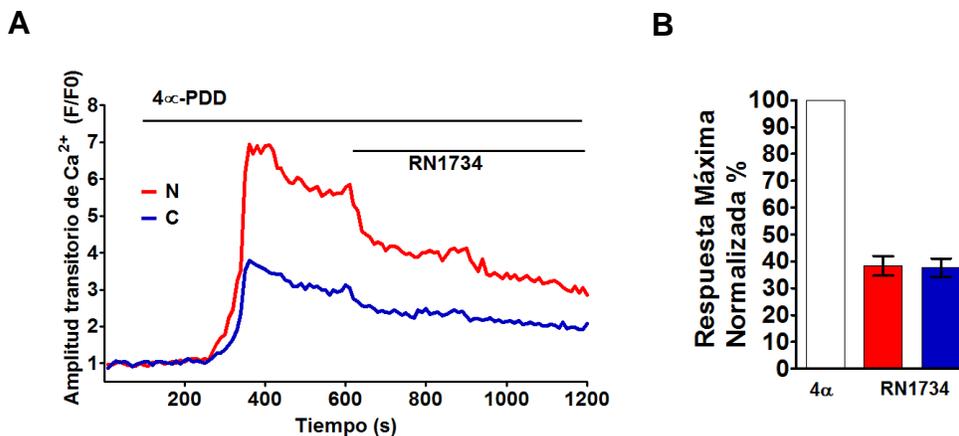


Figura 12. El aumento de Ca^{2+} evocado por 4 α -PDD es disminuido por el bloqueador RN-1734. En experimentos similares a los descritos en la figura 9, se trataron células MDCK subconfluentes con 4 α -PDD 10 μM para inducir el aumento de Ca^{2+} intracelular y posteriormente se agregó el bloqueador de TRPV4, RN-1734 (30 μM) en el medio extracelular. (A) Trazos representativos de la señal de Ca^{2+} en el núcleo (gráfica roja) y en el citoplasma (gráfica azul) en respuesta a la adición de 4 α -PDD y el efecto de la subsecuente adición de RN-1734, las líneas en la parte superior indican la presencia de los fármacos durante el registro. (B) Gráfica que resume los datos cuantitativos del % de la respuesta máxima remanente después de la aplicación de RN-1734, se graficaron los datos de 35 células registradas. Se encontró que el bloqueo de TRPV4 disminuye parcialmente tanto la señal de Ca^{2+} citoplasmático como nuclear.

Para demostrar que el aumento de Ca^{2+} se debe a la activación de TRPV4 por 4 α -PDD, las células MDCK fueron incubadas durante 5 min con el inhibidor específico

RN-1734 (30 μ M) y posteriormente se perfundi3 el activador 4 α -PDD y se registr3 durante 15 min, enseguida las c3lulas se lavaron 5 min y se registraron nuevamente con solo 4 α -PDD durante 20 min. Durante el primer registro, las c3lulas no fueron capaces de inducir el aumento de Ca²⁺ intracelular (Figura 13 A), la gr3fica de barras de la Figura 13 B, compara los aumentos promedio ($\Delta F/F_0$) de las se3ales de Ca²⁺ inducidas por 4 α -PDD en presencia y ausencia de RN-1734. En el n3cleo, en presencia de RN-1734 la se3al de Ca²⁺ fue de $-0.19 \pm .0$ veces y en ausencia fue de 2.4 ± 0.2 veces con respecto a la basal; en el citoplasma se observ3 tambi3n una nula respuesta en presencia de RN-1734 de -0.2 ± 0.03 veces y en ausencia de RN-1734 el aumento de Ca²⁺ fue de 1.4 ± 0.1 veces con respeto a la basal. Demostrando que el incremento de Ca²⁺ evocado por la estimulaci3n con 4 α -PDD se debe a la activaci3n de canales TRPV4.

En conjunto todos estos resultados demuestran que el canal es funcional en las c3lulas MDCK subconfluentes y TRPV4 regula la entrada de Ca²⁺ al n3cleo y al citoplasma.

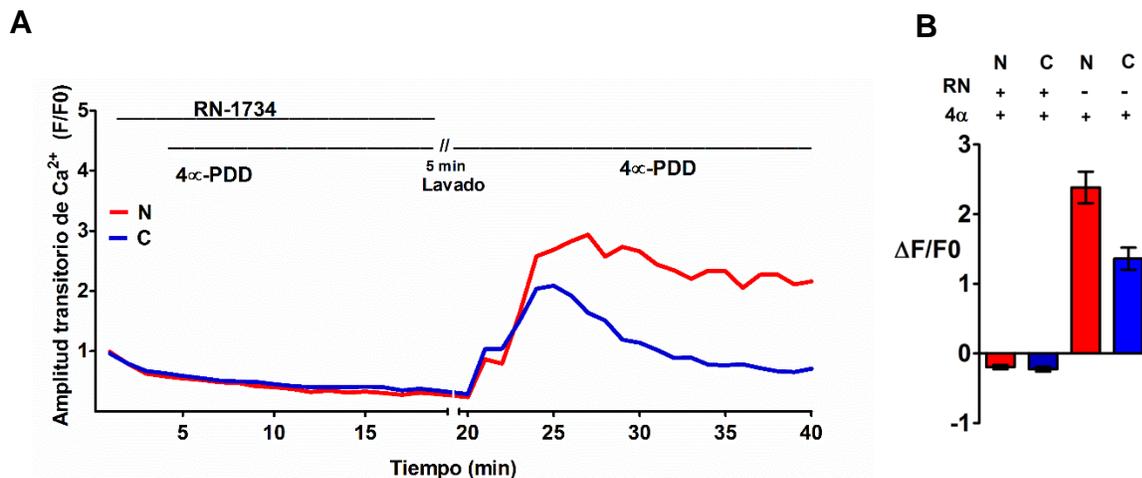


Figura 13. El aumento de Ca²⁺ nuclear y citoplasm3tico evocado por 4 α -PDD se debe a la activaci3n de TRPV4 en c3lulas MDCK subconfluentes. Las c3lulas MDCK subconfluentes fueron perfundidas con el bloqueador del canal TRPV4 -RN-1734 (30 μ M) y posteriormente se perfundi3 el activador del canal TRPV4 4 α -PDD, en estas condiciones no se observ3 ning3n cambio en la concentraci3n intracelular de Ca²⁺. El bloqueo se

mantuvo durante todo el registro de 20 min y después se lavó con buffer HBSS durante 5 min y se aplicó nuevamente el 4 α -PDD. (A) Trazo representativo del bloqueo de la señal de Ca²⁺ en presencia de RN-1734 y posterior aumento de Ca²⁺ en el núcleo y en el citoplasma debida al activador 4 α -PDD. La barra indica la duración del estímulo. (B) Gráfica con el promedio del cambio en la fluorescencia inducido por 4 α -PDD con respecto a la fluorescencia basal en ausencia y presencia de RN-1734 de 35 células consideradas. Se confirma que es necesaria la activación del canal TRPV4 para un aumento de Ca²⁺ en el núcleo (N, barra roja, 2.4 ± 0.22) y el citoplasma (C, barra azul, 1.4 ± 0.15).

El aumento en el Ca²⁺ intracelular y particularmente nuclear, ya ha sido reportado en células MDCK subconfluentes en respuesta al ATP a través de una vía de señalización de Ca²⁺ que involucra la activación de receptores purinérgicos (P2Y) y, subsecuentemente, de receptores a IP3 (Koltsova et al., 2011).

Por esta razón, decidimos registrar los cambios de Ca²⁺ evocados por la perfusión de ATP 1 μ M en nuestras condiciones de registro para comparar la respuesta a este segundo mensajero con los registros evocados por la activación de TRPV4.

En la Figura 14 se observa el aumento de Ca²⁺ en el núcleo y en el citoplasma inducidos por ATP 1 μ M, se puede observar que el aumento en el Ca²⁺ intracelular es inmediato a la aplicación de ATP (100 segundos), con una disminución rápida del Ca²⁺ que posteriormente retorna a los niveles basales en ambos compartimentos intracelulares (Figura 14 A) correspondiendo a lo ya reportado previamente (Collado Hilly et al., 2010). El aumento de Ca²⁺ de la respuesta máxima al pico ($\Delta F/F_0$) en el núcleo debido a ATP fue 4.9 ± 0.2 veces y en el citoplasma de 1.63 ± 0.1 veces con respecto al Ca²⁺ basal, siendo de mayor magnitud en el núcleo (Figura 14 B). El análisis del tiempo que se requiere para observar la respuesta máxima debida a ATP reveló una distribución homogénea y sincronizada donde 31 células de las registradas responden inmediatamente (100 segundos) al estímulo de ATP tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 14 C y D). Las células que responden a ATP lo hacen de manera homogénea a diferencia de las que responden a 4 α -PDD que presentan un rango de tiempo de retardo mayor y muy variable, además los trazos

del aumento de Ca^{2+} tanto en núcleo como citoplasma son diferentes sugiriendo que las vías de señalización de aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplásmico son diferentes para ATP y 4 α -PDD.

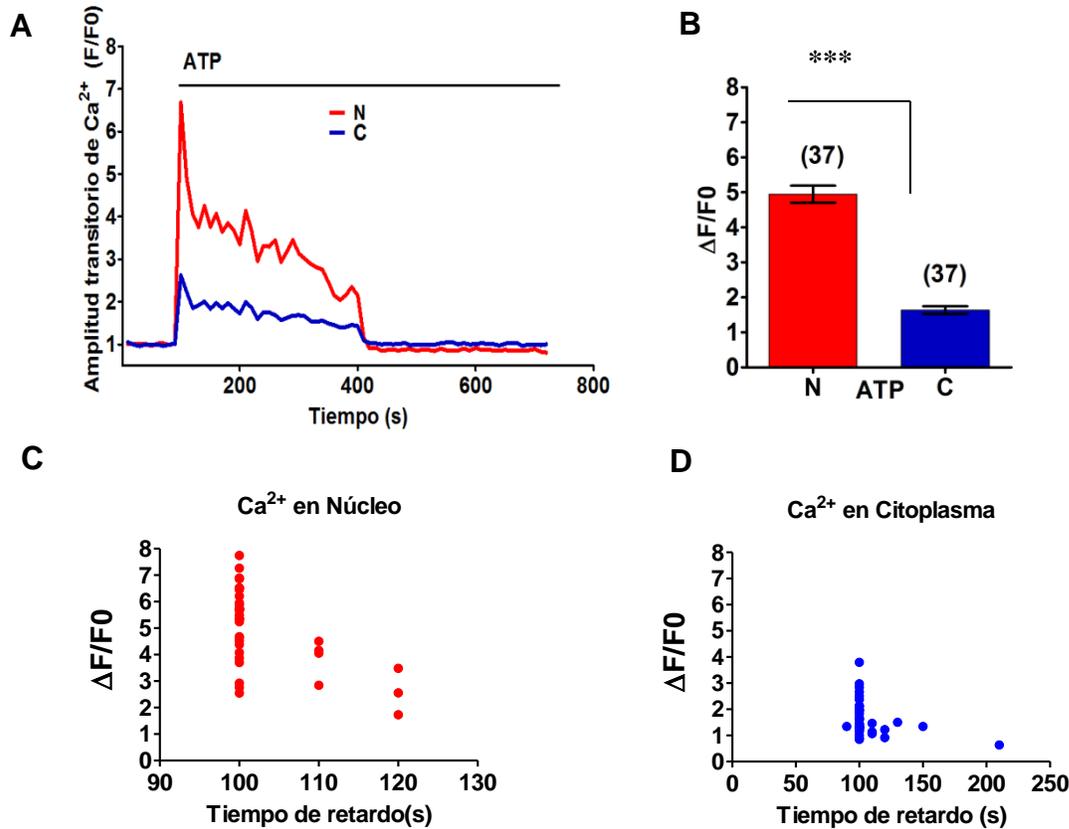


Figura 14. Aumento de Ca^{2+} nuclear y citoplásmico evocado por ATP 1 μM . Las células MDCK se sembraron a 3×10^4 células/ cm^2 , y 24 h después se cargaron con Fluo-4 AM para medir el Ca^{2+} en el núcleo y en el citoplasma. (A) Trazos representativos del aumento de Ca^{2+} en respuesta al estímulo de ATP 1 μM extracelular tanto en el núcleo (N, gráfica roja) como en el citoplasma (C, gráfica azul). La línea superior indica el tiempo en que estuvo presente el ATP durante el registro. (B) Gráfica de los valores promedio del cambio máximo en la fluorescencia inducido por ATP 1 μM con respecto a la fluorescencia basal en el núcleo (N, barra roja, 4.9 ± 0.2) y el citoplasma (C, barra azul, 1.63 ± 0.1). Los valores corresponden a la media \pm error estándar y los números sobre las barras indican el número de células registradas en cada condición. Se utilizó la prueba t de Student's para el análisis estadístico, $P < 0.0001$ (***) . (C y D) Distribución de la respuesta máxima de las 37 células registradas en B con respecto al tiempo de respuesta en núcleo y citoplasma respectivamente.

6.5 La activación de TRPV4 modifica la localización subcelular de β -catenina

Observaciones previas de Zhao *et. al* (2012) describieron una inusual localización nuclear de TRPV4 en miocitos de rata y que posterior a la incubación de las células en medio hipotónico, el canal TRPV4 se detectaba en el citoplasma, es decir la activación del canal parecería modificar su localización subcelular, sin embargo, en este trabajo no se explica que podría estar haciendo el canal TRPV4 en el núcleo. Debido a lo anterior, decidimos evaluar si este fenómeno ocurría en las células MDCK. Usamos dos estímulos diferentes para activar a TRPV4 que se sabe, activan vías de señalización diferentes que fueron exponer a las células a una solución hipotónica (210 mOsm/L) o bien, activar al canal con su activador específico 4 α -PDD (10 μ M) que interactúa directamente con TRPV4.

En la Figura 15 se muestran imágenes de microscopia confocal de un corte óptico de células MDCK subconfluentes permeabilizadas con Tritón X-100 0.05% y teñidas con el anticuerpo anti-C-terminal de TRPV4 (verde) en donde se puede observar que en condiciones control (DMSO y solución isotónica) el canal se localiza principalmente en el núcleo de las células, mientras que en condiciones que inducen la activación del canal ya sea con solución hipotónica (45 min) o con 4 α -PDD (30 min) el canal TRPV4 se observa principalmente en el citoplasma, este cambio de localización es más evidente en el corte lateral en el plano xz.

Para evidenciar que la activación del canal TRPV4 induce la translocación del canal, las células fueron pretratadas con el antagonista específico RN-1734 (30 μ M) durante 10 min y posteriormente estimuladas con la solución hipotónica en presencia del antagonista, se observa que en estas condiciones el canal TRPV4 se mantiene en el núcleo de las células.

Con estos resultados se concluye que la activación del canal modifica su localización subcelular, promoviendo su translocación fuera del núcleo.

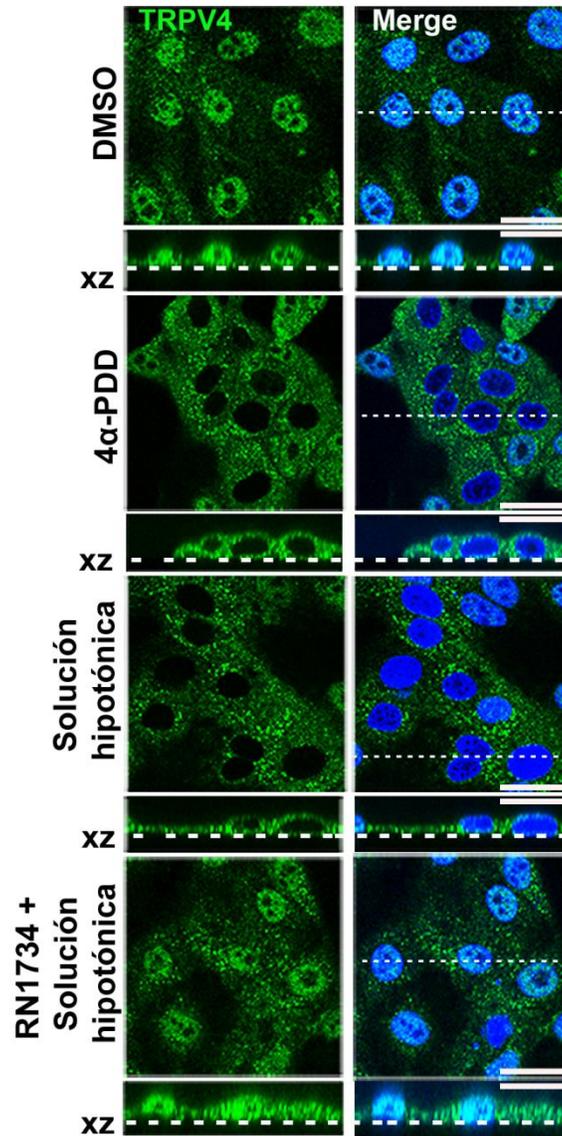


Figura 15. La activación del canal TRPV4 modifica su localización subcelular en células MDCK subconfluentes. Las células MDCK fueron sembradas a 2×10^4 células/cm² y 24 h después se incubaron con 4 α -PDD o con solución hipotónica, después se fijaron y permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05%. Se muestran imágenes de microscopía confocal de un corte óptico de la señal de TRPV4 endógeno (verde) detectado con el anticuerpo dirigido contra la región C-terminal. En condiciones control, con DMSO 0.1%, el canal se observa principalmente en el núcleo y en menor grado en el citoplasma. Las imágenes corresponden a una rebanada óptica de 0.5 μ m. En los cortes transversales (xz) se muestra la colocalización del canal TRPV4 con la señal de los núcleos (azul) en las células control (DMSO) y RN-1734 + Hipotónico, y no así en 4 α -PDD y con solución hipotónica. La línea

discontinua en xy indica el nivel del corte lateral y en xz corresponde a la parte basal del epitelio. Barra = 25 μ m.

El resultado anterior nos llevó a investigar si existía una relación entre la translocación núcleo-citoplásmica del canal TRPV4 y β -catenina. Se sabe que β -catenina es una proteína que se transloca del citoplasma al núcleo celular donde se une al factor de transcripción TCF, (Valenta et al., 2012). Por ello nos preguntamos si el canal TRPV4 podría estar regulando la localización subcelular de β -catenina ya que se ha descrito una interacción directa de TRPV4 con β -catenina (Sokabe et al., 2010) y se sabe que β -catenina se mueve del núcleo a las uniones adherentes. Comenzamos investigando si la translocación del canal del núcleo al citoplasma debida a su activación en células MDCK subconfluentes iba acompañada de la translocación de β -catenina fuera del núcleo.

Para ello, el canal TRPV4 fue activado con solución hipotónica o con el activador específico 4 α -PDD (10 μ M) y enseguida se evaluó la localización subcelular de ambas proteínas. En la Figura 16 se muestra la localización subcelular del canal TRPV4 (rojo) y de β -catenina (verde) en un corte óptico de microscopia confocal. Se observa que cuando el canal se activa con cualquiera de los estímulos se transloca del núcleo al citoplasma y coincide con la ausencia de β -catenina en el núcleo. En las células donde el canal aún se encuentra en el núcleo, β -catenina también lo está (Figura 16, flechas en la última columna, Si las células son pretratadas con el bloqueador RN-1734 (30 μ M) antes de transferirlas a solución hipotónica (en presencia de RN-1734), ambas proteínas permanecen en el núcleo de la célula. Estos resultados indican que la activación del canal TRPV4 transloca a β -catenina fuera del núcleo.

