

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Fisiología Celular**

**ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD Y LA LOCALIZACIÓN CELULAR  
DE MIEMBROS DE LA FAMILIA TRPC.**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Presenta

QFB Alfonso R. Salgado Aguayo

Director de Tesis: Dr. Luis A. Vaca Domínguez

México, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 126N del Departamento de Biología Celular, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Luis A. Vaca. Algunos experimentos se llevaron a cabo en el Rammelkamp Center for Education and Research, MetroHealth Hospital, en Cleveland, OH, USA con la colaboración del grupo de la Dra. Diana Kunze.

El proyecto recibió financiamiento por parte de CONACyT (D39822 y D42469). A.S. recibió el apoyo de una beca para estudios de doctorado por parte de CONACyT.

Dedico esta tesis a Nohemí. Ya sabes lo que significa tu apoyo para mí.

Agradezco profundamente a:

El Dr. Luis Vaca por permitirme trabajar y desarrollarme en su laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio 126N. De todos aprendí mucho.

A todos los amigos que hice durante mi estancia en el IFC

A mi familia, que siempre me ha respaldado.

Y por supuesto a Nohemí, quien me prestó fuerza para superar las inevitables frustraciones del trabajo experimental.

## Abreviaturas

2-APB	2-aminoetoxifenilborato
ADP	Difosfato de adenosina
ANKTM1	Proteína tipo Ankirina con dominios Transmembranales
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
Bk2R	Receptor de Bradicinina 2
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	DNA complementario
CHO	Células de ovario de hamster chino
CIRB	Sitio de Unión Común CaM/IP3R
DAG	Diacil-glicerol
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DS	Desviación estándar
EBP50	Fosfoproteína 50 de unión a Ezrina-radixina-moesina
eCFP	Proteína cian fluorescente
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
eGFP	Proteína verde fluorescente
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERM	Familia de proteínas Ezrina/Radixina/Moesina
eYFP	Proteína amarilla fluorescente
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FRET	Transferencia resonante de energía de fluorescencia
GAPDH	Deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GST	Glutación-S-transferasa
GTP	Trifosfato de guanosina
H1R	Receptor de Histamina
H1R	Receptor de histamina 1
HEDTA	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
HEK	Células embrionarias de riñón humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
IP3	Inositol-trifosfato
IP3R	Receptor de Inositol-trifosfato
IRES	Sitio de unión interna al ribosoma
MBP	Proteína de unión a Maltosa
mRNA	RNA mensajero
mV	Milivoltios
MW	Peso Molecular
nA	Nanoamperes
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NHERF	Factor regulador del intercambio Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NMDG	N-metil-D-glucamina
NompC	No Mecanoreceptor Potencial C
ORF	Marco de lectura abierto

pA	picoamperios
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	Dominio <i>Postsynaptic density, disc large, ZO-1</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP5K	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa
PLC	Fosfolipasa C
pS	picosiemens
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Interferencia por RNA
RTPCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
RyR	Receptor de Ryanodina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida con SDS
siRNA	RNA pequeño interferente
SOCE	Entrada de calcio operada por almacenes
STIM	Molécula de interacción del estróma
TFP	Dimaleato de Trifluoperazina
TM	Transmembranal
TRP	Potencial Transitorio de Receptor
TRPA	Familia TRP ANKTM1
TRPC	Familia TRP clásico
TRPM	Familia TRP Melastatina
TRPML	Familia TRP Mucolipina
TRPN	Familia TRP NompC
TRPP	Familia TRP Policistina
TRPV	Familia TRP Vainilloide
W7	N-aminoheptil-5-cloro-1-naftalensulfonamida
WT	Fenotipo silvestre
ZO1	Proteína Zonula Occludens-1

RESUMEN .....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN .....	6
Las familias del Grupo I de TRPs.....	7
La familia TRPC .....	9
TRPC1.....	11
TRPC5.....	17
JUSTIFICACIÓN AL TRABAJO DE TESIS Y OBJETIVOS GENERALES .....	20
ANTECEDENTES DEL PROYECTO I .....	21
HIPÓTESIS.....	22
Objetivos particulares .....	22
ANTECEDENTES DEL PROYECTO II.....	23
HIPÓTESIS.....	24
Objetivos particulares .....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
Construcciones de DNA y mutagénesis.....	25
Cultivo celular y transfecciones.....	26
Análisis de la expresión de mRNA de mTRPC5 por RT-PCR.....	27
Ensayos de unión de CaM.....	28
Ensayo de biotinilación de superficies celulares .....	28
Mediciones del potencial de membrana por fluorescencia .....	29
Generación de líneas estables .....	30
Medición de corrientes en configuración de célula entera ( <i>Whole-cell</i> ).....	30
Análisis de datos y ajuste de curvas.....	31
Fluorescencia y microscopía confocal .....	32
Mediciones de Ca <sup>2+</sup> con Fura-2 en poblaciones celulares .....	33
RESULTADOS.....	34
1. LAS INTERACCIONES CALCIO-CALMODULINA MODULAN LA ACTIVIDAD DEL CANAL TRPC5.....	34
Cinética de activación de mTRPC5 por agonistas .....	34
La calmodulina acelera la cinética de activación de mTRPC5.....	36
Identificación de dos sitios de unión a CaM en el extremo Carboxilo terminal de mTRPC5 .....	37
La activación del canal mTRPC5 se ve alterada por la mutación de los sitios de unión a CaM.....	39
Efectos inhibitorios de altas concentraciones intracelulares sostenidas de Ca <sup>2+</sup> sobre la activación de mTRPC5.....	41
La activación lenta de mTRPC5 en respuesta a la estimulación con agonista no se debe a su translocación a la membrana plasmática.....	44
2. Estudios sobre la regulación de la localización celular y la función del canal TRPC1 humano por otros miembros de la familia TRPC .....	47
La proteína TRPC1 exógena se expresa principalmente en membranas celulares internas.....	47
Mediciones de pot de membrana de células coexpresando TRPC1 y TRPC5 .....	49
El canal TRPC1 humano parece ser funcional en el RE.....	57
Oscilaciones de Ca <sup>2+</sup> inducidas por agonistas, mediadas por TRPC1 .....	64
DISCUSIÓN .....	66
BIBLIOGRAFÍA .....	74



## RESUMEN

El monómero TRPC5 forma canales catiónicos no selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , importantes para el crecimiento de neuritas y para la morfología del cono de crecimiento de neuronas de hipocampo. En el presente trabajo se estudió la activación de TRPC5 murino expresado en células CHO y HEK293 en respuesta a la estimulación con agonistas de diversos receptores acoplados a la cascada de señalización de fosfatos de inositol, así como el papel de la calmodulina (CaM) en dicha activación. Mostramos que la aplicación exógena de  $10 \mu\text{M}$  CaM por la pipeta de *patch*, acelera la activación inducida por agonistas del canal en un factor de 2.8, con una reducción en la constante temporal de activación 50 del canal, de  $4.25 \pm 0.4$  a  $1.56 \pm 0.85$  min. Identificamos un nuevo sitio de unión a CaM localizado en el extremo carboxilo de TRPC5, a 95 aminoácidos río abajo del ya descrito sitio común de unión a CaM/IP<sub>3</sub>R (CIRB), presente en todas las proteínas TRPC. La ablación de este nuevo sitio de unión a CaM atenuó la aceleración en la activación del canal inducida por CaM. Sin embargo, la destrucción del dominio CIRB de TRPC5 provocó que este canal no respondiera a la estimulación por ningún agonista, sin modificar la expresión del canal en la superficie celular. Además, mostramos que altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $> 5 \mu\text{M}$ ) inhiben la densidad de corrientes sin afectar el curso temporal de la activación de TRPC5 por agonistas de diversos receptores. Estos resultados demuestran que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tiene un efecto dual en la activación de TRPC5. El nuevo sitio de unión a CaM es importante para la facilitación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, mientras que el dominio CIRB resulta crítico para la activación del canal TRPC5 inducida por receptores.

Por otro lado, los miembros de la familia de canales iónicos TRPC son capaces de formar canales homo- y heterotetraméricos. Dependiendo en el estudio, TRPC1 se ha

detectado tanto en la superficie como en el interior de la célula, probablemente en el retículo endoplásmico (RE). De igual manera, TRPC1 se ha descrito como un canal operado por almacenes, o como uno incapaz de funcionar al formar homotetrámeros. Es posible que las diferencias aparentes en la expresión y la función de TRPC1 se deban a su asociación con otras proteínas, probablemente de la misma familia TRPC. En el presente estudio empleamos microscopía confocal y TRPC1 fusionado a una proteína fluorescente, para examinar la localización de esta proteína al ser coexpresada con otros miembros de la familia TRPC. Un sensor de calcio basado en FRET, fusionado a TRPC1, fue empleado para examinar la funcionalidad del TRPC1 intracelular. Nuestros resultados muestran que TRPC4 y TRPC5 fueron capaces de aumentar la cantidad de TRPC1 expresado en la membrana, de acuerdo a resultados de microscopía confocal y registros de *patch-clamp*. El sensor basado en FRET fusionado a TRPC1, sugiere fuertemente que esta proteína forma canales homotetraméricos funcionales expresados en el RE, activados por agonistas de la cascada del IP<sub>3</sub>. Estos resultados indican que TRPC1 es una proteína funcional capaz de formar canales intracelulares de liberación de Ca<sup>2+</sup> al ser expresados solos, y canales en la membrana plasmática al ser coexpresados con TRPC4 o TRPC5, pero no con TRPC3 ni TRPC6. Ambas formas del canal se activan al añadir agonistas que activan la vía de la PLC.

## ABSTRACT

TRPC5 forms  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable nonselective cation channels important for neurite outgrowth and growth cone morphology of hippocampal neurons. Here we studied the activation of mouse TRPC5 expressed in Chinese hamster ovary and human embryonic kidney 293 cells by agonist stimulation of several receptors that couple to the phosphoinositide signaling cascade and the role of calmodulin (CaM) on the activation. We showed that exogenous application of 10  $\mu\text{M}$  CaM through patch pipette accelerated the agonist-induced channel activation by 2.8-fold, with the time constant for half-activation reduced from  $4.25 \pm 0.4$  to  $1.56 \pm 0.85$  min. We identified a novel CaM-binding site located at the C terminus of TRPC5, 95 amino acids downstream from the previously determined common CaM/ $\text{IP}_3\text{R}$  binding (CIRB) domain for all TRPC proteins. Deletion of the novel CaM-binding site attenuated the acceleration in channel activation induced by CaM. However, disruption of the CIRB domain from TRPC5 rendered the channel irresponsive to agonist stimulation without affecting the cell surface expression of the channel protein. Furthermore, we showed that high ( $>5 \mu\text{M}$ ) intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  inhibited the current density without affecting the time course of TRPC5 activation by receptor agonists. These results demonstrated that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  has dual and opposite effects on the activation of TRPC5. The novel CaM-binding site is important for the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated facilitation, whereas the CIRB domain is critical for the overall response of receptor-induced TRPC5 channel activation.

Members of the Canonical Transient Receptor Potential (TRPC) family of ionic channels are able to form homo- and heterotetrameric channels. Depending on the study, TRPC1 has been detected on both the surface and inside the cell, probably in the endoplasmic reticulum (ER). Likewise, TRPC1 has been described both as a store-

operated channel and as one unable to function when forming a homotetramer. It is possible that the apparent differences in the expression and function of TRPC1 are due to its association with other proteins, possibly from the same TRPC family. In the present study we used confocal microscopy and a fluorescently tagged TRPC1 to examine the localization of this protein when co-expressed with other members of the TRPC family. Whole-cell and single channel Electrophysiological recordings were conducted to study the function of TRPC1 expressed alone or co-expressed with other members of the TRPC family. A FRET-based calcium sensor fused to TRPC1 was used to assess the functionality of the intracellular TRPC1. Our results showed that TRPC4 and TRPC5 were able to increase the amount of membrane-expressed TRPC1 as evaluated by confocal microscopy and patch clamp recordings. The FRET-based calcium sensor fused to TRPC1 strongly suggests that this protein forms ER-expressed functional homotetrameric channels activated by agonists coupled to the IP3 cascade. These results indicate that TRPC1 is a multifunctional protein able to form intracellular calcium release channels when expressed alone, and plasma membrane channels when co-expressed with TRPC4 or TRPC5, but not TRPC3 or TRPC6. Both (ER and plasma membrane) forms of the channel are activated upon addition of agonists coupled to the IP3 cascade.

# INTRODUCCIÓN

Los canales TRP se clonaron por primera vez en la mosca *Drosophila melanogaster* gracias a una mutante espontánea, cuyos fotorreceptores son incapaces de mantener el potencial eléctrico elevado en respuesta a estímulos luminosos continuos, presentando únicamente una respuesta transitoria (de ahí el nombre de la mutante: *Transient Receptor Potential* o TRP) <sup>1</sup>. La proteína mutada en la mosca TRP resultó ser un canal catiónico activado en respuesta a la cascada de señalización encendida en respuesta a los estímulos luminosos; esta proteína fue nombrada TRP, y resultó ser el miembro fundador de una superfamilia de canales catiónicos. Estos canales juegan un papel crítico en la respuesta a muchos tipos de estímulos externos, como luz, sonido, sustancias químicas (iones, moléculas orgánicas exógenas, lípidos, nucleótidos, etc , temperatura y presión mecánica<sup>2</sup>). Estos canales también le permiten a las células detectar cambios en el microambiente, como alteraciones en pH o en osmolaridad <sup>3</sup>.

Los miembros de la superfamilia de canales TRP se expresan en gran cantidad de organismos, desde las levaduras hasta los humanos, pasando por nemátodos, moscas de la fruta y pez cebra <sup>1</sup>. La superfamilia TRP se divide en dos grandes grupos, a su vez divididos en un total de siete familias. En levaduras existe otra familia, la familia TRPY, lejanamente relacionada con los TRPs de los dos grupos principales expresados en animales superiores.

El grupo I de TRPs consiste en las 5 familias que tienen la mayor homología con el canal TRP de *Drosophila*, el miembro fundador de la superfamilia TRP por ser el primero descrito. De estas 5, la familia con mayor homología al canal TRP de *Drosophila* es la familia TRPC (TRPs clásicos o canónicos). Nombradas de acuerdo al

nombre del primer miembro descrito en cada familia (ver más adelante), las otras 4 familias pertenecientes al grupo I de TRPs son TRPV, TRPM, TRPA y TRPN.

El grupo II incluye proteínas con poca identidad con los TRPs del grupo I, divididas en dos familias: TRPP (así nombrada por la proteína Policistina, miembro fundador de esta familia) y TRPML (de igual manera, nombrada por la Mucolipina). De este grupo solo se mencionará que mutaciones en el canal TRPP2 (también llamado policistina-2) son responsables de la enfermedad autosómica dominante de riñón poliúístico <sup>4</sup>, mientras que el canal TRPML1 (también conocido como mucolipina-1) se encuentra mutado en pacientes con mucolipidosis tipo IV<sup>5</sup>. En esta enfermedad el metabolismo del hierro se encuentra alterado; dado que TRPML1 es un canal permeable a Fe<sup>2+</sup>, se postula que las mutaciones en esta proteína generan los síntomas observados en la mucolipidosis IV. <sup>6</sup>

### **Las familias del Grupo I de TRPs.**

Todos los TRPs del grupo I comparten una región con homología que abarca sus seis segmentos transmembranales, incluyendo el dominio putativo de poro, localizado entre el quinto y el sexto segmento transmembranal. Además, las familias TRPC, TRPM y TRPN tienen un dominio conocido como “dominio TRP” después del sexto segmento transmembranal; dicho dominio tiene un par de "cajas TRP" con secuencias muy conservadas.

El primer miembro descrito de la familia TRPV en mamíferos se encontró al clonar el receptor de capsaicinas (de ahí la V en TRPV, pues la capsaicina es el Vainilloide responsable de la sensación de picor en alimentos picantes). Esta proteína, TRPV1, también es activada por temperaturas mayores a 43°C <sup>7</sup> y por diversos químicos, y su actividad se ve incrementada a pH bajo <sup>7</sup>. TRPV2 también es un canal

activado por temperatura, en particular por calor dañino (mayor a 52°C, <sup>8</sup>). De igual manera, TRPV3 y TRPV4 se activan por temperatura, en los rangos de 33 a 39°C y 27 a 34°C, respectivamente. Aun no se conocen las señales de activación de los canales TRPV5 y TRPV6, los otros dos miembros de esta familia <sup>9</sup>.

La familia TRPM tiene 8 miembros en los mamíferos. El primer TRPM identificado en mamíferos, TRPM1, se nombró Melastatina ya que sus niveles de expresión eran inversamente proporcionales al potencial metastásico de algunas líneas celulares derivadas de melanomas. Los canales TRPM2, 6 y 7 tienen dominios enzimáticos en sus extremos carboxilo-terminales. El canal TRPM2 tiene un dominio de pirofosfatasa de ADP-ribosa, y el canal se activa por ADP-ribosa, pirimidinas y NAD<sup>10</sup> <sup>11</sup>. Se cree que es un sensor redox, y se activa por agentes productores de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. La actividad constitutiva de TRPM3 es aumentada por hipotonicidad. Los canales TRPM4/5 son regulados por voltaje, activados por Ca<sup>2+</sup>, y selectivos para cationes monovalentes <sup>12</sup>, <sup>13</sup>. Además, el canal TRPM5 es activado por temperaturas en el rango de 15 a 35°C <sup>14</sup>, y participa en las cascadas de señalización activadas en los sensores de sabor en la lengua<sup>15</sup>. Los canales TRPM6 y 7 tienen dominios de cinasa de proteínas en sus extremos carboxilo-terminal, y su actividad parece ser regulada por pH y ATP (<sup>16</sup>). Por último, el canal TRPM8 se regula también por temperatura, en un rango de 23 a 28°C, y por compuestos que evocan sensaciones de frescura, como el mentol <sup>17,18</sup>. Tanto TRPM8 como TRPV1 son canales dependientes de voltaje; la temperatura de activación, así como los ligandos mencionados, cambian el voltaje al que se activan hacia potenciales de membrana más fisiológicos <sup>19, 20</sup>.

TRPA1 es la única proteína de la familia TRPA que se ha encontrado en mamíferos; su nombre originalmente fue ANKTM1 (*Ankyrin-like protein with transmembrane domains* <sup>2</sup>). Este canal es activado por el  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol <sup>21</sup> y

compuestos que producen sensaciones picantes al gusto y al olfato. Fisiológicamente, es posible que TRPA1 también sea un canal sensible a la temperatura, pues algunos reportes indican su activación a temperaturas peligrosamente bajas ( $<15^{\circ}\text{C}$ )<sup>22</sup>.

Los mamíferos no tienen homólogos de canales TRPN. Esta familia de canales tiene como único miembro al canal NompC (*No mechanoreceptor potential C*). De acuerdo a estudios en *Drosophila*, pez cebra y *C. elegans*, estos canales podrían ser regulados por estímulos mecánicos<sup>23</sup>; en los invertebrados NompC no sólo se encuentra expresado en órganos mecanosensibles, sino que en su ausencia, se detectan defectos en la fisiología mecanosensorial, mientras que en el pez cebra se ha propuesto que TRPN1, el homólogo de NompC, juega un papel importante en la audición.<sup>24</sup>

## La familia TRPC

En mamífero se han encontrado 7 proteínas pertenecientes a la familia TRPC. Sin embargo, en humanos sólo se expresan 6, pues TRPC2 es un pseudogen<sup>25</sup>. Los siete miembros de esta familia comparten en su extremo amino-terminal más del 30% de identidad entre ellos y con el TRP original de *Drosophila*. Se les clasifica según su similitud en los siguientes subgrupos: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 y TRPC4/5. Para su activación, todos requieren la actividad de la PLC, aunque la manera en que se acopla la actividad de estos canales con la de la PLC varía según el canal. También se ha sugerido que varios canales TRPC pueden ser activados por el vaciamiento de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Zhu, Birnbaumer y colaboradores<sup>26, 27</sup> demostraron que las proteínas TRPC tienen múltiples sitios putativos de unión con calmodulina (CaM) en sus extremos amino y carboxilo. Inclusive, se ha observado que algunos sitios de unión a CaM se sobrelapan con un sitio de unión al receptor de  $\text{IP}_3$  (conocidos como dominios CIRB). Se demostró *in vitro* que existe competencia entre péptidos de CaM y de  $\text{IP}_3\text{R}$



por este sitio, lo cual sugiere una regulación dinámica de los canales TRPC por interacciones competitivas entre  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  y el  $\text{IP}_3\text{R}$  <sup>26</sup>.

De estos canales, y a pesar de haber sido el primero en identificarse, el canal TRPC1 es el más enigmático en cuanto a su activación y regulación, pues hay evidencia que apoya las diversas hipótesis sobre la activación de este canal: el homotetrámero de TRPC1 es un canal operado por los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , o es operado por receptores, o activado por diacil-glicerol (DAG), o regulado por el  $\text{IP}_3\text{R}$  (estas hipótesis sobre la activación del canal pueden revisarse en <sup>28</sup>). Incluso se ha reportado que, expresado como homotetrámero, no es funcional (<sup>29</sup> y referencias en ese artículo). En general se acepta que al ser expresado como complejo heterotetramérico con TRPC3, TRPC4 o TRPC5, TRPC1 funciona como parte de un canal operado por receptor asociado a la proteína  $\text{G}_{q/11}$  (revisado más a detalle abajo).

El canal TRPC2 no se expresa en humano, pues el gen codifica para una proteína truncada no funcional, y se le considera un pseudogen. En roedores, TRPC2 se expresa en el órgano vomeronasal y parece ser necesario para la transducción de señales debida a feromonas <sup>30</sup>.

Las proteínas TRPC4 y TRPC5 son las que más homología comparten dentro de la familia TRPC, y funcionan como canales catiónicos no selectivos activados por GPCR y por receptores con actividad de cinasas de tirosina <sup>31, 32</sup>. Aunque la activación de estos canales parece requerir la actividad de la PLC, ni el  $\text{IP}_3$  ni el DAG por si solos son capaces de activarlos <sup>32, 33</sup>. Ambos canales, al ser expresados por separado, generan corrientes con una relación I-V doblemente rectificante. Estos canales se expresan en gran cantidad de tejidos y presentan la misma distribución en el cerebro, lo cual sugiere una heteromerización funcional.

Los canales formados al interactuar con TRPC1 tienen propiedades biofísicas que los distinguen del canal homotetramérico: tanto TRPC1+TRPC4 como TRPC1+TRPC5 presentan una curva I-V más sencilla que la correspondiente al canal homotetramérico TRPC4 o TRPC5, además la conductancia a nivel de canal único de TRPC1+TRPC5 es significativamente menor que la del homómero de TRPC5<sup>34</sup>. TRPC5 además regula la morfología de los conos de crecimiento en hipocampo, en donde, de manera interesante, se excluye a TRPC1. Además el canal TRPC5 homotetramérico, pero no el heterotetrámero de TRPC1+TRPC5, se transloca rápidamente a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación de receptores para factores de crecimiento<sup>35</sup>.

Las proteínas TRPC3, TRPC6 y TRPC7 comparten un 65-78% de identidad, y generan corrientes catiónicas similares, no selectivas y doble-rectificadoras al ser activadas por GPCRs o DAG. Tanto TRPC3 como TRPC6 parecen jugar un papel central en la atracción del cono de crecimiento en células granulares del cerebelo de ratas: la expresión de dominantes negativos de TRPC3 o TRPC6, así como la inhibición de la expresión de TRPC3 con siRNA, abate la atracción del cono de crecimiento por el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) en células del cerebelo<sup>36</sup>. A diferencia de TRPC5, cuyo nivel de expresión afecta la extensión de la neurita, la inhibición de la expresión de TRPC3 no influye en el crecimiento de la neurita.

## **TRPC1**

TRPC1 tiene una amplia expresión: se le ha detectado en una gran cantidad de tejidos y tipos celulares en rata, ratón y humano (revisado en<sup>29</sup>). El gen que codifica para TRPC1 se encuentra en el cromosoma 3 humano, y en el ratón se encuentra en el cromosoma 9. Los genes de ambas especies tienen 13 exones que forman el marco de lectura abierto.

En cuanto a la proteína, los análisis de hidropatía indican que tiene de seis a ocho segmentos transmembranales, aunque en el modelo más favorecido el número de segmentos transmembranales es de 6. Casi la mitad de la proteína de TRPC1 está en el extremo amino citoplásmico, antes del primer segmento transmembranal. Este extremo contiene tres repeticiones de motivos de ankirina, cada uno de 30 aminoácidos; se les llama así porque la proteína de citoesqueleto ankirina tiene un alto número de dichos motivos. En este mismo extremo hay un dominio “coiled-coil”<sup>37</sup>, igual que en el extremo carboxilo. Estas estructuras son importantes para la oligomerización de subunidades. Existen sitios consenso para la fosforilación por la proteína-quinasa C y por la proteína-quinasa A en ambos extremos de la proteína; también existe un sitio de fosforilación por quinasas de tirosina en el extremo carboxilo, el cual se sobrelapa con el primer dominio de unión a calmodulina.

En cuanto a su función, una revisión de la literatura sobre TRPC1 muestra que rara vez se ha logrado tener señales fuertes en respuesta a la sobreexpresión de TRPC1, ya sea con mediciones electrofisiológicas o de fluorescencia del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esto se debe a que la mayor parte del TRPC1 sobreexpresado no llega a la membrana plasmática, sino que se queda en membranas intracelulares<sup>38, 39, 40, 41</sup>. Esta localización se ha observado tanto con TRPC1 fusionado a epítomos como HA o FLAG o a la proteína verde fluorescente (GFP), como con TRPC1 silvestre sobreexpresado, detectado con anticuerpos policlonales<sup>39, 42</sup>. Sin embargo también se ha detectado TRPC1 sobreexpresado localizado en la membrana plasmática de neuronas del ganglio superior cervical<sup>43</sup>, así como en células de glándulas submandibulares, en células de músculo liso y en células H4IIE<sup>44, 38, 39, 37, 45</sup>.

Como ya se mencionó, resulta difícil hacer estudios funcionales de TRPC1 por su localización intracelular. En uno de ellos<sup>46</sup>, TRPC1 se sobreexpresó en células sf9,

gracias a lo cual se pudieron obtener las características del canal formado por TRPC1, aunque no se investigó si se trataba de un canal homomérico, o si estaba formando un heterómero, o incluso si se estaba midiendo la actividad de otro canal nativo, estimulado por TRPC1. En cualquier caso, este estudio probó que TRPC1 puede actuar como un canal permeable a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Ba}^{2+}$ , pero no a  $\text{Sr}^{2+}$  ni a N-metil-D-glucamina. El canal es bloqueado por  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  (en concentraciones de alrededor de 1 a 10  $\mu\text{M}$ ), 80  $\mu\text{M}$  de 2-aminoetoxifenilborato (2-APB), o 20  $\mu\text{M}$  de Xestospongina C, pero no por  $\text{Zn}^{2+}$ . Cuando el canal se expresa por sí solo, su curva I-V solo muestra una leve rectificación a lo largo de un amplio rango de voltajes, sugiriendo que el canal tiene poca dependencia de voltaje <sup>46</sup>.

El diacilglicerol (DAG) tiene poco efecto en TRPC1, siendo mayor su capacidad de estimularlo en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular <sup>47</sup>. La maitotoxina, un eter policíclico producido por *Gambierdiscus toxicus* (el dinoflagelado parcialmente responsable de los efectos de la marea roja), es capaz de estimular a TRPC1 sobreexpresado <sup>38</sup>. Uno de los temas más discutidos en cuanto a la activación de TRPC1 es su respuesta al estado de llenado de los almacenes intracelulares de calcio. En algunos estudios la actividad basal del canal resulta insensible al vaciamiento de los almacenes <sup>37, 46</sup>, mientras que en otros, la sobreexpresión de TRPC1 aumenta la Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  Operada por Almacenes (SOCE) <sup>44, 43, 48, 49</sup>. En varios estudios se usó la técnica de interferencia por RNA (RNAi) para inhibir la traducción de TRPC1; como resultado se ha observado la disminución de SOCE en células CHO (usando RNA de doble hebra)<sup>50</sup>, en células de glándulas submandibulares <sup>44</sup>, en células humanas endoteliales en cultivo<sup>51</sup>, en HEK 293<sup>52</sup>, en la línea celular de epitelio de pulmón humano A249 y en células de músculo liso de arterias pulmonares humanas<sup>53</sup>. Por otro lado, este mismo método ha producido resultados contradictorios en ovocitos de *Xenopus* <sup>54, 55</sup>. Es importante, a la hora de

interpretar estos resultados, tomar en cuenta que todos fueron hechos en líneas celulares o en células cultivadas. Además, la inhibición de la expresión de una proteína puede tomar varios días, tiempo en el cual las células podrían compensar su ausencia. Con el uso de anticuerpos se ha obtenido evidencia más directa del papel de TRPC1 en SOCs, en células nativas. Por ejemplo la preincubación con un anticuerpo anti-TRPC1 redujo el SOCE en células de músculo liso arteriolar <sup>45</sup>. Se obtuvo un resultado parecido en plaquetas <sup>56</sup>, en células humanas de eritroleucemia <sup>57</sup>, y en células endoteliales bovinas, aunque en este caso dichas células fueron estimuladas con FGF <sup>58</sup>.

TRPC1 puede interactuar con diversas proteínas, además de otros miembros de la subfamilia TRPC. Por ejemplo, coinmunoprecipita con caveolina-1, proteína que se encuentra enriquecida en las caveolas<sup>59</sup>. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos, y representan dominios de señalización en la membrana plasmática <sup>60</sup>. Aparentemente caveolina-1 se une a una secuencia cercana al extremo amino de TRPC1, y esta unión parece jugar un papel en la inserción de TRPC1 en la membrana <sup>61</sup>. Otros estudios indican que la función de TRPC1 depende de la presencia de colesterol, o al menos de la integridad de las caveolas <sup>62</sup>.

TRPC1 también coinmunoprecipita con los tres tipos de IP<sub>3</sub>R (interactuando con el extremo amino terminal de los IP<sub>3</sub>R) y con la proteína G<sub>αq/11</sub> (acoplada funcionalmente a la PLCβ). <sup>59, 63, 64</sup>. Además, es capaz de interactuar con Policistina 2 <sup>40</sup>, una proteína que funciona como canal intracelular de liberación de Ca<sup>2+</sup> <sup>65</sup>, abriendo la posibilidad de que TRPC1 también pueda funcionar como canal intracelular. Esta idea sobre la expresión funcional intracelular de TRPC1 se refuerza por estudios donde la inhibición de la expresión de TRPC1 reduce la amplitud del pico de liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular <sup>53, 42</sup>. Sin embargo, estas

observaciones también podrían deberse a que los almacenes se rellenan de manera menos eficiente, o a que los IP<sub>3</sub>R son menos sensibles a IP<sub>3</sub><sup>53, 42</sup>.

La proteína Homer parece cumplir la función de un adaptador que une a TRPC1 con el IP<sub>3</sub>R; de acuerdo a los estudios realizados, la unión de Homer con TRPC1 mantiene al canal en un estado cerrado. Apoyando la teoría de que TRPC1 puede funcionar como un canal sensible al estado de llenado de los almacenes intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, se encontró que el vaciamiento de estos almacenes provocó una reducción en la cantidad de TRPC1 inmunoprecipitada por anticuerpos dirigidos contra Homer. La infusión intracelular de una isoforma corta de Homer incapaz de unirse al IP<sub>3</sub>R evocó corrientes espontáneas y suprimió corrientes reguladas por el vaciamiento de almacenes, indicando que Homer actúa no sólo como un adaptador entre ambos canales, sino también como un transductor de la señal de llenado del RE, regulando la actividad de TRPC1 al formar o romper el complejo TRPC1-IP<sub>3</sub>R<sup>66</sup>.

Por otro lado, también se ha comprobado una asociación funcional entre TRPC1 y el receptor de ryanodina (RyR). En el músculo esquelético, el RyR juega un papel central en el acoplamiento entre excitación y contracción, pues se asocia al receptor de dihidropiridinas, el cual, en respuesta a la depolarización de la membrana plasmática durante la excitación, sufre un cambio conformacional que a su vez induce la activación del RyR, provocando la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico. El RyR también está acoplado funcionalmente a las SOCE en ausencia del IP<sub>3</sub>R, pues el vaciamiento del RE en células que expresan RyR, pero no IP<sub>3</sub>R, es capaz de iniciar la SOCE<sup>67</sup>. De acuerdo a experimentos donde TRPC1 se elimina mediante RNAi en células CHO transfectadas con el RyR, la asociación funcional entre TRPC1 y el RyR es responsable en parte de la SOCE, aunque también existe un componente independiente de TRPC1.

De manera similar a la interacción descrita con el IP<sub>3</sub>R, la interacción parece darse con el extremo amino-terminal del RyR<sup>68</sup>.

Otras dos proteínas capaces de interactuar con los canales TRPCs, y cuya función ha atraído recientemente el interés de muchos grupos de investigación, son STIM1 y ORAI1. STIM1 es una proteína con un único cruce transmembranal. La eliminación de esta proteína elimina la entrada de Ca<sup>2+</sup> en respuesta al vaciamiento de almacenes<sup>69</sup>. Además STIM1 tiene un motivo de unión a Ca<sup>2+</sup> (mano EF) en su extremo amino, el cual podría funcionar como un sensor de Ca<sup>2+</sup> en el Retículo Endoplásmico (RE). STIM1 colocaliza al menos parcialmente con el RE, pero se reorganiza en estructuras punteadas después del vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca<sup>2+</sup><sup>70</sup>. Es posible que STIM1 module la actividad de canales iónicos en respuesta al estado de llenado del retículo; en este contexto es de gran relevancia el hecho de que STIM1 es capaz de interactuar con canales TRPC, regulando su actividad<sup>71</sup>. Por otro lado ORAI1 se identificó como una proteína necesaria para el SOCE, tanto por una búsqueda en *Drosophila* basada en siRNA<sup>72</sup> como por el análisis para identificar mutaciones responsables de una inmunodeficiencia severa caracterizada por la ausencia de la I<sub>CRAC</sub><sup>73</sup>. Esta proteína tiene cuatro dominios transmembranales; al ser coexpresada con STIM1, genera una corriente muy parecida a la corriente I<sub>CRAC</sub><sup>74</sup>, por lo que se postuló que ORAI1 era la proteína generadora del poro en la entidad responsable de la I<sub>CRAC</sub>. Sin embargo, recientemente se encontró que ORAI1 interactúa físicamente con los canales TRPC, brindándoles la capacidad de responder al vaciamiento de almacenes<sup>75</sup>.

## TRPC5

El canal TRPC5 fue originalmente clonado durante el análisis de una región del cromosoma X asociada con un tipo específico de retraso mental<sup>76</sup>. En general se considera que TRPC5 no es un canal operado por almacenes, sino por la activación de receptores de membrana<sup>77</sup>. Se expresa principalmente en el sistema nervioso central, en particular en neuronas del hipocampo. En un estudio realizado con una variante dominante negativa de TRPC5 expresada en neuronas del hipocampo en cultivo<sup>78</sup>, se observó que dichas células presentaban un incremento en la longitud de sus filopodios, así como en la longitud de la neurita y en el perímetro de los filopodios. Un estudio basado en el mismo sistema concluyó que la translocación de TRPC5 de vesículas intracelulares a la membrana plasmática es un punto clave en la regulación mediada por TRPC5 de la velocidad de extensión de las neuritas<sup>35</sup>. Estos estudios indican que TRPC5 juega un papel central en el crecimiento axonal y en la morfología del cono de crecimiento en neuronas del hipocampo.

Aparentemente TRPC5 es capaz de responder a diversas señales de activación en una misma célula: receptores, iones extracelulares (lantánidos, alto  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular), elevaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , e incluso el vaciamiento de los almacenes intracelulares de calcio<sup>79</sup>. En cuanto a su activación por receptores, se sabe que ocurre por un mecanismo dependiente de proteínas G, y que requiere la PLC<sup>80,77</sup> pero por sí solo, el DAG no es capaz de modificar la actividad de TRPC5. Aunque el vaciar previamente los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  no evita la activación de TRPC5 en respuesta a estímulos que activan la vía de la PLC, este canal es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y por lo tanto la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  podría facilitar la activación, aunque por un mecanismo desconocido. Cabe recordar que



TRPC5 interactúa con calmodulina, pero en otros canales TRPC la calmodulina es un transductor de una señal de retroalimentación negativa<sup>26, 64</sup>.

La activación de TRPC5 por iones extracelulares resulta de la unión directa de iones como  $Gd^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  al vestíbulo exterior del canal<sup>81</sup>. Existe debate en cuanto al mecanismo que genera esta activación, pues aunque en general estos iones se consideraban como facilitadores o potenciadores tras una activación *vía* receptores acoplados a proteína G, estudios más recientes indican un mecanismo de activación directo, aún en ausencia de señales derivadas de la activación de receptores acoplados a proteína G<sup>82</sup>.

También existe debate en cuanto a la activación de TRPC5 por el estado de los almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$ , pues aunque existen trabajos en los que no se ha podido observar este mecanismo de activación en TRPC5 murino<sup>31, 32, 34, 80, 83</sup>, también los hay en los que se muestra que el TRPC5 humano sí es capaz de actuar como un canal operado por los almacenes, fácilmente detectable cuando se inhiben los canales endógenos<sup>82</sup>; de manera parecida, los canales TRPC5 bovino, de rata y de conejo parecen estar regulados por los almacenes<sup>79</sup>, lo cual podría indicar una regulación diferente del canal según la especie investigada o, de acuerdo a los autores de dicho artículo, que TRPC5 es un canal multimodal activado por diversas señales. El hecho de que el mecanismo de activación de canales TRPC dependa de la especie no es único para TRPC5, pues se ha descrito que TRPC7 murino es activado exclusivamente en respuesta a estimulación de receptores<sup>84</sup>, mientras que el TRPC7 humano es activado exclusivamente por los almacenes de  $Ca^{2+}$ <sup>85</sup>. Esta diversidad en los mecanismos de activación de TRPC5 indica que en general la actividad de este canal puede depender del contexto celular, o de su localización en compartimientos membranales, o del nivel de expresión de la proteína.

Gracias a un motivo de interacción con dominios PDZ, localizado justo en el extremo carboxilo, TRPC5 (al igual que TRPC4) es capaz de interactuar con las proteínas NHERF y ZO1<sup>86, 87</sup>, las cuales contienen dominios PDZ. La interacción con NHERF es necesaria para la asociación de estos canales con PLC- $\beta$ , y según algunos estudios, regula su expresión en la membrana plasmática<sup>88</sup>. TRPC5 interactúa con stathmina y con algunas proteínas SNARE, que llevan el canal homomérico al cono de crecimiento de neuronas de hipocampo<sup>78, 35</sup>. TRPC5 se localiza en vesículas intracelulares móviles, que pueden fusionarse a la membrana rápidamente después de la estimulación con agonistas por un mecanismo dependiente de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), de Rac-1 y de la fosfatidilinositol-4-fosfato 5-cinasa (PIP5K)<sup>35</sup>

De manera interesante, a pesar de que el homómero de TRPC5 se localiza en los conos de crecimiento de neuronas de hipocampo<sup>78</sup>, el heterómero formado por TRPC1 y TRPC5 se localiza en las neuritas<sup>35</sup>. Al coexpresar TRPC1 y TRPC5, la conductancia unitaria del canal disminuye de 38 pS (en el canal formado por TRPC5 solo) a 5 pS (en el heterotetrámero<sup>34</sup>), y el supuesto heterotetrámero formado por TRPC1 y TRPC5 tiene casi la misma permeabilidad a Na<sup>+</sup> que a Ca<sup>2+</sup>. Además, aparentemente este canal heteromérico es activado por Ca<sup>2+</sup>. El canal es estimulado por la activación de los receptores muscarínicos y por lantano en células HEK 293<sup>34</sup>, pero no por tapsigargina ni por IP<sub>3</sub>. Cabe mencionar que se forma un heteromultímero similar entre TRPC1 y TRPC4; el ratón knock-out para TRPC4 tiene una seria deficiencia en SOCE en células endoteliales, las cuales coexpresan TRPC1 y TRPC4<sup>89</sup>.

