



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**LOCALIZACIÓN DE LA COMPUERTA DE ACTIVACIÓN DE LOS CANALES
TRPV1**

TESIS QUE PRESENTA:

HÉCTOR PEDRO SALAZAR GARCÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

TUTOR DE TESIS:

DRA. TAMARA ROSENBAUM

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento, respeto y admiración a la Dra. Tamara Rosenbaum no solo por ser mi tutora sino además por ser una amiga y aguantarme durante estos años, yo se que no soy un alumno fácil y a pesar de eso Tamara ha tenido la paciencia para enseñarme y aun mas importante mostrarme las herramientas para tener una excelente carrera como investigador, gracias.

De la misma forma quiero agradecerle al Dr. León Islas, quien complemento mi formación académica durante el doctorado, gracias por sus consejos.

A mi jurado de examen por sus correcciones y comentarios hechos a esta tesis, Dra. Refugio García Villegas, Dr. Alberto Darszon, Dr. Froylán Gómez Lagunas y Dr. Gerardo Gamba.

Quiero hacer una mención especial al LIBB. Andrés Jara Oseguera. Quien colaboró en la realización de ambos proyectos, tanto experimentalmente así como intelectualmente, además de que es uno de mis mejores amigos.

Agradezco a la Biol. Itzel Alejandra Llorente Gil por su ayuda técnica proporcionada al presente trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Enrique Hernández, por colaborar en la realización de experimentos para esta tesis. Félix Sierra, por su ayuda técnica en el manejo de los animales, Silvina Romero Suárez y Andrés Nieto.

A mi familia, mis papas Claudia García y Héctor Salazar, a mis hermanos Francisco Salazar y Carlos Salazar. Gracias por apoyarme y estar conmigo.

A todos mis amigos en especial a Guillermo Romero, Sergio Juárez, Berenice Hernández, Alejandra Guzmán y Ariadna Aparicio.

INDICE.

	Pagina
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
PROPIEDADES GENERALES DEL CANAL TRPV1.....	8
INFERENCIAS SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS DISTINTAS REGIONES ESTRUCTURALES DEL CANAL TRPV1.....	10
Papel del segmento N- terminal.....	11
Poro del canal TRPV1.....	13
Cara externa del poro del canal TRPV1.....	13
Filtro de selectividad del canal TRPV1.....	15
Cara interna del poro del canal TRPV1.....	15
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
METODOLOGIA.....	20
Métodos electrofisiológicos.....	20
Cultivo celular.....	24
Biología molecular.....	25
Ensayos de comportamiento.....	26
Análisis de periodicidad.....	27
Modelo de homología.....	28
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
Los agentes MTS activan al canal en ausencia de la capsaicina promoviendo un cambio en la probabilidad de apertura del canal TRPV1.....	29

Los canales TRPA1 y TRPV1 pueden ser activados por alicina.....	33
Localización de los residuos que interactúan con los agentes modificadores de cisteínas	34
Efectos fisiológicos de la alicina en el modelo <i>in vivo</i>	40
DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA APERTURA DEL CANAL TRPV1.....	43
Efecto de la modificación de las cisteínas insertadas en el segmento S6.....	43
Efecto de los agentes MTSET y MTSEA en la parte más intracelular del segmento S6.....	48
Accesibilidad de la plata a través del poro del canal TRPV1.....	51
Los residuos L681 y Y671 también juegan un papel importante al activar el canal TRPV1 con temperatura.....	59
Helicidad del segmento S6.....	61
Modelo del canal TRPV1 basados en los datos obtenidos del SCAM.....	64
DISCUSIÓN.....	66
Caracterización de los efectos de compuestos activos del ajo y la cebolla	66
Determinantes estructurales de la activación del canal TRPV1	68
CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFIA	74
APENDICE	81

RESUMEN.

A pesar del importante papel que el canal TRPV1 juega en los procesos de inflamación y detección del dolor, se conoce muy poco acerca de los componentes estructurales que determinan su activación. Uno de los objetivos de este proyecto fue localizar la compuerta de activación del TRPV1. Utilizando el método de accesibilidad de cisteínas sustituidas (SCAM) se insertaron cisteínas a lo largo del segmento transmembranal S6 para realizar experimentos que nos permitieron elucidar la localización de dicha compuerta del canal, evaluando la accesibilidad a agentes de diferente tamaño que modifican cisteínas, como los metano-tiosulfonatos (MTS) y la plata (Ag^+). Al estudiar el efecto de los agentes MTS en el canal TRPV1 silvestre (WT) encontramos que activan al canal, debido a esto decidimos estudiar el mecanismo de acción que utilizan estos agentes que modifican cisteínas y de algunos que se encuentran en la naturaleza como la alicina, el compuesto activo que está presente en los extractos de ajo y cebolla. Encontramos que la alicina y los agentes MTS se unen y activan al canal TRPV1 mediante un enlace covalente con una sola cisteína localizada en el segmento N-terminal. Aun más importante es que el canal TRPV1 participa en la respuesta a dolor inducida por alicina.

Finalmente, demostramos que la compuerta de activación del canal TRPV1 se localiza en los segmentos S6 que forman al poro del canal, y que estos tienen una estructura de α -hélices. Así mismo, demostramos que existen dos constricciones en el poro: una que impide el acceso a moléculas grandes como el metano-tiosulfonato-etil-trimetil-amonio (MTSET) y otra que impide el acceso a moléculas de tamaño pequeño como la plata y que constituye la compuerta de activación de los canales TRPV1.

ABSTRACT.

The TRPV1 ion channels mediates the response to a variety of stimuli such as high temperatures, tissue damage and exposure to pungent compounds like capsaicin, all of which converge on these channels and underlie the common perceptual experience of pain. Despite the clear physiological relevance of TRPV1 and of TRP channels in general, little structural information is currently available. Sequence homology of TRPV1 to ion channels of known structure suggests a subunit topology similar to that of voltage-activated potassium (Kv) channels. Nonetheless, the topology of the pore and the location of the activation gate of TRPV1 or of any other TRP channel remain unknown.

The Use the substituted cysteine accessibility method (SCAM) to scan the entire S6 segment of the rat TRPV1, allowed us to determine the localization of the activation gate, by testing the accessibility of different cysteine modifying agents like MTS agents. During the study of the effect of MTS agents on the WT channel, we found that MTS agents and compounds found on onion and garlic extracts like allicin who can modify cysteines, activate this channel trough a modification of a single cysteine located in the N-terminal region of TRPV1. Using a combination of electrophysiological and behavioural assays we establish that, TRPV1 channels participate in the response to allicin *in vivo*.

Finally we describe the presence of two intracellular constrictions: the most intracellular one located at Leu681, which closes the ion conduction pathway for large molecules and one located at Tyr671, which obstructs the conduction pathway for small permeating ions and constitutes the activation gate of TRPV1. An important result is that the region we define as the activation gate of TRPV1, gates the channel in response to both capsaicin and heat, revealing the physical point of convergence of these two pathways of activation. Finally we have observed a marked periodicity in our accessibility data that is consistent with an α -helical structure for the S6.

ABREVIATURAS.

1,4,5-trifosfato (IP₃).

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetano ácido sulfónico (HEPES).

Aceite de mostaza (AITC).

Acido etil endiamino tetra acético (EDTA).

Adenilato ciclasa (AC).

ASICs (canales iónicos detectores de acidez, por sus siglas en inglés).

cAMP (adenosín monofosfato cíclico).

Calmodulina activada por calcio (CaM).

Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).

Canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG).

Canal silvestre (WT).

Cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII).

Cinasa de proteína A (PKA).

Cinasa de proteína C (PKC).

Ditiotreitol (DTT).

Dominios de asociación (DA).

Dominios de tetramerización (TCC).

Factor de crecimiento neuronal (NGF).

Fenantrolina de cobre (CuP).

Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂).

Fosfolipasa C (PLC).

Ganglio trigeminal (GT).

Índice de periodicidad (α -PI).

Neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG).

Metano-tiosulfanatos (MTS)

Metano tiosulfonato -etil-amonio (MTSEA)

Metano-tiosulfonato-etil-trimetil-amonio (MTSET)

Método de accesibilidad de cisteínas sustituidas (SCAM).

Método de múltiples arreglos (SOPMA).

Probabilidad de apertura (P_o).

Proteína verde fluorescente (GFP).

Prostaglandina E_2 (PGE_2).

Proteína verde fluorescente (GFP).

Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Regiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales.

Resiniferatoxina (RTX).

Rojo de rutenio (RR).

Sistema nervioso central (SNC).

Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (“patch-clamp”).

Tetraetilamonio (TBA).

Tetraetilamonio (TEA).

Tetrapropilamonio (TPrA).

Adenosín trifosfato (ATP).

TRP (por sus siglas en inglés para Transient Receptor Potential).

INTRODUCCIÓN.

Una de las características adaptativas más importantes de los organismos es la capacidad para detectar y responder a estímulos del medio ambiente. En los últimos años se han estudiado las bases moleculares de los procesos que permiten a los organismos percibir cambios en la temperatura, acidez y perturbaciones mecánicas del medio ambiente. Se han identificado algunos canales iónicos que detectan estos estímulos y los traducen a cambios en la excitabilidad de la membrana celular¹. Así, se ha demostrado que algunos de los miembros de la familia de los canales TRP (por sus siglas en inglés para Transient Receptor Potential), funcionan como receptores que median la respuesta a cambios en la temperatura, acidez del medio y perturbaciones mecánicas como cambios en la presión osmótica².

El uso combinado de técnicas de biología molecular y biofísicas así como el de la cristalografía de proteínas, han permitido encontrar regiones responsables de la función de varios canales iónicos. En el caso de los canales TRP existen muy pocos estudios encargados de elucidar la relación entre la estructura y la función de esta molécula. Por ejemplo, aún no se conoce la región del canal encargada de controlar el flujo de los iones a través del poro una vez que ha sido activado el canal por algún agonista. El canal TRPV1 es un modelo de estudio ideal para realizar estudios de estructura-función que lleven a esclarecer la estructura de los canales TRP, pues tiene como ventaja el ser uno de los mejores caracterizados en relación a los estímulos que lo activan.

PROPIEDADES GENERALES DEL CANAL TRPV1.

El canal TRPV1 se expresa principalmente en neuronas del sistema nervioso periférico como las del ganglio de la raíz dorsal (DRG), de los ganglios trigeminales (GT) y torácico vagal, y en fibras nociceptivas C y A δ ³⁻¹². El canal TRPV1 también puede encontrarse en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos no neuronales como los queratinocitos, los folículos pilosos, el tejido muscular liso, la vejiga, el hígado, los riñones, el bazo y los pulmones, en donde todavía se está estudiando su papel fisiológico¹³⁻²².

Se ha predicho que el canal TRPV1 es un tetrámero formado por cuatro subunidades iguales, cada una de las cuales tiene seis segmentos transmembranales y regiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales intracelulares. Los segmentos transmembranales cinco (S5) y seis (S6) de cada subunidad dan lugar al poro o vía de conducción iónica que permite el paso de iones hacia el interior o exterior de la célula (Figura 1). Al igual que los otros canales TRP, el TRPV1 es un canal catiónico no específico que permite el paso de diferentes cationes monovalentes y divalentes²³⁻²⁵.

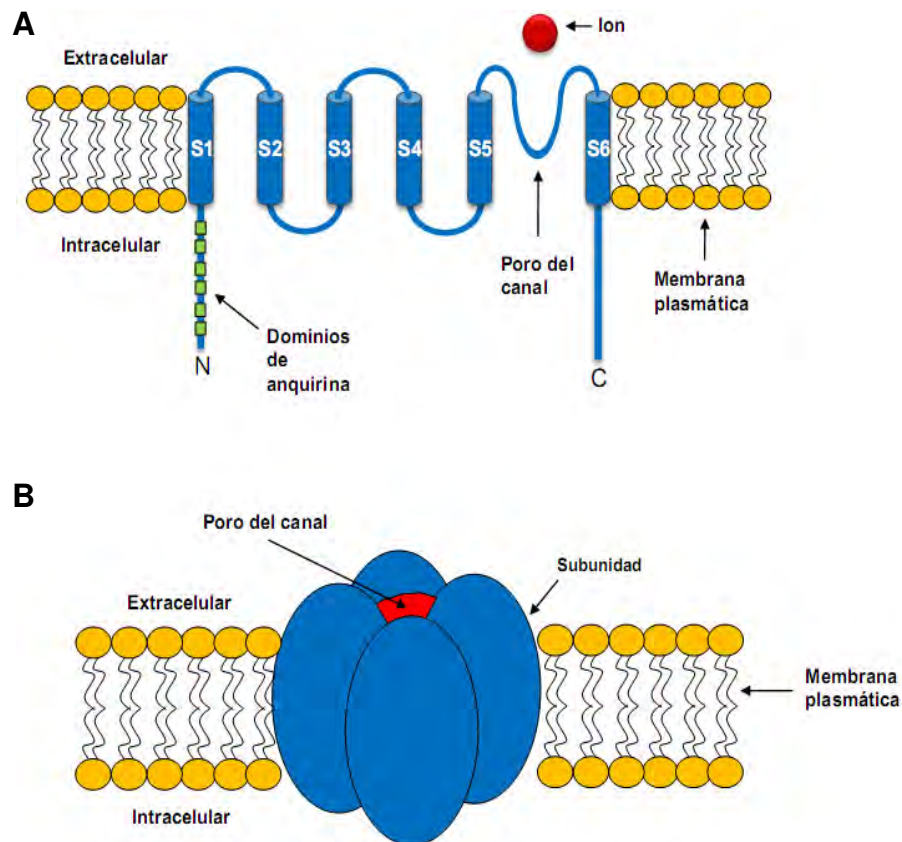


Figura 1. Esquema de la topología del canal TRPV1. (A) Caricatura de una subunidad del canal TRPV1. Cada subunidad está compuesta por seis segmentos transmembranales (S1-S6) y regiones amino- (N) y carboxilo-terminal (C) intracelulares. Los segmentos S5, S6 y el asa que los conecta dan lugar al filtro de selectividad y al poro del canal. La región N-terminal contiene seis repetidos de unión a anquirina (mostrados como cuadros). (B) El canal funcional forma un tetrámero compuesto por cuatro subunidades como las que se muestran en (A).

Una de las propiedades más singulares del TRPV1 es su alta sensibilidad a la temperatura con una $Q_{10} \sim 26$, activándose a temperaturas por arriba de los 43°C ³, por voltaje y por cambios en el pH extracelular³. Los protones (pKa cercana a 5.3) son capaces de activar directamente al canal TRPV1 uniéndose a dos residuos ácidos en el asa del poro del canal^{26,27} además de potenciar su respuesta a otros agonistas como la temperatura (Figura 2). Recientemente se ha descrito que pHs intracelulares alcalinos, con un pKa cercano a 9²⁸ también pueden activar al canal.

Diversos compuestos activan al canal TRPV1 como la anandamida²⁹, el alcanfor que es un analgésico tópico³⁰, la capsaicina o compuesto pungente que se encuentra en los chiles³ y la resiniferatoxina (RTX) de la cactácea *Euphorbia resinifera*³¹ (Figura 2). Dado que la capsaicina es lipofílica, puede cruzar la membrana celular e interactuar con sitios de unión localizados en la parte intracelular del canal (Figura 2)³². También es activado por otros compuestos pungentes como la zingerona que es extraída del jengibre y la piperina que se encuentra en la pimienta³³.

Además de activarse ante una gran cantidad de estímulos de diferente naturaleza, la función del TRPV1 está modulada por varias moléculas como cinasas de proteínas, lípidos y segundos mensajeros que ligan la actividad del canal con diversas vías de transducción de señales tanto intra- como extracelulares (Figura 2). Un ejemplo de esta modulación lo podemos ver en el proceso de desensibilización aguda el cual depende de la presencia de la calmodulina (CaM) que funciona como subunidad accesoria del TRPV1. Cuando la capsaicina se une al canal, éste se abre y permite la entrada de calcio al interior de la célula. El calcio que ingresa interactúa con la CaM, la cual se activa y se asocia con el canal promoviendo un cambio conformacional que provoca el cierre del receptor³⁴.

INFERENCIAS SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS DISTINTAS REGIONES ESTRUCTURALES DEL CANAL TRPV1.

A continuación se detallan las funciones de algunas regiones del canal en su actividad eléctrica.

Papel del segmento N- terminal.

El canal TRPV1 presenta un segmento N-terminal intracelular, con seis repetidos de anquirina denominados de esta forma debido a que la proteína anquirina, la cual se encuentra en el citoesqueleto, presenta 26 copias de estos repetidos³⁵. Estos repetidos de anquirina se han relacionado con una gran cantidad de procesos celulares como la interacción proteína-proteína y proteína-citoesqueleto, pero a pesar de esto aun no se conocen todas las funciones de estos repetidos en el canal TRPV1. A continuación, se resumirán algunas de las funciones de los repetidos de anquirina en el canal TRPV1.

Muchos de los miembros de la familia TRP como el TRPA, TRPC, TRPN y TRPV tienen repetidos de anquirina, el número de éstos puede variar de 3 a 9²⁵, y están constituidos por al menos 33 aminoácidos que forman un par de α -helices anti-paralelas conectadas por láminas β . Los repetidos de anquirina presentan diferentes propiedades entre proteínas e incluso entre miembros de la familia de los canales TRP. Por ejemplo, en los canales TRPV1, los repetidos de anquirina presentan como características principales asas grandes entre los repetidos 1-4 y 5-6, que dividen a estos en dos regiones, además de residuos aromáticos presentes en la horquilla- β de los repetidos 2 y 3, los cuales se han propuesto como sitios de interacción con otras proteínas³⁶⁻³⁸.

Los canales TRP pueden formar homo- o heterotetrámeros. En el caso de la familia TRPV se sabe que forman homotetrámeros, pero las bases moleculares que subyacen a la oligomerización aún permanecen desconocidas. A pesar de esto, recientemente se ha encontrado que los extremos C y N-terminales juegan un papel importante en los procesos de oligomerización³⁹⁻⁴². Estudios recientes en canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), han identificado motivos que actúan como dominios de asociación (DA), llamados dominios de tetramerización (TCC). Este dominio DA puede formar α -hélices súper-enrolladas entre subunidades determinando la selectividad y la estabilidad de la multimerización⁴³⁻⁴⁵. Ferrer-Montiel y colaboradores han propuesto un modelo del segmento C-terminal del TRPV1 en el que han encontrado que los DA contribuyen a la

oligomerización de las subunidades. Sus experimentos describen que cuando se eliminan los DA los monómeros son incapaces de formar canales funcionales³⁹.

Los repetidos de anquirina entre los canales TRPV2 y TRPV1 se encuentran extremadamente conservados y no se les ha relacionado con procesos de oligomerización aunque interactúan con una gran cantidad de moléculas que regulan la actividad de estos canales^{36,37}. Sin embargo en otros miembros de la familia TRP se ha demostrado que esta región es pieza fundamental para la oligomerización. En los canales TRPV5 se han identificado dos regiones importantes para que se lleve a cabo el ensamblaje del canal: la primera está localizada en el segmento N-terminal que conforma los aminoácidos (116-140), y la segunda en el segmento C-terminal conformada por los aminoácidos (596-601). La asociación de estas dos regiones controla el transporte, ensamblaje de las subunidades y la función del canal⁴⁰. Algo similar sucede con el canal TRPV6 en donde el tercer repetido de anquirina es el que inicia el proceso de unión entre subunidades, posteriormente el quinto repetido ancla las subunidades impidiendo que se separen. Cuando se eliminan estas regiones, el canal queda imposibilitado para ensamblarse⁴¹.

El grupo de Gaudet y colaboradores publicaron recientemente el cristal de los repetidos de anquirina del canal TRPV1. Además este mismo grupo confirmó la localización del sitio de unión del adenosín trifosfato (ATP) que se encuentra formado por los repetidos de anquirina 1-3. El trifosfato de la molécula de ATP interactúa con los aminoácidos R115 de la hélice interna 1, K155 y K160 de la hélice interna 2, mientras que la adenosina interactúa con los residuos L163, Y199, Q202 y E210⁴⁶.

Como ya se ha mencionado una de las moléculas que regulan la función del canal es la CaM, la cual promueve la desensibilización del canal dependiente de calcio intracelular. La desensibilización tiene como resultado la reducción de la probabilidad de apertura y con ello una disminución de la corriente. El sitio de unión de la CaM se encuentra localizado en el segmento N-terminal entre los residuos 189-222³⁴. La CaM se une a los dominios de anquirina sobrelapándose con el sitio de unión del ATP y, aún más importante, al activarse el canal utilizando capsaicina, los iones calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) que permean a

través del canal inactivan al ATP interactuando con su grupo fosfato, dejando libre el sitio de unión para que la CaM pueda unirse a éste⁴⁶.

Existen varias evidencias que apuntan a que la región N-terminal del TRPV1 juega un papel importante en su función. Uno de los objetivos de esta tesis fue describir como participa esta región en la activación del canal por compuestos pungentes presentes en algunas plantas.

Poro del canal TRPV1.

Realizando alineamientos de secuencia entre los canales TRPV1 y otros canales iónicos de los cuales se conoce su estructura, se ha podido determinar que el canal TRPV1 es similar estructuralmente a los canales Kv, presentando un poro formado por los segmentos S5 y S6 así como una asa que se encuentra entre ellos. A pesar de la gran similitud que tiene el canal TRPV1 con algunos canales Kv no existen estudios acerca de la relación entre la estructura y la función en el canal TRPV1 que hayan dilucidado el papel de esta región en la función del canal. A continuación se describe brevemente lo que se conoce acerca de esta estructura del poro del canal TRPV1 y de algunos de los miembros de la familia TRP.

Cara externa del poro del canal TRPV1.