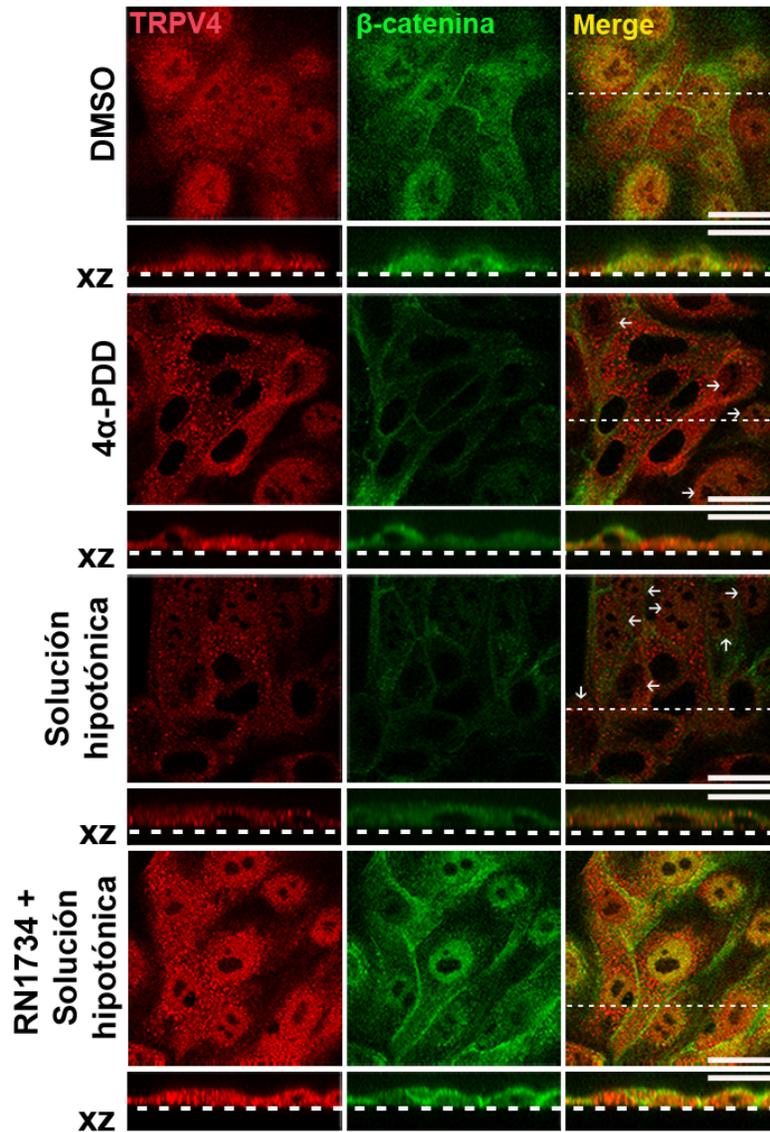


Figura 16. La activación del canal TRPV4 modifica la localización nuclear de β-catenina en células MDCK subconfluentes. Se realizó un experimento igual que en la figura 15. Se muestran imágenes de microscopía confocal de la inmunodetección de TRPV4 (rojo) y β-catenina (verde). En condiciones control (DMSO 0.1%), el canal se observa principalmente en el núcleo y algo de señal citoplásmica, β-catenina también se observa en el núcleo y algo de señal en los bordes celulares. El canal TRPV4 y β-catenina se translocan simultáneamente fuera del núcleo (al citoplasma) cuando el canal es activado ya sea con 4α-PDD (10 μM) o con solución hipotónica. En células pre-tratadas con el bloqueador RN-1734 (30 μM) por 10 min y posteriormente tratadas con solución hipotónica el canal TRPV4 y β-catenina se mantienen en el núcleo. Las flechas indican la localización nuclear de

TRPV4 y β -catenina en células donde el canal no se ha salido. Las imágenes (xy) corresponden a una rebanada óptica de 0.5 μm . Las imágenes transversales (xz) corresponden a la proyección de 10 cortes ópticos de 0.07 μm . La línea discontinua en xy indica el nivel del corte lateral presentadas corresponden a la proyección de 10 cortes ópticos y en xz corresponde a la parte basal del epitelio. Barra = 25 μm

6.6 TRPV4 inhibe la actividad transcripcional dependiente de β -catenina

Una vez que observamos que la activación del canal saca a β -catenina del núcleo nos preguntamos si esto tendría una repercusión funcional, por lo que se planteó medir la actividad transcripcional de β -catenina cuando se sobrexpresas al canal TRPV4. Sin embargo, en experimentos iniciales se vió que el plásmido pCMV-Tag4A que corresponde al vector de expresión que utilizamos para clonar a TRPV4, mostró una inhibición inespecífica de la actividad dependiente de β -catenina en los ensayos de gen reportero con los plásmidos pTOPFlash/pFOPFlash como se muestra en la Figura 17. Por esta razón se probaron otros vectores de expresión como pcDNA3.1⁺ y pGL4.10 [luc]. Para ello, las células MDCK fueron cotransfectadas con β -catenina y con concentraciones crecientes 100 y 500 ng (referidas como 1X y 5X) de cada uno de los vectores de expresión. En la Figura 17 se muestra que los plásmidos pcDNA3.1⁺ y pCMV-Tag 4A tienen un efecto inespecífico inhibitorio sobre la actividad transcripcional de β -catenina de manera dependiente a la cantidad de plásmido transfectado (barras en color morado y rosado) y no así el plásmido pGL4.10 luc2 que no disminuye la actividad transcripcional de β -catenina (barras en color verde) con respecto a la actividad de β -catenina (barra de color gris, Figura 17). Con base en estos resultados, se decidió utilizar al vector pGL4.10 luc2 para clonar al cDNA de TRPV4 y de las mutantes construidas en este trabajo.

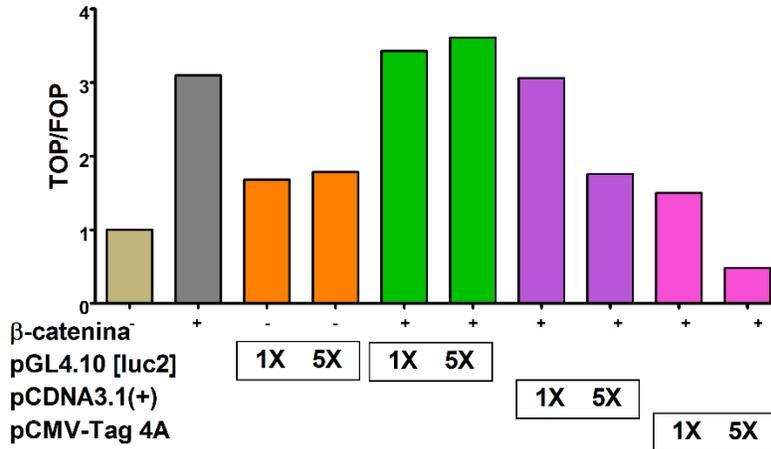


Figura 17. Interferencia de diferentes vectores de expresión en la medición de la actividad transcripcional de β -catenina. Las células MDCK fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros de la actividad transcripcional de β -catenina (pTOPFLASH-wtTCF o pFOPFLASH-mutTCF), y cantidades crecientes (1X y 5X) de los vectores de expresión indicados. La transfección de los vectores pcDNA3.1+ (morado) y pCMV-Tag 4A (rosa) reducen la actividad transcripcional de β -catenina a diferencia de lo observado con el vector pGL4.10[luc2] tanto en presencia (verde), como en ausencia (naranja) de la sobreexpresión de β -catenina. Los resultados corresponden a un solo experimento.

Como TRPV4 regula la localización nuclear de β -catenina, esto nos sugirió que también podría estar regulando su actividad transcripcional. Exploramos dos posibles mecanismos por los que TRPV4 podría estar regulando la actividad transcripcional de β -catenina.

Por un lado, el aumento del Ca^{2+} nuclear ya que la entrada de Ca^{2+} regula la vía de señalización de β -catenina/WNT (Slusarski & Pelegri, 2007), y como se mostró anteriormente, TRPV4 está regulando la entrada de Ca^{2+} al núcleo. Por otro lado, la interacción de TRPV4 con β -catenina dado que, mostramos que el canal TRPV4 saca a β -catenina del núcleo y podría ser a través de una interacción directa.

Para evaluar estas posibilidades se construyeron un canal con un cambio de la metionina 680 por una lisina (M680K) ya que se ha encontrado que esta mutación causa la pérdida de la permeabilidad del canal al ion Ca^{2+} (Liedtke, 2003) y adicionalmente, se construyó un canal con la delección de los primeros 235 aminoácidos del extremo N-terminal del canal TRPV4 (Δ 235) debido a que se ha

reportado que esta región es el dominio de interacción del canal con β -catenina (Sokabe et al., 2010).

Inicialmente se verificó que se expresaran las construcciones clonadas en el plásmido pGL4.10 [luc2]. Para ello, las células MDCK fueron transfectadas con los plásmidos pGE-V4-Flag, pV41L-Flag, pGE-M680K-Flag y pGE- Δ 235-Flag y se obtuvieron proteínas totales 24, 48 y 72 h postransfección. En la Figura 18, se puede observar que todos los plásmidos, ya sea del canal silvestre, del canal que no conduce Ca^{2+} (M680K) o del canal deletado del extremo N-terminal (Δ 235) se expresan y producen las proteínas del peso esperado. En todas las construcciones se observa una disminución de la cantidad de proteína con respecto al tiempo de expresión, siendo a las 24 h cuando hay más proteína. Evaluamos también la expresión del plásmido pV4-1LFlag con la etiqueta Flag en la primera asa extracelular del canal, pero no pudimos detectar la proteína por Western blot.

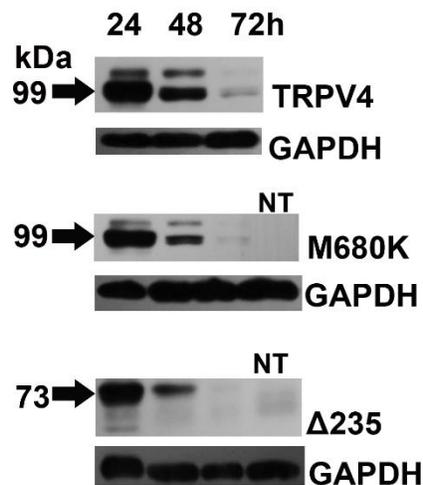


Figura 18. Expresión de las diferentes construcciones del canal TRPV4 en células MDCK. Células MDCK se sembraron a 2×10^4 células/cm² y 24 h después se transfectaron con los plásmidos correspondientes y se lisaron después de 24, 48 y 72 h para evaluar la expresión de cada construcción por medio de western blot con el anticuerpo anti-Flag. Se muestra la cinética de expresión de las proteínas del canal TRPV4 (silvestre), M680K y Δ 235, se observan las bandas del tamaño esperado para cada construcción indicada a la izquierda. Como control de carga se detectó la proteína GAPDH (37 kDa). NT: células no transfectadas.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de las variantes del canal por inmunofluorescencia, los siguientes plásmidos fueron transfectados: pTRPV4-Flag, pV4-1LFlag, pM680K-Flag, pFlag- Δ 235 y pGE- Δ 410-Flag donde se eliminaron 410 aa del extremo N-terminal. Se detectó al canal 24 h postransfección. En la Figura 19, se observa que el canal silvestre con etiqueta Flag en el C-terminal (TRPV4-WT) o en la primera asa extracelular (TRPV4-1L) colocalizan con Lamina A/C, un marcador nuclear localizado en la cara interna de la membrana nuclear interna, se observa colocalización en los pliegues de las invaginaciones de la envoltura nuclear, sin embargo, el canal TRPV4-1L muestra más señal en el citoplasma que el canal TRPV4-WT. El canal M680K se observa principalmente en el núcleo y colocaliza con Lamina A/C en un patrón muy similar a TRPV4-WT, se observa colocalización en amarillo al rededor del núcleo, mientras que los canales Δ 235 y Δ 410 se observan principalmente en el citoplasma y poca señal en el núcleo en el corte transversal xz. Estos resultados sugieren que la delección del extremo N-terminal disminuye la localización de canal en el núcleo.

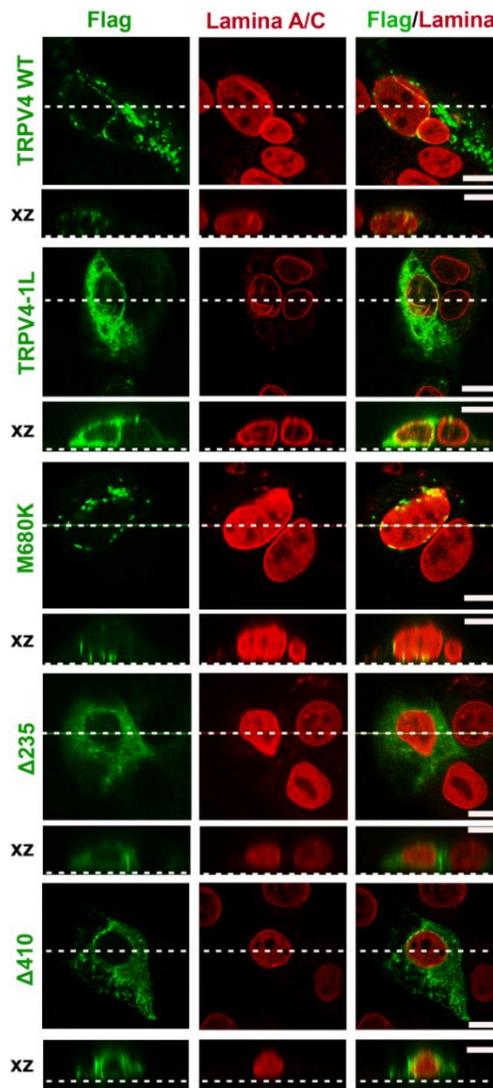


Figura 19. Comparación de la localización subcelular del canal TRPV4-Flag silvestre, y las diferentes mutantes construidas en este trabajo. Las células se procesaron de manera similar a lo descrito en la Figura 8 con 24 h de expresión, se inmunodetectó el epitopo Flag (TRPV4, en verde) de cada una de las construcciones y de la proteína nuclear Lamina A/C (rojo). El canal silvestre TRPV4 WT (con Flag en el C-terminal) y TRPV4-1L (con Flag en la primera asa extracelular), se observa el canal alrededor del núcleo lo que sugiere que el canal se encuentra en la envoltura nuclear en invaginaciones y que colocaliza con el marcador nuclear Lamina A/C, al igual que el canal M680K (con Flag en el C-terminal). Mientras que los canales $\Delta 235$ y $\Delta 410$ (con Flag en el C-terminal) muestran una localización principalmente en el citoplasma y poca señal en el núcleo. Las imágenes corresponden a una rebanada óptica (xy) de 0.2 μm . La línea discontinua indica el nivel del corte lateral en xy y en xz corresponde a la parte basal del epitelio. Barra = 10 μm

Una vez corroborada la expresión de los plásmidos se procedió a evaluar el efecto de TRPV4 sobre la actividad transcripcional dependiente de β -catenina. En primer lugar, se evaluó el efecto del vector vacío y que la etiqueta Flag no afectara en la función del canal TRPV4 WT.

Las células MDCK fueron cotransfectadas con los plásmidos reporteros de la actividad transcripcional de β -catenina (pTOPFlash/pFOPFlash) junto con los plásmidos que expresan al canal y a β -catenina silvestre o β -catenina dominante activa (presenta una delección de los sitios de fosforilación de GSK3 β por lo que no se degrada y se acumula en el núcleo). En la Figura 20 se muestra la gráfica con los resultados, los valores de luciferasa se expresa como el cociente de los valores obtenidos en la transfección de pTOPFlash (silvestre) con respecto a los valores de luciferasa de pFOPFlash (mutante). El efecto inhibitor del canal sobre la actividad transcripcional de β -catenina/TCF es específico debido a que cuando se transfecta al vector vacío a 20 veces en exceso molar (20X) no tiene ningún efecto sobre la actividad transcripcional, siendo 4.3 ± 0.2 veces contra 5.1 ± 0.3 veces con solo β -catenina. Además, el canal TRPV4 con la etiqueta Flag en el extremo C-terminal (TRPV4-Flag) o en la primera asa extracelular (TRPV4-1L) presentan el mismo efecto de inhibición sobre la actividad transcripcional de β -catenina/TCF con 2.0 ± 0.1 y 1.7 ± 0.06 veces con TRPV4-Flag y TRPV4-IL (20 X) respectivamente (Figura 20).

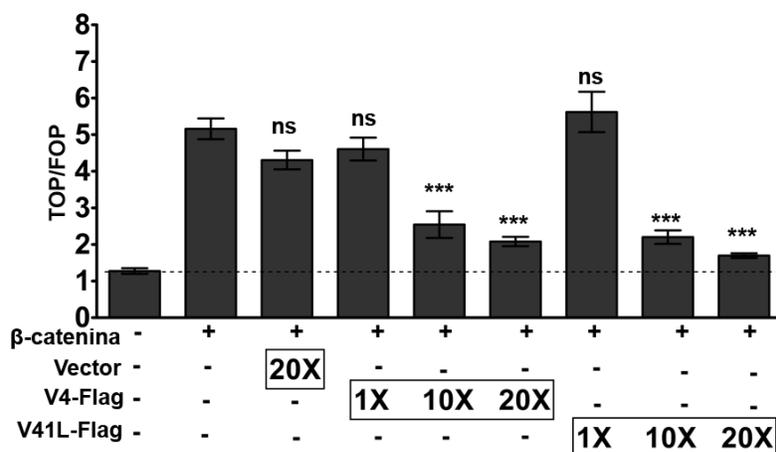


Figura 20. La expresión del canal TRPV4 inhibe la actividad transcripcional de β -catenina independientemente de la posición de epítipo Flag. Células MDCK fueron sembradas a 3×10^4 células/cm² y 18 h después fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros de β -catenina (pTopFlash o pFopFlash), y los plásmidos de β -catenina silvestre y cantidades crecientes (1X, 10X, 20X) del plásmido de TRPV4 con el epítipo Flag en el C-terminal (TRPV4-Flag), con el plásmido que expresa al canal con el epítipo Flag en la primera asa extracelular (TRPV4-1L). La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la transfección. Ambas proteínas son capaces de inhibir la actividad transcripcional de β -catenina. La transfección del vector vacío a exceso molar de 20X con respecto a TRPV4 no tuvo efecto en la actividad transcripcional de β -catenina (incremento de 4.3 ± 0.2) lo que muestra que la inhibición de la transcripción es dada por la expresión de TRPV4. Los resultados corresponden a la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes y por cuadruplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $P < 0.0001$ (***)

Una vez teniendo las condiciones optimizadas, se procedió a medir el efecto de las variantes de TRPV4 sobre la actividad transcripcional. En la Figura 21 A se puede observar que la actividad transcripcional aumenta cuando se sobreexpresa β -catenina a 7.6 ± 0.7 veces con respecto al control y disminuye significativamente cuando se transfecta el plásmido del canal TRPV4 WT en cantidades crecientes (10X, 20X), alcanzando una inhibición de 2.3 ± 0.2 y $1.1 \pm .1$ veces (10X y 20X respectivamente). De manera interesante al transfectar al canal que no conduce Ca^{2+} (M680K) se tuvo el mismo efecto del canal silvestre, inhibió la transcripción a un mínimo de 2.2 ± 0.3 veces con la cantidad más alta (20X). De igual manera, sobreexpresar al canal $\Delta 235$ inhibe la actividad transcripcional de β -catenina/TCF a un mínimo de 1.2 ± 0.2 veces (20X).

Para evidenciar si el efecto de inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF era un efecto nuclear, se transfectó a β -catenina dominante activa. En la Figura 21 B se puede observar que la actividad transcripcional aumenta 11.6 ± 0.1 veces con respecto al control cuando se sobre-expresa a β -catenina dominante activa y disminuye de manera dependiente a la cantidad del canal silvestre a 2.2 ± 0.3 veces a la cantidad de plásmido más alta (20X), 2.9 ± 0.3 veces para M680K (20X) y 5.5 ± 0.6 veces para $\Delta 235$ (20X), siendo este último el menos

eficiente para inhibir la transcripción de β -catenina/TCF, lo cual podría deberse a que interactúa menos eficientemente con β -catenina.

Estos resultados nos sugieren que el canal TRPV4 inhibe la transcripción mediada por β -catenina sin embargo la entrada de Ca^{2+} a la célula debida a TRPV4 no es necesaria para inhibir la actividad transcripcional de β -catenina/TCF.

La inhibición del canal se podría deber a una interacción directa con β -catenina y que la delección de los 235 aminoácidos del extremo amino no fue suficiente para evitar la inhibición de la actividad transcripcional.

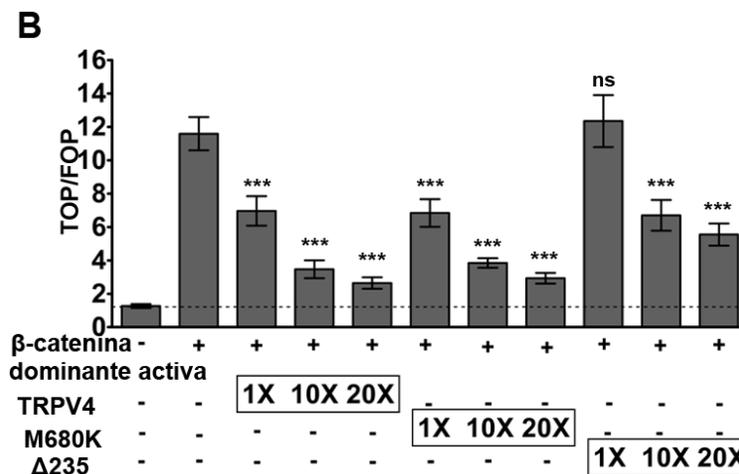
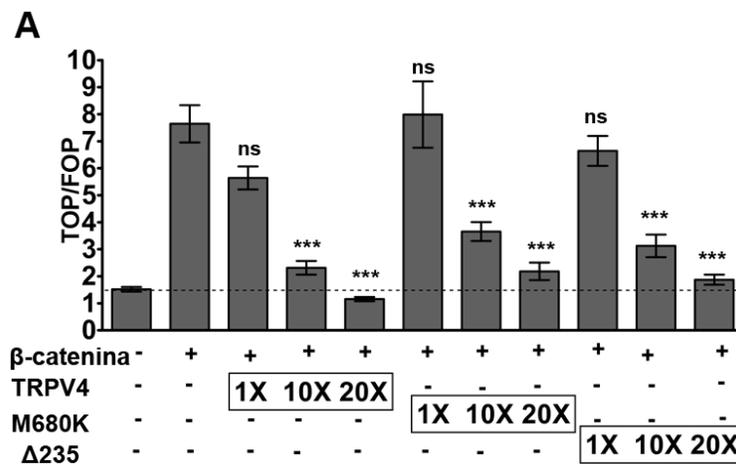


Figura 21. TRPV4 inhibe la actividad transcripcional de β -catenina. Células MDCK fueron sembradas a 3×10^4 células/cm² y 18 h después fueron transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFlash o pFOPFlash, β -catenina silvestre (A) o β -catenina dominante activa (B) y cantidades molares crecientes (1X, 10X, 20X) del canal TRPV4-Flag (silvestre), M680K-Flag o Δ 235-Flag. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la transfección. Los datos se presentan como el cociente entre TopFlash/FopFlash. En A y B se observa inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina dependiente a la cantidad del plásmido que codifica para el canal TRPV4. Los resultados corresponden a la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes y por cuadruplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $P < 0.0001$ (***).

6.7. La interacción de TRPV4 y β -catenina es modulada por la actividad del canal

Para evaluar la posibilidad de que el canal TRPV4 este interactuando con β -catenina se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación entre ambas proteínas. Las células MDCK fueron cotransfectadas a una relación molar 3:1 (β -catenina: TRPV4) de los plásmidos que las expresan y 24 h después, se lisaron las células para los ensayos de coimmunoprecipitación. En la Figura 22 se observa que al inmunoprecipitar al canal TRPV4 (Flag IP), el canal que no conduce Ca^{2+} (M680K) o el canal con la deleción del amino terminal Δ 235 fue posible detectar la coimmunoprecipitación de β -catenina. De manera inversa al precipitar a β -catenina (Myc IP) se obtuvo la coimmunoprecipitación de del canal y las mutantes del canal con β -catenina. Con estos resultados podemos concluir que el canal interactúa con β -catenina y la deleción de los 235 aminoácidos no fue suficiente para evitar la interacción.

