



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Evaluación de la interacción y co-tráfico de los canales TRPC3 y TRPM4”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

KEVIN XAVIER MARTÍNEZ MOLINA

Director del Seminario de Título: DR. OSCAR CERDA ARANCIBIA

Profesor Patrocinante: DR. FRANCISCO PABLO CHÁVEZ ESPINOZA

Octubre 2018
Santiago – Chile

KEVIN XAVIER MARTÍNEZ MOLINA

Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Provengo de Maipú, Región Metropolitana, donde realicé mi enseñanza básica y media. Mis estudios universitarios comenzaron el 2011, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, finalizándolos el año 2017. En el año 2017, me uní al Laboratorio de Proteómica Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Oscar Cerda. Aquí, me interesé en el estudio de la interacción entre dos miembros de la superfamilia de canales TRP, los canales TRPM4 y TRPC3. Mi tesis se centró en la validación de dicha interacción, y en la evaluación del tráfico de estos canales iónicos en modelos de expresión heteróloga. Actualmente me encuentro finalizando mi Tesis de pregrado la cual es financiada por el proyecto de investigación: "Regulation of the trafficking and activity of TRPM4 by End Binding (EB) Proteins and its role in cell migration (FONDECYT Regular 1160518) y Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (IR: Oscar Cerda A.).

DEDICATORIA

Para Jennifer, Raquel, Leonardo² y Samuel.

Mi vida entera.

*El Ahora es la clave.
Eckhart Tolle.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos aquellos que considero importantes en el desarrollo y realización de mi seminario de título.

A mi familia por su paciencia, apoyo y preocupación durante toda mi carrera. Por su amor incondicional quisiera agradecer a mi madre, Jennifer, quien hizo todo esto posible, y a mi hermano Leonardo, cuya presencia constante fue determinante para la culminación de este proceso. También quisiera agradecer a mi abuela Raquel, por fortaleza física y mental, y por su inmenso amor.

A mi Profesor Tutor, el Dr. Oscar Cerda por su paciencia, disposición y dedicación en mi formación profesional y personal, por creer en mis capacidades y por su apoyo.

Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio Alhejandra, Constanza, Diego, José, Jimena, Ian, Ismael, Boris, Carla, Nicolas, Yustin, Valeria y Héctor con quienes compartí largas horas de trabajo, discusión y humor, por sus consejos, ayudas, enseñanzas y la confianza entregada durante mi estadía en el Laboratorio. También quisiera agradecer a los profesores del Programa de Biología Celular y Molecular, Dra. Mónica Cáceres, Dr. Héctor Toledo y Dr. Aldo Solari, por su gentileza al momento de utilizar las dependencias y equipos de sus respectivos laboratorios. A don Nicanor Villarroel, por sus incontables historias, su entrega y dedicación en la asistencia técnica del Laboratorio.

Este Seminario de Título fue financiado por el proyecto FONDECYT 1160518 y Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (IR: Oscar Cerda A.), y fue realizado en el Laboratorio de Proteómica Funcional, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

INDICE DE CONTENIDOS

KEVIN XAVIER MARTÍNEZ MOLINA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE CONTENIDOS.....	V
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TRÁFICO DE CANALES TRP	5
1.2. SUBFAMILIAS TRPM Y TRPC.....	7
1.3. TRPC3.....	9
1.4. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE TRPC3	12
1.5. TRPC3 Y SU ROL FISIOPATOLÓGICO.....	12
1.6. TRPM4.....	15
1.7. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE TRPM4	17
1.8. ROL FISIOPATOLÓGICO DE TRPM4.....	21
1.9. HETEROMERIZACIÓN DE TRPM4 CON TRPC3.....	23
2. HIPÓTESIS.....	24

3. OBJETIVO GENERAL	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. CULTIVO CELULAR.....	25
5.2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.....	25
5.3. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN.....	25
5.4. ENSAYO DE BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CELULAR.....	26
5.5. INMUNOBLOT.....	27
5.6. INMUNOFLUORESCENCIA.....	28
5.7. ENSAYO SISTEMA RETENTION USING SELECTIVE HOOKS (RUSH).....	30
5.8. ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA <i>RETENTION USING SELECTIVE HOOKS</i> (RUSH).....	30
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
6. RESULTADOS	31
6.1. VALIDACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS CANALES TRPM4 Y TRPC3.....	31
6.2. TRÁFICO CELULAR DE LOS CANALES TRPM4 Y TRPC3	33
7. DISCUSIÓN	41
7.1. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE TRPC3.....	41
7.2. TRPC3 INTERACCIONA CON TRPM4.....	42
7.3. CO-TRÁFICO DE TRPM4 Y TRPC3.....	45
7.4. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA INTERACCIÓN TRPM4-TRPC3.....	49
CONCLUSIONES	51

PROYECCIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
8. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	63

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA INMUNOBLOT.....	28
TABLA 2. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA INMUNOFLORESCENCIA.	29

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LOS CANALES TRP. (NILIUS Y OWSIANIK, 2011).....	2
FIGURA 2: TOPOLOGÍA TRANSMEMBRANA DE LOS CANALES TRP (TOMADO DE MADEJ Y ZIEGLER, 2018).....	4
FIGURA 3: INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EBS CON SUS BLANCOS MEDIANTE EL MOTIVO ‘SXIP’	19
FIGURA 4: EL MOTIVO ‘SWIP’ REGULA EL TRÁFICO Y LA MADURACIÓN DE TRPM4.....	20
FIGURA 5: LOS CANALES TRPM4 Y TRPC3 INTERACTÚAN.....	32
FIGURA 6: LA DELECIÓN DEL ‘MOTIVO SWIP’ DE TRPM4 AFECTA LA LOCALIZACIÓN DE TRPC3.	36
FIGURA 7: CO-TRÁFICO DE TRPM4 Y TRPC3.....	38
FIGURA 8: EL ‘MOTIVO SWIP’ REGULA EL TRÁFICO DE TRPM4 AFECTANDO LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE TRPC3.	40
Figura 9: Modelo del nuevo mecanismo de tráfico de TRPC3.....	409
FIGURA SUPLEMENTARIA A: DIAGRAMA DEL FLUJO DE TRABAJO DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES.	63
FIGURA SUPLEMENTARIA B: LA DELECIÓN DEL ‘MOTIVO SWIP’ DE TRPM4 NO AFECTA LA MADURACIÓN DE TRPC3.	64

ABREVIATURAS

CaM	Calmodulina
COS-7	Células tipo fibroblasto de riñón de mono
DAG	Diacylglicerol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
DPBS	Amortiguador Dulbecco fosfato salino
EBs	Proteínas End Binding
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
HEK293	Células humanas embrionarias de riñón 293
IB	Inmunoblot
Icrac	<i>Calcium release-activated calcium current</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
ORAI	<i>Calcium release-activated calcium channel protein</i>
PIC	Cocktail de inhibidores de proteasas
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
SBP	<i>Streptavidin binding-peptide</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino

SOC	<i>Store Operated Channel</i>
SOCE	<i>Store Operated calcium entry</i>
SUR-1	<i>Sulfonylurea Receptor 1</i>
Tris-HCl	Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano
TRP	Receptor de potencial transitorio
RIP ₃	Receptor de Inositol Trifosfato

RESUMEN

Los canales de la superfamilia TRP son canales catiónicos no selectivos que permean principalmente Ca^{2+} y Na^+ , y comparten una arquitectura molecular general. Las subunidades de un canal TRP ensamblan en homo o heterotrómeros entre miembros de una misma o una diferente subfamilia compartiendo mecanismos de regulación y tráfico, lo que resulta en una gran diversidad de conductancias cationicas, en términos de sus propiedades regulatorias y biofísicas, por lo que han sido descritos como sensores polimodales que responden a una gran variedad de estímulos intracelulares y externos, cumpliendo roles fisiológicos esenciales en las funciones sensoriales, homeostáticas e incluso diversas funciones motiles como la contracción muscular y la migración celular.

TRPC3 es un miembro de la subfamilia TRPC que está involucrado en un amplio espectro de mecanismos de señalización de Ca^{2+} , y presenta propiedades de activación y regulación únicas que le permiten el reconocimiento e integración de múltiples estímulos. Este canal se asocia con varias proteínas permitiendo la formación de canales catiónicos diferentes en diversos tipos de células, afectando su actividad y función, por lo que es considerado un sensor multifuncional y versátil de gran relevancia fisiológica y fisiopatológica. Se ha visto que TRPC3 interacciona físicamente con TRPM4 en sistemas de expresión heterólogos, un miembro de la subfamilia TRPM impermeable a calcio, pero activado por este catión, que está involucrado en diferentes procesos fisiológicos, y cuya ganancia de función está relacionada con gran variedad de eventos fisiopatológicos como cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.

En nuestro laboratorio, se encontró que las proteínas *End Binding* (EBs) interaccionan con un motivo 'SxIP' ubicado en la región amino terminal de TRPM4, y que

esta interacción TRPM4-EB gobierna el tráfico anterógrado del canal y su actividad. De acuerdo a estos antecedentes, se propone validar la interacción física entre TRPC3 y TRPM4, y evaluar si es que comparten mecanismos de tráfico y exportación a la superficie celular. Para ello, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación y se evaluó el co-tráfico de estos canales utilizando diferentes aproximaciones en modelos de expresión heteróloga que coexpresaban ambos canales. Se encontró que efectivamente TRPM4 interacciona con TRPC3, y además que la delección del 'motivo SWIP' de TRPM4 afecta la localización y exportación de TRPC3 a la superficie celular.

Debido a la creciente relevancia fisiológica de los eventos de heteroasociación y co-tráfico relacionados a los canales TRP, estos datos sugieren que la interacción física entre estos miembros de diferentes sufamilias TRP involucra mecanismos de tráfico asociado a la interacción TRPM4-EBs y podría tener relevancia en tejidos que coexpresen ambos canales, como en tejido cardiovascular o neuronal.

ABSTRACT

TRP proteins are non-selective cationic channels that permeate mainly Ca^{2+} and Na^+ , and share a general molecular architecture. TRP channels subunits assemble as homo or heterotetramers between members of the same or different subfamily, sharing regulation and trafficking mechanisms which results in a great diversity of cationic conductances, in terms of their regulatory and biophysical properties, so they have been described as polymodal sensors that respond to a wide variety of intracellular and external stimuli, fulfilling essential physiological roles in sensory, homeostatic and even diverse motile functions such as muscle contraction and cell migration.

TRPC3 is a member of the TRPC subfamily involved in a broad spectrum of Ca^{2+} signaling mechanisms, and has unique activation and regulation properties that allow recognition and integration of multiple stimuli. These channels are associated with several proteins that allow it to form different cation channels in different types of cells, affecting the activity and function of the channel, so it is considered a multifunctional and versatile sensor of great physiological and pathophysiological relevance. TRPC3 physically interacts with TRPM4, a member of the TRPM subfamily impermeable by calcium, but activated by this cation, which is involved in different physiological processes, and whose gain of function is related to a great variety of pathophysiological events, such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

In our laboratory, we found that End Binding proteins (EBs) interact with a 'SxIP' motif located in the amino terminal region of TRPM4, and this TRPM4-EB interaction governs the anterograde trafficking of the channel and its activity. Accordingly, we achieved to validate the physical interaction between TRPC3 and TRPM4, and to

evaluate whether these channels share trafficking and exporting mechanisms to the cell surface. To do that, we performed immunoprecipitation assays and the co-trafficking assays in heterologous systems that coexpressed both channels. We found that TRPM4 interacts with TRPC3. Moreover, we observed that the deletion of the 'SWIP motif' of TRPM4 affects the localization and exporting of TRPC3 to the cell surface.

Due to the increasing physiological relevance of hetero-association and co-trafficking events related to TRP channels, these data suggest that the physical interaction between these members of different TRP subfamilies involve trafficking mechanisms associated with TRPM4-EBs interaction. These data could have relevance in tissues that coexpress both channels, as in cardiovascular or neuronal tissues.

1. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas, que a modo de “compuertas”, median el flujo pasivo de iones a través de la membrana plasmática. El poro de cada canal tiene secuencias de aminoácidos que seleccionan el paso preferencial de un ion respecto de otro, en función de sus cargas y disposición espacial, en una zona denominada filtro de selectividad. La apertura y cierre de los canales iónicos, o *gating*, así como su activación o inactivación, puede ser modulada directamente por estímulos mecánicos, variaciones de temperatura, cambios en el potencial de membrana, cambios de pH, unión de ligandos como hormonas, neurotransmisores y segundos mensajeros, fosforilaciones e incluso por interacción con otras proteínas (Hille, 2001). Las señales eléctricas y oscilaciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular resultantes de la activación de determinados canales iónicos, controlan la mayoría de los procesos fisiológicos, tales como la generación de potenciales de acción en neuronas, la contracción muscular, secreción de hormonas, proliferación, migración y diferenciación celular (Yu y col., 2005).

Dentro de la gran superfamilia de canales activados por potencial, que comparten una arquitectura molecular general, se encuentra la superfamilia de canales TRP (*Transient receptor potencial*) (Yu y col., 2005). Análisis de homología de secuencias muestran que los miembros de esta superfamilia son conservados en vertebrados, invertebrados y levadura, y se dividen en 7 subfamilias: TRPML (*Mucolipin*), TRPP (*Polycystin*), TRPA (*Ankyrin*), TRPV (*Vanilloid*), TRPN (TRP NOMPC (*no mechanoreceptor potential C*)) que solo han sido encontrados en invertebrados y peces, TRPM (*Melastin*) y TRPC (*Canonical*) (Figura 1) (Nilius y Owsianik, 2011).

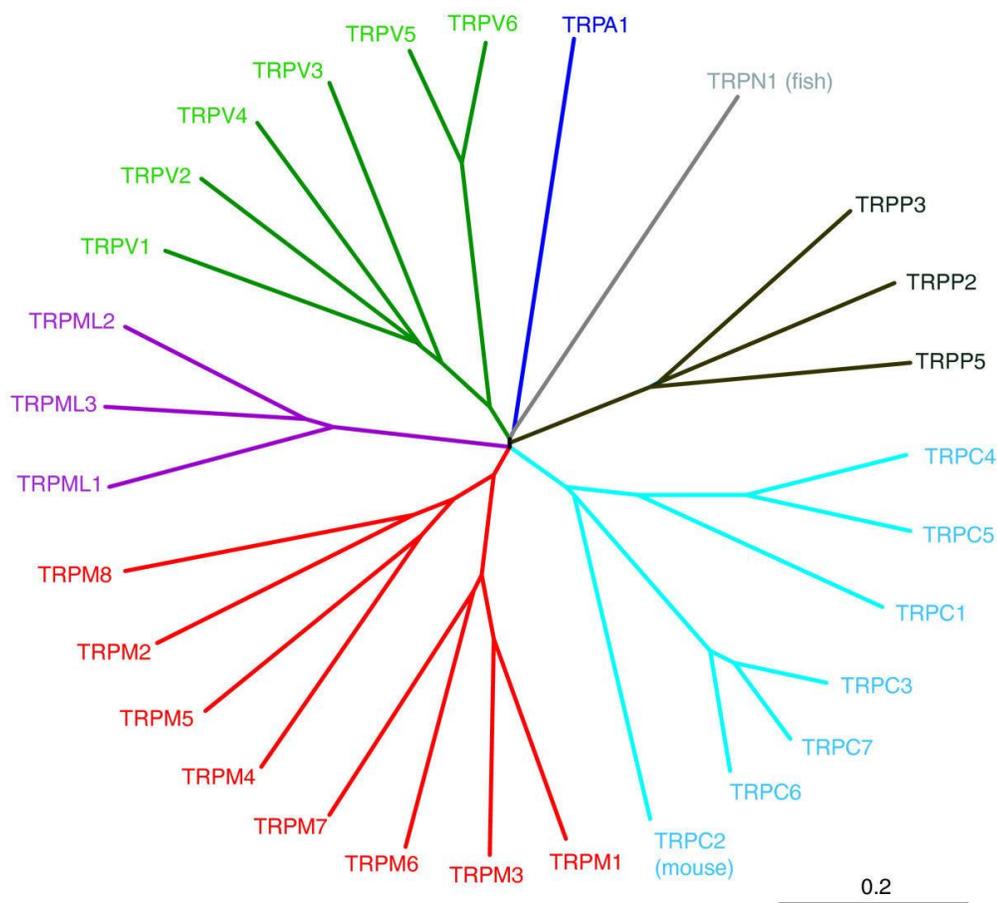


Figura 1: Árbol filogenético de los canales TRP. (Nilius y Owsianik, 2011).

Los canales TRP son permeables a Ca^{2+} y sodio (Na^+), y las permeabilidades relativas (PCa / PNa) varían considerablemente entre los miembros de esta superfamilia, donde encontramos canales impermeables a Ca^{2+} (TRPM4 y TRPM5), algunos que son altamente selectivos a Ca^{2+} ($\text{PCa} / \text{PNa} > 100$, como TRPV5 y TRPV6, y otros son canales catiónicos no selectivos que permean tanto cationes monovalentes como divalentes ($\text{PCa} / \text{PNa} = 0.1-20$) (Gees y col., 2012). De este modo, la superfamilia de canales TRP son, en general, canales catiónicos no selectivos, cuyos monómeros

comparten una topología de 6 hélices transmembrana, y que difieren principalmente en sus dominios amino (N) y carboxilo (C) terminal citosólicos (Venkatachalam y Montell 2007; Mulier y col., 2017). Gracias a los avances en la resolución en la técnica de criomicroscopía electrónica (cryo-EM), se han obtenido 48 estructuras publicadas entre 2013 y 2017 de 11 miembros de diferentes subfamilias de canales TRP (V1, V2, V5, V6, A1, P2, ML1, ML3, M8, N y M4) (Madej y Ziegler, 2018), y recientemente se han publicado 4 estructuras más (M4 (Duan y col., 2018), C3 (Fan y col., 2018), C3 y C6 (Tang y col., 2018)) que añaden a la subfamilia TRPC con dos miembros de estructura resuelta. Esta cantidad de estructuras de canales TRP ha permitido la realización de estudios comparativos y de función estructural que muestran sus similitudes y diferencias, y que proveen información molecular sobre los mecanismos de selectividad catiónica, activación y *gating*.