# **JUSTIFICACIÓN AL TRABAJO DE TESIS Y OBJETIVOS GENERALES**

Se ha encontrado que tanto TRPC1 como TRPC5 son capaces de formar canales homotetraméricos, o heterotetraméricos al interactuar entre sí. No se cuenta con un modelo plenamente aceptado de la regulación de estos canales tanto en su forma homotetramérica como en su forma heterotetramérica; al respecto existen varias contradicciones en la literatura. De manera general, el objetivo del presente trabajo es explorar la modulación por segundos mensajeros y por calcio intracelular de los canales TRPC1 y TRPC5, ya sea de manera individual o formando heterotetrámeros. Otro objetivo es comparar las propiedades electrofisiológicas y la localización subcelular de los canales homo- y heterotetraméricos mencionados.

# ANTECEDENTES DEL PROYECTO “LAS INTERACCIONES CALCIO-CALMODULINA MODULAN LA ACTIVIDAD DEL CANAL TRPC5: IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DOMINIO CARBOXILO TERMINAL RESPONSABLE DE LA FACILITACIÓN MEDIADA POR CALCIO/CALMODULINA”

El canal TRPC5 ha recibido mucha atención por su capacidad de modular tanto la motilidad de los conos de crecimiento como la elongación de neuritas en el hipocampo de cerebros de mamífero<sup>78</sup>. TRPC5 se activa (mediante un mecanismo desconocido a la fecha) por receptores que estimulan a la PLC<sup>77</sup>. Su activación depende de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e intracelular, y aunque se conocen bien los residuos responsables de los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se desconoce el mecanismo de la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular<sup>32, 82</sup>. Un mecanismo común de regulación de proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  es su interacción con el complejo Calcio-Calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ), y es probable que este mecanismo sea responsable de la modulación de TRPC5 por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pues existe un sitio de interacción con CaM en el extremo carboxilo terminal de los canales TRPC (sitio CIRB, *Common CaM/IP<sub>3</sub>R Binding*)<sup>77</sup>, el cual también es capaz de interactuar con una secuencia en el extremo amino del receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ); es posible que  $\text{IP}_3\text{R}$  y CaM compitan por la unión con este sitio, afectando la actividad de TRPC5. En TRPC3 y 4, la unión con  $\text{IP}_3\text{R}$  activa al canal, mientras que la unión con CaM lo inhibe<sup>90</sup>. Se han descrito otros sitios de unión con CaM en miembros de la familia TRPC, aunque tanto la posición como la función de estos sitios secundarios varía según el TRPC investigado; estos segundos sitios de unión a CaM no se unen al  $\text{IP}_3\text{R}$ <sup>77</sup>. En TRPC5 también se ha descrito un sitio de unión a CaM alternativo al CIRB, aunque no se sabe qué papel podría jugar en la regulación de la actividad del canal<sup>26</sup>.

## HIPÓTESIS

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tiene un efecto dual sobre la regulación de TRPC5, ya que es capaz tanto de activarlo como de inhibirlo. Durante la activación de TRPC5 inducida por receptores, el segundo dominio de unión a Calmodulina (CBII) es responsable de la facilitación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Objetivos particulares

- Investigar los mecanismos de la dependencia de TRPC5 respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular
- Estudiar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la Calmodulina en la velocidad de activación y amplitud de las corrientes debidas a TRPC5
- Caracterizar estructuralmente el segundo sitio de unión a CaM en el canal TRPC5
- Explorar los papeles específicos de los dos sitios de unión a Calmodulina de TRPC5 en la modulación de su actividad, después de estimular receptores que activan la vía de la PLC

## **ANTECEDENTES DEL PROYECTO “REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR Y LA FUNCIÓN DEL CANAL TRPC1 HUMANO POR OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA TRPC”**

Se cuenta con información contradictoria al respecto de la capacidad de TRPC1 para formar canales homoméricos. Por ejemplo, se ha detectado la aparición de un canal relativamente sensible a DAG al sobreexpresar TRPC1<sup>47</sup>. Por otro lado, también se ha reportado, empleando líneas celulares distintas y metodologías distintas, la aparición de canales insensibles al estado de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>37, 46</sup> en respuesta a la sobreexpresión de TRPC1. Sin embargo, en respuesta a la misma maniobra se ha detectado un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  posterior al vaciamiento de los almacenes intracelulares<sup>44, 43, 48, 49</sup>. Al ser expresado como homotetrámero su localización es principalmente intracelular<sup>91</sup>, posiblemente en RE. Este hecho, aunado a la difícil detección de su actividad en experimentos de sobreexpresión, se ha interpretado como que el canal homotetramérico formado por TRPC1 no es funcional, aunque no se ha estudiado a profundidad su capacidad funcional al interior del RE. Se sabe que TRPC1 interactúa con TRPC4 y 5<sup>92</sup> y que la translocación de TRPC1 a la membrana plasmática depende de la expresión de TRPC4. Por lo tanto, es probable que la localización intracelular de TRPC1 al expresarse como homotetrámero sea resultado de un proceso activo de retención en el RE, de manera tal que sólo al interactuar con ciertas proteínas que sean capaces de llevarlo a la membrana plasmática, podrá TRPC1 expresarse funcionalmente en dicho sitio. Además existe evidencia funcional de que TRPC1 puede funcionar como canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  al estar expresado en RE<sup>53, 42</sup>, mientras que, al coexpresarse con TRPC4 o con TRPC5, forma canales con características distintas a los formados por homómeros de TRPC4 o TRPC5<sup>34</sup>.

## **HIPÓTESIS**

TRPC1 es un canal que puede expresarse funcionalmente tanto en el retículo endoplásmico, donde funciona como un canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$ , como en la membrana plasmática, donde, asociado con el canal TRPC5, funciona como parte de un canal catiónico no selectivo. Su localización depende de la presencia o ausencia de TRPC5.

### **Objetivos particulares**

- Comparar las propiedades funcionales del homotetrámero de TRPC1 con heterotetrámeros de TRPC1/TRPC5
- Estudiar los eventos que permiten la translocación de TRPC1 a la membrana plasmática
- Generar herramientas que permitan explorar la función de TRPC1 en el retículo endoplásmico
- Determinar la relevancia funcional de la translocación de TRPC1 a la membrana plasmática

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las sales y los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  empleadas son de grado analítico, de la compañía Sigma. El GTP y el ATP también se compraron a Sigma. La calmodulina de cerebro bovino, la bradicinina, la trombina humana, la histamina y los inhibidores de calmodulina N-aminohexil-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W7) y dimaleato de trifluoperazina (TFP) se compraron a Calbiochem. La solución de la pipeta (intracelular) para analizar las corrientes debidas a mTRPC5 contenía: aspartato de potasio 130 mM, KCl 5 mM, EGTA o HEDTA 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  7.39 mM (con EGTA 0.4  $\mu\text{M}$  libre), 5.07 mM (con HEDTA 5  $\mu\text{M}$  libre) o 6.73 mM (con HEDTA 10  $\mu\text{M}$  libre),  $\text{MgCl}_2$  1 mM, ATP 1 mM, GTP 2 mM, HEPES 10 mM a pH 7.2. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la pipeta se calcularon con el programa MaxChelator (ver más adelante). La solución extracelular contenía: NaCl 130 mM, KCl 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  1.7 mM, glucosa 5 mM y HEPES 10 mM pH 7.2.

Para medir las corrientes debidas al heterotetrámero de TRPC1-TRPC5 se usó la siguiente solución intracelular: aspartato de cesio 130 mM, CsCl 10 mM, EGTA 10 mM, ATP 1 mM, GTP 2 mM, HEPES 10 mM a pH 7.2 y  $\text{MgCl}_2$  a 1 mM. Para los experimentos de selectividad en la solución intracelular se sustituyó el aspartato de cesio con aspartato de potasio a la misma concentración, dejando el CsCl para eliminar contaminaciones con corrientes de potasio. En estos experimentos la solución extracelular contenía NaCl 130 mM, KCl 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, Glucosa 5 mM, HEPES 10 mM a pH 7.2, y  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  1.7 mM.

### **Construcciones de DNA y mutagénesis**

El cDNA para el ORF de TRPC5 murino (mTRPC5) se subclonó en el vector pIRESneo (Clontech, Mountain View, CA). La mutagénesis se realizó con el kit de mutagénesis



dirigida QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA), y todas las mutaciones se confirmaron por secuenciación del DNA. Las construcciones de las proteínas de fusión de la proteína de unión a maltosa (MBP) con distintos fragmentos de mTRPC5 se hicieron en el vector pAGA3 según un protocolo previamente establecido<sup>26</sup>. El cDNA del receptor de histamina tipo 1 de cobayo clonado en pcDNA3 fue un regalo del Dr. Michael Schaefer (Charité-Universitätsmedizin Berlin), y el del receptor de bradicinina tipo 2 de humano, fue un regalo del Dr. William W. Schilling (Case Western Reserve University).

Los plásmidos que contienen las proteínas mutantes derivadas de GFP, eCFP y eYFP se adquirieron de la compañía Clontech (Mountain View, CA). El plásmido que contiene el sensor de Ca<sup>2+</sup> por FRET (Chameleon) fue un generoso regalo del Dr. Ikura (Universidad de Toronto) . El plásmido que contiene el ORF del TRPC1 humano fue generosamente donado por el Dr. Ambudkar (NIH), y los plásmidos que contienen los ORFs de TRPC3 humano y TRPC4 murino fueron un regalo del Dr. Michael Zhu (Ohio State University). Mediante oligonucleótidos específicos y técnicas estándar de PCR se añadieron los sitios de restricción siguientes: BamHI y SalI a TRPC1, XhoI y SalI para TRPC4 y TRPC5. La construcción TRPC1-YC6.1 se generó de manera similar, empleando sitios de restricción EcoRI y BamHI. La mutagénesis de los residuos 560-562 (LFW), correspondientes a la región putativa del poro de TRPC1 humano, se realizó empleando el kit QuickChange con los plásmidos (Forward) 5`GGCACCTGCTTTGCTGCAGCAGCATATATTTTCTCCTTAG y (Reverse) 5`CTAAGGAGAAAATATATGCTGCTGCAGCAAAGCAGGTGCC, los cuales cambiaron los residuos mencionados por alaninas. Todas las construcciones y mutaciones se verificaron por secuenciación.

## **Cultivo celular y transfecciones**

Las células CHO y HEK293 se mantuvieron en medio DMEM con 10% suero fetal bovino, L-Glutamina 2mM, 100 unidades/ml de ampicilina, y 100 µg/ml de

estreptomycin. La transfección de ambas líneas celulares se llevó a cabo con 0.8 µg de DNA plasmídico. Dicho DNA se mezcló con 4 µl de reactivo PLUS (Invitrogen) en 20 µl de Optimem, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se le añadió 1 µl de Lipofectamina (Invitrogen) previamente diluida en 24 µl de Optimem, para ser incubada por otros 15 minutos a temperatura ambiente. Después esta incubación, la mezcla se añadió a células sembradas a una confluencia de aproximadamente el 80%, en 200 µl de Optimem. Los liposomas se incubaron con las células por 3 a 6 horas, tras lo cual el medio se sustituyó con DMEM completo. La expresión de las proteínas se analizó 48 horas post transfección.

### **Análisis de la expresión de mRNA de mTRPC5 por RT-PCR**

Se extrajo RNA total de células de fenotipo silvestre y de células transfectadas con mTRPC5 y las mutantes de mTRPC5 usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se usaron aproximadamente 500 ng de RNA total como templado para la RT-PCR, que se llevó a cabo empleando el sistema ONEStep Superscript II (Invitrogen), empleando el protocolo recomendado por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador TC-512 (TECHNE, Cambridge, UK), con 30 repeticiones del siguiente protocolo: 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 s. Los oligonucleótidos empleados amplifican un fragmento de 220 pb, y su secuencia es: 5'-CTATGAGACCAGAGCTATTGATG (forward) y 5'-CTACCAGGGAGATGACGTTGTATG (reverse). Como control se emplearon oligonucleótidos para amplificar un fragmento del mensajero de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. El fragmento amplificado mide 236 pb, y las secuencias de los oligos son: 5'-GACATCAAGAAGCTGGTGAAGC (forward) y 5'-TACTCCTTGGAGGCCATGTAG (reverse). Los productos de PCR se secuenciaron para identificar los productos, y fueron sometidos a electroforesis en gel

de agarosa al 2%. Después de teñir el gel con bromuro de etidio, las bandas se analizaron con un equipo de adquisición de imágenes Typhoon 8600 (Amersham Biosciences).

## **Ensayos de unión de CaM**

Los fragmentos de mTRPC5 fusionados al extremo carboxilo terminal de la MBP se prepararon *in vitro* empleando el sistema de lisados de reticulocitos de conejo con actividad de transcripción y traducción acoplados. La reacción se llevó a cabo empleando [<sup>35</sup>S]Met y [<sup>35</sup>S]Cys; los detalles de esta técnica pueden revisarse en (<sup>90</sup> y <sup>26</sup>). Las proteínas marcadas con <sup>35</sup>S se incubaron con CaM-Sepharose a temperatura ambiente por 30 minutos en la solución de unión, que contiene KCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 0.5% Lubrol, y Tris-HCL 20 mM a pH 7.5. Después de varios lavados, las proteínas unidas se separaron por SDS-PAGE, y fueron detectadas por autoradiografía de rayos X (<sup>90</sup>). Para estudiar la dependencia de Ca<sup>2+</sup> de la unión de mTRPC5 con CaM, a la solución de unión se le añadió EGTA o HEDTA 10 mM y la cantidad deseada de CaCl<sub>2</sub> (calculada con el programa MaxChelator, [www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html](http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html)), y posteriormente se determinó la afinidad aparente para Ca<sup>2+</sup> ( $K_{1/2}$ ) según la técnica reportada previamente<sup>26</sup>.

## **Ensayo de biotilación de superficies celulares**

Para biotilinar proteínas de membrana se empleó el kit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnology). Después de estimular las células, se incubaron en una solución del reactivo biotilante en solución salina de Hanks a una concentración de 1 mg/ml por 30 min a 4°C, tras lo cual el reactivo sobrante se hizo reaccionar con glicina 10 mM por 10 min, para que no interfiriera en reacciones posteriores. Las células así biotiladas se lavaron 3 veces con PBS + Gly 10 mM, tras lo cual se lisaron empleando

una solución de lisado que contiene 0.1% SDS, 1% Triton X-100, NaCl 150 mM, Tris 10 mM a pH 7.6, EDTA 5 mM y una tableta de inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche, Mannheim, Germany) por cada 10 ml de solución de lisado. Las células se lisaron mecánicamente y por incubación en hielo por 30 minutos. El lisado se clarificó centrifugándolo por 10 min a 15,000 rpm a 4°C, y las proteínas biotiniladas se precipitaron con 20 µl de estreptavidina inmovilizada ImmunoPure (Pierce, Rockford, IL) por 12 a 16 horas a 4°C. Las proteínas precipitadas se eluyeron hirviendo la muestra en amortiguador de Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.002% Azul de bromofenol y Tris HCl 0.125 M) por 5 minutos, tras lo cual se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para el western blot se empleó un anticuerpo anti-mTRPC5 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). La cantidad de muestra cargada para el lisado total y para la fracción precipitada representa 12 y 355 µg respectivamente, del total de proteínas en los lisados. Las membranas se expusieron por el mismo tiempo para detectar la señal quimioluminiscente de mTRPC5 en lisados totales y en las fracciones precipitadas.

### **Mediciones del potencial de membrana por fluorescencia**

Se transfectaron células HEK293 con plásmidos conteniendo el gen de mTRPC5 y el de H1R en pozos de una caja de 96 pozos. 24 horas post-transfección, las células se lavaron con solución salina de Hanks, tras lo cual se incubaron por 30 minutos con una solución de 80 µl del indicador de potencial de membrana FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) en solución de Hanks. Los cambios en el potencial de membrana se midieron a 32°C empleando un lector de fluorescencia en placas con capacidad de manejo de fluidos (FlexStation, Molecular Devices). La histamina se diluyó en solución de Hanks a 300 µM, y se añadieron 40 µl a la placa con la pipeta integrada robótica de 8

canales 20 s después del comienzo de la lectura. Las muestras se excitaron a 530 nm, y se leyó la emisión a 565 nm con una frecuencia de 0.67 Hz.

## **Generación de líneas estables**

Se emplearon dos líneas celulares para realizar los experimentos en el presente trabajo: la línea de riñón embrionario humano HEK293, y la línea de ovario de hamster chino CHO. Dadas sus características, la línea HEK293 se usó principalmente para los experimentos de microscopía y la línea CHO para los experimentos de medición de corrientes. Cabe aclarar que todos los experimentos se probaron en ambas líneas, con resultados similares.

Las células HEK293 y CHO se transfectaron con plásmidos bicistrónicos que contenían mTRPC5 silvestre o mutante, seguido de un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) y del gen de resistencia a neomicina. Las células se mantuvieron en medio con 1 mg/ml de G418 por un mes, tras lo cual por RT-PCR se confirmó la presencia de mRNA para mTRPC5 y para la fosfotransferasa de aminoglucósidos responsable de brindar resistencia a neomicina. Se aislaron clonas estables por diluciones progresivas, y se midió su expresión de mTRPC5. Las células también se transfectaron con un plásmido bicistrónico similar que contenía la secuencia del Bk2R seguido por el gen de resistencia a puromicina. Las clonas que expresaban tanto mTRPC5 como Bk2R se aislaron usando ambos marcadores de selección, la neomicina y la puromicina.

## **Medición de corrientes en configuración de célula entera (*Whole-cell*)**

Se usó la configuración *Whole-cell* de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) para estudiar las corrientes debidas a hTRPC1, mTRPC5 o

una combinación de ambos, o a sus respectivas proteínas de fusión con derivados de la GFP. Brevemente: las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio y fueron montadas en un microscopio invertido (Nikon Instruments, Japón). Se usó el amplificador Axopatch 200a (Axon Instruments, Union City, CA). La resistencia de la pipeta fue de alrededor de 10 a 12 megaohms al ser probada con las soluciones de pipeta y de baño. Al lograr el sello, la resistencia en *Whole-cell* alcanzó de 1 a 2 gigaohms, con una capacitancia por célula de alrededor de 10 a 12 picofarads para las células CHO y de 12 a 16 picofarads para las células HEK293. Las células se mantuvieron a un potencial de -80 mV, y el protocolo consistió en cambios de potencial de -120 a +60 mV, manteniendo el potencial por 500 ms, e incrementandolo en 20 mV cada segundo. Los agonistas de los receptores se aplicaron por perfusión en el baño, y la CaM se introdujo intracelularmente por diálisis a través de la pipeta.

### **Análisis de datos y ajuste de curvas**

Todos los datos se graficaron y ajustaron empleando Sigmaplot 8 (SYSTAT, Point Richmond, CA). Para obtener las constantes de activación, la corriente promedio saliente se graficó contra el tiempo a lo largo de los experimentos según las condiciones experimentales indicadas. Los datos se ajustaron a una ecuación sigmoidea según la fórmula

$$f = \frac{a}{1 + \exp(-(x - x_0)/b)}$$

Donde  $a$  representa la corriente saliente máxima (asíntota superior);  $b$  indica la corriente saliente mínima (asíntota inferior);  $x_0$  indica la constante de activación media, y  $x$  indica el tiempo en cada punto.

## Fluorescencia y microscopía confocal

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto aquellos en que se exprese de manera particular la temperatura de trabajo. Las células que se usaron para microscopía se sembraron en cubreobjetos de cristal de 9X9 mm. De ser necesario, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (EMS, Fort Washington, PA) en PBS (pH 7.4) por 15 min. Las células fijadas se montaron en el portaobjetos con ayuda de medio de montaje DAKO o Vectashield (Pierce). Para tinción de membrana plasmática (con FM4-64 a una concentración de 0.5 µg/ml) o de retículo (Brefeldina-Bodipy a 1 µg/ml) las células vivas se incubaron a temperatura ambiente en solución de Hanks con el reactivo fluorescente correspondiente. Tras esta incubación, las células se lavaron con solución de Krebs y se examinaron al microscopio. Para teñir la membrana plasmática con CM-DiI (a 1 µg/ml, Invitrogen), se incubaron por 5 min. a 37 °C en una solución de dicho fluoróforo en Solución de Hanks, tras lo cual se incubaron, sin cambiar de solución, por otros 15 min a 4 °C. Tras esta segunda incubación, y después de lavar las células con PBS, se fijaron con paraformaldehído.

Para detectar la fluorescencia de las proteínas fusionadas a la eCFP, se excitó la muestra a 405 nm, detectando la fluorescencia emitida de 460 a 500 nm. Para detectar la fluorescencia debida a la eYFP, la muestra se excitó a 514 nm, detectando la emisión de 520 a 560 nm. Con estas condiciones fue posible detectar secuencialmente la fluorescencia de ambas proteínas en una célula aislada, con alta resolución temporal. Para la detección de FRET con las proteínas quiméricas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , la fluorescencia debida a eCFP y a eYFP se detectó secuencialmente, excitando la muestra sólo con la línea de láser de 454 nm, que únicamente excita a eCFP. De esta manera, toda la emisión debida a eYFP se debía a FRET y no a excitación directa de esta proteína. Los cambios en el tiempo en la relación de fluorescencias eYFP/eCFP se debía

a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alrededor del sensor. Los datos mostrados corresponden a la relación eYFP/eCFP normalizada, y después de restar fluorescencia de fondo. Se emplearon dos microscopios confocales a lo largo del proyecto: un confocal Leica SP2 (Leica, Wetzlar, Alemania) y un confocal Olympus FV1000 (Olympus, Tokio, Japón). La cuantificación de las imágenes se realizó empleando el programa ImagePro V6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

### **Mediciones de $\text{Ca}^{2+}$ con Fura-2 en poblaciones celulares**

Las células CHO o HEK293 fueron crecidas en monocapas, y cargadas con una solución 5 mM de Fura-2 AM (Molecular Probes-Invitrogen) en solución de Krebs por 45 min. Las células se lavaron 3 veces y se despegaron del vidrio con una solución baja en calcio. La suspensión celular se colocó en una cubeta de espectrofotómetro a una concentración de 1.5 a 2 millones de células/ml. Las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman series 2. La longitud de onda de excitación se alternaba de 340 nm a 380 nm cada 2 segundos, y la emisión se medía con esa frecuencia a 510 nm. Cada experimento se calibró por separado para obtener la fluorescencia máxima, lisando las células con Triton X-100 (Sigma) al 0.1%, y la fluorescencia mínima amortiguando el  $\text{Ca}^{2+}$  libre en solución con EGTA 20 mM (Sigma). Los valores obtenidos con este método se usaron para calcular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular de acuerdo a métodos previamente publicados<sup>93</sup>.



# RESULTADOS

## **1. LAS INTERACCIONES CALCIO-CALMODULINA MODULAN**

### **LA ACTIVIDAD DEL CANAL TRPC5**

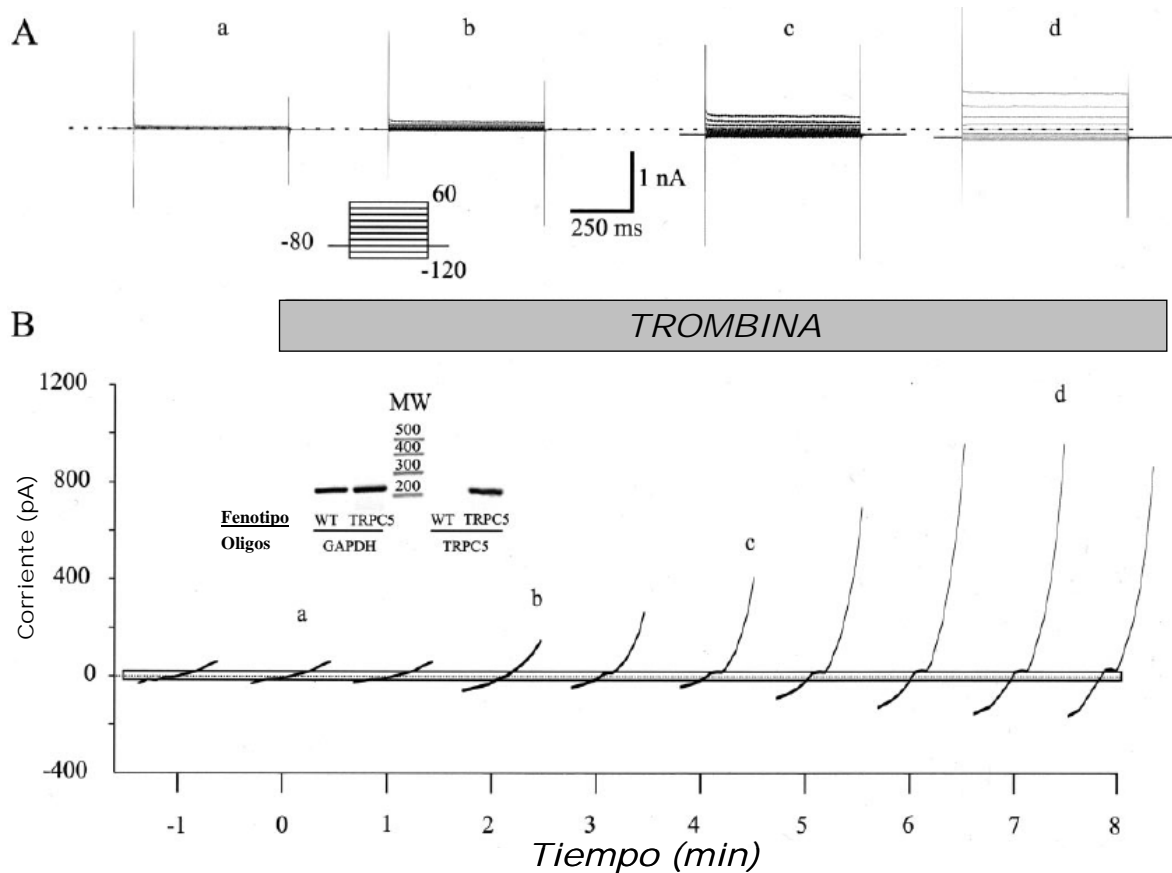
IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DOMINIO CARBOXILO TERMINAL RESPONSABLE DE LA FACILITACIÓN MEDIADA POR CALCIO/CALMODULINA

#### **Cinética de activación de mTRPC5 por agonistas**

Se generó una línea de células CHO que expresaba de manera estable a la proteína mTRPC5. En estas células, la estimulación con agonistas resultó en la activación de corrientes salientes rectificantes, cuya intensidad aumentaba con el tiempo (Fig 1). La activación de dichas corrientes se siguió hasta por 15 min., observándose que se alcanzaba un nivel estable de corriente después de exponer las células al agonista por 7 minutos. Después de este periodo, un 30% de las células mostraron una reducción pequeña (de aproximadamente el 5%) en la amplitud de la corriente. Dicho resultado no se estudió más en el presente trabajo.

En la figura 1A se muestra una familia de corrientes evocada por pulsos de voltaje desde un potencial de holding de -80 mV hasta voltajes que abarcaban el rango de -120 a + 60 mV, en pasos de 20 mV. La trombina (se usó 1 unidad) indujo la activación de una corriente saliente rectificante con potencial de reversión cercano a 0 mV ( $-6 \pm 4$  mV,  $n=25$ ). La cinética de las curvas corriente-voltaje se muestra en la figura 1B; con un rectángulo gris se muestra el límite de la corriente inducida por el agonista en células control sin transfectar. Nótese que la corriente basal en las células que expresaban TRPC5 es ligeramente mayor (alrededor de 10%) que en las células

control; este hecho podría reflejar alguna actividad espontánea de TRPC5, pero no se estudió en más detalle en el presente trabajo.



**Figura 1** Cinética de activación del canal mTRPC5 silvestre en respuesta a agonistas A) Se muestra una familia de corrientes evocada por el protocolo de voltaje ilustrado en la imagen. Cada letra (a-d) corresponde a los puntos temporales marcados en el panel B. B) Cinética de activación de la corriente de mTRPC5 en respuesta a trombina (1 unidad). El panel muestra la relación corriente-voltaje como líneas. La barra gris muestra el rango de corrientes medidas con células CHO sin transfectar (controles). El tiempo 0 corresponde al tiempo de la aplicación de la trombina. Se muestra inserto en el panel, el resultado del análisis por RT-PCR de la expresión de mTRPC5; solo las células transfectadas con mTRPC5 generan un producto de PCR del tamaño esperado, 220 pb. Se usó como control interno de RT-PCR al gen de la deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH); se logró amplificar un fragmento de dicho gen tanto en células no transfectadas como en células transfectadas. Se indican los marcadores de peso molecular con MW.

Para confirmar la expresión de mTRPC5, se hicieron experimentos de RT-PCR con RNA total obtenida de células control y de células que expresaban mTRPC5. Como puede verse en el inserto en la figura **1B**, el transcrito debido a TRPC5 solo pudo ser detectado en las células transfectadas con mTRPC5.

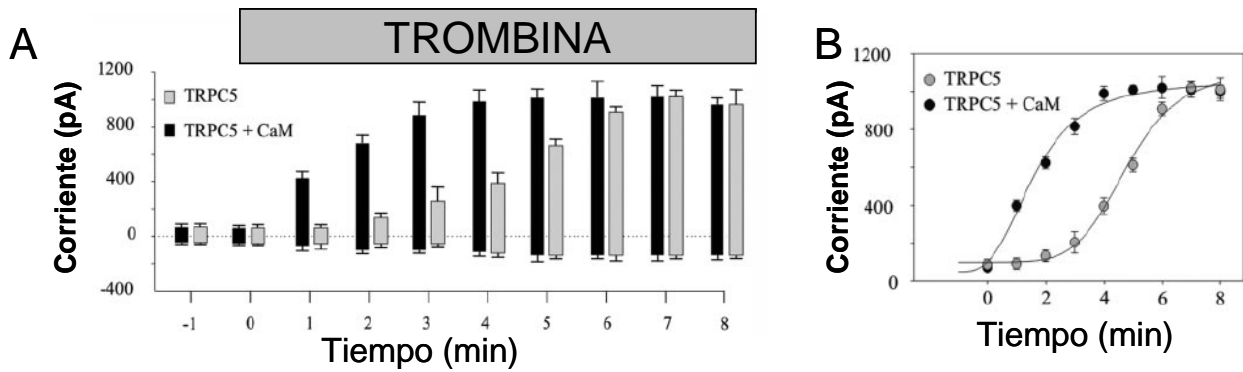
La cinética de la activación de las corrientes de mTRPC5 resultó independiente de los agonistas o receptores usados; además de trombina (1 u/ml) se usó también bradicinina a 100 nM (concentraciones a las que se obtuvo la máxima respuesta). Las constantes de activación de las corrientes de mTRPC5 resultaron ser de  $4.25 \pm 0.4$  min y  $4.10 \pm 0.7$  min para trombina y bradicinina, respectivamente.

### **La calmodulina acelera la cinética de activación de mTRPC5**

Para examinar con más detalle cómo la CaM afecta la activación de mTRPC5, se introdujo CaM en la pipeta de *patch*. Como se observa en la figura 2A, la CaM a 10  $\mu$ M en la pipeta induce una activación más rápida de las corrientes debidas a mTRPC5 en respuesta a trombina. Las curvas de las cinéticas de activación de mTRPC5 en presencia o ausencia de CaM (mostradas en la figura 2B) fueron ajustadas a una ecuación sigmoidea (ver Material y métodos), con la que se calculó la constante de activación de mTRPC5. La constante de activación en presencia de CaM resultó significativamente menor que la constante calculada en ausencia de CaM ( $1.56 \pm 0.85$  min contra  $4.25 \pm 0.4$  min, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron al estimular con bradicinina, tanto en células CHO como en células HEK293 (tabla I). Dado que las corrientes entrantes resultaron mucho menores que las corrientes salientes, y con un valor tal que resultaba difícil separarlas de corrientes entrantes endógenas, los análisis solo se realizaron respecto a corrientes salientes.

**Tabla I: Efecto de la Calmodulina en la activación de TRPC5 por trombina y bradicinina, en dos líneas celulares.**

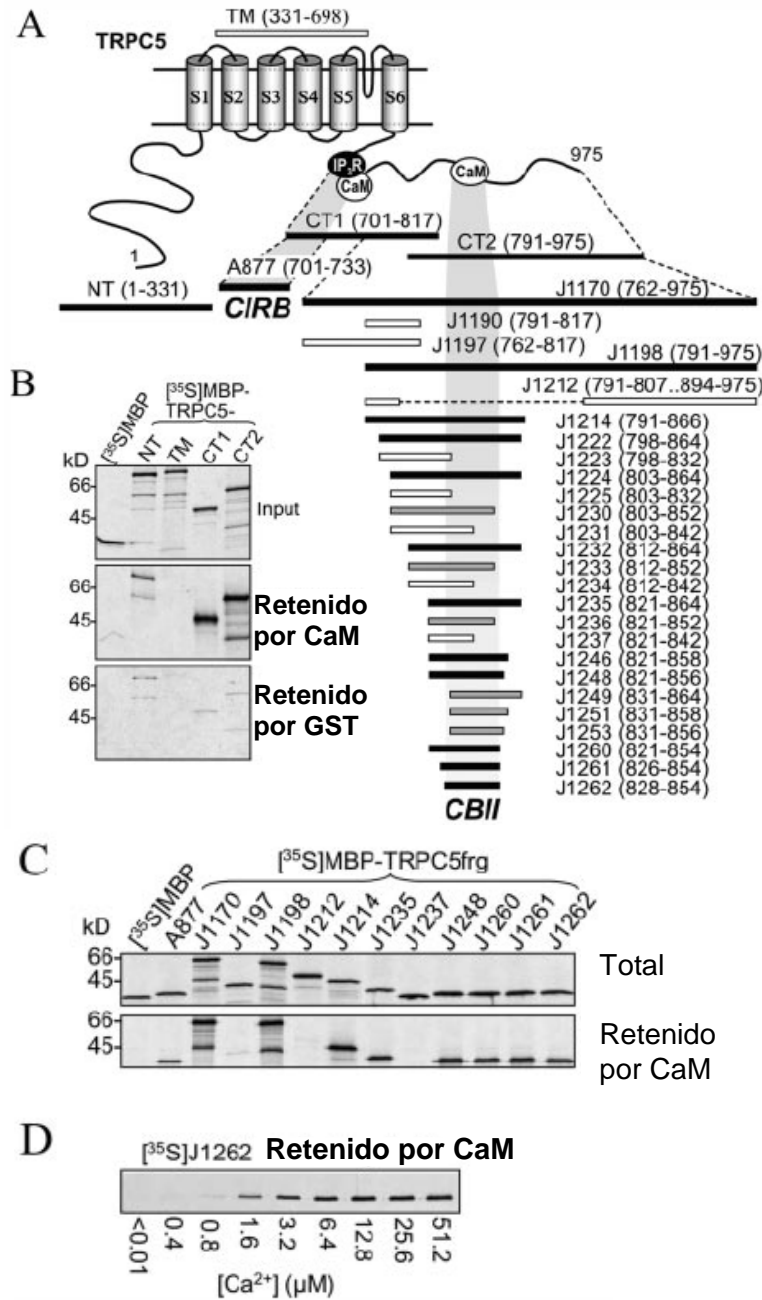
	CHO	HEK293
Trombina - CaM	$4.25 \pm 0.4$ min	No Probado
Bradicinina - CaM	$4.01 \pm 0.7$ min	$4.29 \pm 0.81$ min
Trombina + CaM	$1.53 \pm 0.85$ min	No Probado
Bradicinina + CaM	$1.75 \pm 0.62$ min	$1.47 \pm 0.74$ min



**Figura 2 La Calmodulina acelera la activación estimulada por agonistas de corrientes debidas a mTRPC5** A) Comparación de la cinética de activación de la corriente en la presencia (en negro) o ausencia (en gris) de calmodulina (CaM) 10  $\mu\text{M}$  en la pipeta de *patch*. Se muestran los promedios ( $n=17$ ) + D.E. de la amplitud de las corrientes a +60 mV (barras hacia arriba) y a -120 mV (barras hacia abajo). B) Cinética de activación de las corrientes salientes a +60 mV en presencia y ausencia de CaM. La línea recta representa el ajuste de los datos a una ecuación sigmoidea (ver Métodos) para obtener la constante de activación 50.

### Identificación de dos sitios de unión a CaM en el extremo Carboxilo terminal de mTRPC5

Los resultados obtenidos indican que CaM juega un papel importante al facilitar la activación inducida por receptor de los canales mTRPC5. Se sabe<sup>26</sup> que todos los canales TRPC tienen un sitio de unión a CaM y al IP<sub>3</sub>R (CIRB) en una región proximal al extremo carboxilo terminal; en el caso de TRPC5, dicho sitio se encuentra entre los residuos Glu<sup>701</sup> y Lys<sup>733</sup>, y requiere una concentración mayor de Ca<sup>2+</sup> para unir CaM que los sitios CIRB de otras proteínas TRPC. Además se sabía que en la zona comprendida entre los residuos Gly<sup>762</sup> y Leu<sup>975</sup> había otro sitio de unión a CaM, llamado CBII. Como parte del presente trabajo, nuestros colaboradores del grupo de Columbus, Ohio, definieron mediante ensayos de *pull-down* que el segundo sitio de unión a CaM se encontraba entre los residuos Pro<sup>828</sup> y Asn<sup>854</sup> (fig 3). El fragmento de mTRPC5 que contiene a CBII se une a CaM de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup>, pero tiene una constante de afinidad por CaM casi un orden de magnitud menor que la del CIRB ( $3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$  en CBII contra  $44.2 \mu\text{M}$  en CIRB).