El poro externo del canal TRPV1 se encuentra formado por el asa que une los segmentos S5 y S6 y en esta región del canal se encuentran sitios de unión a varios agonistas incluidos los protones, cationes monovalentes-divalentes y poliaminas⁴⁷⁻⁴⁹ (Figura 2). Además de activar al canal, estos agonistas modifican las propiedades biofísicas de éste, por ejemplo, la activación con protones reduce el coeficiente de permeabilidad al calcio⁵⁰⁻⁵³ y el gadolinio bloquea al canal cuando se encuentra en concentraciones altas⁴⁸. Así que también, algunos de los aminoácidos localizados en el asa del poro regulan las propiedades del poro. Por ejemplo, la neutralización de un residuo ácido en E636, que se encuentra en el vestíbulo extracelular⁵⁴, reduce la sensibilidad al rojo de rutenio, el cual es un bloqueador extracelular⁵⁵. La Figura 2 resume en gran medida lo que se sabe hasta ahora sobre las

regiones del canal TRPV1 que participan en su regulación por agentes diversos y en su activación.

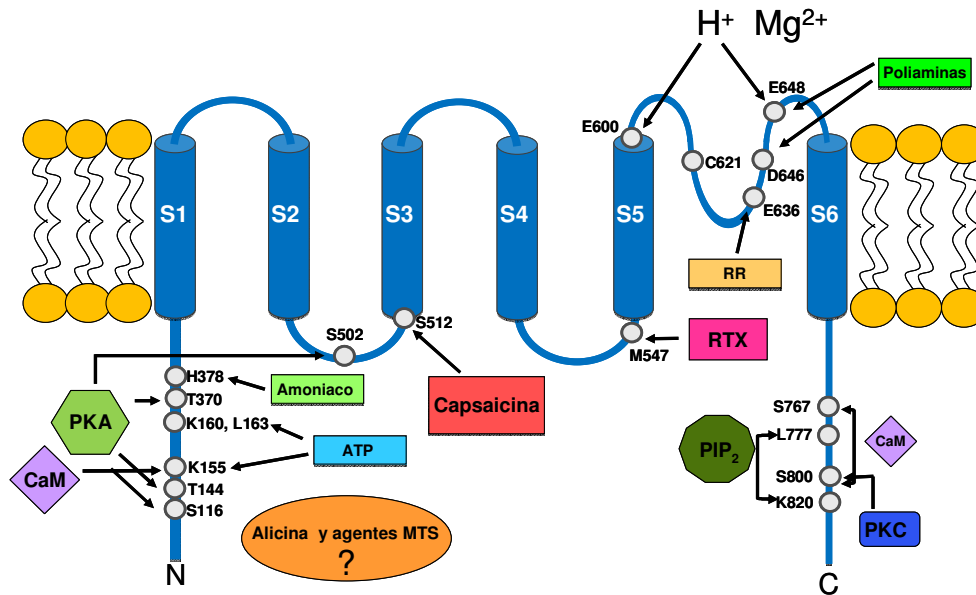


Figura 2. Residuos del canal TRPV1 que interactúan con ligandos y moduladores del canal. El canal TRPV1 tiene una gran cantidad de sitios de fosforilación. La cinasa de proteína A (PKA) activa directamente al canal fosforilando varios sitios del mismo. Los residuos S116 y T370 son fosforilados por la PKA y participan en la desensibilización del canal, además, los residuos T144, T370 y S502 desensibilizan al canal en respuesta a temperaturas altas al ser fosforilados por la PKA. La S502 también es blanco de la cinasa de proteína C (PKC) y de la cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII). La PKC también puede fosforilar al residuo S800, en tanto que la CaMKII fosforila a la T704. La región formada por los aminoácidos 777-820 es responsable de la interacción con el PIP₂. Los aminoácidos K155, K160 y L163 forman el sitio de unión del adenosín trifosfato (ATP) el cual sensibiliza al canal y evita la taquifilaxis o desensibilización aguda. El residuo H378 sufre una deprotonación al interactuar con agentes químicos alcalinos como el amoníaco y pH alcalino, provocando la activación del canal. Varios residuos que interaccionan con vaniloides y, en especial los que interactúan con la capsaicina, han sido identificados. La S512 está implicada en la unión a capsaicina, en tanto que la T550 y la Y511 son necesarias para mantener la sensibilidad a capsaicina. La M547 es responsable de la interacción con la resiniferatoxina (RTX), y además participa en la unión de varios vaniloides. Los aminoácidos E600 y E648 están involucrados en la activación del canal TRPV1 por protones y responsables de la activación por Gd³⁺. E648, junto con D646, son responsables de la interacción con poliaminas. De las tres cisteínas que se encuentran en el poro, la que juega un papel importante es la C621 ya que es la encargada de interaccionar con agentes reductores. Se han encontrado dos sitios de unión a CaM en el TRPV1: uno se encuentra en el segmento N-terminal y otro en el C-terminal de la posición 767 a la 800. finalmente el E636 es el responsable del bloqueo por rojo de rutenio y el A604 es un sitio para N-glicosilación.

Filtro de selectividad del canal TRPV1.

El filtro de selectividad en los canales Kv está formado por una secuencia de aminoácidos que se ha denominado secuencia firma (TVGYG) y que se mantiene conservada en los canales TRPV1 (TIGMG)⁵⁶. Como ya he mencionado, el canal TRPV1 es un canal catiónico no específico y la sustitución de la metionina por una tirosina en la secuencia primaria no cambia la selectividad iónica del canal⁵⁵ coincidiendo con experimentos en canales Kv donde la tirosina se sustituyó por otros aminoácidos como la valina o fenilalanina y tampoco cambió la selectividad iónica del canal⁵⁷.

La mayoría de los estudios de estructura-función de la región del filtro de selectividad se han hecho en otros canales de la familia TRPV como el TRPV5 y TRPV6 utilizando la técnica de SCAM, demostrando que dicha región es de tamaño similar a la de los canales Kv⁵⁸⁻⁶⁰. Por último, en el caso del canal TRPV1 se ha descrito un fenómeno parecido al que se ha encontrado en canales P2X^{61,62} llamado dilatación del poro, en el que la selectividad por cationes de tamaño más grande que el Na⁺ se incrementa dependiendo de la concentración de agonista y tiempo de exposición al agonista⁶³.

Cara interna del poro del canal TRPV1.

Uno de los pocos canales de los cuales se tienen datos sobre la estructura de la cara interna del poro es el canal Shaker de los Kv. En este canal los segmentos S6 de cada una de las cuatro subunidades contribuyen al alineamiento del poro y constituyen la compuerta de activación⁶⁴⁻⁶⁶, la cual se encarga de permitir o impedir el flujo de los iones a través del poro en función de cambios de voltaje en la membrana⁶⁷⁻⁷¹. Se ha propuesto que la estructura del poro interno en los canales TRPV1 se asemeja a la de los canales Kv. Sin embargo, en el caso de los canales TRPV1 no existía ningún estudio que se avocará a describir la localización de la compuerta utilizando datos funcionales.

El uso de amonios cuaternarios ha sido una herramienta importante en el estudio de la localización de la compuerta de activación de los canales Kv^{72,73}. En el laboratorio se

decidió utilizar esta misma estrategia en los canales TRPV1 encontrando que la compuerta de activación podría localizarse en la parte más intracelular del canal impidiendo el paso de moléculas del tamaño del tetrapropilamonio (TPrA, 9 Å)^{74,75}. Los amonios cuaternarios de este tamaño o mayores producen un aumento en el tiempo de apertura del canal TRPV1 así como un enlentecimiento en las colas de corriente. Esto indica que la compuerta de activación del canal se encuentra en alguna región intracelular del canal TRPV1 similar a lo que sucede en los canales Kv. Sin embargo, resulta interesante que bloqueadores como el tetraetilamonio (TEA, 8 Å) no interfieren con el cierre del canal. Esto muestra que moléculas de este tamaño bloquean al canal independientemente del estado en el que se encuentre sugiriendo que el bloqueador puede quedar atrapado en alguna cavidad del canal. Por otro lado, un estudio que utilizó la técnica de sustitución de alaninas mostró que es muy probable que el segmento S6 del canal sea una alfa hélice. Este estudio utilizó simulaciones de dinámica molecular que indicaron que puede haber dos puntos flexibles que cambian de conformación cuando se encuentra el agonista presente⁷⁶. A parte de estos reportes no existía ninguna demostración experimental de la localización de la compuerta de activación en los canales TRPV1.

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la estructura y la localización de la compuerta de activación en otros canales iónicos como los Kv y los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG), es la técnica de SCAM^{64,77-79}. Esta técnica hace uso de la cisteína que es un residuo voluminoso, relativamente hidrofóbico y sensible a modificaciones altamente específicas. Este residuo se ha usado en experimentos de mutagénesis dirigida en conjunto con técnicas bioquímicas y biofísicas para elucidar la topología de los canales en la membrana y la accesibilidad de residuos transmembranales a las fases acuosa o lipídica, así como para esclarecer la proximidad espacial entre dominios transmembranales. Estos experimentos consisten en usar canales iónicos sin cisteínas nativas en los cuales se puedan insertar cisteínas en la región de interés. La aplicación de agentes que promueven la modificación de cisteínas (como por ejemplo los agentes MTS de la familia del metano-tiosulfonato-etil-trimetil-amonio o MTSET), produce la modificación de la cisteína insertada dando como resultado un cambio en la función del canal que normalmente depende de si la cisteína se encuentra accesible y en una región

importante para la función del canal, proporcionando información acerca de cambios conformacionales en esa región^{65,78,79}.

Un ejemplo de la aplicación de estas técnicas son los estudios hechos en canales CNG, donde se insertaron cisteínas a lo largo del segmento S6 hasta llegar a la región inmediata debajo del filtro de selectividad del canal. Cuando se probó la accesibilidad de estas cisteínas a modificarse por agentes MTS, se encontró que la modificación de las cisteínas no discrimina entre los estados cerrado y abierto del canal. Esto indica que, a diferencia de los canales de potasio, la región S6 no se comporta como una compuerta de activación y que muy probablemente, la compuerta de activación en estos canales se encuentra en la región del filtro de selectividad (Figura 3)⁷⁹.

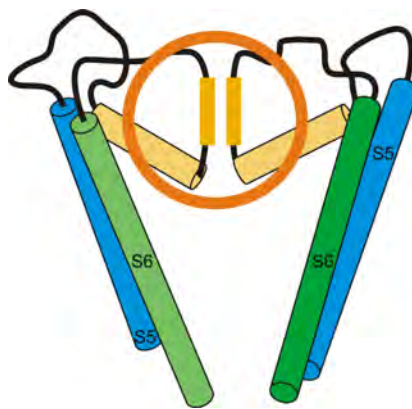


Figura 3. Compuerta de activación de los canales CNG. La compuerta de activación de los canales activados por nucleótidos cíclicos se encuentra en el filtro de selectividad (indicado por el círculo). Los cilindros representan los segmentos transmembranales S6 y S5 de dos subunidades.

Los estudios de accesibilidad a reactivos MTS en canales Kv indican que en el segmento S6 hay una región que funciona como compuerta de activación (Figura 4) que es diferente al filtro de selectividad. Cuando se colocan cisteínas cerca de esta región que constituye la compuerta de activación del canal Kv, estas sólo pueden ser modificadas en el estado abierto y no en el estado cerrado por los agentes MTS, debido a los cambios

conformacionales que ocurren en la compuerta de activación^{64,65} que permiten o impiden el paso de los agentes MTS para modificar las cisteínas insertadas.

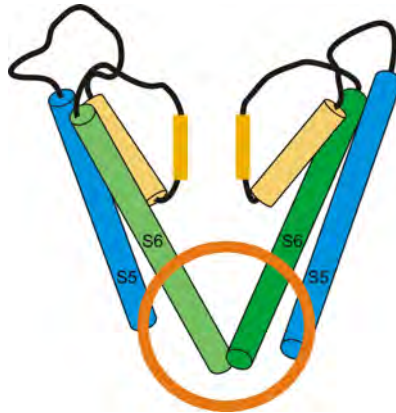


Figura 4. Localización de la compuerta de activación del canal Kv. La compuerta de activación del canal Kv se encuentra en la región intracelular del segmento transmembranal S6 (indicado por el círculo). Los cilindros representan los segmentos transmembranales S6, S5.

Una de las preguntas que nos planteamos fue la de dónde se encuentra la compuerta de activación del canal TRPV1 para lo cual decidimos utilizar el método de SCAM. A continuación se enumeran la hipótesis y objetivos del presente trabajo.

HIPÓTESIS.

La compuerta de activación del canal TRPV1 se encuentra formada por los segmentos transmembranales S6 en alguna región intracelular del canal.

OBJETIVO GENERAL.

Elucidar las características funcionales y estructurales del canal TRPV1 para determinar los dominios responsables de los cambios alostéricos que activan al canal en respuesta a sus agonistas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Explorar el efecto de agentes MTS sobre las corrientes del canal TRPV1 silvestre.
- 2) Producir un canal TRPV1 sin cisteínas.
- 3) Determinar si la modificación de las cisteínas por agentes MTS es dependiente de los estados abierto o cerrado del canal.
- 4) Caracterizar los efectos de compuestos activos del ajo y la cebolla que se sabe que modifican a otros canales TRP.
- 5) Determinar la localización exacta y las características funcionales de la compuerta de activación para este canal insertando y modificando cisteínas en la secuencia primaria del segmento S6.

METODOLOGIA.

A continuación se explican de forma breve las estrategias metodológicas que hemos utilizado para cumplir con los objetivos previamente enumerados.

Métodos electrofisiológicos.

Se examinó la actividad del canal TRPV1 usando la técnica de fijación de voltaje en microareas de membrana (“patch-clamp”) en la configuración de parche escindido. Esta técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre la punta de una pipeta de vidrio y la membrana de la célula. Al retirar la pipeta de la célula, se logra aislar el parche de la membrana del resto de la célula. La ventaja de estudiar este fenómeno en parches de membrana aislados de la célula es que se pueden separar los efectos de los químicos que usamos en nuestros protocolos experimentales de los procesos más complicados que se llevan a cabo dentro de las células. En general, se usó la configuración de “inside-out” del “patch-clamp” en donde la cara intracelular del canal se encuentra expuesta a las soluciones del baño. De esta forma, logramos controlar de forma precisa la naturaleza de las soluciones que se aplicaron a los parches de membrana. Utilizamos soluciones simétricas con una composición en (mM): 130 NaCl, 3 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetane ácido sulfónico (HEPES) y 1 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 7.2 con NaOH).

Preparamos un stock de capsaicina en etanol (4 mM) y a partir de este se realizaron diluciones para obtener la concentración deseada para los experimentos. Soluciones madre (100 mM) de MTSET y MTSEA se prepararon en agua y se congelaron a -70 °C. Las alícuotas se diluyeron en solución con 4 μM capsaicina para estudiar la modificación en estado abierto y con solución de registro en el caso del estado cerrado para obtener la concentración final de 2 mM antes de cada experimento. La alicina fue preparada a partir de un stock 10 mM el cual se mantuvo en congelación a -70 °C. Antes de cada experimento las alícuotas se diluyeron en solución registro para obtener la concentración deseada.

Las curvas dosis-respuesta se midieron a 120 mV en el estado estacionario y normalizadas con la respuesta obtenida con 4 μ M de capsaicina. La metodología para estos experimentos fue la siguiente: la capsaicina fue lavada, a continuación se aplicaron los agentes MTS en presencia o ausencia de capsaicina durante 5 min y se volvió a tomar nuevamente una curva dosis-respuesta a capsaicina. Las $K_{1/2}$ se obtuvieron a partir de los ajustes con la ecuación de Hill:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{[Capsaicina]^n}{[Capsaicina]^n + K_{1/2}^n}$$

Donde la n es el coeficiente de Hill y [Capsaicina] es la concentración del agonista. A todos los trazos se les sustrajo la corriente de fuga obtenida en ausencia del agonista.

Para determinar la probabilidad de apertura (P_o) en presencia de MTSEA, registramos corrientes macroscópicas y de canales únicos en el mismo parche de membrana a un voltaje de +100 mV. A bajas concentraciones de MTSEA, se sustrajo la corriente de fuga utilizando un trazo inicial en ausencia de ligando. Este mismo trazo se utilizó para sustraer la corriente de fuga en corrientes macroscópicas. Las aperturas del canal en ausencia de ligando se obtuvieron utilizando de 50 a 100 trazos de corriente los cuales fueron idealizados y promediados para obtener un trazo NP_o (probabilidad de apertura, P_o x el número de canales, N). El valor del estado estacionario del NP_o fue utilizado para construir la grafica de probabilidad de apertura P_o . Para determinar el valor absoluto de la P_o , se necesita el número de canales en el parche de membrana, el cual fue estimado utilizando el análisis de ruido en el estado no estacionario que se aplicó a 100 trazos de corriente en presencia de 2 mM MTSEA. Las gráficas del promedio de la varianza se ajustaron a la función:

$$\delta^2 = iI - \frac{I^2}{N}$$

Donde δ^2 es la varianza, i es la corriente de un solo canal, I es el promedio de la corriente, N es el número de canales y $P_o = NP/N$ y $P_{max} = I/iN$.

Los registros de potenciales de acción se hicieron en neuronas del DRG de ratones WT, TRPV1^{-/-} y TRPA1^{-/-} en la configuración de célula completa. Para estos experimentos la solución de la pipeta de registro tenía una composición en (mM): 140 KCl, 0.5 ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), 5 HEPES, 3 Mg-ATP y 5 de glucosa pH 7.2, la solución externa tuvo la siguiente composición en (mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ y 10 HEPES. El potencial de membrana fue monitoreado continuamente y la alicina fue aplicada directamente al medio externo.

Para los experimentos de modificación de cisteínas por Ag⁺, preparamos una solución madre de AgNO₃ (10 mM) en agua antes de cada experimento, protegiendo la solución de la luz y diluyéndola, en una solución que consiste de (en mM): 130 NaNO₃, 3 HEPES y 1 EDTA (pH 7.2 NaOH). Utilizando el programa MaxChelator (<http://maxchelator.stanford.edu>), calculamos la concentración de plata (Ag⁺) a 1 mM de EDTA para que fuera 100 nM. Medimos la corriente inicial a 120 mV obtenida con capsaicina 4 μM, después aplicamos Ag⁺ por 5 minutos en presencia de agonista cuando se modificó en estado abierto o lavamos la capsaicina para cerrar el canal y aplicar Ag⁺ por 5 min en el estado cerrado. Finalmente, medimos el efecto de la plata volviendo a aplicar capsaicina 4 μM para activar la corriente modificada por Ag⁺. La fracción de la corriente modificada, F_m , fue calculada de la siguiente manera:

$$F_m = 1 - \frac{I_{post}}{I_{pre}},$$

Donde I_{post} es la corriente obtenida después del tratamiento con Ag⁺ y I_{pre} es la corriente obtenida antes del tratamiento.

Medimos la tasa de modificación por Ag⁺ en el estado abierto aplicando un tren de pulsos de 100 ms a un voltaje de 120 mV partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV

con una frecuencia de 1 Hz en presencia de Ag^+ . Se construyeron cursos temporales en presencia (estado abierto) y en ausencia (estado cerrado) de 4 μM capsaicina, midiendo la exposición a Ag^+ a un solo tiempo, donde varios sellos se utilizaron para promediarlos y obtener la curva completa. Calculamos la tasa de modificación de segundo orden como el inverso del producto de la constante temporal obtenida de los ajustes a una exponencial y de la concentración del modificador.

En los experimentos de activación por temperatura, utilizamos una cámara de registro que controla la temperatura del medio (Bipolar Temperature Controller TC-202, Medical Systems Corp, Greenvale, NY). Utilizamos un termistor (Warner Instruments, Hamden, CT) para monitorear la temperatura del medio y llevamos acabo los experimentos midiendo la corriente inicial a 42°C. En los experimentos de estado abierto, aplicamos Ag^+ a una temperatura de 42°C por 0.5, 1, 3 y 5 min. Lavamos el exceso de Ag^+ y volvimos a medir la corriente a 42°C para evaluar el grado de modificación. Para estudiar la modificación en el estado cerrado, aplicamos Ag^+ a 20°C por 0.5, 1, 3 y 5 min., y construimos los cursos temporales a diferentes tiempos de aplicación del modificador como se explicó antes.

En experimentos en los que evaluamos la cercanía entre residuos utilizamos la fenantrolina de cobre (CuP), la cual preparamos de la siguiente forma: soluciones madre de fenantrolina 5 mM y 1.5 mM de sulfato de cobre (Cu_2SO_4), se diluyeron en etanol para obtener una concentración final de 5 μM de fenantrolina y 1.5 de Cu_2SO_4 ⁸⁰. En estos experimentos se midió la corriente inicial a 120 mV en ausencia de agonista, después se midió la corriente activada por 4 μM capsaicina, continuando con la aplicación de CuP junto con 4 μM capsaicina por 5 min (modificación en el estado abierto) o removiendo la capsaicina del medio y posteriormente aplicando CuP en ausencia de ligando durante 5 min (modificación en estado cerrado). Finalmente medimos la corriente con capsaicina. Adicionalmente revertimos la modificación de CuP con una solución de ditiotreitól 20 mM (DTT).

La tasa de modificación por MTSET, fue construida aplicando el agente en presencia (estado abierto) o en ausencia (estado cerrado) de 4 μM de capsaicina, comparando la corriente activada por capsaicina 4 μM antes y después de la aplicación de MTSET. Se

Graficó el promedio de la corriente modificada a los diferentes tiempos de exposición. En el caso de la mutante L681C, donde el MTSET potencia la corriente, utilizamos una concentración de capsaicina cercana a la $K_{1/2}$ 100 μ M.