Los determinantes moleculares y estructurales responsables del ensamblaje de los canales TRP en tetrámeros se asemejan a los de los miembros de la superfamilia K_v (canales de potasio dependientes de potencial), donde las subunidades de un canal funcional interactúan entre sí a través de sus dominios N y C terminal, que además median la interacción con otras proteínas citoplasmáticas (Lepage y Boulay, 2007). Así, los miembros de la superfamilia TRP forman homo y heterotetrámeros funcionales, y sus subunidades contienen 6 segmentos α -hélice transmembrana (S1-S6) con un bucle reentrante de poro (P) que abarca 1 o 2 hélices (H1 / H2), ubicado entre los segmentos S5 y S6, formando el dominio de poro S5-P-S6. Los segmentos S1-S4 forman dominios sensibles a voltaje VSD (*voltaje sensor domain*) o tipo-VSD (VSLD) para los canales TRP insensibles a voltaje (Madej y Ziegler, 2018). El dominio VSD o VSLD de los canales TRP asocia con el dominio de poro de la subunidad adyacente en la llamada

organización *swap domain*, ya que el enlazador S4-S5 forma una hélice paralela a la membrana que cruza la subunidad opuesta (Madej y Ziegler, 2018). También se ha descrito la presencia de una zona muy conservada en algunas subfamilias de la superfamilia de canales TRP denominado dominio TRP (Taberner y col., 2013), que consta de 25 aminoácidos incluyendo un segmento de 6 aminoácidos que constituyen la caja TRP y una secuencia rica en prolina denominada caja TRP 2 (Venkatachalam y Montell, 2007), y está ubicado justo después del segmento S6 (figura 2).

Los miembros de las subfamilias TRPC, TRPV, TRPN y TRPA contienen en su dominio N terminal uno de los motivos de interacción proteína-proteína más comunes,

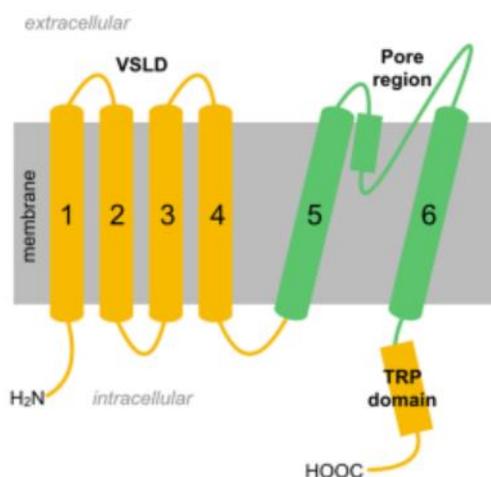


Figura 2: Topología transmembrana de los canales TRP (tomado de Madej y Ziegler, 2018).

los repetidos de anquirina (AR), compuestos de 33 aminoácidos que forman una estructura *hélix-turn-hélix*, y se ha visto que son necesarios para la tetramerización de algunos miembros de la subfamilia TRPV en un mecanismo de ensamblaje secuencial tipo cremallera. Por otro lado, se ha visto la presencia de motivos *coiled coil* en diferentes

miembros de la superfamilia TRP como un importante determinante de ensamblaje de subunidades (Lepage y Boulay, 2007; Schaefer, 2005; Schindl y Romanin, 2007).

Las subunidades de un canal TRP ensamblan en homo o heterotrómeros entre miembros de una misma subfamilia, e incluso con miembros de otras subfamilias, resultando en una gran diversidad de conductancias cationicas en términos de sus propiedades regulatorias y biofísicas (Schaefer, 2005). Por lo tanto, los miembros de esta superfamilia han sido descritos como sensores polimodales que responden a una gran variedad de estímulos intracelulares y externos (Gees y col., 2010), cumpliendo roles fisiológicos esenciales en las funciones sensoriales, contribuyendo en la visión, el gusto, el olfato, la audición, el tacto y la sensación térmica (Venkatachalam y Montell 2007); funciones homeostáticas; y diversas funciones motiles como la contracción muscular y la migración celular (Nilius y Owsianik, 2011). Debido a su amplio rol fisiológico, los canales TRP están asociados a diversos procesos fisiopatológicos que incluyen hipertrofia cardiaca, dolor neuropático e inflamatorio, muerte celular isquémica, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, entre otros. Además, mutaciones o cambios de expresión de muchos de los genes que codifican para los canales TRP son suficientes para causar enfermedades en humanos, por lo que son de gran relevancia biomédica en diferentes áreas terapéuticas, como la neurología, dermatología, pulmonología, cardiología, urología, oncología y en enfermedades hereditarias (Szallasi y col., 2011).

1.1. Tráfico de canales TRP

La localización y distribución espacial en la célula de diferentes proteínas de membrana, como los canales TRP, determinan las características de señalización tanto en células excitables como no excitables. Estas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplasmático, y las modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, ocurren

tanto en el RE como en el aparato de Golgi. Los canales iónicos que se encuentran adecuadamente plegados y ensamblados posteriormente se localizan en vesículas para el tráfico a la superficie celular mediante una vía de exocitosis vesicular constitutiva o regulada, mientras que la internalización de estas proteínas se logra mediante mecanismos de endocitosis. La vía constitutiva de exocitosis se utiliza principalmente para el recambio de proteínas y lípidos de membrana, mientras que la vía regulada se produce solo en respuesta a un estímulo que provoca la movilización, acoplamiento y fusión de vesículas intracelulares almacenadas cerca de la región de la membrana donde liberarán sus componentes (Planells-Cases y Ferrer-Montiel, 2007).

Los canales TRP, así como otros canales iónicos dependientes de potencial, interactúan con una serie de proteínas formando diferentes complejos multiproteicos que definen su distribución espacial, posicionamiento y retención en la superficie celular. Por ejemplo, en neuronas, los canales de sodio regulados por potencial (Nav) y ciertos canales de potasio (Kv), como KCNQ, se encuentran localizados y retenidos en el segmento inicial del axón, nodos de Ranvier y terminales presinápticos gracias a su interacción con otras proteínas, y determinan el umbral que provoca la generación de un potencial de acción (Lai y Jan, 2006). Entre las proteínas que interactúan con los canales TRP y que determinan su correcto *targeting*, se encuentran algunas relacionadas con la señalización, tales como receptores de membrana, calmodulina (CaM), fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa C (PKC) y otras proteínas quinasas, canales iónicos y transportadores; proteínas de andamiaje como INAD, HOMER y NHERF; componentes del citoesqueleto y microtúbulos, como Rho-GTPasas, tubulina y ezrin; y proteínas del tráfico vesicular como SNAREs, GTPasas moleculares pequeñas, dinamina, caveolina, entre otros (Ambudkar, 2007). También se ha visto que componentes no proteicos como PIP₂, DAG y dominios de balsas lipídicas son importantes en la localización y distribución

de los canales TRP. De este modo, la regulación de la exocitosis y endocitosis vesicular proporciona un control eficiente del número y la expresión en membrana de los canales TRP (Ambudkar, 2007). En este contexto, las interacciones homoméricas y heteroméricas entre subunidades TRP determinan el tráfico y retención de estos canales a localizaciones específicas en la célula, así como sus mecanismos de activación e inactivación, debido su interacción con otras proteínas (Ambudkar, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que diferentes miembros de la superfamilia de canales TRP se trasladan a la membrana plasmática tras la estimulación de receptores tirosina quinasa o receptores acoplados a proteína G, y su correcto *targeting* e inserción exocitótica en la membrana conduce a una mayor entrada de Ca^{2+} . Esta estimulación puede desencadenar el tráfico y co-tráfico de canales homo o heteroméricos al lugar donde ejercen su función en la célula (Cayouette y Boulay, 2007). Por ejemplo, se ha visto que $TNF\alpha$ induce el co-tráfico de TRPV1 y TRPA1 en vesículas que contienen VAMP1, participando en la hiper-excitabilidad neuronal asociada con la estimulación inflamatoria/dolorosa (Meng y col., 2016). Si bien existe relativamente poca información sobre el tráfico de canales de TRP, se considera un mecanismo clave para el control de la función del canal, y por lo tanto es un interesante blanco farmacológico para enfermedades donde una expresión no regulada de los canales en la superficie celular produce efectos patológicos.

1.2. Subfamilias TRPM y TRPC

Más de la mitad de los miembros de la superfamilia de canales TRP pertenecen las subfamilias TRPM y TRPC, que comparten alrededor de un 20% de identidad de secuencia aminoacídica, presentando semejanzas y diferencias estructurales

relacionadas a su composición. En estas subfamilias, el dominio TRP se encuentra altamente conservado e incluye un grupo de seis aminoácidos invariables (EWKFAR) conocido como la caja TRP, seguida de una secuencia de aminoácidos rica en prolina (Venkatachalam y Montell 2007). Por otro lado, miembros de ambas subfamilias contienen motivos estructurales de interacción *coiled coil*, que tiene un rol importante en el ensamblaje de subunidades (Lepage y Boulay, 2007).

La subfamilia canónica TRP (TRPC) incluye siete miembros (TRPC1-7), y varían principalmente en sus mecanismos de activación y selectividad por Ca^{2+} (Venkatachalam y Montell, 2007). Su activación, dependiendo del contexto celular y fisiológico, lleva a cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de diferentes mecanismos: por asociación funcional con Orai (*Calcium release-activated calcium channel protein*), constituyente molecular de las corrientes de Ca^{2+} activadas por Ca^{2+} o I_{CRAC} (*Calcium release-activated calcium current*) y como componentes de los canales SOC (*Store-Operated-Channel*) (Schilling y cols., 2004; Trebak y Putney, 2017). Estos canales han sido divididos en 2 subgrupos funcionales basados en la selectividad de su heteromerización, donde todos los miembros de un subgrupo pueden formar heterómeros. Uno de esos subgrupos funcionales está formado por TRPC1, TRPC4 y TRPC5, mientras que el otro incluye a TRPC3, TRPC6 y TRPC7. TRPC2 solamente forma homotetrámeros. Otros estudios han mostrado que TRPC1 se ensambla con TRPC3, y a su vez, TRPC3 forma heterómeros con TRPC4 (Hofmann y col., 2002; Poteser y col., 2005; Lepage y Boulay, 2007). De este modo, la localización de los canales TRPC dentro de las redes de señalización celular, y en microdominios subcelulares, así como su capacidad de asociar en homo o heterotetrámeros, tiene un papel importante en sus mecanismos de regulación (Mulier y col., 2017).

La subfamilia *melastin* TRP (TRPM) está constuida por ocho miembros (TRPM1-8) que presentan regiones de homología conservadas denominadas MHR (TRPM *homology regions*) en su dominio N terminal, y difieren en el número y composición aminoacídica de la región C terminal, así como en su selectividad por iones divalentes y/o monovalentes (Venkatachalam y Montell 2007; Autzen y col., 2017). Es por esto que en esta subfamilia es posible encontrar miembros permeables Ca^{2+} (TRPM2 y TRPM8) y Mg^{2+} (TRPM6 y TRPM7) y otros que solo son permeables a cationes monovalentes (TRPM4 y TRPM5) (Launay y col., 2004). De este modo, los miembros de esta subfamilia integran múltiples vías de señalización debido a sus diversos mecanismos de regulación, selectividad iónica y *gating*.

Los canales TRPM han sido agrupados según su similitud de secuencias aminoacídicas en 3 subgrupos: TRPM1 y TRPM3, TRPM4 y TRPM5, TRPM6 y TRPM7, mientras que TRPM2 y TRPM8 no se encuentran asociados a ningún subgrupo, y se ha visto que TRPM6 y TRPM7 forman heterotetrámeros (Schlingmann y col., 2007). De manera interesante, se ha descrito que TRPM4 es capaz de interactuar con un miembro de la subfamilia canónica, TRPC3, en lo que sería la primera interacción descrita entre miembros de diferentes subfamilias de canales TRP (Park y col., 2008).

1.3. TRPC3

TRPC3 (Receptor de potencial transitorio canónico 3) es un canal catiónico no selectivo permeable a Ca^{2+} y otros cationes, que se expresa abundantemente en tejido embrionario, cerebelo, cerebro, corazón, músculos lisos vasculares de todos los calibres, músculo liso de órganos como el útero y el tracto gastrointestinal (González-Cobos y Trebak, 2010; Lichtenegger y Groschner, 2014). En humanos (hTRPC3), está codificado

por un gen ubicado en el cromosoma 4, y presenta 3 isoformas: una de 836 aminoácidos (isoforma 1), considerada como la secuencia canónica, otra de 921 aminoácidos (isoforma 2), y una de 848 aminoácidos (isoforma 3). En ratón (mTRPC3), el gen TRPC3 se localiza en el cromosoma 3 y codifica una proteína de 836 aminoácidos (Lichtenegger y Groschner, 2014). Existen variantes de *splicing* del gen TRPC3 encontradas también en ratón y rata: una versión extendida en el dominio N terminal, TRPC3a, que codifica proteínas de 911 y 910 aminoácidos, y otra variante más corta de 835 y 828 aminoácidos, respectivamente (Yildirim y col., 2005).

El subgrupo compuesto por TRPC3, C6 y C7, se consideran una familia única de canales catiónicos sensibles a lípidos, que muestran actividad constitutiva significativa relacionada con su grado de glicosilación (Dietrich y col., 2003). La sensibilidad a lípidos de TRPC3 está dada por la presencia de 2 sitios de unión a lípidos, uno enterrado en un bolsillo entre el codo pre-S1, el S1, y el enlazador S4-S5, y el otro insertado en el dominio de poro (Fan y col., 2018). TRPC3 posee propiedades de activación y regulación únicas que, dependiendo del contexto fisiológico, permiten el reconocimiento e integración de múltiples estímulos, incluyendo activación directa por diacilglicerol (DAG), que junto con IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato), derivan de la estimulación de PLC. Además, su actividad es regulada en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteína G, por agotamiento del calcio almacenado en el RE, que sitúa a TRPC3 como un canal SOC contribuyendo en SOCE (*Store-Operated-Calcium-Entry*) a través de diferentes mecanismos, como su interacción con STIM1 dependiente de su heteromerización con TRPC1, acoplamiento funcional con Orai1 y por interacción con el receptor de IP₃ (RIP₃) a través del motivo CIRB (*calmodulin /IP3R-binding motif*) presente en el extremo C terminal de TRPC3, que también es un sitio de unión a CaM (Lichtenegger y Groschner, 2014). También se ha descrito que el nivel de proteína

TRPC3 dentro de la célula puede cambiar el mecanismo de acoplamiento por el cual se produce la activación del canal (Szallasi y col., 2011; Smedlund y col., 2012).

TRPC3 participa en diversos procesos fisiológicos implicados en el desarrollo del tejido neuronal y cardíaco, y como un factor determinante de la proliferación y diferenciación celular, controlando su destino asociado con la remodelación o degeneración tisular. De hecho, se ha visto que este canal se localiza también en mitocondrias, y que tiene un rol en el uso del Ca^{2+} mitocondrial, lo que podría contribuir con su impacto en la apoptosis y procesos degenerativos (Lichtenegger y Groschner, 2014). Existen reportes que indican que TRPC3 es capaz de formar un canal sensible al estado redox a través de su heteromerización con TRPC4, complejo que podría ser responsable de la respuesta a oxidantes del endotelio aortico (Poteser y col., 2005). Otros estudios sugieren que la actividad del canal puede ser regulada por especies reactivas de oxígeno (ROS), involucrando a TRPC3 en la detección hipotalámica de la glucosa y el control de la homeostasis energética (Chrétien y col., 2016). En células excitables, la función de TRPC3 depende de su acoplamiento con otros sistemas de transporte de calcio, como su asociación con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cardíaco NCX1, por lo que es un importante factor involucrado en la excitabilidad cardíaca (Rosker y col., 2004). Se encontró que TRPC3 regula la señalización de ROS a través de la formación de un complejo proteico con Nox2 en células cardíacas, y que la heterotetramerización con TRPC6 desestabiliza la formación del complejo TRPC3-Nox2, lo que respalda la importancia patológica de TRPC3 en la insuficiencia cardíaca dependiente de ROS (Oda y col., 2017). También se ha informado que podría existir comunicación con otros canales de calcio dependientes de potencial en músculo liso vascular, desempeñando un papel en la despolarización de la membrana en este tejido (Lichtenegger y Groschner, 2014).

1.4. Mecanismos de regulación de TRPC3

TRPC3 posee sitios de fosforilación inhibitorias en sus dominios N y C terminal. La proteína quinasa C γ (PKC γ) fosforila a mTRPC3 en la treonina (T) 635 (T573 en hTRPC3) inhibiendo su actividad. Además, se ha visto que PKC fosforila la serina (S) 712, disminuyendo la actividad del canal, y está implicada en la fosforilación dependiente de GMP cíclico de TRPC3 en las posiciones T11 y S263, suprimiendo la actividad SOCE del canal en células HEK293 (Lichtenegger y Groschner, 2014). También se reportó que la interacción de TRPC3 con TRPM4 suprime SOCE mediado por TRPC3 en células HEK293 que expresaban ambos canales (Park y col., 2008).

Debido a que una fracción de TRPC3 es dirigido a zonas de vesículas altamente móviles, el canal es regulado por eventos de exo y endocitosis, consecuente con la presencia de un motivo de unión a caveolina en su N terminal, donde se encuentran los repetidos de ankirina. También se ha descrito la formación de un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) compuesto entre PLC γ 1 y el N terminal de TRPC3, y ha sido sugerido como una estructura esencial para el reclutamiento en membrana de TRPC3 (van Rossum y col., 2005). En el N terminal de TRPC3 también es posible encontrar un sitio de unión a la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP2) que parece gobernar el tráfico del canal e inserción en la membrana a través de la interacción con proteínas de la familia SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) en respuesta a la estimulación por agonistas (Singh y col., 2006).