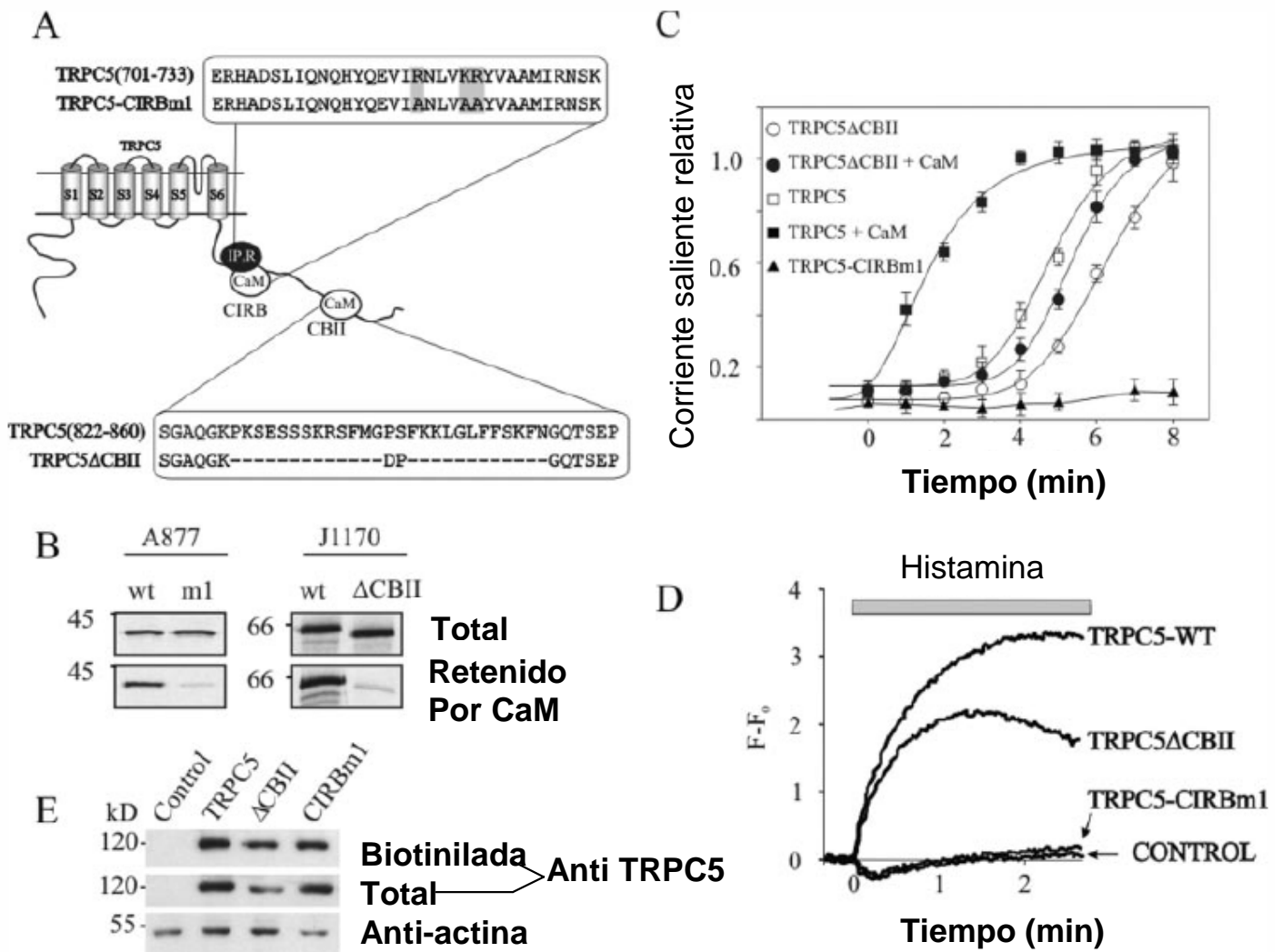


**Figura 3: Identificación del segundo sitio de unión a CaM en el extremo carboxilo terminal de mTRPC5** A) Diagrama de mTRPC5 y sus fragmentos incluidos en las proteínas de fusión con MBP para los experimentos de binding realizados *in vitro*. S1 a S6 indican los segmentos transmembranales. Los colores de las barras blanco, gris y negro, indican unión inexistente, débil o fuerte, respectivamente, a CaM-sefarosa. Se indican los nombres y posiciones (números entre paréntesis) de los fragmentos. Los sitios de unión a CaM, CIRB y CBII se marcan como áreas sombreadas. En B) y C) se muestran autoradiografías representativas obtenidas a partir de ensayos de binding con proteínas MBP marcadas con  $^{35}\text{S}$ , así como de proteínas de fusión de MBP con fragmentos de mTRPC5; se muestran tanto una alícuota de la muestra usada en el ensayo ("total") como la fracción retenida por CaM-Sefarosa. También se muestra como control negativo a la Glutación-S-Transferasa(GST) unida a glutación-sefarosa. El buffer del ensayo incluía 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Las alícuotas mostradas como total equivalen al 40% de las proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$  usadas en el ensayo. D) Dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la interacción entre el CBII de mTRPC5 y la CaM. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se logró tamponándolo con EGTA o HEDTA.

## La activación del canal mTRPC5 se ve alterada por la mutación de los sitios de unión a CaM

Para investigar la función de los sitios de unión a CaM en mTRPC5, estos se mutaron sustituyendo los residuos Arg<sup>718</sup>, Lys<sup>722</sup> y Arg<sup>723</sup> por alaninas (CIRBm1) o generando una delección de todos los residuos entre la Pro<sup>828</sup> y Asn<sup>854</sup> ( $\Delta$ CBII) como se muestra en la figura **4A**. Usando estudios de unión *in vitro*, se confirmó la pérdida de la habilidad de unir a CaM por estas mutantes. Como se muestra en la figura **4C**, sin CaM en la pipeta, la activación de mTRPC5  $\Delta$ CBII se retrasó levemente en comparación con mTRPC5 silvestre, y la adición de 10  $\mu$ M de CaM en la pipeta sólo aceleró levemente la activación del canal mutante. Estos resultados indican que el sitio CBII es importante para la facilitación de la activación de mTRPC5 mediada por Ca<sup>2+</sup>/CaM: la constante temporal de mTRPC5  $\Delta$ CBII fue de  $6.04 \pm 0.5$  min sin CaM en la pipeta mientras que al añadir CaM en la pipeta, la constante temporal calculada fue de  $5.48 \pm 0.7$  min.

Por otro lado, la mutante mTRPC5-CIRBm1 fue completamente incapaz de responder a la estimulación con trombina o bradicinina tanto en células CHO como en células HEK293. Experimentos realizados con el marcador de membranas fluorescente FLIPR, sensible al potencial de membrana, demostraron que al coexpresar mTRPC5 y el receptor de histamina H1R en células HEK293, la estimulación con histamina provocó una despolarización importante de la membrana. Las células que expresaban mTRPC5  $\Delta$ CBII y H1R mostraron una depolarización ligeramente menor que la observada en células con mTRPC5 silvestre; sin embargo en las células con mTRPC5-CIRBm1 y H1R la respuesta observada no resultó diferente a la observada en células transfectadas únicamente con el H1R, lo cual indica que la construcción mTRPC5-CIRBm1 es una mutante con pérdida de función (Figura **4D**).



**Figura 4: La delección del sitio CBII atenúa la facilitación inducida por  $Ca^{2+}/CaM$  de la activación inducida por receptores del canal mTRPC5** A) El diagrama muestra las sustituciones de aminoácidos en la mutante mTRPC5-CIRBm1 y la delección en la construcción mTRPC5ΔCBII. B) Los resultados del ensayo de binding muestran que las mutaciones abolieron la unión de  $Ca^{2+}/CaM$  a los fragmentos de mTRPC5. En la figura 3A se muestra la posición de las construcciones usadas dentro de la proteína. Se probaron las regiones equivalentes de las mutantes bajo las mismas condiciones descritas en la figura 3. C) Cinética de activación de la corriente de mTRPC5 silvestre (cuadros) y de las mutantes mTRPC5ΔCBII (en círculos) y mTRPC5-CIRBm1 (en triángulos) en presencia o ausencia de 10  $\mu M$  de CaM. Las corrientes se indujeron aplicando bradicinina 100 nM. La corriente saliente se midió con un pulso de votaje de +60mV como se describe en la sección de métodos. D) Depolarización inducida por histamina en células HEK293 que coexpresan receptores H1R y mTRPC5 o sus mutantes. Se añadió donde se indican 100  $\mu M$  de histamina. Los valores de fluorescencia mostrados representan  $1 \cdot 10^{-5}$  de los valores mostrados por el instrumento. E) Los experimentos de biotinylación muestran que todas las mutantes alcanzaron la membrana plasmática de manera similar al mTRPC5 silvestre. Como control de cargado se usó actina en cada carril. Se muestra la posición de las bandas con respecto a marcadores de peso molecular (carril kD, peso en kilodaltones).

Para demostrar los niveles de expresión de mTRPC5-CIRBm1 en la membrana plasmática, se hicieron experimentos de biotinylación de proteínas de membrana en células HEK transfectadas con las construcciones. Se detectaron menores niveles de expresión de mTRPC5  $\Delta$ CBII comparados con mTRPC5 silvestre, pero los niveles de mTRPC5-CIRBm1 tanto en lisados totales como en la fracción biotinilada, resultaron similares a los niveles de mTRPC5. Cabe resaltar que el hecho de que se haya podido biotinilar a mTRPC5-CIRBm1 en células sin permeabilizar, indica que la mutante llega a la membrana plasmática eficientemente (Figura 4E).

Se generó otra mutante en el sitio CIRB con los siguientes cambios: I<sup>717</sup>D/L<sup>720</sup>E/V<sup>721</sup>A. Esta mutante, al igual que la anterior, no pudo ser activada por agonistas, a pesar de ser expresada de manera normal en la membrana celular (datos no mostrados). Por lo tanto, es probable que la pérdida de la función de estas mutantes se deba a defectos en el *gating* del canal, o a defectos en la activación por agonistas, y no a problemas en el tráfico y/o translocación de la proteína.

### **Efectos inhibitorios de altas concentraciones intracelulares sostenidas de Ca<sup>2+</sup> sobre la activación de mTRPC5**

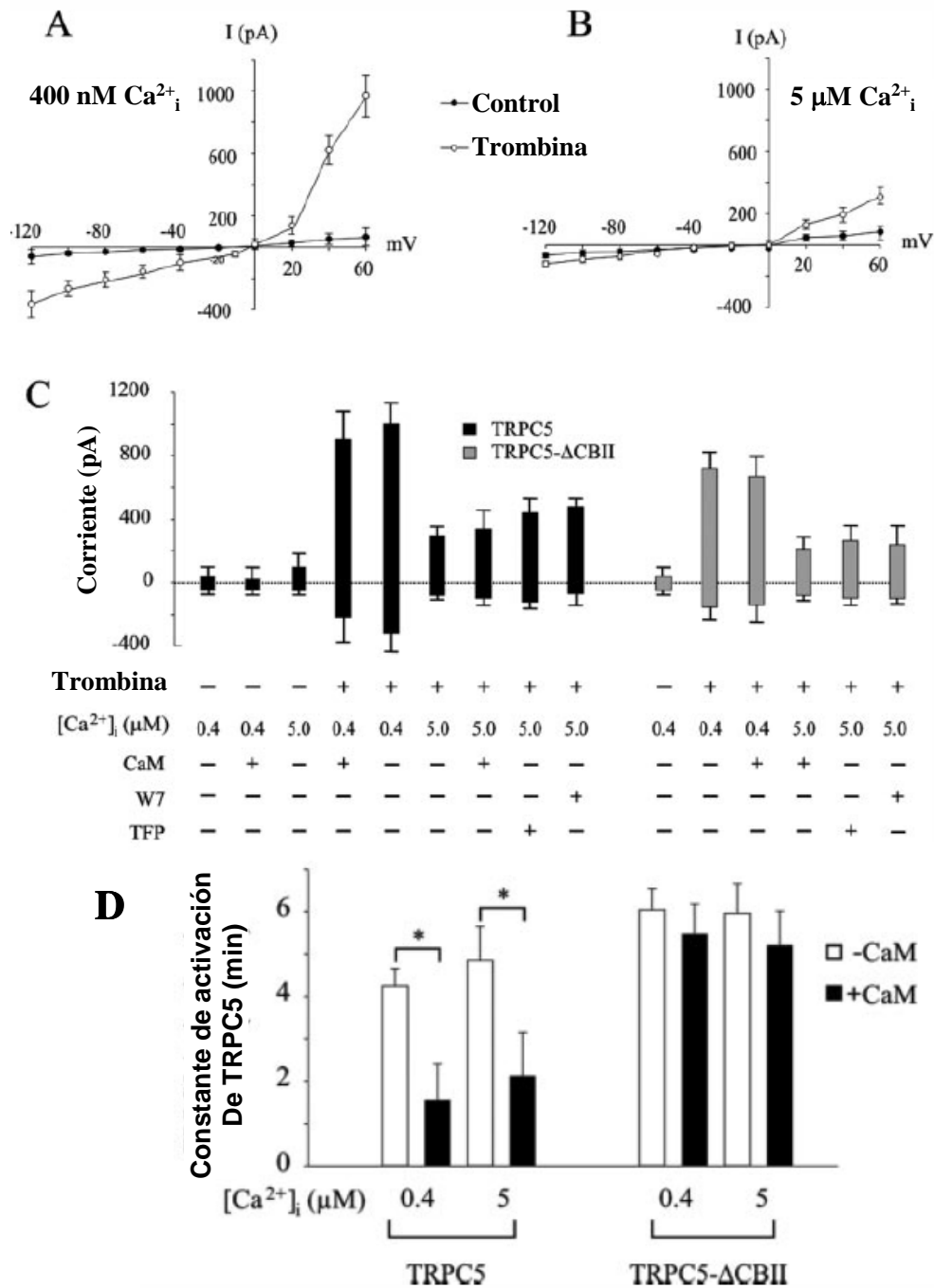
Para investigar con mayor precisión el papel del Ca<sup>2+</sup> intracelular y de la CaM en la velocidad de activación y la amplitud de las corrientes de mTRPC5, se realizaron experimentos a dos diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular (0.4 y 5  $\mu$ M) en presencia y ausencia de CaM en la pipeta de *patch* en células con mTRPC5 silvestre y con la mutante mTRPC5  $\Delta$ CBII (fig 5). En la concentración más alta de Ca<sup>2+</sup> se observó una inhibición significativa de las corrientes máximas activadas por la trombina en células CHO con mTRPC5 silvestre: de  $995 \pm 110$  pA (Fig 5A,  $n=22$ ) en 0.4  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>, la corriente bajó a  $302 \pm 28$  pA (Fig 5B,  $n=19$ ) en 5  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>, corriente



equivalente al 30% de la obtenida en 0.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para mTRPC5  $\Delta\text{CBII}$ , concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de 5  $\mu\text{M}$  también redujeron la amplitud de las corrientes inducidas por agonistas (a +60mV), sólo alcanzando un 28.2% de las corrientes obtenidas con 0.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (fig. **5C**). Estos niveles de inhibición son similares a los observados con el mTRPC5 silvestre, lo que sugiere que el sitio CBII no juega un papel en la inhibición de la activación del canal por concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Como se mostró previamente, la introducción de CaM en la pipeta, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.4  $\mu\text{M}$ , no alteró la amplitud máxima de la corriente debida a mTRPC5 en respuesta a la estimulación por agonistas, aunque sí aumentó la velocidad de la activación de la respuesta. De manera similar, la introducción de CaM 10  $\mu\text{M}$  en la pipeta, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ , no superó los efectos inhibitorios de la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  observados en la máxima amplitud de la corriente (Fig **5C**), pero sí redujo la constante de activación de la corriente saliente a +60mV de  $4.85 \pm 0.8$  min ( $n=12$ ) a  $2.13 \pm 1.02$  min ( $n=16$ , fig **5D**). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en las constantes de activación a las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia o presencia de CaM, lo que indica que, o la CaM endógena es suficiente para mediar el efecto inhibitorio de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , o la inhibición es independiente de CaM.

El siguiente paso consistió en usar inhibidores de CaM incluidos en la pipeta. En la fig **5C** puede observarse que ni W7 (a 500 nM) ni TFP (a 5  $\mu\text{M}$ ) inhibieron de manera importante la amplitud de la corriente inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ . Previamente se había demostrado que dichos inhibidores, a las concentraciones indicadas, eran capaces de eliminar la participación de CaM en la modulación de la entrada de calcio en respuesta al vaciamiento de almacenes en células CHO <sup>50</sup>.



**Figura 5. Regulación dual de mTRPC5 por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM** A) Promedio  $\pm$  D.E. de la relación C-V en células CHO que expresan mTRPC5. Los círculos llenos representan la corriente antes de añadir trombina, y los vacíos indican la corriente 10 minutos después de estimular con 1 U. de trombina, con  $0.4 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  en la pipeta. B) Promedio  $\pm$  D.E. de la relación corriente voltaje determinada en células CHO que expresan mTRPC5 con  $5 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  en la pipeta (n=20). C) Promedio  $\pm$  D.E. de la amplitud máxima de corriente a  $+60 \text{ mV}$  (barras con valores positivos) y  $-120 \text{ mV}$  (barras con valores negativos) de mTRPC5 silvestre (en negro) y mTRPC5 $\Delta$ CBII (en gris) con distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia (+) o ausencia (-) de 1 unidad de trombina y CaM. Se usaron los inhibidores de CaM, W7 y TFP a  $500 \text{ nM}$  y  $5 \text{ } \mu\text{M}$ , respectivamente. La estadística se realizó a partir de los datos de al menos 20 células individuales. El nivel 0 de corriente se marca con una línea punteada. Las corrientes positivas representan corrientes salientes, y las negativas, corrientes entrantes. D) Constantes tiempo de activación semimáxima debida a la estimulación con 1 U. de trombina para mTRPC5 silvestre y TRPC5 $\Delta$ CBII con pipetas conteniendo concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de  $0.4$  o  $5 \text{ } \mu\text{M}$  con (en negro) o sin (en blanco) CaM  $10 \text{ } \mu\text{M}$ . \*,  $p < 0.05$  según el test t de Student.

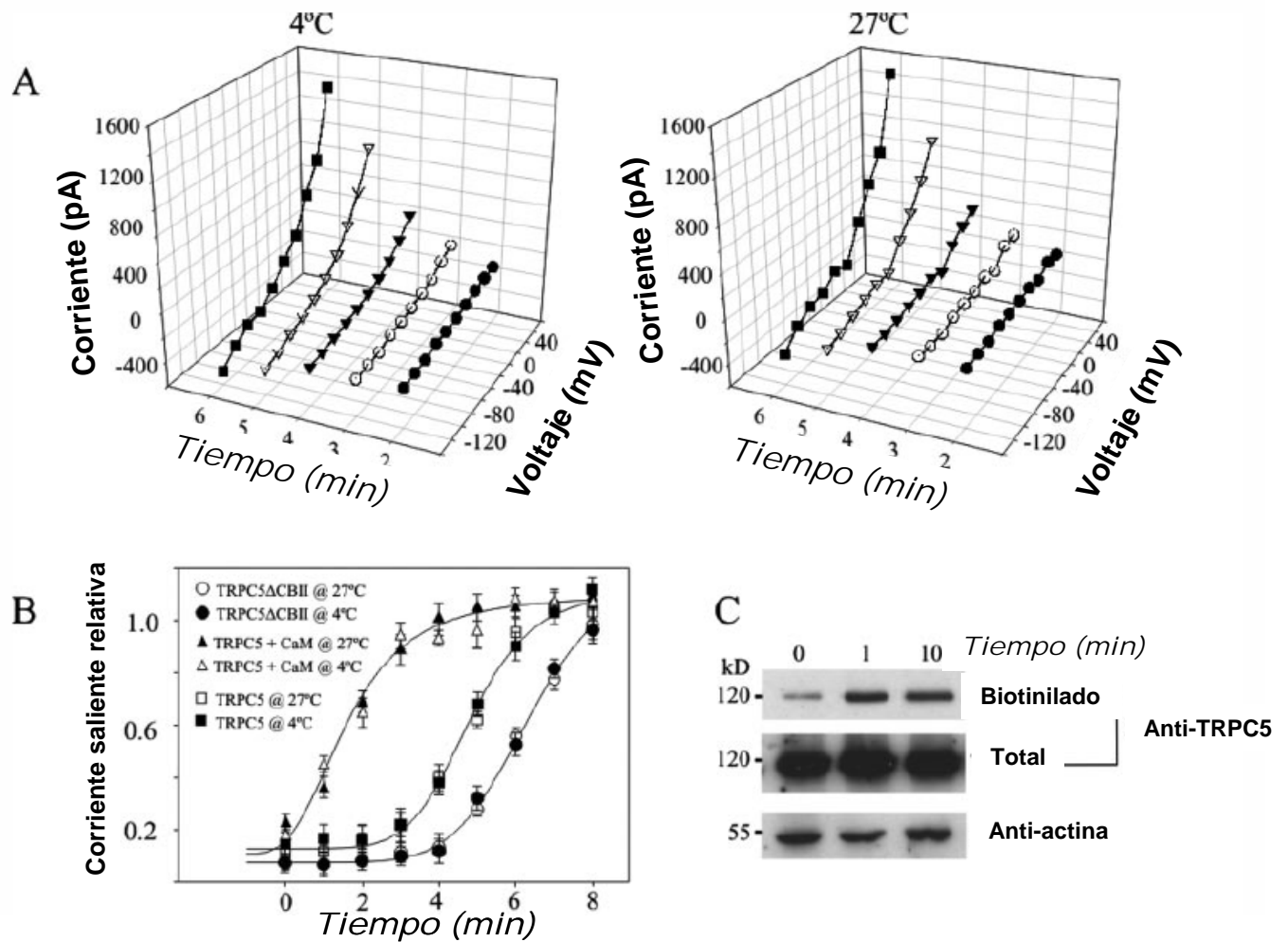
De manera parecida, la adición de CaM a la pipeta de las células que expresaban mTRPC5 $\Delta$ CBII no alteró la velocidad de la activación del canal en respuesta a los agonistas (figura **5D**). Las constantes de activación para mTRPC5 $\Delta$ CBII con Ca<sup>2+</sup> 5  $\mu$ M fueron de  $5.96 \pm 0.7$  min en ausencia de CaM, y de  $5.21 \pm 0.8$  min con CaM 10  $\mu$ M.

### **La activación lenta de mTRPC5 en respuesta a la estimulación con agonista no se debe a su translocación a la membrana plasmática**

Se ha demostrado<sup>35</sup> que el factor de crecimiento epidermal (EGF) induce una rápida translocación vesicular de mTRPC5 a la membrana plasmática en células HEK293. Con el fin de investigar si el efecto de la facilitación de la activación del canal por el dominio CBII, se debía a la translocación de mTRPC5 a la membrana plasmática, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. En primer lugar se comparó la cinética de activación de la corriente en respuesta a agonistas, a dos temperaturas (4°C y 27°C). Como se muestra en las figuras **6A** y **6B**, no hubo diferencias significativas en las cinéticas de activación de mTRPC5 y mTRPC5  $\Delta$ CBII en ambas temperaturas: la constante de activación del mTRPC5 silvestre fue de  $4.12 \pm 0.35$  y de  $4.37 \pm 0.45$  min a 4°C y a 27°C, respectivamente. Las constantes disminuyeron en presencia de CaM 10  $\mu$ M a  $1.58 \pm 0.9$  min y a  $2.01 \pm 0.79$  min a 4 y a 27 °C, respectivamente. Es importante recordar que a 4°C, tanto el transporte vesicular como la translocación de vesículas a la membrana plasmática se hallan inhibidos. Por lo tanto, si la diferencia en la velocidad de activación inducida por agonistas fuera el resultado de que más mTRPC5 alcanzó la membrana plasmática, se esperaba detectar diferencias en las cinéticas de activación de las membranas entre 27°C y 4°C. Además, si CaM estuviera afectando la translocación de mTRPC5 a la membrana plasmática mediante el dominio CBII, se esperaba haber

observado diferencias en las constantes de activación a 4°C y a 27°C. Como se muestra en la figura **6B**, esto no ocurrió así.

Para estudiar más a fondo cualquier posible papel que pudiera tener la translocación del canal a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación con agonistas, se realizaron ensayos de biotinylación con las células que expresaban mTRPC5 en condiciones basales y después de estimularlas por 1 o 10 min. con bradicinina 1 mM. Como se observa en la figura **6C**, la bradicinina induce un incremento significativo en la fracción de mTRPC5 biotinilada a tan solo 1 minuto de estimulación. No se detectaron diferencias en el nivel de biotinylación de mTRPC5 en ambos tiempos de estimulación usados. Este resultado muestra que la bradicinina induce una translocación rápida de mTRPC5 a la membrana plasmática, pero esta translocación no puede explicar la cinética más lenta de activación de mTRPC5 inducida por agonistas. Por lo tanto, es muy posible que la modulación de la facilitación de mTRPC5 por CaM mediante el dominio CBII no se deba a la translocación del canal a la membrana plasmática.



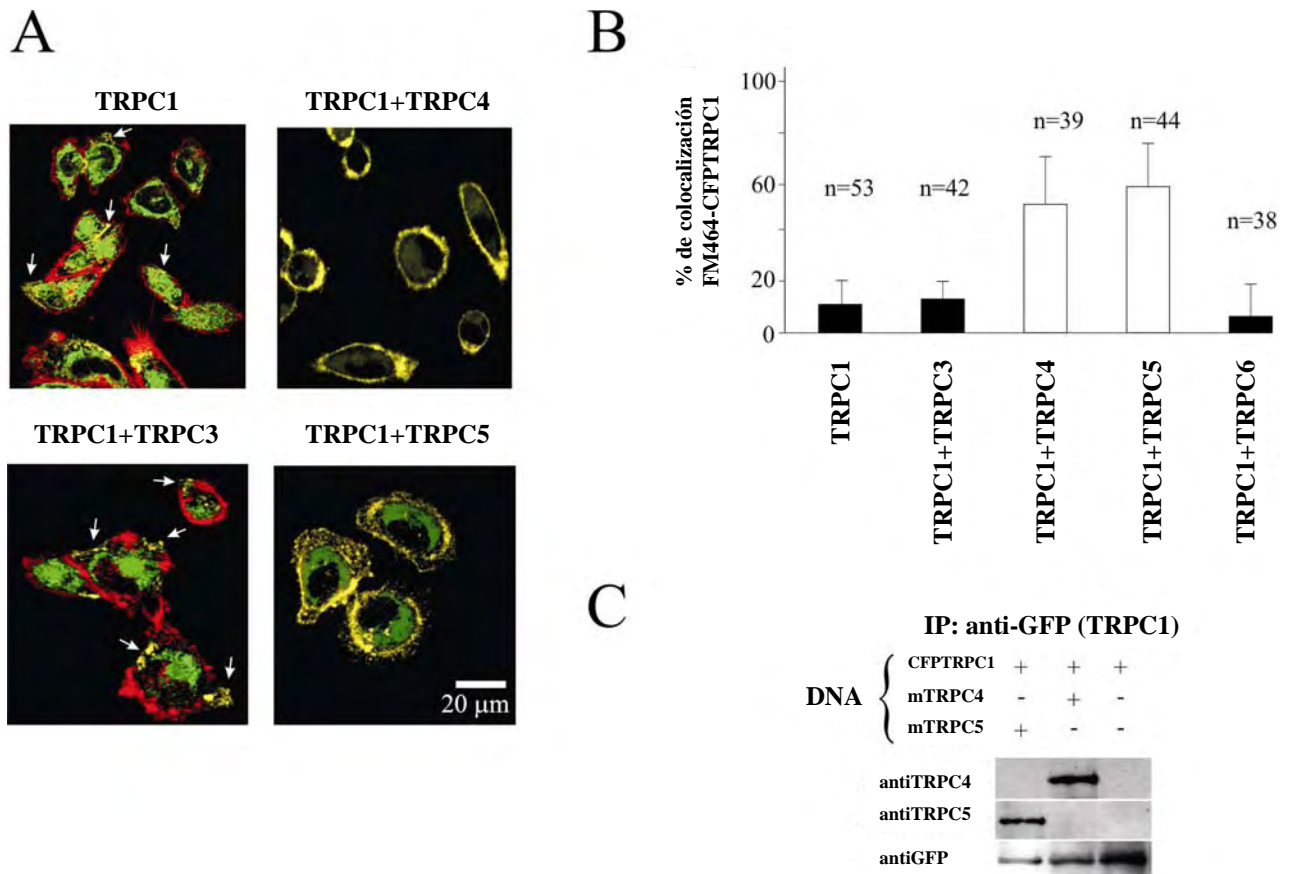
**Figura 6. La facilitación de mTRPC5 inducida por  $Ca^{2+}$ /CaM no se debe a cambios en la translocación del canal a la membrana plasmática.** A) Los gráficos en tercera dimensión ilustran las cinéticas de activación de las corrientes de mTRPC5 en respuesta a la estimulación con Bradicnina 100 nM en células HEK293 expresando el receptor humano Bk2R. Las graficas muestran la relación corriente-voltaje medida de 2 a 6 minutos post-estimulación. La gráfica de la izquierda muestra un experimento representativo realizado a 4°C, mientras que la de la derecha muestra uno realizado a 27°C. B) Cinética de activación de la corriente saliente a +60mV medida a 4 y 27°C con mTRPC5 (en ausencia o presencia de CaM 10  $\mu$ M en la pipeta) y con TRPC5ΔCBII. Las líneas sólidas representan el ajuste a la ecuación sigmoidea 1 (Material y Métodos) para obtener las constantes de activación semimáxima. C) Las células HEK293 se cotransfectaron con Bk2R y con mTRPC5 silvestre. Al día siguiente de la transfección, se añadió bradicnina 1  $\mu$ M a las células. Un minuto o 10 minutos después, se paró la estimulación al bañar a las células con PBS frio por tres veces. Se evitó una posible endocitosis del canal al poner a las células en hielo. Se evaluaron las proteínas totales usando el lisado total, mientras que la porción membranal se evaluó midiendo proteínas biotiniladas. Se usó actina como control de cargado.

## ***2. Estudios sobre la regulación de la localización celular y la función del canal TRPC1 humano por otros miembros de la familia TRPC***

**La proteína TRPC1 exógena se expresa principalmente en membranas celulares internas.**

Con anterioridad se ha reportado que al expresarse sola, la proteína TRPC1 tiene una localización intracelular, probablemente en el Retículo Endoplásmico<sup>41</sup>. Para investigar la localización intracelular de TRPC1 en el presente trabajo se emplearon dos líneas celulares, CHO y HEK293, mismas que fueron transfectadas con las quimeras fluorescentes de TRPC1, TRPC4 o TRPC5 en distintas combinaciones. Cabe mencionar que en estas líneas celulares no nos fue posible detectar por Western Blot los canales TRPC expresados de manera endógena. Por PCR, solo se detectó el mensajero cuando la reacción se dejó por más de 35 ciclos, indicando una cantidad muy baja de mRNA correspondiente a TRPC1, 4 y 5.

En la figura 7A se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal ilustrando la localización principalmente intracelular de la proteína CFP-TRPC1. Para tratar de definir con mayor precisión su localización, las células transfectadas se tiñeron con los marcadores fluorescentes de retículo endoplásmico Brefeldina-bodipy o ER-Tracker, mostrando un alto grado de colocalización (datos no mostrados). Por el contrario, al teñir las células transfectadas con los marcadores fluorescentes de membrana CM-DiI o FM4-64, la colocalización detectada resultó mucho menor (la colocalización con FM 4-64 se muestra en la figura 7A).



**Figura 7: Modulación de la localización celular de TRPC1 humano:** A) Reconstrucción tridimensional de células que expresan CFP-TRPC1 solo (TRPC1) o combinado con TRPC3 silvestre (TRPC1-TRPC3), TRPC4 silvestre (TRPC1-TRPC4) o con TRPC5 silvestre (TRPC1-TRPC5). En rojo se muestra el indicador de membrana plasmática, en verde la fluorescencia debida a CFP-TRPC1 y en amarillo la colocalización de ambas. B) Porcentaje de colocalización de TRPC1 con el marcador de membrana plasmática. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DE), y el número de células (n) medidas. C) Western Blot de la coimmunoprecipitación de TRPC4 o TRPC5 con CFP-TRPC1. Se precipitó esta proteína con anti-GFP, y la membrana se reveló con anticuerpos anti-GFP, anti-TRPC4 o anti-TRPC5

Se obtuvieron resultados similares al cotransfectar a CFP-TRPC1 con TRPC3 (figura 7A) y TRPC6 (no mostrado), a pesar que se ha reportado que ambas proteínas se expresan en la membrana plasmática<sup>41</sup>. Por el contrario, la coexpresión de CFP-TRPC1 con TRPC4 o TRPC5 resultó en un aumento importante en la localización de TRPC1 en la membrana plasmática, de acuerdo a su colocalización con FM4-64 (mostrada en amarillo en la figura 7A). En la figura 7B se muestra el análisis cuantitativo de la

colocalización de TRPC1 con FM4-64 en las distintas condiciones en que se probó: al ser expresado solo, TRPC1 muestra un  $12 \pm 6\%$ , (n=53) de colocalización con la membrana, que no resulta significativamente distinto a los porcentajes de colocalización obtenidos al coexpresar a TRPC1 con TRPC3 ( $15 \pm 4\%$ , n=42) o TRPC6 ( $7 \pm 6\%$ , n=38). Sin embargo, al coexpresarlo con TRPC4 se obtiene un  $59 \pm 9\%$  (n=39) de colocalización, mientras que al coexpresarse con TRPC5, el porcentaje de colocalización de TRPC1 con el marcador de membrana llegó a  $64 \pm 8\%$  (n=44). Para complementar estos estudios, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación aprovechando los epítomos de la GFP presente en las proteínas quiméricas CFP- y YFP-TRPC1. De esta manera, al coexpresar CFP-TRPC1 con TRPC4 o TRPC5, se detectó que el anticuerpo anti-GFP fue capaz de coimmunoprecipitar a TRPC4 o TRPC5 (Figura 7C). En resumen, estos resultados muestran que tanto TRPC4 como TRPC5, pero no TRPC3 ni TRPC6, pueden modular la localización celular de TRPC1, de acuerdo con reportes previos <sup>41</sup> y <sup>66</sup>.

Es importante mencionar que las proteínas de fusión fluorescentes TRPC4 y TRPC5 se localizan en la membrana plasmática, y en nuestro sistema mostraron altos niveles de colocalización con FM4-64 y CM-DiI (imágenes no mostradas):  $72 \pm 9\%$  (n=41) para YFP-TRPC4 y  $75 \pm 11\%$  (n=36) para YFP-TRPC5, respectivamente.

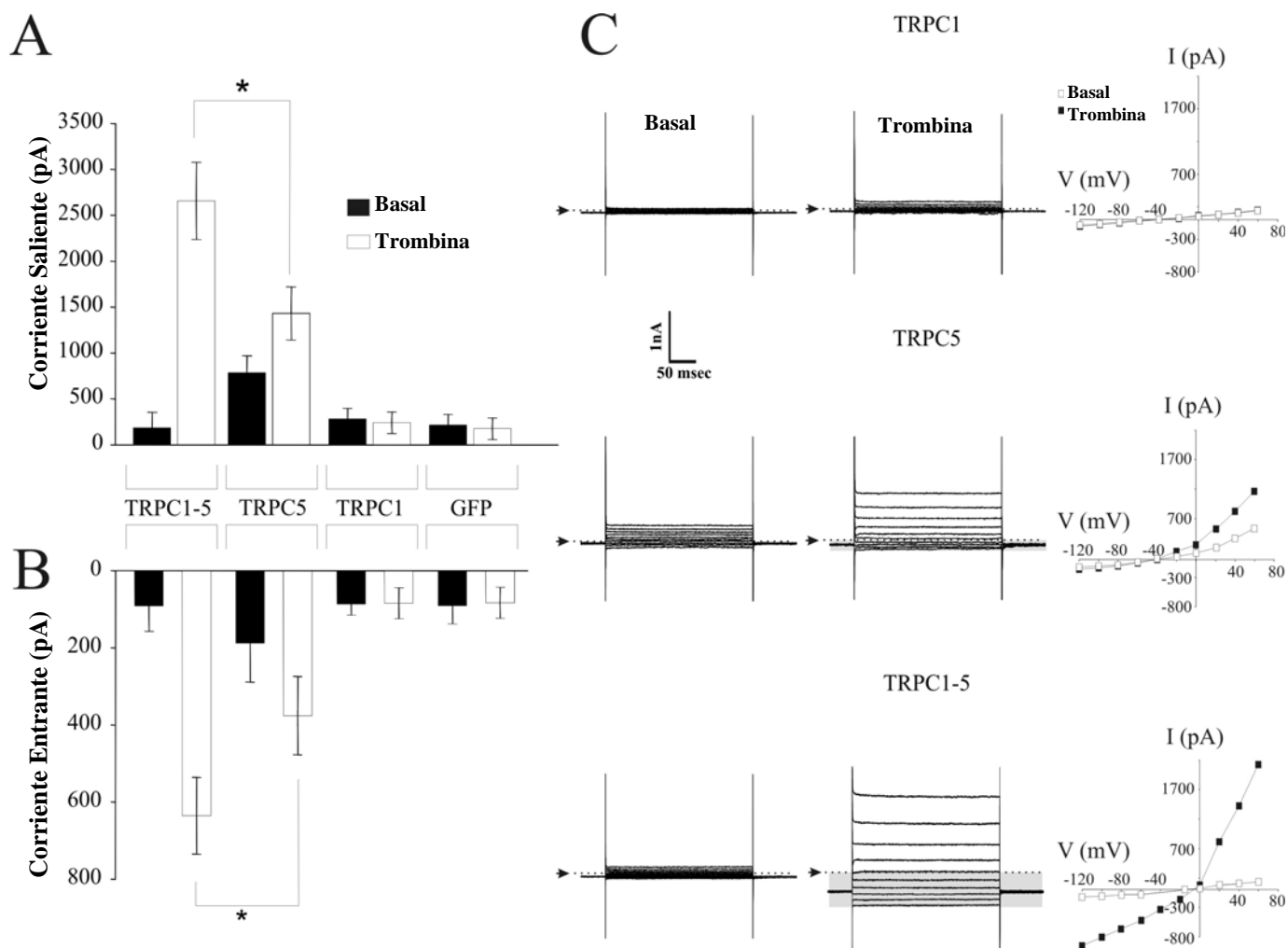
## **Mediciones de potencial de membrana de células coexpresando TRPC1 y TRPC5**

El hecho de que TRPC1 se translocara del RE a la membrana plasmática nos llevó a investigar si esta translocación se refleja funcionalmente con la aparición de alguna corriente iónica distintiva. Con esta finalidad, empleando técnicas comunes de *patch-clamp* se grabó el potencial de membrana de células expresando TRPC1 y/o TRPC5. Las corrientes en *Whole-cell* se provocaron fijando el voltaje en distintos potenciales



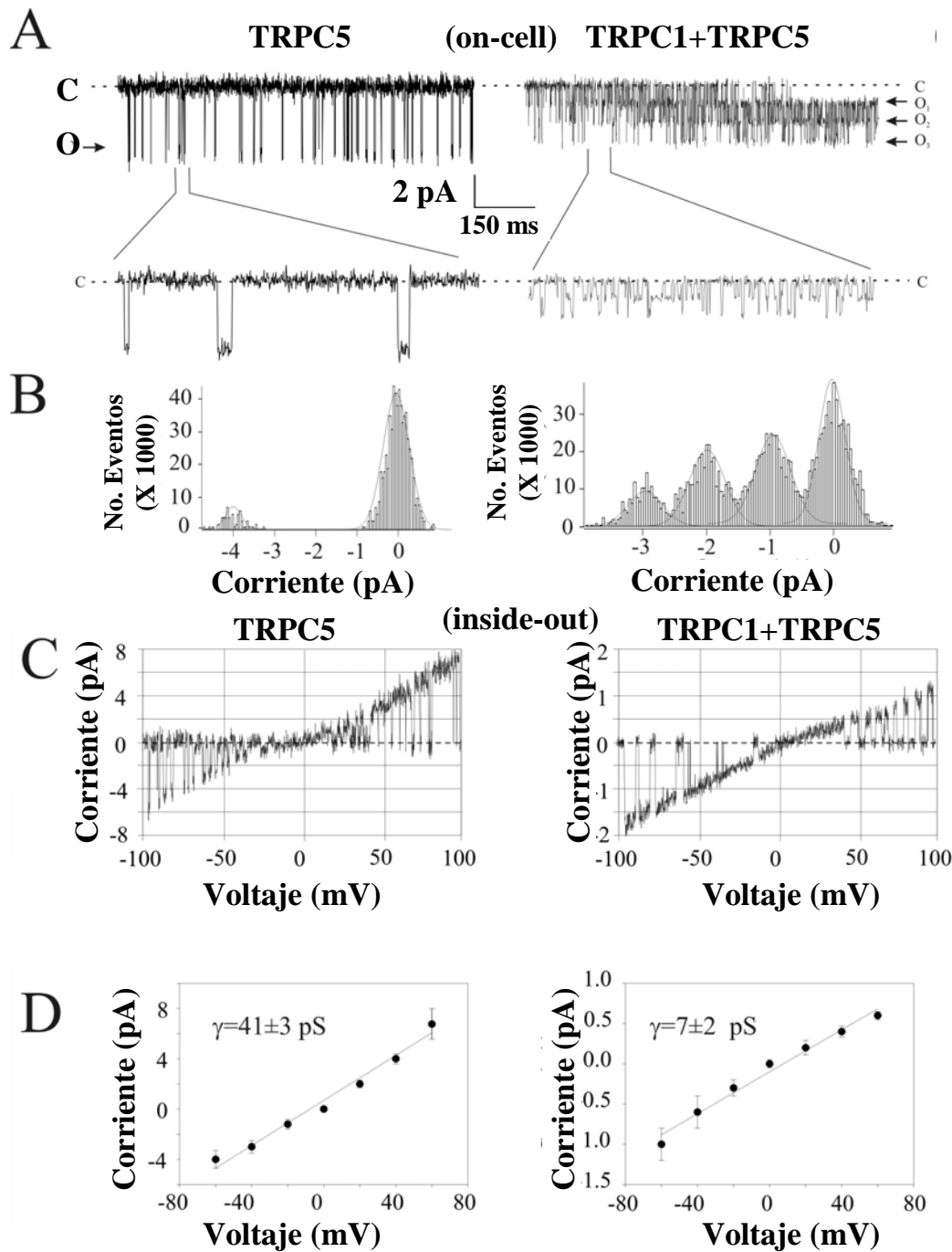
(de -100 a +60 mV) en pasos de 20 mV, a partir de un potencial de *holding* de -80 mV. La solución intracelular contenía aspartato de potasio 130 mM, a la cual se le añadió cloruro de cesio 10 mM para inhibir las corrientes de potasio. En estas condiciones el potencial de reversión de un electrodo selectivo para potasio es de -84 mV.

