



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Ramón Latorre**

Centro de Estudios Científicos

Profesor Copatrocinante

**Dr. Alejandro M. Reyes**

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

**UNIÓN DEL PIP<sub>2</sub> AL TERMINAL CARBOXILO DE LOS  
CANALES TRPV1 Y TRPM8**

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

**INGRID MARISOL OYARZÚN PEÑA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, por apoyarme y transformar sus sueños en lo que son los míos. A mis verdaderos amigos, por su apoyo incondicional, por levantarme cada vez que caí, por estar cuando los necesité, especialmente a Alejandra que me acompañó hasta en el laboratorio.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en quienes encontré una segunda familia. A Eddy por su apoyo en este trabajo, y en especial a Luisita, Gerardo y Gigita quienes fueron un soporte en el abatimiento y me recordaron siempre que esto es lo que quiero y que debo luchar por ello.

A Ornar, por escucharme, darme consejos y discutir conmigo resultados. Por tenerme paciencia y quererme (no está demás).

Al Dr. Babul y su post Doc Ricardo Cabrera, quienes me ayudaron a solucionar problemas experimentales, como la purificación de proteínas.

Pero no quiero desmerecer a nadie, sin embargo, los agradecimientos especiales van dirigidos a una sola persona, a quien me acogió en su laboratorio y me permitió realizar este trabajo. A la persona que realmente me enseñó lo que es ciencia, una persona que contagia su pasión por este trabajo, y no sólo eso, sino que entrega y comparte sus conocimientos sin recelo, al Dr. Ramón Latorre. Una persona capaz de enseñar y entregar cariño. La persona que hizo revivir mis sueños, quien descubrió que lo que me gusta es hacer ciencia y me dio las facilidades para aprender a hacerla. Gracias profesor por enseñarme y apasionarme con esto. Y por seguir apoyándome hasta ahora, cuando ya terminé esta etapa. Nunca olvidaré su frase, y ojalá mis compañeros la graben en su mente como yo: *"Para hacer buena ciencia no sólo se necesita ser inteligente, sino que apasionarse y enamorarse de ella"*.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
3.1 Materiales	14
3.2 Partidores	14
3.3 Amplificación de los C-terminales mediante PCR	16
3.4 Electroforesis de DNA	17
3.5 Purificación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa	17
3.6 Subclonamiento de los fragmentos en el vector pGEM-T easy	17
3.6.1 Modificación de los fragmentos amplificados	17
3.6.2 Ligación de los productos de PCR con el vector pGEM-T easy	18
3.6.3 Preparación de células electrocompetentes DH5 $\alpha$	18
3.6.4 Transformación por electroporación	19
3.6.5 Selección de transformantes	19
3.6.6 Análisis de las transformantes	20
3.7 Digestión de los fragmentos subclonados en el vector pGEM-T easy	20
3.8 Electroforesis en geles de agarosa	22
3.9 Extracción de DNA del gel de agarosa	22
3.10 Ligación	22
3.11 Transformación en <i>Escherichia coli</i> TB1	22
3.11.1 Protocolo de preparación de células competentes TB1	22
3.11.2 Protocolo de transformación por shock térmico	23

3.12	Expresión y purificación de las proteínas en las células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	23
3.13	Electroforesis en gel SDS-PAGE	24
3.14	Western blot	24
3.15	Ensayos de unión a PIP <sub>2</sub> (Protein Lipid Overlay, PLO)	25
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	27
4.1	Construcción de las proteínas de fusión MBP-ctTRPV1 y MBP-ctTRPM8	27
4.2	Expresión de las proteínas de fusión MBP-ctTRPV1 y MBP-ctTRPM8	33
4.3	Ensayos de unión de PIP <sub>2</sub> a las proteínas de fusión	39
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	44
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	50

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> : Topología de los canales TRP	5
<b>Figura 2</b> : Termo TRPs como receptores de frío y de calor	7
<b>Figura3A</b> : Topología y secuencia aminoacídica del canal TRPV1	9
<b>Figura3B</b> : Topología y secuencia aminiacídica del canal TRPM8	10
<b>Figura 4</b> : Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR de los C-terminales de TRPV1 y TRPM8	28
<b>Figura 5</b> : Subclonamiento de los productos de amplificación en el vector pGEM-T easy	29
<b>Figura 6</b> : Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión de los vectores pGEM-T easy subclonados con los C-terminales de TRP	31
<b>Figura 7</b> : Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los carboxilos terminales clonados en el vector pMAL-c2x	32
<b>Figura 8</b> : Gel SDS-PAGE al 10% de las proteínas totales obtenidas de la inducción de las células BL21 (DE3) transformadas	34
<b>Figura 9</b> : Perfiles de elución de las proteínas de fusión	35
<b>Figura 10</b> : Geles SDS-PAGE al 10% de las fracciones eluídas con Maltosa 10mM	37
<b>Figura 11</b> : Western blot de las proteínas de fusión	38
<b>Figura 12</b> : Control positivo ensayos PLO	40
<b>Figura 13</b> : Controles negativos del ensayo de unión a PIP <sub>2</sub>	41
<b>Figura 14</b> : Ensayos de unión a PIP <sub>2</sub>	43

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>BSA</b>	seroalbúmina de bovino
<b>cDNA</b>	ácido desoxiribonucleico complementario
<b>dATP</b>	desoxi adenosin trifosfato
<b>DTT</b>	diotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilen diamino tetraacético
<b>hr</b>	hora
<b>IPTG</b>	isopropil tiogalactosido
<b>kb</b>	kilobases
<b>kDa</b>	kilo Daltons
<b>MBP</b>	proteína que une maltosa
<b>µg</b>	microgramo
<b>µM</b>	micromolar
<b>µL</b>	microlitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitros
<b>NFG</b>	factor de crecimiento neuronal
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanometros
<b>nM</b>	nanomolar
<b>OD</b>	densidad óptica
<b>pb</b>	pares de base

<b>PCR</b>	reacción de polimerasa en cadena
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidil inositol bifosfato
<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>PLO</b>	protein lipid overlay
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>seg</b>	segundo
<b>TRP</b>	receptor de potencial transitorio

## 1. RESUMEN

En mamíferos, las bases moleculares de la percepción de temperatura se encuentran en canales de iones llamados receptores de potencial transitorio (TRP), presentes principalmente en neuronas sensoriales primarias o nociceptores.

Estudios previos sugieren que los dominios C-terminal de TRPV1 (receptor vanilloide de calor, con umbral a 43°C) y TRPM8 (receptor de mentol y frío con umbral a 15°C), son estructuras críticas para la función del canal, la cual estaría determinada por componentes intracelulares. Particularmente, el fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) es un importante modulador de los canales termo-TRP, activa a TRPM8 e inhibe a TRPV1. En el dominio C-terminal de ambos canales existe un sitio conservado que supuestamente intervendría en la activación del canal mediada por PIP<sub>2</sub>. Sin embargo, aún queda por demostrar la unión directa de PIP<sub>2</sub> a los C-terminales de ambos canales.

En nuestro laboratorio, generamos proteínas de fusión entre los C-terminales y MBP (Maltose Binding Protein), las purificamos por cromatografía de afinidad y finalmente, realizamos ensayos de unión a PIP<sub>2</sub> de acuerdo al protocolo de Simon Dowler. Demostramos analíticamente que TRPM8 como TRPV1 unen a PIP<sub>2</sub> en su extremo carboxilo terminal.

## SUMMARY

In mammals, the molecular bases of temperature perception reside in Transient Receptors Potential (TRP) ion channels, which are located mainly on primary sensory neurons called nociceptors.

Previous studies suggest that C-terminals of TRPV1 (vanilloid heat receptor with a threshold around 43°C) and TRPM8 (menthol and cold receptor with a threshold around 15°C) are critical structures for channel function. In particular, phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) is an important modulator of thermo-TRPs, it activates TRPM8 and inhibits TRPV1. At the C-terminal domain of both channels there is a conserved motif involved in PIP<sub>2</sub> channel activation. However, the direct PIP<sub>2</sub> binding to the C-terminals of both channels have not been demonstrated yet.

In our laboratory, we cloned and purified fusion proteins consisting of the TRPM8 and TRPV1 C-terminals in tandem with a Maltose Binding Protein (MBP). The proteins were purified using affinity chromatography. PIP<sub>2</sub> binding assays were performed using the Simon Dowler's protocol. This methodology allowed us to asses analytically the PIP<sub>2</sub> binding to carboxy-terminals of both TRPM8 and TRPV1.

## 2. INTRODUCCIÓN

La capacidad de sentir la temperatura del entorno y la interna son necesarias para sobrevivir, manteniendo la homeostasis y evitando que temperaturas nocivas dañen el tejido. En vertebrados, la temperatura es detectada en el extremo de neuronas sensoriales que se proyectan a la piel (Smith CUM., 2000), en donde se encuentran las bases moleculares fundamentales de la percepción de temperatura, canales de iones (Julius and Basbaum, 2001; Patapoutian et al., 2003). Las neuronas termosensibles se pueden dividir en dos clases: termosensores inocuos (cálido o fresco) y termonociceptores (calientes o frío).

La identificación, clonación y caracterización de los *receptores de potencial transitorio* (TRP), activados por temperatura o también llamados termosensibles (Termo-TRP) (Moran et al., 2004), permitieron un avance en el entendimiento de la iniciación de la transducción de la señal de sensación termal, siendo capaces de detectar distintos rangos de temperatura. Notablemente, la activación por calor o frío corresponde a entidades moleculares diferentes.

Los TRP deben su nombre a un mutante en *Drosophila* del proceso de fototransducción. En experimentos con células de omatidios, en el cual se midió la respuesta eléctrica a un estímulo de luz brillante, esta mutante genera una respuesta transitoria en lugar de una respuesta sostenida, como la observada en moscas silvestres (Montell and Rubin, 1989). Con la identificación del gen de este canal en *Drosophila* comenzó la búsqueda de homólogos en vertebrados, llevando al descubrimiento

de aproximadamente 30 miembros, los que forman la superfamilia de canales TRP, los cuales participan en la detección de diferentes estímulos físicos y químicos (Birbaumer L et al., 2003; Pedersen SF et al., 2005; Voets T et al., 2005; Voets T et al., 2004). En mamíferos, basados en la homología de la secuencia primaria de aminoácidos, pueden ser divididos en 6 subfamilias: TRPC (*canónico*), TRPM (*melastatina*), TRPV (*vanilloide*), TRPA (*ankirina*), TRPP (*policistina*) y TRPML (*mucolipina*) (Clapham, 2003; Montell et al., 2002a; Montell et al., 2002b).