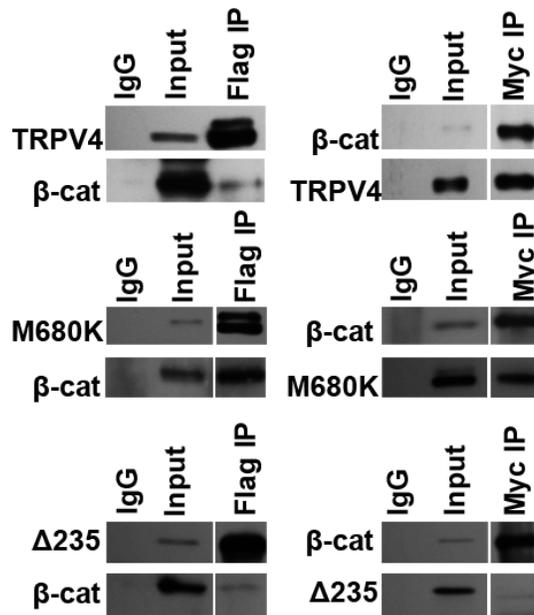


Figura 22. El canal TRPV4 interactúa con β-catenina. Células MDCK fueron sembradas a 3×10^4 células/cm² y 18 h después se co-transfectaron con los plásmidos que expresan TRPV4-Flag y Myc-β-catenina y se cultivaron por 24 h. En la columna izquierda se muestra la inmunoprecipitación del canal (Flag IP), β-catenina co-inmunoprecipita (última línea derecha) con TRPV4 WT (arriba), mutante M680K (medio) y Δ235 (abajo). En la columna derecha se muestra la inmunoprecipitación de β-catenina (Myc IP), el canal TRPV4 WT (arriba), mutante M680K (medio) y Δ235 (abajo) co-inmunoprecipitan. Se analizaron por western blot los extractos de proteínas (IP, 100 %), o el input (1 %) con anti-Flag (TRPV4) y anti-Myc (β-catenina) o con el control de IgG (anticuerpo no relacionado como control negativo). En Flag IP de M680K y Δ235 corresponde a una menor exposición (5 min) que en IgG e Input (10 min). Las imágenes son representativas de 2 experimentos realizados de manera independiente.

Para reforzar los resultados de la coimmunoprecipitación se realizó el ensayo de ligación por proximidad (PLA) para evaluar la interacción de TRPV4 con β-catenina. El PLA nos permite demostrar si dos proteínas interactúan, ya que la reacción se produce solamente si se encuentran a una distancia no mayor a 40 nm (Soderberg et al., 2008). Adicionalmente nos permite ver la localización subcelular de la interacción in situ de las proteínas sin tener que sobrexpresarlas.

Se realizaron ensayos de PLA en células MDCK sembradas a 2×10^4 células/cm², y se utilizaron los anticuerpos primarios dirigidos al C-terminal del canal TRPV4 y a β -catenina. La Figura 23 muestra la interacción directa entre el canal TRPV4 con β -catenina en el núcleo y en el citoplasma en células de 1 día de cultivo, los controles negativos del PLA fueron en ausencia de los anticuerpos primarios contra TRPV4 o contra β -catenina donde no se observa señal mostrando la especificidad de la reacción. En el corte xz se puede observar que las proteínas interactúan principalmente en membranas intracelulares y en la periferia del núcleo (envoltura nuclear).

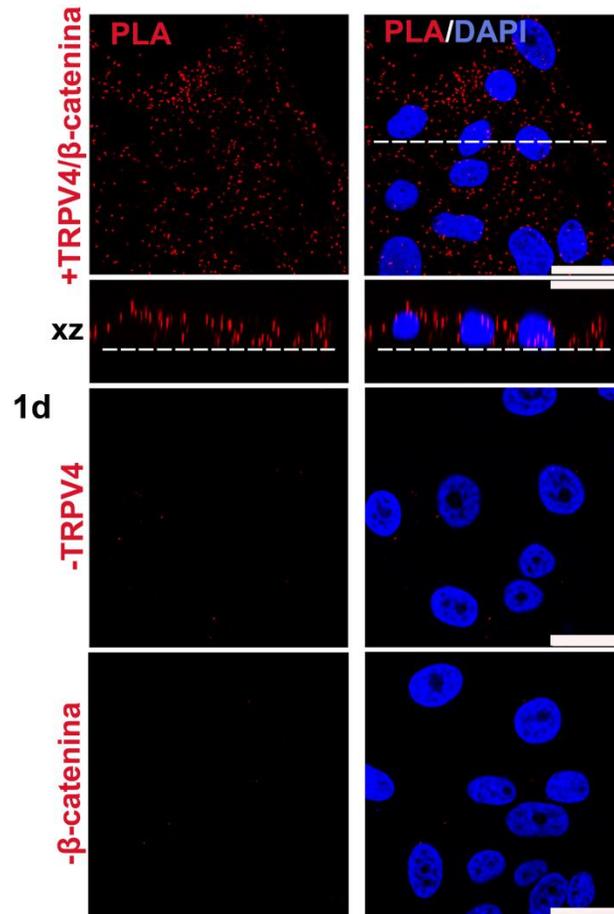


Figura 23. TRPV4 interactúa con β -catenina en el citoplasma y en el núcleo celular. Ensayo de interacción por proximidad (PLA) en células MDCK sembradas a 2×10^4 células/cm² y cultivadas por 1 día (1d). La β -catenina forma un complejo con TRPV4. La

señal se observa como puntos rojos en el citoplasma de las células, así como en el núcleo. Como controles de la especificidad de la interacción el ensayo de PLA se hizo en ausencia del anticuerpo primario del canal TRPV4 (-TRPV4) o de β -catenina ($-\beta$ -catenina). Las imágenes corresponden a una rebanada óptica (xy) de 0.8 μ m. La línea discontinua indica el nivel del corte lateral. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra = 25 μ m

Debido a que no se observó interacción de TRPV4 con β -catenina en los bordes celulares, como ha sido previamente reportado (Sokabe et al., 2010), decidimos evaluar la interacción en células desde un día hasta 7 días de cultivo cuando las células están confluentes y polarizadas. En la Figura 24 A se muestra el PLA en células de 1, 3 y 7 días de cultivo; encontramos que la interacción de TRPV4 y β -catenina disminuyó al tercer día de cultivo y al día 7 de cultivo ya no se observó interacción. Para definir los bordes celulares las células fueron inmunoteñidas con ZO1 (*zonula occludens 1*). De manera interesante no se observa señal de interacción en los bordes celulares, aunque se ha reportado la localización de ambas proteínas en los bordes celulares en MDCK polarizadas (Castillo et al., 2019; Wegierski et al., 2009). Para evidenciar que tanto el canal como β -catenina se localizan en los bordes celulares en estas condiciones de cultivo se detectaron las proteínas por inmunofluorescencia, lo que reveló que, en efecto, ambas proteínas colocalizan en los bordes celulares a los 7 días de cultivo (Figura 24 B) pero los resultados de PLA muestran que no están interactuando en este dominio celular.

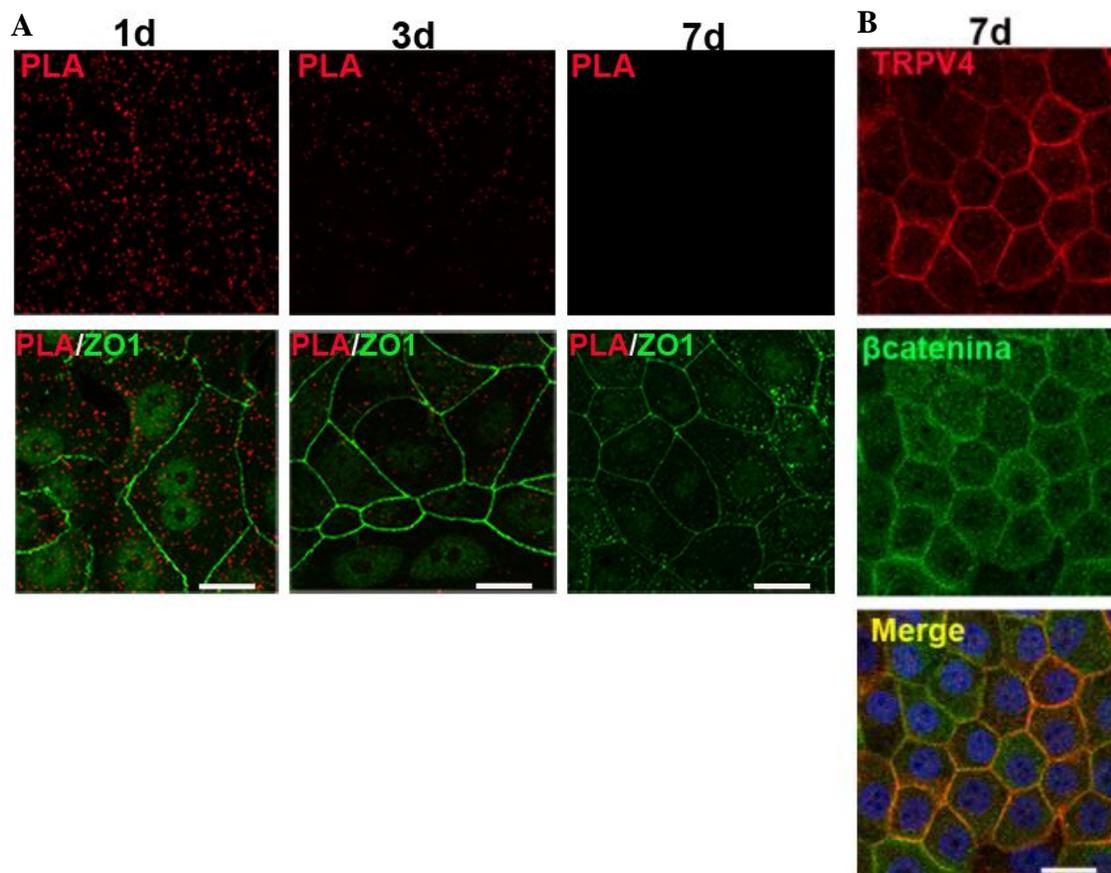


Figura 24. La interacción del canal TRPV4 y β -catenina ocurre únicamente en células MDCK subconfluentes. (A) Ensayo de interacción por proximidad (PLA) en células MDCK sembradas a 2×10^4 células/cm² y cultivadas por 1 día (1d), 3 días (3d) y 7 días (7d). La señal se observa como puntos rojos en el citoplasma de las células, así como en el núcleo. Las uniones estrechas fueron teñidas con ZO1 (verde) para visualizar los bordes celulares. Al día 7 de cultivo no se observó interacción. (B) Inmunofluorescencia de TRPV4 (anti-C-terminal) (rojo) y β -catenina (verde) de células con 7 días de cultivo. La señal de TRPV4 colocaliza con la señal de β -catenina (amarillo), los núcleos fueron teñidos con Hoechts. Las imágenes corresponden a la proyección máxima. Barra = 25 μ m

Tomando en cuenta que como lo mostramos anteriormente la activación del canal TRPV4 modifica la localización nuclear de β -catenina, nos preguntamos si la activación del canal modificaría su interacción con β -catenina. Realizamos ensayos de PLA después de activar a TRPV4 con solución hipotónica o con 4 α -PDD o en condiciones control con solución isotónica o DMSO respectivamente, como se describió en la Figura 15. Después de realizar el PLA (rojo) las células fueron

teñidas con ZO1 (verde). Se cuantificó el número de células y la señal de PLA. Encontramos que la activación de TRPV4 disminuye su interacción con β -catenina de 3.5 ± 0.4 unidades relativas con DMSO a 1.5 ± 0.2 con 4α -PDD, y de 3.1 ± 0.3 con solución isotónica a 1.4 ± 0.2 con solución hipotónica. Cuando el canal TRPV4 es pre-bloqueado con RN-1734 la interacción con β -catenina fue de 2.8 ± 0.3 unidades indicando que el bloqueo de TRPV4 evita la disminución de la interacción con β -catenina ya que no hay diferencia estadística entre las células en solución isotónica con las células prebloqueadas con RN-1734 (Figura 25B).

Estos resultados muestran que la interacción de TRPV4 con β -catenina es modulada por la actividad del canal y que cuando el canal se activa el complejo TRPV4/ β -catenina se sale del núcleo y las proteínas se separan en el citoplasma.

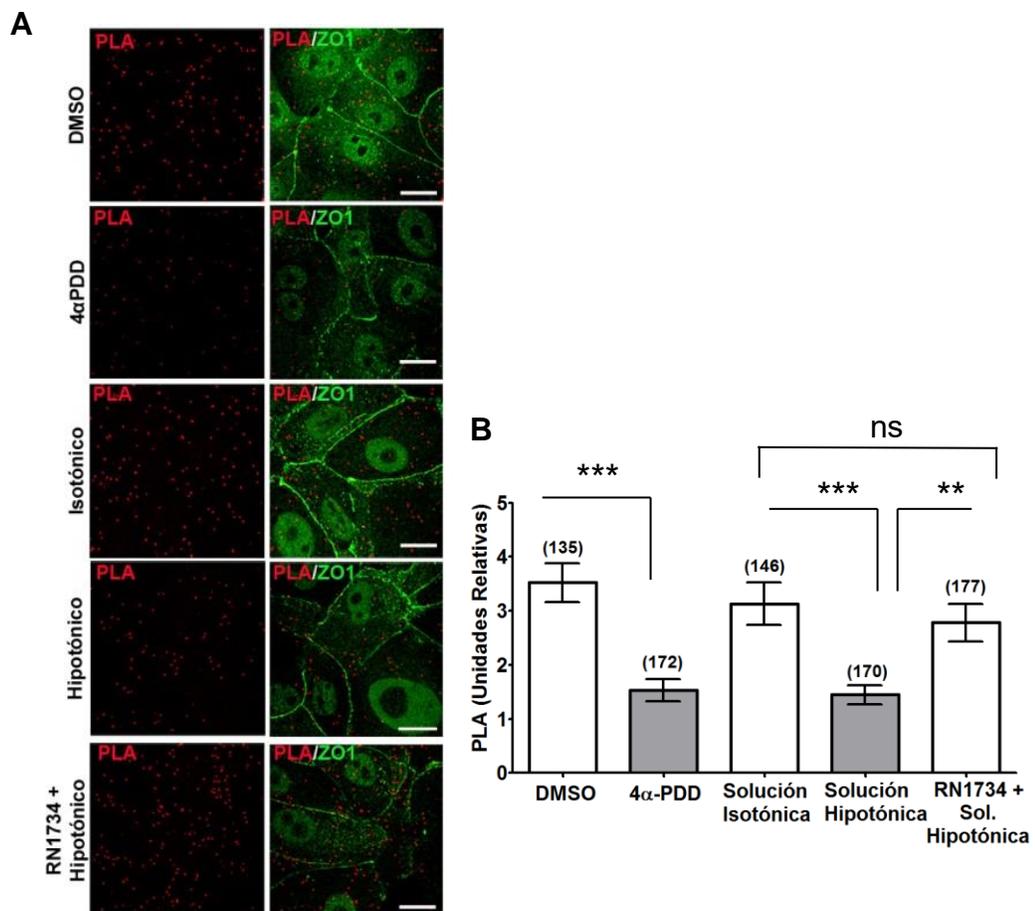


Figura 25. La actividad del canal TRPV4 regula la interacción con β -catenina.

Las células MDCK fueron sembradas a 2×10^4 células/cm² y 24 h después fueron tratadas con el activador del canal TRPV4 4 α -PDD 10 μ M por 30 min o DMSO (0.1%), también se activó el canal TRPV4 con solución hipotónica por 45 min o en condiciones control con solución isotónica. Paralelamente las células fueron pre-tratadas durante 10 min con el bloqueador específico del canal TRPV4-RN-1734 30 μ M y posteriormente se activó el canal TRPV4 con solución hipotónico. (A) La señal de PLA (rojo) y ZO1 (verde) se muestra para cada condición. Las imágenes corresponden a la proyección máxima. La interacción de TRPV4 y β -catenina disminuye después de la activación de TRPV4 con 4 α -PD o solución hipotónica. Barra = 25 μ m (B) Se cuantifico el cambio de señal de PLA usando Image J. El bloqueo del canal con RN-1734 previene la reducción de la señal PLA. Los datos muestran el promedio \pm error estándar, el número de células analizadas es indicado arriba de las barras de cada condición. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $P < 0.0001$ (***) , $P = 0.001$ (**).

6.8 TRPV4 contiene más de un sitio de interacción con β -catenina

Los resultados de coimmunoprecipitación sugieren que el canal TRPV4 tiene otro sitio de interacción con β -catenina independiente a los primeros 235 aa o bien, que el sitio de interacción no está incluido totalmente en la región de los 235 aa (Figura 22). Para evaluar esta posibilidad se construyó un péptido de los primeros 410 aa del canal que contiene los 6 repetidos de ANK y no contiene el sitio de unión a la proteína Os-9 para evitar que se quede atorado en el RE, además se construyó un canal con la secuencia complementaria, es decir, donde se deletaron los primeros 410 aa del canal Δ 410-Flag (aa 411-871). Adicionalmente como control de la interacción se construyó el péptido de los primeros 235 aa que corresponde al dominio de interacción con β -catenina (Sokabe et al., 2010). La Figura 26 muestra un esquema del N-terminal de TRPV4 con los dominios funcionales que fueron incluidos en las construcciones utilizadas para evaluar su interacción con β -catenina.

Posteriormente, se verificó el peso de cada una de las proteínas por Western blot. Para ello las células MDCK fueron transfectadas con los plásmidos pGE-Flag235, pGE-Flag410 y pGE-Δ410-Flag y se analizó su expresión 24, 48 y 72 h postransfección. En la Figura 27 se puede observar que los péptidos de 235 y 410 aa presentan el peso esperado de 27 y 47 kDa respectivamente y que su expresión disminuye con respecto al tiempo. Mientras que para el canal con la delección del N- terminal (Δ410) se observan tres bandas entre los marcadores de 50 y 37 kDa, siendo el peso esperado de 54 kDa lo que sugiere que esta proteína podría ser inestable.

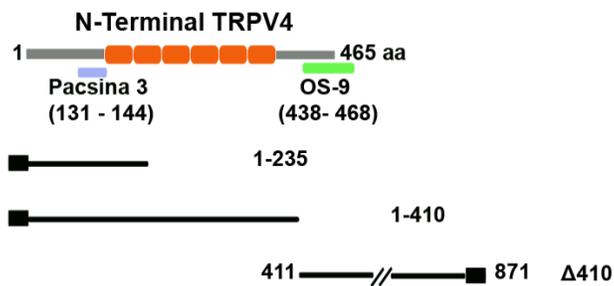


Figura 26. Esquema de las regiones del N-terminal del canal TRPV4 evaluadas para la interacción con β -catenina. Se muestra la localización de los 6 repetidos de anquirina (naranja) así como los dominios de interacción con Pacsina 3 (lila) y OS-9 (verde). En la parte de abajo, las líneas corresponden a las regiones presentes en cada construcción usada para mapear las regiones de interacción con β -catenina. A la derecha se indican las coordenadas en aa presentes de cada construcción. El rectángulo negro indica la localización del epítipo Flag.

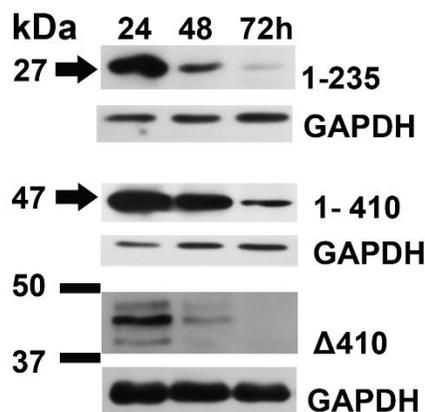


Figura 27. Expresión de los diferentes péptidos del canal TRPV4.

Células MDCK sembradas a 2×10^4 células/cm² fueron transfectadas 24 h después con los plásmidos que expresan los péptidos indicados. Se muestran las cinéticas de expresión de los péptidos de 235 y 410 aa a 24, 48 y 72 h donde se observa la disminución de la proteína a través del tiempo y muestra las bandas del tamaño esperado de las construcciones. Para el canal $\Delta 410$ se observaron 3 bandas. Como control de carga se detectó GAPDH (37kDa).

Una vez verificada la expresión de los péptidos del canal, evaluamos su efecto sobre la transcripción dependiente de β -catenina. Encontramos que las tres regiones de TRPV4 probadas inhibieron la transcripción dependiente de β -catenina/TCF como se muestra en la Figura 28. Se puede observar que la actividad transcripcional cuando se sobreexpresa β -catenina es de 6.9 ± 0.4 . Al sobreexpresar el péptido 1-235 se inhibe la transcripción de manera dependiente a la cantidad molar del plásmido, la actividad baja a 1.9 ± 0.2 con la cantidad más alta del plásmido (20X) y a 2.1 ± 0 veces con el plásmido del péptido 1-410 (20X). Sin embargo, el plásmido del péptido 1-410 a la cantidad más baja (1X) mostró un mayor efecto inhibitorio ya que la actividad transcripcional bajó a 4.3 ± 0.4 en comparación a 5.7 ± 0.3 con el péptido 1-235. De manera interesante el canal $\Delta 410$ a 20X también inhibe la transcripción y baja los valores a 1.3 ± 0.1 . Estos resultados indican que la delección de extremo N-terminal $\Delta 410$ no fue suficiente para prevenir el efecto inhibitorio sobre la transcripción dependiente de β -catenina y sugiere que este péptido tendría otro sitio de interacción con β -catenina.

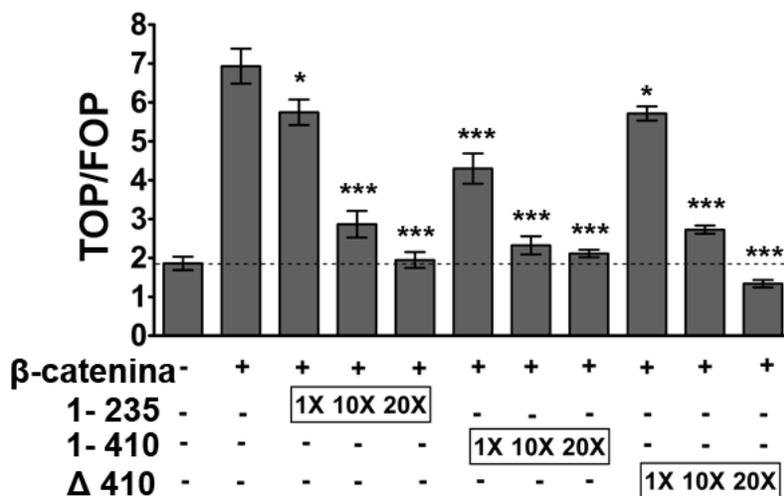


Figura 28. Diferentes regiones de TRPV4 inhiben la actividad transcripcional β-catenina. Las células MDCK fueron sembradas a 3×10^4 células/cm² y 18 h después fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFlash o pFOPFlash, β-catenina y cantidades molares crecientes (1X, 10X, 20X) de cada uno de los péptidos del amino terminal del canal TRPV4 y Δ410. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la transfección. Los datos se presentan como el cociente entre TopFlash/FopFlash. En todas las condiciones se observa inhibición de la actividad transcripcional de β-catenina dependiente a la cantidad del plásmido. Los resultados corresponden a la media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes y por cuadruplicado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. P<0.0001 (***), P=0.01 (*).