Para estimular las células se eligió la trombina, pues como se mostró en la figura 1, provoca una corriente mediada por TRPC5 en células CHO transfectadas con cDNA correspondiente a TRPC5. Se generaron células transfectadas establemente con TRPC1, y al medir en *Whole-cell* la media del pico de la densidad de corriente inducida por trombina, se encontró que dicha corriente no era significativamente diferente de las corrientes espontáneas ni de las corrientes inducidas por trombina en células transfectadas con un vector vacío o en células que expresaban la proteína fluorescente soluble eGFP (figura 8). Este dato refleja datos encontrado por otros grupos (revisado en <sup>94</sup>), es decir, que el canal homomérico debido a TRPC1 no acarrea corrientes detectables entrantes ni salientes. Por otro lado, en células CHO que expresaban TRPC5 de manera transitoria y estimuladas con trombina, se detectó una corriente saliente que aumentaba con el tiempo, alcanzando una amplitud de hasta  $1 \pm 0.5$  nA a +60 mV, con un potencial de reversión de  $-45$  mV  $\pm$  2mV. La corriente alcanzó su amplitud máxima poco después de los 5 minutos de iniciada la estimulación, de manera similar a lo reportado previamente (figura 8). Dado que las células se transfectaron con un plásmido bicistrónico que codificaba para TRPC5 y GFP, para realizar las mediciones de potencial en las células que expresaban TRPC5 bastó con elegir a las células fluorescentes.



**Figura 8. Experimentos de *Patch-clamp* con TRPC1 humano** A) Corrientes totales en *Whole-cell* obtenidas de células transfectadas con GFP, TRPC1, TRPC5 o TRPC1 y TRPC5. Se muestran las corrientes basales y las obtenidas después de estimular con 0.3 u/ml de Trombina. B) Corrientes entrantes obtenidas con las mismas condiciones usadas en el panel A. Se muestran las corrientes obtenidas a +60 y a +120 mV. C) Corrientes en *whole-cell* en condiciones basales y después de la estimulación con 0.3 u/ml de trombina. Se marcó con una barra gris en los paneles de la izquierda, la corriente entrante, para así distinguir con más facilidad la diferencia entre las corrientes con TRPC5 y las corrientes con TRPC1-TRPC5. La corriente a nivel 0 se muestra con la línea discontinua marcada con una flecha a la izquierda de cada medición. La última columna del panel ilustra curvas corriente-voltaje representativas para TRPC1 solo, TRPC5 solo, y la combinación TRPC1-TRPC5 antes (cuadros vacíos) y después de la estimulación con trombina (cuadros llenos). Los asteriscos en A y B indican diferencias significativas ( $P > 0.002$  y  $P > 0.00001$  para corrientes salientes y entrantes, respectivamente).

También se detectaron corrientes iónicas inducidas por trombina en las células que coexpresaban TRPC1 y TRPC5. En este caso la corriente saliente tuvo una amplitud de  $2.7 \pm 0.75$  nA a + 60 mV, con un potencial de reversión de  $-1 \pm 2$  mV (Fig **8C**), alcanzando también su máxima amplitud a los 5 min. de iniciada la estimulación con trombina. Como se muestra en las figuras **8B** y **C**, las principales diferencias entre las corrientes detectadas en células que expresaban TRPC5 y TRPC1+TRPC5 consisten en un aumento en las corrientes entrantes en las células que coexpresaban TRPC1 y TRPC5 al compararlas con las que expresaban TRPC5 solo. Se ha descrito que la expresión de TRPC5 murino resulta en una corriente saliente altamente rectificante, mientras que la corriente debida a TRPC1-TRPC5 tiende a ser lineal. Este comportamiento puede observarse en la figura **8C**; además se observa una diferencia importante en la selectividad iónica de las corrientes. La sustitución del potasio por cesio en la solución intracelular (ver materiales y métodos) produjo un potencial de reversión de  $-26 \pm 3$  mV (n=12) para las células que expresaban TRPC5, y de  $-9 \pm 3$  mV (n=15) para las que coexpresaban TRPC1-TRPC5 (datos no se muestran). Cabe aclarar que ya se habían reportado cambios similares en la selectividad de estos canales en células HEK293<sup>34</sup>. También es importante mencionar que la formación de heterómeros TRPC1-TRPC5 es un proceso natural incluso en células silvestres, pues dicho heterómero se detecta en el cerebro de mamífero, donde se activa por receptores acoplados a proteína G<sub>q</sub><sup>34</sup>.



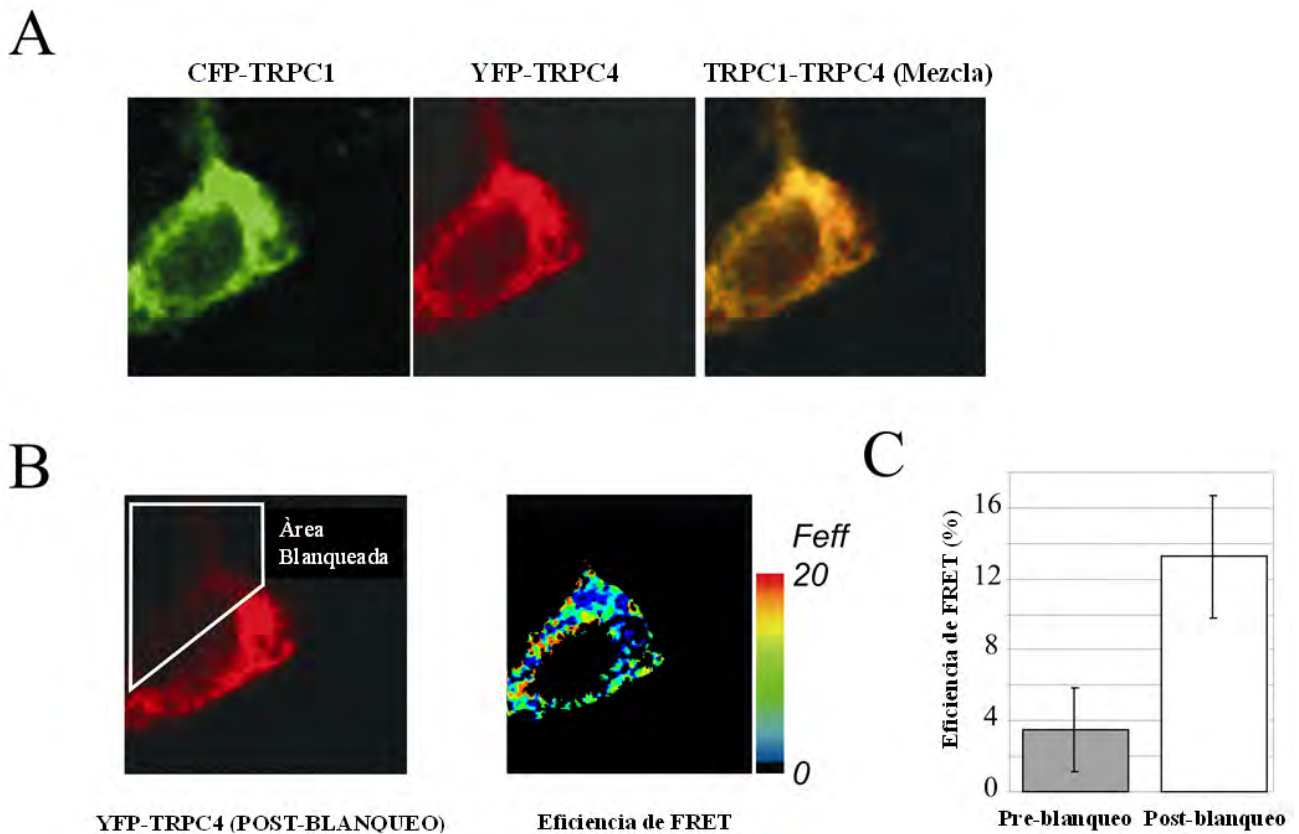
**Figura 9: Propiedades del canal único formado por homómeros de mTRPC5 y de heterómeros TRPC1-TRPC5** A) Registro representativo de un canal único en modo *cell-attached* mostrando la actividad en respuesta a la estimulación con 0.3 U/ml de trombina. Se muestra la corriente en nivel cero (canal cerrado) (C), y la corriente debida al canal abierto (O). El panel TRPC1+TRPC5 muestra tres canales en la pipeta. Los paneles inferiores representan fragmentos del registro mostrado, pero con mayor resolución temporal para mostrar los eventos de apertura de los canales. B) Histogramas de amplitud obtenidos de los registros mostrados en A. Las líneas sólidas representan el ajuste a distribuciones gaussianas para obtener la amplitud media. C) Corrientes en canal único obtenidas con un protocolo de rampa de voltaje, de -100 a +100 mV para TRPC5 solo (izquierda) y TRPC1+TRPC5 (derecha). D) Promedio  $\pm$  desviación estándar para corrientes de canal único de TRPC5 (izquierda) y TRPC1 + TRPC5 (derecha). Los insertos muestran la conductancia del canal único ( $\gamma$ ) calculada ajustando mediante regresiones lineales (líneas sólidas). Se muestran los datos obtenidos de al menos 15 registros independientes, obtenidos de 5 transfecciones distintas.

Las mediciones de corrientes de canal único confirman la formación de heterómeros de TRPC1-TRPC5. Como se observa en la figura 9, las propiedades del canal único obtenidas de células que expresan TRPC5 se distinguen fácilmente de aquellas obtenidas en células que expresan TRPC1-TRPC5. Las diferencias en conductancia y apertura del canal único resultaron más notorias al emplear un protocolo de rampa de voltaje, de -100 a +100 mV (figura 9C). La pendiente promedio de la conductancia del canal único, medida de -60 a 0 mV, fue de  $41 \pm 3$  pS ( $n=15$ ) en las células con TRPC5, y de  $7 \pm 2$  pS ( $n=22$ ) en las células con TRPC1-TRPC5 (figura 9D). Ya se han reportado este tipo de diferencias en la conductancia de canal único entre homotetrámeros de TRPC5 y heterotetrámeros de TRPC1-TRPC5<sup>34</sup>. Estas conductancias no se detectaron en células que expresaban TRPC1 solo, ni en células transfectadas con la GFP o en células sin transfectar. Vale la pena mencionar que, como se había reportado anteriormente<sup>95</sup>, se detectó una importante actividad espontánea del canal en las células que expresaban TRPC5. En las células transfectadas con TRPC1-TRPC5 no se observó esta actividad espontánea, resultado que está de acuerdo con nuestros propios resultados donde las corrientes basales en *Whole-cell* son significativamente mayores en las células que solo expresan TRPC5 que en las que expresan TRPC1-TRPC5 (Figura 8B y C). Sería importante examinar más a detalle los mecanismos que provocan esta diferencia, pero en el presente trabajo este hecho no se investigó más. En resumen, las diferencias en potencial de reversión y en las propiedades del canal único obtenidas con TRPC5 y con TRPC1-TRPC5 apoyan la hipótesis de que TRPC5 y TRPC1 interactúan para formar un nuevo canal capaz de alcanzar la membrana plasmática. El que TRPC1 no acarree corrientes al ser expresado solo, tiene dos posibles interpretaciones: puede ser que TRPC1 no pueda formar un canal funcional homomérico, o que TRPC1 sea incapaz de translocarse a la membrana plasmática por si solo, idea apoyada por los estudios de

microscopía confocal mostrados con anterioridad; en este caso, aunque formara un canal funcional, no se detectarían las corrientes que fluyen a través de él por la técnica de *patch-clamp* en sus configuraciones clásicas.

Para demostrar por otro método la interacción cercana entre TRPC1 y TRPC4 o TRPC5, se aprovecharon las proteínas de fusión fluorescentes de TRPC1 y TRPC4 para hacer experimentos de FRET, empleando a la construcción de eCFP-TRPC1 como fluoróforo donador y a la construcción de eYFP-TRPC4 como fluoróforo aceptor, usando el método de blanqueamiento de aceptor. Brevemente, en este método se mide la eficiencia de FRET antes y después de fotoblanquear al aceptor con una exposición prolongada a un láser de alta intensidad cuya longitud de onda solo permite excitar al aceptor. En caso de que el donador y el aceptor cumplan las condiciones para hacer FRET, al fotoblanquear al aceptor se observará un incremento importante en la fluorescencia del donador, pues al no transferir su energía por FRET, la emite en forma de fotones. Cabe recordar que una de las principales condiciones para que se dé FRET en un par donador-aceptor consiste en una proximidad entre ambos fluoróforos menor a 10 nm, lo cual en general se interpreta como interacción directa entre las moléculas que contienen dichos fluoróforos.

Al emplear las construcciones mencionadas, se observó FRET entre ellas de manera reproducible. La combinación recíproca (ed. eYFP-TRPC1 y eCFP-TRPC4) resultó también en una señal de FRET de magnitud similar a la anterior, confirmando el resultado. La señal se detectó tanto en la membrana plasmática como en el interior de la célula. Es posible que la señal observada al interior de la célula se debiera a canales en tránsito hacia la membrana plasmática, lo cual implica que el heterómero TRPC1-TRPC4 se forma antes de que las proteínas alcancen la membrana (figura 10).



**Figura 10: Formación de heterotetrámeros TRPC1-TRPC4 detectados con FRET.** A) Resultado del protocolo de FRET medido por blanqueamiento de aceptor para determinar las interacciones entre TRPC1 y TRPC4. Se muestra la fluorescencia entre eCFP-TRPC1 (donador, en verde), eYFP-TRPC4 (en rojo) y la colocalización (en amarillo). B) En la imagen de la izquierda se muestra el área de la célula (delimitada por el polígono blanco) blanqueada excitando al aceptor con el láser de 514 nm al 100% de poder por aproximadamente 30 segundos. La eficiencia de FRET se muestra en pseudocolor en la imagen de la derecha. El área blanqueada muestra una mayor eficiencia de FRET. C) Media  $\pm$  DE de la eficiencia de FRET de 20 mediciones independientes. Se compara la eficiencia en las áreas no blanqueadas (en gris) contra las áreas blanqueadas (en blanco).

Las construcciones fluorescentes de TRPC5 (eCFP-TRPC5 y eYFP-TRPC5) resultaron incapaces de hacer FRET entre sí o con TRPC1, aunque mostraron localización principalmente en la membrana plasmática, y funcionalmente resultaron indistinguibles del TRPC5 silvestre (datos no mostrados). Esta incapacidad de hacer FRET no implica que las quimeras fluorescentes de TRPC5 no puedan formar homo u heterotetrámeros, pues un resultado negativo en FRET no se considera prueba de

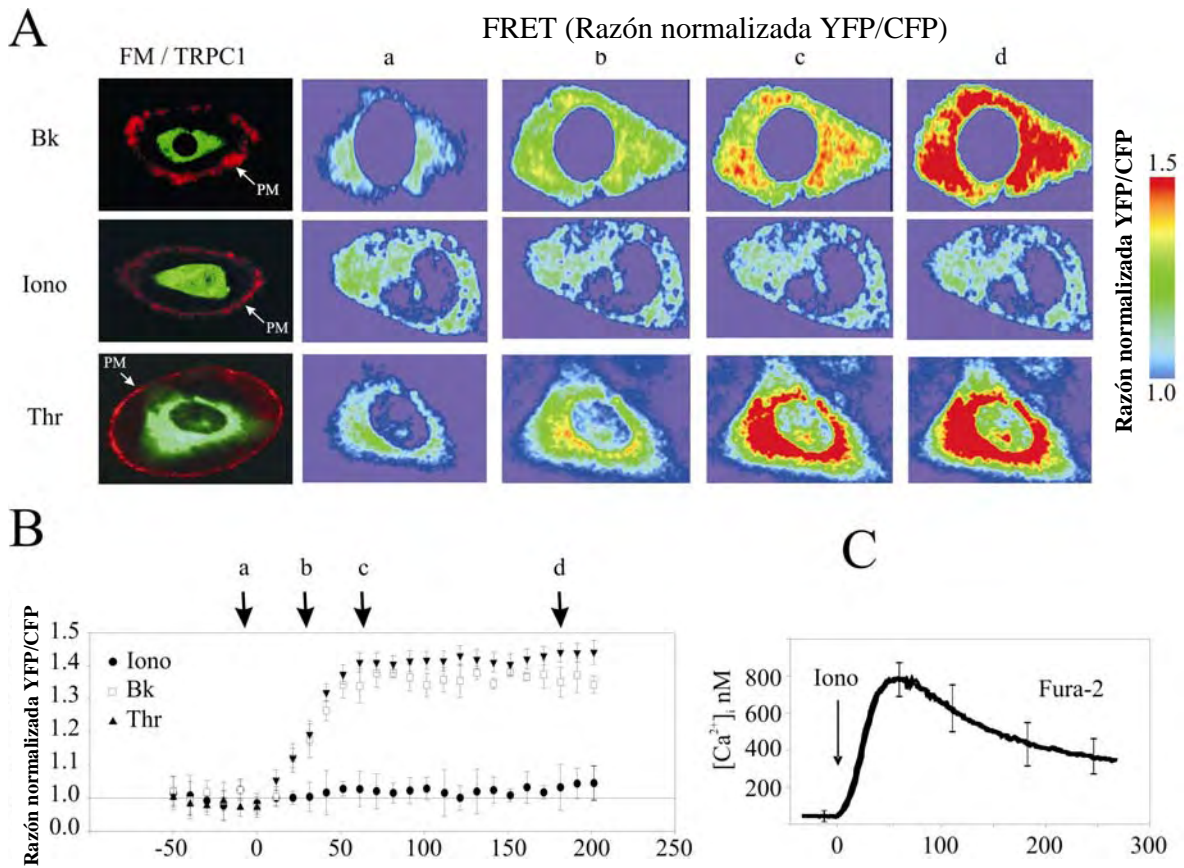
ausencia de interacción. Antes de probar si TRPC5 era capaz de hacer FRET consigo mismo, se demostró la capacidad de todas las construcciones fluorescentes de interactuar consigo mismas: CFP-TRPC4 coimmunoprecipitó a TRPC4 silvestre y CFP-TRPC5 coimmunoprecipitó a TRPC5 silvestre (datos no mostrados). En segundo lugar se detectó FRET al coexpresar CFP-TRPC4 y YFP-TRPC4, así como al coexpresar CFP-TRPC1 y YFP-TRPC1, lo cual indica la formación de tetrámeros que contienen ambas proteínas fluorescentes; la señal de FRET se detecta en las proteínas expresadas en RE, indicando que los tetrámeros ya están formados en este organelo. Por otro lado, no se pudo detectar FRET al coexpresar CFP-TRPC5 y YFP-TRPC5, a pesar de que en el microscopio confocal se observaba una colocalización cercana al 100%. Además de la ya mencionada regla de los 10 nm, otra de las características necesarias para que un par donador-aceptor lleve a cabo el FRET es una adecuada orientación de los momentos dipolo de los fluoróforos; es probable que en el caso de TRPC5, dada la estructura tridimensional de la proteína, las proteínas fluorescentes fusionadas no pudieran orientar sus dipolos adecuadamente para llevar a cabo la transferencia de energía, aunque no afectaron otras características funcionales de la proteína.

### **El canal TRPC1 humano parece ser funcional en el RE**

El canal TRPC5 puede translocarse rápidamente a la membrana plasmática desde sitios intracelulares próximos a la membrana (Fig 6C y <sup>35</sup>). Sin embargo, nunca se observó un proceso similar para el canal TRPC1, el cual, como ya se mencionó, parecía estar localizado en el RE. Cabe la posibilidad de que, para ser completamente funcional, TRPC1 tenga que interactuar con otras proteínas (no necesariamente restringidas a miembros de la familia TRPC) y alcanzar la membrana plasmática. Otra posibilidad es que TRPC1 tenga de hecho una función en el RE como homómero, posiblemente como canal liberador de Ca<sup>2+</sup>.



Como se mencionó anteriormente, al coexpresar TRPC1 fusionado a CFP con TRPC1-YFP, se observó una señal fuerte de FRET en el RE, lo que sugiere que desde que se encuentra en el RE, TRPC1 ya está formando el homotetrámero.



**Figura 11: Medición de la actividad de TRPC1 en el RE con el sensor de calcio basado en FRET, chameleon.** A) Los paneles de la izquierda muestran la fluorescencia de eCFP-TRPC1 (en verde) y del marcador de membrana FM4-64 (en rojo). Se observa una localización de TRPC1 principalmente intracelular. Los paneles a la derecha (a-d) muestran los cambios en la relación de las fluorescencias YFP/CFP (se muestran datos normalizados y sustrayendo el fondo a toda la serie de imágenes), con tres condiciones experimentales (50 nM bradicinina, 1  $\mu$ M ionomicina y 0.3 U/ml trombina). La aplicación de ionomicina (iono) no produjo una señal de FRET detectable. La relación de fluorescencias se representa con pseudo-color. El marcador de membrana se añadió al final de la medición, para evitar contaminación de la emisión del par FRET, así como para evitar cualquier efecto indeseable de este fármaco en la fisiología celular, pues es endocitado después de unos minutos de haber sido aplicado. B) Análisis temporal del FRET, medido como la relación normalizada de YFP/CFP. El fármaco se añadió en el tiempo 0. La gráfica muestra la media  $\pm$  DS de al menos 42 células para cada condición, obtenidas a partir de 6 transfecciones diferentes. Las flechas marcan los puntos donde se obtuvieron las fotos que ilustran el panel A. C) Cambio en el Ca<sup>2+</sup> intracelular en respuesta a ionomicina, en poblaciones celulares cargadas con fura-2. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 25 experimentos independientes.

Para evaluar la funcionalidad del canal putativo formado por TRPC1, se recurrió a un sensor de calcio conocido como Chameleon (descrito en <sup>96</sup>), que consiste en un par FRET (CFP-YFP) unido por una secuencia de aminoácidos cuya estructura depende fuertemente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . La eficiencia del FRET que ocurra entre la CFP y la YFP dependerá de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera que a concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$ , la eficiencia FRET aumentará de manera significativa con respecto a la eficiencia a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ . La fusión del sensor Chameleon con TRPC1 generó una proteína quimérica (TRPC1-YC6.1) que nos permitió monitorear la actividad de TRPC1 en tiempo real.

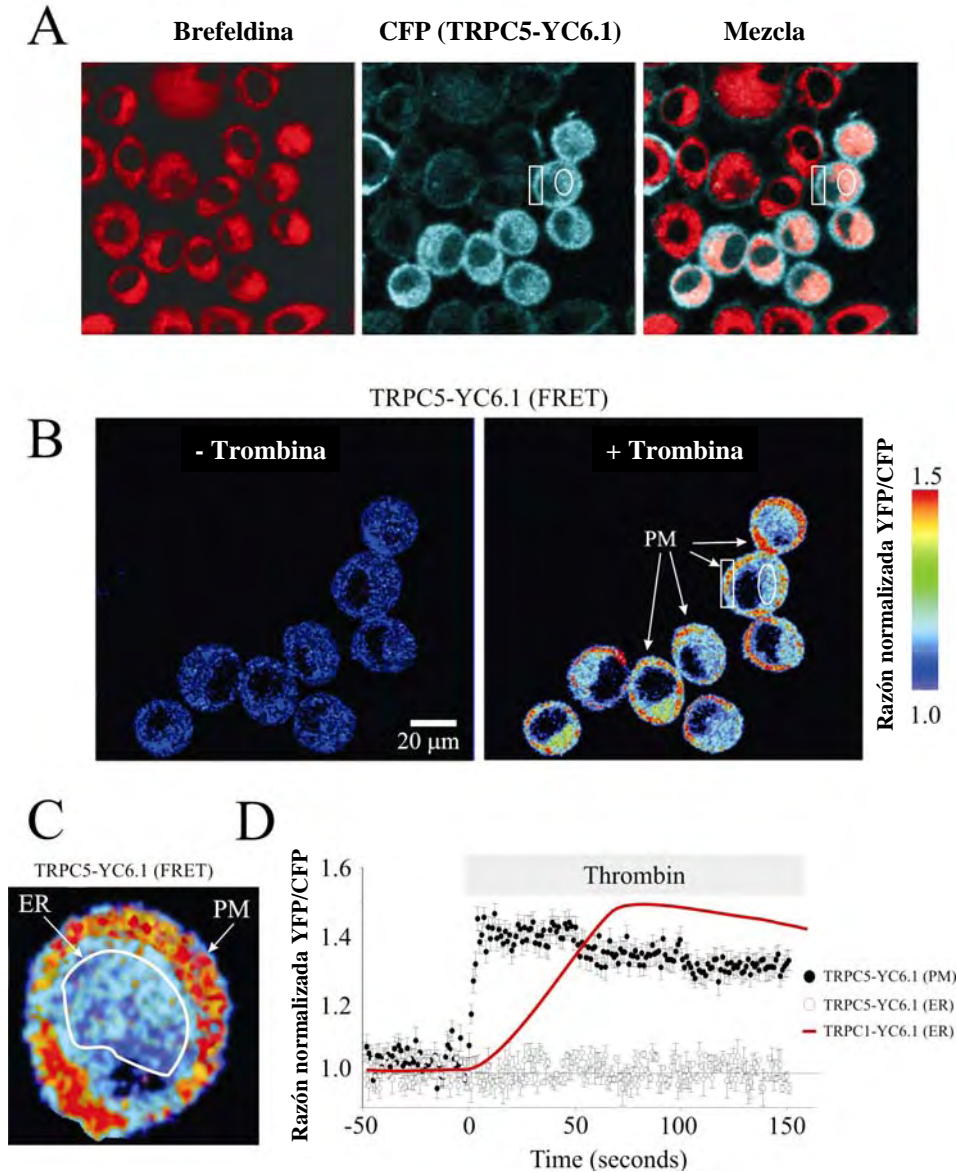
Como se muestra en la figura **11A**, la expresión de TRPC1-YC6.1 es muy similar a la descrita para CFP-TRPC1, es decir, colocaliza de manera importante con marcadores de RE y no con marcadores de membrana. La medición de FRET en células vivas nos permitió explorar el efecto de diversos fármacos que activan la cascada del  $\text{IP}_3$ , como bradicinina y trombina, sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Los agonistas mencionados provocaron una señal fuerte de FRET, que alcanzó su máxima amplitud a los 60 segundos después de su adición. Es importante aclarar, sin embargo, que con esos datos no era posible determinar si el  $\text{Ca}^{2+}$  que detectaba el sensor Chameleon estaba pasando por el poro del canal TRPC1, o si el sensor detectaba incrementos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico. Un resultado que apoya la hipótesis de que de hecho el sensor no detecta incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, es que se observó que al emplear fármacos que liberan de manera pasiva el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, como la ionomicina y la tapsigargina, no se detectaron cambios significativos en la señal de FRET en las células transfectadas con TRPC1-YC6.1. La realización de estos experimentos con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$

fluorescente Fura-2, demostraron que las células seguían viables y con capacidad de responder a ionomicina y tapsigargina con las condiciones experimentales empleadas.

Para analizar directamente si el  $\text{Ca}^{2+}$  detectado atravesaba el poro, se produjo una mutante de poro de TRPC1, en donde los residuos 560-562 (LFW) (que conforman el poro) <sup>97</sup> se sustituyeron con alaninas, esperando generar una proteína incapaz de conducir iones. Esta mutación se generó en la construcción TRPC1-YC6.1, para obtener la construcción TRPC1(mut)-YC6.1. La expresión de la proteína mutada resultó en un patrón de fluorescencia similar al descrito para TRPC1. Sin embargo, ni la estimulación con agonistas ni con agentes movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  provocaron cambios significativos en la intensidad del FRET en estas células. Este resultado sugiere fuertemente que la señal de FRET observada con la construcción TRPC1-YC6.1 sí representa movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del poro formado por TRPC1. Por lo tanto, TRPC1 parece estar formando parte de un canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE.

La novedosa metodología para reportar la actividad del canal TRPC1 podría usarse para analizar la actividad de otros canales. Como prueba de principio, se fusionó el sensor Chameleon a la proteína mTRPC5, generando la construcción TRPC5-YC6.1. Esta proteína quimérica mostró un patrón de localización en la membrana plasmática consistente con el observado para las construcciones de TRPC5 fluorescente, con un alto grado de colocalización con los marcadores de membrana (figura **12A**). También se detectó fluorescencia en el retículo endoplásmico, posiblemente debido a los canales en tránsito a la membrana plasmática. La estimulación con agonistas de células transfectadas con TRPC5-YC6.1 tuvo como resultado un incremento significativo en la señal de FRET, aunque es importante mencionar que este cambio solo se observó en la membrana plasmática y no al interior de la célula, a pesar de la presencia de TRPC5-YC6.1 en compartimentos intracelulares (figura **12B-D**). Este resultado contrasta con lo

observado con la construcción TRPC1-YC6.1 en cuanto a que el TRPC5-YC6.1 expresado en el RE es insensible a la estimulación con agonistas, y apoya la hipótesis que indica que el TRPC1 retenido en el RE tiene un papel funcional como canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por agonista.

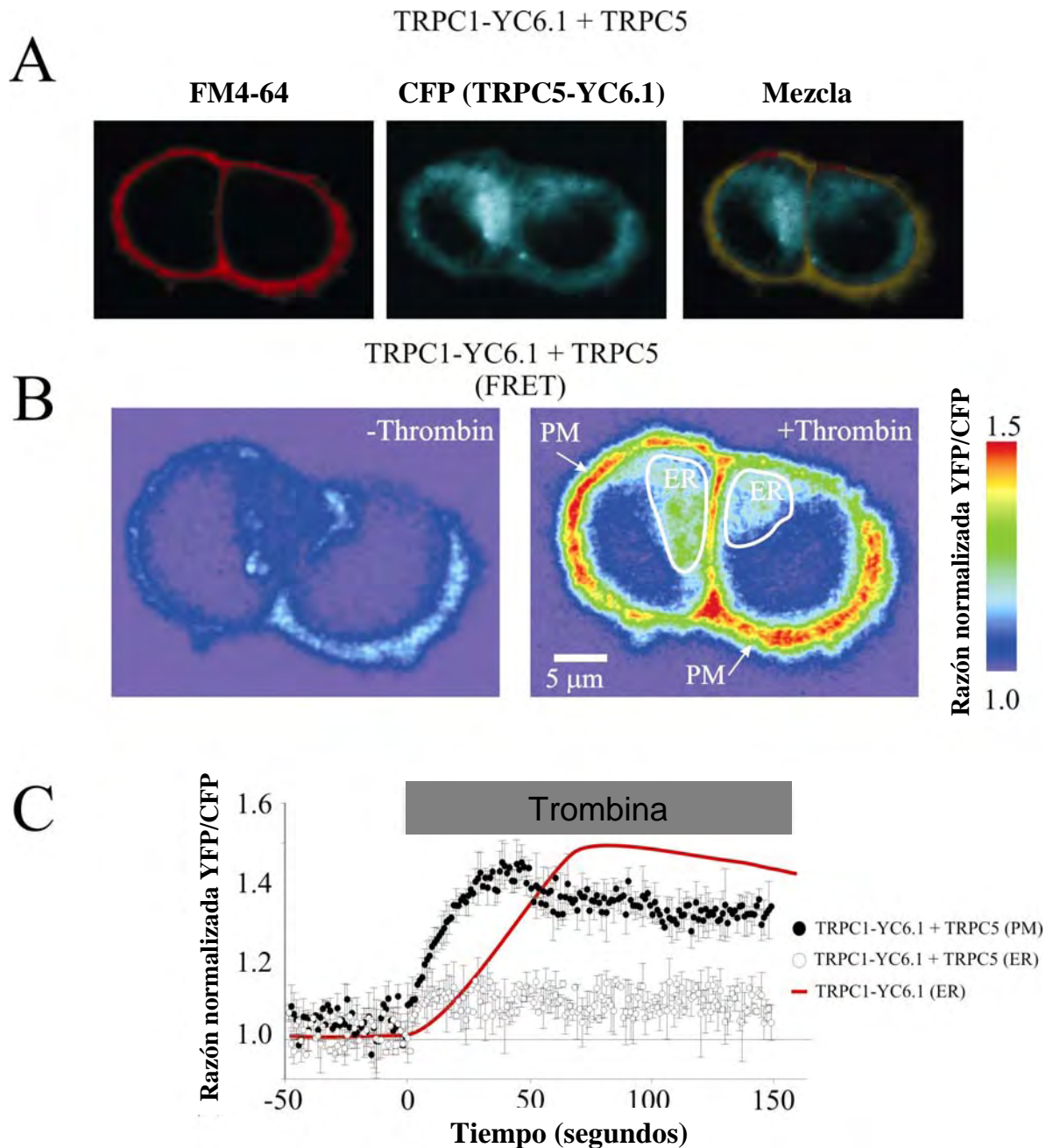


**Figura 12: Medición de la actividad de mTRPC5 empleando el sensor de Calcio Chameleon** A) El panel de la izquierda muestra la fluorescencia del marcador de RE brefeldina (rojo); el panel central muestra la fluorescencia de TRPC5-YC6.1 (azul) y por último, el panel de la derecha muestra la mezcla de ambos canales. Se marcó con un rectángulo blanco la membrana plasmática; notar la ausencia de marcaje con brefeldina en esta área; el RE de la misma célula se marcó con un círculo blanco. B) Relación YFP/CFP normalizada y sin fondo antes (-trombina) y después (+trombina) de añadir 0.3 U/ml de trombina. Notar la señal intensa de FRET (en rojo) en áreas que posiblemente representan la membrana plasmática. Las áreas que corresponden al RE (es decir, teñidas con brefeldina) rara vez mostraron una señal de FRET significativamente mayor al ruido (en azul). C) Ampliación de una célula del panel B para mostrar con más detalle la señal de FRET de una célula activada con trombina. El FRET es fácilmente detectable en la membrana plasmática (marcada con una flecha y PM), pero no en el

RE. D) Curso temporal de la respuesta, medida como FRET, antes y después de estimular a las células como 0.3 U/ml de trombina al tiempo 0. Los círculos sólidos muestran la relación YFP/CFP en la membrana plasmática de las células que expresaban TRPC5-YC6.1, y los círculos vacíos la muestran en la zona correspondiente al RE en la misma célula. La línea roja muestra la señal medida con la construcción TRPC1-YC6.1 para comparar las cinéticas entre ambas construcciones. Se muestra la media  $\pm$  DE de al menos 40 células obtenidas de 5 transfecciones diferentes. Tanto la brefeldina como el FM4-64 se añadieron a las células después de realizar de las mediciones

Es importante mencionar que la velocidad de activación de TRPC5-YC6.1 medida por FRET resultó más rápida que la velocidad de activación de TRPC1-YC6.1 (indicada con una línea roja en la figura **12D**). La respuesta de TRPC5-YC6.1 tiene una cinética comparable con las velocidades de activación medidas con técnicas electrofisiológicas.

Por otro lado, para explorar la capacidad de TRPC5 de modificar la localización de TRPC1-YC6.1, se cotransfectaron los plásmidos con los genes de dichas proteínas, para posteriormente buscar por microscopía la localización de TRPC1-YC6.1. La fluorescencia se localizó principalmente en la membrana plasmática (figura **13A**). En estas células se midió la señal de FRET, y se observó un aumento considerable de dicha señal como respuesta a la estimulación con agonistas, aunque la respuesta siempre se observó restringida a la membrana celular (figura **13B**). Estos resultados indican que TRPC5 induce la translocación de TRPC1-YC6.1 a la membrana plasmática, formando un heterómero funcional activado por agonistas. Además, empleando técnicas electrofisiológicas se midió la actividad del heterómero, la cual resultó muy parecida a la del heterómero obtenido coexpresando TRPC1 y TRPC5 silvestres. Es importante mencionar que la cinética del cambio en la señal de FRET resultó intermedia entre la activación lenta del homómero de TRPC1-YC6.1 y la activación rápida del homómero de TRPC5-YC6.1 (figura **13C**). Estas diferencias probablemente se deben a las propiedades intrínsecas de los canales, pero en el presente trabajo estas características no se exploraron más a fondo.