Los TRP son canales catiónicos que se ensamblan como homo o heterotetrámeros. La topología de estos canales los relaciona a la superfamilia de canales activados por voltaje (Figura 1), caracterizados por poseer 6 segmentos transmembrana (S1-S6), con sus regiones amino y carboxilo terminales citoplasmáticas, una región entre los segmentos S5 y S6 que forma parte del poro acuoso del canal y un sensor de voltaje, presente en el segmento S4 en aquellos canales activados por voltaje, pero que hasta el momento no ha sido corroborado experimentalmente para los canales TRP. Funcionalmente, pueden ser clasificados como canales catiónicos no selectivos, mostrando una amplia diversidad en cuanto a permeabilidad de iones, siendo algunos altamente selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales TRP son ampliamente expresados, tanto en el sistema nervioso como en células no excitables (células endoteliales, epiteliales), por lo que están involucrados en múltiples funciones sensoriales como: visión, tacto, olfato, audición, unión de feromonas, mecanosensación y termosensación. Algunos son activados directamente por el estímulo sensorial, mientras que otros son activados por una variedad de segundos mensajeros.

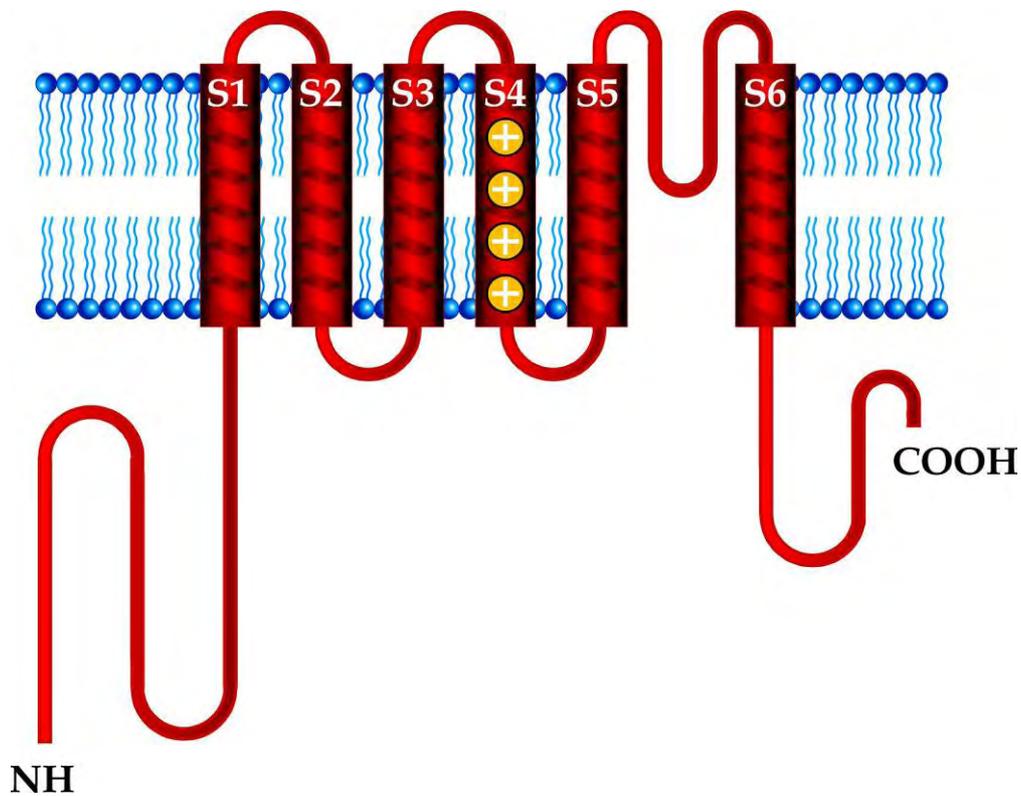


Figura 1. **Estructura de los canales TRP.** Formados por seis segmentos transmembrana (S1-S6), con los extremos amino y carboxilo terminales intracelulares. Con una región formadora del poro de conducción entre los segmentos S5 y S6. Un sensor de voltaje propuesto en torno al segmento S4.

Un grupo de nueve canales, de todos los que forman la superfamilia TRP conocidos, son sensibles a temperatura, debido a esta característica se les denomina “Termo-TRPs”. Estos nueve Termo-TRPs son activados por diferentes umbrales de temperatura que van desde calor nocivo hasta frío nocivo. TRPV1 es activado a  $>42^{\circ}\text{C}$ , TRPV2 a  $>52^{\circ}\text{C}$ , TRPV3 a  $>33^{\circ}\text{C}$ , TRPV4 entre  $27$  y  $42^{\circ}\text{C}$ , TRPM2 entre  $35$  y  $42^{\circ}\text{C}$ , TRPM4 y TRPM5 entre  $15$  y  $35^{\circ}\text{C}$ , TRPM8 a  $<25^{\circ}\text{C}$ , y TRPA1 a  $<17^{\circ}\text{C}$ , cuando son sobreexpresados en cultivos celulares o en ovocitos de *Xenopus*. Otra característica de los Termo-TRPs es que también pueden ser activados por compuestos derivados de plantas, como también de compuestos endógenos y sintéticos (Voets T et al., 2005) (Fig. 2).

El estudio de los canales termosensibles se inició en 1997, con los trabajos de David Julius y colaboradores (Caterina et al., 1997). Sus trabajos se centraron en identificar el receptor molecular que une a la capsaicina, el compuesto activo del ají, el receptor vanilloide (VR1), verificando a continuación, que este receptor puede ser igualmente activado a altas temperaturas ( $43^{\circ}\text{C}$ ), siendo rebautizado como TRPV1. En el 2002, el grupo de Julius demostró que los receptores activados por mentol son los mismos que se activan a una temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ , llamándolos receptores de frío y mentol (CMR1, también llamados TRPM8) (McKemy et al., 2002b). Simultáneamente, este canal fue clonado por el grupo de Patapoutian (Peier et al., 2002).

Para ambos canales, TRPV1 y TRPM8, numerosos estudios sugieren que sus dominios C-terminal (Fig. 3) son estructuras críticas para su función, la cual estaría modulada por componentes intracelulares. Estudios del C-terminal de TRPV1 (3A) han demostrado que contiene varios sitios de fosforilación para proteínas quinasas C y A

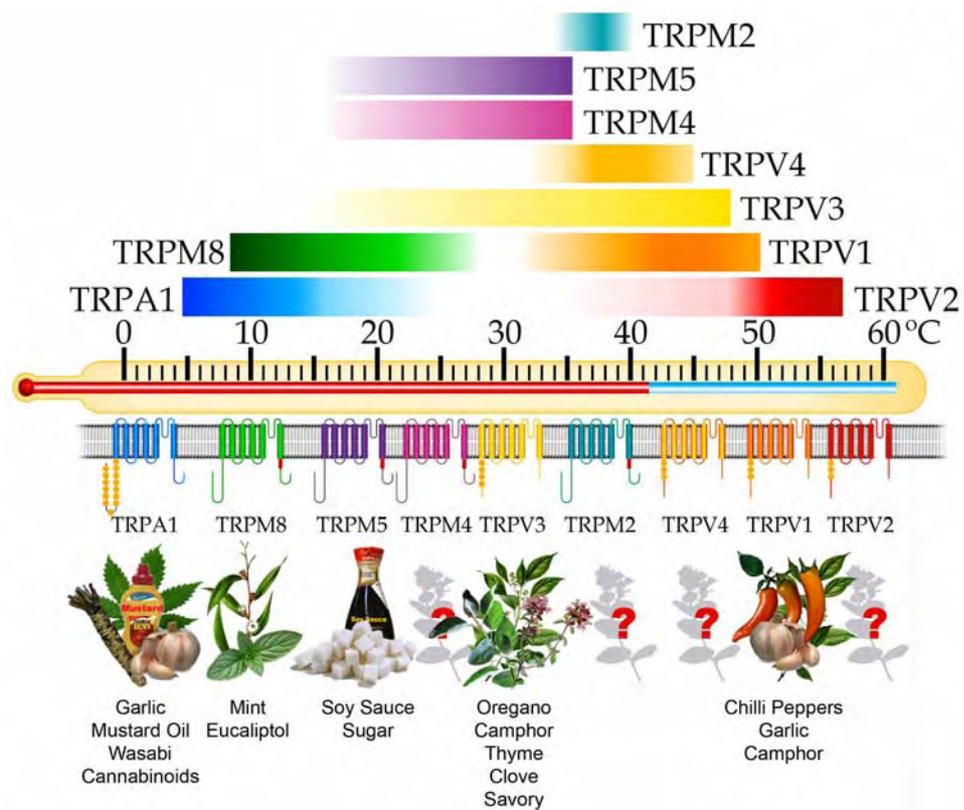


Figura 2. **Termo TRPs como receptores de frío y de calor.** En la parte superior se destacan los rangos de temperatura en los que estos canales se activan. La parte inferior ilustra las plantas y condimentos cuyos componentes activos funcionan como agonista de alguno de estos canales.

(Numazaki et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003), un sitio de unión a calmodulina involucrado en la desensibilización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Numazaki et al., 2003), un sitio de unión a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ), inhibitorio (Prescott and Julius, 2003b), aunque existe una hipótesis alternativa que plantea que no existe tal sitio de unión a  $\text{PIP}_2$ , sino que el efecto es mediado a través de una vía de señalización de segundos mensajeros que involucra a la fosfolipasa C (PLC) (P.Cesare et al., 1999; X.Zhang et al., 2005; Jiehong Huang et al., 2006), y un dominio de tetramerización en el lado proximal del C-terminal, cercano al segmento S6 (Nuria Garcia-Sanz et al., 2004). Supresiones parciales hechas en el C-terminal de TRPV1 resultan en un canal funcional con una sensibilidad al calor atenuada, y la supresión completa del dominio C-terminal anula la expresión del canal (Vlachova et al., 2003; Liu et al., 2004). Por otro lado, en los canales TRPM8 (3B), la unión de  $\text{PIP}_2$  conduce a la activación del canal (Liu and Qin, 2005a; Rohacs et al., 2005b). En estos canales la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal proximal de TRP es conservado y se propone como el sitio de unión a  $\text{PIP}_2$  (Rohacs et al., 2005a). Estos resultados sugieren la importancia del dominio C-terminal de TRPV1 y TRPM8 como un dominio estructural sensible a moduladores intracelulares sobre la actividad de estos canales. Recientemente, la investigación realizada en el laboratorio del Dr. Ramón Latorre apoya esta idea, ya que el intercambio de los carboxilos terminales, entre TRPV1 y TRPM8, determina el fenotipo del canal en cuanto a su sensibilidad a temperatura y su modulación por  $\text{PIP}_2$  (S.Brauchi et al., 2006).