1.5. TRPC3 y su rol fisiopatológico

Debido al amplio rol fisiológico de TRPC3, la disfunción o cambios en sus niveles de expresión se asocian a un gran número de eventos patológicos que incluyen

enfermedades neurodegenerativas, respiratorias, cardíacas y cáncer (Fan y col., 2018). La ganancia de función de TRPC3 está asociada a enfermedades neurodegenerativas como la ataxia, ya que se encuentra altamente expresado en las células de Purkinje cerebelosas, y se ha visto que la mutación T635A explica el fenotipo *Moonwalker* murino, que se caracteriza por una activación constitutiva del canal, causando una pérdida de estas células y ataxia cerebelosa (Szallasi y col., 2011; Becker y col., 2009). TRPC3 también se encuentra abundantemente expresado en diferentes tejidos del sistema circulatorio y está involucrado en diversas enfermedades cardiovasculares asociadas a disfunción endotelial (Smedlund y col., 2012). De hecho, la alta expresión de TRPC3 en células cardíacas y su activación aguda promueven la arritmia (Doleschal y col., 2015). Se ha visto que TRPC3 (y TRPC6) se activan por estiramiento o por agonistas, contribuyendo al potencial de membrana y el tono vascular en células de músculo liso vascular (VSMCs), e interesantemente se encontró que hay un aumento en los niveles de TRPC3 en VSMCs hipertensivas en comparación con células normotensivas, lo que conduce a un cambio en el ensamblaje heteromultimérico entre TRPC3 y TRPC6, y donde la alta contribución de TRPC3 favorece la despolarización de estas células (Álvarez-Miguel y col., 2017). También se ha descrito que este canal es un transductor de fuerza mecánica, y que desempeña un papel importante en la patogénesis de la cicatrización hipertrófica (Ishise y col., 2015).

TRPC3 desempeña un papel crítico en las respuestas fisiológicas y patológicas de las células de músculo liso de las vías respiratorias (ASMCs), como un componente molecular predominante en la regulación del potencial de membrana e influxo de calcio, y en la despolarización de la membrana evocada por asma o por hiperreactividad de las vías respiratorias (Xiao y col., 2010). De hecho, la inhibición del canal disminuye la

hiperreactividad y el remodelamiento de las vías respiratorias en ratones sensibilizados con ovoalbúmina, por lo que TRPC3 juega un rol crítico en el asma (Wang y col., 2017).

La ganancia de función de TRPC3 también está asociada a enfermedades genéticas, como el síndrome de Williams-Beuren, donde una sobreexpresión de TRPC3 en el intestino conduce a anomalías en el metabolismo del calcio por aumento de la absorción de calcio renal y digestivo (Letavernier y col., 2012). Por otro lado, TRPC3 está altamente expresado en las células acinares de las glándulas pancreáticas y salivares, y un aumento en su actividad se asocia al estrés y daño celular en la pancreatitis aguda y al Síndrome de Sjögren, donde su inhibición genética y farmacológica previenen este daño (Kim y col., 2009; Kim y col., 2011).

TRPC3 también juega un papel en diferentes tipos de cáncer, participando en la diferenciación de las células de cáncer de pulmón (Salido y col., 2011), implicado en la proliferación de células cancerígenas y tumorigénesis del cáncer de ovario (Venkatachalam y Montell, 2007). De hecho, TRPC3 se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de ovario y su inhibición suprime su proliferación (Yang y col., 2009). También se sobreexpresa en tejidos de cáncer de mama, en comparación con tejidos normales (Birnbaumer y col., 2009). Otro estudio mostró que la inhibición de TRPC3 disminuía la proliferación celular y la invasión de células de cáncer de vejiga (Szallasi y col., 2011), y recientemente se reportó que TRPC3 regula la proliferación y la migración en células de melanoma mediante SOCE (Oda y col., 2017). Debido a la gran relevancia patológica asociada a la ganancia de función de TRPC3, este canal es un interesante blanco farmacológico.

1.6. TRPM4

TRPM4 (Receptor de potencial transitorio melastatina 4) es un canal catiónico no selectivo activado por Ca^{2+} , pero impermeable a este catión, y se encuentra expresado en gran variedad de tejidos incluyendo músculo esquelético, cerebro, corazón, pulmón, hígado, placenta, próstata, riñón y tracto gastrointestinal (Launay y col., 2002; Nilius y col., 2003). En humanos, TRPM4 es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 19, mientras que en ratón el gen se encuentra en el cromosoma 7, codificando proteínas de 1214 y 1213 aminoácidos, respectivamente, que corresponde a la isoforma canónica del canal (TRPM4b) (Nilius y col., 2003; Murakami y col., 2003). Existen variantes de *splicing* de este canal: TRPM4a y TRPM4c. La primera carece de los 174 primeros aminoácidos N-terminales, mientras que la segunda variante es aún más corta y carece de los primeros 537 aminoácidos N terminales (Launay y col., 2002; Park y col., 2008). Sin embargo, la mayoría de la caracterización funcional de TRPM4 se ha hecho en la isoforma b.

Recientemente, fueron liberadas 4 estructuras de TRPM4 en diferentes conformaciones o estados, que proporcionaron gran cantidad de información acerca de la selectividad a iones monovalentes y mecanismos de regulación del canal (Autzen y col., 2017; Guo y col., 2017; Winkler y col., 2017; Jingjing y col., 2018). En estas publicaciones es posible encontrar estructuras en 2 estados libres de Ca^{2+} (Autzen y col., 2017; Guo y col., 2017), 2 estados unido a Ca^{2+} , uno de ellos con decavanato, un modulador de su actividad (Winkler y col., 2017), 2 estados unido a ATP (Guo y col., 2017) y una en estado cerrado unido a Na^+ (Tang y col., 2018). Se ha visto que el dominio de unión a nucleótidos en el N terminal, en un estado unido a ATP interrumpe las interacciones citosólicas del tetrámero, inactivándolo (Madej y Ziegler, 2018). A su vez,

es posible encontrar sitios de unión a CaM en el N y C terminal de TRPM4, así como también sitios de fosforilación para las proteínas kinasa PKA y PKC, alterando la sensibilidad del canal al Ca^{2+} . La actividad de TRPM4 puede ser modulada por fosfatidil inositol (4,5) bifosfato (PIP_2) y Ca^{2+} , cuyo sitio de unión se encuentra entre el dominio VSD y el dominio TRP, produciendo un aumento en la sensibilidad a Ca^{2+} mediante cambios conformacionales que bloquean la dependencia de voltaje del canal (Nilius y col., 2005; Nilius y col., 2006; Winkler y col., 2017).

TRPM4 está asociado a diversos procesos fisiológicos que involucran tanto células excitables como no excitables. En células no excitables, TRPM4 juega un papel importante en la regulación de las señales intracelulares de Ca^{2+} a través de cambios oscilatorios en el potencial de membrana, donde la entrada de Na^+ produce la entrada de Ca^{2+} vía canales de Ca^{2+} dependientes de potencial (VDCC) o la reducción de la *driving force* para la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOCs (Launay y col., 2004; Gerzanich y col., 2018). De este modo, TRPM4 está asociado a la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} durante la activación de células T y el control de la secreción de interleuquina 2 (Weber y col., 2010). TRPM4 también es esencial en la migración de células dendríticas y fibroblastos embrionarios de ratón, y se ha sugerido que es un componente intrínseco de las adhesiones focales (Barbet y col., 2008; Cáceres y col., 2015). En células excitables, como las células cardíacas, TRPM4 está involucrado en la generación y transmisión de señales eléctricas (Guinamard y col., 2010). También está asociado a la regulación de la vasoconstricción miogénica y de células de músculo liso de arterias cerebrales (Earley y col., 2004; Crnich y col., 2010). Por otro lado, el canal TRPM4 tiene un rol en la secreción de insulina en el páncreas (Cheng y col., 2007) y en procesos de proliferación y muerte celular (Armisen y col., 2011). El canal TRPM4

también es requerido para la señalización normal de los receptores del gusto (Banika y col., 2018). Por otra parte, TRPM4 es capaz de co-ensamblar con la proteína SUR1 para formar el canal SUR1-TRPM4, que confiere sensibilidad a Mg^{2+} y ATP, y se ha visto que este complejo es necesario para la secreción fásica de MMP-9 del endotelio cerebral (Woo y col., 2013; Gerzanich y col., 2018).

1.7. Mecanismos de regulación de TRPM4

La interacción con otras proteínas es clave en los mecanismos de tráfico y regulación de la actividad de TRPM4, las cuales pueden estar implicadas en la generación de modificaciones post-traduccionales, estabilidad del canal en membrana, localización subcelular, entre otros. Se ha visto que TRPM4 posee un sitio único de glicosilación en la asparagina 992, en el dominio de poro S5-P-S6. Esta modificación post-traducciona está implicada en la regulación funcional (Syam y col., 2014) y estabilidad del canal en la membrana (Woo y col., 2013). TRPM4 también puede ser fosforilado por la proteína kinasa CK1 en la serina 839, afectando en la localización del canal en la célula (Cerdea y col., 2015). También se ha visto que la actividad de PKC δ aumenta el número de canales TRPM4 en la membrana de células de músculo liso de arterias cerebrales (Crnich y col., 2010). Además, la actividad del canal puede ser modulada por ROS en células endoteliales de vasos sanguíneos de diferentes calibres (Sarmiento y col., 2015). Por otra parte, se ha visto que la expresión de TRPM4 en la superficie celular está mediada por la interacción con la proteína 14-3-3 γ (Cho y col., 2014).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que TRPM4 interacciona con otras proteínas que regulan el tráfico y posicionamiento del canal a la membrana plasmática.

Así, demostramos que TRPM4 interactúa con las proteínas (*End Binding*) EBs (Blanco y col., en preparación), las cuales se localizan en el cono de crecimiento positivo de los microtúbulos y funcionan como adaptadores que facilitan las interacciones de los microtúbulos con diferentes macromoléculas y organelos (Akhmanova y Steinmetz 2008). Además, la unión de sus cargos es mediada por el motivo consenso 'S/TxIP' presente en la proteína blanco, como lo son STIM1, MCAK y CLASP2 (figura 3) (Honnappa y col., 2009). TRPM4 posee el motivo 'SWIP' en la región N terminal, entre los aminoácidos 9 y 12, flanqueado por aminoácidos básicos que podrían estabilizar la interacción (figura 3) (Kumar y Wittmann 2012), y se encontró que las proteínas EBs (EB1/2/3) actúan en conjunto para llevar a TRPM4 desde el retículo endoplasmático al Aparato de Golgi, donde es glicosilado, y desde éste a la membrana plasmática sin alterar sus propiedades biofísicas (Blanco y col., en preparación).

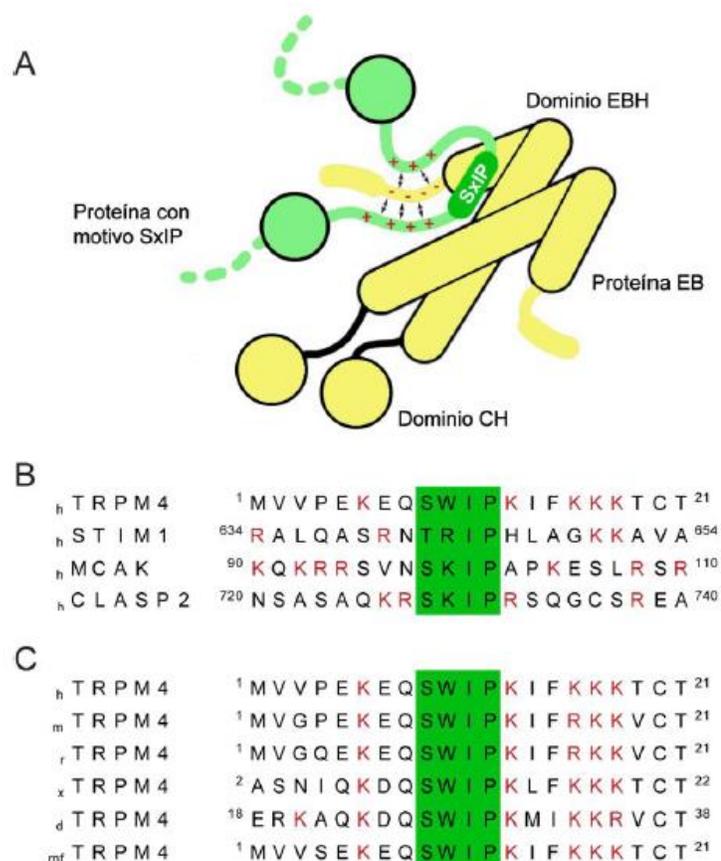


Figura 3: Interacción de las proteínas EBs con sus blancos mediante el motivo ‘SxIP’.

(A) Estructura de proteínas EBs y dominios involucrados en la interacción con proteínas blanco (Adaptado de Kumar y Wittmann, 2012). (B) y (C) En verde se destaca el motivo consenso ‘SxIP’ de las proteínas blanco, importante para la interacción con las proteínas EBs. En rojo, aminoácidos básicos presentes en las secuencias aminoacídicas de las proteínas blanco. (B) Comparación de la secuencia de TRPM4 humano con proteínas de conocida interacción con proteínas EBs. (C) Análisis de la secuencia de TRPM4 en diversas especies (h: *Homo sapiens*, m: *Mus musculus*, r: *Rattus norvegicus*, x: *Xenopus laevis*, d: *Danio rerio*, mf, *Macaca fascicularis*) (Tomado de la tesis de pregrado de Constanza Blanco, 2017).

Se demostró además que la delección del motivo 'SWIP' o una mutación por doble sustitución de los aminoácidos isoleucina y prolina por asparragina (TRPM^{SWNN}) de TRPM4, afecta su patrón de movilidad electroférica e impide la maduración del canal al afectar su grado de glicosilación (figura 4a). También se observó que estas mutaciones afectan el patrón de fluorescencia de TRPM4, mostrando una distribución similar a proteínas de expresión reticular (figura 4c), lo cual fue confirmado mediante un ensayo de biotilación que mostró que la delección del motivo ⁹SWIP¹² disminuye notablemente la expresión del canal en la superficie celular (figura 4) (Blanco y col., en preparación).

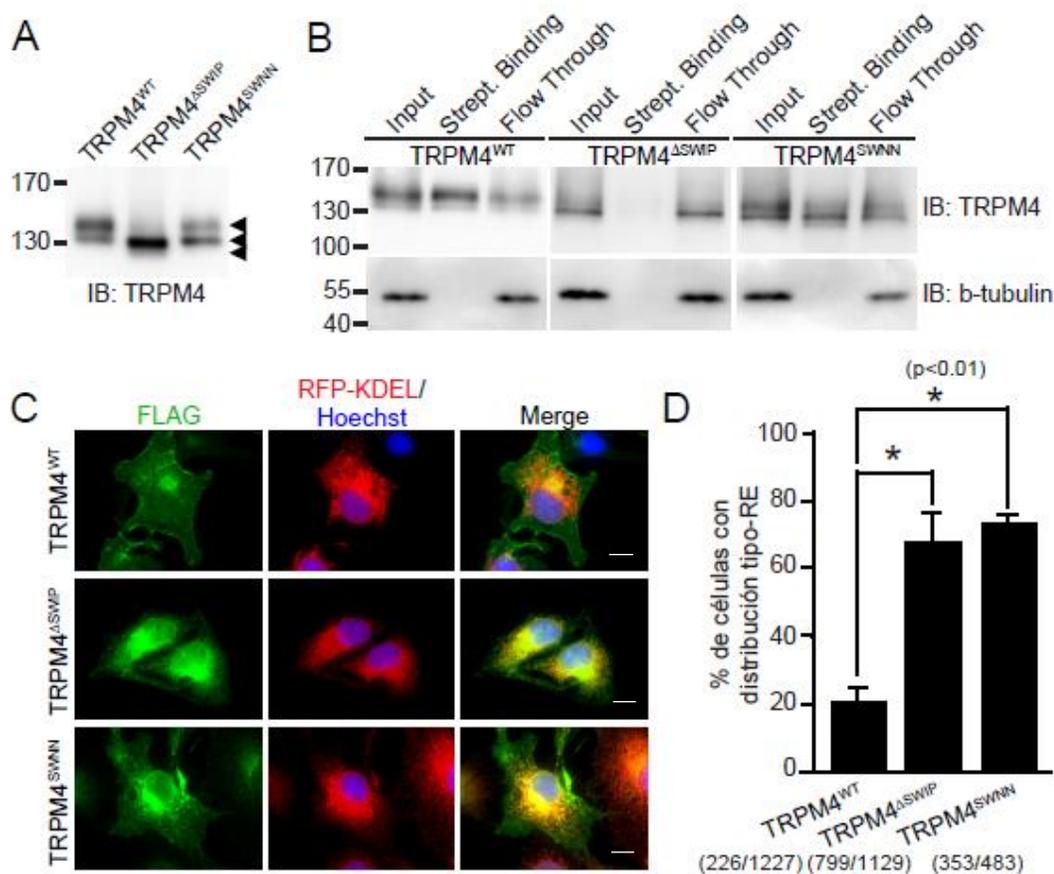


Figura 4: El motivo 'SWIP' regula el tráfico y la maduración de TRPM4.