Para evaluar si el efecto inhibitorio de los péptidos del canal sobre la actividad transcripcional de β-catenina se debe a una interacción, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación. Los diferentes péptidos del canal 1-235, 1-410 y Δ410, se cotransfectaron junto con Myc-β-catenina en células MDCK y se realizó el análisis de coimmunoprecipitación. Encontramos que las 3 regiones de TRPV4 fueron capaces de interactuar con Myc-β-catenina (Figura 29). Estos resultados indican que TRPV4 contiene al menos un dominio de interacción con β-catenina adicional al que se había reportado previamente en el extremo N-terminal y que es a través de una interacción directa con β-catenina que el canal Δ410 reprime su actividad transcripcional.

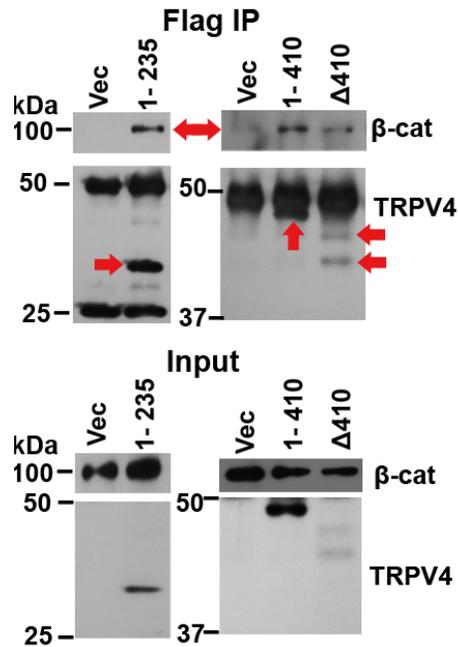


Figura 29. TRPV4 contiene más de un sitio de interacción con β -catenina. Las células MDCK fueron sembradas a 3×10^4 células/cm² y 18 h después se cotransfectaron con 1-235, 1-410 o Δ 410-Flag y Myc- β -catenina y se lisaron 24 h después. Se muestra la inmunoprecipitación de los péptidos (Flag IP) de vector vacío y 1-235 (columna izquierda superior) y inmunoprecipitación (Flag IP) de vector vacío, 1-410 y Δ 410 (columna derecha superior). β -catenina (100 kDa, flecha roja) co-inmunoprecipita con las proteínas 1-235, 1-410 y Δ 410 (señaladas con flechas rojas). Se analizaron por western blot los extractos proteicos inmunoprecipitados (IP, 100 %), o el input (15 μ g, columna derecha e izquierda inferior) con anti-Flag (TRPV4) y anti-Myc (β -catenina). Las imágenes son representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. El revelado se realizó mediante el uso del kit de quimioluminiscencia (No. de catálogo WBKLS0500, Millipore).

6.9 El complejo TRPV4/ β -catenina también se forma en otros modelos celulares

Finalmente evaluamos si la localización nuclear de TRPV4 y su capacidad de formar un complejo con β -catenina como lo describimos en nuestro modelo celular de MDCK, también podía ocurrir en otros tipos celulares. Para evaluar esto, seleccionamos 2 modelos celulares derivados de humano y más relacionados a los fenotipos de los tejidos que son mayormente afectados en la mayoría de canalopatías reportadas en humano.

Analizamos las células SH-SY5Y de neuroblastoma y las Saos-2 de osteosarcoma dado que las enfermedades más frecuentes por canalopatías de TRPV4 son neuropatías periféricas y osteoartropatías (Nilius & Voets, 2013). Además, ambos modelos celulares han sido utilizados ampliamente para el estudio *in vitro* de la diferenciación neuronal y de osteocitos respectivamente (Forster et al., 2016; Zauli et al., 2007). Ambas líneas celulares corresponden a células no diferenciadas que deben ser estimuladas para que adquieran el fenotipo diferenciado. Inicialmente evaluamos la expresión del canal TRPV4 con el anticuerpo que reconoce el dominio extracelular del canal que se encuentra en el poro. La Figura 30 muestra la localización subcelular del canal con el anticuerpo anti-extracelular en células SH-SY5Y y Saos-2 subconfluentes, el canal se observa en el núcleo celular y en el citoplasma de la célula en ambas líneas celulares. La localización nuclear de TRPV4 (verde) es más evidente en el corte transversal (xz).

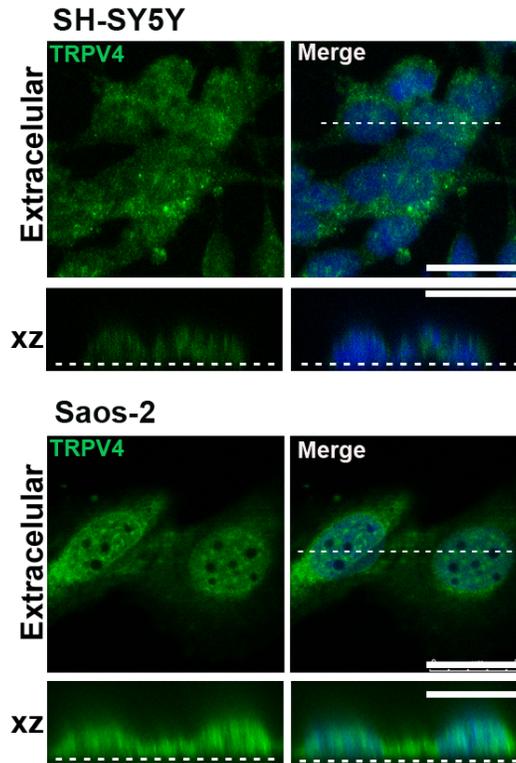


Figura 30. Inmunolocalización del canal TRPV4 en células SH-SY5Y y Saos-2. Las células SH-SY5Y y Saos-2 se sembraron a subconfluencia, 24 h después se fijaron y permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5 %. TRPV4 (verde) fue detectado con el anticuerpo que reconocen al dominio cercano al poro (Extracelular), el canal se observa principalmente en el núcleo y además en el citoplasma celular en ambas líneas celulares. La línea discontinua indica el nivel del corte lateral y en los cortes xz la línea punteada corresponde a la parte basal del cultivo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra = 25 μ m

Una vez evidenciado que el canal TRPV4 se localiza en el núcleo tanto en células Saos-2 y SH-SY5Y se evaluó la posible interacción del canal con β -catenina por ensayos de ligación por proximidad (PLA). Para estos ensayos se utilizó el anticuerpo anti-extracelular de TRPV4. La Figura 31 muestra la interacción de TRPV4/ β -catenina en células Saos-2 y SH-SY5Y. La interacción se observa en el núcleo y en el citoplasma. Las células MDCK subconfluentes se utilizaron como control positivo de la interacción. La interacción nuclear es evidente en las secciones transversales (xz). Cuando se omite el anticuerpo de β -catenina no se observa señal de PLA mostrando la especificidad de la detección. Estos resultados demuestran la

interacción de TRPV4 con β -catenina en el núcleo celular y sugieren la posibilidad de que el canal TRPV4 pudiera también estar regulando la actividad transcripcional de β -catenina en otros modelos celulares que están relacionados con canalopatías humanas como son displasias esqueléticas y neuropatías periféricas (Nilius & Voets 2013).

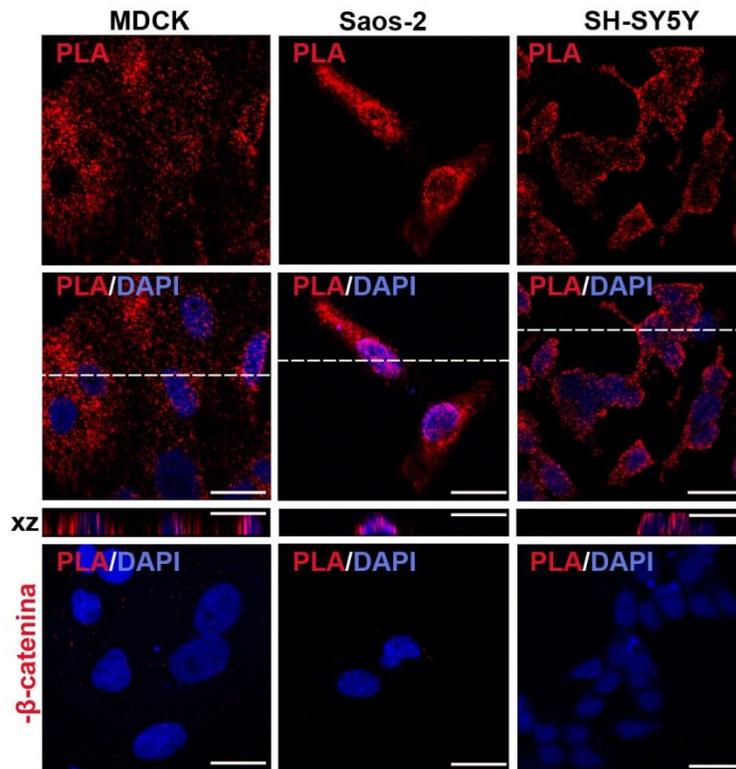


Figura 31. TRPV4 interactúa con β -catenina en células Saos-2 y SH-SY5Y no diferenciadas. Las células de osteosarcoma Saos-2 y neuroblastoma SH-SY5Y fueron sembradas a subconfluencia y 24 h después se fijaron y se realizó el ensayo de interacción con el anticuerpo extracelular de TRPV4 y el anti- β -catenina. La interacción en las células MDCK se utilizó como control positivo. La señal se observa como puntos rojos en el citoplasma de las células, así como en el núcleo en las 3 líneas celulares. La línea discontinua en xy indica el nivel del corte lateral mostrado en xz. Las imágenes corresponden a una rebanada óptica (xy) de 0.5 μ m. No se observa PLA en ausencia del anticuerpo primario de β -catenina ($-\beta$ -catenina). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra = 25 μ m

7. Discusión

En esta tesis, demostramos que el canal TRPV4 se expresa en los núcleos de células de epitelio renal MDCK y que la activación del canal TRPV4 incrementa la concentración de Ca^{2+} nuclear y citoplásmico. Nuestros datos indican que el canal TRPV4 es una proteína que une a β -catenina e inhibe su actividad transcripcional y que esta interacción es interrumpida por la activación del canal.

En esta tesis se describe por primera vez la ubicación nuclear de un canal catiónico de la familia TRP.

Proporcionamos varias líneas de evidencia que prueban la presencia de la proteína completa de TRPV4 en los núcleos de células MDCK no polarizadas las que incluyen datos de inmunofluorescencia (Fig. 5) y Western blot de células completas y de núcleos aislados (Fig. 6 y 7). Nuestros resultados enseñaron la localización del canal TRPV4 endógeno en el núcleo celular y en invaginaciones de la envoltura nuclear en células MDCK subconfluentes (Fig. 8), mientras que en células MDCK confluentes y polarizadas TRPV4 se localiza en los bordes célula-célula y en el citoplasma (Fig. 5 B), estos resultados y los cambios en la localización subcelular del canal transfectado sugieren que TRPV4 después de su síntesis en el RE se dirige al núcleo celular cuando las células están proliferando y posteriormente, sale del núcleo y llega a la membrana plasmática conforme las células adquieren la polaridad y se forma un epitelio maduro.

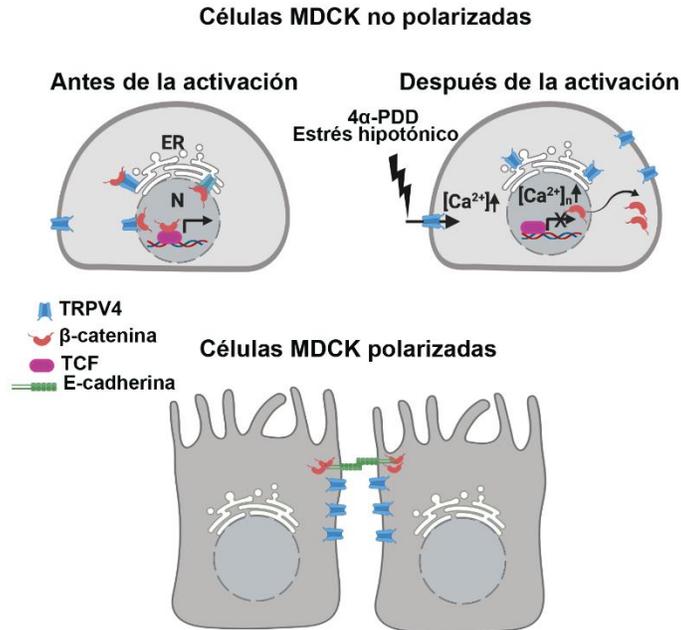


Figura 32. Modelo para la disrupción del complejo TRPV4/ β -catenina después de la activación de TRPV4. En base a nuestros resultados, proponemos el siguiente modelo:

En células MDCK no diferenciadas, el canal TRPV4 se encuentra formando un complejo con β -catenina principalmente en el núcleo (N), y en membranas intracelulares, probablemente retículo endoplásmico (RE). En esta etapa, β -catenina nuclear actúa como un coactivador transcripcional de TCF. TRPV4 se encuentran también en la membrana plasmática, aunque en baja cantidad. La activación de TRPV4 produce un aumento de Ca^{2+} citoplasmático y nuclear y la pérdida del complejo TRPV4/ β -catenina que permite la translocación fuera del núcleo de ambas proteínas por vías independientes, en consecuencia, se inhibe la actividad transcripcional dependiente de β -catenina. TRPV4 puede regresar al RE o bien dirigirse a la membrana plasmática. En células MDCK confluentes y polarizadas, β -catenina se encuentra en las uniones adherentes en un complejo con E-cadherina y TRPV4 se encuentra en el dominio de la membrana basolateral, pero no hay una interacción directa entre β -catenina y el canal.

Nuestros resultados de fraccionamiento celular evidenciaron la presencia del canal TRPV4 completo de 98 kDa en la fracción de proteínas nucleares, sin embargo, también se observa una banda de mayor tamaño que corresponde al canal glicosilado de 122 kDa más evidente en células MDCK confluentes (Fig. 6).

Analizamos la funcionalidad del canal TRPV4 en las células MDCK subconfluentes, para lo cual se utilizó la técnica de imagen de Ca^{2+} usando al indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM para monitorear los cambios de Ca^{2+} en los compartimentos del nucleoplasma y citoplasma de manera simultánea e independiente. Encontramos que la activación del canal TRPV4 indujo un aumento de Ca^{2+} nuclear y citosólico en las células MDCK subconfluentes cuando el canal TRPV4 se localiza principalmente en el núcleo (Fig. 9). En estos experimentos, la activación del canal se indujo con el activador específico 4 α -PDD que se une directamente al canal e induce su apertura (Vriens et al., 2007), esto con la idea de asegurar que los efectos observados están dados por el canal TRPV4.

Se sabe que TRPV4 se localiza en la membrana plasmática y en el cilio de las células MDCK en un epitelio maduro donde regula la entrada de Ca^{2+} cuando se activa por flujo laminar (Kottgen et al., 2008). Nuestros resultados evidencian que el canal también es activo en colonias en proliferación de células MDCK no polarizadas.

Previamente se ha reportado el aumento de Ca^{2+} nuclear en células MDCK evocado por ATP 1 μM (Collado Hilly et al., 2010). Esta respuesta involucra la activación de receptores P2Y y la subsecuente activación del IP3R localizado en el RE y en la EN que conlleva al aumento de la concentración de Ca^{2+} nuclear y citoplasmático (Koltsova et al., 2011). En las gráficas de las Figuras 9 B y 14 A se observa que la estimulación con 4 α -PDD tiene una cinética de incremento de Ca^{2+} nuclear diferente a la obtenida con ATP; 4 α -PDD exhibe un aumento de Ca^{2+} con una meseta sostenida (Fig. 9 A) y una lenta disminución que no vuelve a los niveles basales mientras que la respuesta a ATP causó un rápido pico de Ca^{2+} seguido de oscilaciones de Ca^{2+} en el núcleo y en el citoplasma y vuelve a niveles basales después de 410 segundos (Fig. 14 A). Por otro lado, con ATP, la respuesta es inmediata a la aplicación del estímulo y el tiempo de retardo (100s) es homogéneo en la población celular (Fig. 14), mientras que la respuesta a 4 α -PDD tarda varios segundos después de la aplicación del estímulo y el tiempo de retardo es

heterogéneo (Fig. 10). Estos resultados sugieren que la vía de señalización involucrada en el aumento de Ca^{2+} nuclear inducida por la activación de TRPV4 es diferente a la respuesta para ATP.

Por otro lado, en las gráficas de aumento Ca^{2+} intracelular evocado por la activación de TRPV4 se ve que aumenta primero el Ca^{2+} nuclear y posteriormente el Ca^{2+} citoplásmico sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} al núcleo no requiere un previo aumento del Ca^{2+} citoplasmático y que podrían estar involucradas 2 vías diferentes e independientes de transporte intracelular de Ca^{2+} .

La activación de TRPV4 tanto en el citoplasma como en el núcleo fue prevenida por la presencia de RN-1734, un bloqueador específico de TRPV4 (Fig. 13).

La presencia del bloqueador específico RN-1734 disminuyó parcialmente el aumento de Ca^{2+} en el núcleo y en el citoplasma después de la activación de TRPV4 con a 4α -PDD (Fig. 12) sugiriendo que la activación de TRPV4 podría desencadenar el aumento de Ca^{2+} intracelular a través de otros canales de Ca^{2+} que no pueden ser bloqueados por el RN-1734.

Se sabe que la activación de TRPV4 por 4α -PDD está dada por una entrada inicial de Ca^{2+} extracelular que activa la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Phan et al., 2009). En nuestros registros observamos que al quelar el Ca^{2+} extracelular con EGTA se disminuyó el aumento de Ca^{2+} tanto en el citoplasma y como en el núcleo, revelando la necesidad de la entrada del Ca^{2+} extracelular para aumentar las señales de Ca^{2+} después de la aplicación del activador específico del TRPV4 (Fig. 11) y evidenciando la presencia de canales TRPV4 funcionales en la membrana plasmática.

Los registros de la Figura 13 confirman el papel relevante de la activación inicial de TRPV4 para detonar el aumento del Ca^{2+} nuclear dado que si se bloquea inicialmente a TRPV4 con RN-1734, se elimina por completo el aumento de Ca^{2+} citoplásmico y nuclear evocado por el activador 4α -PDD.

Inicialmente se activarían solo los canales que están en la membrana plasmática, que sería pocas moléculas por lo que no se ve un aumento del Ca^{2+} intracelular inmediato, posteriormente la activación del canal induce su translocación fuera del núcleo para insertarse finalmente en la membrana plasmática aumentando la cantidad del canal y permitiendo un aumento en la señal intracelular de Ca^{2+} como se esquematiza en la Figura 33.

Por otro lado, detectamos por inmunofluorescencia la presencia del canal TRPV4 en núcleos aislados sugiriendo su localización en invaginaciones de la envoltura nuclear en células MDCK subconfluentes (Fig. 7). Estas invaginaciones pueden formarse con la MNI y MNE o simplemente MNI de la EN. La EN penetra a los núcleos para formar invaginaciones que sirven de reservorios de Ca^{2+} (Malhas, 2011). Se ha observado que los RyR (Receptor a rianodina) y IP3R se expresan en extensiones del retículo nucleoplásmico que se considera un continuo de la EN, donde se ha demostrado que colocalizan con el colorante ER-Tracker (Gomes et al., 2006; Marius et al., 2006). Las células MDCK contienen IP3R y SERCA en las invaginaciones de la EN que participan en la señalización de Ca^{2+} nucleoplásmico (Collado Hilly et al., 2010; Malhas, 2011) y en los núcleos están las enzimas necesarias para la producción de IP3 (Gomes et al., 2006) que facilita la activación de los IP3R. Debido a que se sabe que TRPV4 interactúa con el IP3R a través de su región C-terminal (Garcia-Elias et al., 2008), sería relevante estudiar la participación de TRPV4 en la entrada de Ca^{2+} nuclear y si hay alguna relación funcional con el IP3R localizado en la EN.

Estudios recientes demostraron que la apertura de TRPV4 puede activar distintas vías de señalización (Vriens et al., 2004). La respuesta a hipotonicidad depende de la activación de PLA2 y la producción de AA y EET, seguido de una interacción directa de EET con el residuo K535 de TRPV4 (Berna-Ero et al., 2017; Vriens et al., 2005; Vriens et al., 2004), la mutante K535A evita la unión a EET y pierde así la capacidad de activarse por hipotonicidad y AA pero no afecta la activación con GSK1016790A y 4 α -PDD, lo que parece sugerir que la activación por hipotonicidad,

AA y EE convergen en la misma vía. Mientras que para 4 α -PDD tres residuos L584, W586 y Y556 localizados en el segmento que comprende las regiones transmembranales S3-S4 están involucrados en la interacción con TRPV4. La mutante T555A no puede ser activada por 4 α -PDD ni por calor, pero no afecta la activación por hipotonicidad y AA (Vriens et al., 2004). Es importante destacar que el aminoácido R594 se necesita para la activación con estímulos diferentes como hipotonicidad, calor, EET, AA, 4 α -PDD, GSK1016790A y Bisandrographolide A (Berna-Erro et al., 2017; Vriens et al., 2007).

Teniendo en cuenta que la hipotonicidad y 4 α -PDD activan a TRPV4 a través de diferentes vías de señalización, nuestros resultados indican que la activación de TRPV4 con dos estímulos diferentes: solución hipotónica y 4 α -PDD, inducen su salida del núcleo (Fig. 15), por lo que esta movilización parece deberse a su activación, independientemente de la naturaleza de los estímulos que lo activan. Además, TRPV4 es una proteína que se transloca del núcleo al citoplasma, sugiriendo fuertemente que el canal TRPV4 podría tener diferentes funciones dependiendo del compartimento en dónde se encuentre.