La demostración que el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ), un lípido de carga negativa que constituye ~1% de la membrana plasmática, es un importante modulador molecular para los canales termo-TRP, está dada, en el caso de TRPM8, por dos estudios





recientes que dan cuenta que la activación de TRPM8 por baja temperatura o por mentol requiere de la presencia de PIP<sub>2</sub>(Liu and Qin, 2005b; Rohacs et al., 2005c). Apoyando esto, Rohacs et al., identificaron residuos en el dominio de consenso TRP del carboxilo terminal de TRPM8 necesarios para la activación mediada por PIP<sub>2</sub>(Rohacs et al., 2005d). Por otra parte, McKemy et al., demostraron que la desensibilización de TRPM8 requiere calcio extracelular, es decir, el flujo de calcio extracelular y la activación de TRPM8 podrían activar a la PLC, causando la degradación de PIP<sub>2</sub> y la subsiguiente inhibición de TRPM8 (McKemy et al., 2002a; Abe J et al., 2006; Premkumar LS et al., 2005). En contraste a TRPM8, cuya activación requiere PIP<sub>2</sub> para apoyar su función, en TRPV1 el efecto que ejerce PIP<sub>2</sub> sobre este canal, es inhibitorio(Chuang HH et al., 2001), proponiéndose como responsable de esta interacción a la porción distal del C-terminal del canal(Prescott and Julius, 2003a), una región única para TRPV1. Acorde con lo anterior, una reducción de los niveles celulares de PIP<sub>2</sub> aumenta la sensibilidad de TRPV1 al calor. Un estudio reciente ha demostrado que la degradación de PIP<sub>2</sub> ocurre simultáneamente con la activación de TRPV1. La adición de PIP<sub>2</sub> en la membrana determina la recuperación de la desensibilización del canal(Liu et al., 2005). Sin embargo, el grupo de McNaughton propone que la modulación de TRPV1 está dado por un mecanismo que involucra a PIP<sub>2</sub> indirectamente, esta conclusión se origina a partir de su trabajo relacionado con hiperalgesia, en el cual determinan que factor de crecimiento neuronal (NGF), actúa sobre el receptor TrkA, el que a su vez activa una vía de señalización en la que participan la quinasa PI<sub>3</sub> y la quinasa Src. Esta última une y fosforila a TRPV1, modulando de esta forma su actividad(X.Zhang et al., 2005; Jiehong Huang et al., 2006).

Contrario a lo anterior, Gordon et al. en un trabajo reciente demostró que el efecto que ejerce  $\text{PIP}_2$  sobre TRPV1 es de potenciación (Alexander T. Stein et al., 2006), es decir, que estaría involucrado en la activación del canal, esto a partir de experimentos que permiten manejar el medio intracelular del canal, descartando la influencia de otras proteínas que se pudiesen unir e interferir en la actividad del canal.

Los datos apoyan la idea que existe un sitio de unión a  $\text{PIP}_2$  y/o interacción específica entre  $\text{PIP}_2$  y aminoácidos presentes en el dominio C-terminal. Como se dijo anteriormente, este sitio de unión a  $\text{PIP}_2$  podría mantenerse conservado en TRPM8 y TRPV1, sin embargo, hasta la fecha, aún no se han realizado experimentos directos que den cuenta de esto, sólo se ha demostrado el efecto que ejerce el segundo mensajero sobre los canales. En el caso de TRPM8, los resultados descritos se correlacionan bien con respecto al efecto que ejerce  $\text{PIP}_2$  sobre este canal y se ha propuesto un sitio de interacción. En el caso de TRPV1, los trabajos realizados resultan más controversiales, donde la poca evidencia está sujeta a debate.

Como ya se ha dicho, todos los trabajos que involucran al  $\text{PIP}_2$  y estos canales son sobre la base de mediciones indirectas que dan cuenta del tipo de modulación que este ejerce, sin demostrarse de manera directa si la modulación ocurre por interacción entre  $\text{PIP}_2$  y los carboxilos terminales, blanco de interacción de los canales.

Para realizar una demostración directa de la interacción entre  $\text{PIP}_2$  y cada canal, fue necesario aislar la fracción C-terminal de los canales TRPV1 y TRPM8, que suponemos

involucrada en la unión de PIP<sub>2</sub>, y determinar, en un principio, analíticamente, si existe interacción directa entre los canales y el ligando, siendo este el objetivo de esta tesis.

Una vez realizado esto, este trabajo se complementaría y confirmaría realizando mutaciones del o los putativos sitios de unión a PIP<sub>2</sub>, específicamente, determinar que aminoácidos estarían involucrados en la unión, si es que existe. Además, la sobreexpresión y purificación de las fracciones carboxilo terminales de estos canales, resultarían útiles para su cristalización.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales:

- **pGEM-T easy vector (PROMEGA)**

Vector de 3015 pares de base, presenta resistencia a ampicilina. Este es un sistema conveniente para el subclonamiento de productos de PCR, los que quedan insertos en medio del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. La no expresión de esta enzima da cuenta de la inserción del fragmento de interés, dando como resultado colonias blancas, de lo contrario, se permite la expresión del la  $\beta$ -galactosidasa, dando como resultado colonias azules.

- **pMAL-c2x vector (BioLabs, New England)**

Vector de 6646 pares de base, con resistencia a ampicilina. Sistema utilizado para la expresión y purificación de proteínas. Este vector tiene una supresión en el gen malE, el que codifica para la proteína que une maltosa (MBP), por lo que las proteínas no pueden ser secretadas al periplasma, quedándose en el citoplasma.

NaCl, Tris, HCl, acrilamida, bisacrilamida, EDTA, persulfato de amonio,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, metanol, cloroformo y ácido acético fueron obtenidos de Merck. triptona o peptona, extracto de lavadura, fueron adquiridos de BD (Becton, Dickinson and Company). IPTG, X-Gal y ampicilina fueron obtenidos de Calbiochem. Glicina, SDS, agarosa, azul de comassie R-250 y D-glucosa fueron obtenidos de Winkler. El azul de bromofenol fue obtenido de May & Baker Ltd. Dagenham England. El temed y bromuro de etidio se adquirieron de Winkler. El kit QIAprep Spin Miniprep fue obtenido de Qiagen. El

kit E.Z.N.A Gel extraction fue adquirido de Omega Bio-Tek, Inc. El kit pGEM-T easy fue obtenido de Promega. El kit pMAL y las enzimas de restricción fueron obtenidas de New England (BioLabs). T4 DNA ligasa, Taq DNA polimerasa y los estándares de DNA, Hight Range, y de proteínas, fueron adquiridos de Fermentas. Pfu Turbo DNA polimerasa fue adquirida de Stratagene. Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos, maltosa, tween 20 y el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato fueron adquiridos de Sigma. Las tabletas con inhibidores de proteasas fueron obtenidas de Roche. El kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate fue adquirido de Pierce. Las cámaras de electroforesis se obtuvieron de BioRad. Los films Kodak BioMax light fueron obtenidos de Fermelo. Las membranas de nitrocelulosa Hybond-C Extra fueron adquiridas de Amersham Biosciences. Las cubetas de cuarzo fueron adquiridas de Luzchem.

### 3.2 Partidores

El sitio de interés es el carboxilo terminal citoplasmático de los canales TRPV1 y TRPM8.

El fragmento de cDNA correspondiente a los residuos aminoacídicos 686-838 (C-Terminal) de TRPV1 (ctTRPV1) de rata, fue amplificado por PCR usando los partidores 5`-CAC GTC AAC AAG ATT GCA CAA GAG AGC AAG A-3` (sense, P1ctTRPV1) y 5`-GC AAG CTT TTA TTT CTC CCC TGG GAC CAT GG-3` (antisense, P2ctTRPV1). Estos partidores dejan sitios de corte a los extremos del fragmento amplificado, para las enzimas de restricción Pml I (extremo 5`) y Hind III (extremo 3`).

El fragmento de cDNA correspondiente a los aminoácidos 960-1081 (C-Terminal) de TRPM8 (ctTRPM8) de rata fue amplificado por PCR usando los partidores 5`-CAC GTG GGC ATT GTG CAG GAG AAC ACC GA-3` (sense, P1ctTRPM8) y 5`-TCT AGA

TTA TTT GAT TTT ATT AGC AAT CTC TTT CA-3` (antisense, P2ctTRPM8).  
Quedando en el extremo 5` un sitio de corte para la enzima de restricción Pml I y Xba I al extremo 3` del ctTRPM8.

### 3.3 Amplificación de los C-terminales mediante PCR

A partir de los plasmidios pcDNA3-TRPV1 y pcDNA3-TRPM8 fueron amplificados los fragmentos de cDNA correspondientes a la fracción C-terminal de cada canal mediante PCR(Saiki et al., 1988). La amplificación se realizó en tubos de 0.2 ml, con un volumen de reacción de 20  $\mu$ l, que contenía:

DNA templado: pcDNA3-TRP (100 ng/ $\mu$ l)

Partidores : P1ctTRP (10  $\mu$ M)

P2ctTRP (10  $\mu$ M)

dNTPs (10 mM)

Pfu cloned buffer 10X

Pfu Turbo DNA polimerasa (2.5 U/ $\mu$ l)

Agua bidestilada estéril

La amplificación se realizó con el siguiente programa:

Para ctTRPV1:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 segundos
3. 63°C por 30 segundos
4. 72°C por 1 minuto
5. 24 repeticiones a partir del paso 2
6. 4°C

Para ctTRPM8:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 segundos
3. 60°C por 45 segundos
4. 68°C por 30 segundos
5. 24 repeticiones a partir del paso 2
6. 4°C

### **3.4 Electroforesis de DNA**

La separación electroforética de los fragmentos de DNA amplificados se realizó en geles de agarosa a una concentración del 1% en buffer TAE 1X, de acuerdo con Aaij y Borst(Aaij and Borst, 1972). Se usó como marcador el estándar 1 Kb.