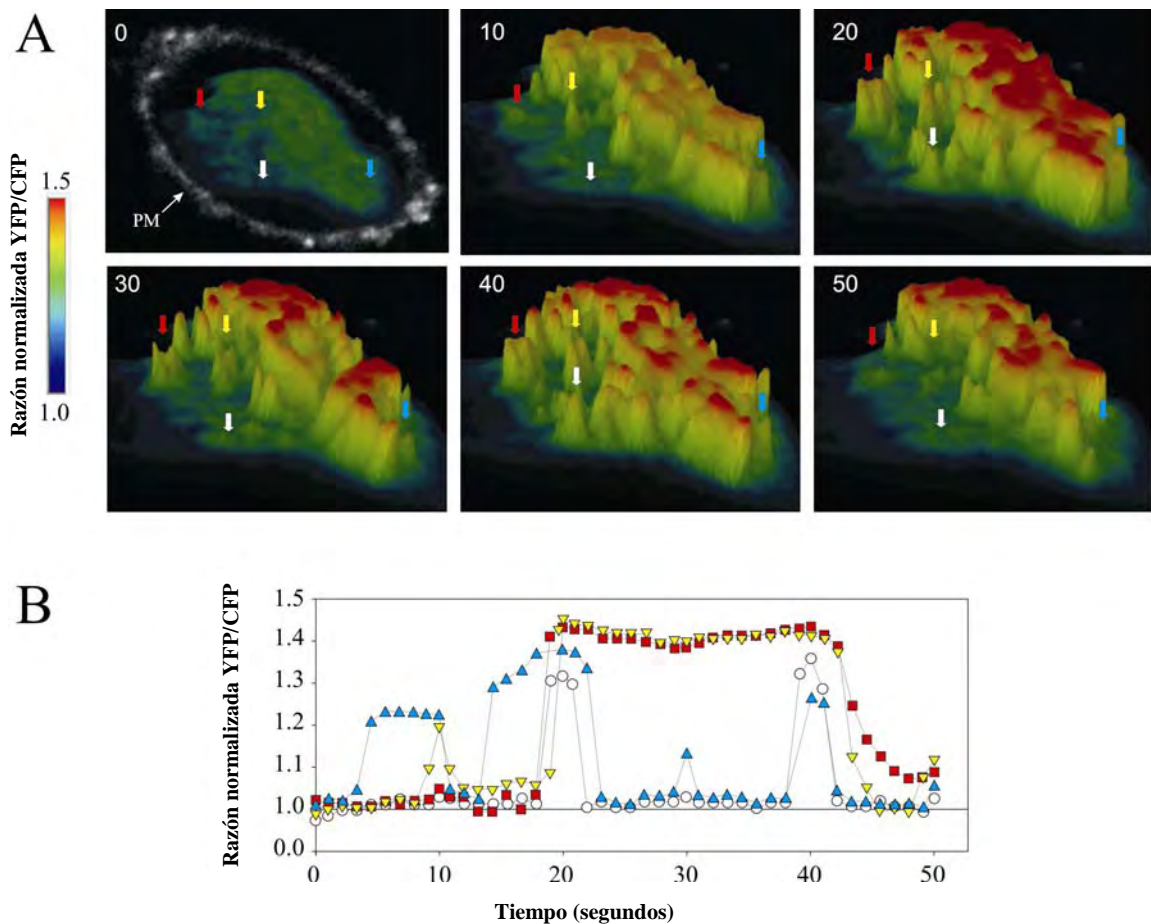


**Figura 13: Respuesta de FRET inducida por agonistas en células coexpresando TRPC1-YC6.1 y mTRPC5 silvestre.** A) El panel de la izquierda muestra en rojo la localización de la membrana plasmática, marcada con FM4-64, de dos células representativas. El panel central muestra en azul la fluorescencia de CFP debida a TRPC1-YC6.1. El panel de la derecha muestra en amarillo la colocalización de TRPC1-YC6.1 y FM4-64. B) Relación de fluorescencias antes (-thrombin) y después (+thrombin) de estimular con 0.3 U/ml de trombina. Empleando una escala de pseudocolor, se muestra FRET intenso en la región que corresponde a la membrana plasmática, así como FRET de menor intensidad en el RE, el cual posiblemente se debe al canal TRPC1-YC6.1 homomérico, no asociado con TRPC5. C) Cinética (media  $\pm$  DE) de la relación de fluorescencias en la membrana plasmática (círculos llenos) y del Retículo Endoplásmico (RE, círculos abiertos). Para fines de comparación se muestra con una línea roja la media de la relación de fluorescencias debida a TRPC1-YC6.1 expresado solo (fluorescencia medida en el RE); puede verse que la activación del heterómero TRPC1-YC6.1 + TRPC5 es más rápida que la activación de TRPC1-YC6.1 solo.

## Oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}$ inducidas por agonistas, mediadas por TRPC1

Al estimular con agonistas a células transfectadas con la construcción TRPC1-YC6.1, en la mayoría (84%, N=51) se observó que las señales de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  oscilaban en ciertas regiones del Retículo Endoplásmico; estas oscilaciones no estaban sincronizadas, sino que tenían un ritmo diferente en distintas secciones del retículo endoplasmico. Como se observa en la figura **14**, en algunas zonas del retículo la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  era sostenida, mientras que en otras las oscilaciones eran notorias. Es posible que la intensa fluorescencia al sobreexpresar TRPC1-YC6.1 haya enmascarado pequeñas variaciones en la señal de FRET, pues las oscilaciones solo se detectaban en las zonas del RE con menos fluorescencia, y en general en células con menor expresión de la quimera; dicha posibilidad no se exploró en el presente trabajo.

Estos resultados indican que la actividad de TRPC1 puede oscilar en ciertas áreas bien definidas en el RE en presencia de agonistas. Estas oscilaciones podrían tener implicaciones funcionales importantes, en especial en vista de la posible interacción entre TRPC1 y el canal  $\text{IP}_3\text{R}$ ; a este respecto cabe resaltar que se ha reportado que en un modelo de knockdown de TRPC1 se eliminan las oscilaciones de calcio mediadas por  $\text{IP}_3\text{R}$  e inducidas por agonistas <sup>42</sup>.



**Figura 14: Oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula única detectadas con TRPC1-YC6.1** A) Movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula representativa, según la relación de fluorescencias YFP/CFP en células transfectadas con la construcción TRPC1-YC6.1. En las figuras se muestra la altura de la señal (proporcional a la magnitud de la relación de fluorescencias) para observar claramente los incrementos localizados de  $\text{Ca}^{2+}$ . La leyenda “Time 0” marca la imagen de la célula antes de añadir la bradicinina; el halo blanco muestra la membrana plasmática, marcada con FM4-64 al final del experimento. Las siguientes imágenes muestran la relación de fluorescencias a los 10, 20, 30, 40 y 50 segundos después de la estimulación. Se marcan con flechas de colores los “hot spots” de  $\text{Ca}^{2+}$  que oscilaron durante el experimento. B) Cinética de la relación de fluorescencia en los “hot spots” marcados con flechas en el panel A. Nótese que los cambios en la relación de fluorescencia son independientes entre sí. Se obtuvieron resultados similares al usar a la trombina como agonista. Se muestra una célula representativa de al menos 60 mediciones independientes obtenidas a partir de 10 transfecciones distintas.



## DISCUSIÓN

La estimulación por agonistas de receptores acoplados a proteínas  $G\alpha_{q/11}$  expresados en la membrana celular, inducen un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la hidrólisis de derivados fosforilados del inositol. Los miembros de la familia TRPC de canales catiónicos no selectivos juegan un papel importante en la señalización por  $Ca^{2+}$  inducida por receptores, pues estos canales se activan en la cascada de señalización iniciada por la PLC y son responsables de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. Aun no se ha identificado con precisión la manera en que la cascada de señalización de la PLC regula a estos canales.

### **La actividad de TRPC5 es modulada por $Ca^{2+}$ /CaM**

Se expresó la proteína mTRPC5 en células CHO y HEK293 para examinar la cinética y la magnitud de su activación después de activar las células con trombina y bradicinina. Con ambos agonistas se detectó una activación lenta de mTRPC5, tomándole aproximadamente 7 minutos de estimulación continua para alcanzar valores de estado estacionario. Esta cinética de activación lenta parece ser una propiedad del canal mTRPC5, independiente del receptor estimulado y de la línea celular empleada. Aquí se demostró que la introducción de CaM a la pipeta de *patch* acelera de manera significativa la activación del canal mTRPC5 en respuesta a la estimulación con agonistas. Las constantes de activación se redujeron a casi un tercio de su valor original al estimular células CHO con trombina y bradicinina, y células HEK293 con bradicinina. Estos resultados indican que el efecto que tiene la CaM sobre la activación

de mTRPC5 también es independiente del receptor estimulado y de la línea celular usada.

Por otro lado, se identificó un nuevo sitio de unión a CaM (CBII) en el extremo carboxilo terminal de mTRPC5. Su delección evitó la aceleración mediada por CaM de la activación del canal en respuesta a la estimulación con agonistas. Aunque este sitio de unión a CaM es importante para la facilitación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , no es imprescindible para la actividad del canal. El mutante mTRPC5 $\Delta$ CBII tuvo una corriente máxima de aproximadamente dos tercios de la corriente máxima del canal mTRPC5 silvestre, aunque otras características de este canal se mantuvieron sin cambios, como la forma de la curva corriente/voltaje, el potencial de reversión y la inhibición por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; la diferencia en la cantidad de corriente podría estar relacionada a la cantidad de proteína expresada o transportada a la membrana, factores que podrían variar según la clona empleada. Estos datos sugieren que el sitio CBII tiene un papel regulador en el control de la velocidad de reclutamiento del canal después de la activación de receptores acoplados a proteína G. Este mecanismo de retroalimentación positiva por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM es un mecanismo novedoso en los canales TRPC, y podría tener implicaciones fisiológicas importantes. En resumen, la velocidad de la activación de mTRPC5 se ve controlada por qué tan rápido se incrementa y qué tan alto llega la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico cerca del canal. Esto explicaría por qué la activación de mTRPC5 depende en gran medida de la capacidad de amortiguamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  de las soluciones intracelulares.

Los experimentos de biotilación y de electrofisiología llevados a cabo a 4°C sugieren fuertemente que los efectos de CaM mediados por CBII no implican cambios significativos en la translocación de mTRPC5 a la membrana plasmática. Aunque se observó un aumento rápido en la cantidad de mTRPC5 biotinilado en respuesta a la

bradicinina, al momento en que se observa la aceleración de las corrientes de mTRPC5 ya no hay cambios en la cantidad de mTRPC5 biotinilado.

La inhibición de TRPC5 por concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  altas y sostenidas, no afecta la velocidad de activación, sino la amplitud máxima de la corriente. La introducción de CaM exógena no afectó el efecto inhibitorio de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la amplitud de la corriente, pero sí facilitó la velocidad de la activación del canal por agonistas. Además, la mutante mTRPC5 $\Delta$ CBII se inhibió por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera similar que el canal silvestre, lo cual indica que el sitio CBII no tiene relación con la inhibición mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, son distintos los sitios responsables de la facilitación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM y de la inhibición mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  de la activación inducida por receptores. Dado que el sitio CIRB es importante para la inhibición dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de la activación de TRPC3 por el  $\text{IP}_3\text{R}$  <sup>90</sup>, es probable que el sitio CIRB de TRPC5 sea el responsable de la inhibición del canal por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que la afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$  por la CaM unida al sitio CIRB es más de 10 veces menor que la del sitio CBII del mTRPC5. Por lo tanto, se necesitan concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mucho mayores para que CaM afecte el sitio CIRB, comparado con el sitio CBII. Desafortunadamente, dado que las mutaciones introducidas en el sitio CIRB resultaron siempre en la inactivación del canal, no se pudo explorar el papel de dicho sitio en la regulación de mTRPC5. Vale la pena investigar cuidadosamente si la inhibición de la densidad de corriente de TRPC5 mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  es dependiente de CaM, y de ser así, cuales son los sitios críticos para esta regulación.

El sitio CIRB es esencial para el funcionamiento de los canales TRPC5, pues las mutaciones en dicho sitio provocaron la inactivación del canal. Dichas mutantes alcanzaban la membrana plasmática en cantidades similares a las del mTRPC5 silvestre,

por lo tanto los defectos en la actividad de mTRPC5 no se deben a deficiencias en la síntesis, estabilidad, tráfico y/o translocación de mTRPC5. Aparentemente se requiere el sitio CIRB intacto para la activación de los canales mTRPC5 por agonistas que activen la cascada de la PLC, aunque existe un reporte donde se detectó que la delección del sitio CIRB del canal TRPC3 generó deficiencias en la translocación de dicho canal a la membrana plasmática <sup>98</sup>. En otro trabajo <sup>80</sup> se mostró que la activación del IP<sub>3</sub>R es necesaria para la apertura de los canales mTRPC5. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con estos datos, y resaltan el papel principal del sitio CIRB durante la activación del canal inducida por agonistas. Dado que este sitio está conservado en todos los miembros la familia TRPC, es importante determinar en qué grado se requiere un sitio CIRB funcional para la activación de los miembros de esta familia.

En resumen, se demostró que la unión de CaM a un sitio carboxilo terminal, 95 residuos río abajo del sitio CIRB descrito con anterioridad, es necesario para la facilitación mediada por Ca<sup>2+</sup>/CaM de la activación inducida por receptor de los canales mTRPC5. Además de incrementar la velocidad de apertura del canal a bajas concentraciones, el Ca<sup>2+</sup> intracelular a altas concentraciones también bloquea la activación inducida por receptores. Este efecto parece ser independiente de la CaM, según lo encontrado al usar antagonistas de la CaM. Además, los resultados apoyan la hipótesis que dice que el sitio CIRB tiene un papel central en la activación de mTRPC5 por agonistas de receptores que activan la vía de la PLC. En conjunto estos resultados muestran una compleja modulación de la función del canal TRPC5, que brinda a las células un medio para controlar de manera fina la velocidad de despolarización de la membrana y la entrada de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a la estimulación de los receptores de la membrana plasmática. El papel de TRPC5 en la modulación de la motilidad de los

conos de crecimiento y de elongación de neuritas en neuronas de hipocampo fue determinado recientemente <sup>78</sup>; en este contexto es importante mencionar que es bien conocido el papel de CaM durante el crecimiento y la regeneración neuronal <sup>99</sup>. Experimentos con mTRPC5 $\Delta$ CBII u otros canales mutantes semejantes, podrían brindar información valiosa sobre el papel de CaM y TRPC5 en el control de la elongación de neuritas en el cerebro de mamíferos.

**TRPC1 es una proteína con actividad dual: funciona como canal liberador de Ca<sup>2+</sup> cuando se expresa como homómero, y como canal activado por receptores cuando forma heterómeros con TRPC5**

A la fecha, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados al respecto, todavía existe incertidumbre en cuanto a la regulación y la activación del canal TRPC1. Se han propuesto modelos donde TRPC1 actúa como un canal activado por el vaciamiento de almacenes intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, o como un canal activado por receptores (para una revisión más detallada de los mecanismos de activación propuestos para TRPC1, se recomienda el artículo de Montell, <sup>100</sup>). Incluso recientemente se ha detectado que TRPC1 podría funcionar como un canal activado por estiramiento <sup>101</sup>. Sin embargo, algunos estudios indican que los homómeros formados por TRPC1 son incapaces de llegar a la membrana plasmática y son retenidos en el retículo endoplásmico <sup>94, 34</sup>, donde podrían participar en la modulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RE al interactuar directamente con el IP<sub>3</sub>R <sup>42</sup>. Es importante mencionar que la mayoría de los estudios mencionados se llevaron a cabo en las mismas líneas celulares, y empleando construcciones similares, por lo que las diferencias observadas no se explican simplemente por diferencias metodológicas. Conforme aumenta el conocimiento

respecto a los canales TRPC, se vislumbran nuevas explicaciones para los diversos comportamientos de TRPC1; es probable que la diversidad de mecanismos de regulación de TRPC1 se deba, al menos en parte, a su asociación con otras proteínas. Por ejemplo, recientemente se ha mostrado que la actividad de canal activado por vaciamiento de almacenes de TRPC1 podría deberse a su interacción con STIM1<sup>102</sup>. Por otro lado, Orai1 también parece controlar dicha actividad, mediante una interacción directa con TRPC1<sup>103</sup>. Se ha postulado que otros miembros de la familia TRPC son capaces de modular la actividad de TRPC1. Por ejemplo al interactuar con TRPC5 en el sistema nervioso central, TRPC1 forma heterómeros activados por receptores e insensibles al vaciamiento de almacenes de Ca<sup>2+</sup><sup>34</sup>. En conclusión, la diversidad de asociaciones podría ser la explicación a los resultados aparentemente conflictivos sobre la activación de TRPC1: de acuerdo a su nivel de expresión relativo a otras proteínas capaces de modularlo, adquiriría el fenotipo de canal residente en RE, o en membrana plasmática.

En el presente trabajo encontramos que los homómeros de TRPC1, expresado de manera exógena, se retienen en el RE en al menos dos líneas celulares, donde funcionan como canal de liberación de Ca<sup>2+</sup> activado por agonistas, según resultados obtenidos con una técnica desarrollada en el laboratorio que nos permite medir la activación en tiempo real de TRPC1. Esta novedosa técnica consiste en fusionar un sensor de Ca<sup>2+</sup> basado en FRET al canal, y en teoría podría permitir la investigación en tiempo real de la actividad de cualquier canal permeable a Ca<sup>2+</sup>. La mutante de poro de TRPC1 apoya fuertemente la hipótesis de que el FRET observado se debe al Ca<sup>2+</sup> que fluye a través del poro del canal, y el hecho de que la construcción con TRPC5 resultara funcional, pero con características diferentes a la construcción con TRPC1, también apoya el empleo de estos sensores para evaluar la función de cualquier canal permeable a Ca<sup>2+</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la hipótesis de que los homómeros formados con TRPC1 son canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, lo cual explicaría las observaciones que indican que TRPC1 modula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo <sup>42</sup>. En dicho artículo, además, se reporta que la inhibición de la expresión de TRPC1 abate las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por  $\text{IP}_3$ ; dato que encuentra explicación en las oscilaciones en la actividad de TRPC1 en el RE detectadas con nuestro sistema.

También se mostró, de manera similar a lo que se había observado con anterioridad <sup>34</sup>, que los heterómeros de TRPC1 con TRPC4 o TRPC5 son capaces de alcanzar la membrana plasmática, donde funcionan como canales activados por receptor. Cabe resaltar que las proteínas TRPC3, TRPC6, TRPM8 y TRPV1 fueron incapaces de translocar a TRPC1 a la membrana plasmática, lo cual sugiere una interacción específica entre TRPC1 y TRPC4/5. Tanto TRPC4 como TRPC5 se distinguen de los demás miembros de la familia TRPC porque en su extremo carboxilo terminal poseen el motivo TTRL de interacción con dominios PDZ <sup>86</sup>. En el caso de TRPC4, este motivo es necesario para su localización en la membrana celular, y mediante este motivo interactúa con la proteína de andamiaje EBP50, que a su vez interactúa con proteínas de la familia ERM, adaptadores entre el citoesqueleto y la membrana celular <sup>88</sup>. En el caso de TRPC5, el motivo TTRL no es necesario para su localización en la membrana plasmática, aunque resulta imprescindible para la modulación de su actividad por parte de EBP50 <sup>104</sup>. Los estudios realizados a la fecha sobre el papel del motivo TTRL de TRPC4/5 siempre han sido sobre los canales homotetraméricos, en los que hay cuatro motivos de interacción con dominios PDZ; sería interesante investigar si el cambio en la estequiometría de la interacción entre EBP50 y los canales formados por TRPC1 (que no tiene el motivo TTRL) con TRPC4/5

es responsable, al menos en parte, de las diferencias de activación observadas al comparar los canales heterotetraméricos con los homotetraméricos.

Futuros estudios ayudarán a entender las funciones de TRPC1 cuando es retenido en el retículo endoplásmico: cómo altera las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por IP3 y qué papel juega como canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por agonistas.



# Calmodulin and Calcium Interplay in the Modulation of TRPC5 Channel Activity

IDENTIFICATION OF A NOVEL C-TERMINAL DOMAIN FOR CALCIUM/CALMODULIN-MEDIATED FACILITATION\*

Received for publication, April 29, 2005, and in revised form, June 14, 2005  
Published, JBC Papers in Press, June 29, 2005, DOI 10.1074/jbc.M504745200

Benito Ordaz‡, Jisen Tang§, Rui Xiao§, Alfonso Salgado‡, Alicia Sampieri‡, Michael X. Zhu§¶, and Luis Vaca‡||

From the ‡Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México City, D.F. 04510, México and the §Department of Neuroscience and Center for Molecular Neurobiology, the Ohio State University, Columbus, Ohio 43210

TRPC5 forms Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels important for neurite outgrowth and growth cone morphology of hippocampal neurons. Here we studied the activation of mouse TRPC5 expressed in Chinese hamster ovary and human embryonic kidney 293 cells by agonist stimulation of several receptors that couple to the phosphoinositide signaling cascade and the role of calmodulin (CaM) on the activation. We showed that exogenous application of 10 μM CaM through patch pipette accelerated the agonist-induced channel activation by 2.8-fold, with the time constant for half-activation reduced from 4.25 ± 0.4 to 1.56 ± 0.85 min. We identified a novel CaM-binding site located at the C terminus of TRPC5, 95 amino acids downstream from the previously determined common CaM/IP<sub>3</sub>R-binding (CIRB) domain for all TRPC proteins. Deletion of the novel CaM-binding site attenuated the acceleration in channel activation induced by CaM. However, disruption of the CIRB domain from TRPC5 rendered the channel irresponsive to agonist stimulation without affecting the cell surface expression of the channel protein. Furthermore, we showed that high (>5 μM) intracellular free Ca<sup>2+</sup> inhibited the current density without affecting the time course of TRPC5 activation by receptor agonists. These results demonstrated that intracellular Ca<sup>2+</sup> has dual and opposite effects on the activation of TRPC5. The novel CaM-binding site is important for the Ca<sup>2+</sup>/CaM-mediated facilitation, whereas the CIRB domain is critical for the overall response of receptor-induced TRPC5 channel activation.

*Drosophila melanogaster* encoded calcium-permeable cationic channels activated either by store depletion or by stimulation of G<sub>q/11</sub>-coupled receptors. These initial findings prompted the search for mammalian homologues, leading to the identification of seven TRP genes with different degrees of sequence similarity to the original insect *Trp* gene (3). These genes are now designated TRP-Canonical or TRPC, symbolizing their close similarity to the original *Drosophila Trp*. Many recently discovered cation channels are found to share some limited homology with the TRPCs. These include TRPVs (similar to the vanilloid receptor), TRPMs (named after the first identified member, melastatin), and TRPPs (named after PKD2 for polycystic kidney disease), etc. Together, there are at least 28 non-allelic TRP genes in the mammalian genome. The TRP channels serve diverse functions in many tissues from somatosensory to cardiovascular systems (4).

TRPC5 is a member of the TRPC family of Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cationic channels. It has drawn attention recently because of its role in modulating hippocampal growth cone motility and neurite elongation in the mammalian brain (5). The TRPC5 channel activity is induced upon stimulation of the phosphoinositide signaling cascade by receptors that stimulate phospholipase C; however, the exact mechanism of channel activation remains controversial (6). The activation of TRPC5 is dependent on the presence of Ca<sup>2+</sup> at both the extracellular and the intracellular sides of the plasma membrane (7–10). Although the extracellular effect of Ca<sup>2+</sup> has been shown to be mediated by the acidic residues, Glu<sup>543</sup>, Glu<sup>595</sup>, and Glu<sup>598</sup>, located at the putative pore loop of the TRPC5 protein (7), the mechanism for the intracellular Ca<sup>2+</sup> dependence of TRPC5 remains to be elucidated.

Calmodulin (CaM) is a common intracellular mediator of many Ca<sup>2+</sup>-dependent regulations. All TRPC proteins possess a C-terminal CaM-binding domain that also interacts with an N-terminal sequence of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) (6). We have demonstrated that IP<sub>3</sub>R and CaM compete with each other for binding to the common CaM/IP<sub>3</sub>R-binding (CIRB) site of the TRPC. In functional studies, the TRPC-binding region of the IP<sub>3</sub>R activated and Ca<sup>2+</sup>/CaM inhibited the activation of TRPC3 and TRPC4. Moreover, TRPC channels were activated by removing or inactivating CaM from

In 1994, we demonstrated (1, 2) that the transient receptor potential (*Trp*)<sup>1</sup> gene and its homologue, *Trp*-like (*Trpl*), from

\* This work was supported by Grant D39822 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, by Grant 201802/14 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (to L. V.), and by Grant NS42183 from the National Institutes of Health (to M. X. Z.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence may be addressed: Dept. of Neuroscience and Center for Molecular Neurobiology, the Ohio State University, Columbus, OH 43210. E-mail: zhu.55@osu.edu.

|| To whom correspondence may be addressed: Dept. de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, México City, D.F. 04510, México. E-mail: lvaca@ifc.unam.mx.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: trp, transient receptor potential; CaM, calmodulin; Bk, bradykinin; Bk2R, bradykinin receptor type 2; CBII, second CaM binding; CHO, Chinese hamster ovary; CIRB, CaM/IP<sub>3</sub>R

binding; H1R, histamine receptor type 1; HEK, human embryonic kidney; IP<sub>3</sub>R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; MBP, maltose-binding protein; mTRPC5, mouse canonical transient receptor potential 5; TRPL, TRP-like; W7, *N*-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide; TFP, trifluoperazine dimaleate; RT, reverse transcription; HEDTA, *N*-(2-hydroxyethyl)ethylenediaminetriacetic acid.

excised inside-out membrane patches, indicating that displacement of the inhibitory CaM from the common CIRB site is sufficient for the activation of TRPC channels (11). Consistent with this, we have shown that CaM increased the delay between the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from internal storage compartments and the activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx via endogenous TRPC1 channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells, which were subjected to the regulation by  $\text{IP}_3\text{R}$  and CaM in a similar fashion as the exogenously expressed TRPC3 and TRPC4 in human embryonic kidney (HEK) 293 cells (12). Additional C-terminal CaM-binding domains outside of the CIRB sites have been found on TRPC proteins (6, 13). Unlike the CIRB sites, these sites are not conserved among all TRPC channels, and they do not bind to  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . The second CaM-binding (CBII) site of TRPC1 has been shown to be involved in the slow  $\text{Ca}^{2+}$ -induced channel inactivation (13).

In the present study we have identified the CBII site from mouse TRPC5 (mTRPC5). We have explored the specific roles of the CIRB and CBII sites in the modulation of channel activity after activation of receptors that stimulate the phosphoinositide signaling cascade by selectively disrupting each CaM-binding site from mTRPC5 and heterologous expression of the wild type and mutant channels in CHO and HEK293 cells. We show for the first time that intracellular application of CaM accelerated the activation of mTRPC5 by receptor agonists. Although mutations in the CIRB site rendered the channel inactive, deletion of the CBII site attenuated the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-induced acceleration of receptor-evoked mTRPC5 activation.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents and Solutions**—All salts were of analytical grade purchased from Sigma. GTP and ATP were also obtained from Sigma. Bovine brain calmodulin, bradykinin, human thrombin, the CaM inhibitors *N*-aminoheptyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) and trifluoperazine dimaleate (TFP), and histamine were purchased from Calbiochem. The pipette (intracellular) solution contained (mM) the following: 130 potassium aspartate, 5 KCl, 10 EGTA or HEDTA, 7.39 (0.4  $\mu\text{M}$  free, with EGTA), 5.07 (5  $\mu\text{M}$  free with HEDTA), or 6.73 (10  $\mu\text{M}$  free with HEDTA)  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 1 ATP, 2 GTP, 10 HEPES, pH 7.2. Free pipette  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were calculated using the MaxChelator program (see below). The extracellular (bath) solution contained (mM) the following: 130 NaCl, 5 KCl, 1  $\text{CaCl}_2$ , 1.7  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.2.

**DNA Constructs and Mutagenesis**—Complementary DNA for the open reading frame of mTRPC5 was subcloned in pIRESneo (Clontech, Mountain View, CA) vector. Mutageneses were performed using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Mutations were confirmed by DNA sequencing. Constructs for maltose-binding protein (MBP) fusion proteins that contained different fragments of mTRPC5 were made in the pAGA3 vector as described previously (14). cDNA for the guinea pig histamine type 1 receptor (HIR) in pcDNA3 was kindly provided by Dr. Michael Schaefer (Charité-Universitätmedizin Berlin) and that for the human type 2 bradykinin receptor (Bk2R) was a generous gift from Dr. William W. Schilling (Case Western Reserve University).

**Analysis of the Expression of mTRPC5 mRNA by RT-PCR**—Total RNA was extracted from wild type cells and cells transfected with mTRPC5 and the mTRPC5 mutants using the TRIzol reagent (Invitrogen). Approximately 500 ng of total RNA was used as the template for RT-PCR, which was carried out using the ONEStep system with Superscript II (Invitrogen) following the manufacturer's protocols. The reaction was performed on a TC-512 thermal cycler (TECHNE, Cambridge, UK) using 30 cycles of the following PCR protocol: 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. The primers used for mTRPC5 were 5'-CTATGAGACCAGAGCTATTGATG (forward) and 5'-CTACCAGGAGATGACGTTGTATG (reverse), which amplify a 220-bp-long product. For glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the primers used were 5'-GACATCAAGAAGCTGGTGAAGC (forward) and 5'-TACTCCTTGGAGCCATGTAG (reverse), which amplify a 236-bp-long product. The PCR products were sequenced to identify the products, run on a 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide. The gel was analyzed with a Typhoon 8600 Imager (Amersham Biosciences).

**CaM Binding Assay**—Fragments of mTRPC5 fused to the C terminus of MBP were prepared by *in vitro* synthesis using the transcription- and translation-coupled rabbit reticulocyte lysates in the presence of [ $^{35}\text{S}$ ]Met and [ $^{35}\text{S}$ ]Cys as described previously (11, 14). The  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins were incubated with CaM-Sepharose at room temperature for 30 min in a binding solution that contained 120 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5% Lubrol, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5. After several washes, bound proteins were separated by SDS-PAGE and then revealed by x-ray autoradiography as described (11). For studying  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of mTRPC5-CaM binding, 10 mM EGTA or HEDTA and the desired concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (calculated using the MaxChelator program ([www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html](http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html))) were included in the binding solution, and the apparent affinity ( $K_{1/2}$ ) for  $\text{Ca}^{2+}$  was determined as described (14).

**Cell Surface Biotinylation Assay**—Transfection, biotinylation, and streptavidin precipitation were performed as described previously (15). Immunoblotting was performed using anti-mTRPC5 antibodies (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Sample loading for the crude cell lysate and streptavidin precipitated portion represents 12 and 355  $\mu\text{g}$ , respectively, of total proteins in cell lysates. Identical exposure time was used to reveal the chemiluminescent signals for the mTRPC5 proteins in crude lysates and streptavidin-precipitated samples.

**Fluorescence-based Membrane Potential Measurements**—HEK293 cells were cotransfected with mTRPC5 and H1R in wells of a 96-well plate as described previously (16). One day after the transfection, cells were washed once with Hanks' balanced salt solution and then incubated for 30 min with 80  $\mu\text{l}$  of FLIPR membrane potential dye (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) diluted in the Hanks' solution. Changes in membrane potential were measured at 32 °C using a fluid handling integrated fluorescence plate reader, FlexStation (Molecular Devices). Histamine was diluted in Hanks' solution at 300  $\mu\text{M}$ , and 40  $\mu\text{l}$  were delivered to the sample plate by the integrated robotic 8-channel pipettor at 20 s after readings began. Samples were excited at 530 nm, and emission of 565 nm was collected from the bottom of the plate at 0.67 Hz.

**Stable Cell Lines**—HEK293 and CHO cells were transfected with bicistronic plasmids containing the wild type mTRPC5 or the mutants described in this study followed by an internal ribosome entry site and the gene conferring resistance to neomycin. Cells were maintained in 1 mg/ml G418 for 1 month and later assayed by RT-PCR to confirm the presence of the mRNA for mTRPC5 and aminoglycoside phosphotransferase. Stably transfected cell clones were isolated by progressive dilution and tested for mTRPC5 expression. Cells (both CHO and HEK293) were transfected also with a similar bicistronic plasmid containing the cDNA for Bk2R and the gene conferring resistance to puromycin. Clonal cell lines expressing both mTRPC5 and Bk2R were isolated using the two selection markers, neomycin and puromycin.

**Whole-cell Measurements of mTRPC5 Currents**—The whole-cell configuration of the patch clamp technique was utilized to study mTRPC5-mediated currents as described previously (12). Briefly, cells were plated on glass coverslips and mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Instruments, Japan). The amplifier used was the Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA). Pipette resistance was 10–12 megohms when tested with pipette and bath solutions. Whole-cell resistances were in the range of 1–2 gigohms, and cell capacitance ranged from 10 to 12 picofarads for CHO and 12 to 16 picofarads for HEK293 cells. Cells were held at the holding potential of  $-80$  mV and repetitively stepped to  $-120$  through  $+60$  mV for 500 ms each in a 20-mV increment once every second. Receptor agonists were applied through bath perfusion, and CaM was introduced intracellularly by dialysis through the patch pipette.

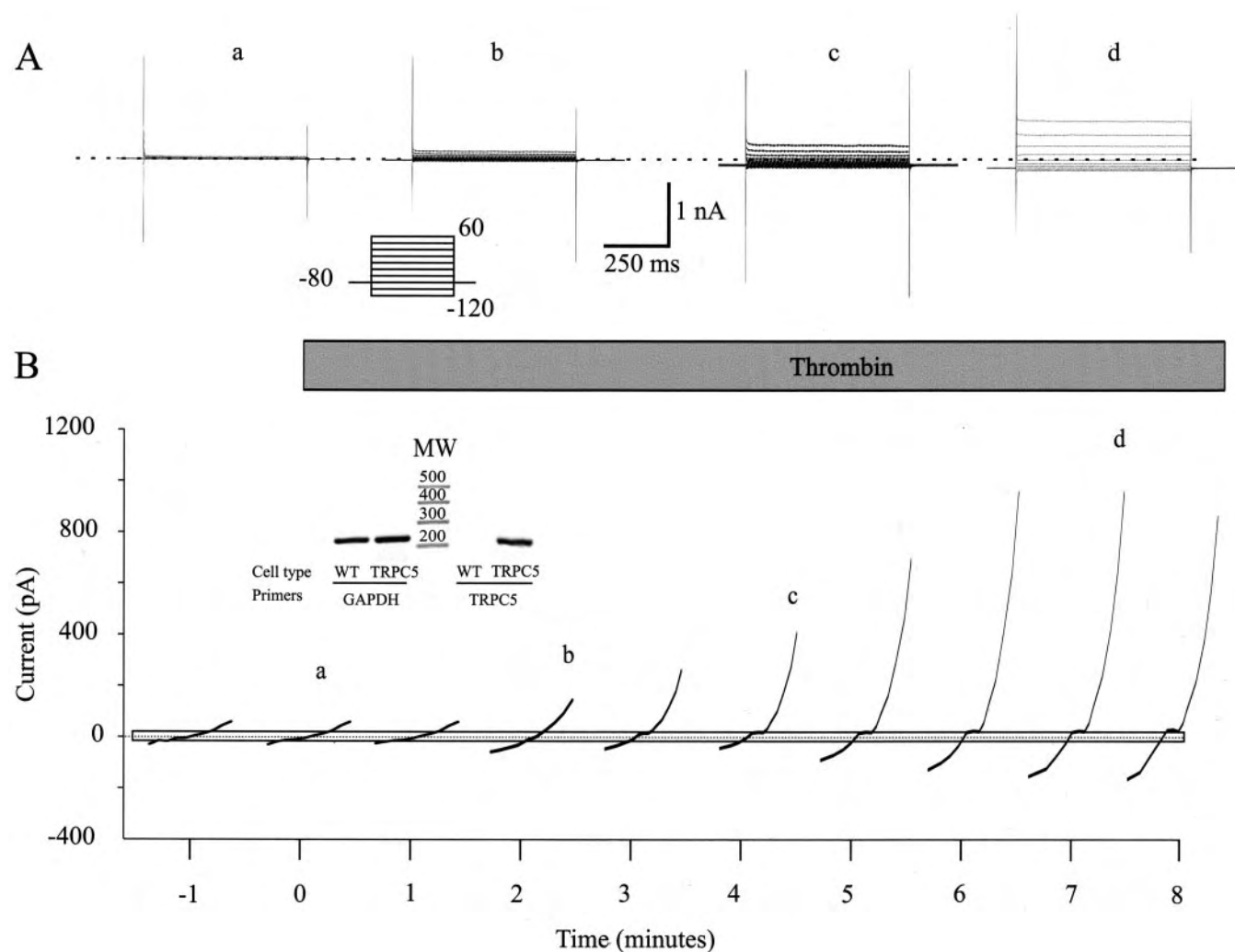
**Data Analysis and Curve Fitting**—All data were plotted and fitted using Sigmaplot 8 (SYSTAT, Point Richmond, CA). To obtain activation time constants, the mean outward current was plotted over time for the duration of the experiments under the different experimental conditions indicated in each figure legend. Data were fitted to sigmoidal Equation 1 as follows:

$$f = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b)) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $a$  indicates the maximum outward current value (top asymptote);  $b$  indicates the minimum outward current value (bottom asymptote);  $x_0$  indicates time constant for half-activation, and  $x$  indicates the time explored for each data point.

#### RESULTS

**Time Course of the Activation of mTRPC5 by Agonists**—Agonist stimulation of CHO cells stably expressing the wild



**FIG. 1. Activation time course of the wild type mTRPC5 channels in response to agonists.** *A*, family of currents evoked by the voltage protocol illustrated in the *inset* ("Experimental Procedures"). Each letter (*a-d*) corresponds to the time position shown in *B*. *B*, activation time course of mTRPC5 currents in response to 1 unit of thrombin. The panel shows the current-voltage relationships as *lines*. The *gray bar* shows the range of currents obtained from untransfected (control) CHO cells. Time 0 corresponds to the time of thrombin application. The *inset* shows results of RT-PCR experiments with CHO cells illustrating that only cells transfected with mTRPC5 show a PCR product of 220 bp. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as control of the RT-PCR conditions and was amplified in transfected and untransfected cells. Molecular weight markers are indicated as *MW*.

type mTRPC5 channel results in a time-dependent activation of outwardly rectifying currents (Fig. 1). We followed current activation in the presence of agonists for 15 min (only the first 8 min are shown). The current reached a steady-state level after  $\sim 7$  min in the continuous presence of the agonists. After this period of time, 30% of the cells showed a small (about 5%) reduction of current amplitude. This phenomenon was not further studied in the present work.

Fig. 1*A* shows a family of currents evoked by voltage pulses from a holding potential of  $-80$  to  $-120$  mV through  $+60$  mV in 20-mV steps. Thrombin (1 unit) induced activation of an outwardly rectifying current with the reversal potential near 0 mV ( $-6 \pm 4$  mV,  $n = 25$ ). The time course of the current-voltage (I-V) relationships is illustrated in Fig. 1*B*. The *gray rectangle* in Fig. 1*B* shows the limit of current induced by the agonist in cells not expressing mTRPC5. Notice that basal current level (before agonist stimulation) in mTRPC5-expressing cells was slightly higher when compared with wild type cells ( $\sim 10\%$  more current). Although this current may reflect mTRPC5 channel activity, this was not further explored in the present study.

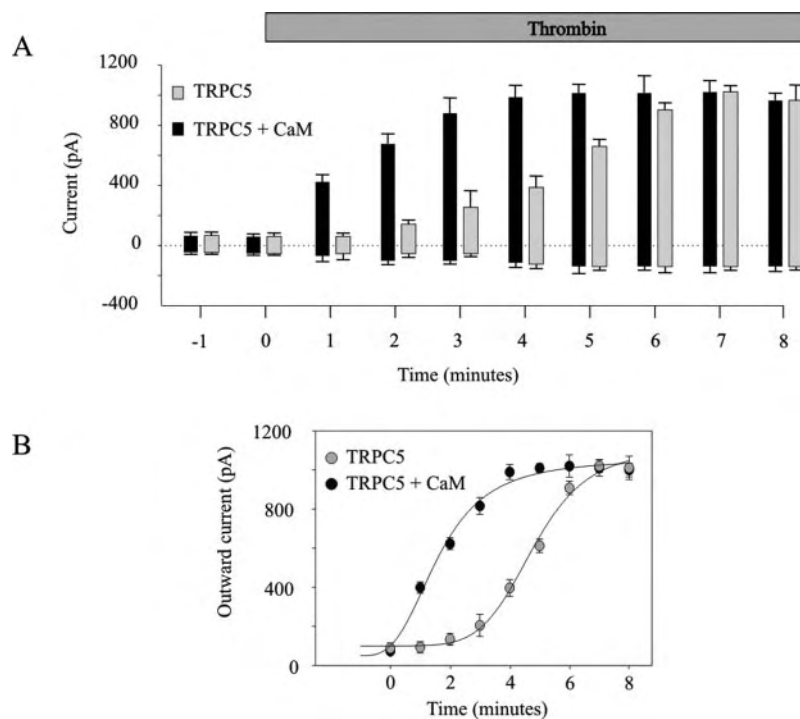
To confirm the expression of mTRPC5, we performed RT-PCR experiments with total RNA obtained from control cells

(wild type CHO cells) and cells expressing mTRPC5. The *inset* in Fig. 1*B* shows that that only mTRPC5-transfected cells contained the mTRPC5 transcript.