Nuestros resultados sugieren que el canal TRPV4 se encontraría orientado con las regiones N y C-terminal hacia el nucleoplasma para poder interactuar con β -catenina en el núcleo. Esta orientación permitiría la entrada de Ca²⁺ del espacio perinuclear al nucleoplasma a través de TRPV4, sin embargo el canal estaría localizado en una orientación contraria en el RE que corresponde a una topología con las regiones N y C-terminal hacia el citoplasma como ha sido previamente reportado para los canales iónicos (Deutsch, 2003). Se necesitarán más estudios para determinar la orientación del canal TRPV4 en la EN y su papel en la regulación de la concentración del Ca²⁺ nuclear. Se ha mostrado que la distribución topológica de las proteínas transmembranales es un proceso dinámico en el RE como en el caso de aquaporina 1 (AQP1) que sufre una reorientación y un cambio topológico durante su maduración (Lu et al., 2000) por lo que el canal TRPV4 podría también tener cambios en su orientación desde su síntesis en el RE, o bien, se podría mover

por la membrana del RE a través del poro nuclear para quedar con los extremos N y C hacia el nucleoplasma (Fig. 32).

El Ca^{2+} juega un papel crítico en muchas funciones celulares como la apoptosis y la transcripción génica (Slusarski & Pelegri, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad del canal TRPV4 regula la translocación de NFAT al núcleo donde induce la diferenciación de los osteoclastos (Masuyama et al., 2008). Además, la localización nuclear del factor de transcripción SOX9 está regulada por el incremento de Ca^{2+} mediado por TRPV4 y contribuye a la condrogénesis (Muramatsu et al., 2007).

En este contexto y para investigar si los efectos inhibitorios sobre la actividad transcripcional de β -catenina/TCF en el núcleo se debían al aumento en los niveles nucleares de Ca^{2+} por la activación de TRPV4 o por su interacción directa con β -catenina, realizamos experimentos usando el canal mutante TRPV4-M680K impermeable a Ca^{2+} (Liedtke, 2003) y la mutante $\Delta 235$ donde se eliminaron los primeros 235 aa del extremo N-terminal de TRPV4 que contiene el dominio de unión a β -catenina (Sokabe et al., 2010). La sobreexpresión del canal mutante TRPV4-M680K resultó en la inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF y mostró que los efectos inhibitorios del canal no dependen de la entrada de Ca^{2+} y apoyó la idea de que el fenómeno depende de la formación del complejo TRPV4/ β -catenina. Además, el canal $\Delta 235$, también inhibió la actividad transcripcional de β -catenina/TCF (Fig. 21 A). Estos resultados indicaron que esta delección no fue suficiente para evitar el efecto inhibitorio del canal sobre la actividad transcripcional de β -catenina.

En línea con este resultado, ensayos de coimmunoprecipitación demostraron que β -catenina interactúa con TRPV4 silvestre, así como con el canal mutante M680K e incluso con el canal $\Delta 235$ aunque menos eficientemente (Fig. 22).

Inesperadamente, una construcción con una delección más grande de la región N-terminal del canal $\Delta 410$ también inhibió la actividad transcripcional de β -catenina/TCF (Fig. 28) y los experimentos de coimmunoprecipitación demostraron

que la eliminación de ese fragmento del extremo N-terminal de TRPV4 no impide su interacción con β -catenina (Fig. 29). Además, el péptido con los 410 aa del N-terminal de TRPV4 también coinmunoprecipita con β -catenina (Fig. 29). Por lo tanto, estos resultados indican la presencia de al menos otro sitio de interacción de TRPV4 con β -catenina adicional al reportado previamente.

El transporte núcleo-citoplásmico de β -catenina se regula a través de interacciones con varias proteínas citosólicas como Menina, Axina, Chibby, APC y LZTS2 (Cao et al., 2009; Cong & Varmus, 2004; Henderson, 2000; Li et al., 2010; Thyssen et al., 2006) que transportan a β -catenina fuera del núcleo. La exportación nuclear de β -catenina resulta en la inhibición de la transcripción mediada por β -catenina/TCF. Mientras que otras proteínas regulan su importación nuclear como IQGAP1, PAK4 y Kank (Briggs et al., 2002; Li et al., 2012; Wang, 2006) a través de la interacción con β -catenina dando lugar a la activación de la transcripción mediada por β -catenina/TCF.

Se han descrito varias proteínas que se unen a β -catenina a través de motivos consenso de unión a β -catenina, por ejemplo, se sabe que la APC interactúa con β -catenina a través de tres motivos consenso de unión además de 7 repetidos de 20 aminoácidos ubicados en su dominio central para formar un complejo estable con β -catenina (Rubinfeld et al., 1995). Recientemente, también se reportó que ICAT tiene un motivo de unión a β -catenina y un segundo sitio independiente para interactuar con β -catenina (Domingues et al., 2017). Por lo tanto, estas observaciones estarían de acuerdo con lo que encontramos con respecto a que TRPV4 parecería tener más de un sitio de interacción con β -catenina. Analizando la secuencia de TRPV4, localizamos 3 posibles sitios consenso de unión a β -catenina, el primero se encuentra dentro del dominio 1 de anquirina ¹⁶⁷**DGLLPFLLTHKKRLTDE**¹⁸³, el segundo entre la anquirina 3 y 4 ²⁷⁷**DEGGYFYFGE**²⁸⁶ y el tercero en el dominio C-terminal ⁷⁷³**DRRWCFRVDE**⁷⁸². Interesantemente, las mutaciones en TRPV4 E183K, E278K, R775K y C777Y que causan displasias esqueléticas (Camacho et al., 2010; Dai et al., 2010) se encuentran dentro de las secuencias consenso de unión a β -catenina que

encontramos, sería relevante estudiar si estas mutaciones afectan la interacción con β -catenina y sí podrían estar implicadas en el desarrollo de patologías de TRPV4.

Recientemente, se reportó mediante el uso de imágenes de microscopía *direct stochastic optical reconstruction microscopy* (dSTORM) de alta resolución que TRPV4 forma un complejo con β -catenina en la membrana basolateral en células endoteliales humanas y la activación de TRPV4 por estrés mecánico cambia la localización del complejo TRPV4/ β -catenina a la membrana basal (Baratchi et al., 2017). Nuestros resultados de los ensayos de ligación por proximidad (PLA), evidenciaron que el canal TRPV4 endógeno forma un complejo con β -catenina en los núcleos y el citoplasma (probablemente membranas intracelulares) en células MDCK no polarizadas (Fig. 23), sin embargo, en células polarizadas este complejo no se observa a pesar de que hay una colocalización de estas proteínas en los bordes celulares (Fig. 24 B). Nuestros resultados sugieren que cuando las células están proliferando el canal TRPV4 está en el núcleo al igual que β -catenina y cuando el canal se activa, se sale del núcleo junto con β -catenina y se separan dirigiéndose a diferentes dominios subcelulares, TRPV4 se iría a la membrana basolateral y β -catenina a las uniones adherentes de la membrana basolateral, pero ya no habría una interacción directa de estas proteínas (Fig. 32). Esto implicaría que, en las primeras etapas del desarrollo epitelial, TRPV4 modula la localización nuclear de β -catenina, podría ser que estas proteínas se unan desde que se sintetizan en el RE, TRPV4 estaría regulando los niveles de β -catenina libre en el núcleo y su actividad transcripcional. Por el contrario, en el epitelio maduro, TRPV4 y β -catenina colocalizan en los bordes celulares, pero nuestros resultados indican que no están interactuando. La función del canal durante esta etapa podría ser la de un sensor de estímulos físicos en la membrana plasmática como se ha reportado anteriormente (Kottgen et al., 2008).

La regulación negativa o a la baja de la vía de señalización Wnt/ β -catenina está relacionada con la diferenciación celular, nuestros resultados sugieren que TRPV4 estaría regulando la diferenciación celular al inhibir la actividad de β -catenina en MDCK y probablemente en otros modelos celulares como en osteocitos y neuronas

en donde observamos también la interacción de TRPV4 con β -catenina en los núcleos celulares (Fig. 31). Se ha descrito que la interacción del factor de transcripción Sox9 y β -catenina controlan la diferenciación de condrocitos (Akiyama, 2004). En vivo, la sobreexpresión de Sox9 en condrocitos de embriones de ratón produce degradación de β -catenina, disminución de la proliferación, retraso de la diferenciación de condrocitos y enanismo. Análogicamente, la inactivación de β -catenina produce un fenotipo similar a la sobre-expresión de Sox9. Como se mencionó anteriormente, TRPV4 regula la diferenciación de condrocitos (Muramatsu et al., 2007) y el enanismo y la condrodisplasia son fenotipos vinculados a mutaciones humanas en TRPV4 (Camacho et al., 2010; Hurd et al., 2015; Lamandé et al., 2011). Sería interesante demostrar la interacción entre TRPV4/ β -catenina *in vivo* y su participación en patologías humanas.

Entre los canales iónicos que se han reportado que regulan la expresión génica, se encuentra el canal de Ca^{2+} activado por voltaje Cav1.2, en este caso un péptido que contiene la secuencia de su C-terminal viaja al núcleo para interactuar con factores de transcripción y regular la diferenciación neuronal (Gomez-Ospina et al., 2006). Para TRPM7 se ha reportado que el extremo C-terminal se corta y libera una cinasa (M7CK) que viaja al núcleo y regula la expresión génica mediante la modificación de la cromatina a través de fosforilación de histonas (Krapivinsky et al., 2014). También se ha descrito que el canal BKCa, está localizado en la membrana externa de la EN y el bloqueo de los canales BKCa induce la liberación de Ca^{2+} de la EN a través del RyR aumentando el Ca^{2+} nuclear que regula la expresión génica a través del factor de transcripción CREB (Li et al., 2014b).

El aumento de Ca^{2+} nuclear mediado por la activación de TRPV4 y la participación de TRPV4 en la expresión génica a través de la regulación transcripcional mediada por β -catenina/TCF que describimos en este trabajo, corresponde a un mecanismo diferente mediante el cual un canal iónico es capaz de transducir cambios en el exterior celular para regular la actividad transcripcional.

Nuestros resultados proporcionan un mecanismo potencial por el cual TRPV4 modula la transcripción dependiente de β -catenina a través de la regulación de su

localización subcelular por la formación de un complejo con β -catenina que se disocia con la activación del canal. Estas nuevas funciones de TRPV4 podrían ayudar a entender los fenotipos de canalopatías asociadas a TRPV4.

8. Conclusiones

En este trabajo se describen funciones que no habían sido reportadas para el canal TRPV4 como son:

1. Su localización nuclear, la participación en la regulación de la entrada de Ca^{2+} al núcleo.
2. TRPV4 es una proteína que une a β -catenina y regula su tráfico núcleo-citoplásmico.
3. Inhibe la transcripción dependiente de β -catenina.
4. TRPV4 forma un complejo con β -catenina y este complejo se modula por la actividad del canal.

El mecanismo por el cual TRPV4 regula la transcripción es diferente a los previamente reportados para otros canales iónicos.

Se ha demostrado la formación del complejo TRPV4/ β -catenina en modelos celulares de osteoblastos y de neuronas de humano.

Estas nuevas funciones deberían ser consideradas para estudiar los mecanismos por los cuales mutaciones en TRPV4 son letales o causan canalopatías con diferentes fenotipos.

Este trabajo abre un área nueva de investigación del papel del canal TRPV4 en la regulación transcripcional y la diferenciación celular.

9. Perspectivas

- Investigar cuál es la señal que promueve la salida de TRPV4 del núcleo en condiciones fisiológicas y provoca que TRPV4 se separe de β -catenina.
- Describir el mecanismo de entrada de Ca^{2+} al núcleo producido por la activación de TRPV4 y el mecanismo por el cual el canal se sale del núcleo después de su activación.
- Identificar cuáles son los genes regulados por TRPV4/ β -catenina en células MDCK y su posible implicación en la diferenciación celular.
- Evaluar si TRPV4 regula la actividad transcripcional de β -catenina y la diferenciación en modelos celulares como osteosarcoma (Saos-2) y neuroblastoma (SH-SH5Y) que corresponden a modelos celulares de los tejidos afectados en las canalopatías más comunes asociadas a TRPV4.
- Analizar si hay factores de transcripción activados por Ca^{2+} regulados por TRPV4 en células MDCK, por ejemplo, NFAT, CREB y NF- κ B.
- Evaluar si alguna mutación en TRPV4 relacionada con canalopatías afecta la interacción del canal con β -catenina.

10. Bibliografía

- Akazawa, Yuki, Yoshida H, Sugiyama Y, & I. S. 2013. Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin pharmacology and physiology*. 26:15-21.
- Akiyama, J.P.L., Yuko Mori-Akiyama, Xiaohong Yang, Ren Zhang, Zhaoping Zhang, Jian Min Deng, Makoto M Taketo, Takashi Nakamura, Richard R Behringer, Pierre D McCrea, & Benoit de Crombrughe. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*.
- Alessandri-Haber, E. Joseph, O.A. Dina, W. Liedtke, & J.D. Levine. 2005. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain*. 118:70-79.
- Andreucci, A.S., Alcausin M, Haan E, Hunter W, Kannu P, Kerr B, McGillivray G, McKinlay Gardner RJ, Patricelli MG, Sillence D, Thompson E, Zacharin M, Zankl A, Lamandé SR, & Savarirayan R. 2011. TRPV4 related skeletal dysplasias: a phenotypic spectrum highlighted by clinical, radiographic, and molecular studies in 21 new families. *Orphanet J Rare Dis*.
- Arniges, V. E, F.-F. JM, & V. MA. 2004. Swelling-activated Ca²⁺ Entry via TRPV4 Channel Is Defective in Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *J Biol Chem*.
- Arniges, Fernandez Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M, & V.M. A. 2006. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *Journal of Biological Chemistry*. 281:1580-1586.
- Auer-Grumbach, Olschewski A, Papić L, Kremer H, McEntagart ME, F.C. Uhrig S, & Fröhlich E. 2010. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nature genetics*. 42:160-164.
- Baratchi, Knoerzer M, Khoshmanesh K, Mitchell A, & M. P. 2017. Shear Stress Regulates TRPV4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane. *Scientific reports*. 7:15942.
- Becker, Blase C, Bereiter Hahn J, & J. M. 2005. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *Journal of cell science*. 118:2435-2440.
- Becker, Muller, & J.M. Leuner. 2008. The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization. *Molecular membrane biology*. 25:139-151.
- Benfenati, M. Caprini, M. Dovizio, M.N. Mylonakou, S. Ferroni, O.P. Ottersen, & M. Amiry-Moghaddam. 2011. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:2563-2568.
- Berna-Erro, Izquierdo-Serra M, Sepulveda RV, Rubio-Moscardo F, Donate-Macian P, Serra SA, Carrillo-Garcia J, Peralvarez-Marin A, Gonzalez-Nilo F, Fernandez-Fernandez JM, & V. MA. 2017. Structural determinants of 5',6'-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. *Scientific reports*. 7:10522.
- Briggs, Z. Li, & D.B. Sacks. 2002. IQGAP1-mediated stimulation of transcriptional co-activation by beta-catenin is modulated by calmodulin. *The Journal of biological chemistry*. 277:7453-7465.
- Cadigan, & Waterman. 2012. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*. 4.
- Camacho, Krakow D, Johnykutty S, Katzman PJ, Pepkowitz S, Vriens J, Nilius B, Boyce BF, & C. DH. 2010. Dominant TRPV4 mutations in nonlethal and lethal metatropic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 152A:1169-1177.
- Cao, Anishkin A, Zinkevich N S, Nishijima Y, Korishettar A, Wang Z, Fang J, Wilcox D A, & Z.D. X. 2018. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) activation by

- arachidonic acid requires protein kinase A-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 293:5307-5322.
- Cao, Liu R, Jiang X, Li J, Jiang J, Zhang C, Li X, & N. G. 2009. Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of β -catenin. *Molecular and cellular biology*. 29:5477-5487.
- Castillo, A., C. Ortuño-Pineda, C. Flores-Maldonado, I. Larre, J. Martínez Rendón, L. Hinojosa, A. Ponce, A. Ogazón, M. Serrano, J. Valdes, R.G. Contreras, & M. Cereijido. 2019. Ouabain Modulates the Adherens Junction in Renal Epithelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 52:1381-1397.
- Clevers, & Nusse. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 149:1192-1205.
- Collado Hilly, Shirvani H, Jaillard D, & M. JP. 2010. Differential redistribution of Ca^{2+} -handling proteins during polarisation of MDCK cells: Effects on Ca^{2+} signalling. *Cell calcium*. 48:215-224.
- Cong, & Varmus. 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:2882-2887.
- Cuajungco, Grimm C, Oshima K, D'Hoedt D, Nilius B, Mensenkamp A R, Bindels R J, Plomann M, & H. S. 2006. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *The Journal of biological chemistry*. 281:18753-18762.
- Chen, Sanchez A, Rubio M E, Kohl T, Pardo L A, & S. W. 2011. Functional $\text{K}(\text{v})10.1$ channels localize to the inner nuclear membrane. *PloS one*. 6:e19257.
- D'Hoedt, G. Owsianik, J. Prenen, M.P. Cuajungco, C. Grimm, S. Heller, T. Voets, & B. Nilius. 2008. Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3. *The Journal of biological chemistry*. 283:6272-6280.
- Dai, O.H. Kim, T.J. Cho, M. Schmidt-Rimpler, H. Tonoki, K. Takikawa, N. Haga, K. Miyoshi, H. Kitoh, W.J. Yoo, I.H. Choi, H.R. Song, D.K. Jin, H.T. Kim, H. Kamasaki, P. Bianchi, G. Grigelioniene, S. Nampoothiri, M. Minagawa, S.I. Miyagawa, T. Fukao, C. Marcelis, M.C. Jansweijer, R.C. Hennekam, F. Bedeschi, A. Mustonen, Q. Jiang, H. Ohashi, T. Furuichi, S. Unger, B. Zabel, E. Lausch, A. Superti-Furga, G. Nishimura, & S. Ikegawa. 2010. Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. *Journal of medical genetics*. 47:704-709.
- Delany, Hurlle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, & Kinghorn I. 2001. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiological Genomics*.
- Deutsch, C. 2003. The Birth of a Channel. *Neuron*.
- Domingues, Martinez-Sanz J, Papon L, Larue , Mouawad L, & B. J. 2017. Structure-based mutational analysis of ICAT residues mediating negative regulation of β -catenin co-transcriptional activity. *PloS one*. 12:e0172603.
- Doñate-Macián, & Perálvarez-Marín. 2014. Dissecting domain-specific evolutionary pressure profiles of transient receptor potential vanilloid subfamily members 1 to 4. *PloS one*. 9:e110715.
- Du, X. Ma, B. Shen, Y. Huang, L. Birnbaumer, & X. Yao. 2014. TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 28:4677-4685.
- Ezak, & D. Ferkey. 2011. A Functional Nuclear Localization Sequence in the C. elegans TRPV Channel OCR-2.

- Fagotto, G.U., & Gumbiner BM. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin α independent nuclear import of β -catenin. *Curr Biol*.
- Fagotto, W.a. 2001. CRM1- and Ran-independent nuclear export of β -catenin.
- Fan, X. Zhang, & P.A. McNaughton. 2009. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 284:27884-27891.
- Fang, D. Hawke, Y. Zheng, Y. Xia, J. Meisenhelder, H. Nika, G.B. Mills, R. Kobayashi, T. Hunter, & Z. Lu. 2007. Phosphorylation of β -catenin by AKT promotes β -catenin transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 282:11221-11229.
- Fedorenko, Yarotsky V, Duzhy D, & M. S. 2010. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pfluegers Archiv*. 460:1045-1050.
- Fiorillo, Moro F, Brisca G, Astrea G, Nesti C, Bálint Z, & O. A. 2012. TRPV4 mutations in children with congenital distal spinal muscular atrophy. *Neurogenetics*. 13:195-203.
- Forster, J.I., S. Koglsberger, C. Trefois, O. Boyd, A.S. Baumuratov, L. Buck, R. Balling, & P.M. Antony. 2016. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of biomolecular screening*. 21:496-509.
- Garcia-Elias, Lorenzo I M, Vicente R, & V.M. A. 2008. IP3 receptor binds to and sensitizes TRPV4 channel to osmotic stimuli via a calmodulin-binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 283:31284-31288.
- Garcia-Elias, S. Mrkonjic, C. Pardo-Pastor, H. Inada, U.A. Hellmich, F. Rubio-Moscardo, C. Plata, R. Gaudet, R. Vicente, & M.A. Valverde. 2013. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:9553-9558.
- Gkoumassi, B.G. Dekkers, M.J. Droge, C.R. Elzinga, R.E. Hasenbosch, H. Meurs, S.A. Nelemans, M. Schmidt, & J. Zaagsma. 2009. (Endo)cannabinoids mediate different Ca²⁺ entry mechanisms in human bronchial epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 380:67-77.
- Gomes, Leite MF, Bennett AM, & N. M. 2006. Calcium signaling in the nucleus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 84:325-332.
- Gomez-Ospina, G. Panagiotakos, T. Portmann, S.P. Pasca, D. Rabah, A. Budzillo, J.P. Kinet, & R.E. Dolmetsch. 2013. A promoter in the coding region of the calcium channel gene CACNA1C generates the transcription factor CCAT. *PloS one*. 8:e60526.
- Gomez-Ospina, F. Tsuruta, O. Barreto Chang, L. Hu, & R. Dolmetsch. 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)_{1.2} encodes a transcription factor. *Cell*. 127:591-606.
- Goswami, J.K., P. A. Heppenstall, & T. Hucho. 2010. Importance of Non-Selective Cation Channel TRPV4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells.
- Hatano, S.H., Itoh Y, & Muraki K. 2013. TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. *Life sciences*. 92:317-324.
- He, Q. Pan, Z. Chen, C. Sun, P. Zhang, A. Mao, Y. Zhu, H. Li, C. Lu, M. Xie, Y. Zhou, D. Shen, C. Tang, Z. Yang, J. Jin, X. Yao, B. Nilius, & X. Ma. 2017. Treatment of hypertension by increasing impaired endothelial TRPV4-KCa_{2.3} interaction. *EMBO molecular medicine*. 9:1491-1503.
- Hecht, V.K., Stemmler MP, van Roy F, & Kemler R. 2000. The p300 CBP acetyltransferase function as transcriptional coactivators of β -catenin in vertebrates. *EMBO J*.
- Henderson, B. 2000. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*. .