### **3.5 Purificación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa**

Después de la separación de los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa, las bandas de DNA de interés, detectadas con la ayuda de un transiluminador de luz UV, se cortaron del gel y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.

El DNA se purificó utilizando el Kit E.Z.N.A Gel extraction .

### **3.6 Subclonamiento de los fragmentos en el vector pGEM-T easy**

#### **3.6.1 Modificación de los fragmentos amplificados**

Como la enzima Pfu DNA polimerasa genera fragmentos terminales romos durante la amplificación por PCR, y para la ligación del fragmento de interés al vector se requieren extremos de adenina, para subsanar esto, se realizó el siguiente protocolo:

7  $\mu$ l del fragmento de PCR purificado, generado con Pfu DNA polimerasa, se le agregó 1  $\mu$ l de buffer de reacción Taq DNA polimerasa 10X con  $MgCl_2$ , dATP a una concentración final de 0.2 mM, 5 Unidades de Taq DNA polimerasa y agua desionizada a un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l.

La mezcla de reacción se incubó a 70°C por 15-30 minutos. De esta reacción se tomaron 2  $\mu$ l para la ligación con el vector pGEM-T easy.

### **3.6.2 Ligación de los productos de PCR con el vector pGEM-T easy**

La reacción de ligación se realizó de la siguiente manera:

Buffer de ligación T4 DNA ligasa 2X

Vector pGEM-T easy (50 ng)

Producto de PCR modificado (100 ng)

T4 DNA ligasa (3 U/ $\mu$ l)

Agua desionizada estéril

### **3.6.3 Preparación de células electrocompetentes DH5 $\alpha$**

La introducción del plasmidio vector en las células DH5 $\alpha$  se realizó mediante la transformación de células competentes.

Protocolo de preparación de células electrocompetentes:

1. Inocular en 5 ml de medio LB con células DH5 $\alpha$ , dejar crecer toda la noche a 37°C a 215 rpm.
2. En 100 ml de medio LB inocular 1ml del cultivo de toda la noche. Incubar a 37°C a 215 rpm hasta alcanzar una  $OD_{600nm}$  0.6

3. Enfriar el cultivo en hielo por 15 minutos
4. Centrifugar a 5500 g a 4°C en tubos falcon de 50ml fríos por 30 minutos
5. Retirar el sobrenadante, resuspender suavemente primero en 1 ml de agua destilada estéril fría, y luego enraizar a 100 ml final con agua
6. Centrifugar a 5500 g a 4°C en tubos falcon de 50 ml fríos por 30 minutos
7. Resuspender en 2 ml de agua destilada estéril fría
8. Centrifugar 20 minutos y resuspender en 250 µl de agua destilada estéril fría con 10% glicerol
9. Alicuotar de a 30 µl fueron congeladas con nitrógeno líquido y guardadas a -80°C

#### **3.6.4 Transformación por electroporación(Dower et al., 1988)**

Se mezcló en hielo, 30 µl de células electrocompetentes DH5α con 1.5 µl de la mezcla de ligación, en cubetas de electroporación de 2 mm frías y electroporadas en un electroporador usando el siguiente protocolo:

Voltaje        2.5 kV

Capacitancia 25 µF

Resistencia    200 Ω

A continuación se añadieron rápidamente 900 µl de medio LB a 37°C. Se incubaron por 1 hora a 100rpm en un agitador orbital.

#### **3.6.5 Selección de transformantes**

Alícuotas de 100  $\mu$ l de la suspensión anterior se sembraron en placas de medio selectivo, LB ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Para poder diferenciar las transformantes que han incorporado el vector con el inserto interés de aquellas que no lo portan, las placas se suplementaron con IPTG/X-Gal, con concentraciones finales de 0.5 mM y 80  $\mu$ g/ml, respectivamente. Las colonias que incorporaron el vector intacto fueron de color azul, mientras que las que incorporaron el plásmido recombinante fueron blancas; esto debido a la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa.

### **3.6.6 Análisis de las transformantes**

Las colonias blancas fueron sembradas cada una en 5 ml de medio LB ampicilina líquido, incubándolas a 37°C a 215 rpm toda la noche. Seguidamente se purificó el DNA plasmidial utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep, siguiendo la metodología propuesta por el fabricante.

El DNA plasmidial purificado fue digerido con enzimas de restricción adecuadas, y los fragmentos de DNA resultantes se separaron por electrofóresis en geles de agarosa al 1%. El análisis de tamaño de los fragmentos liberados da cuenta si los transformantes contienen la construcción adecuada.

### **3.7 Digestión de los fragmentos subclonados en el vector pGEM-T easy**

Una vez confirmado que las células contenían los constructos adecuados, los fragmentos de DNA de interés contenidos en el vector pGEM-T easy, fueron clonados en el vector pMAL-c2x.

La digestión se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo para cada caso:

\* pGEM-T easy/ ctTRPV1

DNA plasmidial

BSA 20X

NE Buffer 2 (New England, BioLabs)

Hind III

Pml I

Agua bidestilada estéril

\* pGEM-T easy/ ctTRPM8

DNA plasmidial

BSA 20X

NE Buffer 2 (New England, BioLabs)

Pml I

Xba I

Agua bidestilada

Las enzimas de restricción Hind III y Xba I deja extremos cohesivos en los fragmentos digeridos, y la enzima Pml I, deja extremos romos.

En el caso del vector pMAL-c2x, el par de enzimas de restricción utilizadas, dependió del inserto a clonar. El fragmento amplificado ctTRPV1 fue clonado dentro de los sitios de restricción Xmn I y Hind III del vector. Y el fragmento ctTRPM8 dentro de los sitios Xmn I y Xba I del vector. El codón de término está incluido en la secuencia de los fragmentos C-terminales.

### **3.8 Electroforesis en geles de agarosa**

Esta técnica es usada rutinariamente para visualizar los DNAs obtenidos tras las digestiones. Se utilizaron concentraciones de agarosa 0.7% y 1%, dependiendo del tamaño del DNA, en TAE 1X, usando como marcador de peso molecular el estándar 1 Kb.

### **3.9 Extracción de DNA del gel de agarosa**

Para aislar los fragmentos deseados se visualizaron las bandas del gel con ayuda de un transiluminador UV. Se extrajo la banda de DNA, del tamaño deseado, del gel de agarosa con un bisturí. Para purificar el DNA de la agarosa se usó el kit E.Z.N.A Gel extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.10 Ligación**

Una vez abierto el vector y listo el producto a clonar, ambos linearizados y con sus extremos compatibles para ser ligados, se mezcló una relación molar vector:inserto, de 1:10, en un medio que contenía buffer de ligación 10X y 1 U/ $\mu$ l de T4 DNA ligasa. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

### **3.11 Transformación en *Escherichia coli* TB1**

#### **3.11.1 Protocolo de preparación de células competentes TB1**

1. Inocular en 5 ml de medio LB con una colonia y dejar crecer durante la noche con agitación (215 rpm) a 37°C
2. Inocular en 50 ml de medio LB fresco con 0.5 ml del cultivo anterior. Incubar a 37°C a 215 rpm por aproximadamente 2 hr, hasta alcanzar una OD<sub>550nm</sub> 0.2
3. Centrifugar a 3000 g por 10 minutos a 4°C. Usar rotor S4180(Beckman)

4. Resuspender en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril, frío y dejar en hielo 30 minutos
5. Centrifugar a 3000 g por 10 minutos a 4°C
6. Resuspender en solución estéril fría de CaCl<sub>2</sub> con glicerol al 15%. Se pueden almacenar a -70°C en alícuotas de 300 µl

### **3.11.2 Protocolo de transformación por shock térmico**

1. Descongelar las células competentes y mantenerlas en hielo por 10 minutos
2. Transferir 50 µl de células competentes a un tubo eppendorf o falcon 2029
3. Mantener en hielo 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos
4. Añadir aproximadamente 1 ng del plasmidio con el inserto (puede ser hasta un 5% del volumen total), y agitar suavemente
5. Mantener en hielo por 30 minutos
6. Calentar por 60 segundos en un baño a 42°C
7. Mantener 1-2 minutos en hielo
8. Añadir 800 µl d medio LB a 37°C e incubar por 45 minutos a 37°C con agitación
9. Plaquear 200 µl en cada placa de LB/ampicilina (100 µg/ml) e incubar toda la noche a 37°C

Los cronstructos expresados fueron verificados por secuenciación nucleotídica para posteriormente ser retransformado en células competentes BL21 (DE3), siguiendo la metodología descrita anteriormente para electroporación.

### **3.12 Expresión y purificación de las proteínas en las células de *E. coli* BL21 (DE3)**

La expresión se indujo con Isopropyl beta-D-Thiogalactoside (IPTG) 0.5 mM por 3 hrs. A continuación las células fueron centrifugadas a 4000 g por 20 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer de elución (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl y 1 mM EDTA), las muestras fueron sonicadas con pulsos cortos de 15 seg y posteriormente centrifugadas a 9000 g por 30 min, el sobrenadante se diluyó con buffer de elución y se aplicó a una resina que contiene polímeros de maltosa, el cual es el ligando para la proteína MBP (maltose binding protein), por lo que la separación de la proteína de interés del resto se realizó por cromatografía de afinidad. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con el ligando libre (Maltosa 10 mM), el cual está contenido en el buffer de elución.

La concentración de proteínas fue verificada midiendo la absorbancia a 280 nm.

### **3.13 Electroforesis en gel SDS-PAGE**

Las muestras eluidas fueron concentradas y analizadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%, de acuerdo con Laemmli(Laemmli, 1970). El gel fue teñido con 0.25 g de azul de comassie, 225 ml de metanol, 46 ml de ácido acético y 230 ml de agua destilada; esto permitió visualizar las proteínas.