The time course of mTRPC5 current activation was independent of the agonist and receptor utilized. Fig. 1 only illustrates the response to thrombin. We have compared the responses to thrombin and bradykinin (Bk) at concentrations that gave the maximal response (1 unit and 100 nM, respectively) in CHO cells stably expressing mTRPC5, and we obtained similar time constant values for half-activation of the outward current of  $4.25 \pm 0.4$  and  $4.01 \pm 0.7$  min, respectively.

*Calmodulin Accelerates the Time Course of the Activation of mTRPC5*—In order to examine how CaM affects the activation of mTRPC5, we introduced CaM into mTRPC5-expressing cells by including the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein in the patch pipette. As illustrated in Fig. 2*A*, addition of CaM (10  $\mu\text{M}$ ) to the pipette resulted in a faster activation of mTRPC5 currents. Plotting the activation time courses for the outward currents in the absence (Fig. 2*B*, *gray circles*) and presence (*black circles*) of the exogenously applied CaM yielded activation curves that can be fitted with the sigmoidal equation as described under "Experimental Procedures." The time constant for half-activation was

**FIG. 2. CaM accelerates the agonist-stimulated activation of mTRPC5 currents.** *A*, comparison of the time course of current activation in the presence (black) and absence (gray) of 10  $\mu\text{M}$  CaM in the patch pipette. Current amplitudes at +60 (upward bars) and -120 mV (downward bars) are shown in averages  $\pm$  S.D. from 17 cells. *B*, time course of outward current at +60 mV in the presence and absence of CaM. The solid lines represent the fit to a sigmoidal equation ("Experimental Procedures") to obtain the half-activation time constants.



reduced from  $4.25 \pm 0.4$  min ( $n = 17$ ) in the absence of exogenous CaM to  $1.56 \pm 0.85$  min with 10  $\mu\text{M}$  CaM in the pipette. This effect was obtained with thrombin and Bk in CHO cells. Similar results were found in HEK293 cells stimulated with Bk (cells expressing mTRPC5 and Bk2R, see under "Experimental Procedures"). Time constants for outward currents in the absence and presence of CaM were comparable across cell lines and agonists tested (Table I). Because inward currents were relatively small compared with the amplitude of outward currents, and because they were difficult to separate from endogenous inward currents (this was especially difficult with HEK293 cells that showed larger inward currents than CHO cells), all the analyses in this study were conducted only on the outward currents.

**Identification of Two CaM-binding Sites at the C Terminus of mTRPC5**—The above results suggest that CaM plays an important role in facilitating the receptor-induced activation of mTRPC5 channels. We have reported previously (14) the presence of a conserved common CIRB site at the near C-terminal regions of all TRPC proteins. For mTRPC5, the CIRB site lies in between Glu<sup>701</sup> and Lys<sup>733</sup> and requires higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (apparent  $K_{1/2} = 44.2 \mu\text{M}$ ) for binding to CaM than the CIRB sites of other TRPC proteins. We also reported that the rest of the mTRPC5 C terminus downstream from the CIRB site (Gly<sup>762</sup>-Leu<sup>975</sup>, clone J1170 in Fig. 3A) bound to CaM as well. To narrow down the CBII site of mTRPC5, we have tested a large number of smaller fragments generated from J1170 by using an *in vitro* pull-down assay. As shown in Fig. 3, the minimal binding site for CaM is confined to a stretch of 27 residues, Pro<sup>828</sup>-Asn<sup>854</sup>, 95 amino acids downstream from the CIRB site. The isolated mTRPC5 CBII fragment bound to CaM in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner (Fig. 3D) with an apparent  $K_{1/2}$  for  $\text{Ca}^{2+}$  of  $3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ). This value is lower than the previously determined  $K_{1/2}$  value ( $44.2 \mu\text{M}$ ) of  $\text{Ca}^{2+}$  for CaM binding to the mTRPC5 CIRB site but within the range of those values ( $1.6$ – $12.9 \mu\text{M}$ ) for the CIRB sites of other TRPC isoforms (14).

**Mutations on CaM-binding Sites Alter mTRPC5 Channel Activation**—To investigate the function for each of the CaM-binding sites of mTRPC5, we destroyed the CIRB and CBII

**TABLE I**  
Effect of CaM on TRPC5 activation (rate constants in minutes) by two agonists in CHO and HEK293 cells

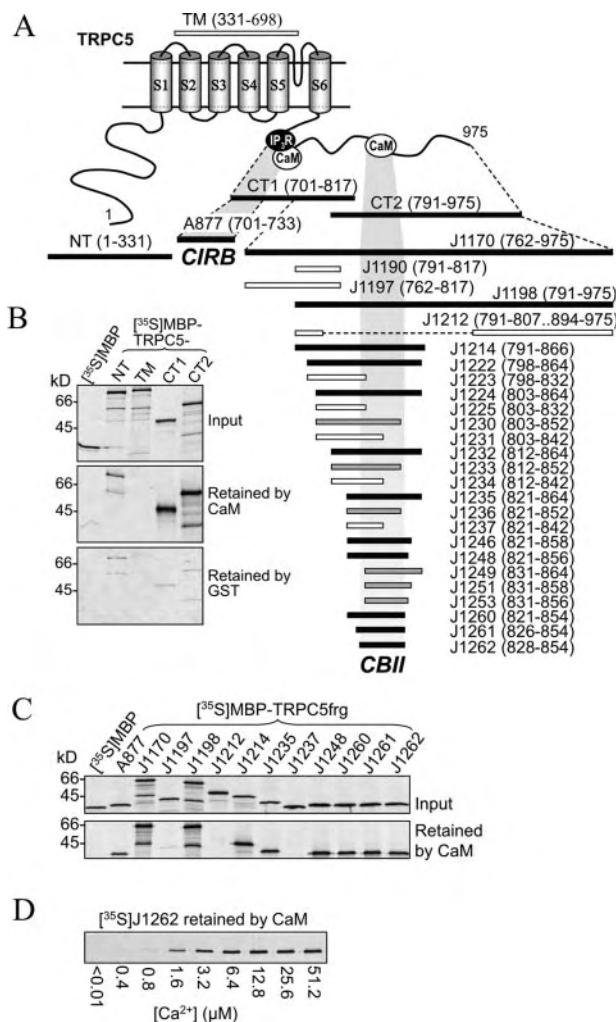
Condition	CHO	HEK293
Thrombin - CaM	4.25 $\pm$ 0.4	NT <sup>a</sup>
Bradykinin - CaM	4.01 $\pm$ 0.7	4.29 $\pm$ 0.81
Thrombin + CaM	1.56 $\pm$ 0.85	NT
Bradykinin + CaM	1.75 $\pm$ 0.62	1.47 $\pm$ 0.74

<sup>a</sup> NT indicates not tested.

sites by substituting Arg<sup>718</sup>, Lys<sup>722</sup>, and Arg<sup>723</sup> with alanines (CIRBm1) and deleting Pro<sup>828</sup>-Asn<sup>854</sup> ( $\Delta\text{CBII}$ ), respectively (Fig. 4A). The loss of CaM binding in these mutants was confirmed by *in vitro* binding studies (Fig. 4B). Receptor-mediated activation of mTRPC5 currents was studied after coexpression of the full-length clones of the mutated mTRPC5 with Bk2R or by stimulation of the endogenous thrombin receptor in CHO. As shown in Fig. 4C, without CaM in the pipette, the activation of mTRPC5 $\Delta\text{CBII}$  was slightly delayed as compared with the wild type mTRPC5. Inclusion of 10  $\mu\text{M}$  CaM in the pipette only weakly accelerated the activation of the mutant channel, indicating that CBII is important for the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated facilitation of mTRPC5 activation. After fitting the outward current, the time constants for mTRPC5 $\Delta\text{CBII}$  of  $6.04 \pm 0.5$  (control) and  $5.48 \pm 0.7$  min (with 10  $\mu\text{M}$  CaM) were obtained.

In contrast, the mTRPC5-CIRBm1 mutant failed to respond to the stimulation by thrombin and Bk in both CHO and HEK293 cells. In a fluorescence-based membrane potential assay using the FLIPR membrane potential dye, coexpression of mTRPC5 with H1R in HEK293 cells resulted in a histamine-evoked membrane depolarization (Fig. 4D). Although cells expressing mTRPC5 $\Delta\text{CBII}$  showed a slightly reduced depolarization as compared with those expressing the wild type mTRPC5, cells expressing mTRPC5-CIRBm1 failed to show any difference from those expressing H1R alone. This result confirms that mTRPC5-CIRBm1 is a loss-of-function mutant.

In order to determine whether mTRPC5-CIRBm1 is sufficiently expressed on the plasma membrane, we performed surface biotinylation assays for mTRPC5 and its mutants transiently transfected in the HEK293 cells. Two days after



**FIG. 3. Identification of a second CaM-binding site on the C terminus of mTRPC5.** *A*, diagram of mTRPC5 and its fragments included in the MBP fusion proteins for the *in vitro* binding experiments. S1–S6 indicates the six transmembrane segments. White, gray, and black bars denote no, weak, and strong binding, respectively, to CaM-Sepharose. The names and positions, indicated by the numbers in parentheses, of the fragments are labeled either above or at right. Shaded areas indicate the CIRB and CBII sites. *B* and *C*, representative binding results showing the autoradiograms of input <sup>35</sup>S-labeled MBP and MBP fusion proteins containing the mTRPC5 fragments and those retained by CaM-Sepharose and glutathione *S*-transferase bound to glutathione-Sepharose (negative controls). The binding buffer contained 1 mM Ca<sup>2+</sup>. *Input* represents 40% of <sup>35</sup>S-labeled protein added to the binding assay. *D*, Ca<sup>2+</sup> dependence of the interaction between mTRPC5 CBII and CaM. Ca<sup>2+</sup> was buffered by EGTA or HEDTA.

the transfection, although a lower amount was detected for mTRPC5ΔCBII than for the wild type, the expression of mTRPC5-CIRBm1 in the total cell lysate as well as in the biotinylated fraction was similar to that of wild type mTRPC5 (Fig. 4E). The fact that mTRPC5-CIRBm1 protein was labeled by biotin in the nonpermeabilized cells at cold temperature indicates that the mutant protein is efficiently delivered to the plasma membrane.

To confirm that the CIRB site is critical for the receptor-induced mTRPC5 activation, we made another mutant, I717D/L720E/V721A, at the CIRB site. Again the mutant was irresponsive to agonist stimulation but showed normal cell surface expression as the wild type channel (not shown). Thus, the lack of function for these CIRB mutants is most likely because of a defect in channel gating and/or channel activation by agonists, rather than a dysfunction in the trafficking and translocation of the channel protein.

**Inhibitory Effect of Constantly High Intracellular Ca<sup>2+</sup> on the Activation of mTRPC5**—To investigate further the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> and CaM on the activation rate and amplitude of mTRPC5 currents, studies were performed by utilizing two concentrations (0.4 and 5 μM) of intracellular Ca<sup>2+</sup> in the presence and absence of CaM in the patch pipette with cells expressing wild type mTRPC5 and mTRPC5ΔCBII mutant (Fig. 5). As compared with 0.4 μM, the high intracellular Ca<sup>2+</sup> (5 μM) produced a significant inhibition of the maximal currents activated by thrombin in CHO cells that expressed wild type mTRPC5 from 995 ± 110 (Fig. 5A, *n* = 22) to 302 ± 28 pA (Fig. 5B, *n* = 19), which accounts for 30.3% of the current obtained with 0.4 μM free Ca<sup>2+</sup> in the pipette. The maximum current inhibition obtained with 10 μM free Ca<sup>2+</sup> (75%) was not different from that obtained with 5 μM free Ca<sup>2+</sup>.

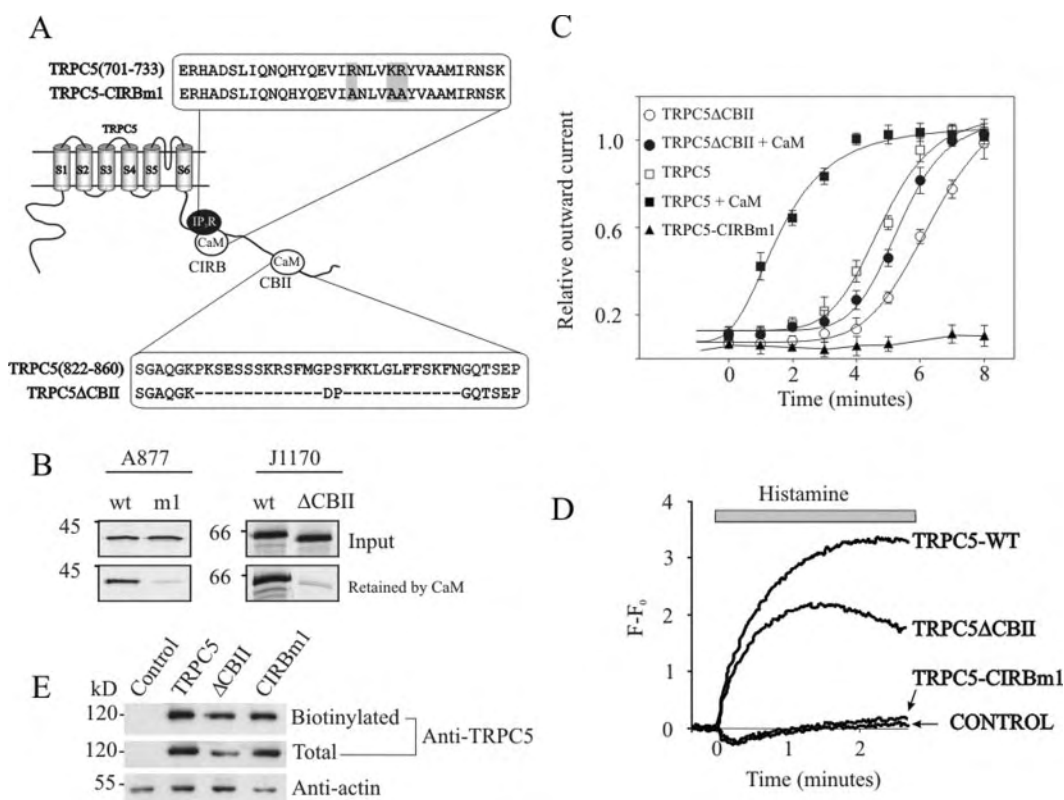
For mTRPC5ΔCBII, 5 μM free Ca<sup>2+</sup> also reduced the maximal amplitude of receptor-induced currents (at +60 mV) to 28.2% of that obtained with 0.4 μM free Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5C). This level of inhibition is similar to that of the wild type mTRPC5, suggesting that the CBII site is not involved in the inhibition of channel activation by high concentrations of intracellular Ca<sup>2+</sup>.

As illustrated in previous figures, introduction of CaM in the patch pipette in the presence of 0.4 μM free Ca<sup>2+</sup> did not alter the maximal current amplitude but accelerated the rate of current activation in response to agonist stimulation of the wild type mTRPC5. Similarly, introduction of 10 μM CaM in the pipette in the presence of 5 μM free Ca<sup>2+</sup> did not overcome the inhibitory effect of the high intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration on the maximal current amplitude (Fig. 5C) but reduced the time constant for half-activation of the outward current at +60 mV from 4.85 ± 0.8 (*n* = 12) to 2.13 ± 1.02 min (*n* = 16) (Fig. 5D). On the other hand, there is no significant difference in the time constants between 0.4 and 5 μM free Ca<sup>2+</sup> for mTRPC5 activation in the absence or presence of exogenously applied CaM, indicating that either the endogenous CaM is more than enough to mediate the inhibitory effect of high intracellular Ca<sup>2+</sup> or the inhibition is independent of CaM.

To explore further the possible role of CaM on the Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of mTRPC5 and mTRPC5ΔCBII, we used two potent CaM inhibitors in the patch pipette. As illustrated in Fig. 5C, neither 500 nM of W7 nor 5 μM of TFP showed any effect on the inhibition of current amplitude induced by 5 μM Ca<sup>2+</sup>. We had shown previously (12) that these concentrations of the inhibitors were sufficient to eliminate the participation of CaM in the modulation of store-operated calcium entry in CHO cells.

Similarly, addition of CaM to the pipette of mTRPC5ΔCBII-expressing cells did not alter the rate of channel activation in response to agonists, as indicated in Fig. 5D, even though the current amplitude was significantly reduced (Fig. 5C). Activation time constants obtained for mTRPC5ΔCBII with 5 μM Ca<sup>2+</sup> were 5.96 ± 0.7 in the absence of CaM and 5.21 ± 0.8 min with 10 μM CaM (*n* = 21).

**The Slow Activation of mTRPC5 in Response to Agonist Stimulation Does Not Involve Translocation to the Plasma Membrane**—It has been shown recently (17) that epidermal growth factor induced rapid vesicular translocation of mTRPC5 channels to the plasma membrane in HEK293 cells. To determine whether the effect of CBII domain on facilitation of channel activation in response to agonists may be the result of mTRPC5 translocation to the plasma membrane, we performed two types of experiments. In the first set of experiments we compared the time course of channel current activation in response to agonists at 4 and 27 °C. As illustrated in Fig. 6, *A* and *B*, no significant differences in the time courses of mTRPC5 and mTRPC5ΔCBII were observed between the two temperatures



**FIG. 4. Deletion of CBII site attenuated the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-induced facilitation of receptor-induced mTRPC5 channel activation.** *A*, diagram showing the amino acid substitutions in mTRPC5-CIRBm1 and the deletion in mTRPC5ΔCBII. *B*, *in vitro* binding results showing that the mutations abolished the binding to  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM of the mTRPC5 fragments. Clone names are shown in Fig. 3A. Equivalent regions from the mutants were tested under the same condition as described in Fig. 3. *wt*, wild type. *C*, time course of the current activation of wild type mTRPC5 (squares) and the mutants mTRPC5ΔCBII (circles) and mTRPC5-CIRBm1 (triangles) in the presence or absence of  $10 \mu\text{M}$  CaM. Currents were induced by the application of  $100 \text{ nM}$  Bk. The outward current was measured by a voltage pulse to  $+60 \text{ mV}$  as described under "Experimental Procedures." *D*, histamine-induced membrane depolarization in HEK293 cells that coexpressed H1R and mTRPC5 or its mutant.  $100 \mu\text{M}$  histamine was added as indicated. Fluorescence values shown are  $1/100,000$  of those displayed by the instrument. *E*, biotinylation experiments illustrating that all mutants reached the plasma membrane similarly to wild type mTRPC5. Actin was used as loading control on each lane. *kD* illustrates the molecular mass markers (in kilodaltons).

tested. Wild type mTRPC5 showed half-activation constants of  $4.12 \pm 0.35$  and  $4.37 \pm 0.45$  min at 4 and  $27^\circ\text{C}$ , respectively. Time constants were reduced in the presence of  $10 \mu\text{M}$  CaM to  $1.58 \pm 0.9$  and  $2.01 \pm 0.79$  min at 4 and  $27^\circ\text{C}$ , respectively. These time constants were not statistically different.

At  $4^\circ\text{C}$  all vesicle transport and plasma membrane translocation of vesicles were inhibited, and therefore if the slow activation induced by agonists was the result of more mTRPC5 reaching the plasma membrane, it was expected to observe differences in the time courses of current activation between 4 and  $27^\circ\text{C}$ . Furthermore, if CaM via the CBII domain was affecting the translocation of mTRPC5 to the plasma membrane, it would be expected to observe differences in time constants between 4 and  $27^\circ\text{C}$ . As illustrated in Fig. 6B, this was not the case.

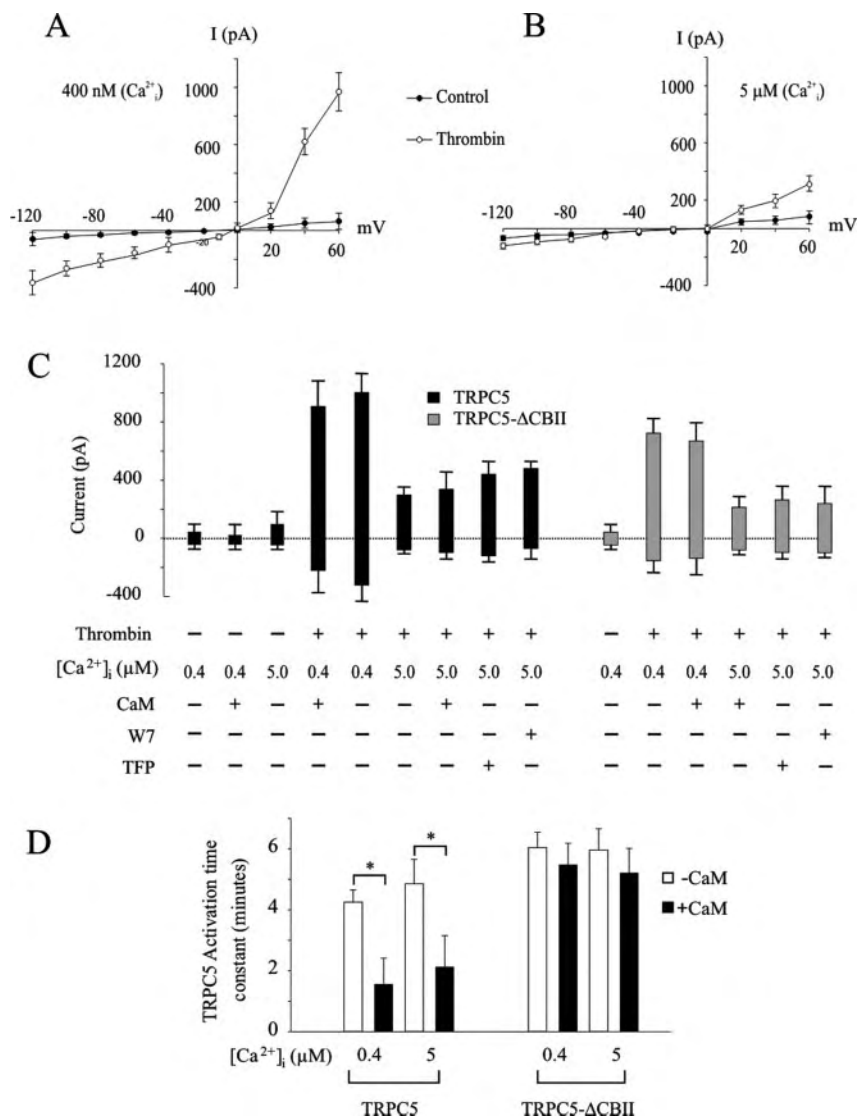
To explore further any possible role of channel translocation to the plasma membrane induced by agonist stimulation, we performed biotinylation assays with mTRPC5-expressing cells under resting conditions and after  $1 \mu\text{M}$  Bk was applied to the cells for 1 or 10 min. As illustrated in Fig. 6C, Bk induced a significant increment in biotinylated mTRPC5 after only 1 min of Bk stimulation. No significant differences were detected between 1 and 10 min of Bk exposure (Fig. 6C). These results demonstrate that Bk induced a rapid (less than 1 min) translocation of mTRPC5 to the plasma membrane. However, the rapid translocation cannot explain the slow activation of mTRPC5 currents induced by agonists. Therefore, it appears that the CaM modulation of mTRPC5 facilitation via the CBII domain does not involve channel translocation to the plasma membrane.

## DISCUSSION

**$\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated Facilitation of mTRPC5 Activation by Receptor Agonists**—Stimulation of many cell surface receptors triggers intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling through activation of phospholipase C and breakdown of phosphoinositides. Members of the TRPC family of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable nonselective cation channels have emerged as important players for the receptor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling because they are activated downstream from phospholipase C activation and mediate  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the cells. Exactly which step(s) or component(s) of the phosphoinositide signaling cascade is involved in gating the TRPC channels remains to be elucidated. In the present study, we have expressed mTRPC5 in two cell lines (CHO and HEK293), and we studied kinetics and the magnitudes of its activation after agonist stimulation of two different receptors (thrombin receptor and Bk2R). For both receptors, the activation of the mTRPC5 channel was slow, requiring  $\sim 7$  min to reach steady-state values in the continuous presence of the agonists. The two different receptor agonists induced channel activity with similar time constants (Table I), indicating that the slow activation kinetics is a property of the mTRPC5 channels independent of receptor and cell types.

Most interestingly, rat TRPC5 expressed in HEK293 cells showed a slow initial activation phase that was clearly distinguishable from the later fast activation in response to the stimulation of coexpressed H1R (18). In our study, there was no clear transition from the slow to fast activation, and the rate of activation for mTRPC5 was much slower than that for the rat

**FIG. 5. Dual regulation of mTRPC5 by  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM.** *A*, mean  $\pm$  S.D. of current-voltage relationships obtained from CHO cells expressing mTRPC5. Closed circles represent currents before the addition of thrombin, and open circles indicate those 10 min after addition of 1 unit of thrombin for the same cells with  $0.4 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the pipette. *B*, mean  $\pm$  S.D. of current-voltage relationships obtained from CHO cells expressing mTRPC5 with  $5 \mu\text{M}$  in the patch pipette ( $n = 20$ ). *C*, mean  $\pm$  S.D. of maximal current amplitudes at  $+60$  mV (positive bars) and  $-120$  mV (negative bars) from wild type mTRPC5 (black) and mTRPC5 $\Delta$ CBII (gray) with different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the presence (+) or absence (-) of 1 unit of thrombin and CaM. The CaM inhibitors W7 and TFP were tested at  $500$  nM and  $5 \mu\text{M}$ , respectively. Statistics obtained from at least 20 independent cell measurements. Dotted line shows the zero current level. Positive current represents outward current and negative inward current. *D*, time constants of half-activation induced by 1 unit of thrombin for the wild type and TRPC5 $\Delta$ CBII with pipettes containing  $0.4$  or  $5 \mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$  with (black) or without (white)  $10 \mu\text{M}$  CaM. \*,  $p < 0.05$  by Student's  $t$  test.



clone. These differences may be due to the different concentrations of EGTA ( $0.5$  versus  $10$  mM) used between the two studies.

We show that introduction of CaM in the patch pipette significantly accelerated mTRPC5 channel activation after agonist stimulation. Half-time constants were reduced almost 3-fold with thrombin and Bk in CHO cells and Bk in HEK293 cells (Table I). These results indicate that the effects of CaM on mTRPC5 activation are also independent of the receptor stimulated and the cell line used.

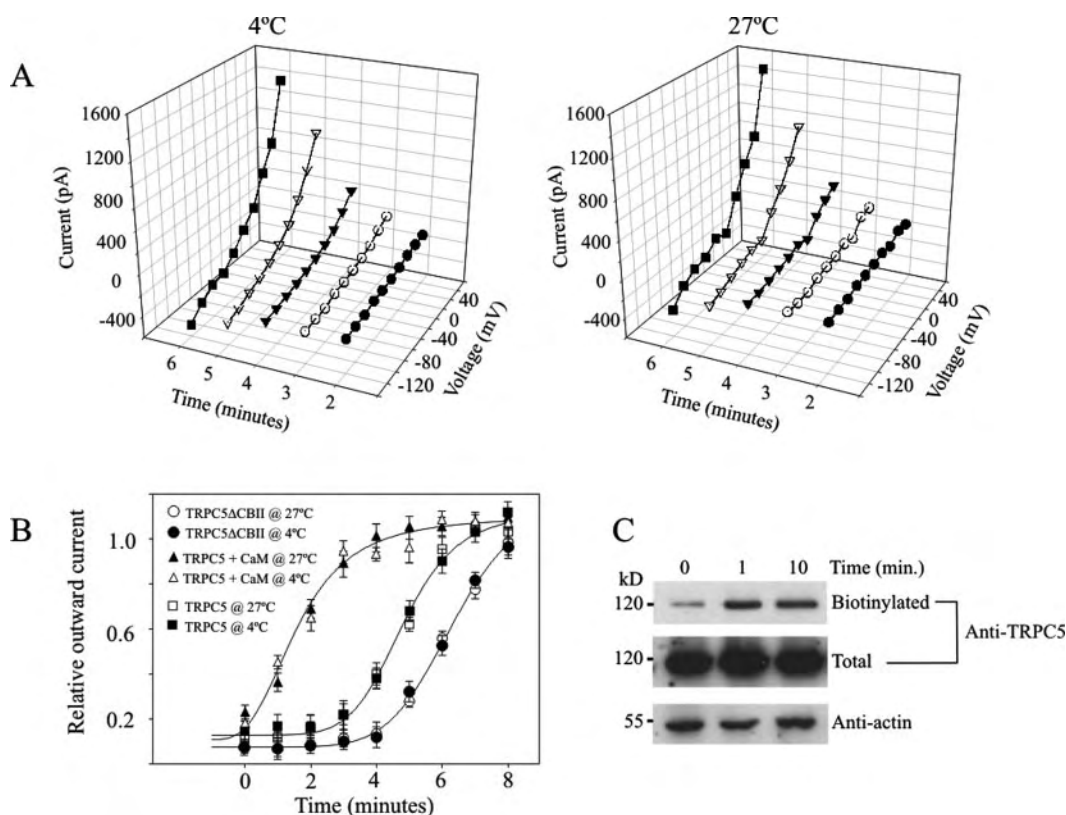
*The Second C-terminal CaM-binding Site Is Critical for the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated Facilitation of mTRPC5 Activation*—We have now identified a novel CaM-binding domain (CBII) on the mTRPC5 C terminus, and we show that it is critical for the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated facilitation of receptor-induced activation of mTRPC5. Disruption of the CBII site prevented the acceleration of channel activation in response to agonist stimulation mediated by the exogenously applied CaM. More interestingly, even though it is important for the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated facilitation, this CaM-binding site is not absolutely required for the channel activity. The mTRPC5 $\Delta$ CBII mutant showed about two-thirds of the maximal currents and membrane depolarization as compared with the wild type mTRPC5 but maintained other properties of the mTRPC5 channel, including the shape of the I/V curve, reversal potential, and inhibition by high concentrations of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Differences in the amount of current

may be related to the amount of protein expressed/transported to the membrane, due to clonal differences.

These data suggest that the CBII site has a modulatory role in controlling the rate of channel recruitment following the activation of G-protein-coupled receptors. This positive feedback modulation by  $\text{Ca}^{2+}$  through CaM is a novel mechanism for TRPC channels and may have important physiological implications. The rate of mTRPC5 activation is thus controlled by how fast and how high the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration near the cytoplasmic side of the channel can increase. This explains why the activation of TRPC5 is heavily influenced by the  $\text{Ca}^{2+}$ -buffering capacity of intracellular solutions (7, 9).

Biotinylation and electrophysiological experiments carried out at  $4^\circ\text{C}$  strongly suggest that the effects of CaM via CBII do not involve significant changes in mTRPC5 channel translocation to the plasma membrane. Although we observed a rapid increment in biotinylated mTRPC5 in response to Bk, no significant differences were observed at the time periods when we observed the acceleration of mTRPC5 current activation in response to agonists.

The activation of TRPC5 causes  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  influxes, which in turn lead to membrane depolarization and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase, respectively. In unclamped cells, the positive feedback mechanism should be more important in the initial phase of channel activation before membrane depolarization



**FIG. 6. The  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-induced facilitation of mTRPC5 does not involve changes in channel translocation to the plasma membrane.** A, tri-dimensional plots illustrating the time courses of mTRPC5 current activation in response to 100 nM Bk in HEK293 cells expressing the human Bk2R. Plots show the current-voltage relationships obtained at 2–6 min after agonist stimulation. The plot to the left is a representative experiment conducted at 4 °C and the right plot at 27 °C. B, time course of outward current at +60 mV obtained at 4 and 27 °C with TRPC5 (in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  CaM in the patch pipette) and TRPC5 $\Delta$ CBII. The solid lines represent the fit to the sigmoidal Equation 1 (see under “Experimental Procedures”) to obtain the half-activation time constants. C, HEK293 cells were cotransfected with Bk2R and wild type TRPC5. One day after transfection, 1  $\mu\text{M}$  Bk was applied to the cells. 1 or 10 min later, the stimulation was terminated by washing cells with cold phosphate-buffered saline three times. Endocytosis was avoided by placing the culture dishes on ice. Total proteins were evaluated by the total lysate, and the surface parts were evaluated by biotinylated proteins. Actin (anti-actin) was probed as the control for loading.

becomes predominant, in which case the reduced driving force for  $\text{Ca}^{2+}$  influx would prevent further intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevation through TRPC5. However, membrane depolarization in excitable cells would lead to the activation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, causing further increases in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Because TRPC5 activation is also inhibited by high concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the  $\text{Ca}^{2+}$  increases mediated by the voltage-gated channels could cause either further potentiation or inhibition of the TRPC5 channel depending on the relative density of each channel type and the level of receptor activation and CaM present. The relative activity of TRPC5 would again affect the voltage-gated channels through membrane potential regulation. Such an intricate interplay among receptors, TRPC5, and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels provides a mechanism to fine tune  $\text{Ca}^{2+}$  signal in the growth cones of hippocampal neurons, in which both TRPC5 and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels are abundantly expressed (5).

**$\text{Ca}^{2+}$ -mediated Inhibition of TRPC5 Activation**—The regulation of TRPC5 by  $\text{Ca}^{2+}$  is further complicated by the finding that at constantly high intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, the receptor-induced activation of TRPC5 is inhibited. Different from the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated facilitation discussed above, the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated inhibition did not affect the rate of channel activation but rather the maximal current amplitudes. Introduction of exogenous CaM did not overcome the inhibitory effect of high  $\text{Ca}^{2+}$  on the current amplitudes but still facilitated the rate of channel activation by receptor agonist. Furthermore, the mTRPC5 $\Delta$ CBII mutant was inhibited to a similar degree by high  $\text{Ca}^{2+}$  as the wild type channel, indi-

cating that the CBII site is not involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated inhibition. Therefore, different sites are involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-mediated facilitation and  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated inhibition of the receptor-induced activation of TRPC5 channels. Given that the CIRB site is important for the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inhibition of TRPC3 activation by  $\text{IP}_3$ Rs (11), it is possible that the TRPC5 CIRB site is responsible for channel inhibition by high concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . This is supported by the finding that the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity for CaM binding to the CIRB site is more than 10 times lower than to the CBII site of mTRPC5. Thus, much higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations are needed for CaM to affect the CIRB than the CBII site. Unfortunately, the role of the CIRB site on this effect could not be determined because mutations introduced at this domain rendered the channel inactive.

Dual regulations by  $\text{Ca}^{2+}$  have been shown for the *Drosophila* TRPL channel (19, 20), which was originally identified in a CaM binding assay (21). Low intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  enhanced the activation of the TRPL channel with an  $\text{EC}_{50}$  value of 0.45  $\mu\text{M}$  (20), whereas higher (micromolar) intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  inhibited the channel activity (20, 22). Whether or not CaM is involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated regulation of TRPL has not been completely resolved, although at least two CaM-binding sites (23), in addition to the CIRB domain (14), are present at its C terminus. Thus, for TRPC5 whether or not the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated inhibition on current density is mediated by CaM and the critical site(s) involved in this regulation warrant further investigation.

**The Critical Role of the CIRB Site in the Receptor-induced Activation of TRPC5**—We have also found that the common



CIRB site is essential for the function of TRPC5 channels. Mutations at the CIRB site rendered the mTRPC5 channel inactive. However, the biotinylation experiments showed that a similar amount of the mTRPC5-CIRB mutants reached the plasma membrane as the wild type mTRPC5, ruling out the possibility that the lack of function was because of a defect in channel protein synthesis, stability, or trafficking and translocation. Thus it appears that an intact CIRB site is required for the activation of mTRPC5 channels via receptor agonists. This is in contrast to the finding that deletion of the CIRB site impaired the plasma membrane translocation of TRPC3 (24), arguing against the claim that trafficking-related defect is the cause for the lack of TRPC5 channel activity resulting from the disruption of CaM and/or IP<sub>3</sub>R binding at the CIRB domain.

It has been shown previously (25) that activation of IP<sub>3</sub>R is required for the opening of the mTRPC5 channels. The results presented here are in agreement with this early finding, while highlighting the key role of the CIRB domain during agonist-induced channel activation. Because this domain is conserved in all TRPC members, it is important to determine to what extent a functional CIRB domain, with perhaps a separable binding capability to IP<sub>3</sub>R and CaM, is required for channel activation in the TRPC family.

In summary, the current study demonstrates that CaM binding to a C-terminal site 95 residues downstream from the previously identified CIRB domain is critical for the Ca<sup>2+</sup>/CaM-mediated facilitation of receptor-induced activation of TRPC5 channels. It shows that in addition to facilitating the rate of channel opening, intracellular Ca<sup>2+</sup> also blocks the receptor-induced channel activation at high concentrations. This effect appears to be independent of CaM, as indicated by the use of two potent CaM antagonists. Moreover, it provides a further support for a critical role of the CIRB site on the activation of TRPC5 channels by receptor agonists. Together, these results reveal a complex modulation of TRPC5 channel function, which provides cells with sophisticated means to exquisitely control the rate of cell membrane depolarization and Ca<sup>2+</sup> influx in response to agonist stimulation of cell surface receptors. The role of TRPC5 in modulating hippocampal growth cone motility and neurite elongation has been established recently (5). Most interestingly, it is well known that CaM is also important during neuron growth and regeneration (26). Future experiments using mTRPC5ΔCBII or similar mutant channels could

provide insightful information about the role of CaM and TRPC5 in controlling neurite elongation in the mammalian brain.

**Acknowledgments**—We thank Drs. M. Schaefer and W. Schilling for receptor cDNA constructs. The technical assistance from the Molecular Biology Unit at the Institute of Cellular Physiology and D. Chuang-Zhu is greatly appreciated.