(A) Inmunoblot de células HEK293 que sobreexpresan TRPM4 muestra alterada la movilidad electroforética de las variantes mutantes del canal (TRPM4^{ΔSWIP} y TRPM4^{SWNN}). La delección del motivo ⁹SWIP¹² reduce la expresión de la banda superior de TRPM4. (B) Inmunoblots de lisados de un ensayo de biotilación de superficie en células HEK293 que expresaban TRPM4^{WT}, TRPM4^{ΔSWIP} y TRPM4^{SWNN}. La delección del motivo ⁹SWIP¹² reduce notablemente la expresión en membrana del canal. (C) Inmunofluorescencia de células Cos-7 que coexpresaban el marcador de retículo RFP-KDEL (rojo) con TRPM4^{WT}, TRPM4^{ΔSWIP} o TRPM4^{SWNN} (verde). Los núcleos (azul) fueron marcados con Hoechst. Se muestra que el patrón de fluorescencia de TRPM4 es alterado en las variantes mutantes del canal (TRPM4^{ΔSWIP} y TRPM4^{SWNN}) y colocaliza con el retículo. (D) Porcentaje de células que muestran un patrón de fluorescencia de tipo reticular. Los números indican la cantidad de células con distribución reticular respecto a las células totales contadas (Adaptado de Blanco y col., en preparación).

1.8. Rol fisiopatológico de TRPM4

La ganancia de función de TRPM4, ya sea por un aumento en su actividad o en sus niveles de expresión, está implicada en diversos procesos fisiopatológicos, que incluyen enfermedades del sistema nervioso central, cardíaco e incluso cancer. Se ha visto que TRPM4 media la degeneración axonal y neuronal en encefalomiелitis autoinmune y esclerosis múltiple (Schattling y col., 2012). También está asociado al daño espinal y episodios isquémicos (Wang y col., 2013; Gerzanich y col., 2018). De hecho, se ha visto que el canal SUR1-TRPM4, está asociado a la secreción de MMP-9 que es esencial para la transformación hemorrágica en accidentes cerebrovasculares, por lo que está asociado a variados tipos de injurias del sistema nervioso central, y donde su

inhibición genética y farmacológica tienen un efecto altamente protectorio (Woo y col., 2013; Gerzanich y col., 2018). Por otro lado, se ha visto que al menos 15 mutaciones en TRPM4 están asociadas con enfermedades cardiovasculares, donde seis de estas mutaciones originan una ganancia de función del canal (Liu y col., 2013). Por ejemplo, una mutación sin sentido que causa la sustitución de un residuo de glutamato por lisina (TRPM4^{E7K}) provoca una desregulación de la endocitosis del canal, y está involucrada en el desarrollo de una enfermedad cardíaca denominada bloqueo cardíaco familiar progresivo de tipo I, debido al incremento de la actividad de TRPM4 que causa su alta expresión en la membrana plasmática (Kruse y col., 2009). También se ha reportado que en cardiomiocitos de ratas hipertensas hay un aumento en los niveles de expresión de TRPM4 al compararlas con ratas normotensas (Guinamard y col., 2006). En cáncer de próstata y cáncer cérvico-uterino, se ha encontrado que el canal TRPM4 se encuentra sobreexpresado, y está asociado con la migración de estas células (Narayan y col., 2007; Holzmann y col., 2015). De hecho, en nuestro laboratorio se encontró que TRPM4 está asociado a la migración de diversas líneas celulares, y que el silenciamiento del canal disminuye la migración e invasión de células de melanoma, tanto en ensayos *in vitro* como en modelo murino *in vivo* (Morales y col., en preparación). TRPM4 también participa en la transdiferenciación endotelial mesenquimal, asociado al desarrollo de la fibrosis endotelial, donde una disminución de su actividad promueve la conversión fibrótica a través de la producción de TGF- β (Echeverría y col., 2015). Considerando la participación de TRPM4 en una gran variedad de eventos fisiopatológicos y sus mecanismos de regulación, es un interesante blanco farmacológico para el tratamiento de diferentes enfermedades a las cuales está asociado.

1.9. Heteromerización de TRPM4 con TRPC3

En los últimos años ha surgido evidencia de la formación de canales heteroméricos entre miembros de diferentes subfamilias de la superfamilia de canales TRP y se ha investigado acerca de su funcionalidad e importancia fisiológica. Recientemente se demostró que TRPV4 y TRPC1 forman canales heteroméricos (TRPV4-C1) en los tejidos vasculares, siendo los principales responsables de SOCE endotelial y posterior relajación vascular, mediante un aumento de su expresión en membrana (Ma y col., 2010; Ma y col., 2011). Por otro lado, se encontró que TNF α induce el cotráfico de TRPV1 y TRPA1 en neuronas sensoriales que coexpresan estos canales. Además, estos canales forman heterómeros funcionales, participando en la hiperexcitabilidad neuronal asociada con la estimulación inflamatoria / dolorosa (Meng y col., 2016). En 2008, Park y sus colaboradores encontraron por medio de diferentes aproximaciones que los canales TRPM4 y TRPC3 interaccionan directamente y sugieren que TRPM4 puede estar involucrado en SOC a través de la interacción con TRPC3, en lo que supone el primer hallazgo de heteromultimerización entre miembros de diferentes subfamilias de canales TRP (Park y col., 2008). Sin embargo, el mecanismo de heteroasociación entre TRPM4 y TRPC3 no ha sido estudiado en detalle, y sólo fue demostrado en sistemas de expresión heterólogos, de modo que el rol fisiológico de su heteroasociación aún permanece sin ser explorado en células que coexpresan ambos canales. En su conjunto, estos datos confirman la importancia del estudio de los canales TRP heteroméricos, sus mecanismos de regulación y su relevancia fisiopatológica.

2. HIPÓTESIS

Debido a que miembros de una misma subfamilia o de diferentes subfamilias de canales TRP forman homo y heteromultímeros mixtos en diferentes tejidos, compartiendo mecanismos de tráfico y exportación a la membrana, y dado que la interacción física entre TRPM4 y TRPC3 no ha sido no ha sido estudiada en mayor detalle, resulta interesante investigar si alguno de los mecanismos que regulan el tráfico del canal TRPM4, regulan también el tráfico de TRPC3. En nuestro laboratorio se encontró que TRPM4 interacciona con las proteínas EBs a través del motivo 'SWIP', localizado en la región amino terminal del canal, y que la delección y mutación puntual de este motivo afectan la localización y actividad de TRPM4, de modo que estarían participando en el tráfico y exportación del canal a la membrana plasmática. En base a estos antecedentes, se propone que:

“Los canales TRPM4 y TRPC3 interaccionan, compartiendo mecanismos de tráfico y exportación a la membrana plasmática”.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción y el co-tráfico entre los canales TRPM4 y TRPC3.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar la interacción proteína-proteína entre los canales TRPM4 y TRPC3.
2. Evaluar el co-tráfico celular de los canales TRPM4 y TRPC3.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular.

Se trabajó con células COS-7, cultivadas a 37 °C y 5% CO₂ en medio DMEM alto en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 5% v/v, glutamina 2 mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

5.2. Transfección transitoria.

Se sembraron células HEK293 y COS-7 en placas de 60 mm y 35 mm respectivamente y fueron transfectadas de forma transitoria usando 3 µL y 2 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) con 3 µg y 1 µg de DNA, respectivamente.

5.3. Ensayo de inmunoprecipitación.

Las células HEK293 y COS7 sembradas en placas de 60 mm con un 50% de confluencia se cotransfectaron con los plasmidios pcDNA4/TO, FLAG-TRPM4 (pcDNA4/TO-Flag-TRPM4) y TRPC3-Myc (Addgene plasmid # 25902). Tras 48 hrs de expresión las células se lavaron dos veces con DPBS (2,67 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na₂HPO₄-7H₂O) frío y se lisaron en agitación por 25 min a 4°C con 500 µL de un amortiguador que contenía Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, NP-40 0,5% v/v, NaF 5 mM, Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (PIC). Los lisados se homogenizaron y centrifugaron a 11.000 x g durante 10 min a 4°C. Se extrajo 100 µL de sobrenadante como control de entrada y el resto se incubó con 2 µg de anticuerpo monoclonal (mAb) TRPM4, clon 10H5

(Origene) durante toda la noche en rotación (10 rpm) a 4°C. Al día siguiente, se incubó los complejos con 25 µL de esferas *Protein G Agarose* (Merck) durante 1 hrs. Los complejos inmunoprecipitados fueron lavados 6 veces con 1 mL de amortiguador de lavado que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y NP-40 0,5 % v/v. Los controles de entrada y los complejos inmunoprecipitados fueron eluidos con un amortiguador reductor (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, β-mercaptoetanol 1% v/v, azul de bromofenol 1% v/v) (RSB) 1X y 5X respectivamente. Las muestras fueron calentadas a 85°C por 5 min y separadas mediante geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) a 70 V por 3 hrs y 30 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia húmeda a 30 V por 18 hrs a 4° C y fueron analizadas por inmunoblot.

5.4. Ensayo de biotiniación de proteínas de superficie celular.

El ensayo de biotiniación se realizó acorde a Cerda y col. 2015. Células COS-7 fueron cotransfectadas con los plasmidios pcDNA4/TO (Thermo Scientific #V102020), FLAG-TRPM4 (que fue gentilmente cedido por el Dr. Pierre Launay (Caceres, Ortiz et al. 2015)), FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} (pcDNA4/TO-FLAG-TRPM4-ΔSWIP, generado a partir del plasmidio pcDNA4/TO-FlagTRPM4) y TRPC3-Myc (Addgene #25902). Tras 48 hrs de expresión, las células se lavaron tres veces en DPBS frío (pH 8,0) y se incubaron con 1 mg/ml de biotina sulfo-NHS-LC EZ-link (Thermo Scientific catálogo #21335) disuelto en DPBS (pH 8,0) por 30 min a 4 °C. Posteriormente se incubó con una solución de bloqueo que contiene Tris-HCl 50 mM y NaCl 154 mM (pH 8,0) por 5 min y luego lavó dos veces con DPBS frío. Las células se lisaron con 250 µL de amortiguador de lisis (Tritón X-100 1% v/v, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH: 8,0, NaF 5 mM, SDS 0,1% p/v, 1mM Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) y 1 mM Cocktail de inhibidores de proteasas (PIC)). Los

lisados se homogenizaron y centrifugaron a 11.000 x g durante 10 min a 4°C. Se extrajo 50 µL de sobrenadante como control de entrada y el resto se incubó en columnas de *Pierce™ Streptavidin Agarose* (Thermo Scientific catálogo #20351) durante 16 hrs a 4°C en rotación. Los controles de entrada y las proteínas precipitadas fueron eluidas con 12,5 µL y 70 µL de amortiguador reductor RSB 5X respectivamente. Las muestras fueron calentadas a 85°C por 5 min y separadas mediante geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) a 70 V por 3 hrs y 30 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia húmeda a 30 V por 18 hrs a 4°C y fueron analizadas por inmunoblot.

5.5. Inmunoblot.

Las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (4 % p/v leche libre de grasa en TBS Tween® 20) por 30 min a temperatura ambiente. Luego se incubó con anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal (mAb) anti-TRPM4 clon 10H5 (Origene), anticuerpo policlonal de conejo anti-TRPC3 (Alomone labs, Jerusalén, Israel) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-Tubulina (Sigma) durante toda la noche a 4°C según correspondiera, y se lavó tres veces con TBS Tween® 20 0,1% v/v. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa para inmunoblot (KPL, Gaithersbury, MD, EEUU) durante 1 hrs a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS Tween® 20 0,1% v/v. Los inmunoblots fueron visualizados usando Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) con un equipo fotodocumentador UVItec Alliance Mini HD9 (Cambridge, Inglaterra). Se empleó un protocolo de *stripping* incubando la membrana de nitrocelulosa con amortiguador de *stripping* pH 2.2 (Glicina 1,5% p/v, SDS 0,1% p/v, Tween® 20 1% v/v) 2 veces por 10 min, seguido de 2 lavados

con DPBS por 10 min y 2 lavados con TBS Tween® 20 0,1% v/v por 5 min, cada vez que se utilizó un anticuerpo diferente.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunoblot.

Anticuerpo	Isotipo	Dilución	Fuente	Número de catálogo
Monoclonal ratón anti-TRPM4 clon 10H5	IgG1	1:1000	Origene	TA500381
Policlonal conejo anti-TRPC3		1:1000	Alomone	ACC-016
Anti-Tubulina	IgG1	1:3000	Sigma	T5168
Anti-mouse		1:8000	KPL	52200286
Anti-rabbit		1:8000	KPL	52200283

5.6. Inmunofluorescencia.

Las células COS-7 se cotransfectaron con los plasmidios RFP-KDEL (ER-mRFP, Clontech #62236), FLAG-TRPM4, TRPC3-Myc, FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} y TRPC5-HA (pCMV-HA-TRPC5, generado a partir del vector pCMV-HA, Clonetech #631604, y cedido generosamente por el Dr. David Clapham (Clapham, 2003)) y se incubaron durante 24 hrs. Luego, se transfirieron a cubreobjetos de 12 mm previamente incubados con fibronectina 5 µg/mL. Luego de 24 hrs, las células se lavaron con DPBS y se fijaron por 15 min a 4°C con solución de fijación 4% p/v formaldehído/4% p/v sacarosa en DPBS pH 7,4. Posteriormente, las células se bloquearon y permeabilizaron con solución de bloqueo (leche libre de grasas al 4% p/v y 0,1% Tritón X-100 en DPBS) durante 1 hrs a temperatura ambiente y se incubó por 2 hrs con anticuerpo primario (anti-FLAG y/o anti-Myc). Luego se lavó tres veces con solución de bloqueo por 5 min cada vez y los anticuerpos primarios se tiñeron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 647 (Life technologies), anti-IgG1 de ratón conjugado

con el fluoróforo Alexa 488 (Life technologies) y con anti-igG2b conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (Life technologies), según correspondiera durante una 1 hrs a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con DPBS durante 5 min. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (200 ng/mL). Finalmente, los cubreobjetos se montaron con el reactivo de montaje *ProLong® Gold* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU). Los cubreobjetos fueron examinados por microscopía de fluorescencia confocal con un microscopio de escaneo laser Eclipse Ti (Nikon A1R), usando un objetivo de inmersión en aceite de 1,4 NA de 60X. Las imágenes se adquirieron de modo que el tamaño del píxel fue de 0,25 μm . Se adquirieron cortes apilados en Z con un espaciado de corte de 0,4 μm . Cada pila tomó aproximadamente 4 min para su adquisición. La configuración del *pinhole* fue ajustada para permitir secciones de 4 μM . El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image J utilizando la extensión '*Just Another Co-localization Plugin*' (JaCop). Los histogramas se generaron utilizando el flujo de trabajo sugerido en Pike y col., 2017 (figura suplementaria A). Los anticuerpos utilizados se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Isotipo	Dilución	Fuente	Número de catálogo
Anti-FLAG rabbit	IgG	1:200	Sigma	F7425
Anti-Myc clon qE10 mouse	IgG1	1:200	Sigma	M4439
Anti-HA mouse	IgG2b	1:50	Roche	11583816001
Alexa Fluor 647 conjugated goat anti-rabbit H+L		1:500	Life technologies	A27040
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG1	IgG1	1:500	Life technologies	A21121
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG2a	IgG2b	1:500	Life technologies	A21141

5.7. Ensayo sistema Retention Using Selective Hooks (RUSH).

Células COS-7 fueron cotranfectadas en placas 60 mm usando 4 μ L de Lipofectamina 2000 con los plasmidios RFP-KDEL, pCDH-Str-Li (Addgene #65313), pcDNA4/TO-FLAG-TRPM4-SBP (generaron a partir del plasmidio pcDNA4/TO-FlagTRPM4) y TRPC3-Myc (2 μ g de DNA total) y se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos. 24 hrs después se agregó 40 μ M de D-Biotina (Sigma) y se fijaron por 15 min a 4°C con solución de fijación 4% p/v formaldehído/ 4% p/v sacarosa en DPBS pH 7,4 luego de 0, 30, 60 y 120 min después de agregar la D-biotina. Posteriormente se procedió a realizar un ensayo de inmunofluorescencia.

5.8. Ensayo de inmunofluorescencia *Retention Using Selective Hooks* (RUSH).

Las células se bloquearon y permeabilizaron con solución de bloqueo (leche libre de grasas al 4% p/v y 0,1% Tritón X-100 en DPBS) durante 1 hrs a temperatura ambiente y se incubó por 2 hrs con anticuerpo primario (anti-FLAG y anti-Myc). Luego se lavó tres veces con solución de bloqueo por 5 min cada vez y los anticuerpos primarios se tiñeron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 647 (Life technologies) y con anti-IgG1 de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (Life technologies), según correspondiera durante una 1 hrs a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con DPBS durante 5 min. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (200 ng/mL). Finalmente, los cubreobjetos se montaron con el reactivo de montaje *ProLong® Gold* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU). Las imágenes fueron obtenidas por una CCD instalada en un microscopio *Spinning Disk Olympus®*

IX81, con un objetivo de 63X con apertura numérica de 1.3. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J.

5.9. Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron repetidos de manera independiente al menos tres veces. Los datos recogidos fueron cuantificados y expresados como el promedio \pm desviación estandar. Los datos normalizados fueron comparados con sus respectivos controles utilizando Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1. Validación de la interacción de los canales TRPM4 y TRPC3.

Datos de publicaciones anteriores habían mostrado que TRPM4 interacciona con TRPC3 (Park y col., 2008), por lo que el primer objetivo de este seminario de título consistió en validar la interacción entre estos dos canales iónicos pertenecientes a distintas subfamilias de la super familia TRP.

Para llevar a cabo esto se utilizaron células HEK293 y COS-7, que fueron cotransfectadas con pcDNA4TO, FLAG-TRPM4 y Myc-TRPC3. Tras 48 hrs de expresión se realizó un ensayo de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-TRPM4 y se analizó por inmunoblot.

Para evaluar la eficiencia de la inmunoprecipitación y la expresión de TRPM4, se incubó con anticuerpo anti-TRPM4, y se observó bandas en la altura de los 130 kDa, que corresponde a lo predicho para TRPM4. Estas bandas se observan en los carriles

correspondiente a los controles de entrada y al inmunoprecipitado en las muestras que fueron transfectadas con el plásmido Flag-TRPM4.