### **3.14 Western blot**

Para confirmar que las proteínas purificadas corresponden a las proteínas de fusión de interés se realizó un western blot(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). En primer lugar se realizó una transferencia electroforética de las bandas que contienen las proteínas desde el gel de acrilamida-bisacrilamida a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Tris-HCl 48 mM pH 8.3, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20%, todo en 1 Litro enrazado con agua destilada), bajo las siguientes condiciones: Toda la noche a 30

V y 90 mA. Una vez realizada la transferencia la membrana se lavó con TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 0.1% de Tween 20, todo en 1 Litro de agua destilada), dos veces por 5 min cada vez. A continuación la membrana se bloqueó con TBS-T más 5% de leche descremada. Se incubó por una hora a temperatura ambiente. A continuación, a la solución de bloqueo se le agregó el anticuerpo primario (anti-MBP policlonal de conejo) en una relación 1:10000, y la membrana se dejó incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 6 veces de 5 minutos cada uno con TBS-T, el último lavado se realizó con TBS-T + 5% Leche descremada, y se le agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa). Se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente (dilución 1:2000). Finalmente, la membrana fue lavada con TBS-T 6 veces de 5 minutos cada uno, para ser revelada con SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate y el resultado visto en un film.

### **3.15 Ensayos de unión a PIP<sub>2</sub> (Protein Lipid Overlay, PLO)**

Las mediciones se realizaron mediante unión de los carboxilos terminales de TRPV1 y TRPM8 a PIP<sub>2</sub>, de acuerdo con el protocolo de Simon Dowler (Dowler et al., 2002), con pequeñas modificaciones.

Protocolo:

1. Preparar un stock de PIP<sub>2</sub> en una solución 1:1 de metanol:cloroformo y guardar a -80°C antes de usar
2. Diluir el lípido en una solución 2:1:0.8 de metanol:cloroformo:agua, en un rango de concentraciones de 1-300 µM
3. Cargar 1 µl de la diluciones seleccionadas sobre la membrana Hybond-C (la cual contendrá de 1 a 300 picomoles del lípido),

4. Dejar secar a temperatura ambiente por 1 hora
5. Incubar la membrana con buffer de bloqueo (50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 y 3% de BSA libre de ácidos grasos, todo preparado en 1 L de agua destilada y guardado a 4°C), por 1hr a temperatura ambiente.
6. Incubar la membrana toda la noche a 4°C con el buffer de bloqueo que contiene 30 nM de la proteína de fusión.
7. Lavar la membrana 10 veces en 50 minutos con TBST (50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, en un litro de agua destilada)
8. Incubar la membrana 1 hr a temperatura ambiente con una dilución 1:6500 del anticuerpo policlonal anti-MBP, en buffer de bloqueo
9. Lavar la membrana 10 veces en 50 minutos con TBST
10. Incubar la membrana por 1 hr con una dilución de 1:25000 de el anticuerpo secundario anticonejo conjugado a peroxidasa, en TBST
11. Lavar la membrana 12 veces en 1 hr con TBST
12. Detectar la unión de la proteína al lípido unido a la membrana de acuerdo a las instrucciones del fabricante para SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Construcción de las proteínas de fusión MBP-ctTRPV1 y MBP-ctTRPM8

Con el fin de determinar y demostrar la unión de PIP<sub>2</sub> a los carboxilo terminales de los canales TRPV1 y TRPM8, se decidió construir proteínas de fusión entre los C-terminales y la proteína que une maltosa (Maltose Binding Protein o MBP). Para esto se realizó en primer lugar la amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA correspondiente a la región carboxilo terminal de los canales TRPV1 (ctTRPV1) de 461 pares de base y TRPM8 (ctTRPM8) de 369 pares de base (Fig. 4), a partir de los plásmidos pcDNA3-TRPV1 y pcDNA3-TRPM8, respectivamente.

Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente subclonados en el vector pGEM-T easy (Fig. 5A), este es un sistema conveniente para el subclonamiento de productos de PCR, el que queda inserto en medio del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Por lo tanto, en las colonias DH5 $\alpha$  transformadas con este vector recombinante, la no expresión de la enzima da cuenta de la inserción del fragmento de interés. En otras palabras, las colonias que incorporaron el vector intacto serán de color azul, mientras que las que incorporaron el plasmidio recombinante, debido a la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, serán blancas (Fig. 5B).

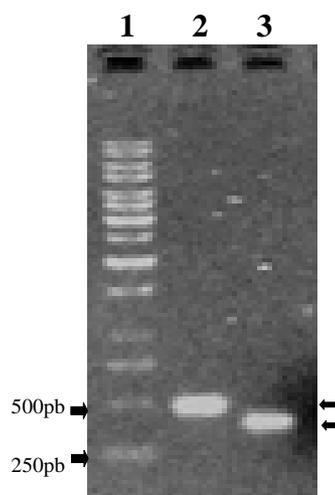


Figura 4. **Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR de los C-terminales de TRPV1 y TRPM8.** Carril 1: Estándar de 1Kb, carril 2: carboxilo terminal TRPV1 de 461 pares de base y carril 3: carboxilo terminal TRPM8 de 369 pares de base.

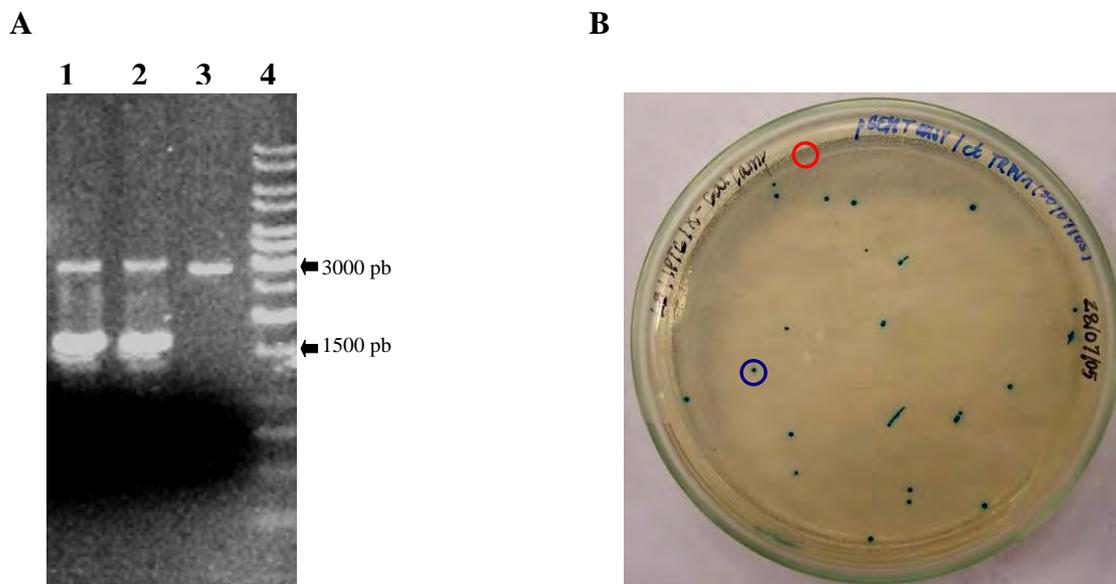


Figura 5. **Subclonamiento de los productos de amplificación en el vector pGEM-T easy.** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1: vector pGEM-T easy subclonado con ctTRPV1 (~3476 pares de base), carril 2: vector pGEM-T easy subclonado con ctTRPM8 (~3384 pares de base), y carril 3: vector pGEM-T easy sin inserto, linearizado y carril 4: estándar de 1Kb. (B) Placa de agar ampicilina, IPTG/X-Gal con colonias DH5 $\alpha$  transformadas con vector pGEM-T easy (colonias azules) y colonias DH5 $\alpha$  transformadas con el vector recombinante pGEM-T easy/ctTRP (colonias blancas). En el círculo azul se destaca una colonia azul y en el rojo, una colonia blanca.

A partir de las colonias blancas se purificó el vector con el inserto y se realizó la digestión con las enzimas correspondientes (Fig 6). En el caso, del vector pGEM-T easy que contenía al ctTRPV1, se digirió con el par de enzimas de restricción PmlI (extremo 5') y HindIII (extremo 3'), y para el vector subclonado con ctTRPM8 se realizó la digestión con el par de enzimas de restricción PmlI (extremo 5') y XbaI (extremo 3') quedando libre fragmentos de 461 y 369 pares de base, respectivamente, y uno de ~3000pb correspondiente al vector pGEM-T easy.

Los extremos C-terminales tanto de TRPV1 como TRPM8, obtenidos a partir de la digestión enzimática, quedaron con un extremo romo y otro cohesivo, lo que permitió su posterior clonamiento en el vector pMAL-c2x (Fig 7), por lo que el fragmento correspondiente al ctTRPV1 fue clonado dentro de los sitios de restricción Xmn I y Hind III del vector, y el fragmento ctTRPM8 dentro de los sitios Xmn I y Xba I del vector.

El vector pMAL -c2x es un sistema utilizado para la expresión y purificación de proteínas. El vector tiene una supresión en el gen *malE* que codifica para la proteína que une maltosa (MBP), específicamente una región que permite a las proteínas ser secretadas al periplasma, por lo que, por efecto de la supresión, las proteínas quedan retenidas en el citoplasma.

Los constructos fueron transformados en células competentes *E. coli* TB1 y posteriormente verificados por secuenciación nucleotídica, para ser finalmente retransformados en células competentes BL21 (DE3).

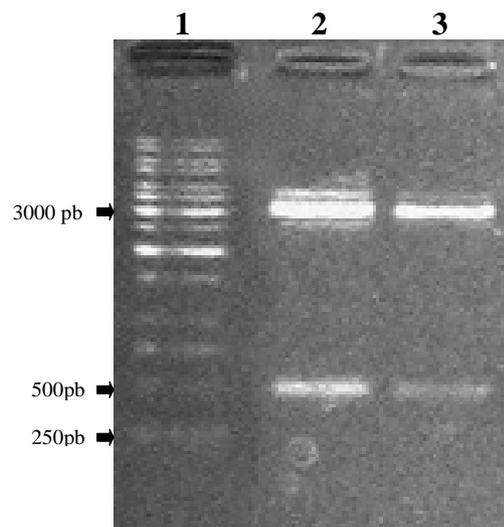


Figura 6. **Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la digestión de los vectores pGEM-T easy subclonados con los C-terminales de TRP.** Carril 1: Estándar de 1Kb, carril 2: vector pGEM-T easy subclonado con ctTRPV1 digerido con las enzimas de restricción Pml I y Hind III, y carril 3: vector pGEM-T easy subclonado con ctTRPM8 digerido con las enzimas de restricción Pm I y Xba I.