- Hu, H. Sun, Gui B., & Sui C. 2017. TRPV4 functions in flow shear stress induced early osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 91:841-848.
- Huber, A.H., & W.I. Weis. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 105:391-402.
- Hurd, Kirwin SM, Boggs M, Mackenzie WG, Bober MB, Funanage VL, & D. RL. 2015. A mutation in TRPV4 results in altered chondrocyte calcium signaling in severe metatropic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 167A:2286-2293.
- Jang, J.K. Byun, W.I. Jeon, S.Y. Choi, J. Park, B.H. Lee, J.E. Yang, J.B. Park, S.M. O'Grady, D.Y. Kim, P.D. Ryu, S.W. Joo, & S.Y. Lee. 2015. Nuclear localization and functional characteristics of voltage-gated potassium channel Kv1.3. *The Journal of biological chemistry*. 290:12547-12557.
- Katta, Smoyer C, & J. SL. 2014. Destination: inner nuclear membrane. *Trends in cell biology*. 24:221-229.
- Koltsova, A Platonova, GV Maksimov, AA Mongin, G. R, & S. Orlov. 2011. Activation of P2Y receptors causes strong and persistent shrinkage of C11-MDCK renal epithelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*.
- Kottgen, Buchholz B, Garcia-Gonzalez M A, Kotsis F, Fu X, Doerken M, Boehlke C, Steffl D, Tauber R, Wegierski T, Nitschke R, Suzuki M, Kramer-Zucker A, Germino G G, Watnick T, J. Prenen, Nilius B, Kuehn E W, & Walz G. 2008. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *Journal of Cell Biology*. 182:437-447.
- Krapivinsky, L. Krapivinsky, Y. Manasian, & D. Clapham. 2014. The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell*. 157:1061-1072.
- Lamandé, Yuan Y, Gresshoff IL, Rowley L, Belluoccio D, Kaluarachchi K, Little CB, & B. E. 2011. Mutations in TRPV4 cause an inherited arthropathy of hands and feet. *Nature genetics*. 43:1142-1146.
- Lee, T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki, & M.J. Caterina. 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:1304-1310.
- Lee, C. Zhu, Y. Peng, D.T. Johnson, L. Lehmann, & Z. Sun. 2013. Identification of a novel role of ZMIZ2 protein in regulating the activity of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 288:35913-35924.
- Leite, E.C. Thrower, W. Echevarria, P. Koulen, K. Hirata, A.M. Bennett, B.E. Ehrlich, & M.H. Nathanson. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:2975-2980.
- Li. 2017. TRP Channel Classification. *Advances in experimental medicine and biology*. 976:1-8.
- Li, C. Chen, F. Wang, W. Huang, Z. Liang, Y. Xiao, K. Wei, Z. Wan, X. Hu, S. Xiang, X. Ding, & J. Zhang. 2014a. KCTD1 suppresses canonical Wnt signaling pathway by enhancing beta-catenin degradation. *PloS one*. 9:e94343.
- Li, Jie W, L. Huang, Wei P, Li S, Z. Luo, Friedman AK, Meredith AL, Han MH, Zhu XH, & G. TM. 2014b. Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling. *Nature neuroscience*. 17:1055-1063.
- Li, Mofunanya A, Fischer V, Hall J, & T. K. 2010. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Chibby controls beta-catenin signaling. *Molecular biology of the cell*. 21:311-322.
- Li, Y. Shao, Y. Tong, T. Shen, J. Zhang, Y. Li, H. Gu, & F. Li. 2012. Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates beta-catenin intracellular translocation and signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 1823:465-475.

- Liedtke, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, & H. S. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*.
- Liedtke, & Friedman. 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:13698-13703.
- Liedtke, T.D., Bargmann C, & Friedman J. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *In Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 100 Suppl 2. 14531-14536.
- Ling Wu, X.G., R. C Brown, S. Heller, & R. G O'Neil. 2007. Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293:F1699-1713.
- Liu, B.C. Bandyopadhyay, T. Nakamoto, B. Singh, W. Liedtke, J.E. Melvin, & I. Ambudkar. 2006. A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *The Journal of biological chemistry*. 281:15485-15495.
- Lu, Turnbull SR, B. A, Carveth K, Verkman AS, & S. W. 2000. Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*.
- Ma, B. Nilius, J.W. Wong, Y. Huang, & X. Yao. 2011. Electrophysiological properties of heteromeric TRPV4-C1 channels. *Biochimica et biophysica acta*. 1808:2789-2797.
- Mack, F., M. 2017. Disrupting sensitization of TRPV4. *Neuroscience*. 352:1-8.
- Malhas, G.C., & Vaux DJ. 2011. The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in cell biology*. 21:362-373.
- Marius, Guerra MT, M. Nathanson, Ehrlich BE, & L. MF. 2006. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell calcium*. 39:65-73.
- Martínez-Rendón, J. 2016. Papel del canal TRPV4 en el establecimiento y regulación de las uniones estrechas en células de epitelio corneal RCE1 (515). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.
- Martinez-Rendon, J., Sanchez-Guzman E, Rueda A, Gonzalez J, Gullias-Canizo R, Aquino-Jarquín G, Castro-Munozledo F, & García-Villegas, R. 2017. TRPV4 Regulates Tight Junctions and Affects Differentiation in a Carcell Culture Model of the Corneal Epithelium. *Journal of cellular physiology*. 232:1794-1807.
- Masuyama, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, & C. G. 2008. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell metabolism*. 8:257-265.
- Matamoros-Volante, J. A. 2016. Análisis de la localización nuclear inusual del canal iónico TRPV4 en células de epitelio renal. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Iztacala.
- Mauger. 2012. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biology of the cell*. 104:70-83.
- Mellström, S.M., Gomez-Villafuertes R, & Naranjo JR. 2008. Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol Rev*. .
- Miravet, J. Piedra, F. Miro, E. Itarte, A. Garcia de Herreros, & M. Dunach. 2002. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 277:1884-1891.
- Mizuno, M.N., Imai M, & Suzuki M. 2003. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am J Physiol Cell Physiol*. .

- Muramatsu, Wakabayashi M, Ohno T, Amano K, Ooishi R, & S. T. 2007. Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 282:32158-32167.
- Nilius, J. Prenen, U. Wissenbach, M. Bodding, & G. Droogmans. 2001. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 443:227-233.
- Nilius, & Voets. 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports*. 14:152-163.
- Pan, H. Yang, S. Mergler, H. Liu, S.D. Tachado, F. Zhang, W.W. Kao, H. Koziel, U. Pleyer, & P.S. Reinach. 2008. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell calcium*. 44:374-385.
- Pedersen, G. Owsianik, & B. Nilius. 2005. TRP channels: an overview. *Cell calcium*. 38:233-252.
- Peng, U. Lewandrowski, B. Muller, A. Sickmann, G. Walz, & T. Wegierski. 2010. Identification of a Protein Kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochemical and biophysical research communications*. 391:1721-1725.
- Phan, Leddy HA, Votta BJ, Kumar S, Levy DS, Lipshutz DB, Lee S H, Liedtke W, & G. F. 2009. Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*. 60:3028-3037.
- Rock, Prenen J, Funari VA, Funari TL, Merriman B, Nelson SF, Lachman RS, Wilcox WR, Reyno S, Quadrelli R, Vaglio A, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Ikegawa S, Nagai T, Rimoin DL, Nilius B, & C. DH. 2008. Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nature genetics*. 40:999-1003.
- Rubinfeld, Souza B, Albert I, Munemitsu S, & P. P. 1995. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 270:5549-5555.
- Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, & A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 9:676-682.
- Shin, E.J. Lee, S. Hyun, J. Chun, Y. Kim, & S.S. Kang. 2012. Phosphorylation on the Ser 824 residue of TRPV4 prefers to bind with F-actin than with microtubules to expand the cell surface area. *Cellular signalling*. 24:641-651.
- Shin, L.E., Chun J, Hyun S, & Kang SS. 2015. Phosphorylation on TRPV4 Serine 824 Regulates Interaction with STIM1. *Open Biochem J*.
- Shukla, J. Kim, S. Ahn, K. Xiao, S.K. Shenoy, W. Liedtke, & R.J. Lefkowitz. 2010. Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *The Journal of biological chemistry*. 285:30115-30125.
- Slusarski, & F. Pelegri. 2007. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Developmental biology*. 307:1-13.
- Soderberg, Leuchowius K J, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson L G, & Landegren U. 2008. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods*. 45:227-232.
- Sokabe, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, & T. M. 2010. The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 285:18749-18758.

- Strotmann, S.D., & Plant TD. 2003. Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *The Journal of biological chemistry*. 278:26541-26549.
- Su, B. Vogelstein, & K.W. Kinzler. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 262:1734-1737.
- Sullivan, Zimanyi C M, Aisenberg W, Bears B, Chen D H, Day J W, Bird TD, Siskind CE, & S. C.J. 2015. Novel mutations highlight the key role of the ankyrin repeat domain in TRPV4-mediated neuropathy. *Neurology. Genetics*. 1:e29.
- Suzuki, A. Hirao, & A. Mizuno. 2003a. Microtubule-associated [corrected] protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4). *The Journal of biological chemistry*. 278:51448-51453.
- Suzuki, A. Mizuno, K. Kodaira, & M. Imai. 2003b. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *The Journal of biological chemistry*. 278:22664-22668.
- Suzuki, Notomi T, Miyajima D, Mizoguchi F, Hayata T, Nakamoto T, Hanyu R, Kamolratanakul P, Mizuno A, Suzuki M, Ezura Y, Izumi Y, & N. M. 2013. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. *Bone*. 54:172-178.
- Tabuchi, M. Suzuki, A. Mizuno, & A. Hara. 2005. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neuroscience letters*. 382:304-308.
- Tadmouri, S. Kiyonaka, M. Barbado, M. Rousset, K. Fablet, S. Sawamura, E. Bahembera, K. Pernet-Gallay, C. Arnoult, T. Miki, K. Sadoul, S. Gory-Faure, C. Lambrecht, F. Lesage, S. Akiyama, S. Khochbin, S. Baulande, V. Janssens, A. Andrieux, R. Dolmetsch, M. Ronjat, Y. Mori, & M. De Waard. 2012. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *The EMBO journal*. 31:3730-3744.
- Tago , N.T., Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, & Akiyama T. 2000. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev*. .
- Takemaru , M.R. 2000. The Transcriptional Coactivator CBP Interacts with b-Catenin to Activate gene expression. *The Journal of cell biology*.
- Taylor, A. Pereyra, T. Zhang, M.L. Messi, Z.M. Wang, C. Herenu, P.F. Kuan, & O. Delbono. 2014. The Cavbeta1a subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *The Journal of cell biology*. 205:829-846.
- Thyssen, Li T H, Lehmann L, Zhuo M, Sharma M, & S. Z. 2006. LZTS2 is a novel beta-catenin-interacting protein and regulates the nuclear export of beta-catenin. *Molecular and cellular biology*. 26:8857-8867.
- Ueda , S.M., Kamiya T, Joh T, & Ugawa S. 2011. The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Unger, Lausce, Stanzial F, Gillessen Kaesbach G, Stefanova I, Di Stefano CM, Bertini E, Dionisi Vici C, Nilius B, Zabel B, & S.F. A. 2011. Fetal akinesia in metatropic dysplasia: The combined phenotype of chondrodysplasia and neuropathy? *American journal of medical genetics. Part A*. 155A:2860-2864.
- Valenta, Hausmann G, & B. K. 2012. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO Journal*. 31:2714-2736.
- Venkatachalam, & C. Montell. 2007. TRP channels. *Annual review of biochemistry*. 76:387-417.
- Vincent, & Duncton. 2011. TRPV4 Agonists and Antagonists. *Curr Top Med Chem*.
- Vincent , A.A., Nguyen MT, Dourado M, DeFalco J, Gustafson A, Spiro P, Emerling DE, Kelly MG, & Duncton MA. 2009. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochemical and biophysical research communications*. 389:490-494.

- Voets, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bodding M, Droogmans G, & Nilius B. 2002. Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of biological chemistry*. 277:33704-33710.
- Vriens, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, Morisseau C, Hammock B D, Fleming I, Busse R, & N. B. 2005. Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circulation research*. 97:908-915.
- Vriens, Owsianik G, Janssens A, Voets T, & N. B. 2007. Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*. 282:12796-12803.
- Vriens, Watanabe H, Janssens A, Droogmans, Voets T, & N. B. 2004. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:396-401.
- Wang, Fu X, Gaiser S, Kottgen M, Kramer-Zucker A, Walz G, & Wegierski T. 2007. OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 282:36561-36570.
- Wang, K.N., Zhu Y, & Kiyama R. 2006. Nucleo-cytoplasmic shuttling of human Kank protein accompanies intracellular translocation of beta-catenin. *Journal of cell science*. 119:4002-4010.
- Watanabe, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, & Nilius B. 2003a. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. 424:434-438.
- Watanabe, J. Vriens, A. Janssens, R. Wondergem, G. Droogmans, & B. Nilius. 2003b. Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺. *Cell calcium*. 33:489-495.
- Wegierski, Lewandrowski U, Muller B, Sickmann A, & Walz G. 2009. Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli. *Journal of Biological Chemistry*. 284:2923-2933.
- Weinstein, T.S. W, C. Y, L. B, & C.D. H. 2014. Mice expressing mutant Trpv4 recapitulate the human TRPV4 disorders. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 29:1815-1822.
- White, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, & N. I. 2016. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiological Reviews*. 94:911-973.
- Willette, W. Bao, S. Nerurkar, T.L. Yue, C.P. Doe, G. Stankus, G.H. Turner, H. Ju, H. Thomas, C.E. Fishman, A. Sulpizio, D.J. Behm, S. Hoffman, Z. Lin, I. Lozinskaya, L.N. Casillas, M. Lin, R.E. Trout, B.J. Votta, K. Thorneloe, E.S. Lashinger, D.J. Figueroa, R. Marquis, & X. Xu. 2008. Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 326:443-452.
- Wissenbach, Bödding M, Freichel M, & F. V. 2000. Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* . 24:127-134.
- Xu, H. Zhao, W. Tian, K. Yoshida, J.B. Roullet, & D.M. Cohen. 2003. Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *The Journal of biological chemistry*. 278:11520-11527.
- Xu, Y.F., W. Tianand, & D. M. Cohen. 2005. Glycosylation of the osmosensitive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol*.
- Zauli, G., E. Rimondi, F. Corallini, R. Fadda, S. Capitani, & P. Secchiero. 2007. MDM2 antagonist Nutlin-3 suppresses the proliferation and differentiation of human pre-

osteoclasts through a p53-dependent pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 22:1621-1630.

Zhao, Huang H, Jiang Y, Wei H, Liu P, Wang W, & N. W. 2012. Unusual localization and translocation of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *European Journal of Histochemistry*. 56:e32.

Apéndice

A. Cultivos bacterianos, extracción de DNA plasmídico y visualización de geles de agarosa

Las bacterias de interés fueron crecidas en medio LB líquido con 100 µg/µL de ampicilina (Amp^R) o kanamicina 20 µg/µL (Km^R), para posteriormente extraer el plásmido por medio de miniprep por lisis alcalina o bien, cuando el DNA se utilizó para transfectar, se purificó por midiprep con el kit QIAGEN® *Plasmid Midi Kit* (No. de Catálogo 12143, QIAGEN). La identificación y caracterización de plásmidos se realizó mediante ensayos de digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

De manera general para todas las construcciones, las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la T4 DNA ligasa (No. de Catálogo 10 481 220 001, Roche) durante toda la noche a 16°C y se transformaron en bacterias *E. coli* DH5α para la selección y obtención de plásmidos. La purificación de fragmentos provenientes, ya sea de una amplificación por PCR o de una digestión enzimática, se realizó por minicolumna con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (No. de Catálogo A9281, Promega). Los productos de PCR así como los patrones de restricción de los DNAs analizados se visualizaron en geles de agarosa al 0.8% preparados en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.4). El DNA se visualizó con bromuro de etidio (0.1µg/mL) en un transiluminador de luz UV+ y los geles fueron fotografiados utilizando un fotodocumentador DigiGenius (Synoptics).

B. Secuenciación automatizada de DNA

Todos los plásmidos construidos con las secuencias amplificadas por PCR fueron verificados por secuenciación automatizada del DNA utilizando el kit BigDye terminator v3.1 cycles sequencing (No. de Catálogo 4337455, Applied Biosystems). Se emplearon 500 ng del plásmido de interés y 10 nmoles de primer en un volumen total de reacción de 20 µL. Las condiciones de la reacción fueron: 1 minuto a 96°C; 25 ciclos de 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos, 60°C 4 min y terminando a 4°C. Posteriormente el DNA se precipitó con 60 µl de etanol absoluto y 5 µl de EDTA 125 mM por 30 min a TA, se centrifugó 20 min a 13 000 rpm y se limpió la pastilla

con 2 lavados de 250 µl de etanol a 70%. Estas secuencias fueron enviadas para su análisis a la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Vector NTI.

C. Construcción del vector pCMV-ΔLuc

Se partió del plásmido pGL4.10 [luc2] (4242 pb, Promega, Amp^R) (Figura Suplementaria 1A), del cual se cortó 1 µg de DNA con 3 U de las enzimas de restricción *EcoRV* (extremos parejos) y *XbaI* (extremos 5´saliente) durante 1 h a 37°C para liberar el fragmento que codifica para luciferasa (*luc2*) (1716 pb). El fragmento de 2526 pb (sin purificar) se rellenó con la enzima Klenow (5U) (No. de Catálogo 11008404001, Roche) y 1 µl de dNTPs (0.5 mM) en un volumen final de 20 µl durante toda la noche a 32°C para obtener extremos parejos. Después de limpiar el DNA por minicolumna se religó el vector y se transformó en bacterias DH5α. El plásmido obtenido se nombró pΔLuc (2526 pb). Este plásmido se digirió simultáneamente con *BamHI* y *PstI* para obtener 2 fragmentos de 1426 y 1100 pb que confirman la correcta ligación del plásmido.

El vector pΔLuc se cortó con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* durante 1 h a 37°C, mostrando su forma linealizada de 2526 pb y se desfosforiló con la enzima rAPid Alkaline Phosphatase (No. de Catálogo 04898133001, Roche) en un volumen final de 20 µl por 10 min a 37 °C y después se inactivo la enzima 5 min a 75°C para posteriormente insertarle la secuencia del promotor CMV.

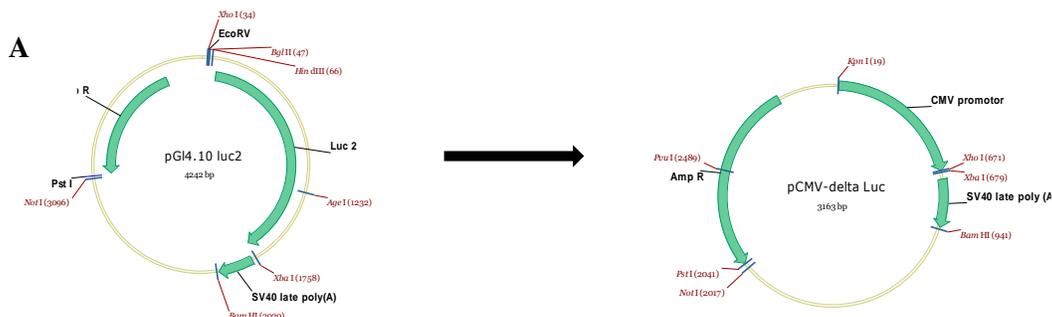
Para obtener el promotor, se amplificó un fragmento de 652 pb por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) correspondiente al enhancer y promotor del citomegalovirus (CMV) con 1 U de la DNA polimerasa Pfx Platinun (No. de Catálogo 11708013 Invitrogen), con los oligonucleótidos sentido KpnCMV F y anti sentido XhoCMV R (10 µM), 200 µM de la mezcla de dNTPs y 50 ng del plásmido templado (pFlag-TRPV4, Km^R) en un volumen final de 50 µl ajustados con agua libre de nucleasas (Gibco). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador AB Applied Biosystems. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en

la Tabla suplementaria 1. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min seguida de 30 ciclos de, desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, acoplamiento de los oligonucleótidos a 53°C durante 30 segundos y elongación a 68°C durante 40 segundos, seguidas por una elongación final a 68°C durante 40 segundos y finalmente a 4°C. Todas las amplificaciones de fragmentos por PCR se hicieron con las mismas condiciones.

El fragmento obtenido por PCR se limpió por minicolumna y se cortó simultáneamente con 3 U de cada una de las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* durante toda la noche a 37°C y se visualizó en un gel de agarosa.

Posteriormente, en el vector pΔLuc se clonó el fragmento del promotor CMV en los mismos sitios de restricción, la inserción del promotor se confirmó por restricción con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*, el plásmido fue denominado pCMV-ΔLuc y que se usó como vector de expresión para clonar TRPV4 y sus variantes.

En la figura Suplementaria 1 se muestran los patrones de restricción de las moléculas utilizadas en la construcción.