En algunos experimentos se usó un bloqueador del poro del canal tetrabutilamonio (TBA) (Fluka, St. Louis, MO) y medimos la corriente inicial en presencia de capsaicina 4 μ M, luego aplicamos Ag^+ junto con una concentración saturante de TBA 2.5 mM⁷⁵ a varios tiempos de exposición y volvimos a medir la corriente con capsaicina.

Todos los experimentos de electrofisiología que se mencionan arriba y más adelante se llevaron a cabo usando el siguiente equipo: un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik GMBH, Pflaz, Germany), un microscopio con fluorescencia, un micromanipulador motorizado y un sistema de recambio de soluciones RSC-200 (Molecular Kinetics, pulman, WA). Los datos fueron capturados utilizando el sistema de registro de corrientes Patchmaster de Heka Instruments. Los resultados se analizaron utilizando el programa IgorPro (Wavemetrics. Inc., Lake Oswego, OR).

Cultivo celular.

Se usaron células de mamífero HEK 293 transfectadas transitoriamente con lipofectamina con 2 plásmidos: uno de los cuales contiene el ADN que codifica ya sea para el canal TRPV1 silvestre de rata (WT) o alguna mutante y el otro ADN que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) pIRES-GFP (BD biosciences., San Jose, Ca). La ventaja de transfectar con GFP es que aquellas células que presenten fluorescencia normalmente también expresan al canal TRPV1 y así la presencia de fluorescencia permite la identificación de aquellas células que fueron exitosamente transfectadas.

Para llevar a cabo los experimentos donde utilizamos células del ganglio de la raíz dorsal (DRG) utilizamos ratones WT y knock-out (KO) para los canales TRPV1 (TRPV1^{-/-}) y TRPA1 (TRPA1^{-/-}). Los ratones fueron anestesiados con éter y posteriormente sacrificados por decapitación. Para obtener las células, se realizó la disección de los ganglios de la raíz

dorsal utilizando técnicas quirúrgicas convencionales. Una vez terminada la disección, los ganglios se depositaron en solución de disociación compuesta por colagenasa 1.25 mg/ml y tripsina 1.25 mg/ml (Sigma-Aldrich), en medio de cultivo sin suero. El tubo con los ganglios se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5 % y aire 95 % durante 30 minutos, después de los cuales se reemplazó el medio de cultivo con enzimas, por medio de cultivo completo. A continuación, las células se disociaron mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur pulida a fuego. El producto de este procedimiento se centrifugó durante dos minutos y posteriormente se lavó con medio de cultivo completo; esta operación se efectuó tres veces. Luego del último lavado se retiró el exceso de sobrenadante, y la suspensión celular se depositó en una caja para cultivo (Corning) con placas de vidrio de 12 x 10 mm (Corning) previamente cubiertas con poli-D-lisina (Sigma Aldrich). Las células se incubaron durante 4 a 6 horas en medio de cultivo completo.

Biología molecular.

Los experimentos de mutagénesis se llevaron a cabo usando la metodología descrita en^{34,81}. En general, esta consiste en identificar la región de interés y diseñar oligonucleótidos para introducir las mutaciones correspondientes, así como un sitio de restricción nuevo y específico en la secuencia de ADN nativa. Como primer paso utilizamos el ADN del canal nativo para introducir, por medio de la amplificación con una reacción en cadena de polimerasa (PCR) y de los oligonucleótidos diseñados, la mutación y el sitio de restricción que nos interesan. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda reacción de PCR usando otro par de oligonucleótidos para producir varias copias (amplificación) de esta secuencia de ADN en donde ya había sido insertada la mutación de interés junto con la introducción del nuevo sitio de restricción para identificar esa secuencia de ADN modificada una vez que había sido introducida en un vector para expresión en células de mamífero (pcDNA3) por medio de una reacción de ligación. Una vez que se llevó a cabo la reacción de ligación, se transformaron bacterias competentes por medio de choque por calor y se crecieron cultivos de las mismas. Después de extraer el ADN de estos cultivos, se procedió a hacer una reacción de diagnóstico en donde inicialmente se verificó que la mutación se insertó usando la enzima de restricción cuyo sitio de reconocimiento se había insertado recientemente en la

secuencia. Los tamaños de los productos de corte de ADN esperados se calcularon haciendo uso del programa Vector NTI, que también es utilizado para diseñar los oligonucleótidos. Una vez que el ADN había sido cortado en presencia de esta enzima de restricción, fue posible definir si la mutación fue insertada corriendo el ADN en un gel de agarosa y comparando los pesos de las bandas con un marcador de pesos conocido. Finalmente, la presencia de la mutación insertada se confirmó con la secuenciación del ADN.

Este ADN fue utilizado para después transfectar células HEK293 y estudiar los efectos de la mutación por medio de las técnicas electrofisiológicas antes descritas.

Ensayos de comportamiento.

Los ensayos para evaluar la respuesta dolorosa ante alicina, se hicieron inyectando en las patas delanteras de los ratones alicina. En estos experimentos los ratones se aclimatizaron durante 30 min antes de los experimentos y luego, se inyectaron 10 μ l intraplantares ya sea de solución salina (0.9% NaCl) o alicina 2 μ M usando una jeringa 30G y se cuantificó el tiempo acumulativo que los animales pasaron lamiéndose la pata inyectada durante 30 min. Estos ensayos se realizaron en ratones de la cepa C57BL/6J, TRPV1^{-/-} (B6;129XI-TRPV1^{tm1jul}/J), TRPA1^{-/-} y TRPA1^{-/-} (B6;129XI-TRPV1^{tm1jul}/J) provenientes de laboratorios Jackson.

Análisis de periodicidad.

Evaluamos la periodicidad del segmento S6 utilizando la tasa de modificación por Ag²⁺ de cada uno de los residuos mutados y realizamos el análisis utilizando una transformada discreta de Fourier⁸²⁻⁸⁴. Asumimos que r_k es la tasa de modificación del residuo k -th y \hat{r} es el promedio de r , el espectro de poder $P(\varphi)$ para cada uno de los $n-1$ residuos está dado por:

$$A(\varphi) = \sum_{k=0}^{n-1} (r_k - \bar{r}) \cos(k2\pi \varphi / 360)$$

$$B(\varphi) = \sum_{k=0}^{n-1} (r_k - \bar{r}) \sin(k2\pi \varphi / 360)$$

$$P(\varphi) = [A(\varphi)]^2 + [B(\varphi)]^2$$

y donde φ es el ángulo en grados, que se forma entre un par de aminoácidos. Para una α -hélice típica, se espera que el valor $P(\varphi)$ sea máximo a 100° , y es de 3.6 aminoácidos por vuelta de una α -hélice. El índice de la α -helicidad del segmento se obtiene calculando el índice de periodicidad (α -PI), el cual está definido por⁸²:

$$\alpha PI = \frac{\left[\frac{1}{30^\circ} \right] \int_{90^\circ}^{120^\circ} P(\varphi) d\varphi}{\left[\frac{1}{180^\circ} \right] \int_{0^\circ}^{180^\circ} P(\varphi) d\varphi}$$

y un valor mayor a 2 indica que es una α -helice anfipática.

Modelo de homología.

La secuencia del segmento S5-P-asa-S6 (residuos 612-683), del canal TRPV1 fue enviada al BioinfoBank MetaServer con el fin de obtener una estructura modelo y obtener *de novo* un modelo molecular de esta región. Este sitio web busca estructuras terciarias que sean análogas. La estructura que resultó ser mas parecida con una calificación de 10.00 fue la del canal de mamífero Kv1.2 (PDB entry: 2a79, www.pdb.org). Como primer paso utilizamos la estructura del cristal del canal Kv1.2, junto con las predicciones de la estructura secundaria del poro del canal TRPV1 para obtener una optimización del modelo utilizando un método de múltiples arreglos (SOPMA)⁸⁵ y para modelar el poro del canal TRPV1 utilizamos el programa QUANTA (Accelrys Inc. San Diego, CA). El modelo final fue energéticamente minimizado con limitantes armónicas en el esqueleto de la proteína (100

kcal mol⁻¹) con el fin de obtener la diferencia mínima de energía de 0.01 kcal mol⁻¹ para obtener un modelo de conformación de baja energía. Además se realizaron simulaciones de dinámicas moleculares utilizando el programa HyperChem 7.1 (Hypercube, Inc., Gainesville, FL) con el fin de alinear los residuos correctamente de acuerdo a los datos funcionales. Como último paso las imágenes en tercera dimensión del modelo del poro del canal TRPV1 se generaron con el programa Pymol ⁸⁶.

Análisis estadístico.

Los datos están presentados como el promedio \pm error estándar. Utilizamos la prueba t-student y los datos con un valor de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS.

La sección de resultados está dividida en dos partes, la primera se refiere a los resultados obtenidos estudiando la acción de la alicina sobre el canal TRPV1, datos que pertenecen a un artículo publicado en la revista *Nature Neuroscience*⁸⁷ y que cumplen con los objetivos particulares 1-4. En la segunda parte se describen los experimentos que se realizaron para dilucidar la localización de la compuerta de activación del canal TRPV1 que forma parte de un trabajo que fue publicado en la revista *Nature Structure and Molecular Biology*⁵⁶ y que cumplen con los objetivos particulares de esta tesis.

Los agentes MTS activan al canal en ausencia de la capsaicina promoviendo un cambio en la probabilidad de apertura del canal TRPV1.

Utilizando parches escindidos en la configuración de inside-out en células HEK 293 transfectadas con el canal TRPV1, estudiamos si los agentes MTS tenían efectos sobre la activación del canal silvestre (WT) y si estos efectos eran dependientes del estado cerrado o abierto del canal. De esta manera, se aplicó 2 mM MTSEA en estado cerrado, es decir, en ausencia de cualquier agonista. Al utilizar un protocolo de pulsos de voltaje que va desde -100 mV a +100 mV partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV observamos que este agente es capaz de promover la activación de corrientes a los diferentes voltajes estudiados (Figura 5 A). La activación puede ser revertida al aplicar un agente reductor como el DTT que rompe los puentes disulfuro que se forman entre los compuestos MTS y las cisteínas (Figura 5 B). La activación ocurre con una constante de tiempo de 13.1 ± 2 s (N = 3) (Figura 5 C). Además, al graficar las curvas dosis-respuesta a capsaicina después de la aplicación de MTSEA observamos que la curva se desplaza a la izquierda ($K_{1/2} = 124 \pm 25$ nM, $n = 1 \pm 0.8$ para la curva inicial en respuesta a capsaicina y de 4 ± 1 nM, $n = 0.7 \pm 0.04$ para la curva después del tratamiento con MTSEA; N = 5) (Figura 5 D). Cuando utilizamos otro agente MTS de distinto tamaño como es el MTSET, la $K_{1/2}$ a capsaicina disminuyó de 158 ± 38 nM con una $n = 1.2 \pm 0.1$ en la curva control a 8 ± 3 nM con una $n = 0.9 \pm 0.2$ para la curva obtenida después de la aplicación de MTSET (N = 4), (Figura 5 E). Una posible explicación de estos resultados sería que la modificación de una o varias

cisteínas por distintos agentes MTS vuelve al canal TRPV1 mucho más sensible a la capsaicina.

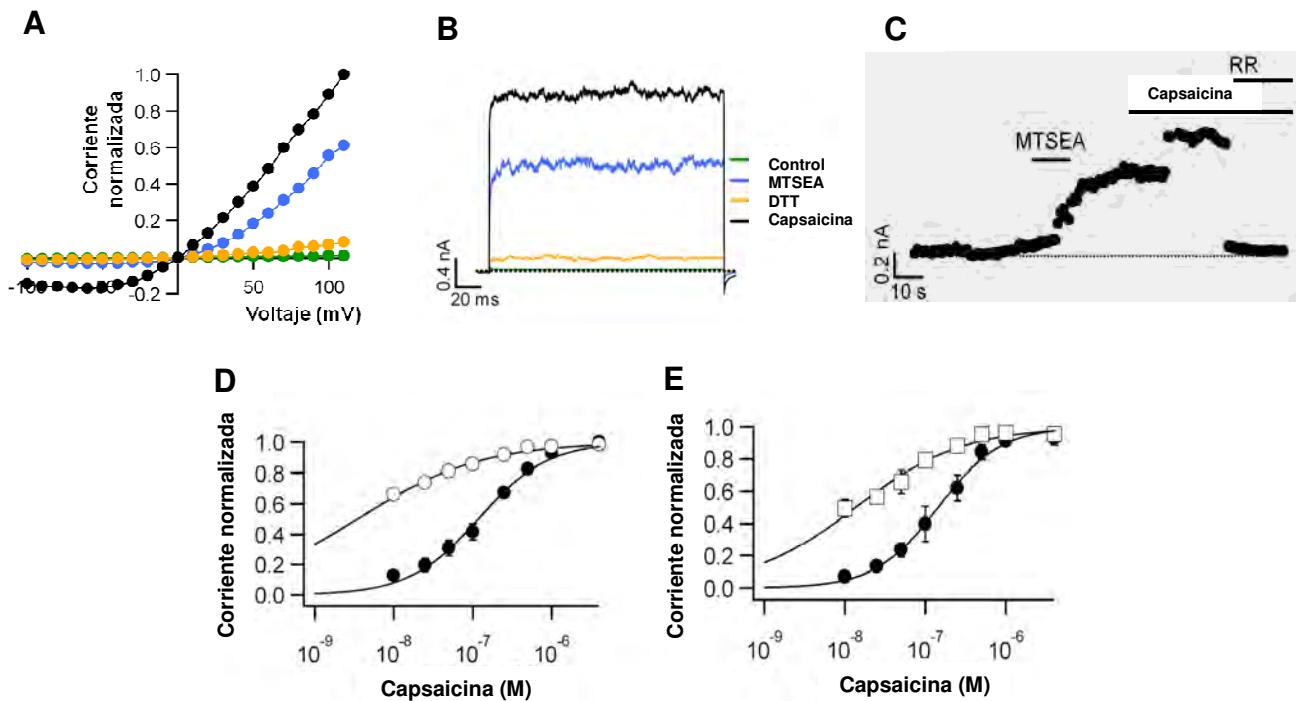


Figura 5. Los agentes que modifican cisteínas actúan como activadores del canal TRPV1. El MTSEA promueve la activación de TRPV1 en células HEK (A y B). (A) los símbolos verdes muestran las corrientes en ausencia de cualquier ligando. El agente MTSEA activa por si solo las corrientes del canal TRPV1 (trazo azul) y el efecto del MTSEA puede ser revertido por el uso del DTT 10 mM (trazo amarillo). Al aplicar capsaicina, la corriente se puede volver a activar (trazo negro). (B) Trazos representativos obtenidos a +100 mV en condiciones control (verde) y después de la aplicación de MTSEA (azul). La aplicación de DTT revierte el efecto del MTSEA (trazo amarillo) y la capsaicina induce la activación de corrientes después de todos estos tratamientos (trazo negro). (C) Curso temporal de la activación del canal TRPV1 por MTSEA. Las barras indican el tiempo de aplicación de MTSEA, capsaicina y rojo de rutenio 10 μ M (RR), un bloqueador inespecífico de los canales TRP. Los pulsos de voltaje van de 0 a +100 mV a una frecuencia de estimulación de 1 Hz. Diez segundos después de la aplicación de MTSEA se observa un aumento de la corriente equivalente al 60-70% con respecto a la corriente que se obtiene con capsaicina. El RR bloquea al canal. (D y E) Curvas dosis-respuesta a capsaicina antes (símbolos oscuros) y después de la aplicación de MTSEA (D) y MTSET (E) respectivamente. La aplicación de estos agentes a los parches de membrana que expresan al TRPV1 induce corrimientos a la izquierda de la curva dosis-respuesta (símbolos blancos). Las líneas indican el ajuste de la ecuación de Hill. Los valores de la $K_{1/2}$ antes de la aplicación de MTSEA (D) y MTSET (E) son estadísticamente diferentes a los obtenidos después de la aplicación de estos agentes (t-student, $p < 0.002$). Los valores de los coeficientes de Hill antes y después de la aplicación de MTS no presentaron diferencias.

Dado que la aplicación de estos agentes es suficiente para generar un incremento en la corriente, estudiamos en detalle el mecanismo por medio del cual los agentes MTS inducen sus efectos sobre el canal TRPV1. Para esto se aplicó MTSEA en ausencia de ligando y se registraron las corrientes con un pulso de voltaje a +100 mV. Como se muestra en la Figura 6 A, el voltaje sólo es capaz de activar a uno o dos canales. Al aplicar MTSEA a este mismo parche, se observó la activación de corrientes macroscópicas (Figura 6 B). Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos sugieren que la probabilidad de apertura del canal TRPV1 aumenta al aplicar el MTSEA en el estado cerrado convirtiéndose en corriente macroscópica y acercándose al valor de corriente que se obtiene con 4 μ M de capsaicina (Figura 6 A y B). Posteriormente medimos la probabilidad de apertura (P_o), en ausencia de capsaicina y después de la aplicación de MTSEA con el ensamble promedio de 60 trazos a +100 mV. El número de canales, N , se estimó con la fórmula $I=piN$, donde I es la corriente macroscópica activada por la capsaicina, $i=10.5$ pA y $P=0.92$ que es la (P_o) a 4 μ M capsaicina. i y p se obtuvieron de registros de canal único. Al graficar el cambio en la probabilidad de apertura (P_o), observamos que el MTSEA promueve un aumento en este parámetro llegando a valores cercanos a 0.9 (Figura 6 C). Estos resultados nos indican que la modificación por cisteínas es suficiente para producir la activación del canal TRPV1.

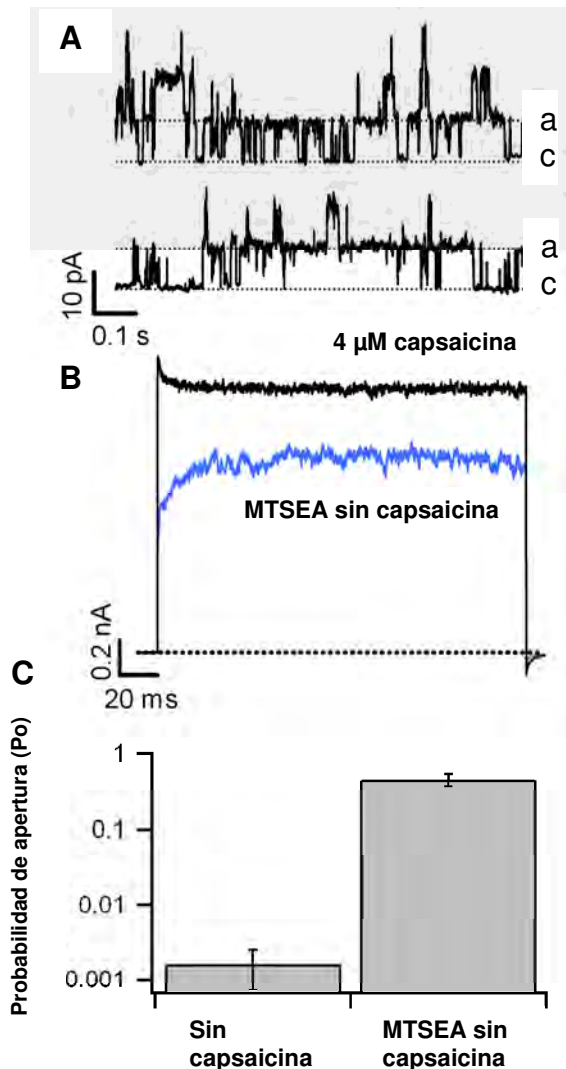


Figura 6. Registros de canal único en un parche de membrana de célula HEK293 transfectada con TRPV1. (A) (a) y (c) representan los estados abierto y cerrado del canal en ausencia de ligando. (B) Corrientes macroscópicas obtenidas en el mismo parche que en (A) después de la aplicación de MTSEA (trazo azul) y de una concentración saturante de capsaicina (trazo negro). La conductancia unitaria no se afecta antes y después de MTSEA (12.3 ± 5 pS y 14.1 ± 3 pS; $n=3$) (C) El MTSEA induce un aumento en la probabilidad de apertura del canal en ausencia de la capsaicina; es decir, funciona como un agonista del canal. $P_o = 0.0016 \pm 0.0009$ y 0.45 ± 0.08 , antes y después del MTSEA ($n=5$). Los trazos se obtuvieron a +100 mV.

Los resultados obtenidos hasta ese momento indicaban que el canal TRPV1 podía ser activado por compuestos que modifican cisteínas. Con el fin de encontrar un correlato fisiológico de estos efectos y dilucidar el mecanismo de acción de estos agentes que modifican cisteínas, decidimos realizar una búsqueda bibliográfica para ver qué canales TRP eran activados por sustancias orgánicas que modificaran cisteínas. De forma interesante, encontramos que se habían realizado estudios en los que se demostraba que ciertos compuestos como la alicina que se encuentra en el ajo y en la cebolla actúan modificando cisteínas y que activaban al canal TRPA1 que se encuentran en la misma subpoblación de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) donde se encuentra el canal TRPV1.

Sin embargo, dado que había poca información con respecto a la activación de estos canales por estos compuestos, existía controversia en cuanto a si ambos canales eran responsables de la respuesta de las neuronas de DRG a la alicina. Por un lado, existe un estudio en el que se describe la activación del TRPV1 por alicina en un sistema de expresión heterólogo^{33,88} y, por el otro lado, un trabajo describe que sólo el TRPA1 se activa por este compuesto⁸⁹.

Dada esta controversia, decidimos estudiar el efecto de los extractos de ajo y cebolla para comprobar si efectivamente activaban al TRPV1 y para dilucidar el mecanismo por medio del cual esto ocurría.

Los experimentos que se realizaron consistieron en el registro de corrientes de células HEK 293 transfectadas con el canal TRPV1 WT, con varias mutantes y con neuronas DRG de ratones WT y de ratones “knock out” (KO) para los canales TRPV1 (TRPV1^{-/-}) y TRPA1 (TRPA1^{-/-}). Los resultados de estos experimentos se mencionan a continuación.