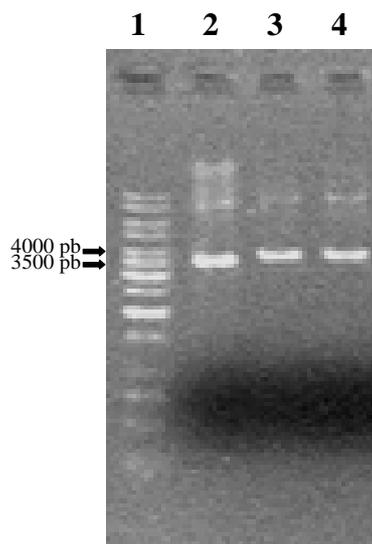


Figura 7. **Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de los carboxilos terminales clonados en el vector pMAL-c2x.** Carril 1: Estándar 1Kb, carril2: Vector pMAL c-2x, carril 3: Vector pMAL -c2x clonado con ctTRPM8, carril 4: Vector pMAL -c2x clonado con ctTRPV1.

## 4.2 Expresión de las proteínas de fusión MBP-ctTRPV1 y MBP-ctTRPM8

En primer lugar, se determinó si la expresión de las proteínas se llevaba a cabo, para esto se indujo la expresión de las proteínas de fusión en células con el vector intacto y se compararon con células que contenían el vector recombinante (Fig. 8). En la figura 8, se muestra un curso temporal de la expresión de las proteínas de fusión inducidas con IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactoside) a una concentración final de 0.5 mM. Este análisis permitió determinar que la inducción y expresión de la proteína de fusión se lleva a cabo, obteniéndose una concentración óptima a las 3 horas de agregado el inductor.

Una vez verificada la inducción, se procedió a expresar altas concentraciones de proteínas de fusión., preparándose e induciendo alta cantidad de células BL21 (DE3) con el vector recombinante. A partir de las células se obtuvo el extracto crudo, que contenía tanto proteínas de la bacteria como la de nuestro interés. El extracto fue pasado a través de una columna de afinidad, compuesta por polímeros de maltosa (amilosa), la que permitía la retención de la proteína de fusión por medio de la unión de la proteína que une maltosa (MBP) a los polímeros que forman la resina de la columna. Finalmente, después de varios lavados, la proteína retenida en la columna se eluyó con maltosa libre (10 mM). A cada fracción colectada se le midió la absorbancia a 280 nm, obteniendo los siguientes perfiles de elución que se muestran en la Fig. 9.

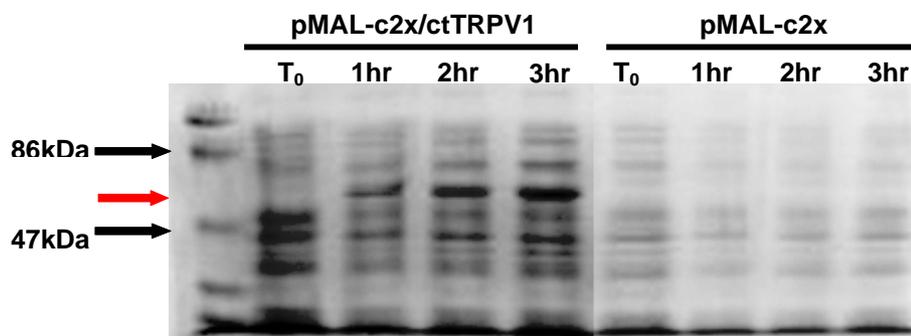


Figura 8. Gel SDS-PAGE al 10% de las proteínas totales obtenidas de la inducción de las células BL21 (DE3) transformadas. Las fracciones corresponden a las proteínas totales obtenidas antes ( $T_0$ ) y durante la inducción con IPTG 0.5 mM final (1, 2 y 3 horas). En el gel, los cuatro primeros tiempos corresponden a células BL21 (DE3) transformadas con el vector pMAL-c2x clonado con ctTRPV1, las cuatro restantes, a células BL21 (DE3) transformadas con pMAL-c2x intacto. En el primer carril se cargó el estándar de proteínas preteñido de 19.000 a 118.000 Da (Winkler). La flecha roja indica la proteína de fusión MBP-ctTRPV1 de aproximadamente 58.6 kDa.

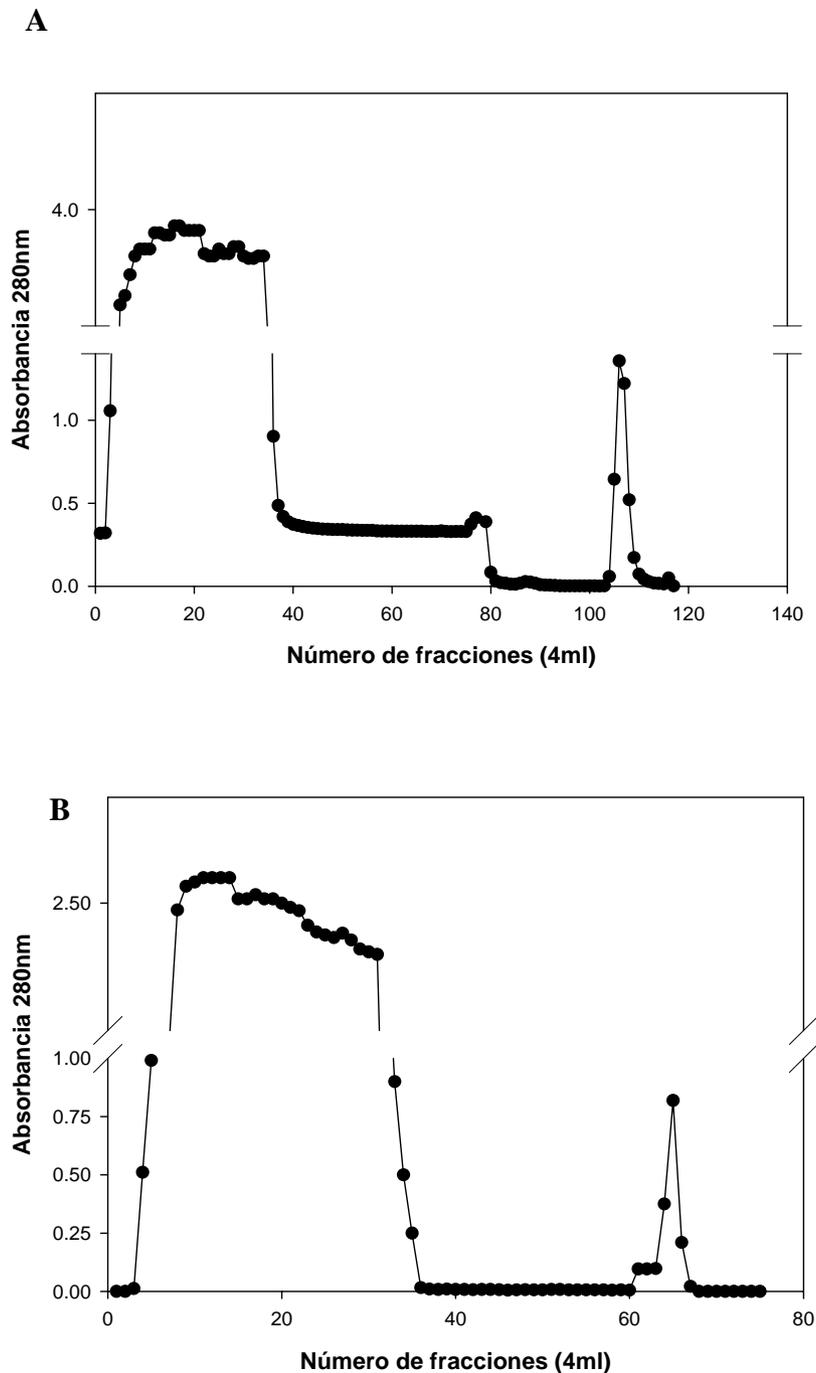


Figura 9. **Perfiles de elución de las proteínas de fusión.** En ambos casos el primer pico corresponde a las proteínas totales y el segundo, en (A) MBP-ctTRPV1 y (B) MBP-ctTRPM8.

De acuerdo con los perfiles de elución, el primer pico da cuenta de las proteínas totales de la bacteria, presentes en el extracto crudo, las que no presentan afinidad por los polímeros de la resina. A continuación de los lavados se observa un segundo pico, correspondiente a las proteínas que presentan afinidad por el azúcar, dentro de las cuales se espera encontrar a nuestra proteína de fusión. La elución de las proteínas presentes en el segundo pico, se consiguió agregando maltosa libre (10mM) al buffer. Para confirmar la presencia de nuestras proteínas de interés se tomaron alícuotas de las fracciones del segundo pico y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10%. De esta forma se determinó la presencia y pureza de las proteínas de fusión (Fig.10).

De los geles SDS-PAGE podemos observar que las fracciones correspondientes a MBP-ctTRPM8 (Fig. 10B) se encuentran enriquecidas con esta proteína de fusión, además, su banda de migración se corresponde con el peso molecular determinado para la proteína de fusión. Sin embargo, para el caso de las fracciones que contienen a la proteína MBP-ctTRPV1 (Fig. 10A), no sólo están enriquecidas con una proteína de peso molecular correspondiente a la esperada, sino que además con una proteína de aproximadamente 45 kDa.