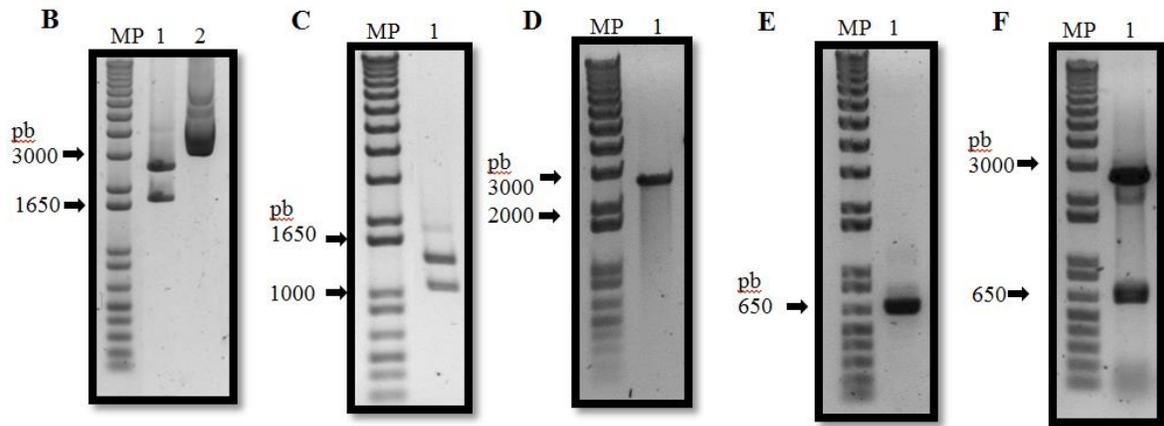


Figura Suplementaria 1. Esquema de la construcción del vector de expresión pCMV- Δ Luc. (A) Mapa del plásmido pGL4.10 luc2 que se usó como molécula de inicio al cual se le eliminó el gen Luc2 y se le clonó el promotor CMV para obtener al plásmido pCMV- Δ Luc cuyo mapa se muestra a la derecha. Los detalles de la construcción se describen en el texto. (B) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido de pGL4.10 luc2 digerido con *EcoRV* y *XbaI* para generar los fragmentos correspondientes a 2526 y 1716 pb y liberar el fragmento del gen de luciferasa 2 (carril 1, 1716 pb). Carril 2, plásmido sin cortar. (C) Plásmido p Δ Luc digerido con *BamHI* y *PstI* (carril 1, 1426 y 1100 pb). (D) Plásmido p Δ Luc digerido con *KpnI/XhoI* (carril 1, 2522 pb). (E) Fragmento de 652 pb del promotor CMV amplificado por PCR (carril 1) a partir del plásmido pFlag-TRPV4. (F) Plásmido pCMV- Δ Luc cortado con las enzimas de restricción *KpnI/XhoI* que confirma la clonación del inserto de 652 pb del promotor CMV en el sitio *KpnI/XhoI* (carril 1, 2511 y 652pb). MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

D. Construcción del plásmido pGE-V4-Flag (TRPV4 WT)

Se empleó 1 µg del vector pGL4.10 [luc2] (Amp^R) para cortarlo con 3 U de *EcoRV* (extremos parejos) y *XbaI* (extremos 5´ salientes) y obtener los fragmentos 2526 y 1716 pb y sin purificar, se rellenaron con la enzima Klenow durante 1 h a 32°C. Después de limpiar el DNA por minicolumna, el vector se desfosforiló con la enzima rAPid Alkaline Phosphatase en un volumen final de 20 µl por 30 min a 37 °C y se inactivó 5 min a 75°C (Figura Suplementaria 2).

Se partió del plásmido pTRPV4-Flag (Km^R), que contiene al cDNA de TRPV4 de perro (No. Acc. NM_001127315 clonado en el vector pCMV-Tag 4A (Stratagen, Km^R) con el epítipo Flag en el C-terminal. Este plásmido se cortó con 3 U de las enzimas de restricción *PvuI* (extremos 3´ salientes) y *NsiI* (extremos 3´ salientes) que liberó un fragmento de 3423 pb con la secuencia codificante de TRPV4 antecedida del promotor CMV. Posteriormente los fragmentos obtenidos con extremos 3´ salientes (sin purificar) se rellenaron con la enzima Klenow (5U) y 1 µl de dNTPs (0.5 mM) en un volumen final de 20 µl durante toda la noche a 32°C para obtener extremos parejos y en seguida se limpiaron por minicolumna. Finalmente, la mezcla de fragmentos del plásmido pTRPV4-Flag se ligó con la mezcla de fragmentos de pGL4.10 con los extremos parejos a una relación molar vector: inserto de 1:5, poniendo 50 ng del vector (pGL4.10, 2526 pb). Todas las ligaciones se realizaron en la misma proporción. La ligación se transformó y se seleccionaron clonar resistentes a Ap.

Las clonas fueron evaluadas por *cracking* para seleccionar las colonias de bacterias que tuvieran plásmido de mayor tamaño (correspondiente a la ligación de inserto en el vector) de aquellas de menor tamaño (con solo vector). Para ello cada colonia fue resuspendida en 25 µl de agua bidestilada y después se agregaron 25 µl de la solución de *cracking* 2X (NaOH 10N, EDTA 0.5 M pH8, SDS 10%, verde de bromocresol 0.05% y glicerol 10%) se homogenizó brevemente en vortex y se dejaron 5 min a TA. Las muestras se corrieron en geles de agarosa, se extrajo el plásmido de las colonias seleccionadas y se digirió con las enzimas de restricción

PstI y *XhoI* para confirmar la identidad del plásmido, esperando un patrón de corte de 2909, 1156, 1478 pb y 407 pb. Este plásmido resultante fue denominado pGE-V4-Flag. En la figura Suplementaria 2 se muestran los patrones de restricción de las moléculas utilizadas en la construcción.

Adicionalmente, se construyó un plásmido con el canal TRPV4 con un epítipo Flag en la primera asa extracelular, para esto, se amplificó por PCR *overlap-extension* con los oligonucleótidos sentido V41LFlag F y antisentido V41LFlag R usando como templado al plásmido pPG-V4 (Amp^R), el fragmento obtenido se cortó con *EcoRI* durante 2 h a 37°C y se insertó en el sitio *EcoRI* del vector pPG-V4 (derivado de pGL4.10 [luc2]) para obtener el plásmido pV4-1LFlag (Amp^R).

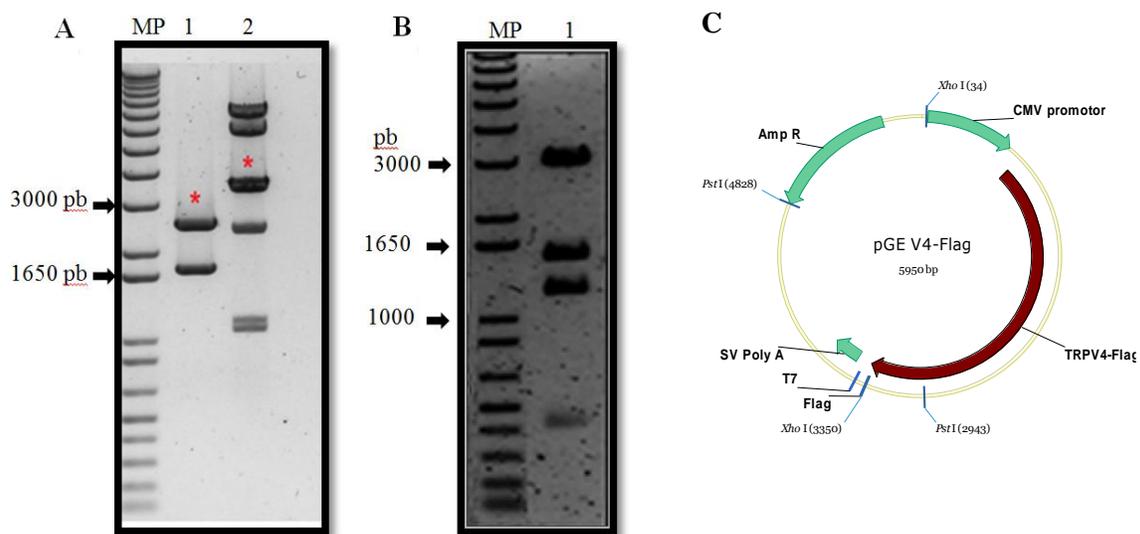


Figura Suplementaria 2. Esquema de la construcción del plásmido silvestre de TRPV4 pGE-V4-Flag. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pGL4.10 luc2 digerido con *EcoRV/XbaI* para generar los fragmentos correspondientes a 2526 y 1716 pb (carril 1) y digestión enzimática con *PvuI/NsiI* del plásmido pTRPV4-Flag para generar los fragmentos de 3423, 2331, 1069 y 72 pb (carril 2), los * indican los fragmentos que se deseaban ligar (2526 y 3423 pb). (B) Plásmido pGE-V4-Flag cortado con las enzimas de restricción *PstI/XhoI* que confirma la orientación correcta del inserto (2909, 1478, 1156 y

407 pb, carril 1). (C) Mapa del plásmido pGE-V4-Flag donde se indican los sitios de restricción *PstI/XhoI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

E. Construcción del plásmido pGE-M680K-Flag (TRPV4-M680K)

Inicialmente se partió del plásmido pEYFP-V4D-M680K Km^R (construido por Lilianha Domínguez Malfavón) para transferir la mutación M680K al plásmido pTRPV4-Flag (Km^R).

El plásmido pTRPV4-Flag se digirió con 3 U de cada enzima *BamHI/PstI* y se desfosforiló, los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa esperando fragmentos de 4694 y 2201 pb (Figura Suplementaria 3A). Posteriormente, 2 µg del plásmido pEYFP-V4D-M680K fueron digeridos con 3 U de cada una de las enzimas de restricción *KpnI/BamHI/PstI* durante 2 h a 37 °C en un volumen final de 30 µl, generando segmentos de 4348, 2201, 550 y 507 pb, el fragmento *BamHI-PstI* de 2201 pb contiene la mutación. Los fragmentos obtenidos se limpiaron por extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y posteriormente el DNA se precipitó agregando 0.1 del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 0.6 del volumen de isopropanol.

La mezcla de los fragmentos fue ligada con el plásmido pTRPV4-Flag en los sitios *BamHI-PstI*. Para identificar la construcción deseada, los candidatos se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* durante 2 h a 37°C, esperando un patrón de corte de 5252 y 1643, los fragmentos que se clonaron en sentido inverso liberaban un fragmento de 600 pb, la liberación de un fragmento de 1643 pb confirmó la orientación correcta para obtener el plásmido pM680K-Flag. En la figura Suplementaria 3 se muestran los patrones de restricción de las moléculas utilizadas en la construcción.

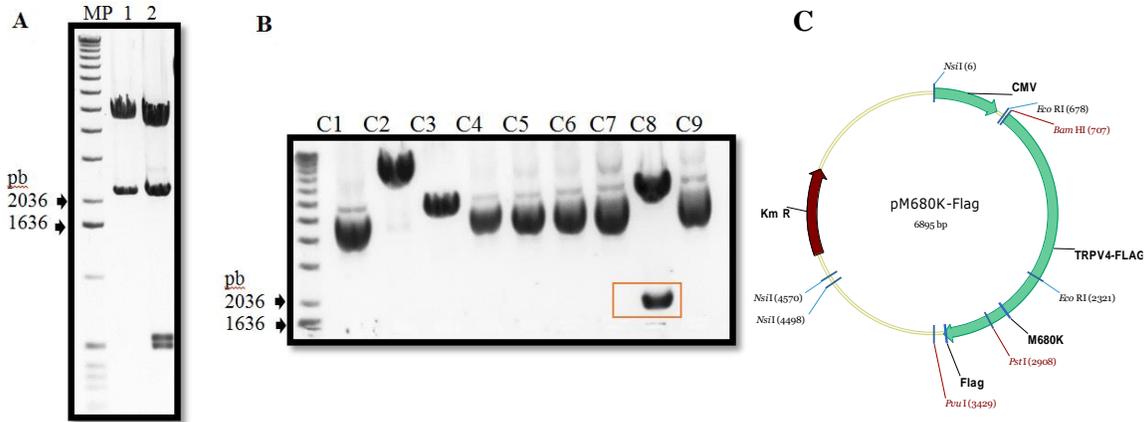


Figura Suplementaria 3. Esquema de la construcción del plásmido pM680K-Flag. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pTRPV4-Flag digerido con *BamHI/PstI* para generar los fragmentos correspondientes a 4694 y 2201 pb (carril 1). En el carril 2 se muestra la restricción enzimática con *KpnI/BamHI/PstI* del plásmido pEYFP-V4D-M680K para generar los fragmentos correspondientes a 4348, 2201, 550 y 507 pb. El segmento de 2201 pb contiene la mutación. (B) C1-C9 diferentes candidatas analizadas con la enzima de restricción *EcoRI*, clona 8 contiene el inserto en la orientación correcta liberando un fragmento de 1643 pb indicado en el recuadro rojo. (C) Mapa del plásmido pM680K-Flag donde se indica los sitios de restricción *EcoRI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

Finalmente, para obtener el plásmido pGE-M680K-Flag se siguió una estrategia similar a la usada para pasar el cDNA silvestre de TRPV4 del plásmido pTRPV4-Flag (Km^R) al vector pGL4.10 [luc2] (Amp^R).

En la figura Suplementaria 4 se muestran los patrones de restricción del plásmido pGL4.10 luc2 cortado con *EcoRV/XbaI*. Posteriormente el plásmido pM680K-Flag (Km^R) se digirió con las enzimas de restricción *PvuI/NsiI* que liberó la secuencia codificante del TRPV4 junto con el promotor CMV resultando un fragmento de 3423 pb y el vector digerido en fragmentos de 2331, 1069 y 72 pb. Posteriormente se rellenaron los extremos 3' salientes con la enzima *Klenow* para obtener extremos parejos. Los fragmentos de ambos, del vector (2526 pb) y del canal con CMV (3423 pb), se ligaron en los extremos parejos. Las colonias candidatas fueron evaluadas con las enzimas de restricción *PstI* y *XhoI* esperando un patrón de corte de 2909,

1156, 1478 y 407 pb. Se verificó por secuenciación la presencia de la mutación M680K, el plásmido resultante se nombró pGE-M680K-Flag (Figura Suplementaria 4D).

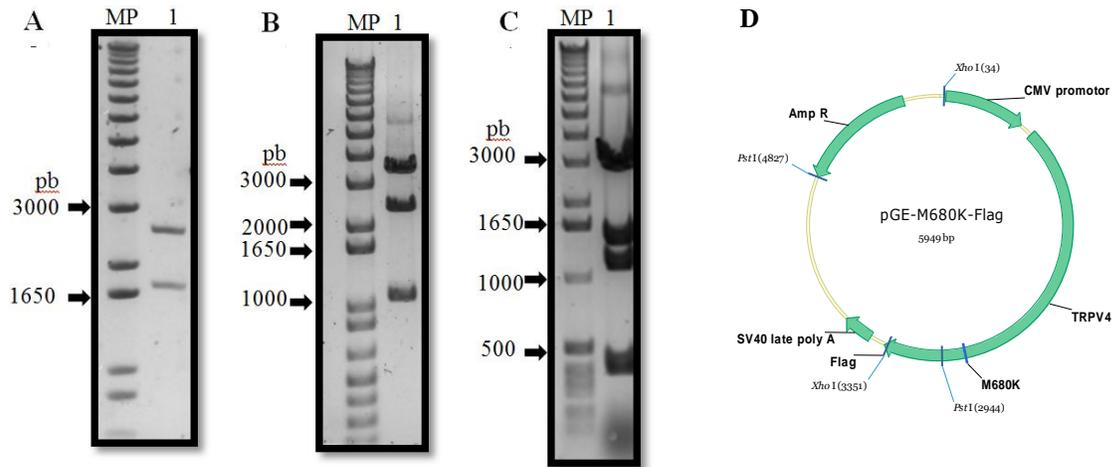


Figura Suplementaria 4. Esquema de la construcción del plásmido pGE-M680K-Flag
 (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pGL4.10 luc2 digerido con *EcoRV/XbaI* para generar los fragmentos correspondientes a 2526 y 1716 pb (carril 1). (B) Restricción enzimática con *PvuI/NsiI* del plásmido pM680K-Flag con el patrón de bandas correspondientes a 3423, 2331, 1069 y 72 pb (carril 1). (C) Plásmido pGE-M680K-Flag cortado con las enzimas de restricción *PstI/XhoI* que confirma la orientación correcta del inserto 2909, 1478, 1156 y 407 pb. (carril 1). (D) Mapa del plásmido pGE-M680K-Flag indicando los sitios de restricción *PstI/XhoI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

F. Construcción del plásmido pGE-Δ235-Flag

El fragmento del canal TRPV4 correspondiente a los aa 236 al 871 (1.9 Kb) fue amplificado por PCR usando 10 μM de cada uno de los oligonucleótidos Bgl2Delta235DV4 F y DV4StopXho R (Tabla A1), 1 U de la DNA polimerasa Pfx Platinun, 200 μM de la mezcla de dNTPs y 50 ng del plásmido templado pTRPV4D (Amp^R) en un volumen final de 50 μl ajustados con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron las mencionadas anteriormente, pero con una temperatura de acoplamiento de los oligonucleótidos de 55°C durante 30 segundos. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa. El producto de PCR se limpió por minicolumna y se digirió con 3 U de las enzimas de restricción *Bgl*III y *Xho*I a 37°C durante toda la noche (Figura Suplementaria 5).

Por otro lado, 1 µl del vector pCMV-Tag1 (con el epítipo Flag en el N-terminal) (Stratagen, Km^R) se digirió con 3 U de las enzimas de restricción *Bgl*III y *Xho*I a 37°C durante 2 h y se desfosforiló con rAPid Alkaline Phosphatase, el vector en su forma linealizada se observó en un gel de agarosa.

El fragmento obtenido del vector y el fragmento de PCR se ligaron en los sitios *Bgl*III y *Xho*I. Las clonas fueron evaluadas con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Xho*I esperando un patrón de corte de 1.9 Kpb y 4.4 Kpb. La autenticidad de la secuencia se verificó por secuenciación y el plásmido se denominó pFlag-Δ235 (Figura Suplementaria 5D).

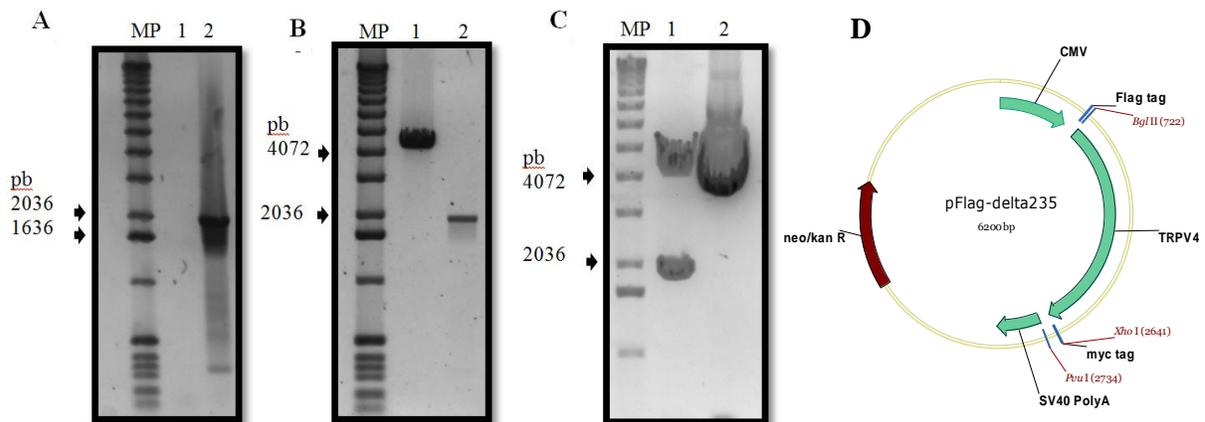


Figura Suplementaria 5. Esquema de la construcción del plásmido pFlag-Δ235. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del control negativo sin DNA de la PCR (carril 1), PCR del fragmento de 1.9 Kb que codifica para los aminoácidos 236 al 871 de TRPV4 (carril 2). (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido CMV-tag1 digerido con *Bgl*III/*Xho*I (4.4 Kb, carril 1). Carril 2 muestra el Fragmento de PCR cortado con *Bgl*III/*Xho*I

(1.9 Kb). (C) Plásmido pFlag- Δ 235 cortado con las enzimas de restricción *BglIII/XhoI* para liberar el inserto que confirma la clonación del fragmento de 1.9 Kb en el sitio *BglIII/XhoI* (carril 1). Carril 2 Plásmido sin cortar. (D) Mapa del plásmido pFlag- Δ 235 que ubica los sitios de restricción *BglIII/XhoI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

Adicionalmente, también se clonó el canal truncado Δ 235TRPV4 con el epítipo Flag en el extremo C-terminal, para ello se amplificó por PCR un fragmento de 1349 pb con los oligonucleótidos NotI Δ 235 F y DV4-M680K R (Tabla suplementaria 1) y 50 ng del plásmido templado pTRPV4D (Amp^R). La Figura Suplementaria 6 muestra la amplificación por PCR del fragmento de 1349 pb. El producto de PCR fue digerido con *NotI/EcoRI* durante 2 h a 37 °C y se visualizó en un gel de agarosa, se divide en dos fragmentos de 919 y 430 pb, el segmento de 919 pb (no incluye la mutación proveniente del oligo DV4-M680K R. Los fragmentos se limpiaron por minicolumna.

Posteriormente, en el plásmido pTRPV4-Flag se clonó el fragmento de 919 pb de TRPV4 en los sitios de restricción *NotI/EcoRI*. El plásmido pTRPV4-Flag se cortó simultáneamente con las enzimas de restricción *NotI/EcoRI*, para obtener fragmentos de 5243 y 1643 pb, el segmento correspondiente a 1643 pb sin purificar fue intercambiado con el de 919 pb. La inserción del fragmento se confirmó por restricción con las enzimas de restricción *NotI/EcoRI* esperando un patrón de corte de 5243 y 924 pb. La autenticidad de la secuencia se verificó por secuenciación para obtener el plásmido pNot Δ 235 V4-Flag (Figura Suplementaria 6D).