Luego de un protocolo de *stripping*, la membrana se incubó con anticuerpo anti-TRPC3, para evaluar la expresión de este canal en los controles de entrada y la posible interacción con TRPM4 en las células transfectadas con el plásmido Myc-TRPC3. Se logra observar una banda cercana a 100 kDa en los controles de entrada correspondientes al peso esperado de Myc-TRPC3. En los carriles correspondientes a los inmunoprecipitados, sólo se logra observar esta banda en el carril en donde se cotransfectó FLAG-TRPM4 y Myc-TRPC (figura 5).

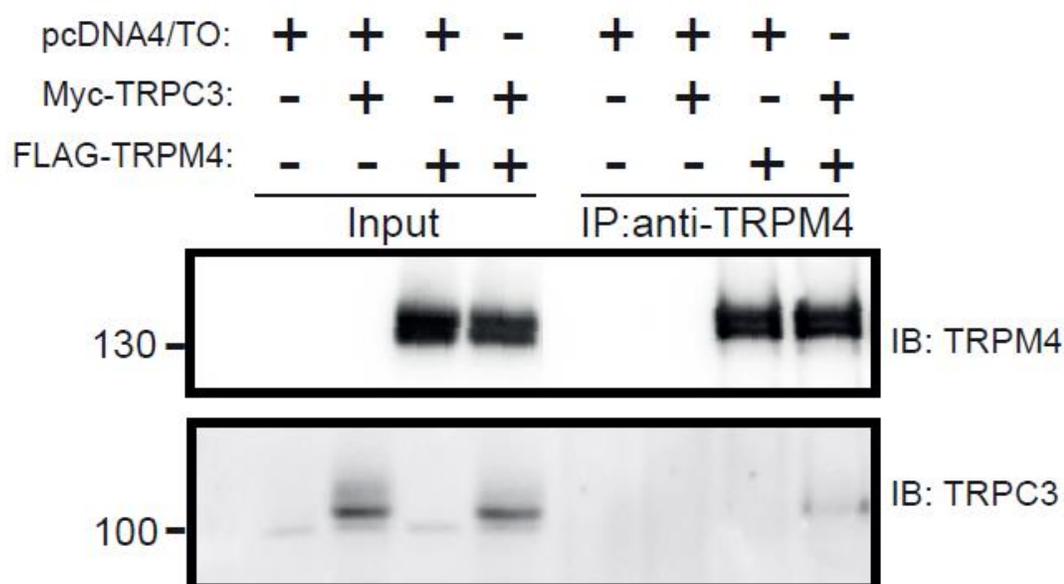


Figura 5: Los canales TRPM4 y TRPC3 interactúan.

Inmunoblot representativo de TRPM4 y TRPC3 de lisados de células COS-7 que sobreexpresaban FLAG-TRPM4 y Myc-TRPC3, inmunoprecipitado con anticuerpo anti-TRPM4. Imagen representativa para células que fueron cotransfectadas con pcDNA4/TO, FLAG-TRPM4 y Myc-TRPC3 (n=3).

6.2. Tráfico celular de los canales TRPM4 y TRPC3

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que el 'motivo SWIP' del canal TRPM4 regula su tráfico anterógrado hacia la membrana plasmática (Blanco y col., en preparación), regulando su número en la membrana, y por lo tanto la corriente del canal.

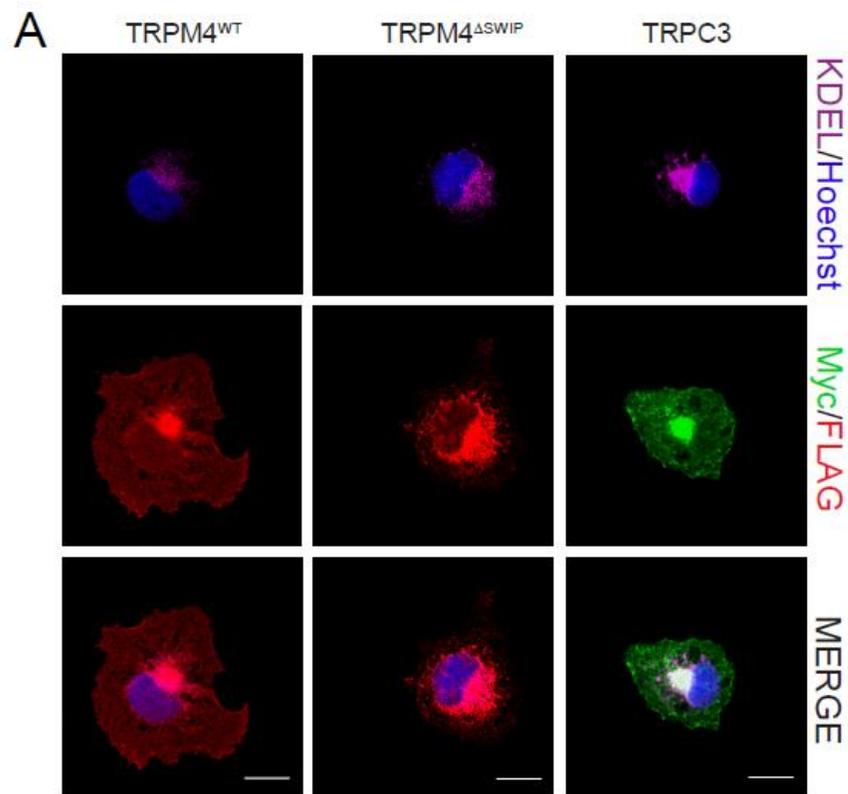
Con la premisa de que TRPM4 interactúa con TRPC3, y para evaluar el tráfico celular de los canales TRPM4 y TRPC3, se utilizó 3 aproximaciones.

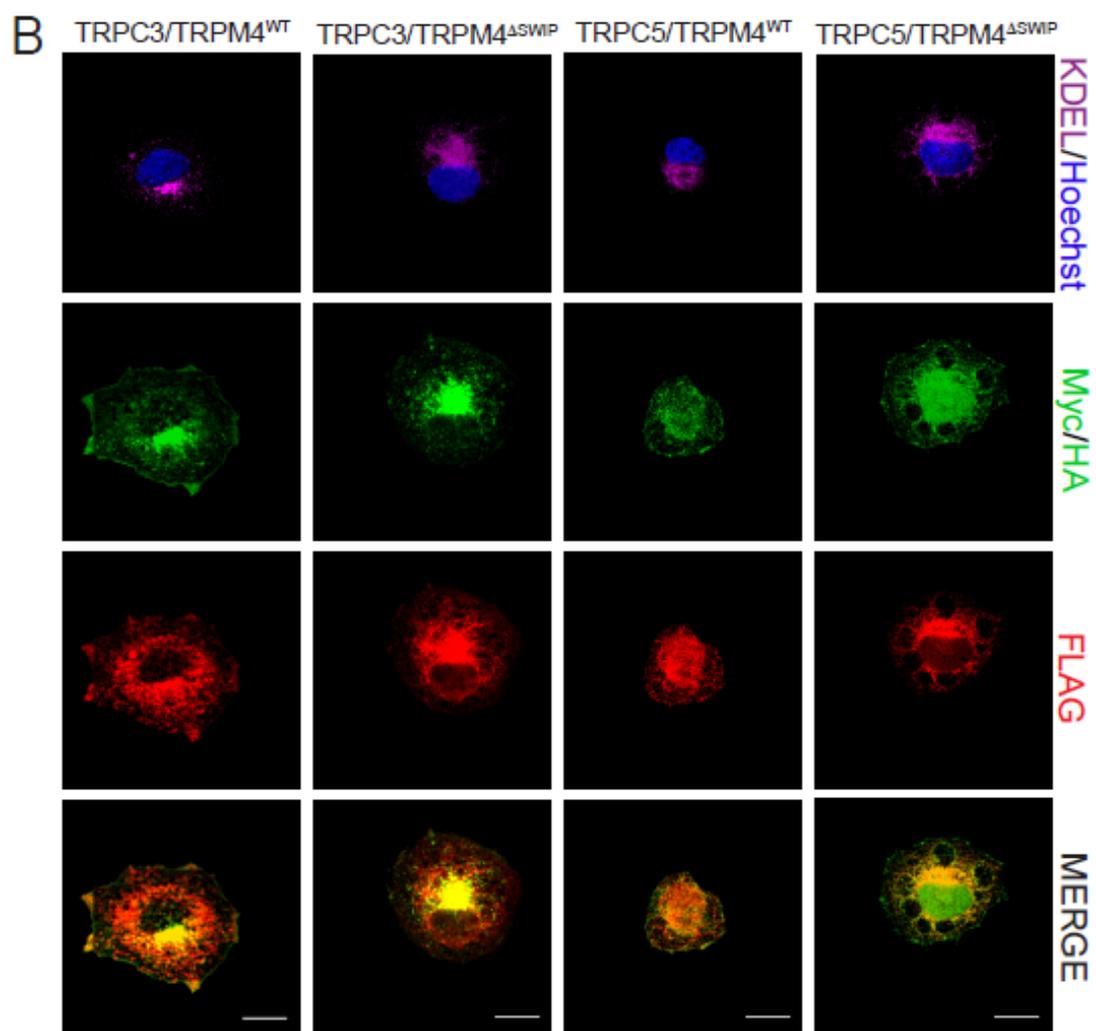
Primero, la localización subcelular de TRPM4, TRPM4^{ΔSWIP} y Myc-TRPC3 se evaluó por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal de escaneo láser después de su expresión transitoria en células COS-7, y se observó que TRPM4 y TRPC3 se localizan principalmente en la membrana plasmática y retículo endoplasmático, mientras que al expresar TRPM4^{ΔSWIP} se observa principalmente una localización reticular y perinuclear (figura 6A).

De forma análoga a observaciones previas sobre la expresión de TRPC1, TRPC6 y TRPC6^{Δ131} en sistemas celulares heterólogos (Hofmann y col., 2002), y a raíz de informes anteriores que sugieren una posible heteromultimerización de TRPM4 con TRPC3 (Park y col., 2008), se probó la hipótesis de que el correcto tráfico de TRPC3 podría cambiar el patrón de fluorescencia de TRPM4^{ΔSWIP}. Por lo tanto, se coexpresó FLAG-TRPM4 y FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} con Myc-TRPC3 o HA-TRPC5. Sin embargo, esta maniobra no cambió el patrón de fluorescencia de TRPM4^{ΔSWIP}, y por el contrario, cambió la localización de TRPC3 a un patrón similar al de TRPM4^{ΔSWIP}. TRPC5 se observa correctamente insertado en la membrana plasmática en ambas condiciones, y no fue capaz de reestablecer el tráfico de TRPM4^{ΔSWIP} en la membrana (figura 6B). Por lo tanto,

TRPC3, pero no TRPC5, es retenido en el retículo endoplasmático al ser coexpresado con TRPM4^{ΔSWIP}, muy probablemente formando multímeros mixtos.

La visualización de la colocalización se realiza mejor usando histogramas. Para esto, se utilizó el flujo de trabajo sugerido en Pike y col., 2017 (figura suplementaria A) y se determinó la co-ocurrencia de las señales aisladas de los fluoróforos a través de los coeficientes de Manders (M1 y M2) (figura 6C). Se observó que al superponer la señal aislada de TRPC3 y TRPC5 con la señal aislada de TRPM4, hay un alto grado de co-ocurrencia en ambas condiciones. Sin embargo, se observó que al superponer las señales aisladas de TRPC3 y TRPC5 con la señal aislada de TRPM4^{ΔSWIP}, disminuye la co-ocurrencia para TRPC5 y no para TRPC3, lo que indica que TRPC3 se colocaliza con TRPM4^{ΔSWIP} principalmente en el retículo endoplasmático, y que TRPC5 escapa a la membrana plasmática sin alterar el patrón de fluorescencia de TRPM4^{ΔSWIP}.





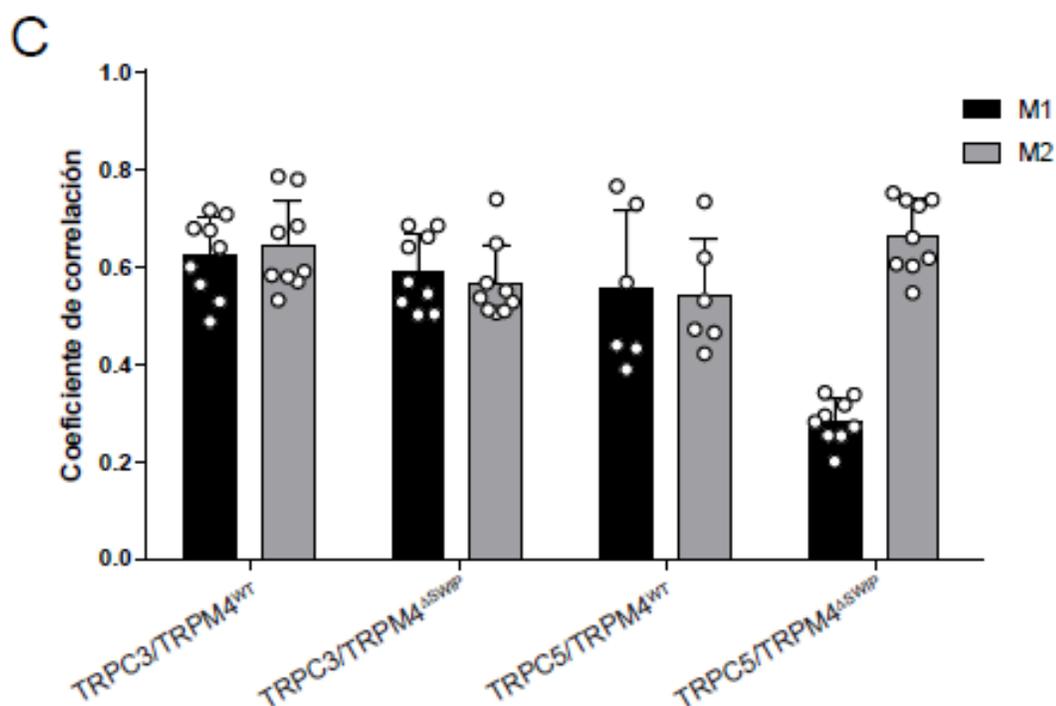


Figura 6: La delección del ‘motivo SWIP’ de TRPM4 afecta la localización de TRPC3. Imágenes representativas de inmunofluorescencia con anti-FLAG (rojo 647), anti-Myc (verde 488), anti-HA (verde 488) y tinción nuclear con Hoechst (azul) de células COS-7 cotransfectadas con solamente con FLAG-TRPM4, FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} o TRPC3-Myc y RFP-KDEL como marcador de retículo endoplasmático (RE) (A); o cotransfectadas con FLAG-TRPM4 o FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} y Myc-TRPC3 o HA-TRPC5, además del marcador de RE RFP-KDEL (B), obtenidas mediante microscopio confocal de escaneo laser. Barra de escala: 20 μ m. (C) Análisis de colocalización de TRPM4 o TRPM4^{ΔSWIP} y TRPC3 o TRPC5. Se muestran los coeficientes de Manders M1 (•) y M2 (◦). Los puntos blancos indican las mediciones realizadas a partir de 3 experimentos independientes. Las barras indican los datos presentados como el promedio \pm D.E.

La segunda aproximación utilizada fue el sistema de retención usando ganchos selectivos RUSH (*Retention using selective hooks*) (Boncompain y col., 2012), que es

un sistema de sincronización del tráfico. Está técnicamente basado en la interacción reversible de una proteína gancho, fusionada a un núcleo de estreptavidina y anclada de manera estable en el compartimento celular donante, con una proteína de interés que en este caso TRPM4, fusionada al péptido de unión a estreptavidina SBP (*Streptavidin-binding protein*). La adición de biotina causa la liberación de la proteína de interés del gancho, permitiendo el análisis del tráfico y localización de proteínas marcadas a distintos tiempos (Boncompain y col., 2012). En este caso, se cotransfectó FLAG-TRPM4-SBP y Myc-TRPC3, además de un marcador de retículo (KDEL-RFP), y mediante inmunofluorescencia se observó que el patrón de fluorescencia de los canales TRPM4 y TRPC3, sin agregar biotina (tiempo 0), es principalmente a nivel de retículo. A 30 min luego de agregar la biotina (tiempo 30'), se observó que la localización de ambas proteínas era principalmente reticular y citoplasmática, sugiriendo que estos canales iónicos se encontraban en su proceso de tráfico anterógrado. En los tiempos 60 min y 120 min se observó que los canales TRPM4 y TRPC3 se localizaban principalmente en el citoplasma y correctamente insertados en la membrana de la célula (Figura 7).