Los canales TRPA1 y TRPV1 pueden ser activados por alicina.

Con el fin de estudiar si los compuestos que se encuentran en el ajo y la cebolla pueden activar el canal TRPV1, utilizamos la técnica de fijación de voltaje en parches escindidos en la configuración de “inside-out” de neuronas de DRG de ratones C57BL/6, las cuales expresan normalmente a los canales TRPV1 y TRPA1. Se aplicó capsaicina 4µM con el fin de mostrar la presencia del canal TRPV1 en estas células. Después de cambiar el medio de la cámara de registro para retirar el efecto de la capsaicina aplicamos extractos de ajo o cebolla, y observamos que estos producían un aumento en la corriente, finalizando con la aplicación de capsaicina en presencia de RR para bloquear las corrientes. Estos resultados indican que los compuestos que se encuentran en los extractos de ajo y cebolla activan corrientes en las neuronas de DRG (Figura 7 A, B). A continuación, estudiamos el efecto del principal compuesto pungente que se encuentra en los extractos de ajo y cebolla, la alicina. Al aplicar alicina observamos que se genera una corriente similar a la que se

obtiene con los extractos de ajo y cebolla, el efecto de la alicina puede ser revertido aplicando DTT, lo cual nos indica que reacciona con alguna de las cisteínas del canal (Figura 7 C).

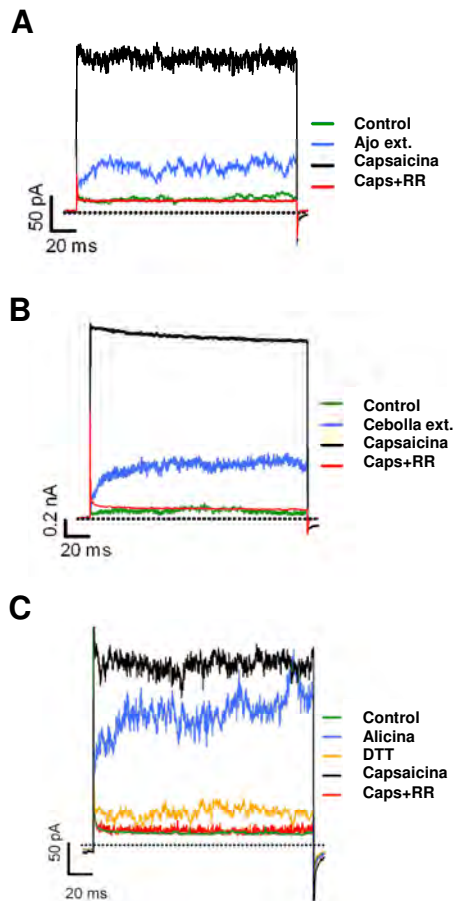


Figura 7. Los extractos de ajo y cebolla promueven la activación de corrientes en neuronas de DRG. (A y B) Las corrientes iniciales se muestran en verde, las corrientes activadas por los extractos se muestran en azul y las corrientes activadas por capsaicina se muestran en negro. El RR 10 μ M bloquea las corrientes activadas por capsaicina (trazo rojo). (C) La aplicación de alicina, uno de los compuestos activos de los extractos de cebolla y ajo, activa corrientes en las neuronas de DRG. La aplicación de 10 mM DTT, un agente reductor, revierte el efecto de la alicina (trazo amarillo) (N = 7).

Las neuronas de DRG pueden expresar tanto canales TRPV1 como canales TRPA1, de tal modo que la respuesta a compuestos pungentes puede deberse a la activación de cualquiera de estos dos canales. Para determinar si el canal TRPV1 puede ser activado por los extractos de ajo, cebolla y por la alicina, examinamos la respuesta del canal TRPV1 expresado en células HEK 293. Cuando se aplicaron estos agentes a parches escindidos en la configuración de “inside-out”, se observó una activación del canal similar a la que observamos en neuronas de DRG. Así, concluimos que el canal TRPV1 puede ser activado

por compuestos que se encuentran en los extractos de ajo y cebolla así como por alicina (Figura 8 A-C).

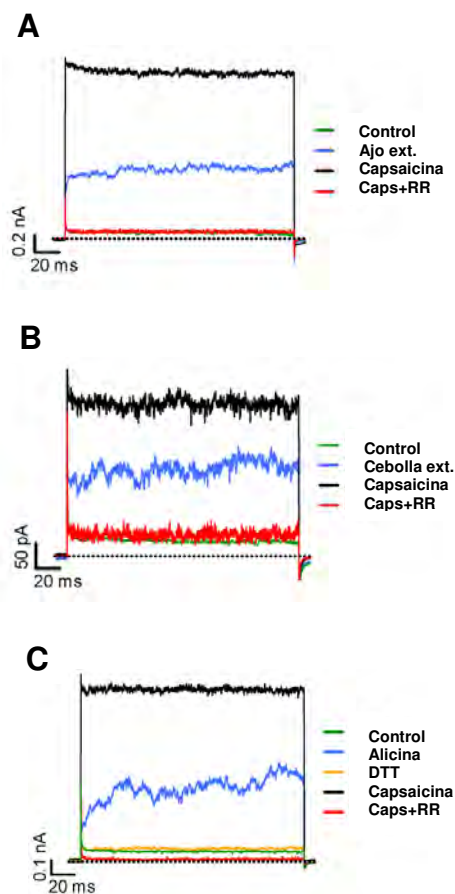


Figura 8. Trazos de corrientes obtenidas en células HEK 293 a las cuales se les transfectó con el canal TRPV1. La aplicación de extractos de ajo y cebolla induce la activación de corrientes (A y B, trazos azules). (C) La alicina también induce la activación de corrientes (trazo azul) y la activación por alicina puede ser revertida con 10 mM DTT (trazo amarillo) (N = 7).

Al estudiar la curva dosis-respuesta a capsaicina antes y después de la aplicación de alicina 200 μM se observó que la alicina modificó la $K_{1/2}$ y el coeficiente de Hill a capsaicina ($141 \pm 39 \text{ nM}$, $n = 1.2 \pm 0.3$ a $24 \pm 14 \text{ nM}$, $n = 0.76 \pm 0.04$, antes y después de alicina; N = 5) (Figura 9 A). Estos resultados sugieren que la alicina aparentemente vuelve al canal TRPV1 mucho más sensible a la capsaicina. A continuación, estudiamos la respuesta del canal TRPV1 ante distintas concentraciones de alicina. Al construir una curva dosis-respuesta a alicina en ausencia de capsaicina, obtuvimos que el ajuste de la curva a la ecuación de Hill da como resultado una $K_{1/2} = 139 \pm 6.7 \mu\text{M}$, $n = 1.6 \pm 0.5$ (N = 5) (Figura 9 B).

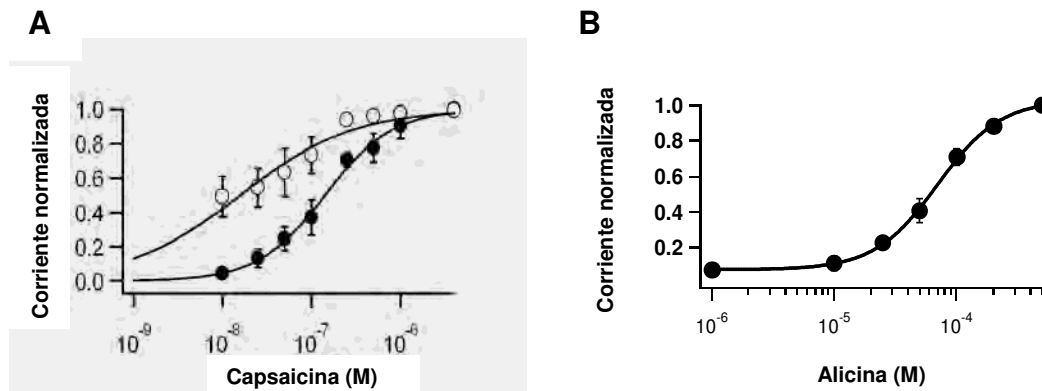


Figura 9. Curva dosis-respuesta obtenida de parches de membrana de células HEK293 transfectadas con el TRPV1. (A) Los símbolos negros representan la curva dosis-respuesta a capsaicina y los símbolos blancos representan la curva dosis-respuesta a capsaicina después de la aplicación de alicina. Los trazos se obtuvieron a +100 mV. Las líneas continuas representan ajustes a la ecuación de Hill. (B) Curva dosis-respuesta a alicina los trazos se obtuvieron a +100 mV.

Localización de los residuos que interactúan con los agentes modificadores de cisteínas.

Dado que el canal TRPV1 contiene 15 cisteínas en su cara intracelular y 3 en su cara extracelular, decidimos probar en dónde se localizan la(s) cisteína(s) modificada(s) por los distintos agentes antes mencionados. Para responder esta pregunta, utilizamos pipetas de registro llenas de una solución de cisteína 20 mM con el objetivo de secuestrar el MTSEA que pudiese permear, ya sea desde el lado intra o extracelular. El MTSEA siempre se aplicó en el baño. El primer experimento se realizó en la configuración de “inside-out” (Figura 10 A) donde las cisteínas de la cara intracelular quedaron expuestas al agente MTS y las cisteínas de la cara extracelular quedaron expuestas al quelante del MTS. Se observó un aumento de la corriente en presencia de MTSEA. El segundo experimento se realizó en la configuración de outside-out. En este caso la cara externa del canal quedó expuesta al baño y la cara interna a la solución de la pipeta con cisteína (Figura 10 B). En este caso no observamos modificación al exponer la cara externa del canal al MTSEA. Estos datos nos indican que la cisteína que se está modificando se encuentra en la cara interna del canal.

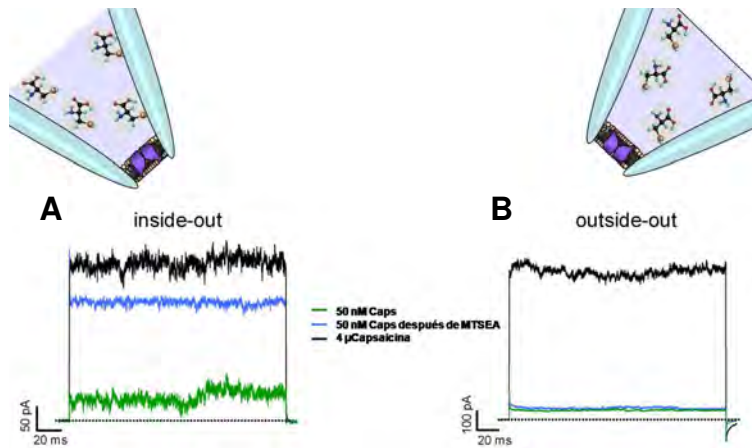


Figura 10. La cisteína responsable de la activación del TRPV1 por MTS se encuentra en el lado intracelular del canal. (A) En los parches “inside-out” donde la cisteína libre se encontraba bañando el lado extracelular del canal, el MTSEA aplicado al lado intracelular del canal promovió la activación del canal. (B) En los parches “outside-out” donde la cisteína se encontraba bañando el lado intracelular del canal, el MTSEA aplicado al lado extracelular no produjo cambios en la corriente. Los trazos se obtuvieron a +100 mV.

Durante el primer semestre del doctorado logramos terminar el canal TRPV1 funcional sin cisteínas que fue utilizado como herramienta para determinar la localización de la compuerta de activación del canal. Este canal sin cisteínas también fue utilizado para llevar a cabo experimentos dirigidos a determinar la región responsable de la activación del canal por agentes que modifican cisteínas. Primero determinamos que en el canal sin cisteínas (18^c TRPV1) que es funcional y sensible a la capsaicina, la alicina era incapaz de producir la activación de corrientes (Figura 11 A). La curva dosis-respuesta a capsaicina después de la aplicación de alicina no presentó cambios con respecto a la curva control ($K_{1/2} = 106 \pm 17$, $n = 1.2 \pm 0.1$ y 129 ± 16 nM, $n = 1.2 \pm 0.1$ antes y después de la aplicación de alicina, $N = 5$ Figura 11 B).

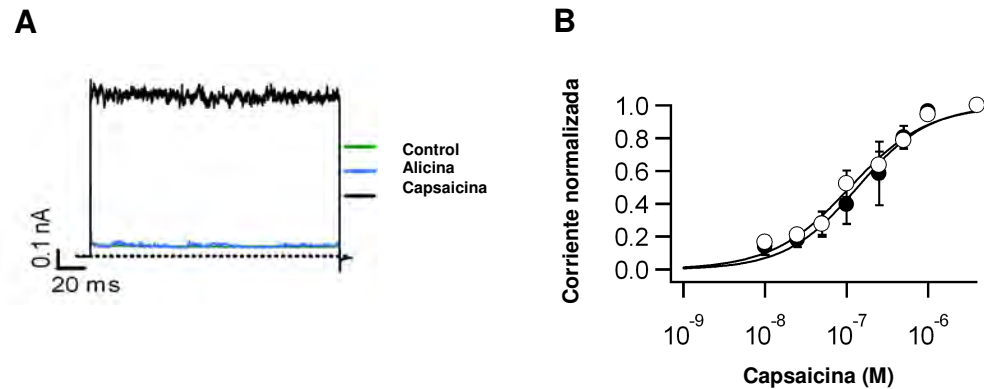


Figura 11. La sustitución de todas las cisteínas del canal TRPV1 da como resultado un canal funcional pero que no responde a la alicina. (A) Se muestran trazos de corriente obtenidos a +100 mV bajo las distintas condiciones. (B) Se muestra la curva dosis-respuesta para capsaicina antes (puntos negros) y después de la aplicación de alicina (puntos blancos). Las líneas continuas son ajustes a la ecuación de Hill. No se observaron cambios en la $K_{1/2}$ ni en el coeficiente de Hill después de la aplicación de alicina.

Encontramos un solo aminoácido responsable de la activación por los agentes modificadores de cisteínas. Como se muestra en la Figura 12 A, la sustitución de sólo la cisteína 157 en el segmento amino terminal por alanina (TRPV1-C157A) vuelve al canal insensible a la alicina. Al construir, la curva dosis-respuesta a capsaicina antes (símbolos negros) y después de la aplicación de alicina (símbolos blancos), se observó que el canal ya no se modifica por alicina ($K_{1/2} = 118 \pm 24$ nM, $n = 1.4 \pm 0.2$ y $K_{1/2} = 133 \pm 32$ nM, $n = 1.1 \pm 0.04$ antes y después de la aplicación de alicina; $N = 5$ Figura 12 B). Estos resultados demuestran que el residuo C157 es necesario para la activación del TRPV1 por alicina.

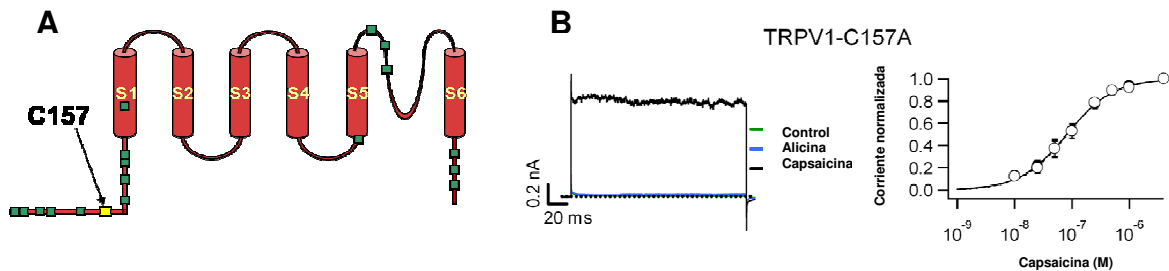


Figura 12 La cisteína C157 es necesaria para la activación del TRPV1 por la alicina. (A) La cisteína 157 se encuentra en el segmento amino terminal de canal TRPV1. (B) La mutación C157A promueve que el canal TRPV1 ya no responda a la alicina. En el panel izquierdo se muestran trazos de corriente obtenidos a +100 mV bajo las distintas

condiciones indicadas y en la columna de la derecha se muestran curvas dosis-respuesta para capsaicina antes (símbolos negros) y después de la aplicación de alicina (símbolos blancos). Las líneas continuas son ajustes a la ecuación de Hill.

A continuación decidimos examinar si la cisteína 157 es suficiente para promover una activación por los compuestos que modifican cisteínas por lo que la reinsertamos en el canal 18⁻TRPV1. Los canales 18⁻TRPV1-A157C responden a la capsaicina de forma similar a los canales silvestres ($K_{1/2} = 106 \pm 17$ nM, $n = 1.2 \pm 0.1$ para el canal 18⁻ TRPV1 y $K_{1/2} = 128 \pm 37$ nM, $n = 1.2 \pm 0.1$ para el canal 18⁻ TRPV1-A157C, N =5 Figura 13 B). Estos canales también responden a la alicina (trazo azul) y su activación por este compuesto se puede revertir al aplicar 10 mM DTT (trazo amarillo) (Figura 13 A). La reinsertión de esta cisteína en el fondo 18⁻ TRPV1, produjo una reducción de la $K_{1/2}$ para la curva dosis-respuesta a capsaicina después de la aplicación de alicina (10 ± 2 nM, con una $n = 0.9 \pm 0.05$, N = 5 Figura 13 B). Estos datos indican que la cisteína 157 es suficiente para promover los efectos de la alicina.

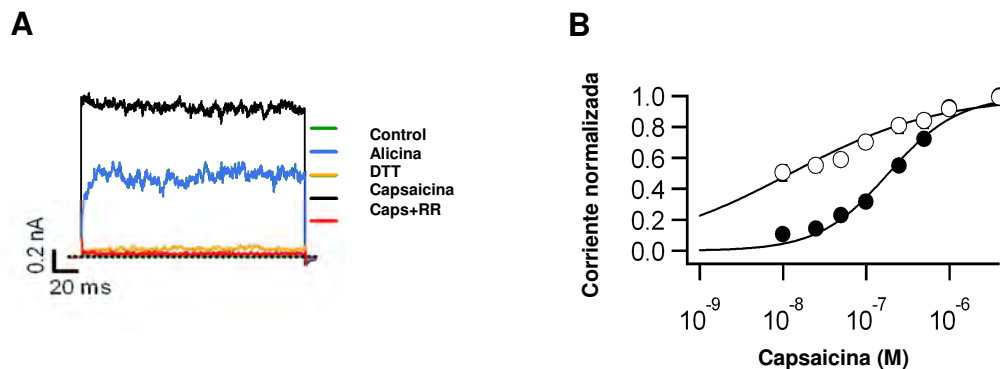


Figura 13. La reinsertión de C157 en el canal TRPV1 sin cisteínas recupera la sensibilidad del canal a la alicina. (A) Trazos de corriente obtenidos a +100 mV bajo las distintas condiciones. (B) Curva dosis-respuesta para capsaicina antes (símbolos negros) y después de la aplicación de alicina (símbolos blancos). Las líneas continuas son ajustes a la ecuación de Hill.

Finalmente, al utilizar los extractos de ajo y cebolla vimos que los efectos se pueden explicar por el mismo mecanismo que ya se ha mencionado; los extractos también promueven la activación del canal por medio de un mecanismo de interacción con la cisteína 157 (trazos azules) y estos efectos pueden ser revertidos aplicando DTT (trazos amarillos) (Figura 14).

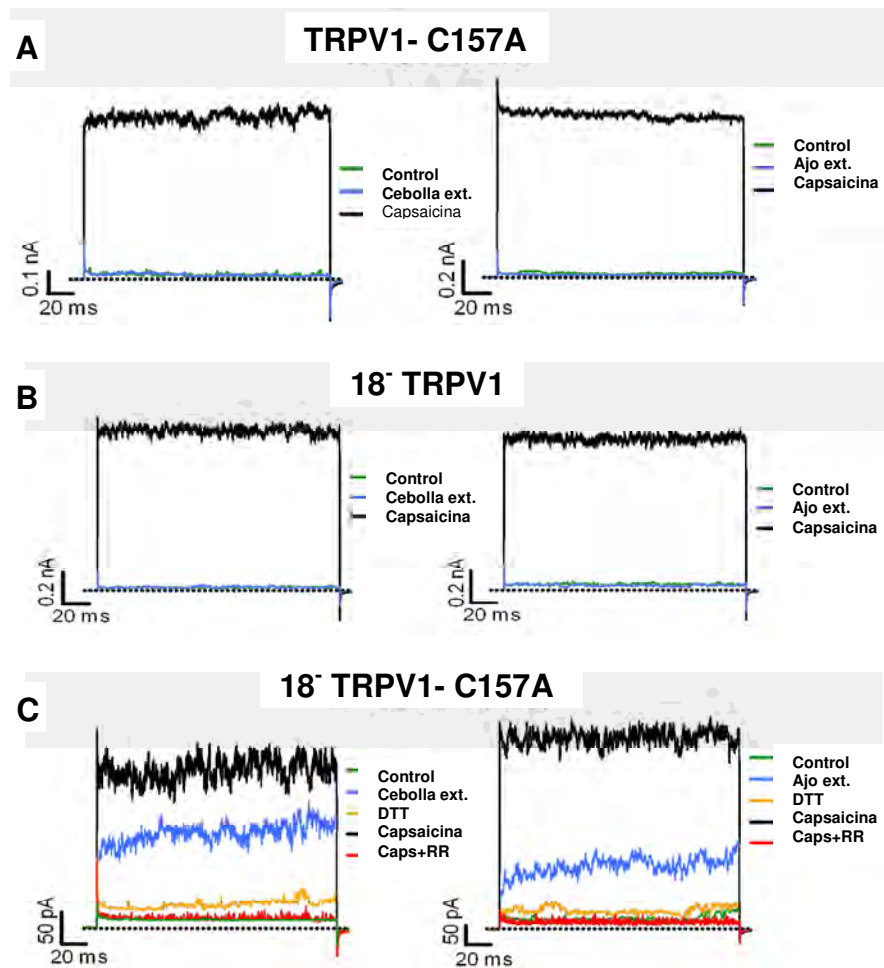


Figura 14. La cisteína C157 también es responsable de la activación del TRPV1 por los extractos de ajo y cebolla. (A) El canal sin cisteínas no responde a los extractos de cebolla y ajo. (B) La sustitución de C157 por otro aminoácido en un fondo en el cual el resto de las cisteínas se encuentran intactas, produce canales insensibles a la alicina (C) La reinscripción de C157 en el canal sin cisteínas da como resultado canales que recuperan su sensibilidad a la alicina. Los trazos de corriente obtenidos a +100 mV. Los trazos verdes representan los trazos en ausencia de cualquier agonista o modificador de cisteínas, los trazos azules representan la respuesta a los extractos de cebolla o de ajo, los trazos negros representan la respuesta a capsaicina, los trazos amarillos representan la reversión del efecto de los extractos por 10 mM DTT y los trazos rojos representan el bloqueo de las corrientes activadas con capsaicina en presencia de 10 μ M RR.