#### REFERENCES

- Vaca, L., Sinkins, W. G., Hu, Y., Kunze, D. L., and Schilling, W. P. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, 1501–1505
- Hu, Y., Vaca, L., Zhu, X., Birnbaumer, L., Kunze, D. L., and Schilling, W. P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1050–1056
- Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996) *Cell* **85**, 661–671
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strubing, C. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 387–396
- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D. E. (2003) *Nat. Neurosci.* **6**, 837–845
- Plant, T. D., and Schaefer, M. (2003) *Cell Calcium* **33**, 441–450
- Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T. D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3562–3571
- Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., and Mori, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 27359–27370
- Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., and Schultz, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17517–17526
- Zeng, F., Xu, S. Z., Jackson, P. K., McHugh, D., Kumar, B., Fountain, S. J., and Beech, D. J. (2004) *J. Physiol. (Lond.)* **559**, 739–750
- Zhang, Z., Tang, J., Tikunova, S., Johnson, J. D., Chen, Z., Qin, N., Dietrich, A., Stefani, E., Birnbaumer, L., and Zhu, M. X. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3168–3173
- Vaca, L., and Sampieri, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42178–42187
- Singh, B. B., Liu, X., Tang, J., Zhu, M. X., and Ambudkar, I. S. (2002) *Mol. Cell* **9**, 739–750
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., and Zhu, M. X. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21303–21310
- Wang, C., Hu, H. Z., Colton, C. K., Wood, J. D., and Zhu, M. X. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 37423–37430
- Hu, H. Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C. K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L. Y., Wood, J. D., and Zhu, M. X. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 35741–35748
- Bezzlerides, V. J., Ramsey, I. S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D. E. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 709–720
- Obukhov, A. G., and Nowycky, M. C. (2004) *J. Cell. Physiol.* **201**, 227–235
- Obukhov, A. G., Schultz, G., and Luckhoff, A. (1998) *Neuroscience* **85**, 487–495
- Zimmer, S., Trost, C., Wissenbach, U., Philipp, S., Freichel, M., Flockerzi, V., and Cavalie, A. (2000) *Pfluegers Arch.* **440**, 409–417
- Phillips, A. M., Bull, A., and Kelly, L. E. (1992) *Neuron* **8**, 631–642
- Kunze, D. L., Sinkins, W. G., Vaca, L., and Schilling, W. P. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, C27–C34
- Warr, C. G., and Kelly, L. E. (1996) *Biochem. J.* **314**, 497–503
- Wedel, B. J., Vazquez, G., McKay, R. R., Bird, G. St. J., and Putney, J. W., Jr. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25758–25765
- Kanki, H., Kinoshita, M., Akaike, A., Satoh, M., Mori, Y., and Kaneko, S. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 989–998
- Liu, Y. C., and Storm, D. R. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 107–111

# Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family

Salgado Alfonso<sup>a</sup>, Ordaz Benito<sup>a</sup>, Sampieri Alicia<sup>a</sup>, Zepeda Angélica<sup>a</sup>,  
Glazebrook Patricia<sup>b</sup>, Kunze Diana<sup>b</sup>, Vaca Luis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México CP 04510, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Rammelkamp Center for Education and Research, MetroHealth Campus and Department of Neurosciences, Case Western Reserve University, 2500 MetroHealth Drive, Cleveland, OH 44109, USA

Received 3 May 2007; received in revised form 6 July 2007; accepted 9 July 2007  
Available online 11 September 2007

## Abstract

Members of the Canonical Transient Receptor Potential (TRPC) family of ionic channels are able to form homo- and heterotetrameric channels. Depending on the study, TRPC1 has been detected on both the surface and inside the cell, probably in the endoplasmic reticulum (ER). Likewise, TRPC1 has been described both as a store-operated channel and as one unable to function when forming a homotetramer. It is possible that the apparent differences in the expression and function of TRPC1 are due to its association with other proteins, possibly from the same TRPC family. In the present study we used confocal microscopy and a fluorescently tagged TRPC1 to examine the localization of this protein when co-expressed with other members of the TRPC family. Whole-cell and single channel electrophysiological recordings were conducted to study the function of TRPC1 expressed alone or co-expressed with other members of the TRPC family. A FRET-based calcium sensor fused to TRPC1 was used to assess the functionality of the intracellular TRPC1. Our results showed that TRPC4 and TRPC5 were able to increase the amount of membrane-expressed TRPC1 as evaluated by confocal microscopy and patch clamp recordings. The FRET-based calcium sensor fused to TRPC1 strongly suggests that this protein forms ER-expressed functional homotetrameric channels activated by agonists coupled to the IP<sub>3</sub> cascade. These results indicate that TRPC1 is a multifunctional protein able to form intracellular calcium release channels when expressed alone, and plasma membrane channels when co-expressed with TRPC4 or TRPC5, but not TRPC3 or TRPC6. Both (ER and plasma membrane) forms of the channel are activated upon addition of agonists coupled to the IP<sub>3</sub> cascade.  
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** TRPC channels; TRPC1; Calcium influx; Calmodulin; Endoplasmic reticulum; FRET; Confocal microscopy

## 1. Introduction

Agonist-induced increments in intracellular calcium are a widespread phenomenon associated with a large number of cellular functions. The increments in cytosolic calcium may result from the entry of extracellular calcium, or from the

release of intracellular calcium stores, like the endoplasmic reticulum (ER). Both, calcium influx and calcium release, are tightly coupled via the so-called store-operated calcium entry process (SOCE) [1]; the proteins responsible for such SOCE are believed to be members of the transient receptor potential (TRP) channel superfamily (for a recent review, see [2]).

All TRPs contain six putative transmembrane domains and are thought to assemble with other TRP proteins as homo- or heterotetramers to form cation channels. The functional properties of homo- versus heterotetramers have been poorly explored to this date. TRP is the second largest superfamily of channels, right after potassium channels. As we reported originally, *Drosophila* TRP proteins can function as SOCE

**Abbreviations:** TRPC, Canonical Transient Receptor Potential; SOC, store-operated channel; ROC, receptor-operated channel; SOCE, store-operated calcium entry; IP<sub>3</sub>R, inositol-3-phosphate receptor; CaM, calmodulin; ER, endoplasmic reticulum; hTRPC1, human TRPC1; mTRPC5, mouse TRPC5

\* Corresponding author. Tel.: +52 5 56225654.

E-mail address: lvaca@ifc.unam.mx (V. Luis).

channels when expressed in SF9 cells [3]; the finding of homologs of the TRP protein in mammals introduces the possibility that they could be responsible for SOCE in higher organisms, with mammal TRPC channels sharing the highest identity with *Drosophila* TRP channels. The results so far are conflicting; with some studies favoring the SOCE function of some TRPC proteins, while others finding that they can function as receptor-operated channels mostly insensitive to store depletion. It is generally accepted that all TRPCs have overlapping binding sites for Calmodulin (CaM) and the inositol(1,4,5)trisphosphate (IP<sub>3</sub>R) receptor, thus raising the possibility of modulation of their function by the filling state of the ER in certain conditions [4].

In particular, TRPC1 has been proposed to be responsible for SOCE in salivary gland cells [5], A549 [6], pulmonary artery cells [7], Chinese hamster ovary (CHO) cells [8] and vascular smooth muscle cells [9], although the mechanism of gating in these cells has not been elucidated [10]. However, there is also evidence that TRPC1 is insensitive to store depletion when expressed alone [11]. Native TRPC1 from CHO cells is activated both by store-depletion and agonists coupled to the IP<sub>3</sub> cascade [8]. The activation requires association to IP<sub>3</sub>R and is modulated by calmodulin [8].

More recently, we have shown that TRPC1 can associate to the skeletal muscle, type 1 ryanodine receptor (RyR1) [12]. The foot structure from RyR1 is required for this functional association [12]. However, in these studies it was not determined if TRPC1 was associated to other TRPC proteins, forming heterotetramers.

According to others studies, TRPC1 may only form functional channels when expressed as heterotetramer, since the major localization of TRPC1 (as homotetramer) appears to be in intracellular compartments [13]. It is experimentally established that TRPC1 interacts with TRPC4/5 [14], and more recently, TRPC1 translocation into the plasma membrane has been shown to depend upon the expression of TRPC4 [15]. However, the details of such interactions have not been completely outlined.

Recently, new proteins (STIM1 and Orai) that seem to be necessary for SOCE, were identified using wide screening RNAi-based approaches. STIM1 seems to be a Ca<sup>2+</sup>-sensing protein located at the ER membrane (and possibly on the plasma membrane). STIM1 may modulate the activity of cationic channels at the plasma membrane in response to the filling state of the ER. It was recently found that STIM1 interacts with TRPC channels, thereby regulating their activity during SOCE [16]. Orai1 was identified as a component of the calcium release activated current (*I*<sub>CRAC</sub>), a particular form of SOCE [17]. It has been found also that Orai1 physically interacts with TRPC channels, conferring them sensitivity to store depletion [18]. It is thus possible than the activity of TRPC channels as SOCE not only depends on the interaction among members of the TRPC family, but on its association to other proteins as well.

To further study the events that allow TRPC1 translocation to the plasma membrane and their relevance to

channel function, we generated N-terminal fusion proteins of TRPC1, TRPC4 and TRPC5 with fluorescent proteins CFP or YFP. These chimeric proteins allowed us to examine their cellular localization using confocal microscopy, and heterotetramer formation with co-immunoprecipitation studies.

In agreement with previous reports, we found that TRPC1 expression in CHO and HEK293 cells resulted in fluorescent fusion proteins localized mainly to the ER. However, when TRPC1 was co-expressed with either TRPC4 or TRPC5 abundant plasma membrane fluorescence was observed.

Whole-cell and single channel electrophysiological experiments further confirmed that the biophysical properties of TRPC5 were altered when co-expressed with TRPC1, suggesting the formation of TRPC1–TRPC5 heterotetramers at the plasma membrane. No whole-cell currents were detected when TRPC1 was expressed alone, as expected since most of the protein remained at the ER.

To explore the function of TRPC1 when expressed alone (when present in the ER) we produced a novel chameleon TRPC1 protein containing a FRET-based Ca<sup>2+</sup>-sensing domain, which allowed us to investigate TRPC1 activity in the ER.

With this chimeric protein, local changes in FRET induced by agonist stimulation could be detected. The chimeric protein did not detect [Ca<sup>2+</sup>] increments induced with ionophores, suggesting that the FRET-based Ca<sup>2+</sup>-sensing domain was detecting localized changes in [Ca<sup>2+</sup>], probably due to [Ca<sup>2+</sup>] traversing the TRPC1 pore. A similar chimeric construct containing a pore-mutated version of TRPC1, further confirmed that the FRET reported by the chimera was the result of calcium traversing the TRPC1 pore. The chimeric mutant was unable to respond with FRET to agonist stimulation.

All these results taken together strongly suggest that TRPC1 functions as a homotetramer calcium release channel (in the ER) or as an agonist-activated channel (heterotetramer with TRPC4 or TRPC5) at the plasma membrane. Thus, both TRPC4/TRPC5 control the localization and function of TRPC1 in the cell. These results have important implications to understand the complex association between Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release from internal stores, while providing novel physiological significance to the TRPC homo–heterotetramer formation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and solutions

All salts were analytical grade purchased from Sigma (St. Louis, MO). Guanosine triphosphate (GTP) and adenosine triphosphate (ATP) were obtained also from Sigma. The FM646 fluorescent dye, brefeldin conjugates and CM-DiI were purchased from Invitrogen–Molecular Probes

(Invitrogen, Carlsbad, CA). All TRPC antibodies used were purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel).

## 2.2. Plasmids

Plasmids containing the GFP mutants CFP and EYFP were purchased from Clontech (Mountain View, CA). The plasmid containing the Chameleon FRET-based  $\text{Ca}^{2+}$  sensor was a kind gift from Dr. Ikura (University of Toronto) [19]. The plasmid containing the ORF corresponding to human TRPC1 (hTRPC1) was kindly provided by Dr. Ambudkar (NIH), and the plasmids containing ORFs for hTRPC3, mTRPC4 and mTRPC5 were a kind gift from Dr. Michael Zhu (Ohio State University). Using standard PCR protocols, restriction sites were added to the ORFs, which then were cloned in frame to the vectors containing the fluorescent proteins using the following restriction sites: BamHI and SalI for TRPC1, XhoI and SalI for TRPC4 and TRPC5. To construct the chimeric TRPC proteins containing a FRET-based  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing domain, we fused the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing chimera (YC6.1) generously provided by Dr. Ikura (University of Toronto) [19] to the carboxy-terminus of TRPC1 using EcoRI and BamHI restriction sites. The resulting fusion protein (TRPC1-YC6.1) was used in the FRET studies described in this manuscript. To produce TRPC5-YC6.1, the YC6.1  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing chimera was fused to the amino terminus of TRPC5. All constructs were confirmed by DNA sequencing.

## 2.3. TRPC1 pore mutations

To perform site directed mutagenesis of nucleotides coding for the amino acid residues 560–562 (LFW), corresponding to the putative pore region of the human TRPC1, the following primers were used: forward 5'GGC-ACCTGCTTTGCTGCAGCAGCATATATTTTCTCCTTAG, reverse 5'CTAAGGAGAAAATATATGCTGCTGCAGCA-AAGCAGGTGCC. These primers change the sequence in the pore region from LFW to AAA. The mutagenesis reaction was performed using QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, TX, USA). Pore mutations were confirmed by DNA sequencing.

## 2.4. Cell culture and transfection

HEK293 and CHO cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml ampicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. Transient transfection of both cell lines was performed using 0.8  $\mu\text{g}$  total DNA. Briefly, the DNA was combined with 4  $\mu\text{l}$  of PLUS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 20  $\mu\text{l}$  Optimem (Invitrogen), incubated at room temperature for 15 min, added to 1  $\mu\text{l}$  Lipofectamine (Invitrogen) in 24  $\mu\text{l}$  Optimem, and incubated for another 15 min at room temperature. The mixture was then added to cells plated in 200  $\mu\text{l}$  Optimem, in 24-well plates. After 3–6 h, Optimem was replaced with normal growth medium.

Protein expression and function was assayed 48 h post-transfection.

## 2.5. Whole-cell current measurements

HEK293 and Chinese hamster ovary (CHO) cells were transfected with plasmids containing the wild type hTRPC1, mTRPC4 or mTRPC5, or the fusion proteins C/YFP-TRPC1, TRPC4 or TRPC5. The whole-cell configuration of the patch clamp technique was utilized to study whole-cell currents as previously described [8]. Briefly, cells were plated on glass coverslips and mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Instruments, Japan). The amplifier used was the Axopatch 200 A (Axon Instruments, Union City, CA). Pipette resistance was 10–12 M $\Omega$  when tested with pipette and bath solutions. Whole-cell resistances were in the range of 1–2 G $\Omega$ , and cell capacitance ranged from 10–12 pF for CHO and 12–16 pF for HEK293 cells. The pipette (intracellular) solution contained (mM): 130 Cs-aspartate, 10 CsCl, 10 EGTA, 1 ATP, 2 GTP, 10 HEPES, 1  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.2. For selectivity experiments we used a second intracellular solution replacing the Cs-aspartate with 130 mM K-aspartate. Ten millimolars CsCl was added to eliminate any possible contamination with potassium currents. The extracellular (bath) solution contained (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 1  $\text{CaCl}_2$ , 5 glucose, 10 HEPES, 1.7  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , pH 7.2.

## 2.6. Fluorescence and confocal imaging

All steps were performed at room temperature unless otherwise mentioned. All the cells used for imaging were grown on glass coverslips. When necessary, the cells were fixed with freshly made 4% paraformaldehyde (EMS, Fort Washington, PA) in PBS (pH 7.4) for 15 min. The cells were mounted onto a slide with DAKO or Vectashield antifade mounting medium (Pierce). For membrane (FM-464, final conc. 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or ER (brefeldin–bodipy, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) staining live cells were incubated for 5 min at room temperature in Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen) prior to imaging. When staining the cell membrane with CM-DiI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Invitrogen), after a 5 min incubation with the dye, the cells were fixed with paraformaldehyde as described before. For detection of CFP fluorescence, the sample was excited with the 405 nm, and the emission was detected from 460 to 500 nm. To detect YFP fluorescence, the sample was excited with the 514 nm line, and emission was detected from 520 to 560 nm. Using these conditions, we could detect sequentially both fluorescent proteins in a single cell with a high temporal resolution.

For dynamic FRET using the chimeric TRPC1-YC6.1 or TRPC5-YC6.1 protein containing the FRET-based  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing domain, fluorescence of both CFP and YFP were recorder sequentially, but exciting only with the 454 nm line, to ensure that all YFP fluorescence was due to direct excitation from excited CFP. The changes in the fluorescence of both fluorescent proteins were related to changes in  $\text{Ca}^{2+}$  in

the vicinity of the sensor. We used two different multispectral confocal systems which allowed us to resolve emitted light with a resolution of 1 nm, facilitating the separation of CFP and YFP emissions, and ensuring that the light collected was the result of FRET. Data reported in the figures represents the normalized ratio YFP/CFP, after background fluorescence subtraction. All fluorescence and FRET experiments were conducted in two different multispectral confocal equipments: a Leica SP2 Confocal (Leica, Wetzlar, Germany) and an Olympus FV1000 confocal system (Olympus, Tokyo, Japan) and quantified with ImagePro V6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

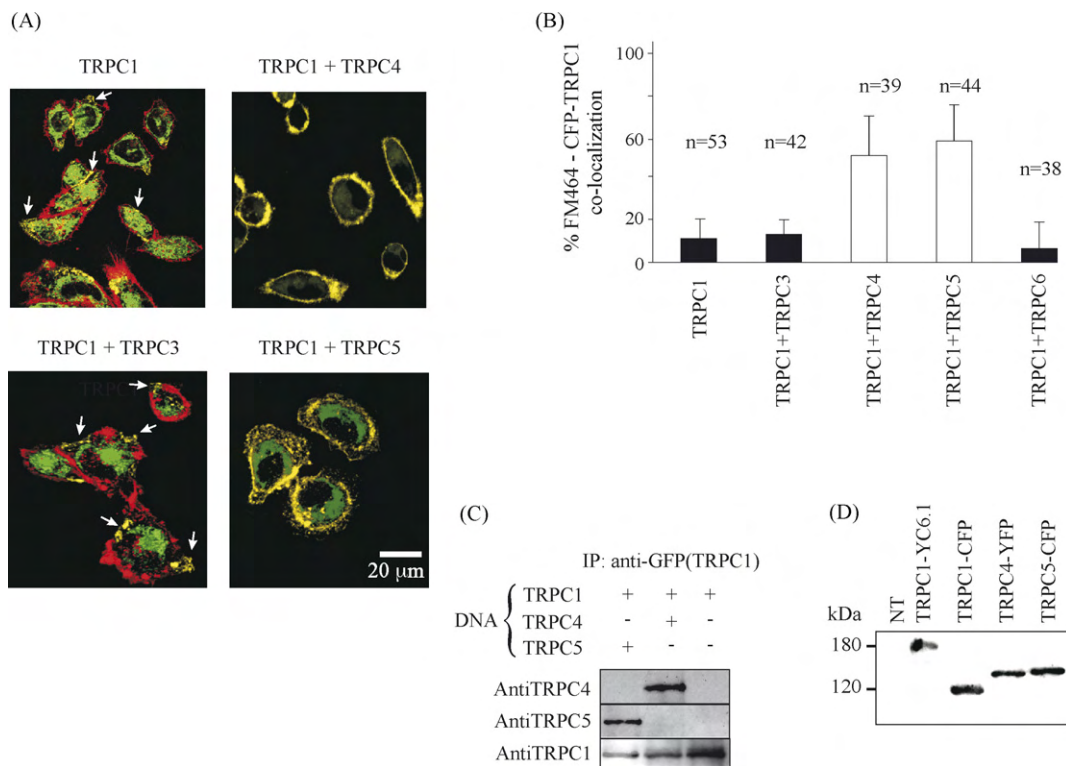
### 2.7. Fura-2 $Ca^{2+}$ measurements in cell populations

Either CHO or HEK293 cells growing as monolayers were loaded with 5  $\mu$ M fura-2 AM (Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA) for 45 min. Cells were rinsed three times and dispersed using a low  $Ca^{2+}$  solution and

placed in a 1 ml cuvette (1.5–2 millions cells/ml).  $Ca^{2+}$  measurements were conducted in an Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer. The excitation wavelength was alternated between 340 and 380 nm every 2 s and the emission was collected at 510 nm. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximum fluorescence after disrupting the cells with 0.1% Triton X-100, Sigma (St. Louis, MO), and the minimum fluorescence obtained after buffering  $Ca^{2+}$  in the solution with 20 mM EGTA Sigma (St. Louis, MO). The values obtained with this procedure were used to calculate the free intracellular  $Ca^{2+}$  concentration as previously reported [20].

### 2.8. Data analysis

All the data from electrophysiological recordings were plotted and fitted using Sigmaplot 9 (SYSTAT, Point Richmond, CA). Images were analyzed using ImagePro V6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). FRET calculations



**Fig. 1.** Modulation of the cellular localization of human TRPC1. (A) Confocal microscopy three-dimensional reconstruction of HEK 293 cells expressing CFP-TRPC1 alone (TRPC1) or combined with wild type human TRPC3 (TRPC1–TRPC3), wild type mouse TRPC4 (TRPC1–TRPC4) and wild type mouse TRPC5 (TRPC1–TRPC5). In red is depicted the plasma membrane fluorescent indicator FM464, in green CFP-TRPC1 and in yellow the spatial co-localization CFP-TRPC1/FM464. White arrows point to the small spots of TRPC1 which reached the plasma membrane in TRPC1 and TRPC1 + TRPC3 panels (spots in yellow). Notice that in the panels TRPC1 + TRPC4 and TRPC1 + TRPC5 almost all plasma membrane is yellow. (B) Percentage of FM464-TRPC1 co-localization (mean  $\pm$  S.D.). The number of cells studied for each condition (*n*) is indicated in the panel. (C) Western blot showing the co-immunoprecipitation studies using CFP- or YFP-TRPC1 alone or co-transfected with wild type murine TRPC4 or TRPC5. Samples were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. Channels in the blot were identified using specific anti-TRPC4/TRPC5 antibodies (Section 2). (D) Western blot showing the specificity of the immunoprecipitation procedure. Cells were transfected with an empty vector (NT) or with the constructions shown in the figure. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. The precipitated fraction was subjected to SDS-PAGE, and blotted as described in the methods section. Chimeric proteins were detected using the anti-GFP antibody. The expected molecular weight of the different proteins are as follows: TRPC1-YC6E.1, 165 kDa; CFP-TRPC1, 115 kDa; YFP-TRPC4, 138 kDa; CFP-TRPC5, 138 kDa.

and background subtractions were performed using macros written in ImagePro V6.0.

### 3. Results

#### 3.1. Exogenous TRPC1 is expressed almost exclusively on internal membranes in the cell

It has been reported that when expressed alone, TRPC1 stays in intracellular location, probably the ER [15]. To determine TRPC1 localization in two different cell lines, we transfected either CHO or HEK293 cells with the fusion protein CFP-TRPC1.

Fig. 1 shows representative cell fluorescence confocal studies illustrating CFP-TRPC1 localization in the cell. Expression of TRPC1 alone shows an almost exclusive intracellular localization (see also Supplemental Fig. 1). Using the selective ER marker, brefeldin demonstrates almost complete co-localization of CFP-TRPC1 and brefeldin–bodipy. Furthermore, using the plasma membrane fluorescent indicator FM464, we observed a reduced co-localization of CFP-TRPC1 (shown in green) and FM464 (shown in red) in Fig. 1A.

Similar results are obtained when TRPC1 is co-expressed with TRPC3 (Fig. 1A) and TRPC6 (Data not shown). However, co-expression of TRPC1 with TRPC4 or TRPC5 results in abundant labeling that co-localize with the plasma membrane indicator FM464 (Fig. 1A). The co-localization between CFP-TRPC1 and FM464 is illustrated in yellow in Fig. 1A. Fig. 1B shows a quantitative analysis of TRPC1-FM464 co-localization under the different experimental conditions described above. Over 50% co-localization was observed only when CFP-TRPC1 was co-expressed with TRPC4 ( $59 \pm 9\%$ ,  $n = 39$ ) or TRPC5 ( $64 \pm 8\%$ ,  $n = 44$ ), but not when TRPC1 was expressed alone ( $12 \pm 6\%$ ,  $n = 53$ ) or TRPC1 with TRPC3 ( $15 \pm 4\%$ ,  $n = 42$ ) or TRPC6 ( $7 \pm 6\%$ ,  $n = 38$ ).

The confocal observations were further validated with co-immunoprecipitation studies using CFP- or YFP-TRPC1. As illustrated in Fig. 1C, using an anti-GFP antibody we could immunoprecipitate TRPC1, and wild type TRPC4 or TRPC5 were also precipitated when expressed in combination with CFP- or YFP-TRPC1 (Fig. 1C). Fig. 1D shows some of the different chimeric proteins used for the experiments described. The proteins were detected with an anti-GFP antibody, showing the specificity of the immunoprecipitation procedure.

These results show that TRPC4 and TRPC5, but not other members from the TRPC family can modulate the cellular localization of human TRPC1. These results are in agreement with a previously published observation indicating that when TRPC1 is co-expressed with TRPC4/5, it is able to reach the plasma membrane [15,21].

Expression of fluorescent fusion proteins containing TRPC4/5 were readily detected in patches on the plasma

membrane, showing a high degree of co-localization with FM464 and CM-DiI (data not shown). The values obtained were  $72 \pm 9\%$  co-localization with FM464 ( $n = 41$ ) and  $75 \pm 11\%$  ( $n = 36$ ) for YFP-TRPC4 and YFP-TRPC5, respectively.

#### 3.2. Electrophysiological recordings of cells co-expressing TRPC1 and TRPC5

To determine the functional relevance of the translocation of TRPC1 from the ER to the plasma membrane, we studied the electrophysiological properties of cells expressing either TRPC1 or TRPC5 alone or in combination (TRPC1–TRPC5) using standard patch-clamp techniques. Whole-cell currents were elicited with voltage-clamp steps from  $-100$  to  $+60$  mV in steps of 20 mV (holding potential  $-80$  mV). The intracellular (pipette) solution contained 130 mM K-aspartate. Ten millimolar CsCl was also added to the intracellular solution to prevent contamination with potassium currents. The bath solution was PBS (Section 2). Under these conditions the expected reversal potential for a potassium-selective electrode is  $-84$  mV.

The cells were stimulated with thrombin, which as we have previously shown [22], elicits a TRPC5 mediated current in CHO cells transfected with TRPC5 cDNA. When CHO cells were stably transfected with TRPC1, the mean peak current densities of thrombin-induced whole-cell currents were not significantly different from spontaneous and thrombin-induced currents in mock-transfected cells or in cells expressing only the CFP (Fig. 2A and B). As previously reported [23], homotetrameric TRPC1 channels did not carry significant inward or outward currents. In contrast, an outward current with an amplitude of up to  $1 \pm 0.5$  nA at  $+60$  mV and a reversal potential of  $-45 \pm 2$  mV developed overtime in response to thrombin in CHO cells expressing TRPC5 (Fig. 2C). This current reached the maximum amplitude about 5 min after the addition of thrombin, as we have previously reported [22].

Co-expression of TRPC1–TRPC5 resulted also in thrombin-induced ionic currents. The outward currents obtained were  $2.7 \pm 0.75$  nA at  $+60$  mV and the reversal potential was  $-1 \pm 2$  mV (Fig. 2C). As in the case of TRPC5, the TRPC1–TRPC5 currents reached maximum amplitude after approximately 5 min of thrombin stimulation.

The main differences observed between TRPC5 and TRPC1–TRPC5 currents included a significant amount of inward current in cells co-expressing TRPC1–TRPC5, when compared to TRPC5 alone (Fig. 2B and C). As we and others have previously shown, mouse TRPC5 expression results in strongly outwardly rectifying currents [22], whereas TRPC1–TRPC5 currents tend to be linear. Fig. 2C shows representative whole-cell currents under the conditions indicated above. Another relevant difference was the ionic selectivity of the currents.

Replacing the intracellular solution with 130 mM cesium-aspartate (Section 2) produced a reversal potential of  $-26 \pm 3$

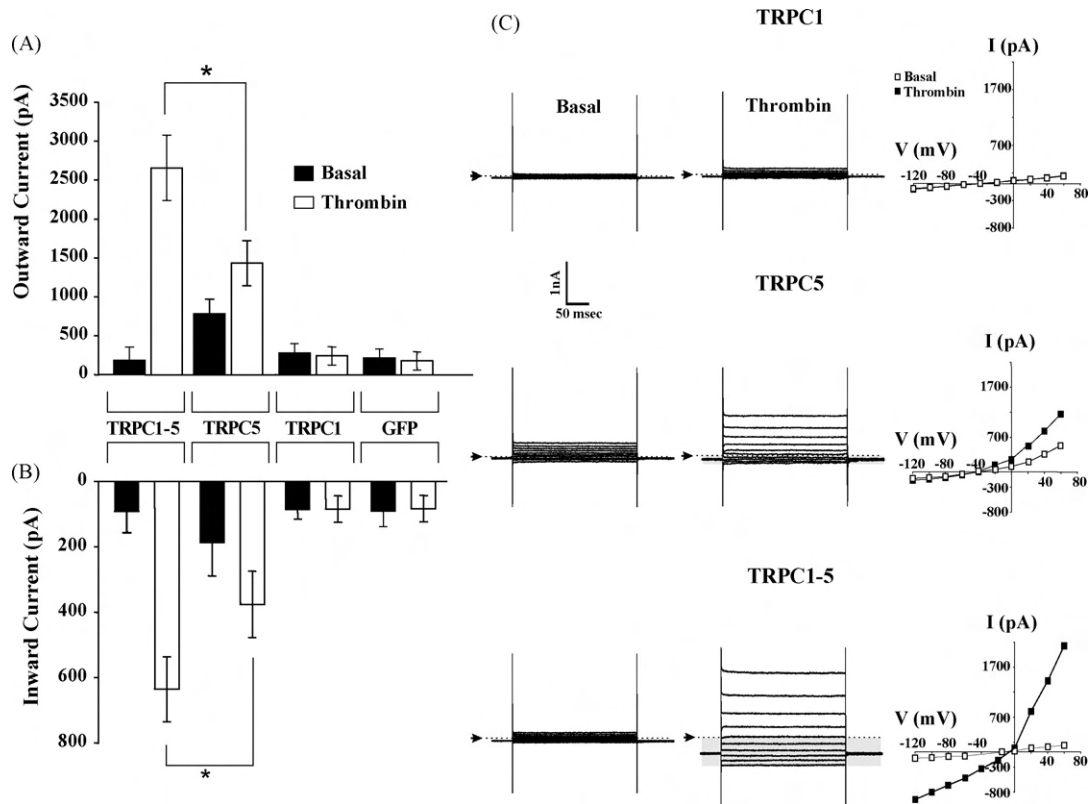


Fig. 2. Patch clamp experiments with human TRPC1. (A) Whole-cell outward currents obtained from CHO cells transfected with GFP (control) or TRPC1, TRPC5 and TRPC1-5. The data shows basal currents and currents elicited with 0.3 U/ml thrombin. (B) Inward currents obtained under the same experimental conditions as in panel A. Current measurements obtained at +60 and  $-120$  mV. (C) Representative whole-cell currents under basal conditions and after addition of 0.3 U/ml thrombin. The gray bar on the left panel marks the inward current to clearly illustrate the differences between TRPC5 and TRPC1-5. Zero current level is shown with the dotted line and horizontal arrow to the left of each whole-cell recording. The last column of the panel illustrates representative current-voltage relationships for TRPC1 alone, TRPC5 or the combination TRPC1-TRPC5, before (open squares) and after thrombin stimulation (filled squares). The asterisks in A and B indicate statistically significant differences between the data, with  $P=0.002$  and  $0.00001$  for outward and inward current comparisons, respectively.

( $n=12$ ) for TRPC5-expressing cells, and  $-9 \pm 3$  ( $n=15$ ) for TRPC1-TRPC5-expressing cells (data not shown).

Similar changes in ionic selectivity for TRPC1-TRPC5 heterotetramers were previously reported for these channels co-expressed in HEK293 cells [24]. The TRPC1-TRPC5 heterotetramer formation does not appear to be an artifact of using cultured cells since native TRPC1-TRPC5 heterotetramers are found in the mammalian brain, where they are also activated by  $G_q$ -coupled receptors [24].

Single channel recordings further evidence the formation of TRPC1-TRPC5 heterotetramers. As illustrated in Fig. 3, single channel properties obtained from cells expressing TRPC5 were clearly distinguishable from the channel properties obtained with cells expressing TRPC1-TRPC5. A voltage ramp from  $-100$  to  $+100$  mV further evidence the differences in single channel gating and conductance, as depicted in Fig. 3C. Fig. 3D illustrates the mean single channel slope conductance measured from  $-60$  to  $0$  mV with TRPC5 was  $41 \pm 3$  pS ( $n=15$ ), and with TRPC1-TRPC5  $7 \pm 2$  pS ( $n=22$ ). Similar differences in single channel conductance were previously reported for TRPC5 and TRPC1+TRPC5 heterotetramers [24]. Furthermore, these conductances were not observed in TRPC1-transfected cells,

cells transfected with a vector expressing GFP ( $n=21$ ) or untransfected cells ( $n=19$ ). These results further support the hypothesis that TRPC1 does not produce functional channels at the plasma membrane, and that in our hands, TRPC1-TRPC5 heterotetramers have distinct electrophysiological characteristics from TRPC5 homotetramers, as previously reported by others [24].

Interestingly, we observed substantial spontaneous (in the absence of agonist) single channel activity in TRPC5-expressing cells (Supplemental Fig. 2), which was not observed with TRPC1-TRPC5. This high spontaneous single channel activity was previously reported for TRPC5 expressed in HEK293 cells [25]. The spontaneous single channel activity observed with TRPC5 is consistent with the basal whole-cell current obtained with the same construct (compare TRPC5 with TRPC1-TRPC5 in Fig. 2B and C). The mechanisms underlying the higher spontaneous activity observed with TRPC5 was not further explored in the present study, but may reflect activation of the channel by extracellular cations, as previously shown [26].

The different reversal potentials and single channel properties obtained with TRPC5 and TRPC1-TRPC5 indicates

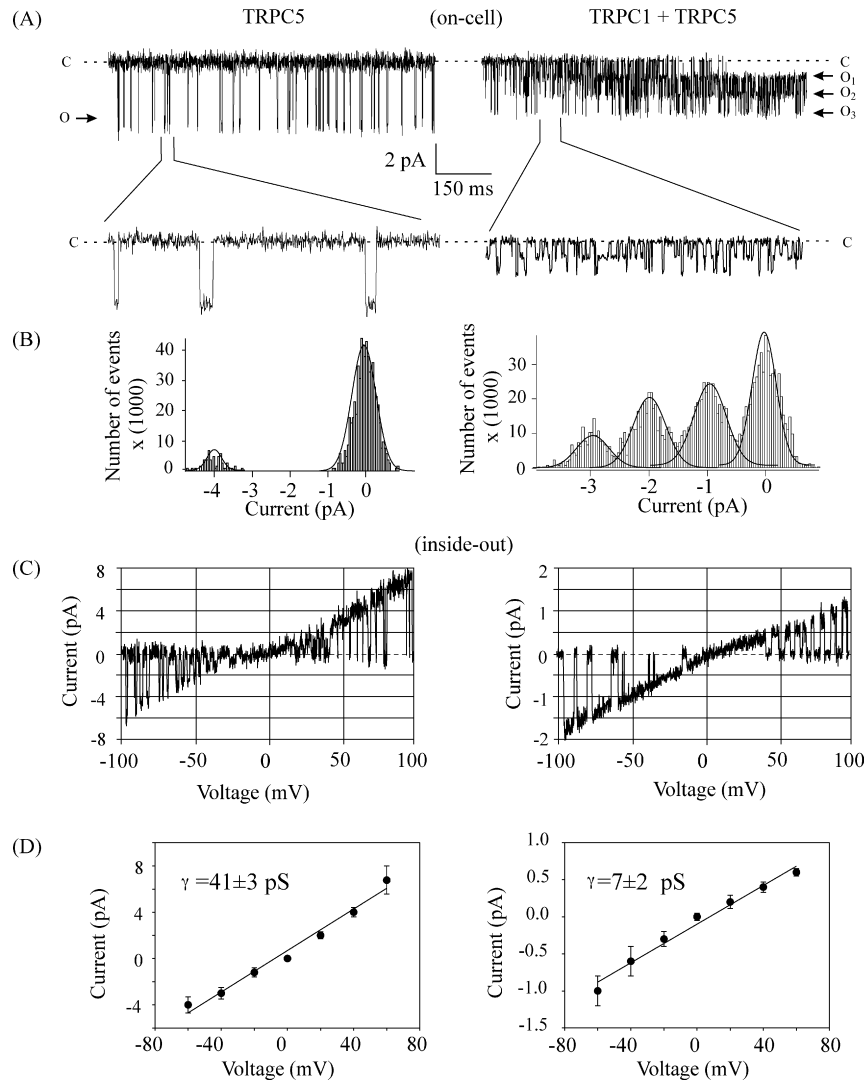


Fig. 3. Single channel properties of TRPC5 homotetramers and TRPC1–TRPC5 heterotetramers. (A) Representative cell-attached (on-cell) single channel recordings showing the activity elicited with the application of 0.3 U/ml thrombin. The zero current level (closed channel) is illustrated with c, while the open channel level is illustrated with numbered o. The TRPC1 + TRPC5 panel shows three open channel levels indicative of three channels in the patch of membrane. The panels underneath show fragments of channel activity with greater temporal resolution to show clearly channel opening events. (B) Total points amplitude histograms obtained from channel recordings shown in panel A. Solid lines represent fits to Gaussian equations to obtain mean amplitudes. (C) Single channel currents obtained with a voltage ramp from  $-100$  to  $+100$  mV for TRPC5 alone (left panel) and the combination TRPC1 + TRPC5 (right panel). (D) Single channel mean  $\pm$  S.D. amplitudes for TRPC5 (left) and TRPC1 + TRPC5 (right). Insets show the single channel conductance ( $\gamma$ ) obtained from fits to linear regressions (solid lines). Data obtained from at least 15 independent observations obtained from five different transfection experiments performed on CHO cells.

that indeed TRPC5 and TRPC1 interact to form a distinct channel that is able to reach the plasma membrane. The fact that TRPC1 was unable to carry currents when expressed alone has two possible explanations: either TRPC1 is unable to form a homotetrameric functional channel, or it is unable to translocate to the plasma membrane by itself. The later hypothesis is supported by our confocal studies shown in Fig. 1.

To further demonstrate the close interaction between TRPC1 and TRPC4 or TRPC5, we conducted acceptor bleaching FRET experiments with CFP-TRPC1 and YFP-TRPC4. With this method FRET efficiency is measured after bleaching the acceptor, which will result in an increase in

donor fluorescence if the acceptor–donor pair is in fact performing FRET. Using these constructs we observed robust and reproducible FRET. Exchanging the fluorescent proteins between the two channels produced also a robust FRET signal. This signal was observed in the ER and the plasma membrane. The signal coming from the ER presumably represents channels in transit to the plasma membrane. These results suggest that the TRPC1–TRPC4 heterotetramer formation occurs before reaching the plasma membrane (Supplemental Fig. 3). Furthermore, stable cell lines expressing CFP-TRPC1 showed almost exclusive ER fluorescence localization, even after months in culture. This was not the case for CFP-TRPC5 (data not shown).



### 3.3. Human TRPC1 appears to be functionally expressed in the ER

It has been shown that TRPC5 can be rapidly translocated to the plasma membrane from an intracellular membrane-proximal location [27,22]. This is not likely the case for TRPC1, since it seems to be located throughout the ER, showing high degree of co-localization with brefeldin and the ER tracker (Section 2). It is possible that, to be fully functional at the plasma membrane, TRPC1 needs to assemble with other TRPC proteins and translocate to the plasma membrane. However, it is also possible that TRPC1 has a function in the ER as a homotetramer, functioning most likely as a  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel.

We conducted FRET experiments with a combination of CFP-TRPC1 and YFP-TRPC1 to force homotetramer formation with proteins carrying both CFP and YFP. With these fusion proteins we found a robust FRET of ER-retained TRPC1 (data not shown). This result strongly suggests that the ER-retained TRPC1 is already forming a homotetramer, since close proximity (less than 10 nm) between CFP and YFP is required to obtain the FRET efficiency reported here.

In order to explore if ER-retained TRPC1 homotetramer may function as a  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel, a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing

chimeric TRPC1 was constructed (TRPC1-YC6.1). This protein consists of a FRET-based  $\text{Ca}^{2+}$  sensor chameleon [19] fused to the carboxy-terminus of TRPC1 (Section 2). This chameleon allows us to measure TRPC1 activity without using disruptive methods, such as patch clamping of the ER.

As shown in Fig. 4A, TRPC1-YC6.1 has a pattern of expression similar to the one previously described for CFP-TRPC1, the majority of the label co-localizes with brefeldin and not with FM464, the plasma membrane fluorescent indicator (Fig. 4A shows FM464 in red and TRPC1-YC6.1 in green).

Measuring FRET in living cells expressing TRPC1-YC6.1 allowed us to explore the effect of two different agonists coupled to the  $\text{IP}_3$  cascade (bradykinin and thrombin). Supplemental Fig. 4 illustrates a typical FRET experiment using TRPC1-YC6.1. This movie shows the typical agonist-induced changes in fluorescence (reduction of CFP and increment of YFP fluorescence) as a result of the energy transfer during FRET.