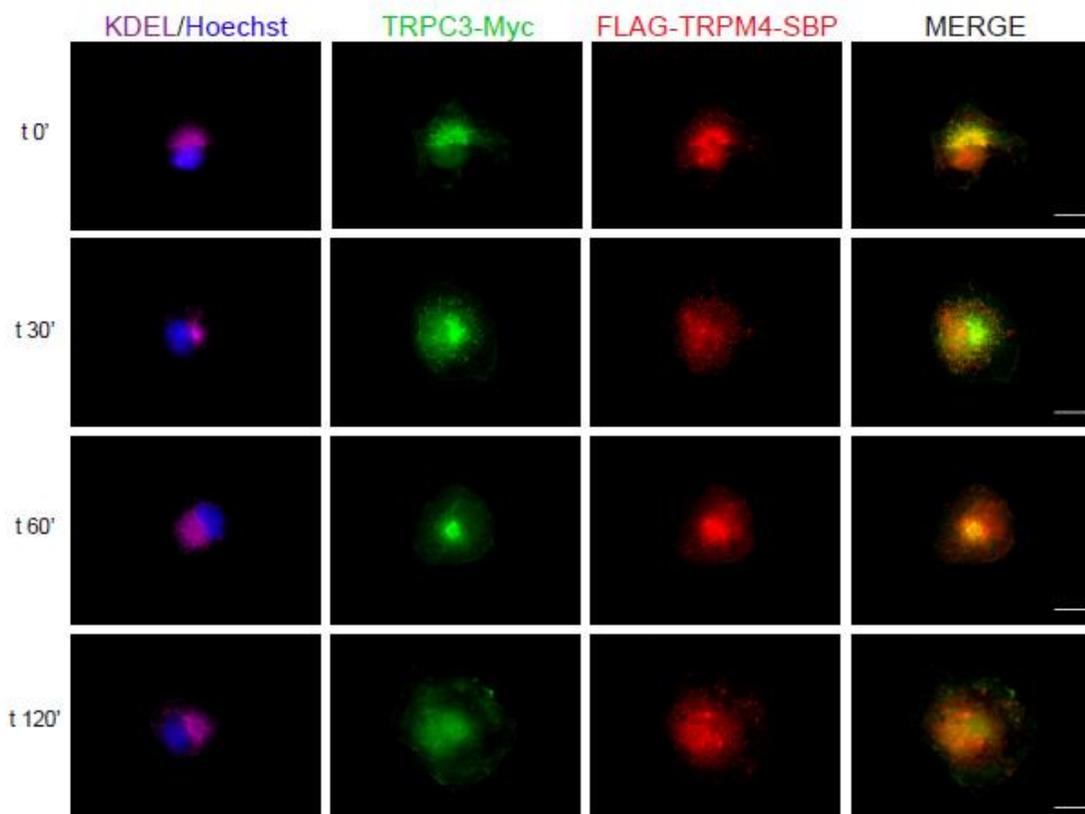


Figura 7: Co-tráfico de TRPM4 y TRPC3

Imágenes representativas de inmunofluorescencia con anti-FLAG (rojo 647), anti-Myc (verde 488) y tinción nuclear con Hoechst (azul) de un ensayo de sistema RUSH en células COS-7 cotransfectadas con Flag-TRPM4-SBP, TRPC3-Myc, Hook de Golgi (Str-Li) y RFP-KDEL (magenta). Se muestran imágenes representativas de 3 transfecciones independientes a cuatro tiempos de incubación con d-biotina (min 0, 30', 60' y 120'). Barra de escala: 20 μm .

Para evidenciar que el efecto de retención reticular observado al cotransfectar TRPC3 con la mutante de tráfico TRPM4^{ASWIP}, se evaluó la expresión en membrana de TRPC3 a través de un ensayo de biotilación. Las células cotransfectadas con TRPC3

y TRPM4^{WT} o TRPM4^{ΔSWIP} se trataron con biotina sulfo-NHS-LC EZ-link para marcar solamente las proteínas de la superficie celular, a través de la unión de esta vitamina a las lisinas expuestas al medio extracelular. Cuando las proteínas precipitadas en columnas de estreptavidina se analizaron por *Inmunoblot*, se confirmó que el protocolo de biotilación no precipitó proteínas citoplasmáticas al incubar con anticuerpo contra tubulina (figura 8a). Por otro lado, se logró observar bandas a la altura de 130 kDa correspondientes a la masa molecular de TRPM4 (figura 8a). De acuerdo con datos obtenidos en nuestro laboratorio (Blanco y col., en preparación), al analizar la intensidad de estas banda, se observa que la delección del 'motivo SWIP' disminuyó significativamente la expresión en membrana de TRPM4, incluso al coexpresar TRPM4^{ΔSWIP} con TRPC3 (figura 8b). A su vez, se observó bandas a la altura de 100 kDa correspondientes a la masa molecular de TRPC3 (figura 8a). Al analizar la intensidad de estas bandas se observó una disminución significativa del canal TRPC3 en la superficie celular al ser coexpresada con TRPM4^{ΔSWIP}, en comparación con su coexpresión con TRPM4^{WT} (figura 8c).

A través de una reacción de desglucosilación con la enzima Peptide-N-glycosidase F (PNGaseF) y su posterior análisis por inmunoblot de muestras provenientes de células COS-7 que expresaban TRPM4, TRPM4^{ΔSWIP} y/o TRPC3 (figura suplementaria 1a), se determinó que los niveles relativos de bandas maduras e inmanaduras de los canales TRPM4 y TRPM4^{ΔSWIP} no se ven afectados al ser coexpresados con TRPC3 (figura suplementaria 1b). A su vez, no se observaron diferencias en los niveles de maduración de TRPC3 al ser coexpresado con TRPM4, ni con la mutante de tráfico TRPM4^{ΔSWIP} (figura suplementaria 1c).

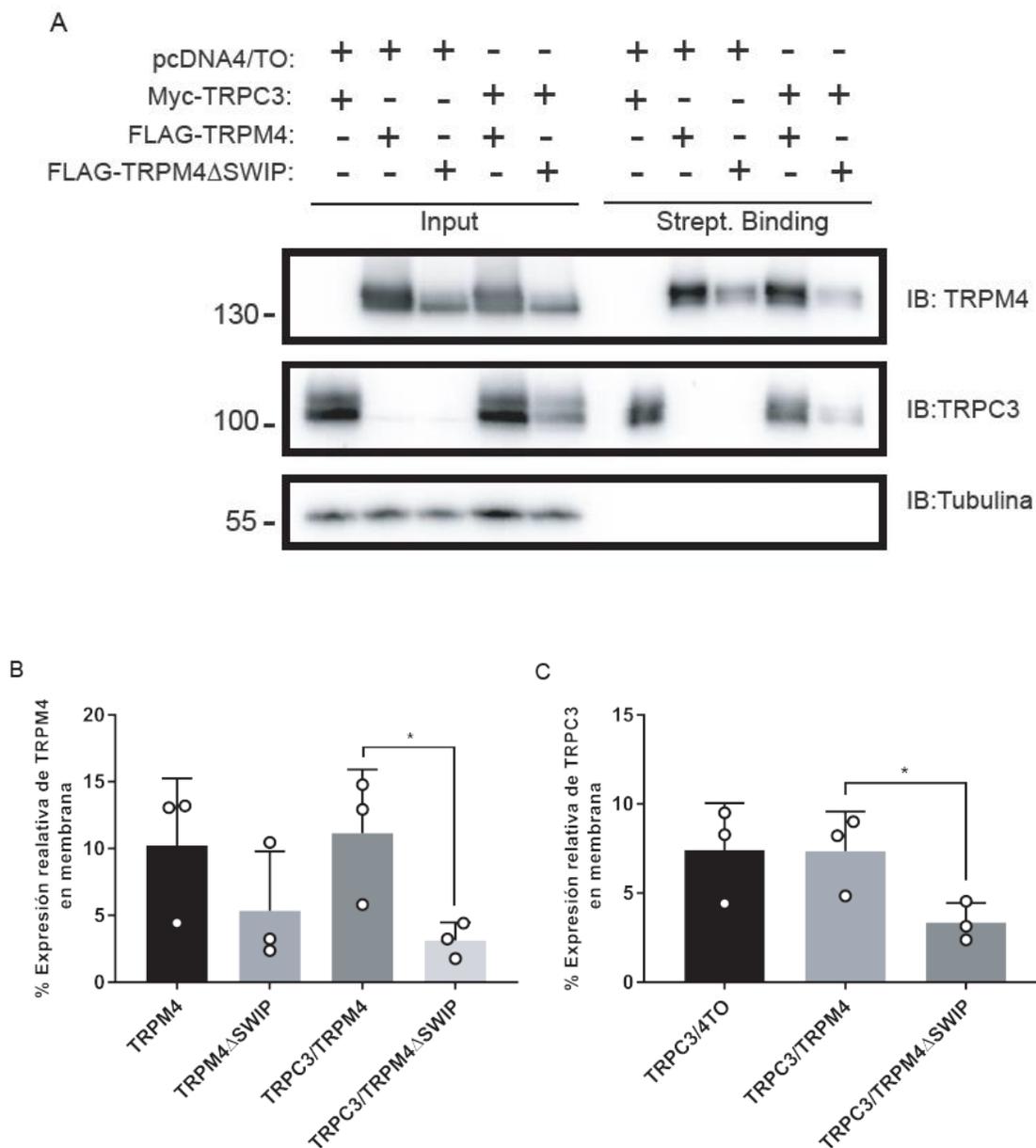


Figura 8: El 'motivo SWIP' regula el tráfico de TRPM4 afectando la expresión en membrana de TRPC3.

TRPM4, FLAG-TRPM4 Δ SWIP y TRPC3-Myc. (A) Inmunoblot representativo de TRPM4, TRPC3 y Tubulina de lisados de células COS-7. (B) y (C) Cuantificación de la intensidad de cada banda inmunoreactiva anti-TRPM4 (B) y anti-TRPC3 (C) por densitometría, normalizado frente al valor de su correspondiente control de entrada. Datos obtenidos a

partir de 3 experimentos independientes presentados como el promedio \pm D.E.; * indica una disminución estadísticamente significativa en comparación con la condición control ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

TRPC3 está involucrado en un amplio espectro de mecanismos de señalización de Ca^{2+} , y presenta propiedades de activación y regulación únicas que le permiten el reconocimiento e integración de múltiples estímulos tanto en células excitables como no excitables. Se ha visto que este canal se asocia con una variedad de proteínas le permiten formar canales catiónicos diferentes en diversos tipos de células. La asociación con otras proteínas afecta su actividad y función, por lo que TRPC3 es considerado un sensor multifuncional y versátil de particular relevancia fisiológica y fisiopatológica.

7.1. Mecanismos de regulación de TRPC3.

TRPC3 es un canal catiónico sensible a lípidos, que estructuralmente se caracteriza por poseer un segmento transmembrana (S3) más largo que los otros miembros de la subfamilia TRPC, que se conecta a S4 a través de un *loop* notablemente largo, donde se encuentra un sitio de glicosilación, modificación post traduccional que se relaciona con la actividad constitutiva significativa del canal (Fan y col., 2018; Dietrich y col., 2003). Puede ser directamente activado por DAG o en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteína G y está involucrado en SOCE a través de la interacción con otras proteínas como TRPC1, Orai1 o RIP_3 (Lichtenegger y Groschner,

2014). TRPC3 posee 4 sitios de fosforilación que inhiben su actividad. El sitio T573 es fosforilado por PKC γ , y S712 que es fosforilado por PKC y disminuye la actividad del canal,. Además posee 2 sitios de fosforilación dependiente de GMP cíclico (T11 y S263) que suprimen su actividad SOCE en células HEK293 (Lichtenegger y Groschner, 2014). También se ha descrito que el nivel de expresión de TRPC3 puede cambiar el mecanismo de acoplamiento por el cual se produce su activación (Szallasi y col., 2011; Smedlund y col., 2012). En cuanto al tráfico del canal a membrana, se ha visto que TRPC3 posee un sitio de unión a caveolina en su región N-terminal y que una fracción del canal es dirigido a zonas de vesículas móviles, de modo que es regulado por eventos de exo y endocitosis. Además, se ha descrito que forma un dominio PH compuesto con PLC γ 1 en el N terminal del canal, que es esencial para el reclutamiento en membrana de TRPC3 (van Rossum y col., 2005). TRPC3 interactúa con α SNAP, una proteína de la familia SNARE, y posee un sitio de unión a VAMP2 en su dominio N terminal, mediando el tráfico e inserción en la membrana del canal en respuesta a la estimulación con agonistas (Singh y col., 2004; Ambudkar, 2007). Debido a que la interacción de TRPC3 con otras proteínas es esencial en la regulación de su actividad y localización celular, aun es necesario seguir indagando en estas interacciones, ya que podrían entregar nuevas funciones y mecanismos de regulación del canal.

7.2. TRPC3 interacciona con TRPM4.

En 2008, Park y colaboradores encontraron por medio de diferentes aproximaciones que TRPM4 y TRPC3 interaccionan físicamente y sugieren que TRPM4 puede estar involucrado en SOC a través de esta interacción con TRPC3, en lo que supone el primer hallazgo de heteromultimerización entre miembros de diferentes

subfamilias de canales TRP, en sistemas de expresión heteróloga (Park y col., 2008). Sin embargo, el mecanismo de heteroasociación entre TRPM4 y TRPC3 y su relevancia fisiológica no ha sido estudiados en detalle. En este trabajo de tesis, en una primera instancia, se validó dicha interacción mediante experimentos de inmunoprecipitación, encontrándose que efectivamente estos dos miembros de diferentes subfamilias de canales TRP interactúan (figura 5). Las estructuras de estos dos canales iónicos han sido resueltas recientemente, revelando semejanzas y diferencias estructurales que pueden servir de información para indagar sobre el mecanismo de asociación entre estas proteínas, además de los determinantes moleculares de ensamblaje comunes a la superfamilia TRP (Fan y col., 2018). Se ha determinado que el N terminal de TRPM4 no es necesario para la interacción con TRPC3, de modo que las variantes TRPM4a y TRPM4c también podrían interactuar con TRPC3 (Park y col., 2008). Por otro lado, el dominio C-terminal de TRPC3 se asemeja al de las estructuras de TRPM4 y TRPM8, que presentan un dominio *coiled coil* en el eje de simetría del tetrámero, y una estructura α hélice que penetra en un túnel formado por dominios intracelulares adyacentes, y que es considerado esencial en la tetramerización y *gating* de ambos canales iónicos (Autzen y col., 2017; Madej y Ziegler, 2018; Fan y col., 2018).

TRPM4 interactúa con una gran cantidad de factores citoplasmáticos, tales como algunos nucleótidos, y proteínas que regulan su actividad y mecanismos de tráfico. Por ejemplo, se ha reportado que TRPM4 tiene un dominio de unión a nucleótidos, cuya unión a ATP interrumpe las interacciones citosólicas del tetrámero e inactiva el canal (Madej y Ziegler, 2018). TRPM4 posee un sitio único de glicosilación en el dominio de poro que está implicado en la regulación de la actividad y estabilidad del canal en la membrana (Woo y col., 2013; Syam y col., 2014). Es un canal catiónico sensible a Ca^{2+} ,

y se ha visto que la sensibilidad a este catión puede verse aumentada tras la unión de CaM, PIP₂ y Ca²⁺, e incluso por fosforilaciones dependiente de PKC en la serina 1145 y 1152, componentes celulares que también interaccionan con TRPC3 (Nilius y col., 2005; Nilius y col., 2006; Winkler y col., 2017; Lichtenegger y Groschner, 2014). Por otra parte, TRPM4 interacciona con la proteína 14-3-3γ, regulando la expresión en superficie del canal, y datos de espectrometría de masa sugieren que TRPC3 también interacciona con esta proteína relacionada con la entrada y señalización de Ca²⁺ (Cho y col., 2014; Lockwich y col., 2008).

En nuestro laboratorio, se demostró que TRPM4 interacciona con las proteínas *End Binding*, las cuales gobiernan el tráfico desde el retículo endoplasmático al Aparato de Golgi, y de este a la membrana plasmática, proceso por el cual el canal alcanzaría su maduración (Blanco y col., en preparación). Estas proteínas se localizan en el cono de crecimiento positivo de los microtúbulos facilitando las interacciones de los microtúbulos con varias macromoléculas y organelos (Akhmanova y Steinmetz 2008). TRPM4 posee el 'motivo SWIP' en su dominio N terminal, entre los aminoácidos 9 y 12, y se ha demostrado que es necesario para la unión con las proteínas EBs. Este motivo consenso está flanqueado por aminoácidos básicos que estabilizan la interacción con las proteínas EBs, y la delección de este motivo o una doble sustitución puntual de los aminoácidos isoleucina y prolina por asparragina, cambia el patrón de migración electroforética relativo al grado de glicosilación del canal, su localización y disminuye su expresión en la superficie celular, afectando también a la maduración del canal (figura 4) (Blanco y col., en preparación; Honnappa y col., 2009; Kumar y Wittmann 2012). De este modo, la interacción entre TRPM4 y TRPC3 podría estar involucrando un mecanismo de tráfico que incluya a las proteínas EBs a través de la interacción con TRPM4.

7.3. Co-tráfico de TRPM4 y TRPC3

Debido a que TRPM4 y TRPC3 interactúan directamente, y que el tráfico anterógrado de TRPM4 es regulado por su interacción con las proteínas EBs, se evaluó la localización celular de TRPC3 al ser coexpresado con TRPM4^{WT} y la mutante de tráfico TRPM4^{ΔSWIP}, con la hipótesis de que el correcto tráfico de TRPC3 podría cambiar la localización de TRPM4^{ΔSWIP}, de forma análoga a observaciones realizadas en estudios de tráfico de receptores heteroméricos (Hofmann y col., 2002). Sin embargo, se encontró que TRPC3 no cambió el patrón de fluorescencia de TRPM4^{ΔSWIP}, si no que, por el contrario, TRPC3 quedaba retenido en el retículo endoplasmático de manera similar a la mutante de tráfico de TRPM4, probablemente a través de la formación de multímeros mixtos.