Efectos fisiológicos de la alicina en el modelo *in vivo*.

Con el fin de comprobar que el efecto de la alicina tuviese un correlato fisiológico, realizamos registros en la configuración de célula completa en neuronas de DRG de ratones

WT y de ratones KO para los canales TRPV1 (TRPV1^{-/-}) y TRPA1 (TRPA1^{-/-}). En ausencia de la alicina, las neuronas permanecieron en reposo a potenciales alrededor de -40 mV sin disparar potenciales de acción (paneles izquierdos de la Figura 15 A-C). La aplicación de alicina 400 μ M a las neuronas de ratones WT y de ratones KO produjo una despolarización de 7 a 20 mV lo cual provocó que se presentaran disparos de PA (paneles derechos de la Figura 15 A-C). Estos datos indican que la alicina activa a las neuronas WT así como a las neuronas de ratones KO TRPV1 y TRPA1. Por lo tanto, ambos canales participan en la respuesta a alicina. Como era de esperarse, la alicina también activó corrientes en los ratones WT y en los ratones KO TRPV1 y TRPA1 (Figura 15 D, E).

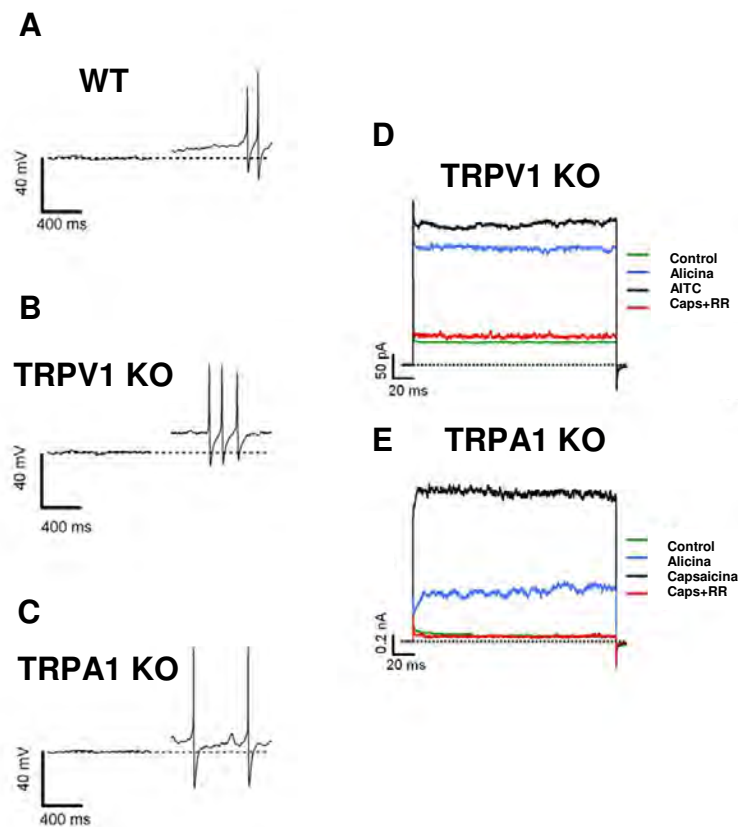


Figura 15. Potenciales de acción obtenidos de neuronas DRG WT(A), KO TRPV1 (B) y KO TRPA1 (C). Los trazos de la izquierda representan el PM antes de la aplicación de alicina, en la derecha se muestran PA después de la aplicación de alicina. La línea punteada indica el PM al inicio del experimento, N = 7. (D y E) Trazos representativos de corrientes activadas por alicina en parches de membrana de neuronas de DRG del KO TRPV1 y TRPA1, (N = 10).

Para obtener otro correlato fisiológico en el sistema *in vivo*, realizamos ensayos de comportamiento para determinar si la alicina producía dolor en los ratones WT y mutantes. Los ensayos de comportamiento consistieron en inyectar solución salina como control y solución con alicina 2 μg en el cojinete de la pata delantera de los ratones WT, TRPV1^{-/-} y TRPA1^{-/-}. Después de la inyección, se midió el tiempo acumulativo durante el cual los ratones se lamieron la pata inyectada durante un periodo de 30 minutos. Cuando se les inyectó alicina, los tres grupos mostraron un incremento en el tiempo que permanecían lamiendo la pata afectada. Este incremento fue estadísticamente significativo con respecto a la solución salina (Figura 16). Estos resultados nos indican que la alicina es capaz de inducir una respuesta dolorosa mediada por ambos canales: el TRPV1 y el TRPA1

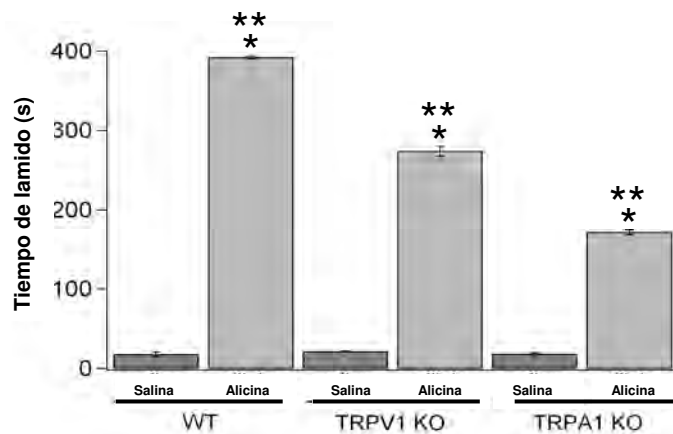


Figura 16. El tiempo que pasan lamiéndose la pata los animales después de la inyección de alicina es evidencia de un comportamiento relacionado con la respuesta a dolor. Todos los animales respondieron con una mayor duración del tiempo que pasaron lamiéndose la pata después de la aplicación de alicina (N = 7). El símbolo * denota una diferencia significativa con una $p < 0.01$ entre la solución salina y la alicina en cada tipo de animal, el símbolo ** denota diferencias significativas en la respuesta a alicina entre cada tipo animal.

DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA APERTURA DEL CANAL TRPV1.

A pesar de la relevancia fisiológica que tienen el canal TRPV1 y los miembros de la familia TRP, se tiene muy poca información sobre la estructura de estos canales^{36-38,46,90}. Realizando alineaciones de secuencia con otros canales iónicos de los cuales se conoce su estructura, podemos sugerir que el canal TRPV1 comparte la misma topología general de los canales Kv, puesto que cada subunidad está formada por seis segmentos transmembranales (S1-S6), regiones N- y C-terminales intracelulares y un asa entre los segmentos S5 y S6 que forma el poro del canal. A pesar de esto, la localización de la compuerta de activación y la topología del poro del canal TRPV1 y de cualquier otro miembro de la familia TRP permanecen desconocidas. Debido a esto decidimos estudiar los determinantes moleculares que subyacen a la localización de la compuerta de activación del canal TRPV1 y estudiar la topología general del poro.

Efecto de la modificación de las cisteínas insertadas en el segmento S6.

En el trabajo de Jara-Oseguera *et al*⁷⁴, utilizando bloqueadores de diferentes tamaños se sugiere la existencia de una compuerta de activación en el lado intracelular del canal TRPV1, similar a la que se ha observado en canales Kv. Para estudiar la arquitectura de la compuerta del canal TRPV1, utilizamos la técnica de modificación de cisteínas o SCAM, la cual consiste en sustituir los aminoácidos de la secuencia del segmento S6 por cisteínas y aplicar agentes que modifican cisteínas como el MTSET, MTSEA y Ag⁺, en el estado abierto o cerrado del canal en la configuración de “inside-out”. La idea que subyace a estos experimentos es que si observamos una modificación dependiente del estado en el que se aplicó el agente en alguna de las mutantes, esto nos indicaría que en esta posición existe una oclusión que impide el paso de estos agentes y que es accesible a estos químicos cuando sufre el cambio conformacional correspondiente a la apertura del canal.

El canal mutante TRPV1-C157A se utilizó como fondo para insertar cisteínas a lo largo del S6 ya que esta mutante presenta niveles adecuados de expresión y no se ve modificada por agentes como el MTSEA⁸⁷, el MTSET o Ag⁺ (Tabla 1). Además esta mutante presenta las

mismas propiedades biofísicas que el canal WT como la dependencia de voltaje⁸⁷ y la respuesta a capsaicina (Figura 19).

Utilizando parches escindidos de membrana de células HEK293 que expresan al canal TRPV1-C157A, aplicamos MTSET y MTSEA 2 mM a la cara interna de los canales y observamos que las curvas dosis-respuesta no se modifican en comparación con la curva dosis-respuesta inicial a capsaicina. Este resultado es el mismo cuando los agentes MTS son aplicados tanto en estado cerrado como abierto (Figura 17 A y B). Esto demuestra que el canal TRPV1-C157A no se modifica al aplicar diferentes agentes que modifican cisteínas por lo que es un buen fondo para insertar cisteínas a lo largo del segmento S6. Las $K_{1/2}$ y los coeficientes de Hill están resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Las $K_{1/2}$ y los coeficientes de Hill obtenidos con la ecuación de Hill de las curvas dosis-respuesta en el canal TRPV1-C157A.

	Estado abierto				Estado cerrado			
	$K_{1/2}$ (nM)		Coeficiente de Hill (n)		$K_{1/2}$ (nM)		Coeficiente de Hill (n)	
C157A	Capsaicina	MTS	Capsaicina	MTS	Capsaicina	MTS	Capsaicina	MTS
MTSET	106 ± 28	106 ± 20	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	124 ± 21	125 ± 28	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.09
MTSEA	116 ± 27	134 ± 37	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	134 ± 10	109 ± 9	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1

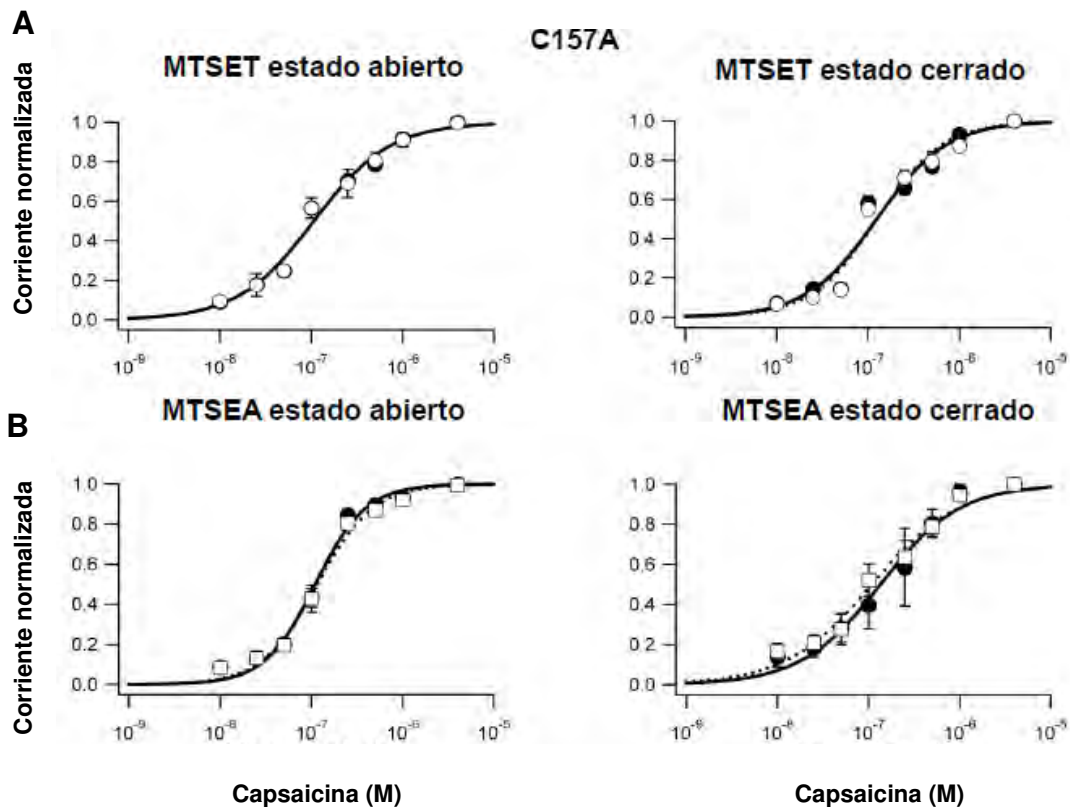


Figura 17. Los agentes MTSET y MTSEA no modifican la actividad del canal TRPV1-C157A. (A y B) Curvas dosis-respuesta a capsaicina antes (círculos cerrados) y después de la aplicación de MTSET (círculos abiertos) y MTSEA (cuadros abiertos) en el estado abierto en el panel de la izquierda y cerrado en el panel derecho. La aplicación de estos agentes no produce cambios en la curva dosis-respuesta en comparación a las curvas obtenidas antes de la aplicación de estos agentes (t-student, $p > 0.2$) ($N = 6$). Las líneas son el ajuste a la ecuación de Hill antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con los agentes MTS.

Haciendo uso de análisis de hidrofobicidad⁸² y nuestros propios alineamientos de secuencias con canales Kv, pudimos determinar la región que forma al segmento transmembranal S6 del canal TRPV1, que en varios canales constituye la compuerta de activación. Esta región S6 en los canales TRPV1 está conformada por los aminoácidos D654 al G683 (Figura 18).



Figura 18. Secuencia del segmento S6 del canal TRPV1. La barra indica la región del segmento S6 en donde los aminoácidos se mutaron individualmente por cisteínas. Abajo se muestra una caricatura de una de las subunidades del canal TRPV1, las cajas verdes indican la posición de 17 de las 18 cisteínas del canal WT y en amarillo el residuo C157.

Como se puede ver, el canal TRPV1 no presenta cisteínas nativas en esta región de su secuencia. Así, los aminoácidos de la mutante TRPV1-C157A del segmento S6 se sustituyeron por cisteínas que no se encontraban ahí inicialmente. Todos los canales mutantes resultaron funcionales, con curvas dosis-respuesta a capsaicina que no difirieron substancialmente a la del canal WT-TRPV1 (Figura 19). Esto nos permitió llevar a cabo los experimentos de accesibilidad a agentes que modifican cisteínas que se describen a continuación.

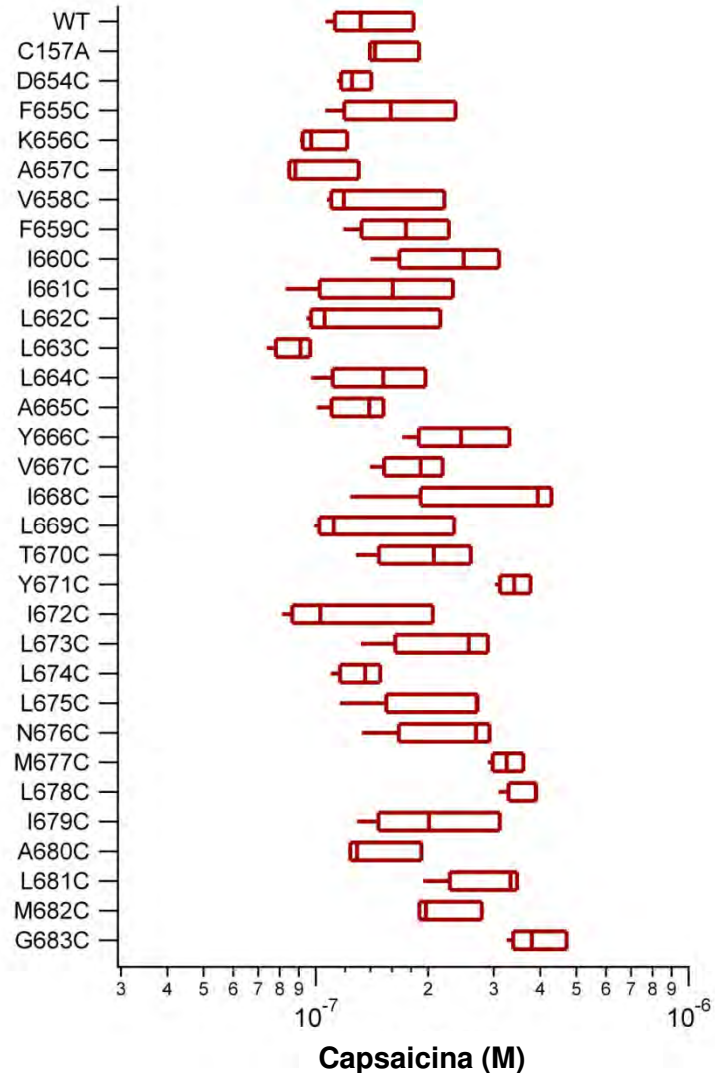


Figura 19. Respuesta de los canales mutantes a capsaicina. Diagramas de cajas para la $K_{1/2}$ de cada una de las mutantes del segmento S6 así como la mutante C157A y el WT. Para cada caja la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil. Las constantes de modificación se obtuvieron de ajustes con la ecuación de Hill a las curvas dosis-respuesta ($N = 6$) para cada mutante.

Los experimentos realizados consistieron en comparar la modificación de las cisteínas por compuestos MTS en el estado abierto y cerrado, estos agentes se aplican en la cara intracelular de los parches de membrana de células HEK 293 transfectadas con cada mutante del S6.

Efecto de los agentes MTSET y MTSEA en la parte más intracelular del segmento S6.

Construimos curvas dosis-respuesta a capsaicina antes y después de la aplicación de MTSET 2 mM en estado abierto y cerrado durante 5 minutos, en las mutantes de la posición G683C a la L681C. El efecto que se produce en la mutante G683C es una disminución de corriente, mientras que notablemente, en la mutante M682C se da una potenciación de la corriente, posiblemente por que se favorece energéticamente la transición al estado abierto (Figura 20 A y B). La modificación por MTSET para ambas mutantes G683C y M682C es independiente del estado del canal en el que se aplicó, lo cual nos indica que no hay ningún cambio en la accesibilidad del MTSET durante la apertura del canal en esta región del S6. Las $K_{1/2}$ y los coeficientes de Hill están resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Las $K_{1/2}$ y los coeficientes de Hill obtenidos con la ecuación de Hill de las curvas dosis-respuesta para las mutantes G683C, M682C y L681C.

Mutante	Estado abierto				Estado cerrado			
	$K_{1/2}$ (nM)		Coeficiente de Hill (n)		$K_{1/2}$ (nM)		Coeficiente de Hill (n)	
	Capsaicina	MTSET	Capsaicina	MTSET	Capsaicina	MTSET	Capsaicina	MTSET
G683C	397 ± 55		1.6 ± 0.3		397 ± 8		1.1 ± 0.1	
M682C	218 ± 24	2 ± 37	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.04	199 ± 52	11 ± 7	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2
L681C	295 ± 18	98 ± 9	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.4	347 ± 34	405 ± 74	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.1

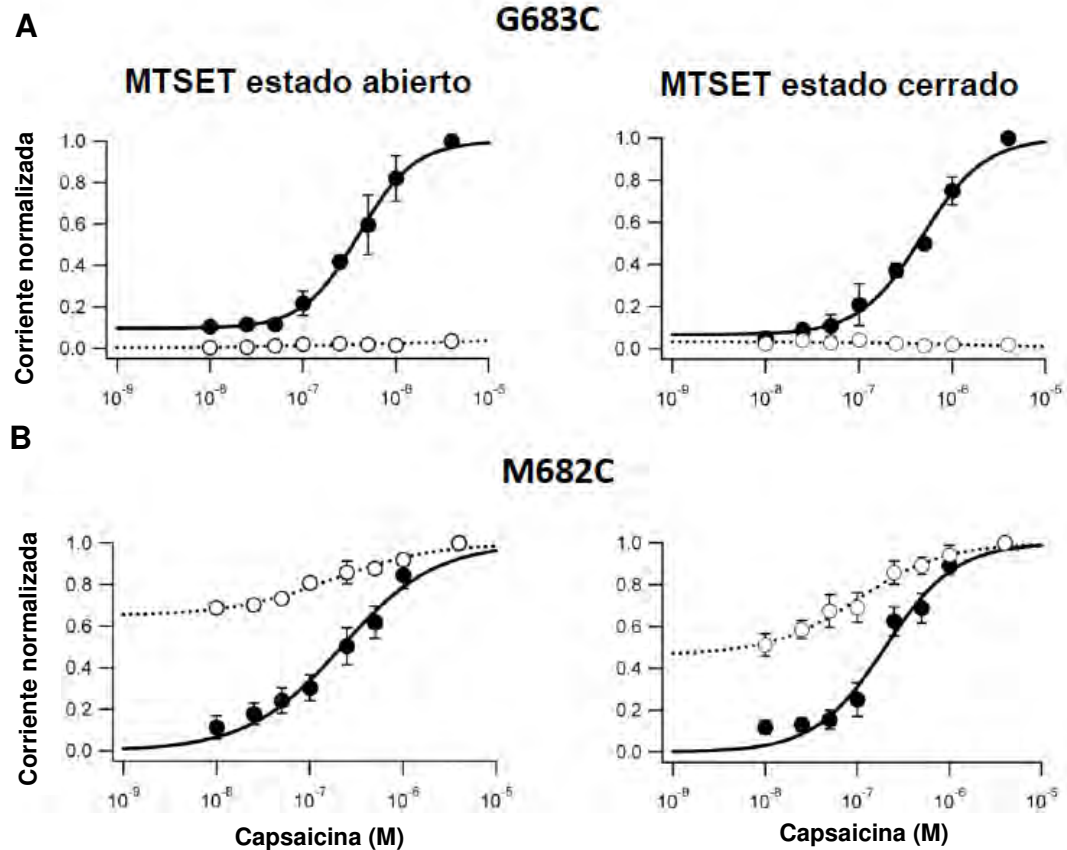


Figura 20. El MTSET modifica la actividad de las mutantes G683C y M682C. Curvas dosis-respuesta a capsaicina antes (círculos negros) y después de la aplicación de MTSET 2 mM (círculos blancos) en estado abierto (panel izquierdo) y en el cerrado (panel derecho). Las líneas son el ajuste a la ecuación de Hill antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con MTSET. (A) Efecto del MTSET sobre la mutante G683C. La modificación es independiente del estado en el que se aplicó este agente provocando una disminución de la corriente a todas las concentraciones de capsaicina (N = 6). (B) En la mutante M682C, la aplicación de este agente potencia la corriente de manera independiente del estado en el que se aplique el MTSET, corriendo la curva dosis-respuesta a la izquierda (N = 6).