Para determinar a ciencia cierta que dentro de las fracciones eluidas se encuentran las proteínas de fusión, fue necesario realizar un Western Blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína que une maltosa (MBP) (Fig.11)

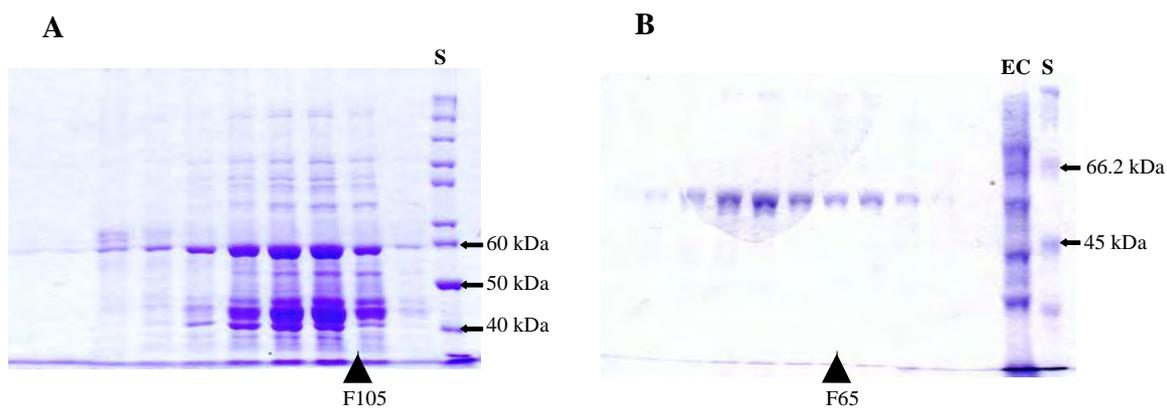


Figura 10. **Geles SDS-PAGE al 10% de las fracciones eluidas con Maltosa 10mM.** Las muestras cargadas corresponden a: (A) Fracciones 102 a 111 correspondientes a la proteína de fusión MBP-ctTRPV1. (B) Fracciones 59 a 68 correspondientes a MBP-ctTRPM8, del segundo pico de elusión de la figura 8. *S* corresponde al estándar de proteínas que abarca el rango de pesos moleculares de 10 a 200 kDa (Fermentas), *EC* corresponde al extracto crudo, proteínas totales, antes de ser purificado. Las flechas indican fracciones eluidas de cada proteína.



Figura 11. **Western blot de las proteínas de fusión.** Las muestras cargadas fueron: (A) Fracción 105 de MBP-ctTRPV1 y (B) Fracción 65 de MBP-ctTRPM8, indicadas en la figura 9, las que se detectaron con el anticuerpo primario Anti-MBP de conejo y se revelaron con el anticuerpo secundario Anti-Conejo conjugado a peroxidasa.

Según el Western Blot, las bandas prominentes en los geles SDS-PAGE corresponderían a las proteínas de fusión, y la banda adicional, presente en alta concentración, en la elución de MBP-ctTRPV1, correspondería a la proteína que une maltosa (MBP), ya que se corresponde en peso molecular y unió el anticuerpo policlonal dirigido contra MBP (Fig. 11A).

### 4.3 Ensayos de unión de PIP<sub>2</sub> a las proteínas de fusión

Una vez expresadas y purificadas las proteínas de fusión se pueden llevar a cabo los ensayos de unión a PIP<sub>2</sub>. Este tipo de ensayo es específico y cualitativo, lo cual nos permite determinar si una proteína presenta unión al fosfolípido. Un control positivo son los dominios PH, moléculas de aproximadamente 100 aminoácidos, cuya principal función es la unión a fosfatidilinositoles. Un ejemplo es la PLC, como muestra la Fig. 12.

En primer lugar se realizaron controles para determinar si la MBP, los anticuerpos primario y secundario interfieren en el ensayo, descartándose cualquier unión inespecífica que no sea mediada por los c-terminales de TRPV1 y TRPM8 (Fig.13).

De acuerdo con los controles se puede inferir que el *background* en el ensayo, se deberá a que los anticuerpos se unen de manera inespecífica a la membrana de nitrocelulosa (Fig.13B), no así a PIP<sub>2</sub>.

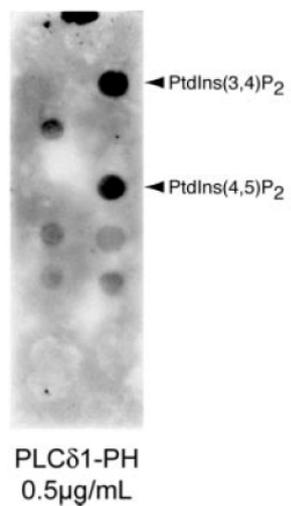


Figura 12. **Control positivo ensayos PLO.** Unión del dominio PH de la PLC  $\delta$ 1 expresada bacteriamente (0.5  $\mu$ g/ml). Este ensayo sirve como control positivo, demostrando que nuestro procedimiento experimental es reproducible.

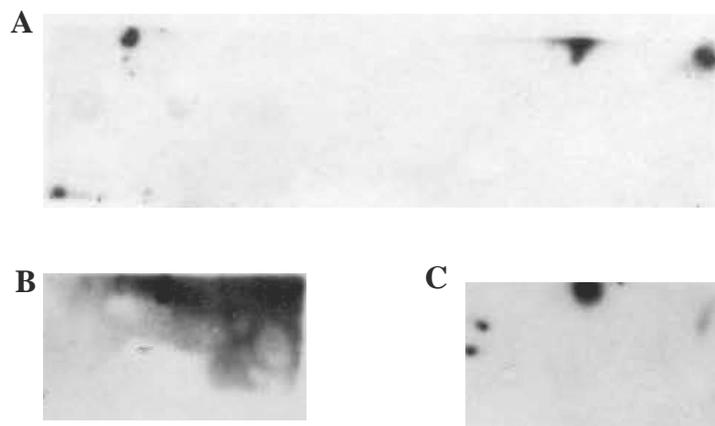


Figura 13. **Controles negativos del ensayo de unión a PIP<sub>2</sub>**. Se realizaron los ensayos PLO bajo 3 condiciones (A) PIP<sub>2</sub> unido a la membrana incubado con MBP y anticuerpos primario y secundario. (B) PIP<sub>2</sub> unido a la membrana incubado sin proteínas, sólo con los anticuerpos primario y secundario. (C) Membrana sin PIP<sub>2</sub>, sólo con solvente, incubada con MBP-ctTRP y anticuerpos primario y secundario.

Una vez realizados los controles y demostrado que ni una de las proteínas nombradas anteriormente se unen al fosfolípido, se procedió a determinar si en la fracción c-terminal de los canales TRPV1 y TRPM8 se encuentra el sitio de unión a este fosfolípido. El ensayo se realizó con un rango de PIP<sub>2</sub> de 0 a 300 picomoles y una concentración fija de proteína de fusión de 30 nM (Fig. 14).

Como muestra la figura 14, las proteínas de fusión unen PIP<sub>2</sub>, validándose así nuestra hipótesis y demostrándose por primera vez, de manera directa, que en la fracción C-terminal de los canales TRPV1 y TRPM8 se encuentra el sitio de unión al segundo mensajero.

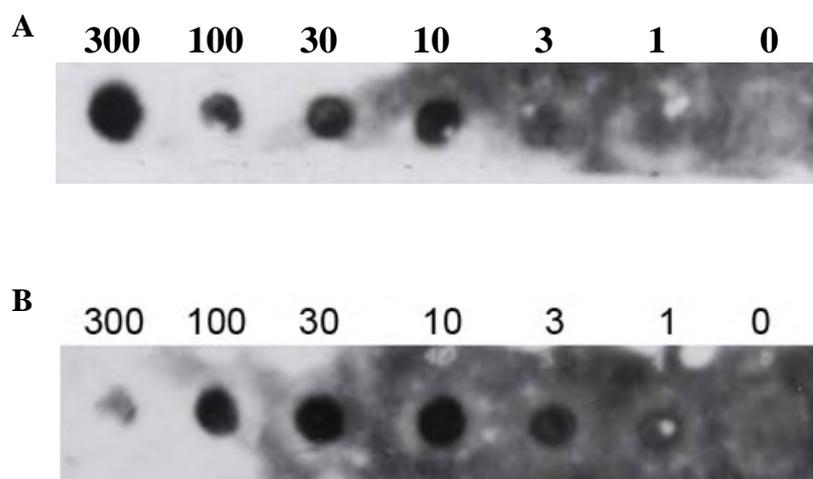


Figura 14. **Ensayos de unión a PIP<sub>2</sub>** (A) Unión de la proteína de fusión MBP-ctTRPV1 a 300, 100, 10, 3, 1 y 0 picomoles de PIP<sub>2</sub>. (B) Unión de MBP-ctTRPM8 a 300, 100, 30, 10, 3, 1 y 0 picomoles de PIP<sub>2</sub>.

## DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta tesis apoya la idea que los canales sensibles a temperatura, TRPV1 y TRPM8, unen PIP<sub>2</sub>. Demostrándose por primera vez la unión directa del fosfolípido PIP<sub>2</sub> al carboxilo Terminal de estos dos canales pertenecientes a la superfamilia de TRP.

En estudios previos se ha demostrado que los canales TRP pueden ser activados o regulados por lípidos endógenos, centrándose principalmente en el segundo mensajero fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). PIP<sub>2</sub> activa a un gran número de estos canales, incluido TRPM8, sin embargo, el tipo de modulación que ejerce sobre TRPV1, aún es controversial. Se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar la modulación que ejerce PIP<sub>2</sub> sobre el canal: una interacción directa entre PIP<sub>2</sub> y TRPV1; o un mecanismo indirecto, el cual supone intermediarios entre PIP<sub>2</sub> y el canal.

Trabajos preliminares en el laboratorio demostraron que el C-terminal es capaz de conferir el fenotipo de activación por temperatura. Por lo que el carboxilo terminal de los TRP cumple un rol regulador en la actividad del canal, y su función es modulada por PIP<sub>2</sub>. Sobre la base de estos datos preliminares en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere el mecanismo por el cual PIP<sub>2</sub> ejercería su efecto. En este trabajo se demuestra experimentalmente que la modulación que ejerce PIP<sub>2</sub> sobre los canales TRPV1 y TRPM8 es a través de una interacción directa, específicamente con los C-terminales de estos. Tal hallazgo constituye un aporte en el área, ya que en la literatura la modulación por PIP<sub>2</sub> es motivo de álgida controversia.

En primer lugar, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que la fracción C-terminal de los canales TRPV1 y TRPM8, son estructuras solubles, como era de esperar de acuerdo a la topología propuesta para los canales TRP. El sistema pMAL resulta conveniente y beneficioso para la sobreexpresión y purificación de proteínas. Esto gracias a las propiedades del vector pMAL, el que contiene un promotor *tac*, híbrido de los promotores *lac* y *trp*, favoreciendo la expresión de la proteína. El vector codifica un tag (MBP) al extremo N-terminal de la proteína de interés, lo que permite una purificación por cromatografía de afinidad en condiciones mínimas de elución. Si bien la purificación no fue total, lo cual puede resultar una desventaja para otro tipo de experimentos, en nuestro caso, el grado de purificación aquí obtenido fue suficiente para realizar nuestros experimentos PLO. Sin embargo, una mejor purificación se podría lograr variando la concentración de sales en el buffer de elución, o bien, utilizando otros sistemas de cromatografía, filtros que separen por peso molecular o hasta sistemas más sofisticados como HPLC. Una ventaja adicional del sistema pMAL. Es que la proteína tag puede ser removida por proteólisis con una proteasa específica (Factor Xa), dejando a la proteína de interés intacta. Esto resulta de gran utilidad para trabajos posteriores, como dilucidar la estructura tridimensional de esta fracción del canal a través de técnicas como por ejemplo, cristalización.