Para evitar la dependencia del criterio del usuario en la elección de imágenes representativas que proporcionan evidencia cualitativa de los efectos anteriormente mencionados, se realizó estudios de colocalización utilizando histogramas. Si bien el indicador de colocalización más utilizado es el coeficiente de Pearson, se debe considerar que esta medida asume que las intensidades de las señales que se están comparando son similares, lo que puede producir resultados erróneos. De este modo, el coeficiente de Pearson estima la correlación general entre las intensidades de las señales a evaluar en regiones de interés, sin discriminar los píxeles que se superponen entre las señales a comparar, de los que no se superponen. Así, si el número de píxeles que no se superponen es mayor que el número de píxeles superpuestos, la correlación se distorsiona por la variación en la intensidad de los píxeles no superpuestos (Pike y col., 2017). Los coeficientes de Manders son una medida de co-ocurrencia que es

insensible a la correlación de las intensidades de las señales a evaluar, por lo tanto, la cuantificación de la co-ocurrencia es una proporción de los píxeles superpuestos con respecto al número total de píxeles (Pike y col., 2017). De este modo, la co-ocurrencia de las señales aisladas de los fluoróforos a través de los coeficientes de Manders (M1 y M2), que representan la superposición de las señales en verde con respecto a las señales en rojo (M1) y la superposición de las señales en rojo con respecto a las señales en verde (M2), dio como resultado un alto grado de co-ocurrencia de la señal aislada de TRPC3 y TRPC5 con la señal aislada de TRPM4^{WT}, probablemente porque todas son proteínas que se localizan y ejercen su función principalmente en la membrana plasmática. Sin embargo, al superponer las señales aisladas de TRPC3 o TRPC5 con la señal aislada de TRPM4^{ΔSWIP}, disminuye la co-ocurrencia para TRPC5 y no para TRPC3, lo que indica que TRPC3 se colocaliza con TRPM4^{ΔSWIP} principalmente en el retículo endoplasmático a través de su interacción directa, y que TRPC5 no es retenido ni altera el patrón de fluorescencia de TRPM4^{ΔSWIP}, debido a que posee un mecanismo de tráfico diferente y porque probablemente no interactúa con TRPM4, aunque esto no ha sido evaluado aún.

Se ha visto que TRPC5 interacciona con estatmina 2 para su transporte en vesículas, que están dirigidas a conos de crecimiento de los microtubulos, y que TRPC5 asociado a estatmina puede estar contenido en un complejo que contiene proteínas de vesículas sinápticas como VAMP2 y sinaptotagmina (Eder y col., 2007). Por otro lado, TRPC3 trafica hacia la membrana en vesículas que contienen VAMP2 y proteínas SNARE, como α SNAP, y se ha visto que proteínas de la familia Rab GTPasas podrían estar involucradas en el tráfico de este canal de manera similar a TRPC6 (Cayouette y col., 2010). Similar a TRPC5, se ha demostrado que el canal TRPC3 se localiza en una

población de vesículas móviles cercanas a la membrana plasmática, desde las cuales es enviado a la superficie celular mediante estimulación por agonistas (Eder y col., 2007). De este modo, los datos obtenidos sugieren que el correcto tráfico de TRPC3 y TRPC5 no restaura el tráfico de la mutante TRPM4^{ΔSWIP}, y que la retención en RE de TRPC3 y no de TRPC5, involucran un nuevo mecanismo de tráfico para TRPC3 mediante su interacción física con TRPM4. Para corroborar esta observación, se realizó un ensayo de sincronización del tráfico utilizando el sistema RUSH, que se basa en la interacción de una proteína gancho que se encuentra fusionada a un núcleo de estreptavidina anclada de manera estable en el retículo endoplasmático, y una proteína cebo, en este caso el canal TRPM4, fusionado al péptido SBP, que se une al núcleo de estreptavidina de manera reversible. Al añadir D-biotina, TRPM4-SBP es liberado del compartimento donante, y trafica hacia el compartimento de destino, en este caso la membrana plasmática (Boncompain y col., 2012). Se observó que, sin incubar con D-biotina, tanto TRPM4-SBP como TRPC3 quedaban atrapados en el compartimento donante, y luego de 1 hrs de añadida la biotina, se vio que ambos canales se localizaban principalmente en el citoplasma y en la membrana de la célula. Para profundizar sobre el efecto de retención en el retículo de TRPC3 al ser coexpresado con TRPM4^{ΔSWIP}, se realizó un ensayo de biotilación de proteínas de superficie y se observó que efectivamente TRPC3 redujo significativamente su expresión en membrana. Estos resultados indican que TRPM4 y TRPC3 co-trafican en vesículas transportadas por las proteínas EBs que gobiernan el tráfico anterógrado de TRPM4, a través de su heteromultimerización, lo que sugiere un nuevo mecanismo de tráfico para TRPC3, como muestra el modelo propuesto en la figura 9.

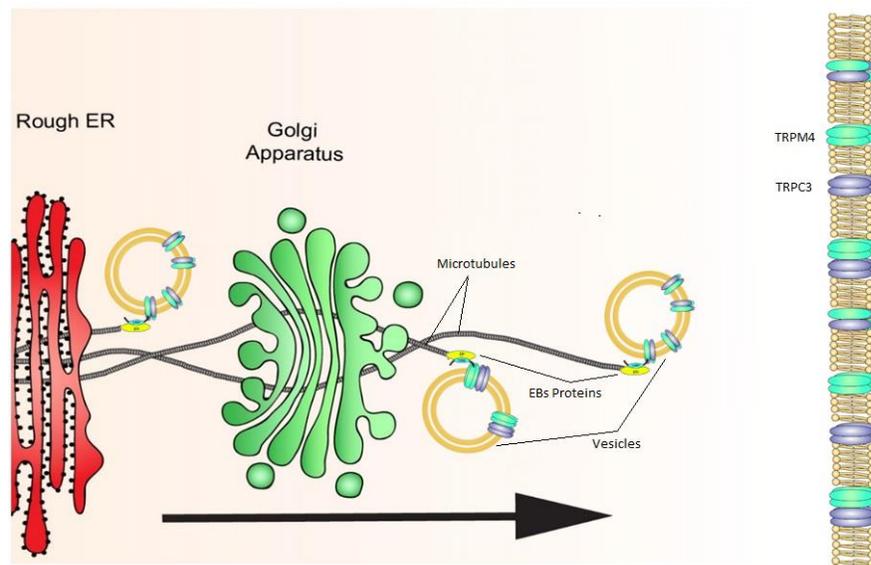


Figura 9: Modelo del nuevo mecanismo de tráfico de TRPC3.

Las vesículas que contienen TRPM4 y TRPC3 se forman en el retículo endoplasmático, y son llevadas hacia la membrana plasmática a través del extremo de crecimiento de los microtúbulos. Esto ocurre a través de la interacción de TRPC3 con TRPM4 el cual interactúa con las proteínas EBs a través del motivo SWIP presente en su dominio N terminal.

Las proteínas EBs median el correcto tráfico de diferentes proteínas involucradas en las señalizaciones de Ca^{2+} . Por ejemplo, EB1 interactúa con STIM1, una proteína transmembrana del retículo endoplasmático que es esencial para SOCE, a través de su interacción con el canal Orai1 ubicado en la membrana plasmática (Grigoriev y col., 2008). En células endoteliales, EB3 interactúa con los receptores de IP_3 , que se ha visto que también interactúa con TRPC3, regulando su *clustering* y señalización de Ca^{2+} a la estimulación con α -trombina (Lichtenegger y Groschner, 2014; Geyer y col., 2015). De este modo, las vesículas transportadas a través de las proteínas EBs por su interacción con TRPM4, podrían contener el canal TRPC3. Sin embargo,

esto fue estudiado en modelos de expresión heteróloga y aún no se ha evaluado la interacción entre TRPM4 y TRPC3 en células que coexpresan endógenamente estos canales iónicos. Por otro lado, aún queda por evaluar y caracterizar la formación de un canal heteromérico entre TRPM4 y TRPC3, el cual podría tener propiedades biofísicas diferentes a los canales homoméricos, dadas las diferencias estructurales entre estos dos miembros de diferentes subfamilias de canales TRP.

7.4. Relevancia fisiológica de la interacción TRPM4-TRPC3

En los últimos años han salido a la luz diferentes publicaciones que relacionan directamente a los canales TRPM4 y TRPC3. Se ha visto que TRPM4 y TRPC3 se coexpresan en una amplia variedad de tejidos, tales como cerebro, corazón, músculo liso vascular y tracto gastrointestinal). Además, están involucrados en la función en diversos tipos celulares del sistema cardiaco y neuronal (Launay y col., 2002; Guinamard y col., 2010; Ben-Mabrouk y Tryba, 2010). De hecho, más recientemente se encontró que ambos canales se encuentran altamente expresados en las neuronas inspiratorias excitatorias del complejo preBötzinger (preBötC) y contribuyen críticamente a la formación de patrones motores respiratorios en circuitos del tronco encefálico de roedores (Dorst, 2017; Koizumi y col., 2018). Sin embargo, y a pesar de que estos canales pueden estar involucrados funcionalmente en múltiples niveles dentro de los circuitos respiratorios centrales, aún queda por determinar el mecanismo de acople entre las actividades de TRPM4 y TRPC3, y la posible contribución de su heteroasociación. Otros estudios sugieren que TRPM4 es un efector de la señalización de receptores asociados a proteína G en la regulación miogénica de la contractilidad vascular, del mismo modo en que TRPC3 media la despolarización inducida por el receptor de piridina

en arterias piales (Li y col., 2014). Además, en patologías como la hipertensión, TRPM4 y TRPC3 se encuentran más expresados en modelos de células hipertensivas en comparación con células normotensivas (Álvarez-Miguel y col., 2017; Guinamard y col., 2006). Sin embargo, su acomplamiento funcional o la contribución de su heteroasociación en tejido cardiovascular aún permanece sin estudiar. Juntos, estos datos revelan la importancia del estudio del acoplamiento funcional de las actividades de estos canales iónicos, y la posible significancia fisiológica de su heteroasociación, de modo que hay muchas preguntas abiertas sobre cómo las señales son sensadas y transducidas, y cómo estos heterocomplejos de canales TRP cooperativamente participan en la señalización celular (Madej y Ziegler, 2018).

En los últimos años, los estudios de heteroasociación entre miembros de la superfamilia TRP han arrojado información importante sobre su funcionalidad e importancia fisiológica. Se demostró que la heteroasociación entre TRPV4 y TRPC1 en los tejidos vasculares es importante para SOCE endotelial y posterior relajación vascular (Ma y col., 2010; Ma y col., 2011). También se ha visto que TNF α induce el cotráfico de TRPV1 y TRPA1 en neuronas sensoriales, y su importancia en la hiper-excitabilidad asociada con la estimulación inflamatoria / dolorosa (Meng y col., 2016). De este modo, aún queda por evaluar si TRPM4 y TRPC3 interaccionan en modelos celulares que coexpresen ambos canales de manera endógena, y si comparten el mecanismo de tráfico descrito. También serán necesarios estudios funcionales que evalúen la importancia fisiológica o patológica de la interacción entre TRPM4 y TRPC3.

CONCLUSIONES

Los resultados que fueron presentados en este trabajo permiten concluir que:

- TRPM4 interacciona con TRPC3 en modelos de expresión heteróloga, validando dicha interacción.
- TRPC3 co-trafega con TRPM4 a través de su interacción, mediante la unión de TRPM4 a las proteínas EBs].
- La delección del 'motivo SWIP' de TRPM4 afecta la localización y disminuye expresión en membrana de TRPC3 en modelos de expresión heteróloga que coexpresan ambos canales.
- La delección del 'motivo SWIP' de TRPM4 no afecta el grado de glicosilación de TRPC3 en modelos de expresión que coexpresan ambos canales.

PROYECCIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se propone:

- Evaluar la interacción entre TRPM4 y TRPC3 en modelos que coexpresan endógenamente ambos canales.
- Determinar el mecanismo de heteroasociación entre TRPM4 y TRPC3.
- Evaluar el co-tráfico de TRPM4 y TRPC3 en modelos de que coexpresan endógenamente ambos canales.

BIBLIOGRAFÍA

Armisen, R., Marcelain, K., Simon, F., Tapia, J. C., Toro, J., Quest, A. F. y Stutzin, A. 2011. TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway. *J Cell Physiol.* 226(1): 103-109.

Akhmanova, A. y Steinmetz, MO. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 309-322.

Álvarez-Miguel I, Ciudad P, Pérez-García MT, López-López JR. 2017. Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol*; 595 (5) :1497 - 1513.

Ambudkar, I.S. 2007. Trafficking of TRP Channels: Determinants of channel function. *HEP*, 179:541 – 557.

Armisen, R., Marcelain, K., Simon, F., Tapia, J. C., Toro, J., Quest, A. F. y Stutzin, A. 2011. TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway. *J Cell Physiol.* 226(1): 103-109.

Autzen HE., Myasnikov AG., Campbell MG., Asarnow D., Julius D. y Cheng Y. 2017. Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc. *Science.* 12; 359(6372):228-232.

Banik, D., Martin LE., Freichel, M., Torregrossa, AM. and Medler KF. 2018. TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23; 115(4): E772 - E781.

Barbet, G., Demion, M., Moura, I. C., Serafini, N., Léger, T., Vrtovsnik, F. y Launay, P. 2008. The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat Immunol.* 9(10): 1148-1156.

Becker, E., Oliver, L., Glitsch, D., Banks G, Achilli, G., Hardy, A., Nolan, P., Fisher, E., and Davies, K. 2009. A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106(16):6706-11.

Ben-Mabrouk, F. and Tryba, A. 2010. Substance P modulation of TRPC3/7 channels improves respiratory rhythm regularity and ICAN-dependent pacemaker activity. *Eur J Neurosci.* 31(7): 1219-1232.

Birnbaumer, L. 2009. The TRPC Class of Ion Channels: A Critical Review of Their Roles in Slow, Sustained Increases in Intracellular Ca²⁺ Concentrations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 49: 395-426.

Birnbaumer y Motohiro Nishida. 2017. TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex leading to attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice. *Scientific reports*; 7: 7511.

Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., de Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G. and Perez, F. 2012. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods.* 9(5): 493-8.

Cáceres, M., Ortiz, L., Recabarren, T., Romero, A., Colombo, A., Leiva-Salcedo, E., Varela, D., Rivas, J., Silva, I., Morales, D., Campusano, C., Almarza, O., Simon, F., Toledo, H., Park, K. S., Trimmer, J. S. y Cerda O. 2015. TRPM4 Is a Novel Component of the Adhesome Required for Focal Adhesion Disassembly, Migration and Contractility. *PLoS One* 10(6): e0130540.

Cayouette, S. and Boulay, G. 2007. Intracellular trafficking of TRP channels. *Cell Calcium* 42: 225–232.

Cayouette, S., Bousquet, S., Francoeur, N., Dupré, É., Monet, M., Gagnon, H., Guedri, Y., Lavoie, C. and Boulay, G. 2010. Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *BBAMCR*, Volume 1803, Issue 7, Pages 805-812.

Cerda, O., Cáceres, M., Park, K. S., Leiva-Salcedo, E., Romero, A., Varela, D., Trimmer, J. y Stutzin, A. 2015. Casein kinase-mediated phosphorylation of serine 839 is necessary for basolateral localization of the Ca²⁺-activated non-selective cation channel TRPM4. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 467(8): 1723-1732.

Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S. A., Stokes, A. J., Kinet, J. P. y Penner, R. 2007. TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium.* 41(1): 51-61.

Cho, C. H., Kim, E., Lee, Y. S., Yarishkin, O., Yoo, J. C., Park, J. Y., Hong, S.H. y Hwang, E. M. 2014. Depletion of 14-3-3 γ reduces the surface expression of Transient Receptor Potential Melastatin 4b (TRPM4b) Channels and attenuates TRPM4b-mediated glutamate-induced neuronal cell death. *Molecular brain*. 7(1): 1.

Chrétien, C., Fenech, C., Liénard, F., Grall, S., Chevalier, C., Chaudy, S., Brenachot, X., Berges, R. ... and Fioramonti, X. 2016. Transient Receptor Potential Canonical 3 (TRPC3) Channels Are Required for Hypothalamic Glucose Detection and Energy Homeostasis. *American Diabetes Association. Diabetes* vol. 66. 314 – 324.

Crnich, R., Amberg, G. C., Leo, M. D., Gonzales, A. L., Tamkun, M. M., Jaggar, J. H. y Earley, S. 2010. Vasoconstriction resulting from dynamic membrane trafficking of TRPM4 in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 299(3), C682–C694.

Damian B. van Rossum, Randen L. Patterson, Sumit Sharma, Roxanne K. Barrow, Michael Kornberg, Donald L. Gill y Solomon H. Snyder. 2005. Phospholipase C γ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *NATURE*, VOL. 434, 99–104.

Dietrich, A. Mederos, M. and Schnitzler, Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T. y Gudermann, T. 2003. N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 47842 – 47852.

Doleschal, B., Primessnig, U., Wölkart, G., Wolf, S., Scherthaner, M., Lichtenegger, M., Glasnov, TN., Kappe, CO., Mayer, B., Antoons, G., Heinzl, F., Poteser, M. y Groschner, K. 2015. TRPC3 contributes to regulation of cardiac contractility and arrhythmogenesis by dynamic interaction with NCX1. *Cardiovascular Research*. 106, 163–173.

Dorst, K. 2017. The neural basis of breathing rhythm: TRPM4 and TRPC3 ion channels contribute to inspiratory burst generation in Dbx1-derived interneurons of the preBötzing Complex in mice. *UHT*. 1040.

Duan J., Li Z., Li J., Santa-Cruz A., Sanchez-Martinez S., Zhang J. y Clapham D. 2018. Structure of full-length human TRPM4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 115(10): 2377–2382.

Earley, S., Waldron, B.J. y Brayden, J.E. 2004. Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res.* 95(9): 922-929.

Echeverría, C., Montorfano, I., Cabello-Verrugio, C., Armisen, R., Varela, D. y Simón, F. 2015. Suppression of transient receptor potential melastatin 4 expression promotes conversion of endothelial cells into fibroblasts via transforming growth factor/activin receptor-like kinase 5 pathway. *Journal of hypertension.* 33(5): 981-992.

Eder, P., Schindl, R., Romanin, C., et al. 2007. Protein–Protein Interactions in TRPC Channel Complexes. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* Chapter 24.

Fan, C, Choi, W., Du, J., Lü, W. 2018. Structure of the human lipid-sensitive cation channel TRPC3. *eLife*; volumen 7: e36852.

Gaëlle Boncompain, Severine Divoux, Nelly Gareil, Helene de Forges, Aurianne Lescure, Lynda Latreche, Valentina Mercanti, Florence Jollivet, Graça Raposo y Franck Perez. 2012. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nature Methods*, volume 9, NO. 5, pp. 493 – 498.

Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., Voets, T. 2012. TRP channels. *Compr. Physiol.* 2 563–608.

Gees, M., Colsoul, B. y Nilius, B. 2010. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol. Rev.* 2(10): a003962.

Gerzanich V, Kwon MS, Woo SK, Ivanov A y Simard JM. 2018. SUR1-TRPM4 channel activation and phasic secretion of MMP-9 induced by tPA in brain endothelial cells. *PLoS ONE*; 13(4): e0195526.

Geyer, M., Huang, F., Sun, Y., Vogel, S. M., Malik, A. B., Taylor, C. W. y Komarova, Y. A. 2015. Microtubule-Associated Protein EB3 Regulates IP3 Receptor Clustering and Ca²⁺ Signaling in Endothelial Cells. *Cell reports.* 12 (1): 79-89.

Grigoriev, I., Gouveia, S. M., Van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S. y Akhmanova, A. 2008. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current biology: CB.* 18(3): 177-182.

González-Cobos, J.C., and Trebak, M. 2010. TRPC channels in smooth muscle cells. *Front Biosci-Landmark* 15, 1023-1039.

Guo J, She J, Zeng W, Chen Q, Bai XC, Jiang Y. 2017. Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4. *Nature* 552:205–209.

Guinamard, R., Demion, M., Magaud, C., Potreau, D. y Bois, P. 2006. Functional expression of the TRPM4 cationic current in ventricular cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 48: 587–594.

Guinamard R., Demion M. y Launay P. 2010. Physiological roles of the TRPM4 channel extracted from background currents. *Physiology (Bethesda)*. Rev. 25(3): 155-164.

Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Vol 57. *Classical Biophysics of the squid giant axon*. pp 25-60. Sinauer Associates, Sunderland, MA, EEUU.

Hofmann, T., Schaefer, M. Schultz, G. and Gudermann, T. 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *PNAS* May 28, 2002. 99 (11) 7461-7466.

Holzmann, C., Kappel, S., Kilch, T., Jochum, M. M., Urban, S. K., Jung, V. y Peinelt, C. 2015. Transient receptor potential melastatin 4 channel contributes to migration of androgen-insensitive prostate cancer cells. *Oncotarget*. 6(39): 41783-41793.

Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H. y Jelesarov, I. 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell*. 138(2): 366-376.

Ishise, H., Larson, B., Hirata, Y., Fujiwara, T., Nishimoto, S., Kubo, T., Matsuda, K., Kanazawa, S., Sotsuka, Y., Fujita, K., Kakibuchi, M. and Kawai, K. 2017. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFκB activation. *Sci Rep*; 5:11620.

Kim MS, Hong JH, Li Q, Shin DM, Abramowitz J, Birnbaumer L y Muallem S. 2009. Deletion of TRPC3 in Mice Reduces Store-Operated Ca Influx and the Severity of Acute Pancreatitis, *Gastroenterology*, Volume 137, Issue 4.

Kim MS, Lee KP, Yang D, Shin DM, Abramowitz J, Kiyonaka S, Birnbaumer L, Mori Y y Muallem S. 2011. Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Ca Influx Channel TRPC3 Protects Secretory Epithelia from Ca-Dependent Toxicity, *Gastroenterology*, Volume 140, Issue 7, Pages 2107-2115.

Koizumi, H., John, T. T., Chia, J. X., Tariq, M. F., Phillips, R. S., Mosher, B., Chen, Y., Thompson, R., Zhang, R., Koshiya, N., ... Smith, J. C. 2018. Transient Receptor Potential Channels TRPM4 and TRPC3 Critically Contribute to Respiratory Motor Pattern Formation but not Rhythmogenesis in Rodent Brainstem Circuits. *eNeuro*, 5(1), ENEURO.0332-17.2018. doi:10.1523/ENEURO.0332-17.

Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G. y Pongs, O. 2009. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest*. **119**(9): 2737-2744.

Kumar, P. y Wittmann T. 2012. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends in cell biology*. Rev. **22**(8): 418-428.

Lai, H. and Jan, L. 2006. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*; Vol. 7: 548-62.

Letavernier, E., Rodenas, A., Guerrot, D. and Haymann, JP. 2012. Williams-Beuren Syndrome Hypercalcemia: Is TRPC3 a Novel Mediator in Calcium Homeostasis?. *PEDIATRICS* Vol. 129 No. 6. 0031-4005.

Lepage P. and Boulay G. 2007. Molecular determinants of TRP channel assembly. *Biochemical Society Transactions*. Volume 35, part 1.

Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., y Kinet, J. P. 2002. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109(3), 397-407.

Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A. y Kinet, J. P. 2004. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*. 306(5700): 1374-1377.

Lichtenegger, M. and Groschner, K. 2014. TRPC3: a multifunctional signaling molecule. *Handb Exp Pharmacol*; 222:67-84.

Lingwei Wang, Jie Li, Jian Zhang, Qi He, Xuanwen Weng, Yanmei Huang, Minjie Guan, Chen Qiu. 2017. Inhibition of TRPC3 downregulates airway hyperresponsiveness, remodeling of OVA-sensitized mouse, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 484, Issue 1, Pages 209-217.

Liu, H., Chatel, S., Simard, C., Syam, N., Salle, L., Probst, V. y Schott, J. 2013. Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel. *PLoS One*. 8 (1): e54131.

Lockwich, T., Pant, J., Makusky, A., Jankowska-Stephens, E., Kowalak, J. A., Markey, S. P., and Ambudkar, I. S. 2008. Analysis of TRPC3-Interacting Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 7(3), 979–989.

Ma, X., Qiu, S., Luo, JH., Ma, Y., Ngai, CY., Shen, B., Wong, CO., Huang, Y. and Yao, XQ. 2010. Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca²⁺ influx. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:851–858.

Ma, X., Cheng, KT., Wong, CO., O'Neil, RG., Birnbaumer, L., Ambudkar, I. S. and Yao, X. 2011. Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca(2+) entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium*. 50(6): 502-9.

Madej G. and Ziegler C. 2018. Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*; 470:213–225.

Meng, J., Wang, J., Steinhoff, M. and Dolly, J. 2016. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Scientific Reports*; 6:21226.

Mulier M., Vriens J., Voets T. 2017. TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium*. Vol 66. pp 19-24.

Murakami, M., Xu, F., Miyoshi, I., Sato, E., Ono, K. y Iijima, T. 2003. Identification and characterization of the murine TRPM4 channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 307: 522–528.

Narayan, G., Bourdon, V., Chaganti, S., Arias-Pulido, H., Nandula, S. V., Rao, P. H. y Mansukhani, M. 2007. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes, chromosomes y cancer*. **46**(4): 373-384.

Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U. y Flockerzi, V. 2003. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 30813–30820.

Nilius, B., Prenen, J., Tang, J., Wang, C., Owsianik, G., Janssens, A., ... and Zhu, M. X. 2005. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(8), 6423-6433.

Nilius, B., y Owsianik, G. 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology. Rev.* **12**(3): 218.

Oda, K., Umemura, M., Nakakaji, R., Tanaka, R., Sato, I., Nagasako, A., Oyamada, C, Baljinnyam, E, Katsumata, M, Xie, LH, Narikawa, M, Yamaguchi, Y, Akimoto, T, Ohtake, M, Fujita, T, Yokoyama, U, Iwatsubo, K, Aihara, M y Ishikawa, Y. 2017. Transient receptor potential cation 3 channel regulates melanoma proliferation and migration. *J Physiol Sci*; **67**(4): 497 – 505.

Park, JY., Hwang, EM., Yarishkin, O., Seo, JH., Kim, E., Yoo, Jiyun., Yi, GS., Kim, DG., Park, N., Ha, C., La, Jh., Kang, D., Han, J., Oh, U. and Hong, SG. 2008. TRPM4b channel suppress store-operated Ca²⁺ entry by a novel protein-protein interaction with the TRPC3 channel. *Biochemical and Biophysical Research*. **368**: 677 – 683.

Pike, J. A., Styles, I., Rappoport, J. and Heath, J. 2017. Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *METHODS*, volume 115, Pages 42-54.

Planells-Cases, R. y Ferrer-Montiel, A. 2007. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. *Frontiers in Neuroscience*. Chapter 23.

Poteser, M., Graziani, A., Rosker, C., Eder, P., Derler, I., Kahr, H., Zhu, M., Romanin, C., and Groschner, K. 2005. TRPC3 and TRPC4 Associate to Form a Redox-sensitive Cation Channel. *The journal of biological chemistry* vol. **281**, no. 19, pp. 13588 –13595.

Rosker C, Graziani A, Lukas M, Eder P, Zhu MX, Romanin C y Groschner K. 2004. Calcium signaling by TRPC3 involves sodium entry and local coupling to the sodium/calcium exchanger. *J Biol Chem.* 2; 279(14): 13696 – 704.

Salido, GM., Jardin, I. and Rosado, J. A. 2011. The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704, pp. 413-433.

Sarmiento, D., Montorfano, I., Cerda, O., Cáceres, M., Becerra, A., Cabello-Verrugio, C., Elorza, AA., Riedel, C., Tapia, P., Velásquez, LA., Varela, D. and Simon, F. 2015. Increases in reactive oxygen species enhance vascular endothelial cell migration through a mechanism dependent on the transient receptor potential melastatin 4 ion channel. *Microvasc Res.* 98: 187 – 96.

Schaefer, M. 2005. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*; 451: 35–42.

Schattling, B., Steinbach, K., Thies, E., Kruse, M., Menigoz, A., Ufer, F. y Kneussel, M. 2012. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* **18**(12): 1805-1811.

Schilling, W. and Goel, M. 2004. Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Mammalian TRP Channels as Molecular Targets: Novartis Foundation Symposium 258.* Volume 258.

Schlingmann, K., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., and Gudermann, T. 2007. TRPM6 and TRPM7—Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* Volume 1772, Issue 8, Pages 813-821.

Schindl, R. and Romanin, C. 2007. Assembly domains in TRP channels. *Biochemical Society Transactions.* Volume 35, part 1.

Singh, B., Lockwich, T., Bandyopadhyay, B, Liu, X., Bollimuntha, S., Brazer, Sc., Combs, C., Das, S., Leenders, M., Sheng, ZH., Knepper, M., Ambudkar, S. and Ambudkar, I. S. 2006. VAMP2-Dependent Exocytosis Regulates Plasma Membrane Insertion of TRPC3 Channels and Contributes to Agonist-Stimulated calcium Influx. *Molecular Cell*, Vol. 15, 635–646.

Smedlund K., Bah M., Vazquez G. 2012. On the role of endothelial TRPC3 channels in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*; 10(3):265-74.

Syam, N., Rougier, J. S. y Abriel, H. 2014. Glycosylation of TRPM4 and TRPM5 channels: molecular determinants and functional aspects. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8:52.

Szallasi, A., Moran, M., McAlexander and M., Bíró, T. 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews. Drugs Discovery*. Volumen 10. 3456.

Taberner, F.J., Lopez-Cordoba, A., Fernandez-Ballester, G., Korchev, Y., and Ferrer-Montiel, A. 2013. Mutations in the TRP Domain Differentially affect the Function of TRPM8. *Biophys J* 104, 456a-456a.

Tang Q., Guo W., Zheng L., Wu JX., Liu M., Zhou X., Zhang X. y Chen L. 2018. Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research*, volume 28, Pages746–755.

Trebak, M. and Putney, J. 2017. ORAI Calcium Channels. *PHYSIOLOGY*, 32: 332-342.

van Rossum, DB; Patterson, RL., Sharma, S., Barrow, RK., Kornberg, M., Gill, DL. and Snyder, SH. 2005. Phospholipase Cgamma1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature*. 3;434(7029): 99-104.

Venkatachalam, K. y Montell, C. 2007. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*. Rev. 76: 387–417.

Wang, L., Li, J., Zhang, J., He, Q., Weng, X., Huang, Y., Guan, M., Qiu, C. 2017. Inhibition of TRPC3 downregulates airway hyperresponsiveness, remodeling of OVA-sensitized mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 26;484(1):209 - 217.

Weber, K. S., Hildner, K., Murphy, K. M., y Allen, P. M. 2010. Trpm4 differentially regulates Th1 and Th2 function by altering calcium signaling and NFAT localization. *Journal of Immunology*. 185(5): 2836-2846.

Winkler PA, Huang Y, Sun W, Du J, Lu W. 2017. Electron cryomicroscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature* 552: 200–204.

Woo, S. K., Kwon, M. S., Ivanov, A., Geng, Z., Gerzanich, V. y Simard, J. M. 2013. Complex N-glycosylation stabilizes surface expression of transient receptor potential melastatin 4b protein. *Journal of Biological Chemistry*. 288(51): 36409-36417.

Woo, SK., Kwon, MS., Ivanov, A., Gerzanich, V. y Simard, JM. 2013. The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) channel. *J Biol Chem*. 288: 3655–3667.

Xiao J., Zheng Y., Liao B., Wang Y. 2010. Functional role of canonical transient receptor potential 1 and canonical transient receptor potential 3 in normal and asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 17–25.

Yang, S., Cao, Q., Zhou, K., Feng, Y. and Wang, Y. 2009. Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28:1320–1328.

Yildirim E., Kawasaki, B., Birnbaumer, L. 2005. Molecular cloning of TRPC3a, an N-terminally extended, store-operated variant of the human C3 transient receptor potential channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102(9): 3307–3311.

Yu F., Yarov-Yarovoy V., Gutman G. and Catterall W. 2005. Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacological Reviews*; 57(4):387-95.

8. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



Figura suplementaria A: Diagrama del flujo de trabajo del análisis de imágenes.

El primer paso es la eliminación de datos que se realiza para reducir el ruido que se genera durante la adquisición de imágenes. Esto es seguido por la segmentación del límite celular usando la señal de los fluoróforos en membrana. Luego se realiza la substracción de *background*, seguida de una umbralización para aislar la señal en ambos canales. Finalmente se calcula las medidas de colocalización pertinentes.

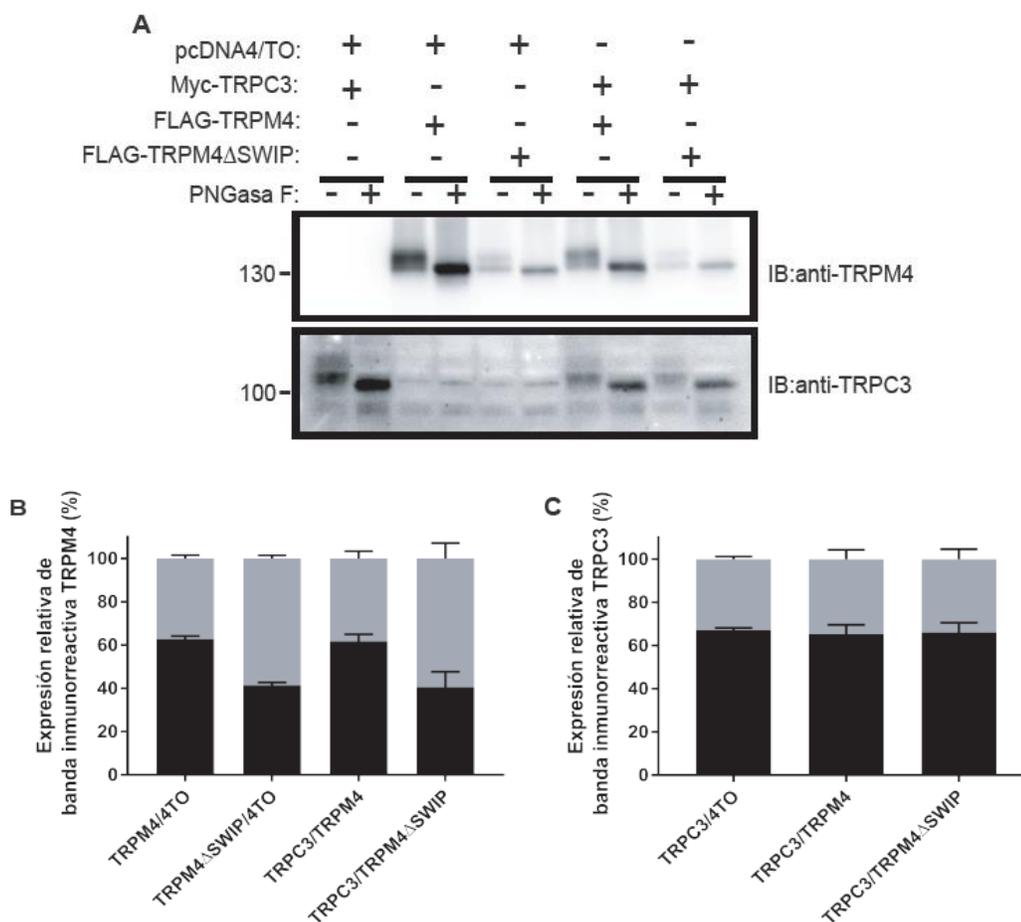


Figura suplementaria B: La delección del 'motivo SWIP' de TRPM4 no afecta la maduración de TRPC3.

Reacción de desglicosilación con la enzima Peptide-N-glycosidase F (PNGaseF). (A) Inmunoblot representativos para TRPM4 y TRPC3 en células COS-7 cotransfectadas con pcDNA4/TO, FLAG-TRPM4, FLAG-TRPM4^{ΔSWIP} y TRPC3-Myc, tratadas sin (-) y con (+) Peptide-N-glycosidase F (PNGaseF). (B) y (C) Cuantificación de la intensidad de cada banda inmunoreactiva anti-TRPM4 (B) y anti-TRPC3 (C) por densitometría.

En negro se muestra la banda de canal inmaduro, mientras que en gris se muestra canal maduro, expresados como porcentaje de la proteína total. Datos a partir de 4 experimentos independientes presentados como el promedio \pm D.E.