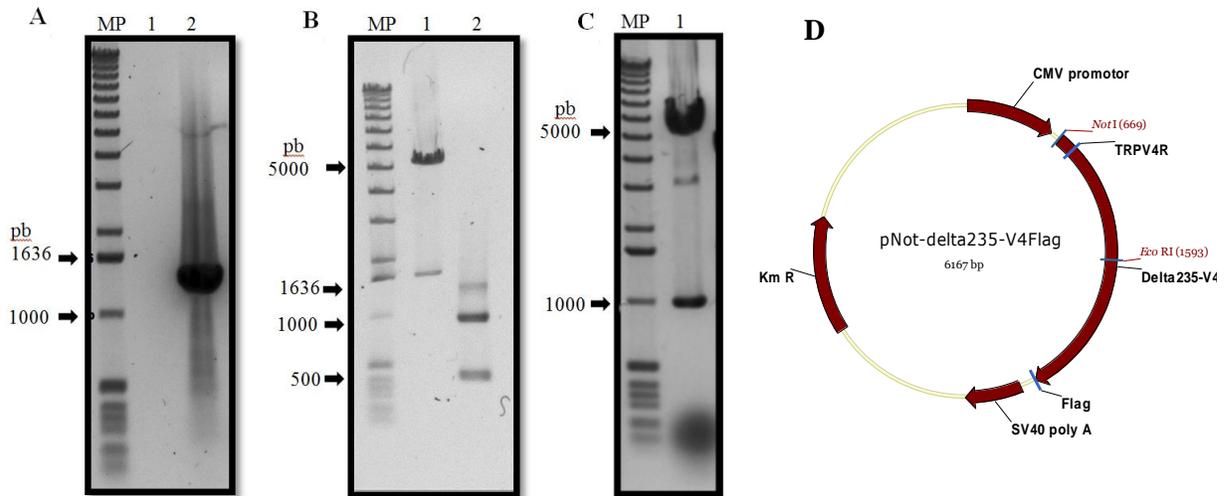


Figura Suplementaria 6. Esquema de la construcción del plásmido pNotΔ235 V4-Flag.

(A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del control negativo sin cDNA de la PCR (carril 1), PCR del fragmento de 1349 que codifica para los aminoácidos de 236 al 871 de TRPV4 (carril 2). (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pTRPV4-Flag digerido con *NotI/EcoRI* para generar los fragmentos de 5243 y 1643 pb (carril 1). El carril 2 muestra la restricción enzimática con *NotI/EcoRI* del producto de PCR para generar los fragmentos de 919 y 430 pb. (C) Plásmido pNotΔ235 V4-Flag cortado con las enzimas de restricción *NotI/EcoRI* (5243 y 924 pb, carril 1) que verifica la inserción del inserto clonado en los sitios *NotI/EcoRI*. (D) Mapa del plásmido pNotΔ235 V4-Flag que muestra los sitios de restricción *NotI/EcoRI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

Finalmente, para obtener el plásmido pGE-Δ235-Flag (Amp^R), se transfirió el cDNA del canal del plásmido pNotΔ235 V4-Flag al vector pGL4.10 [*luc2*] siguiendo la misma estrategia que se describe para la construcción del TRPV4-Flag silvestre. El vector pGL4.10 *luc2* fue cortado con *EcoRV/XbaI* para generar el fragmento de 2526 pb, posteriormente el plásmido pNotΔ235 V4-Flag fue digerido con las enzimas de restricción *PvuII/NsiI* que liberó la secuencia codificante del Δ235 junto con el promotor CMV resultando un fragmento de 2695 pb. Ambos fragmentos del vector (2526 pb) y del canal Δ235 con CMV (2695 pb) con extremos parejos se ligaron. La correcta inserción en la orientación adecuada del promotor se verificó por digestión enzimática con *XhoI/PstI* para obtener los segmentos de 2182, 1476, 1156 pb y 407 pb. El plásmido obtenido se nombró pGE-Δ235-Flag. En la Figura

Suplementaria 7 se muestran los patrones de restricción de las moléculas utilizadas en la construcción.

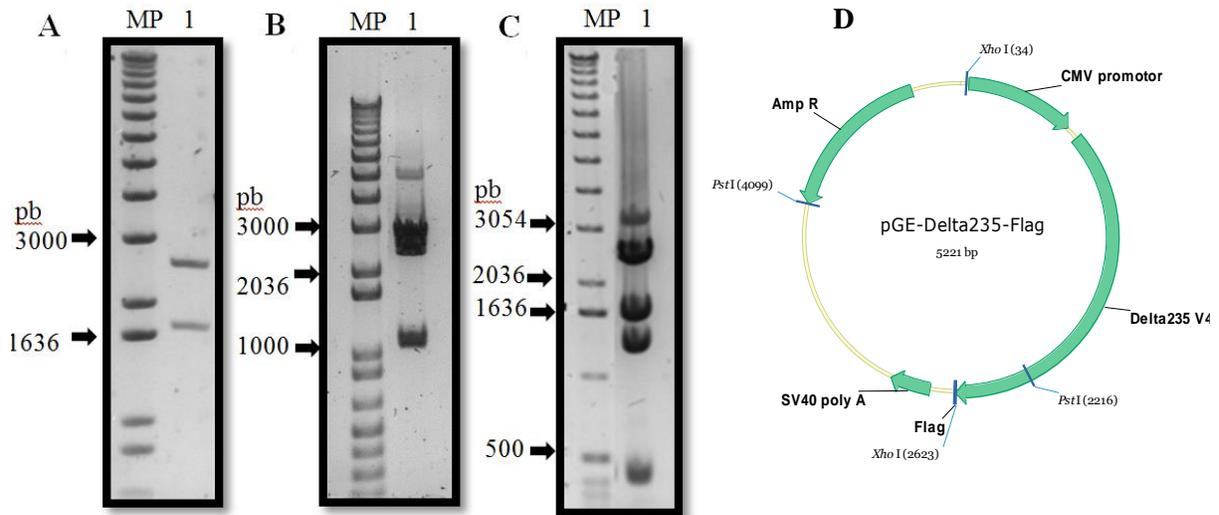


Figura Suplementaria 7. Esquema de la construcción del plásmido pGE-Δ235-Flag.

(A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pGL4.10 luc2 digerido con *EcoRV/XbaI* con los fragmentos correspondientes a 2526 y 1716 pb (carril 1). (B) Digestión enzimática del plásmido pNotΔ235 V4-Flag con *PvuII/NsiI* con los fragmentos correspondientes a 2695, 2331, 1069 y 72 pb (carril 1). (C) Plásmido pΔ235 V4-Flag cortado con las enzimas de restricción *XhoI/PstI* para generar los fragmentos 2182, 1476, 1156 pb y 407 pb, que confirma la orientación correcta del inserto (carril 1) (D) Mapa del plásmido pΔ235 V4-Flag donde se indica los sitios de restricción *XhoI* y *PstI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

G. Construcción del plásmido pΔ410-Flag

Se clonó el canal truncado Δ410 que va del aminoácido 411 al 871 con el epítipo Flag en el extremo C-terminal. Un fragmento de 573 pb se amplificó por PCR con el par de oligonucleótidos *EcoRI*Δ410 F y DV4e10R.

Para la PCR se utilizó 1 U de la DNA polimerasa *Pfx* Platinun, con los oligonucleótidos correspondientes (10 μM), 200 μM de la mezcla de dNTPs y 50 ng de templado (pCMV-V4DXBRI-, Km^R) en un volumen final de 50 μl ajustados con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron las mencionadas anteriormente, pero con una temperatura de acoplamiento de los oligonucleótidos de 60°C durante 30 segundos.

El fragmento obtenido se visualizó en un gel de agarosa y enseguida se cortó con 3 U de *EcoRI* durante 3 h a 37 °C para generar 2 fragmentos de 396 y 177 pb, el fragmento de 396 pb fue clonado en el sitio *EcoRI* del plásmido pGE-V4-Flag (Amp^R) substituyendo la región amino del canal silvestre completo, para ello el plásmido pGE-V4-Flag se digirió con *EcoRI*, los fragmentos obtenidos fueron 1643 y 4307 pb. Las mezclas de fragmentos del plásmido y del fragmento de PCR se ligaron y se seleccionaron clonas Amp^R . Para confirmar la correcta inserción las clonas candidatas se digirieron con *EcoRI*, los fragmentos esperados fueron de 4307 y 398 pb para obtener el plásmido pGE-Δ410-Flag (Amp^R). En la Figura Suplementaria 8 se muestran los patrones de restricción de las moléculas utilizadas en la construcción.

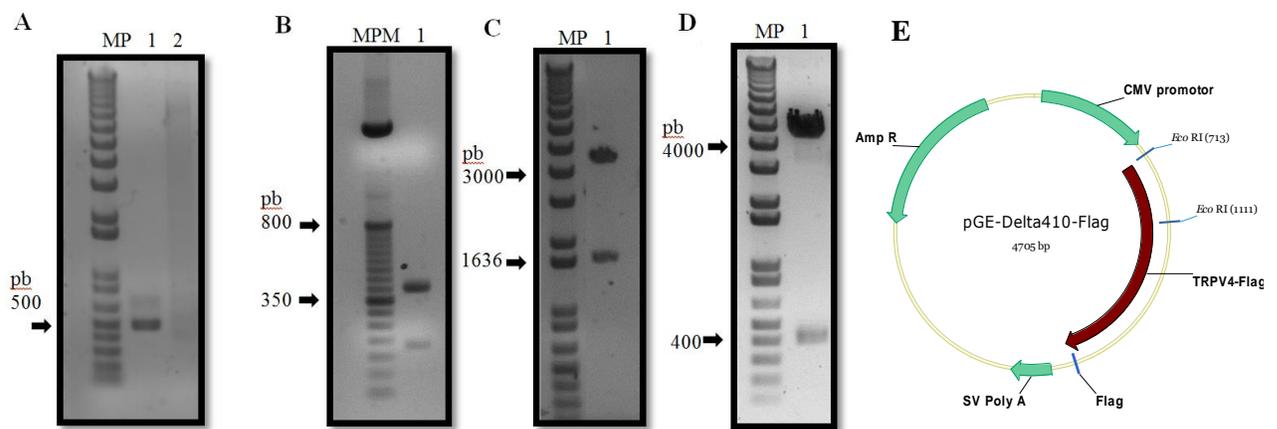


Figura Suplementaria 8. Esquema de la construcción del plásmido pGE-Δ410 V4-Flag.

(A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la PCR del fragmento de 573 que codifica a partir del aminoácido 411 de TRPV4 (carril 1). El carril 2 muestra el control negativo sin cDNA de la PCR. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la purificación del fragmento de PCR cortado con *EcoRI* para generar los fragmentos de 396 y 177 pb (carril 1). (C) Digestión enzimática del vector pGE-V4-Flag con *EcoRI* (1643 y 4307pb, carril 1). (D) Plásmido pGE-Δ410-Flag cortado con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el inserto que confirma la clonación del fragmento de 396 pb. (E) Mapa del plásmido pGE-Δ410-Flag

indicando los sitios de restricción *EcoRI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus. MPM, Marcador de peso molecular, escalera 50 pb (Invitrogen).

H. Construcción de los plásmidos pGE-Flag-235 y pGE-Flag-410

Para producir los péptidos correspondientes a los primeros 235 aa y a los primeros 410 aa del canal TRPV4 se procedió a amplificar por PCR los fragmentos de 758 pb y 1283 pb con el oligo sentido XhoNFlag F y los oligos anti sentido 235StopXba R o bien 410StopXba R respectivamente y se usó como templado el plásmido pFlag-TRPV4 (Km^R).

La PCR se realizó con 1.7 U de la DNA polimerasa *Expand High Fidelity* (No. de Catálogo 11732641001, Roche), con los oligonucleótidos correspondientes (10 µM), 200 µM de la mezcla de dNTPs y 50 ng de templado (pFlag-TRPV4) en un volumen final de 50 µl ajustados con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 10 ciclos compuestos por 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de acoplamiento de los oligonucleótidos a 60°C (para el fragmento de 235 aa) y 55 °C (para el fragmento de 410 aa), 45 segundos de elongación a 68°C; a partir del ciclo 20 se añadieron 5 segundos adicionales de elongación en cada ciclo. Finalmente se programaron 7 min de elongación final a 68°C.

Los productos de PCR obtenidos para cada uno de los fragmentos se muestran en la Figura Suplementaria 9A. Los fragmentos obtenidos por PCR se limpiaron por minicolumna y se cortaron con 3 U de las enzimas de restricción *XhoI/XbaI* durante toda la noche a 37°C y se clonaron en los sitios *XhoI/XbaI* del vector pCMVΔLuc (Amp^R) previamente cortado y desfosforilado. La inserción de los fragmentos clonados se verificó por digestión enzimática con *XhoI* y *XbaI* que liberan el inserto. Los fragmentos clonados se secuenciaron para verificar la correcta amplificación. Se obtuvieron los plásmidos pGE-Flag410 y pGE-Flag235 (Amp^R) (Figura Suplementaria 9).

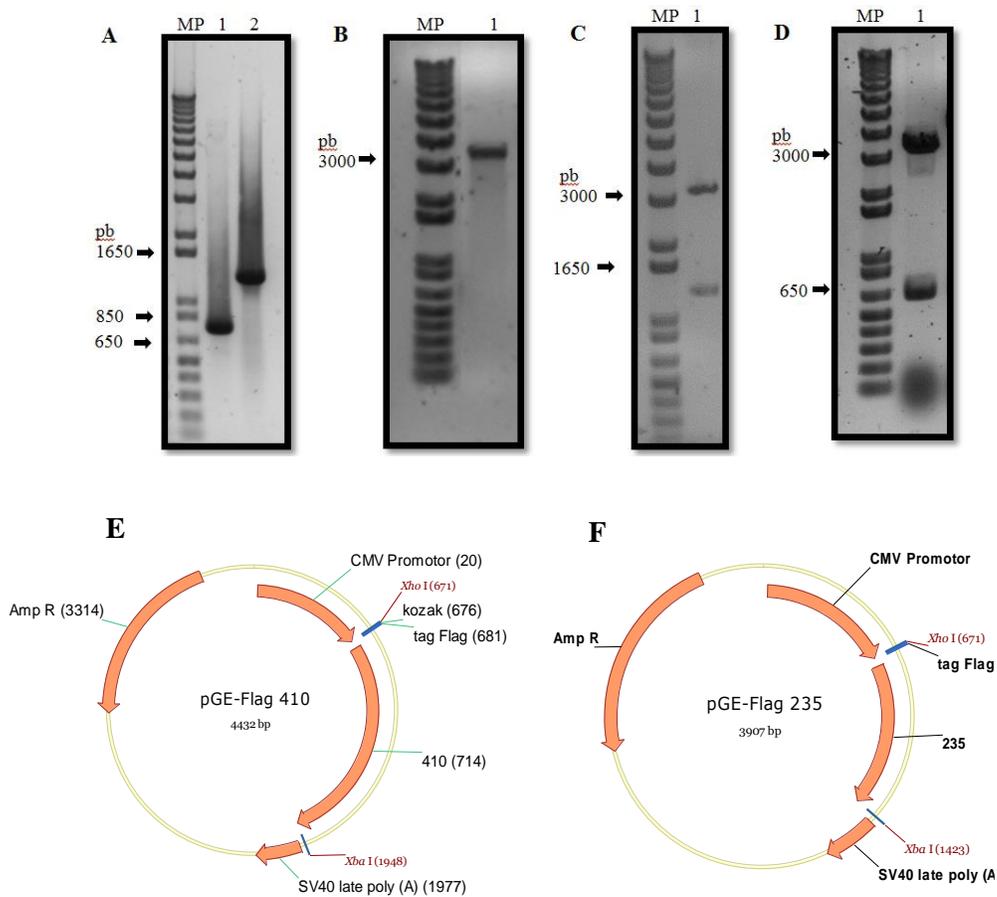


Figura Suplementaria 9. Esquema de la construcción de los plásmidos pGE-Flag410 y pGE-Flag235. (A) Los carriles 1 y 2 muestran los fragmentos amplificados por PCR de 758 pb (235 aa) y 1283 pb (410 aa) respectivamente. (B) Digestión enzimática del vector pCMV-ΔLuc que muestra su forma linealizada cuando se corta con *XhoI/XbaI* (3163 pb, carril 1). (C y D) Plásmido pGE-Flag410 y pGE-Flag235 respectivamente, cortados con las enzimas de restricción *XhoI/XbaI* para generar los fragmentos 3155 y 1277 pb y 3155 y 752 pb respectivamente que confirma la clonación de los péptidos de TRPV4. (E y F) Mapas de los plásmidos pGE-Flag410 y pGE-Flag235 respectivamente, se indican los sitios de restricción *XhoI/XbaI*. MP, Marcador de peso molecular, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen).

Tabla Suplementaria 1. Secuencia de los oligonucleótidos usados en las construcciones descritas en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
KpnCMV F	AAGGTACCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
XhoCMV R	TTCTCGAGGGGTTAATTTTCGAGCTTGGC
V41LFlag F	GATTACAAGGATGACGACGATAAGCCTTACCGCACCACCG TGGACTACC
V41LFlag R	GGTAGTCCACGGTGGTGCGGTAAGGCTTATCGTCGTCATC CTTGTAATC
DV4-M680K R	CATCTCCAGGTCACCCTTGCCG
Bgl2Delta235DV4 F	TTTAGATCTTATACCGAGGTCAGACCGCC
DV4StopXho R	AACTCGAGCTAGAGGGGAGCATCGTCAGTC
NotIdelta235 F	TTTTTTTTCGCGCCGCATGTACCGAGGTCAGACCGCC
EcoRIdelta410 F	TGGAATTCATGTATGGGCCGGTGTATTCC
DV4e10 R	TTCCTGTCAGCTTCAACCCACG
XhoNFlag F	AACTCGAGCCACC <u>ATGGATTACAAGGATG</u>
235StopXba R	AA TCTAGACTAGTAGATGTCCCGGAAGGGC
410StopXba R	AA TCTAGACTAGGCCAGTCTTTGAACTTGC

En negritas se muestran las secuencias correspondientes al canal TRPV4, en cursivas, los sitios de restricción agregados y subrayada, la secuencia del epítipo Flag.

Tabla Suplementaria 2. Plásmidos usados para la clonación del canal TRPV4 y sus variantes.

Plásmido	Tamaño en kb	Descripción
pGL4.10 [luc2]	4.2	Codifica para el gen reportero de luciferasa (luc 2), sin promotor transcripcional eucariótico, diseñado para eliminar la mayor parte de secuencias consenso de unión a factores de transcripción eucarióticos, (Amp ^R). Proveedor: Promega, No. de Catálogo E665A.
pDNA3.1 ⁺	5.4	Vector de expresión eucariótica, contiene al promotor-enhancer de CMV (Amp ^R). Proveedor: Invitrogen.
pCMV-Tag 4A	4.3	Vector para etiquetar proteínas en el extremo C-terminal y con el <i>enhancer</i> -promotor de CMV (Km ^R). Proveedor Stratagene, No. de Catálogo 211174.

pTRPV4-Flag	6.8	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV y con el epítipo Flag en el C-terminal. (Km ^R) construido por: Dra. Refugio García Villegas
pCMV-Tag1	4.3	Vector para etiquetar proteínas en el extremo N-terminal y con el <i>enhancer</i> promotor de CMV (Km ^R). Proveedor Stratagene, No. de Catálogo 211170.
pFlag-TRPV4	6.9	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV y con el epítipo Flag en el N-terminal. (Km ^R) construido por: Lilianha Domínguez Malfavón.
pEYFP-V4D-M680K	7.7	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV y con la proteína EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) en el N-terminal (Km ^R). Construido por: Dra. Refugio García Villegas.
pTRPV4D	8.1	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV en el vector pcDNA3.1+ (Amp ^R). Construido por: Dra. Refugio García Villegas.
pPG-V4	5.8	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV (Amp ^R). Derivado de pGL4.10 [luc2]. Construido por Gabriela Espadas.
pCMV-V4DXBRI-		Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 bajo el promotor CMV (Km ^R). Construido por: Dra. Refugio García Villegas.

Tabla Suplementaria 3. Plásmidos utilizados en los ensayos para medir la actividad transcripcional de β -catenina.

Plásmido	Origen	Descripción
pMyc- β -catenina	Dra. Diana Escalante	Contiene la secuencia completa de β -catenina con la bandera Myc en su extremo N-terminal (Amp ^R).
pMyc- Δ N- β -catenina	Dra. Diana Escalante	Contiene una delección en el extremo N-terminal de β -catenina que elimina los sitios de fosforilación (S33/S37/T41) por GSK-3 β que la convierte en dominante activa transcripcional y se acumula en el núcleo (Amp ^R).
pTOPFlash	Dra. Diana Escalante	Plásmido reportero de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF que contienen tres copias de la secuencia consenso silvestre del sitio de unión a TCF/LEF río arriba del gen de luciferasa de luciérnaga (Amp ^R).
pFOPFlash	Dra. Diana Escalante	Plásmido reportero de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF que contienen tres copias de la

		secuencia consenso TCF/LEF mutada río arriba del gen de luciferasa de luciérnaga (Amp ^R).
pRL-TK	Promega. No. de Catálogo E2241.	Contiene el gen de luciferasa de Renilla bajo el control de un promotor constitutivamente activo de timidina cinasa (TK) (Amp ^R). Se usó para normalizar la eficiencia de transfección.
pGEM®-T Easy	Promega. No. de Catálogo A137A.	Plásmido inocuo en los ensayos de luciferasa porque no contiene promotores eucarióticos (Amp ^R).

Tabla Suplementaria 4. Plásmidos con diferentes versiones del canal TRPV4 usados en el ensayo de gen reportero luciferasa.

Plásmido	Tamaño en kb	Descripción
pGE-V4-Flag	5.9	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 silvestre con el epítipo Flag en el C-terminal bajo el promotor CMV. (Amp ^R).
pV41L-Flag	5.9	Contiene la secuencia completa del canal TRPV4 con el epítipo Flag en la primera asa extracelular bajo el promotor CMV. (Amp ^R)
pGE-M680K-Flag	5.9	Plásmido equivalente a pGE-V4-Flag que contiene la mutación M680K. (Amp ^R)
pGE-Δ235-Flag	5.2	Contiene la secuencia del canal TRPV4 donde se eliminaron los primeros 235 aa y con el epítipo Flag en el C-terminal. (Amp ^R)
pGE-Flag235	3.9	Contiene el péptido de los aa 1 al 235 de TRPV4 y con el epítipo Flag en el N-terminal. (Amp ^R)
pGE-Δ410-Flag	4.7	Contiene la secuencia del canal TRPV4 donde se eliminaron los primeros 410 aa y con el epítipo Flag en el C-terminal. (Amp ^R)
pGE-Flag410	4.4	Contiene al péptido del aa 1 al 410 de TRPV4 con el epítipo Flag en el N-terminal. (Amp ^R)
pCMV-ΔLuc	3.1	Vector usado para la clonación del canal TRPV4 y sus variantes bajo la expresión del promotor CMV, construido en este trabajo. (Amp ^R)