The ensuing  $\text{Ca}^{2+}$  liberation from the ER induced after agonist stimulation was readily detectable with the chameleon, achieving maximum amplitude about 60 s after the addition of either agonist (Fig. 4B).

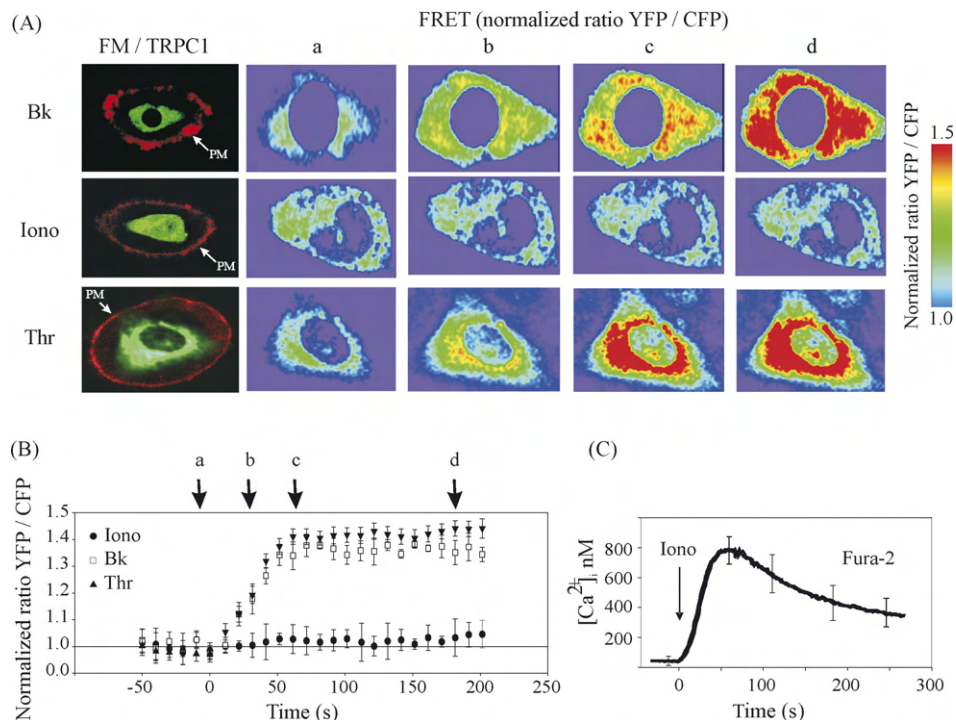


Fig. 4. Measuring TRPC1 activity at the ER with a novel FRET-based chameleon. (A) Left panels show CFP-TRPC1 (green) fluorescence and FM464 (red) to show the intracellular localization of TRPC1. The panels to the right (a–d) show the changes in normalized (background subtracted) YFP/CFP ratio for the three different conditions explored (bradykinin 50 nM, ionomycin 1  $\mu\text{M}$  and 0.3 U/ml thrombin). Notice that application of ionomycin (iono) did not result in detectable FRET. Cells represented in pseudo color scale. FM464 was added to cells only after the FRET measurements concluded, to prevent any possible undesirable effect of this drug on cell physiology and to avoid FM464 endocytosis, which occurs after a couple of minutes of application. (B) Time course analysis of FRET measured as normalized (background subtracted) YFP/CFP ratio. Drug was applied at time zero. Data shows the mean  $\pm$  S.D. obtained from at least 42 cells for each condition from six different transfections. Arrows indicate time points where representative cells were obtained and illustrated in panel A. (C) increments in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in response to ionomycin measured in cell populations loaded with fura-2. Data represents mean  $\pm$  S.D. of 25 independent measurements obtained with HEK 293 cells.

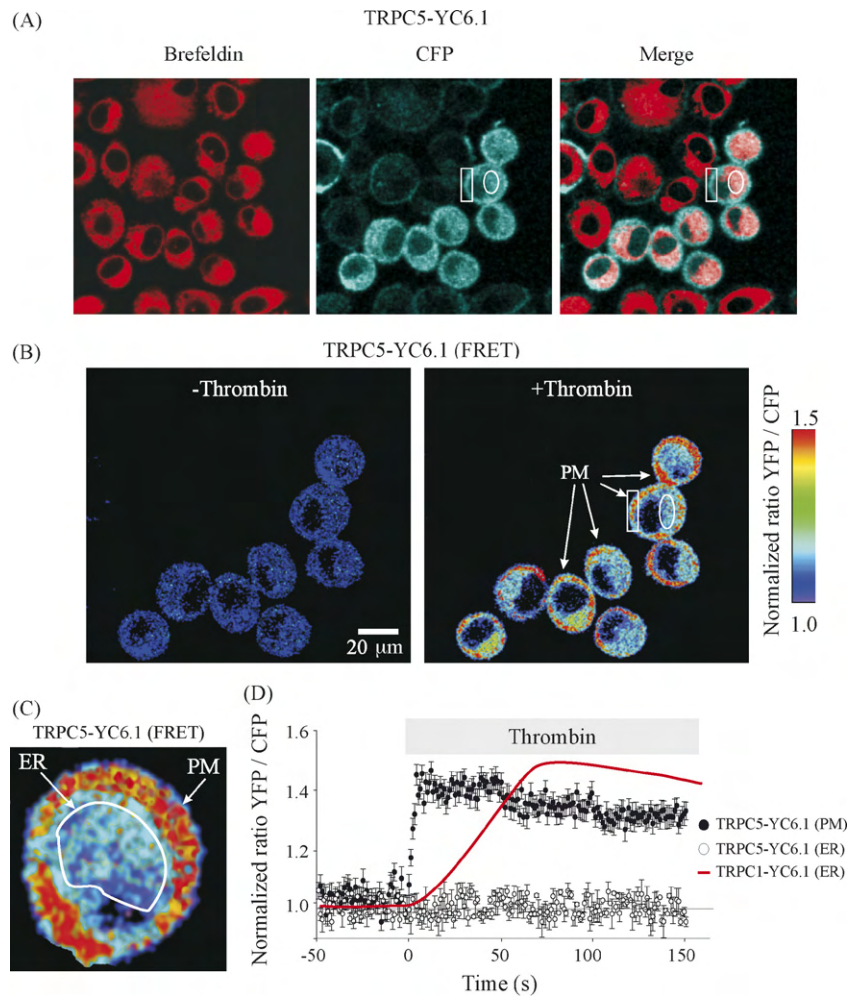


Fig. 5. Measuring TRPC5 channel activation using a novel TRPC5 FRET-based chameleon. (A) Left panel shows the brefeldin labeling indicative of ER (red). Central panel shows TRPC5-YC6.1 fluorescence (blue) and right panel the merge of both channels. The white square shows the plasma membrane in a representative cell (note absence of red labeling in this area) and the white circle the ER area in the same cell (notice the strong red signal in this area representing brefeldin fluorescence). (B) Normalized (background subtracted) YFP/CFP ratio before (–thrombin) and after (+thrombin) the addition of 0.3 U/ml thrombin. Notice the strong FRET signal (in red) in areas representing the plasma membrane in all cells. Areas corresponding to the ER (brefeldin positive) did not show FRET above the background level (illustrated in blue, according to the pseudocolor scale). (C) Magnification of a representative single cell obtained from panel B to show in greater detail the FRET signal at the plasma membrane (white arrow PM) but not in the ER area (white circle). (D) Time course of FRET response before and after 0.3 U/ml thrombin application at time zero. Solid circles show the YFP/CFP ratio measured at the plasma membrane of cell expressing TRPC5-YC6.1 chameleon, while open circles show the ratio obtained at ER (brefeldin positive) areas of same cells. Red line shows the mean FRET obtained with TRPC1-YC6.1 chameleon (measured at ER areas) only to compare time courses between TRPC1-YC6.1 and TRPC5-YC6.1. Data shows the mean  $\pm$  S.D. of at least 40 HEK 293 cells obtained from 5 different transfections. Brefeldin was added to cells only after the FRET measurements concluded, to prevent any possible undesirable effect of this drug on cell physiology.

At this point, it is not possible to determine if the detected  $\text{Ca}^{2+}$  was indeed moving through the pore of the channel formed by TRPC1-YC6.1 or if the chameleon was sensing nearby  $\text{Ca}^{2+}$  increments. However, the former seems very likely since using the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin did not induce FRET in the TRPC1-YC6.1. However, ionomycin induced a robust increment in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  as reported by the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura-2 (Fig. 4C).

It is worth mentioning that the increments in  $\text{Ca}^{2+}$ , as reported by the changes in FRET signal, were not sustained, and oscillations of the signal were frequently observed in the ER. These oscillations were not synchronized throughout the ER, but rather in well-defined spots, as illustrated

in Supplemental Fig. 5. Oscillations were not detected in all cells explored; this pattern of local, well-defined oscillations in FRET signal was observed in 43 of 51 (84%) cells analyzed. The functional implications of these  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and its possible interactions with  $\text{IP}_3\text{R}$  activity remain to be studied. There is already indirect evidence in the literature showing that TRPC1 knockdown eliminates agonist-induced  $\text{IP}_3\text{R}$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, suggesting a role for TRPC1 in  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER [23].

To further validate our chimera and to explore if the FRET observed was indeed the result of  $\text{Ca}^{2+}$  traversing the TRPC1 pore, we produced a similar chimera (TRPC1(MUT)-YC6.1) but using a modified version of TRPC1 in which the amino

acids from the putative channel pore were replaced with alanines (Section 2). One would expect that such replacement would result in non-conducting channels.

Expression of TRPC1(MUT)-YC6.1 produced a protein with similar cellular localization to the wild type chimera TRPC1-YC6.1 (Supplemental Fig. 6). However, agonist stimulation failed to produce FRET with this pore-mutated new chimera. These results strongly suggest that the agonist-induced FRET observed with TRPC1-YC6.1 represent  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes via the TRPC1 channel pore. All these results together strongly suggest that TRPC1 is indeed forming an agonist-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel at the ER.

To investigate if the chameleon could also report TRPC5 homotetramer channel activity, we produced a novel fusion protein consisting of TRPC5 fused to the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing FRET chameleon (TRPC5-YC6.1).

The TRPC5-YC6.1 chameleon showed typical plasma membrane localization with high degree of co-localization with the plasma membrane indicator FM464 (Fig. 5A). Some ER stained was detected also, which presumably represent TRPC5 channels in transit to the plasma membrane. Most importantly, agonist stimulation resulted in robust FRET at the plasma membrane, but not the ER, in spite the fact that some TRPC5-YC6.1 was readily detected at the ER (Fig. 5B and C). Analysis of multiple independent experiments clearly shows robust agonist-induced FRET only at the plasma membrane but not the ER (Fig. 5D).

These results indicate that unlike what we observed with the TRPC1-YC6.1 chameleon, the TRPC5-YC6.1 construct is insensitive to agonist stimulation while present in the ER, further supporting our hypothesis of a functional role for ER-retained TRPC1 as an agonist-activated,

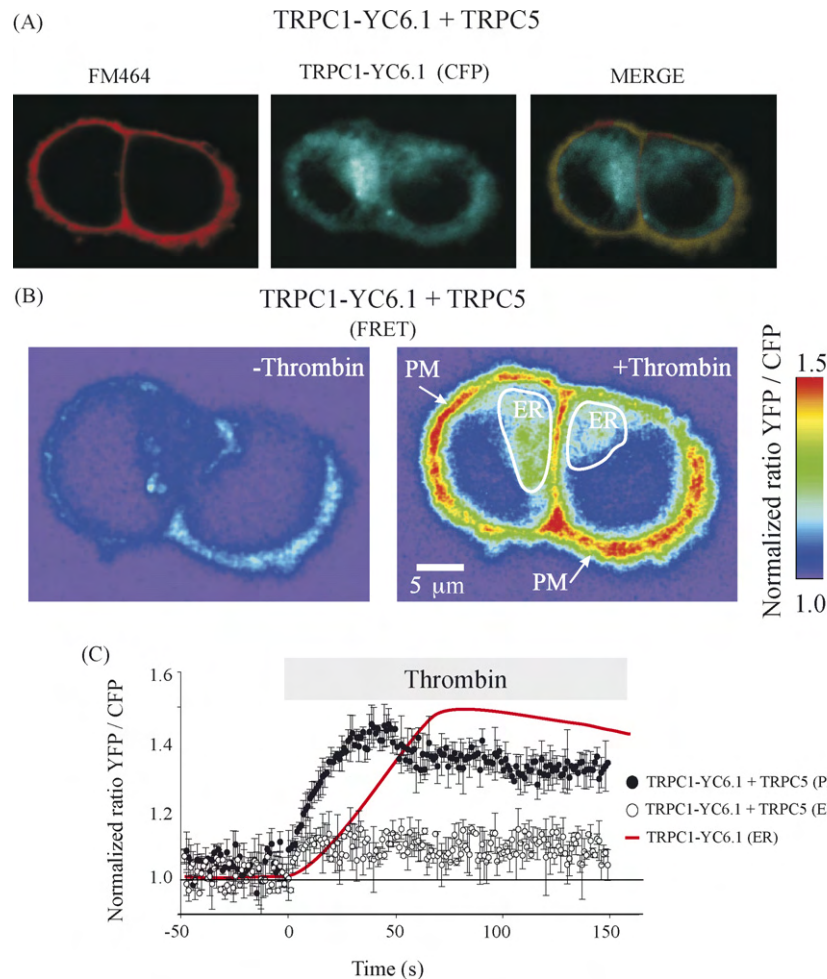


Fig. 6. Agonist-induced FRET response with the TRPC1-YC6.1 co-expressed with wild type TRPC5. (A) Left panel shows the localization of the plasma membrane in two representative HEK 293 cells (FM464 fluorescence in red). Middle panel shows the CFP fluorescence from TRPC1-YC6.1 chameleon. Right panel shows the co-localization of TRPC1-YC6.1 and FM464 (yellow). (B) YFP/CFP ratio before (–thrombin) and after (+thrombin) the addition of 0.3 U/ml thrombin. Pseudo color scale shows the FRET at the region corresponding to the plasma membrane (PM), and some reduced FRET at the ER, which presumably corresponds to TRPC1-YC6.1 homotetramers which did not associate to TRPC5. (C) Time course of mean  $\pm$  S.D. normalized YFP/CFP ratio at the PM (filled circles) and ER (open circles). The red line represents the mean YFP/CFP ratio obtained with the TRPC1-YC6.1 expressed alone for comparison. Note that the time course of activation of the heterotetramer TRPC1-YC6.1 + TRPC5 is faster than the time course of TRPC1-YC6.1 alone measured at the ER, where most of the protein remains.

Ca<sup>2+</sup>-release channel as reported by our TRPC1-YC6.1 chameleon.

Interestingly the time course of FRET with TRPC5-YC6.1 was faster than that observed with TRPC1-YC6.1 (illustrated as a red line in Fig. 5D). The time course of FRET reported by the TRPC5-YC6.1 chameleon matched the time course of TRPC5 channel activation measured in whole-cell currents and single channel experiments (Supplemental Fig. 2).

In a different set of experiments, a combination of TRPC1-YC6.1 chameleon and wild type TRPC5 were co-transfected to explore the ability of TRPC5 to modify the localization of TRPC1-YC6.1. The fluorescent proteins showed abundant plasma membrane localization (Fig. 6A). In these cells agonist stimulation resulted in robust FRET at the plasma membrane (Fig. 6B), further demonstrating that TRPC5 can conduct TRPC1-YC6.1 to the plasma membrane to form functional heterotetramers. The electrophysiological properties of this heterotetramer were indistinguishable from those obtained with wild type TRPC1–TRPC5 (Figs. 2 and 3). Most interestingly, the time course of FRET with this combination (Fig. 6C) was intermediate between the fast activation of homotetramer TRPC5-YC6.1 chameleon (Fig. 5) and the slow activation of homotetramer TRPC1-YC6.1 chameleon (Fig. 4). The differences in activation kinetics may reflect properties of the homo- and heterotetramers, something that has not been studied thus far, but deserves further consideration in the future.

When the pore-mutated chimera TRPC1(MUT)-YC6.1 was co-transfected in combination with TRPC5, the fluorescent signal localized at the plasma membrane, however no FRET was detected after agonist stimulation (data not shown). Even though there should be a small number of homotetrameric TRPC5 channels formed under these conditions, whole-cell electrophysiological experiments were not able to detect currents in over 30 cells explored from five independent transfection experiments, when using the combination of TRPC1(MUT)-YC6.1 and wild type TRPC5 (in spite the fact that the cells showed fluorescent proteins at the plasma membrane). On the contrary, typical whole-cell currents were observed with TRPC1-YC6.1 and wild type TRPC5 combination.

These results further support the formation of TRPC1–TRPC5 heterotetramers at the plasma membrane.

All these results together further strengthen our hypothesis that agonist-induced FRET with the TRPC1-YC6.1 chimera is reporting the activity of TRPC1 channels at the ER. Furthermore, the results obtained with the novel TRPC5-YC6.1 chimera suggest that this imaging method can be used to measure channel activity with other Ca<sup>2+</sup>-permeable channels.

#### 4. Discussion

Over a decade has passed since the identification of the first two members from the TRP superfamily of cationic channels [3,28]. In spite of hundreds of studies conducted

to this date with the different members from this superfamily of channels, there are many unsolved questions about their regulation and mechanisms of activation. The TRPC family appears to be the most mysterious in this regard. TRPC1 is not an exception, there are many studies indicating that this channel functions as a store-operated channel (SOC) and many studies indicating that this is a receptor-operated channel (ROC, for review see [29]). Even more, a recent elegant study shows that TRPC1 functions as a stretch-activated channel [30].

The controversy about the modulation of TRPC1 does not stop here; other studies indicate that homotetramers of TRPC1 never reach the plasma membrane and are retained at the ER [23,24]. Even more, TRPC1 has been implicated in modulation of Ca<sup>2+</sup> release from the ER by a yet unidentified mechanism [31].

It is worth noting that the *Saccharomyces cerevisiae* TRP channel, perhaps the oldest member from this superfamily, is an intracellular channel involved in Ca<sup>2+</sup> release from the vacuole [32].

Many of these apparently conflicting results regarding the mechanisms of activation and cellular localization of TRPC channels were conducted in the same cell line, and using similar constructs in overexpression studies. Thus, differences in the cell lines used are not sufficient to explain these discrepancies.

A feasible explanation for this apparent irreproducibility of results may be emerging in more recent studies. A far more sophisticated combination of events may be responsible for determining if TRPC1 functions as a SOC, ROC, stretch-activated or if it is retained at the ER.

One of such complex events may involve TRPC1 association to other partners, something that has been only superficially studied thus far. Indeed, recent studies have shown that TRPC1 association to the stromal interacting molecule (STIM1) is required for the SOC activity of TRPC1 [33]. In a different study it has been shown that in addition, Orai1 is also involved in controlling the SOC activity of TRPC1 [34].

But TRPC1 can function also as a ROC. It has been previously shown that TRPC1–TRPC5 heterotetramers form novel ROC in the central nervous system of mammals, essentially insensitive to store-depletion [24], whereas TRPC1–IP<sub>3</sub>R interactions may be responsible for controlling Ca<sup>2+</sup> release from the ER [31].

In agreement with these reports, we have shown here that TRPC1–TRPC4/5 heterotetramers form plasma membrane ROCs. Using two different agonists coupled to the IP<sub>3</sub> cascade, we have found reproducible activation of these heterotetramers in two different cell lines. Also in agreement with these reports, we have found that TRPC1–TRPC4/5 heterotetramers are largely insensitive to thapsigargin, ionomycin and maneuvers that deplete intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, arguing against their role in SOCE.

These complex associations may explain why, depending on the expression level of the TRPC channel studied, mechanisms of activation may differ. Indeed this is the case for

human TRPC5, which functions as a SOC or ROC in the same cell, based on the expression levels attained, and most likely due to TRPC5 association to different endogenous protein complexes [35].

In the present study we have produced evidence showing that homotetramers of TRPC1 are retained at the ER in two different cell lines, and function as agonist-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels. To show this, we have developed a novel imaging-based methodology to study  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels using a FRET-based  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing chameleon.

Using a TRPC1 pore mutant, we have shown that the FRET reported by the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing chameleon derives from fluxes through the TRPC1 channel pore. Combining the expression of TRPC1(MUT)-YC6.1 chameleon pore mutant with wild type TRPC5 resulted in a fluorescent protein present at the plasma membrane. Most importantly, this protein was irresponsive to agonist stimulation in FRET and whole-cell studies. These results confirm that alanine replacements at the putative TRPC1 pore result in non-conducting channels, regardless of whether the TRPC1 channels are forming homo- or heterotetramers.

We have further extended the use of our novel imaging-based method to study TRPC5 channel activation at the plasma membrane. The TRPC5-YC6.1 chameleon showed agonist-induced FRET at the plasma membrane with a time course of activation resembling the TRPC5 whole-cell currents. These results open the possibility of using this novel imaging method to study other  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels.

Thus, all the experimental evidence presented here supports our hypothesis of TRPC1 homotetramers as novel ER  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels, and provide a feasible explanation for previous studies where TRPC1 modulates  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER by an unidentified mechanism [31]. Furthermore, in that study TRPC1 knockdown abolished  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations from the ER. Using the imaging method reported here for the first time, we were able to monitor agonist-induced oscillations of TRPC1 channel activity at the ER, suggesting a novel role for TRPC1 in agonist-induced ER-originated  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations.

We have shown also that heterotetramers of TRPC1–TRPC4/5 reach the plasma membrane, where they function as ROCs, in agreement with previous reports [24]. TRPC3, TRPC6, TRPM8 and TRPV1 failed to conduct TRPC1 to the plasma membrane, suggesting a preferential heterotetramer formation among TRPC1, TRPC4 and TRPC5.

The results presented here provide a feasible avenue to explain apparently conflicting evidence suggesting that TRPC1 protein does not produce functional channels, whereas other reports show TRPC1 as a plasma membrane channel activated by agonists. Since almost all studied cell lines express several members of the TRPC family, it is possible to envision a wide variety of distinct environments affecting the localization and function of TRPC1 and its interaction with other partners.

Ongoing studies may help to characterize the role of ER-retained TRPC1 in  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and  $\text{IP}_3\text{R}$  activity, and

to study the possible role of TRPC1– $\text{IP}_3\text{R}$  association at the ER in modulating agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (D42469) and DGAPA IN204406 to LV. The authors thank Dr. A. Navarro for technical assistance. We greatly appreciate the technical assistance from the Microscopy and Molecular Biology units at the Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ceca.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.07.004).

## References

- [1] M.J. Berridge, Capacitative calcium entry, *Biochem. J.* 312 (Pt 1) (1995) 1–11.
- [2] S.F. Pedersen, G. Owsianik, B. Nilius, TRP channels: an overview, *Cell Calcium* 38 (2005) 233–252.
- [3] L. Vaca, W.G. Sinkins, Y. Hu, D.L. Kunze, W.P. Schilling, Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells, *Am. J. Physiol.* 267 (1994) C1501–C1505.
- [4] J. Tang, Y. Lin, Z. Zhang, S. Tikunova, L. Birnbaumer, M.X. Zhu, Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21303–21310.
- [5] X. Liu, W. Wang, B.B. Singh, T. Lockwich, J. Jadlovec, B. O'Connell, R. Wellner, M.X. Zhu, I.S. Ambudkar, Trp1, a candidate protein for the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanism in salivary gland cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3403–3411.
- [6] G.H. Brough, S. Wu, D. Cioffi, T.M. Moore, M. Li, N. Dean, T. Stevens, Contribution of endogenously expressed Trp1 to a  $\text{Ca}^{2+}$ -selective, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathway, *FASEB J.* 15 (2001) 1727–1738.
- [7] M.J. Lin, G.P. Leung, W.M. Zhang, X.R. Yang, K.P. Yip, C.M. Tse, J.S. Sham, Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension, *Circ. Res.* 95 (2004) 496–505.
- [8] L. Vaca, A. Sampieri, Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42178–42187.
- [9] G.U. Ahmed, D. Mehta, S. Vogel, M. Holinstat, B.C. Paria, C. Tirupathi, A.B. Malik, Protein kinase C $\alpha$  phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20941–20949.

- [10] X. Liu, B.B. Singh, I.S. Ambudkar, TRPC1 is required for functional store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Role of acidic amino acid residues in the S5–S6 region, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11337–11343.
- [11] B. Lintschinger, M. Balzer-Geldsetzer, T. Baskaran, W.F. Graier, C. Romanin, M.X. Zhu, K. Groschner, Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive cation channels, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27799–27805.
- [12] A. Sampieri, M. Diaz-Munoz, A. Antaramian, L. Vaca, The foot structure from the type 1 ryanodine receptor is required for functional coupling to store-operated channels, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24804–24815.
- [13] S.R. Hassock, M.X. Zhu, C. Trost, V. Flockerzi, K.S. Authi, Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel, *Blood* 100 (2002) 2801–2811.
- [14] C. Strubing, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, D.E. Clapham, Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39014–39019.
- [15] T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, T. Gudermann, Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 7461–7466.
- [16] J.P. Yuan, W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, S. Muallem, STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 636–645.
- [17] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature* 441 (2006) 179–185.
- [18] Y. Liao, C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D.L. Armstrong, L. Birnbaumer, Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 4682–4687.
- [19] K. Truong, A. Sawano, H. Mizuno, H. Hama, K.I. Tong, T.K. Mal, A. Miyawaki, M. Ikura, FRET-based in vivo  $\text{Ca}^{2+}$  imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule, *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001) 1069–1073.
- [20] J.R. Martinez-Francois, V. Morales-Tlalpan, L. Vaca, Characterization of the maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblasts, *J. Physiol.* 538 (2002) 79–86.
- [21] J.P. Yuan, K. Kiselyov, D.M. Shin, J. Chen, N. Shcheynikov, S.H. Kang, M.H. Dehoff, M.K. Schwarz, P.H. Seeburg, S. Muallem, P.F. Worley, Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors, *Cell* 114 (2003) 777–789.
- [22] B. Ordaz, J. Tang, R. Xiao, A. Salgado, A. Sampieri, M.X. Zhu, L. Vaca, Calmodulin and calcium interplay in the modulation of TRPC5 channel activity. Identification of a novel C-terminal domain for calcium/calmodulin-mediated facilitation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 30788–30796.
- [23] D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strubing, The TRP ion channel family, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 387–396.
- [24] C. Strubing, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, D.E. Clapham, TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain, *Neuron* 29 (2001) 645–655.
- [25] H. Yamada, M. Wakamori, Y. Hara, Y. Takahashi, K. Konishi, K. Imoto, Y. Mori, Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells, *Neurosci. Lett.* 285 (2000) 111–114.
- [26] S. Jung, A. Muhle, M. Schaefer, R. Strotmann, G. Schultz, T.D. Plant, Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3562–3571.
- [27] V.J. Bezzerides, I.S. Ramsey, S. Kotecha, A. Greka, D.E. Clapham, Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 709–720.
- [28] Y. Hu, L. Vaca, X. Zhu, L. Birnbaumer, D.L. Kunze, W.P. Schilling, Appearance of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of *Drosophila*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994) 1050–1056.
- [29] C. Montell, The TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* 2005 (2005) re3.
- [30] R. Maroto, A. Raso, T.G. Wood, A. Kurosky, B. Martinac, O.P. Hamill, TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 179–185.
- [31] Y. Mori, M. Wakamori, T. Miyakawa, M. Hermosura, Y. Hara, M. Nishida, K. Hirose, A. Mizushima, M. Kurosaki, E. Mori, K. Gotoh, T. Okada, A. Fleig, R. Penner, M. Iino, T. Kurosaki, Transient receptor potential 1 regulates capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 673–681.
- [32] C.P. Palmer, X.L. Zhou, J. Lin, S.H. Loukin, C. Kung, Y. Saimi, A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel in the yeast vacuolar membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 7801–7805.
- [33] G.N. Huang, W. Zeng, J.Y. Kim, J.P. Yuan, L. Han, S. Muallem, P.F. Worley, STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 1003–1010.
- [34] H.L. Ong, K.T. Cheng, X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B.B. Singh, D. Gill, I.S. Ambudkar, Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx: evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9105–9116.
- [35] F. Zeng, S.Z. Xu, P.K. Jackson, D. McHugh, B. Kumar, S.J. Fountain, D.J. Beech, Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell, *J. Physiol.* 559 (2004) 739–750.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Montell, C. & Rubin, G.M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-1323 (1989).
2. Ramsey, I.S., Delling, M. & Clapham, D.E. An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology* **68**, 619-647 (2006).
3. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels. *Annual review of biochemistry* **76**, 387-417 (2007).
4. Mochizuki, T., *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science (New York, N.Y)* **272**, 1339-1342 (1996).
5. Sun, M., *et al.* Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Human molecular genetics* **9**, 2471-2478 (2000).
6. Dong, X.P., *et al.* The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* (2008).
7. Caterina, M.J., *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824 (1997).
8. Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J. & Julius, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436-441 (1999).
9. Hoenderop, J.G., *et al.* Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *The EMBO journal* **22**, 776-785 (2003).
10. Perraud, A.L., *et al.* ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595-599 (2001).
11. Sano, Y., *et al.* Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. *Science (New York, N.Y)* **293**, 1327-1330 (2001).
12. Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T. & Montell, C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* **13**, 1153-1158 (2003).
13. Launay, P., *et al.* TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* **109**, 397-407 (2002).
14. Talavera, K., *et al.* Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* **438**, 1022-1025 (2005).
15. Liu, D. & Liman, E.R. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15160-15165 (2003).
16. Jiang, J., Li, M. & Yue, L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *The Journal of general physiology* **126**, 137-150 (2005).
17. McKemy, D.D., Neuhauser, W.M. & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58 (2002).
18. Peier, A.M., *et al.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715 (2002).
19. Voets, T., *et al.* The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-754 (2004).
20. Brauchi, S., Orio, P. & Latorre, R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15494-15499 (2004).

21. Jordt, S.E., *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-265 (2004).
22. Bandell, M., *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849-857 (2004).
23. Walker, R.G., Willingham, A.T. & Zuker, C.S. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science (New York, N.Y)* **287**, 2229-2234 (2000).
24. Sidi, S., Friedrich, R.W. & Nicolson, T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science (New York, N.Y)* **301**, 96-99 (2003).
25. Wes, P.D., *et al.* TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9652-9656 (1995).
26. Tang, J., *et al.* Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* **276**, 21303-21310 (2001).
27. Zhu, M.X. Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch* **451**, 105-115 (2005).
28. Ambudkar, I.S. TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochemical Society transactions* **35**, 96-100 (2007).
29. Beech, D.J., Xu, S.Z., McHugh, D. & Flemming, R. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* **33**, 433-440 (2003).
30. Liman, E.R., Corey, D.P. & Dulac, C. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5791-5796 (1999).
31. Okada, T., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J Biol Chem* **273**, 10279-10287 (1998).
32. Schaefer, M., *et al.* Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* **275**, 17517-17526 (2000).
33. Hofmann, T., *et al.* Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**, 259-263 (1999).
34. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D.E. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-655 (2001).
35. Bezzerides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A. & Clapham, D.E. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* **6**, 709-720 (2004).
36. Li, Y., *et al.* Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **434**, 894-898 (2005).
37. Engelke, M., *et al.* Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* **523**, 193-199 (2002).
38. Brereton, H.M., Chen, J., Rychkov, G., Harland, M.L. & Barritt, G.J. Maitotoxin activates an endogenous non-selective cation channel and is an effective initiator of the activation of the heterologously expressed hTRPC-1 (transient receptor potential) non-selective cation channel in H4-IIIE liver cells. *Biochimica et biophysica acta* **1540**, 107-126 (2001).
39. Wang, W., *et al.* Cloning of Trp1beta isoform from rat brain: immunodetection and localization of the endogenous Trp1 protein. *Am J Physiol* **276**, C969-979 (1999).
40. Tsiokas, L., *et al.* Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3934-3939 (1999).



41. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. & Gudermann, T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7461-7466 (2002).
42. Mori, Y., *et al.* Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **195**, 673-681 (2002).
43. Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F.C., Mistry, M. & Brown, D.A. Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* **34**, 209-220 (2002).
44. Liu, X., *et al.* Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem* **275**, 3403-3411 (2000).
45. Xu, S.Z. & Beech, D.J. TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca(2+) channels in native vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **88**, 84-87 (2001).
46. Sinkins, W.G., Estacion, M. & Schilling, W.P. Functional expression of TrpC1: a human homologue of the Drosophila Trp channel. *Biochem J* **331** ( Pt 1), 331-339 (1998).
47. Lintschinger, B., *et al.* Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca2+-sensitive cation channels. *J Biol Chem* **275**, 27799-27805 (2000).
48. Singh, B.B., *et al.* Trp1-dependent enhancement of salivary gland fluid secretion: role of store-operated calcium entry. *Faseb J* **15**, 1652-1654. (2001).
49. Zhu, X., *et al.* trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca2+ entry. *Cell* **85**, 661-671 (1996).
50. Vaca, L. & Sampieri, A. Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem* **277**, 42178-42187 (2002).
51. Brough, G.H., *et al.* Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca2+-selective, store-operated Ca2+ entry pathway. *Faseb J* **15**, 1727-1738 (2001).
52. Wu, X., Babnigg, G. & Villereal, M.L. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *American journal of physiology* **278**, C526-536 (2000).
53. Sweeney, M., *et al.* Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca2+ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L144-155 (2002).
54. Tomita, Y., *et al.* Intracellular Ca2+ store-operated influx of Ca2+ through TRP-R, a rat homolog of TRP, expressed in Xenopus oocytes. *Neuroscience letters* **248**, 195-198 (1998).
55. Brereton, H.M., Harland, M.L., Auld, A.M. & Barritt, G.J. Evidence that the TRP-1 protein is unlikely to account for store-operated Ca2+ inflow in Xenopus laevis oocytes. *Molecular and cellular biochemistry* **214**, 63-74 (2000).
56. Rosado, J.A., Brownlow, S.L. & Sage, S.O. Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca2+ entry by conformational coupling in human platelets. *J Biol Chem* **277**, 42157-42163 (2002).
57. Antoniotti, S., Lovisolò, D., Fiorio Pla, A. & Munaron, L. Expression and functional role of bTRPC1 channels in native endothelial cells. *FEBS Lett* **510**, 189-195 (2002).
58. Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J.M. & Martinez, M.C. Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem* **277**, 19876-19881 (2002).

59. Lockwich, T.P., *et al.* Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem* **275**, 11934-11942 (2000).
60. Schlegel, A., Pestell, R.G. & Lisanti, M.P. Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease. *Front Biosci* **5**, D929-937 (2000).
61. Brazer, S.C., Singh, B.B., Liu, X., Swaim, W. & Ambudkar, I.S. Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem* **278**, 27208-27215 (2003).
62. Bergdahl, A., *et al.* Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry dependent on TRPC1. *Circulation research* **93**, 839-847 (2003).
63. Rosado, J.A. & Sage, S.O. Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets. *Biochem J* **356**, 191-198 (2001).
64. Singh, B.B., Liu, X., Tang, J., Zhu, M.X. & Ambudkar, I.S. Calmodulin regulates Ca(2+)-dependent feedback inhibition of store-operated Ca(2+) influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1. *Molecular cell* **9**, 739-750 (2002).
65. Koulen, P., *et al.* Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* **4**, 191-197 (2002).
66. Yuan, J.P., *et al.* Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* **114**, 777-789 (2003).
67. Kiselyov, K., Shin, D.M., Shcheynikov, N., Kurosaki, T. & Muallem, S. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup> current (I<sub>crac</sub>) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem J* **360**, 17-22 (2001).
68. Sampieri, A., Diaz-Munoz, M., Antaramian, A. & Vaca, L. The foot structure from the type 1 ryanodine receptor is required for functional coupling to store-operated channels. *J Biol Chem* **280**, 24804-24815 (2005).
69. Roos, J., *et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *The Journal of cell biology* **169**, 435-445 (2005).
70. Liou, J., *et al.* STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241 (2005).
71. Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F. & Muallem, S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-645 (2007).
72. Vig, M., *et al.* CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science (New York, N.Y)* **312**, 1220-1223 (2006).
73. Feske, S., *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185 (2006).
74. Peinelt, C., *et al.* Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* **8**, 771-773 (2006).
75. Liao, Y., *et al.* Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4682-4687 (2007).
76. Sossey-Alaoui, K., *et al.* Molecular cloning and characterization of TRPC5 (HTRP5), the human homologue of a mouse brain receptor-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Genomics* **60**, 330-340 (1999).
77. Plant, T.D. & Schaefer, M. TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium* **33**, 441-450 (2003).

78. Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A. & Clapham, D.E. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature neuroscience* **6**, 837-845 (2003).
79. Philipp, S., *et al.* A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *The EMBO journal* **17**, 4274-4282 (1998).
80. Kanki, H., *et al.* Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse TRP5 channels. *Molecular pharmacology* **60**, 989-998 (2001).
81. Jung, S., *et al.* Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* **278**, 3562-3571 (2003).
82. Zeng, F., *et al.* Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *J Physiol* **559**, 739-750 (2004).
83. Venkatachalam, K., Zheng, F. & Gill, D.L. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* **278**, 29031-29040 (2003).
84. Okada, T., *et al.* Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **274**, 27359-27370 (1999).
85. Riccio, A., *et al.* Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* **277**, 12302-12309 (2002).
86. Tang, Y., *et al.* Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* **275**, 37559-37564 (2000).
87. Song, X., *et al.* Canonical transient receptor potential channel 4 (TRPC4) co-localizes with the scaffolding protein ZO-1 in human fetal astrocytes in culture. *Glia* **49**, 418-429 (2005).
88. Mery, L., Strauss, B., Dufour, J.F., Krause, K.H. & Hoth, M. The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *Journal of cell science* **115**, 3497-3508 (2002).
89. Freichel, M., *et al.* Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol* **3**, 121-127 (2001).
90. Zhang, Z., *et al.* Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3168-3173 (2001).
91. Hassock, S.R., Zhu, M.X., Trost, C., Flockerzi, V. & Authi, K.S. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* **100**, 2801-2811 (2002).
92. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D.E. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* **278**, 39014-39019 (2003).
93. Hu, H.Z., *et al.* 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* **279**, 35741-35748 (2004).
94. Clapham, D.E., Runnels, L.W. & Strubing, C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396 (2001).
95. Yamada, H., *et al.* Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells. *Neuroscience letters* **285**, 111-114 (2000).
96. Truong, K., *et al.* FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nature structural biology* **8**, 1069-1073 (2001).

97. Liu, X., Singh, B.B. & Ambudkar, I.S. TRPC1 is required for functional store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem* **278**, 11337-11343 (2003).
98. Wedel, B.J., Vazquez, G., McKay, R.R., St, J.B.G. & Putney, J.W., Jr. A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP<sub>3</sub> receptor-independent process. *J Biol Chem* **278**, 25758-25765 (2003).
99. Liu, Y.C. & Storm, D.R. Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends in pharmacological sciences* **11**, 107-111 (1990).
100. Montell, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3 (2005).
101. Maroto, R., *et al.* TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* **7**, 179-185 (2005).
102. Huang, G.N., *et al.* STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* **8**, 1003-1010 (2006).
103. Ong, H.L., *et al.* Dynamic Assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 Ternary Complex Is Involved in Store-operated Calcium Influx: EVIDENCE FOR SIMILARITIES IN STORE-OPERATED AND CALCIUM RELEASE-ACTIVATED CALCIUM CHANNEL COMPONENTS. *J Biol Chem* **282**, 9105-9116 (2007).
104. Obukhov, A.G. & Nowycky, M.C. TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). *Journal of cellular physiology* **201**, 227-235 (2004).