La siguiente mutante del S6 que estudiamos, L681C, tiene un efecto interesante. Al aplicar MTSET en estado abierto se produce un aumento en la corriente. En contraste, al aplicar este agente en estado cerrado, no se observa ningún cambio en la curva dosis-respuesta a capsaicina (Figura 21 A). Este efecto dependiente del estado en el que se aplicó el MTSET sugiere que la accesibilidad al residuo L681C por el MTSET está limitada por una

constricción del poro en el estado cerrado del canal. Las $K_{1/2}$ y los coeficientes de Hill están resumidos en la Tabla 2.

Para validar esta hipótesis realizamos el mismo experimento pero con MTSEA el cual tiene un diámetro de 3.6 Å, más pequeño que el MTSET que presenta un diámetro de 5.8 Å, obteniendo como resultado la potenciación de la corriente independientemente del estado en el que se aplicó el MTSEA (Figura 21 B). Estos datos sugieren que el acceso al residuo L681 es restringido a cationes del tamaño del MTSET pero no al de moléculas del tamaño del MTSEA, señalando la presencia de una constricción intracelular que controla el acceso a cationes de tamaño grande como el MTSET y que está localizada en una región cercana al residuo L681.

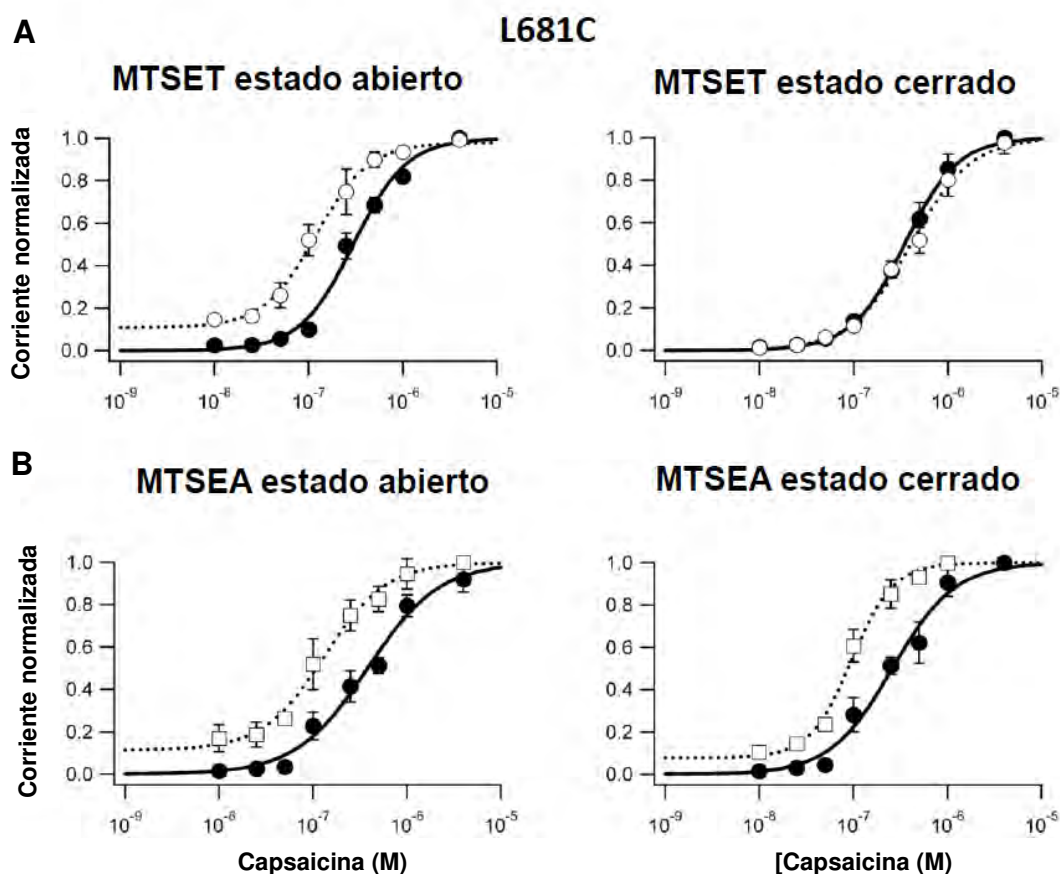


Figura 21. El MTSET y MTSEA modifican la actividad de la mutante L681C. (A) Curvas dosis-respuesta a capsaicina antes (círculos negros) y después de la aplicación de MTSET 2 mM (círculos blancos). El MTSET aplicado en el estado abierto (panel

izquierdo) provocó un desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta a capsaicina, contrario a lo que se observó en estado cerrado (panel derecho) donde no hay cambios en la curva dosis-respuesta a capsaicina. (B) Curvas dosis-respuesta a capsaicina antes (círculos blancos) y después de MTSEA (cuadrados blancos) en el estado abierto y cerrado no son estadísticamente diferentes (t-student, $p > 0.1$). En el estado abierto los valores de la $K_{1/2}$ fueron 356 ± 48 nM, con una $n = 1 \pm 0.01$ y 131 ± 16 nM, con una $n = 1.2 \pm 0.1$ antes y después de la aplicación de MTSEA, los valores de la $K_{1/2}$ en el estado cerrado fueron de 259 ± 87 nM, con una $n = 1.4 \pm 0.2$ y 98 ± 4 nM, con una $n = 1.8 \pm 0.02$, antes y después de la aplicación de MTSEA; $N = 6$). Las líneas son el ajuste a la ecuación de Hill antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con los MTS.

Hasta este momento habíamos encontrado una primera compuerta en la posición L681 para moléculas mayores a 5.8 Å como el MTSET pero no para moléculas como el MTSEA de (3.8 Å). El MTSEA es una molécula grande en comparación con iones como el Na^+ (0.97 Å), Ca^{2+} (0.94 Å) o incluso el K^+ (1.33 Å) que fluyen a través del poro del canal⁹¹. Por esta razón el MTSEA no constituye un agente apropiado para localizar la compuerta que controla el flujo de los iones. Un agente que modifica cisteínas y que tiene un tamaño cercano al de los iones que pasan por el poro del canal como el Na^+ y el K^+ es la Ag^+ (1.26 Å). Además, se ha demostrado su eficiencia al utilizarla en estudios de accesibilidad de iones en canales de potasio Kv^{65} y activados por nucleótidos cíclicos⁹².

Accesibilidad de la plata a través del poro del canal TRPV1.

Para confirmar que la Ag^+ es un buen candidato para realizar estos experimentos nos aseguramos de que ésta no tuviera ningún efecto sobre la actividad de nuestro fondo TRPV1-C157A ni en el estado abierto ni en el cerrado del canal. La Figura 22 A muestra que la Ag^+ no tiene ninguna acción sobre la mutante TRPV1-C157A en ningún estado.

Posteriormente, se realizaron los experimentos con Ag^+ para cada una de las 30 mutantes del segmento S6, aplicando 100 nM de Ag^+ durante 5 minutos en estado abierto o cerrado del canal en la configuración de “inside-out”. La Figura 22 A muestra el efecto de la aplicación de Ag^+ en las diferentes mutantes en donde se graficó la fracción de la corriente modificada por Ag^+ ($1 - [I_{\text{post}}/I_{\text{pre}}]$) (donde I_{pre} es la amplitud de la corriente antes de la aplicación de Ag^+ , I_{post} es la amplitud de corriente después de la aplicación de Ag^+) en los diferentes estados.

La modificación de la mutante L681C por Ag^+ es independiente del estado en el que se aplica. De igual forma, las nueve mutantes restantes de las posiciones A680C a la I672C tampoco muestran diferencias en la modificación por Ag^+ (Figura 22 A).

A partir de la región en donde se localiza el aminoácido Y671C la modificación por Ag^+ es dependiente del estado en el que se aplicó para todas las mutantes, desde esta posición hasta la posición D654 (Figura 22 A). En el estado abierto la fracción de corriente modificada es mayor a la que se observa en el estado cerrado, esto demuestra que estos residuos se encuentran accesibles en el estado abierto y menos accesibles en el estado cerrado del canal lo que nos lleva a inferir que en esa posición hay un estrechamiento, que impide el flujo de los iones cuando el canal está cerrado y que en esta región es en la cual se encuentra la compuerta de activación del canal TRPV1.

Los datos de la Figura 22 A se obtuvieron midiendo el grado de modificación después de 5 min de aplicación de Ag^+ . Cabe la posibilidad de que el grado de modificación pueda ser mal interpretado o sub-estimado ya que solo lo medimos a este tiempo. Para aclarar este punto decidimos medir las tasas de modificación obtenidas a partir de los cursos temporales de la modificación por Ag^+ en estado abierto y cerrado del canal en mutantes clave (Figura 22 B-D). La Figura 22 muestra el resumen de estos resultados. La mutante Y671C siguió exhibiendo una modificación dependiente del estado (Figura 22 C y Figura 23), así como los residuos que se encuentran arriba de la posición Y671C como I668C (Figura 22 B y Figura 23). Por el contrario, los residuos que se encuentran debajo de la posición Y671C como L673C y L675C se siguieron modificando independientemente del estado en el que se aplicó la Ag^+ (Figura 22 D y Figura 23).

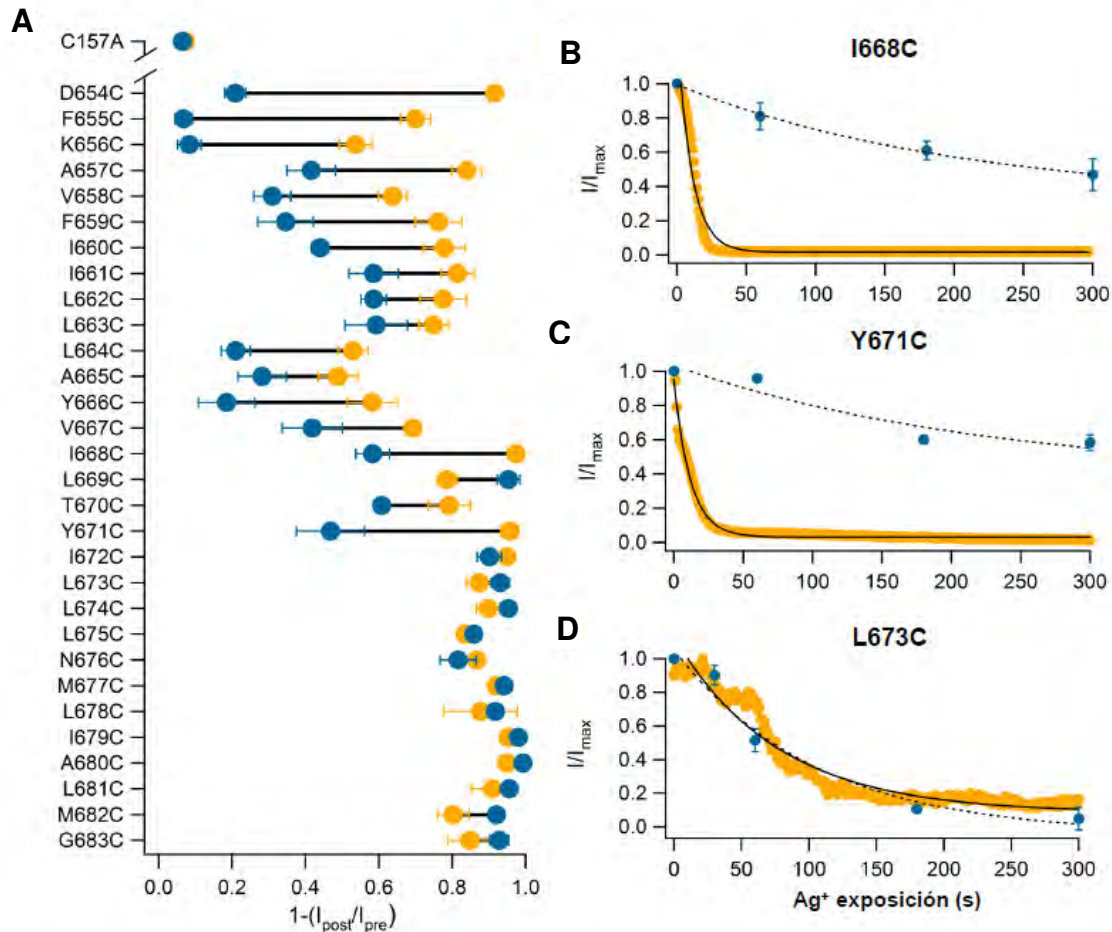


Figura 22. La modificación por plata revela la presencia de una compuerta intracelular para iones del tamaño de la Ag^+ en la posición Y671. (A) Fracción de corriente modificada por Ag^+ 100 nM, para cada una de las 30 mutantes del segmento S6, en presencia (círculos naranjas) y en ausencia (círculos azules) de 4 μM capsaicina ($N = 6$). Las líneas negras sirven como guía para ver la diferencia entre los dos estados. (B-D) Cursos temporales de la modificación por Ag^+ de I668C (B), L671C (C), I673C (D). La modificación en el estado abierto se muestra en (círculos naranja) y en el estado cerrado (círculos azules), las líneas son el ajuste a una función exponencial antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con Ag^+ . En el estado abierto se muestran resultados de un experimento y en el caso del estado cerrado es el promedio \pm el error estándar ($N = 6-8$) para cada tiempo de exposición a Ag^+ . La tasa de modificación de segundo orden en el estado abierto (k_A) está expresada como el promedio \pm error estándar, $N = 6$. La tasa de modificación de segundo orden para el estado cerrado (k_C) es el resultado de un ajuste con una función exponencial (líneas punteadas). (B) I668C muestra una modificación dependiente del estado con una $k_A = 8.6 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una $k_C = 0.13 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (C) La modificación de Y671C es dependiente del estado con una $k_A = 13.8 \pm 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una $k_C = 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. (D) L673C presenta una modificación independiente del estado con una $k_A = 0.86 \pm 0.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una $k_C = 1.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

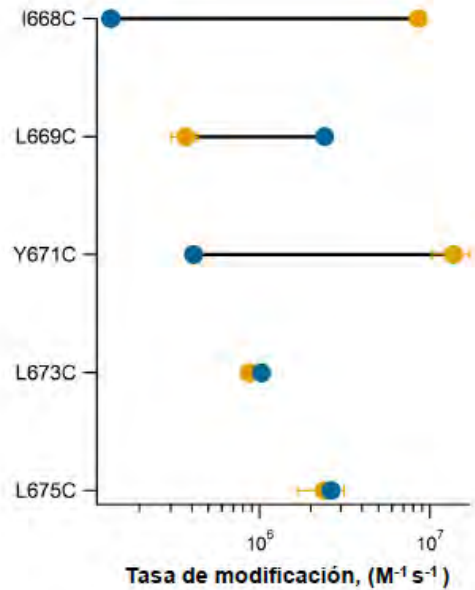


Figura 23. Modificación de las mutantes del segmento S6 por agentes Ag^+ . Tasa de modificación para el estado abierto (círculos naranjas) y estado cerrado (círculos azules) para mutantes claves del segmento S6. Las tasas de modificación de segundo orden del estado abierto (k_A) que se muestran en la figura son el promedio del ajuste exponencial al curso temporal para cada mutante. Las tasas de modificación de segundo orden para el estado cerrado (k_C) son el ajuste de una función exponencial al curso temporal obtenido con puntos individuales para cada tiempo, con una ($N = 3$) para cada punto. I668C muestra una modificación dependiente del estado con una $k_A = 8.5 \pm 0.8 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y una $k_C = 0.1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$. La modificación de la mutante Y671C es dependiente del estado con una $k_A = 13.7 \pm 3.4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y una $k_C = 0.4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$. La modificación de L669C también es dependiente del estado pero a diferencia de las demás, la modificación en el estado cerrado es mucho más rápida que en el estado abierto ($k_A = 0.37 \pm 0.06 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y una $k_C = 2.4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$). La modificación para L673C y L675C es independiente del estado con una $k_A = 0.86 \pm 0.08 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y una $k_C = 1.02 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $k_A = 2.4 \pm 0.73 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y una $k_C = 2.6 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente.

Una vez que identificamos las dos posibles compuertas la primera en la posición L681 para moléculas grandes y la segunda en la posición Y671 que controla el paso de moléculas pequeñas, decidimos investigar si se podrían formar puentes disulfuro entre los residuos de cada una de las cuatro subunidades en donde se encuentran las dos compuertas, utilizando la fenantrolina de cobre (CuP). La particularidad de la formación de estos puentes disulfuro es que sólo ocurren cuando las cisteínas se encuentran en proximidad espacial (a menos de 4 \AA), esto nos indicaría que en el estado cerrado los aminoácidos de cada una de las

subunidades en estas dos posiciones están lo suficientemente cercanos para poder interactuar entre ellos mismos.

Utilizamos el canal sin cisteínas 18^{TRPV1}, ya que este canal no presenta modificación al ser expuesto a CuP en estado abierto y cerrado (Figura 24 A y B). Utilizando el canal 18^{TRPV1} como fondo construimos dos mutantes sustituyendo los aminoácidos en las posiciones L681 y Y671 por cisteínas. Después aplicamos 50 μ M CuP durante 5 min en estado abierto y cerrado, tiempo suficiente para formar puentes disulfuro entre las cisteínas, después de lavar la CuP medimos la corriente a 4 μ M capsaicina.

Al aplicar CuP en estado abierto, la mutante 18^{TRPV1-L681C} no presentó cambios significativos en la corriente obtenida a 4 μ M capsaicina. En contraste, observamos una pequeña reducción en la corriente de la mutante 18^{TRPV1-Y671C} que resultó ser significativa con respecto a la mutante 18^{TRPV1} (Figura 24 A). Al aplicar CuP en el estado cerrado ambas mutantes presentaron cambios significativos en la corriente obtenida a 4 μ M capsaicina. Después de la aplicación de CuP en el estado cerrado la corriente disminuyó un 97 % en el caso de la mutante 18^{TRPV1-L681C} y 87 % en la mutante 18^{TRPV1-Y671C} (Figura 24 B). Esta reducción en la corriente no puede ser revertida con el lavado de CuP, pero se recupera parcialmente al tratar los parches de membrana con 20 mM de DTT, recuperándose un $52 \pm 10\%$ y $50 \pm 4\%$ de la corriente en la mutante 18^{TRPV1-L681C} y 18^{TRPV1-Y671C}, respectivamente.

Estos experimentos demuestran que los aminoácidos de las cuatro subunidades en las posiciones L681C y Y671C en el estado abierto se encuentran a una distancia mayor a 4 Å ya que no vemos ningún cambio en la función de canal, sin embargo observamos una modificación en el estado cerrado indicando que los aminoácidos de las cuatro subunidades en ambas posiciones se encuentran por lo menos a 4 Å de distancia, sugiriendo que estas regiones sufren cambios conformacionales al pasar del estado abierto al cerrado que las acercan entre ellas.