La inducción realizada en células BL21 (DE3) transformadas con el vector recombinante permitió aumentar la expresión de proteínas comparado con las cantidades obtenidas con células TB1, recomendadas por el fabricante del kit. Una ventaja de las células BL21 (DE3) es su carencia de proteasas, las que podrían inducir la proteólisis de las proteínas sobreexpresadas. De otro modo, la presencia de proteasas podría habernos conducido a resultados falsos negativos. Esto debido a que el extremo C-terminal

fusionado a MBP podría haber sufrido una degradación parcial imperceptible a los ensayos de western blot, ya que los anticuerpos utilizados fueron dirigidos contra el tag. Así, al realizar los ensayos PLO no habríamos detectado unión a PIP<sub>2</sub> por pérdida o alteración en la estructura del C-terminal.

La cantidad de proteínas de fusión obtenidas resultaron suficientes para realizar los ensayos de unión a PIP<sub>2</sub> (PLO, ver materiales y métodos), ya que estos sólo requieren de microgramos de proteína para poder determinar la unión. Las proteínas se obtuvieron purificadas casi en su totalidad, correspondiendo a la fracción más concentrada de la elución. Por otra parte, el ensayo PLO realizado de acuerdo al protocolo de Dowler et al., debió ser modificado, adecuándolo a nuestras condiciones y mejorando así la calidad del ensayo. Estas modificaciones (cambio de dilución de anticuerpos, pH del buffer y porcentaje de BSA libre de ácidos grasos para el bloqueo) nos permitieron conseguir un resultado más fidedigno que nos condujo a demostrar la unión directa de PIP<sub>2</sub> a los C-terminales. Si bien este ensayo nos da sólo información cualitativa resulta óptimo para demostrar si existe tal interacción. Por otra parte, los controles de unión nos permitieron comprobar la especificidad del ensayo (Fig.12) La proteína MBP no interfiere en los ensayos de unión a PIP<sub>2</sub> y los anticuerpos resultaron ser específicos, descartándose, en el caso de MBP-ctTRPV1 en el que también se sobreexpresa el tag MBP, alguna interferencia de esta última que haga dudar del resultado. Además, se determinó que el *background* se debe a que los anticuerpos se unen de manera inespecífica a la membrana, no así a la zona en la que se encuentra fijo el PIP<sub>2</sub>. Esto se mejoró aumentando el número de lavados y disminuyendo la concentración de anticuerpos propuesto en el protocolo de Dowler et al.

Una de las desventajas de este método es el *background*, ya que si no se logra disminuir, no se puede determinar si existe realmente unión.

Finalmente, este trabajo aporta al conocimiento del efecto que ejerce  $\text{PIP}_2$  en la modulación de estos canales, demostrándose de manera directa la unión de  $\text{PIP}_2$  a los C-terminales de TRPM8 y TRPV1.

Este resultado permite sustentar algunos mecanismos propuestos por el cual este segundo mensajero modularía la actividad de estos canales. En primer lugar, en el caso de TRPM8, a partir de trabajos recientes que demuestran el efecto regulador que ejerce  $\text{PIP}_2$  sobre la actividad de este canal, más el trabajo realizado aquí, se concluye que la activación del canal ocurre por interacción directa entre el carboxilo terminal de TRPM8 y  $\text{PIP}_2$ . Resta por dilucidar que residuos específicos en el C-terminal involucrados en la interacción. Existe evidencia que atribuye esta interacción a cargas presentes en el dominio TRP, un dominio conservado entre los Termo-TRPs. Resultaría beneficioso para esclarecer completamente este mecanismo, determinar realmente que cargas están involucradas en esta interacción. Una primera aproximación sería mutar los aminoácidos cargados positivamente en el dominio TRP y realizar los ensayos PLO.

Contrario a lo que sucede con TRPM8, cuyos trabajos son coincidentes con respecto al efecto de  $\text{PIP}_2$ , el mecanismo de interacción de  $\text{PIP}_2$  con TRPV1 es más controvertido. A partir de este trabajo podemos concluir que cualquiera sea el mecanismo, debe incluir una unión directa de  $\text{PIP}_2$  a este canal, del mismo modo que lo observado en TRPM8. Así, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, se puede descartar el

mecanismo de un efecto indirecto propuesto por McNaughton et al. Ahora queda por determinar cual es el sitio específico de interacción. Una vez determinado este sitio podríamos estudiar el verdadero efecto que ejerce el fosfoinosítido, midiendo la actividad del canal cuando se suprime el putativo sitio de interacción.

Si bien la interacción se puede atribuir a la alta cantidad de cargas positivas presentes en los carboxilos terminales, esto se descarta debido a la especificidad del ensayo, ya que la alta cantidad de lavados realizados entre cada etapa elimina cualquier interacción inespecífica. Además, la reproducibilidad del ensayo nos asegura su especificidad, siendo esto una ventaja que nos permite proyectar a lo que ocurriría *in vivo*. Para demostrar y confirmar esta especificidad se podrían complementar estos mismos experimentos con análogos y derivados de PIP<sub>2</sub>.

Con respecto a las proyecciones de este trabajo, resultaría atractivo complementarlo con experimentos que determinen un sitio específico de unión, ya sea deleciones de un putativo sitio o mutaciones de aminoácidos, específicamente de carga positiva, presentes en el carboxilo Terminal y luego determinar si se altera la unión a PIP<sub>2</sub> mediante ensayos PLO. Para el caso de TRPV1 se puede realizar un tipo más específico de ensayo, que nos permita obtener una constante de afinidad, y así determinar si existe más de un sitio de interacción, lo cual también resulta beneficioso para TRPM8. Una vez dilucidado el o los sitios, determinar el efecto que ejerce PIP<sub>2</sub> en el canal completo, pero con el sitio de interacción suprimido. Esto resultaría un gran aporte en el entendimiento de la modulación de estos canales, a los cuales se les involucra en una gran variedad de patologías, entre las cuales se encuentra la hiperalgesia.

Con este trabajo hemos dado un paso importante en el comienzo del entendimiento del efecto que involucra a  $PIP_2$ , este segundo mensajero que interactúa con los canales TRPV1 y TRPM8, específicamente, con sus C-terminales, modulando así su actividad. Como se dijo anteriormente, aún queda por dilucidar un sitio específico de interacción y el verdadero efecto que ejerce sobre TRPV1.

## REFERENCIAS

Aaij C, Borst P, 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 269: 192-200.

Abe J, Hosokawa H, Sawada Y, Matsumura K, Kobayashi S, 2006. Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC activation mediates menthol-induced desensitization of transient receptor potential M8. *Neurosci Lett* 397, 140-144.

Alexander T.Stein, Carmen A.Ufret-Vincenty, Li Hua, Luis F.Santana, Sharona E.Gordon, 2006. Phosphoinositide 3-Kinase Binds to TRPV1 and Mediates NGF-stimulated TRPV1 Trafficking to the Plasma Membrane. *J.Gen.Physiol.* 128, 509-522.

Birnbaumer L, Yidirim E, Abramowitz J, 2003. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *cell calcium* 33, 419-432.

Burnette WN, 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D, 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, BasbaumAI, Chao MV, Julius D, 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mediated inhibition. *Nature* , 957-962.

Clapham DE, 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW, 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.

Dowler S, Kular G, Alessi DR, 2002. Protein lipid overlay assay. *Sci. STKE.* 2002: L6.

Jiehong Huang, Xuming Zhang, Peter A.McNaughton, 2006. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* in press.

Julius D, Basbaum AI, 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Liu B, Ma W, Ryu S, Qin F, 2004. Inhibitory modulation of distal C-terminal on protein kinase C-dependent phospho-regulation of rat TRPV1 receptors. *J. Physiol* 560: 627-638.

Liu B, Qin F, 2005a. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25: 1674-1681.

Liu B, Qin F, 2005b. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25: 1674-1681.

Liu B, Zhang C, Qin F, 2005. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25: 4835-4843.

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D, 2002a. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58.

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D, 2002b. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58.

Mohapatra DP, Nau C, 2003. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278: 50080-50090.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, 2002a. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108: 595-598.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX, 2002b. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* 9: 229-231.

Montell C, Rubin GM, 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323.

Moran MM, Xu H, Clapham DE, 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14: 362-369.

Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M, 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 8002-8006.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M, 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* 277: 13375-13378.

Nuria Garcia-Sanz, Asia Fernandez-Carvajal, Cruz Morenilla-Palao, Rosa Planells-Cases, Emmanuel Fajardo-Sanchez, Gregorio Fernandez-Ballester, Antonio Ferrer-Montiel, 2004. Identification of a Tetramerization Domain in the C Terminus of the Vanilloid Receptor. *J. Neurosci* 24[23], 5307-5314.

P.Cesare, A.Moriondo, V.Vellani, P.A.McNaughton, 1999. Ion channels gated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7658-7663.

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V, 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 529-539.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B, 2005. TRP channels: An overview. *cell calcium* 38, 233-252.

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A, 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715.

Premkumar LS, Raisinghani M, Pingle SC, Long C, Pimentel F, 2005. Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J. Neurosci* 25, 11322-11329.

Prescott ED, Julius D, 2003a. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300: 1284-1288.

Prescott ED, Julius D, 2003b. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300: 1284-1288.

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE, 2005d. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8: 626-634.

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE, 2005c. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8: 626-634.

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE, 2005a. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8: 626-634.

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE, 2005b. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8: 626-634.

S.Brauchi, G.Orta, M.Salazar, E.Rosenmann, R.Latorre, 2006. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J.Neurosci* 26, 4835-4840.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Smith CUM., 2000. *Biology of Sensory Systems*. Wiley.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 4350-4354.

Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklicky L, 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.* 23: 1340-1350.

Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B, 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.

Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B, 2005. Sensing with TRP channels. *Nature Chem Biol* 1, 85-92.

X.Zhang, J.Huang, P.A.McNaughton, 2005. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal* , 1-13.