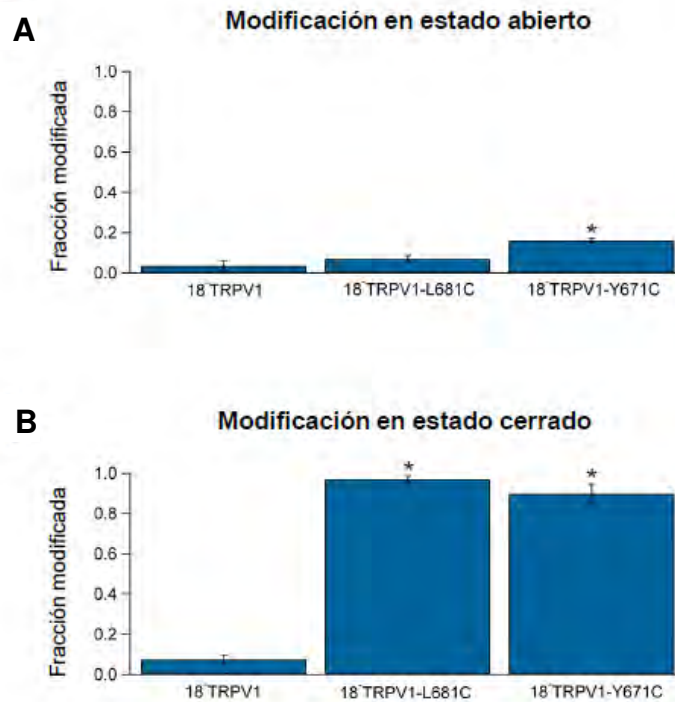


Figura 24 Puentes disulfuro pueden formarse en el estado cerrado del canal en las mutantes 18⁻ TRPV1-L681C y 18⁻ TRPV1-Y671C. (A) Las barras representan la fracción de corriente modificada por CuP aplicada con 4 μ M capsaicina en estado abierto. No hay diferencias significativas entre 18⁻ TRPV1 (0.035 ± 0.025) y 18⁻ TRPV1-L681C (0.069 ± 0.016) después del tratamiento con CuP (t-tudent, $p > 0.1$), lo cual indica que no hay formación de puentes disulfuro. En el caso de la mutante 18⁻ TRPV1-Y671C (0.16 ± 0.009) si existe una diferencia pequeña pero significativa (t-student, $p < 0.005$) comparada con 18⁻ TRPV1, sugiriendo que existe un cierto grado de formación de puentes disulfuro. (B) Las corrientes de ambas mutantes 18⁻ TRPV1-L681C y 18⁻ TRPV1-Y671C se modifican después de de la aplicación de CuP en estado cerrado (0.97 ± 0.01) y (0.89 ± 0.05) resultando significativos respecto a la mutante 18⁻ TRPV1 (0.075 ± 0.02) (t-student, $p < 0.001$). Esto indica que en el estado cerrado las cisteínas de las cuatro subunidades en las posiciones 681 y 671 se encuentran muy cerca y por eso se pueden formar los puentes disulfuro.

La diferencia entre los efectos que observamos al aplicar CuP entre el estado abierto y cerrado apoya la hipótesis de que las regiones L681 y Y671 están formando oclusiones que impiden el flujo de los iones a través del poro.

Por lo tanto si el residuo L681 sirve como compuerta para moléculas grandes como el MTSET, resulta interesante que la CuP, que es una molécula grande, pueda alcanzar el

residuo Y671C y formar puentes disulfuro. La habilidad de la CuP de formar puentes disulfuro en esta posición se debe a que es una molécula hidrofóbica con una área polar de 2.7 \AA^2 y una área apolar de 311.9 \AA^2 . Debido a estas características la CuP podría alcanzar este residuo a través de otras vías que no sean el poro, por ejemplo la membrana plasmática o regiones hidrofóbicas de la proteína, mientras que el MTSET solo puede acceder a través del poro.

Si el acceso del MTSET hacia las cisteínas del S6 está regulado por una compuerta en la posición L681, la modificación de las cisteínas después de esta posición deberá ser dependiente del estado en el que se aplique. Este supuesto concuerda con nuestros datos. En la Figura 25 se muestra que la modificación después de L681 en estado abierto es mucho más rápida que en estado cerrado y las tasas de modificación por debajo de este residuo, por ejemplo en G683C, en estado abierto y cerrado no difieren, lo cual concuerda con la presencia de una oclusión en la posición L681.

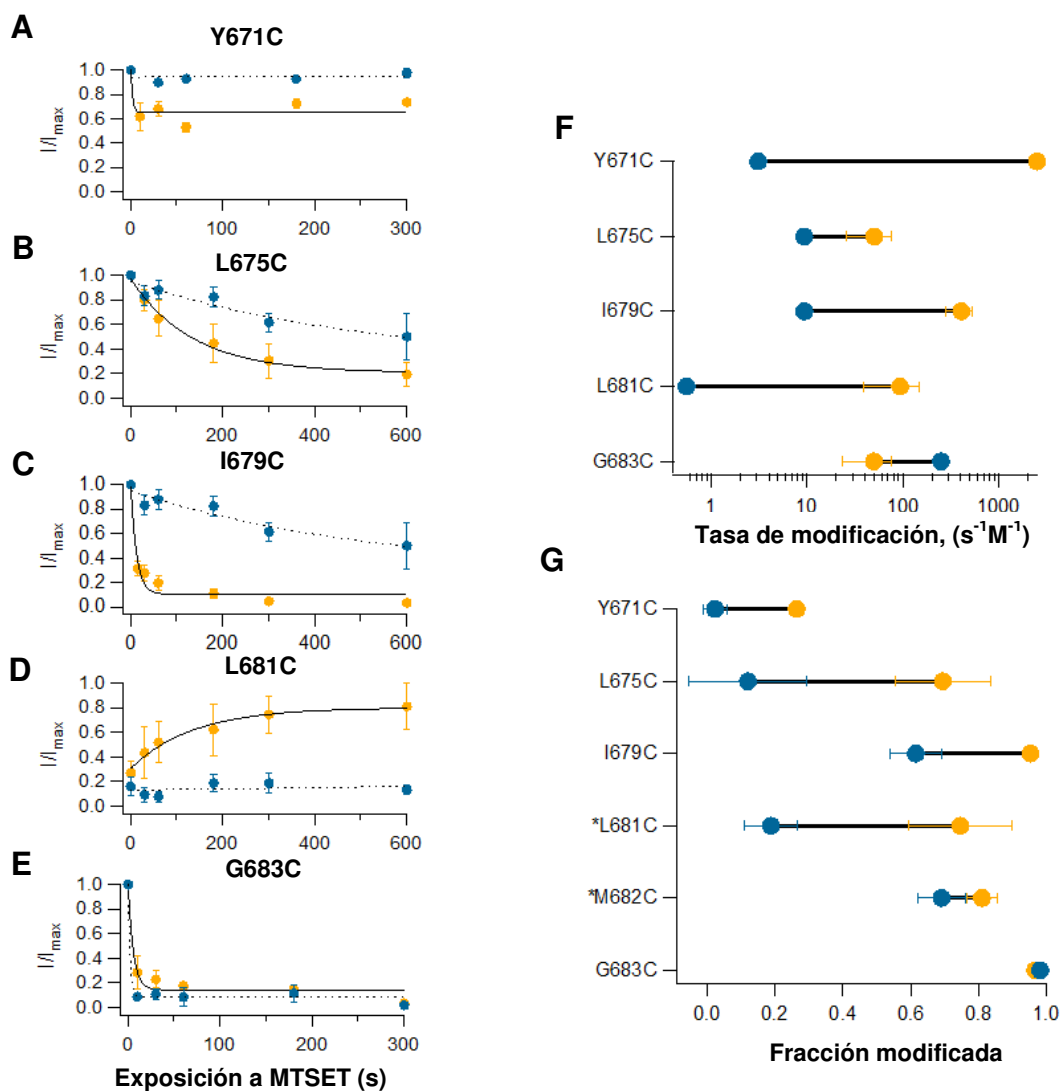


Figura 25. Modificación por MTSET en las mutantes del S6. (A-E) Promedio de los cursos temporales en estado abierto (círculos naranjas) y estado cerrado (círculos azules) después de la aplicación de MTSET 2 mM sobre residuos clave que se localizan cerca de la constricción para cationes de tamaño grande en la posición L681. Las líneas son el ajuste a una función exponencial antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con MTSET. Las tasas de modificación para cada mutante se muestran en el panel (F). Las constantes de modificación de segundo orden en el estado abierto (k_A círculos naranja) son el promedio de tres experimentos diferentes, mostradas como el promedio \pm error estándar. Las constantes de modificación de segundo orden en el estado abierto (k_C círculos naranja) fueron obtenidas del ajuste al promedio de los cursos temporales con una ($N = 3$) para cada punto. La fracción de corriente modificada después de 5 min de exposición a MTSET tanto para el estado abierto como el cerrado se muestran en (G), están expresadas como el promedio \pm error estándar. Los asteriscos señalan a las mutantes donde el efecto es potenciar las corrientes. Las líneas negras sirven de ayuda visual. (A) La modificación de Y671C es dependiente del estado. Observamos que la

modificación en el estado abierto alcanza su meseta a los 10 s, mientras que en el estado cerrado es tan lento que la función exponencial no se puede ajustar bien. Los ajustes estimados son de $k_A = 2500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 3.09 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La fracción de la corriente inhibida por MTSET después de 5 min en el estado abierto es de 0.26 ± 0.01 , constituyendo el efecto máximo del agente. En el estado cerrado, la fracción de la corriente inhibida a los 5 min es de 0.023 ± 0.036 significativamente más pequeña a la que se obtuvo en el estado abierto (t-tudent, $p < 0.01$). (B) La modificación por MTSET también es dependiente del estado, con $k_A = 50.2 \pm 24.5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 9.35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La fracción inhibida después de 5 min para el estado abierto es 0.69 ± 0.13 , la cual es más grande que la que se observa en el estado cerrado (0.12 ± 0.17). A pesar de la diferencia entre los valores del estado abierto y cerrado esta vez no es significativo el cambio (t- student, $p > 0.05$). (C) I679C se modifica en el estado abierto con una $k_A = 405 \pm 123 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 9.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La fracción de corriente inhibida en el estado cerrado tiene un valor pequeño (0.61 ± 0.077 ; t-student, $p < 0.01$) en comparación con la que se obtiene en el estado abierto (0.95 ± 0.006). (D) L681C es potenciada por el MTSET. Los valores de los cursos temporales se muestran en (F). Son los cocientes entre la corriente medida a 100 nM capsaicina y la corriente máxima obtenida con 4 μM capsaicina obtenida al final del experimento y representan la fracción de corriente potenciada, que se muestra en (G) después de 5 min de exposición tanto para la mutante L681C así como para M682C la cual también muestra un potenciación. La modificación de L681C ocurre de manera dependiente del estado, con una $k_A = 94 \pm 54 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 0.6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La fracción de la corriente modificada a los 5 min en el estado abierto es significativamente más grande (0.74 ± 0.15) que el estado cerrado (0.18 ± 0.077 ; t-student, $p < 0.01$). (E) La cisteína localizada en el residuo 683, por debajo de la constricción localizada en L681, presenta una pequeña dependencia del estado, de hecho la tasa de modificación en estado cerrado es mucho más rápida que la que se observa en estado abierto ($k_A = 49.7 \pm 27 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Las fracciones de corriente modificada en el estado abierto y cerrado son 0.96 ± 0.01 y 0.98 ± 0.008 , respectivamente. La mutante M682C también es modificada de manera independiente del estado (G), con fracciones de corriente modificadas en el estado abierto y cerrado de 0.80 ± 0.044 y 0.69 ± 0.07 , respectivamente. Las diferencias en la fracción modificada entre el estado abierto y cerrado para ambas mutantes debajo de L681 no son significativas (t-student, $p > 0.5$).

Los residuos L681 y Y671 también juegan un papel importante al activar en la activación del canal TRPV1 por temperatura.

Nuestros datos de accesibilidad indican que la capsaicina controla la apertura y cierre de la compuerta localizada en la posición Y671C. El canal TRPV1 además de activarse por capsaicina también puede activarse por temperatura. Se ha descrito que estos dos estímulos, están alostéricamente acoplados⁹³, es de esperarse que estos estímulos converjan en la apertura del poro y que los cambios conformacionales sean muy parecidos.

Exploramos la posibilidad de que la apertura del canal por capsaicina o por temperatura, siga el mismo mecanismo. Medimos la tasa de modificación por Ag^+ en el estado cerrado y abierto para las mutantes I668C, Y671C y L673C activando el canal con temperatura. Los datos de estos experimentos son consistentes con los resultados de los experimentos con capsaicina. I668C y Y671C mostraron una modificación rápida en el estado abierto comparado con el estado cerrado (Figura 26 A y B) y la mutante L673C muestra una modificación independiente del estado en el que se aplicó la Ag^+ (Figura 26 C). En la Figura 26 D se muestran las tasas de modificación de dichas mutantes.

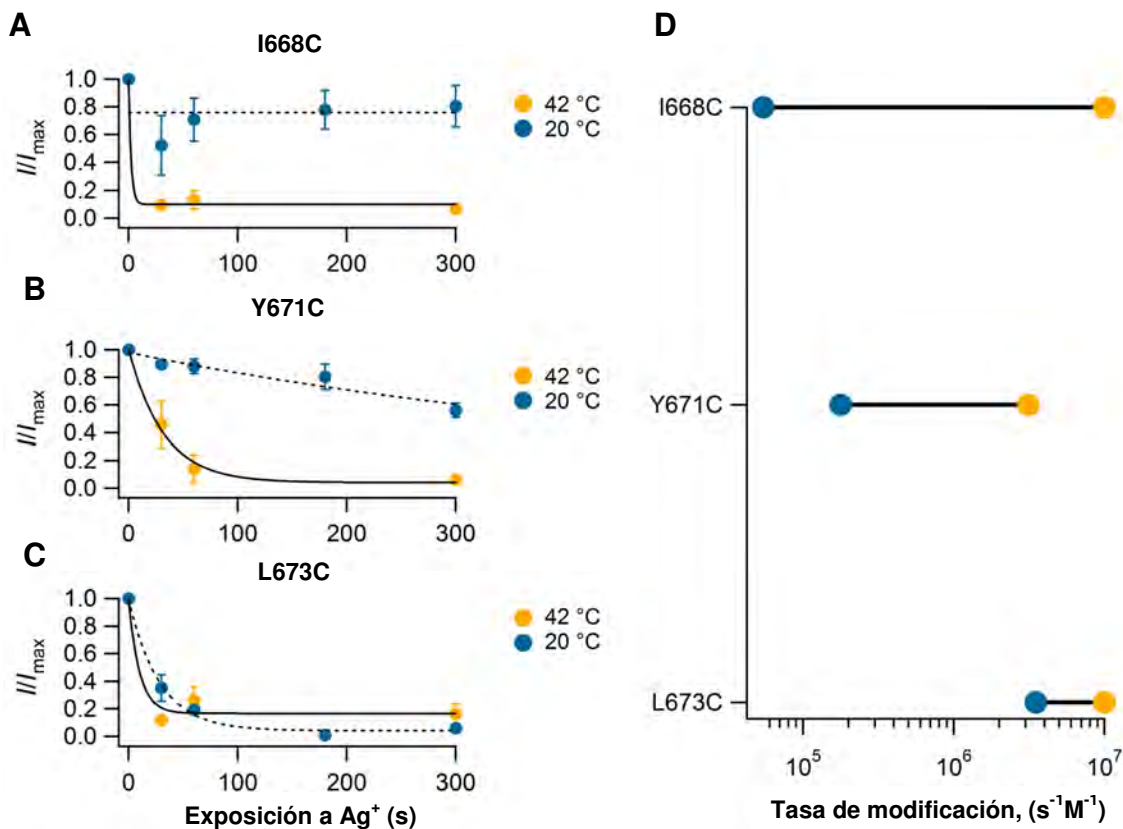


Figura 26. Activación de las mutantes del TRPV1 por temperatura. (A-C) Cursos temporales de la modificación por Ag^+ de I668C (A), Y671C (B) y L673C (C) en estado abierto a 42°C, círculos naranja o en estado cerrado a 20°C círculos azules. Las líneas son el ajuste a una función exponencial antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con la Ag^+ . (A) I668C la modificación es dependiente del estado. La tasa de modificación de segundo orden para el estado abierto es de $k_A = 10.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 0.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. (B) La modificación de Y671C es dependiente del estado con una $k_A = 3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 0.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. (C) La tasa de modificación de L673C fue de $k_A = 10 \pm 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_C = 3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. (D) Comparación de las tasas de modificación

en estado abierto (círculos naranja) y en estado cerrado (círculos azules) datos obtenidos de (A-C). Las líneas negras sirven como ayudas visuales. $N = 3$ para cada punto.

Helicidad del segmento S6.

Los segmentos transmembranales de los canales iónicos se organizan clásicamente como alfa hélices^{68,94}. Si el segmento S6 es una alfa hélice presentará una periodicidad cercana a 3.6 residuos por vuelta⁹⁵ en la cual algunos de los residuos apuntan al poro acuoso, otros a la membrana y el resto a la proteína que conforma al canal dado que los residuos que apunten al poro van a ser más accesibles a la Ag^+ , una de las formas para determinar si los residuos están apuntando al poro, es medir la tasa de modificación durante la aplicación de Ag^+ en estado abierto. Después de aplicar Ag^+ en estado abierto a parches de membrana de todas las mutantes del segmento S6, se graficaron las corrientes máximas en función del tiempo y a esta grafica se le ajustó una función exponencial simple. Como era de esperarse encontramos que existe una gran variación en los cursos temporales para las mutantes. La Figura 27 A ilustra las tasas de modificación para cada mutante del S6 y C157A. Estos nuevos datos son consistentes con los obtenidos previamente donde los residuos L681C y Y671C tuvieron las tasas de modificación más rápidas, confirmando que los residuos L681 y Y671 están apuntando a la cara interna del poro.

Con el objetivo de obtener datos cuantitativos de la periodicidad realizamos un análisis armónico utilizando una transformada de Fourier discreta⁸². El espectro de potencias como función de la frecuencia angular, $P(\varphi)$, para una alfa hélice anfipática ideal tiene un pico en 100 grados, valor que se observa con frecuencia en proteínas en solución⁸³. Para proteínas membranales el pico se encuentra corrido hacia frecuencias angulares mayores, que es justo lo que se observa en nuestros datos experimentales en donde se puede ver un pico pronunciado a 107 grados (Figura 27 B). Es importante recalcar que aunque el S6 pueda no ser una hélice anfipática donde se alternan residuos hidrofóbicos con hidrofílicos, sí deberían de alternarse residuos que ven al poro y residuos que están ocultos. La periodicidad de la alfa hélice puede ser medida evaluando el índice de periodicidad, αPI , donde valores por arriba de 2 indican hélices anfipáticas⁸². El valor αPI para los 30 residuos del S6 es de 1.71, lo cual sugiere una pobre organización de alfa hélice, pero si omitimos

los tres residuos C-terminales (G683-L681), la α PI es de 2.3, sugiriendo que tales residuos no forman parte de la alfa hélice.

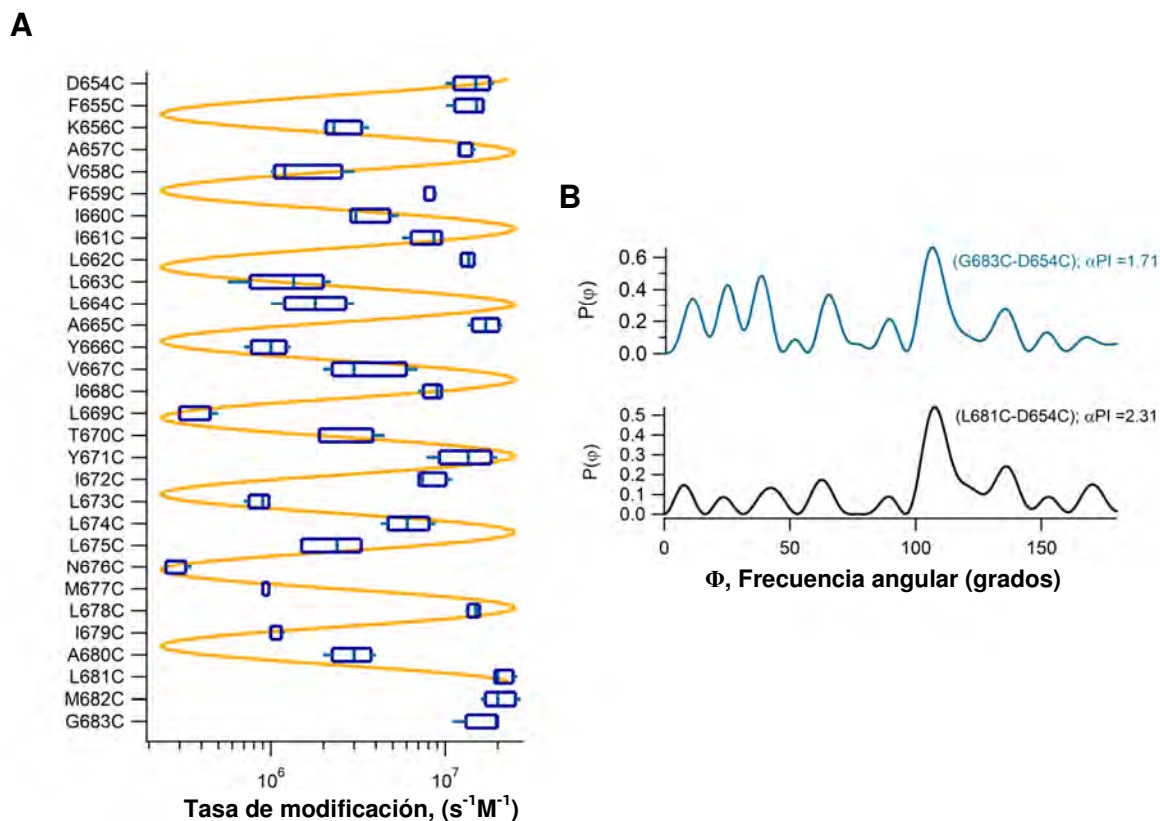


Figura 27. (A) Diagramas de cajas para las tasas de modificación por Ag^+ de cada una de las mutantes estudiadas donde en cada caja la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil. Las tasas de modificación se obtuvieron a partir de los cursos temporales de modificación por Ag^+ en el estado abierto, a los cuales se les ajustó una función exponencial. Una función seno con un periodo de 3.4 se graficó encima de los datos (línea naranja) como guía visual. (B) Análisis de la periodicidad del segmento S6. El trazo azul es el espectro de poder de todos los residuos del S6. El trazo negro es el espectro que se obtuvo cuando se eliminaron los tres residuos (683-681). El número que aparece en la gráfica es el índice de periodicidad, α PI.

Sorprendentemente la modificación de algunos de los residuos que se encuentran en la parte superior del poro (A657C y D654C) es bastante rápida, esto posiblemente se deba a que la Ag^+ este accediendo a través de otra vía que no sea el poro. Para desechar esa posibilidad decidimos utilizar un bloqueador del poro del canal que impidiera el flujo de Ag^+ a través de éste como el TBA. Los resultados nos muestran que las tasas de

modificación de las mutantes que se encuentran en la parte N-terminal (A657C y D654C) se hicieron más lentas al aplicar TBA junto con Ag^+ y 4 μM capsaicina, en comparación con los experimentos donde no utilizamos bloqueador (Figura 28 A y B).

La razón por la cual estos residuos se modifican rápidamente en ausencia del bloqueador no está clara. El poro del canal es una estructura dinámica⁹⁶, es posible que los residuos que se encuentran en la parte superior de la región del S6 pierdan el empaquetamiento y con ello pueda modificarse rápidamente en el estado abierto. Aún se necesitan más datos acerca de la estructura de la parte superior del poro que puedan resolver este problema.

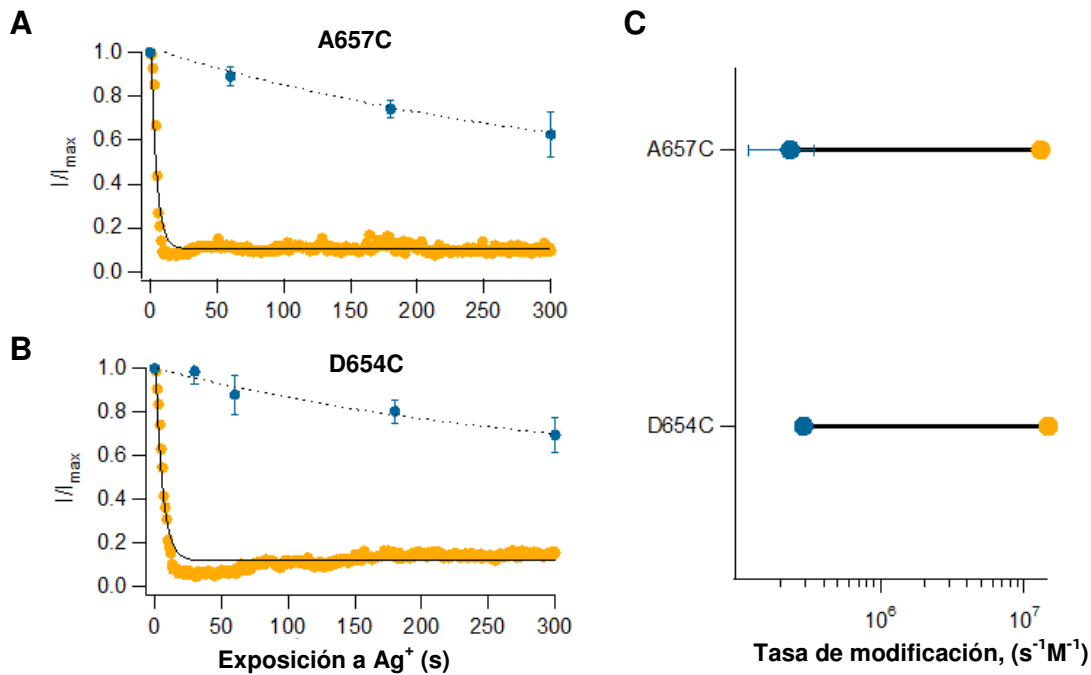


Figura 28. El bloqueador (TBA) evita que se modifiquen los residuos (A657C y D654C) por Ag^+ . (A y B) Cursos temporales de la modificación por Ag^+ para las mutantes A657C (A) y D654C (B) en ausencia de (círculos naranja) y en presencia (círculos azules) de TBA 2.5 mM. Las líneas son el ajuste a una función exponencial antes (líneas continuas) y después (líneas punteadas) del tratamiento con Ag^+ . El curso temporal sin TBA es un experimento típico y el curso temporal con TBA es el promedio \pm error estándar ($N = 3$) para cada punto. La modificación en presencia del bloqueador disminuye dos órdenes de magnitud en comparación con modificación en ausencia del TBA, mostrándonos que el bloqueador impide el paso de la Ag^+ a través del poro del canal impidiendo la modificación de los dos residuos que se encuentran en la parte más N-terminal del S6. (C) Las constantes de modificación de segundo orden para las mutantes A657C y D654C en presencia de TBA

fueron de (k_{TBA} , círculos azules) y en ausencia de TBA (k_0 , círculos naranja) los promedios \pm error estándar ($N=3$). Los valores para A657C son $k_{TBA} = 0.23 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_0 = 13.0 \pm 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ambas tasas son significativamente diferentes (t-student, $P < 0.005$). Las tasas para D654C también son significativamente diferentes (t-student, $P < 0.02$) son $k_{TBA} = 0.28 \pm 0.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_0 = 14.6 \pm 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Modelo del canal TRPV1 basados en los datos obtenidos del SCAM.

Decidimos construir un modelo funcional del TRPV1 a partir de nuestros datos utilizando como molde el canal Kv1.2. El modelo que obtuvimos es consistente con los datos que hemos presentado, demostrando que los cuatro residuos aromáticos, Y671, localizados a la mitad del S6, apuntan a la cara acuosa del poro y se encuentran lo suficientemente cerca para poder interactuar entre ellos. Otra característica importante es que los residuos L681 apuntan también a la cara interna del poro. Adicionalmente, los residuos 681-683 no se encuentran en la alfa hélice concordando con los datos de helicidad (Figura 29).

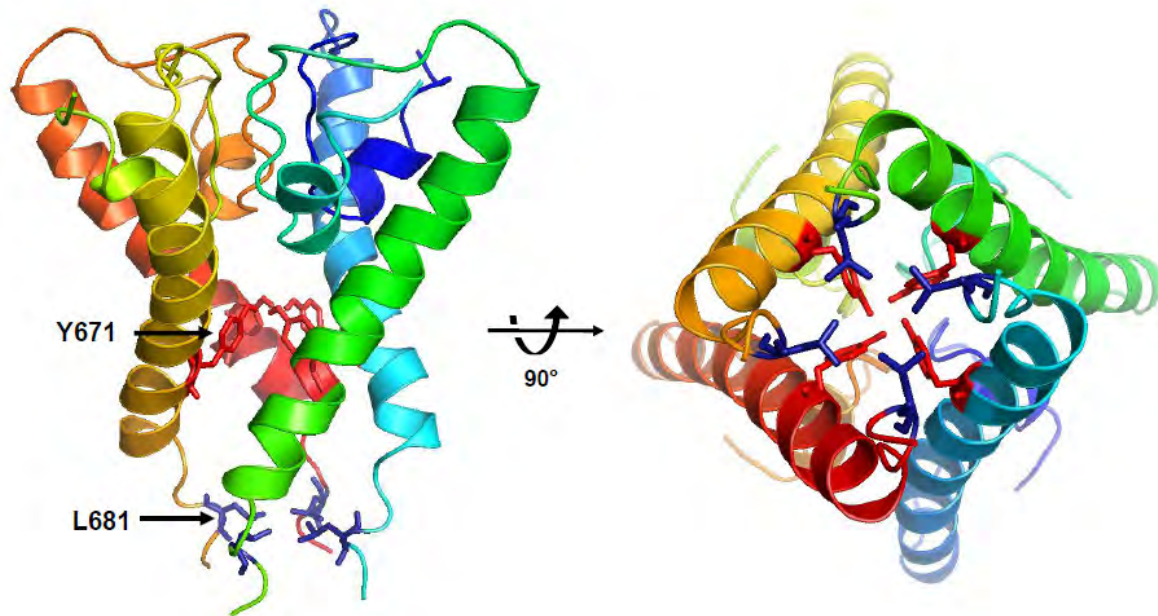


Figura 29. Modelo de homología del canal TRPV1 con el Kv1.2. Vista lateral (panel izquierdo) y desde abajo (panel derecho) de los cuatro segmentos transmembranales S6 en diferentes colores. Los residuos L681 y Y671 en azul y rojo respectivamente, apuntan hacia la cara interna del poro del canal.

DISCUSIÓN.

Caracterización de los efectos de compuestos activos del ajo y la cebolla.

Los canales TRP se encuentran relacionados con la detección de estímulos del medio ambiente y algunos de ellos muestran sensibilidad a compuestos de origen vegetal como el cinamaldehído, el aceite de mostaza o la alicina, sustancias que producen una sensación de dolor^{97,98}. Al parecer quedaba claro que el cinamaldehído y el aceite de mostaza (AITC) solo activaban al canal TRPA1, aunque diferentes reportes indicaban que el canal TRPV1 también podría ser activado por otro compuesto que se encuentra en los extractos de ajo y cebolla^{88,99,100}.

Nuestros datos mostraron que el canal TRPV1 puede ser activado por compuestos que se encuentran en los extractos del ajo y la cebolla. Aun más importante, encontramos que la alicina activa al canal TRPV1 y este efecto tiene una relevancia fisiológica, puesto que el canal TRPV1 media parte de la respuesta a alicina en neuronas aisladas del DRG y en el modelo *in vivo*. Nuestros datos electrofisiológicos así como de comportamiento hechos en ratones KO de los canales TRPV1 y TRPA1, sirvieron para aclarar el papel que cada uno de estos canales juega en la respuesta a alicina, indicándonos que el canal TRPV1 también participa en la respuesta a alicina. De hecho, las neuronas de DRG de ambos ratones KO fueron capaces de responder a la alicina y con un incremento en la excitabilidad eléctrica. Estos experimentos de comportamiento, claramente indican que ambos canales el TRPV1 y el TRPA1 contribuyen a la respuesta a dolor inducida por alicina.

Las cisteínas están relacionadas con la modulación de las señales en una gran cantidad de canales iónicos^{88,100-104}, para poder explorar el mecanismo por el cual la alicina activa al TRPV1, construimos un canal sin cisteínas el cual es una herramienta importante para realizar estudios de relación entre la estructura y la función. En este estudio describimos el mecanismo de acción de los extractos de ajo y cebolla así como de la alicina, el principal compuesto irritante que se encuentra en estos extractos, los cuales activan al canal TRPV1

a través de la modificación de una sola cisteína localizada en la posición C157, en la región N-terminal de la proteína.

La estructura de alta resolución de la región N-terminal del canal TRPV1 y del TRPA1 se ha obtenido recientemente por rayos X, mostrándonos que esta región en los canales TRPV1 presenta seis repetidos de anquirina^{46,105}. Varios estudios han dejado claro que esta región presenta varios dominios de unión a múltiples ligandos mediando la respuesta a ATP, PIP₂ y calmodulina^{34,46}. Revisando la estructura publicada de la región N-terminal del canal TRPV1⁴⁶ encontramos que el residuo C157 se localiza en la parte interna del segundo dominio a anquirina (Figura 31), una región donde otros ligandos que modulan la actividad del canal tienen su sitio de unión. Por ejemplo, los residuos K155, K160 y L163 localizados en el segundo dominio a anquirina forman el sitio de unión a ATP en el canal TRPV1. La mutación de cualquiera de estos residuos resulta en una alteración del proceso de taquifilaxis (desensibilización ante estímulos repetidos de agonista) en ausencia de ATP⁴⁶. Este y nuestros resultados sugieren que esta región sufre importantes cambios conformacionales que están acoplados a la apertura del canal y constituye una importante región regulatoria del canal TRPV1.

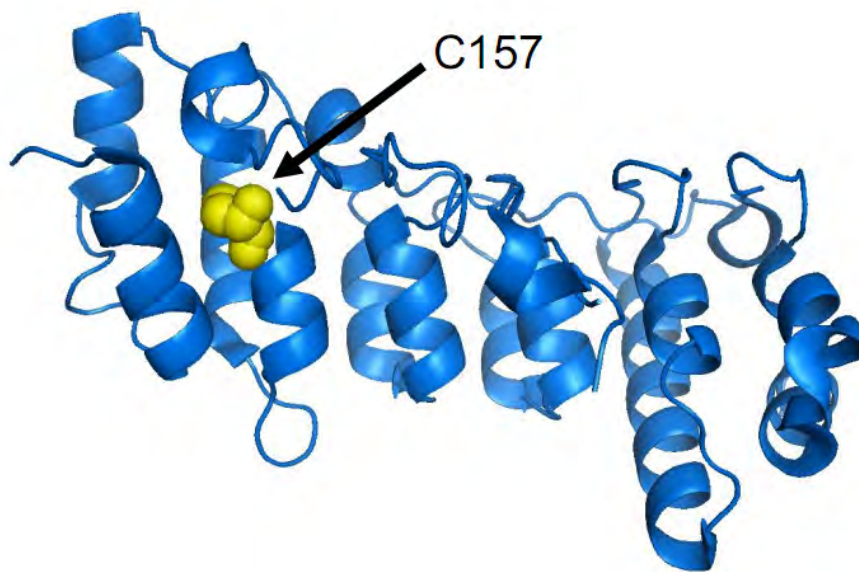


Figura 31. Localización del residuo C157 en el segmento N-terminal del canal TRPV1. El diagrama muestra los seis repetidos de anquirina del segmento N-terminal. Basándonos

en esta estructura, el residuo C157 (en amarillo) se encuentra en la segunda hélice del segundo repetido de anquirina del canal TRPV1 tomada de Lishko *et al*⁴⁶.

La importancia de la región N-terminal parece estar conservada en otros miembros de la familia TRP, un ejemplo de ello, es que tres residuos (C619, C639 y C663) localizados en esta región del canal TRPA1 median la activación por cinamaldehído y aceite de mostaza¹⁰⁶. Además, esta región en los canales TRPA1 cuenta con repetidos de anquirina que responden a cambios de tensión en la membrana plasmática¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

La activación de los canales TRP por agentes que modifican cisteínas parece seguir un mecanismo de acción similar, sin embargo los resultados que hemos obtenido indican que los compuestos que activan al canal TRPA1 como el cinamaldehído, N-etilmaleimida, adenilatos⁸⁸ y en particular el AITC, el cual presenta una estructura similar a la alicina, no activan al canal TRPV1. Esto indica que este tipo de compuestos son selectivos entre miembros de la familia TRP. El hecho de que los agentes MTS cargados y no cargados activen al canal TRPV1, nos indica que el mecanismo de acción es estérico y no se debe a interacciones electrostáticas. Además, el que la capsaicina siga activando a los canales mutantes C157A y 18-TRPV1 sugiere que el mecanismo de activación por capsaicina es diferente al de la alicina.

Los canales TRPV1 y TRPA1 presentan solo 13% de identidad de secuencias y un 22% de conservación. A pesar de esto, nuestros resultados indican que presentan un mecanismo de activación conservado. El estudiar la naturaleza de acción de este mecanismo más a fondo proveerá de nuevas pistas acerca de las bases moleculares que subyacen a la detección de estímulos nocivos.

Determinantes estructurales de la activación del canal TRPV1.

Con el objetivo de obtener nuevos datos acerca de la localización y arquitectura de la compuerta de activación del TRPV1, realizamos un estudio de accesibilidad de cisteínas. Medimos la accesibilidad de cada uno de los residuos del segmento S6 en el estado cerrado o abierto del canal midiendo la potenciación o reducción de corriente así como la tasa de

modificación de cada una de las cisteínas insertadas en el S6. Esta metodología dejó claro que el segmento S6 sufre cambios conformacionales al activarlo ya sea con capsaicina o temperatura.

Hasta el momento se cuenta con muy pocos estudios que describen con datos funcionales la localización de la compuerta de activación en otros canales iónicos^{65,66,79,92}. En el caso de los canales TRP, no existía ningún estudio que se avocara a describir la localización de la compuerta utilizando datos funcionales.

Un estudio previo sugirió que algunos residuos localizados en la parte C-terminal del segmento S6 podrían formar parte de la compuerta de activación del canal TRPV1⁷⁶. El hecho de que el canal TRPV1 no presente una región flexible formada por los residuos glicina o prolina como en los canales de Kv¹¹⁰, muestra que ese estudio no puede proveer datos funcionales que identifiquen la compuerta de activación.

Nosotros demostramos que el residuo L681 localizado en la parte más intracelular del segmento S6, impide el paso de iones del tamaño del MTSET (5.8 Å) en el estado cerrado pero deja pasar iones del tamaño del MTSEA (3.6 Å) o incluso, más pequeños como la Ag⁺ (1.26 Å). Aun más importante, la modificación dependiente del estado por MTSET en el residuo 681 junto con el bloqueo independiente del estado por TEA, indica que por lo menos moléculas de (8 Å) como el TEA pueden residir adentro del poro cuando el canal está cerrado.

Mediante la utilización de Ag⁺, pudimos determinar la región que forma la compuerta de activación que impide el flujo de iones de tamaño pequeño como la Ag⁺ y que se localiza a la mitad del segmento S6 cercana al residuo Y671. Por medio de la formación de puentes disulfuro, confirmamos que los residuos de las cuatro subunidades en las posiciones L681 y Y671 se encuentran cercanos entre sí, apoyando la idea de que estas dos regiones forman constricciones que impiden el flujo de moléculas a través del poro. En otro trabajo se había demostrado que mutar Y671 la permeación de Ca²⁺¹¹¹ se afecta en el TRPV1, coincidiendo

con nuestros resultados ya que proponemos que este residuo esta apuntando a la cara interna del poro.

Una observación interesante en nuestros experimentos donde medimos la tasa de modificación por Ag^+ , fue que en la mutante L669C la modificación por Ag^+ en el estado cerrado es más rápida que en el estado abierto (Figura 22 y Figura 23). Una posible explicación es que la plata pueda acceder por algún otro sitio que no sea el poro y que esta modificación sea dependiente del estado en que se aplicó la Ag^+ y con ello produzca un cambio conformacional que exponga a este residuo en el estado cerrado y que lo haga inaccesible en el estado abierto. Otra posibilidad es que este residuo apunte al centro del poro en el estado cerrado y no en el abierto, como consecuencia de cambios conformacionales en el poro al abrir el canal. Dado que la probabilidad de apertura en ausencia de capsaicina no es cero⁷⁵, la Ag^+ podría estar permeando y estabilizando el estado cerrado del canal, aumentando la tasa de modificación en el estado cerrado comparada con el abierto, cuando el residuo es inaccesible. Esta modificación dependiente del estado invertida ya se ha observado en una de las mutantes de uno de los trabajos donde se estudio la localización de la compuerta de activación del canal Shaker de Kv^{112} .

Otro efecto interesante fue el que observamos en un par de mutantes: la L681C y la M682C, las cuales muestran una potenciación de las corrientes cuando son tratadas con MTSEA o MTSET pero la corriente es inhibida al aplicar Ag^+ . Estas diferencias pueden ser atribuidas a la carga de los agentes que modifican cisteínas que utilizamos, el MTSEA y el MTSET que a un pH 7¹¹³ se encuentran cargados y la Ag^+ al reaccionar con la cisteína se mantiene neutra. En este contexto las cargas positivas de los agentes MTS podrían encontrarse cerca entre si en el estado cerrado del canal causando una repulsión electrostática y desestabilizando este estado⁷⁹.

Grandl *et al*¹¹⁴, han mostrado que algunos de los residuos que se encuentran en el segmento S6 juegan un papel importante en la respuesta a temperatura pero no a otros agonistas en los canales TRPV3. Nosotros no investigamos a detalle el efecto de la temperatura en todas las mutantes del S6. A pesar de esto, demostramos que la temperatura también controla la

apertura de las dos regiones cercanas a los residuos L681 y Y671 que funcionan como compuertas. Se ha propuesto que los canales TRP funcionan como proteínas modulares; es decir, que cada dominio o modulo está acoplado alostéricamente al otro pero funcionan de manera independiente^{93,115}. Los datos que hemos presentado en este trabajo siguen la misma idea.

Otros grupos de investigación, usando la misma técnica de sustitución de cisteínas, han sugerido que la hélice de poro y el filtro de selectividad juegan un papel importante en la apertura del canal TRPV5¹¹⁶. Los resultados no son opuestos a los nuestros, dado que la presencia de una compuerta en la parte interna del canal, formada por los segmentos S6 no produce cambios conformacionales en otra parte del canal como el asa entre los segmentos S5 y S6, como lo que ocurre en los canales Kv con la inactivación del tipo-C¹¹⁷, o los cambios conformacionales en el poro del canal mutante *Shaker*¹¹⁸. Se ha demostrado que el poro del canal TRPV1 es una estructura dinámica que permite cambios en la selectividad en respuesta a diferentes agonistas y tiempos de exposición⁶³. Nosotros no observamos este fenómeno debido a que solo utilizamos un ion permeante en nuestros experimentos^{74,75}.

Se ha asumido que el segmento S6 de los canales iónicos dependientes de voltaje se organiza como una α -hélice⁶⁸. Estudios de accesibilidad en otros canales iónicos han detectado el mismo patrón de helicidad en otros segmentos transmembranales¹¹⁹. En nuestro estudio encontramos que varias cisteínas, incluida la Y671C, insertadas en el segmento S6 podrían encontrarse apuntando a la cara interna del poro. Observamos claras diferencias en el patrón de la tasa de modificación por Ag^+ , es de esperar que los residuos que apunte al poro se modifiquen con tasas mucho más rápidas y los que no apunten al poro tengan tasas de modificación lentas. Nuestros datos reflejan la helicidad del segmento transmembranal S6 del canal TRPV1.

Los estudios funcionales y estructurales hechos en canales de K^+ nos han provisto de invaluable información acerca de la naturaleza y localización de la compuerta de activación. Por lo tanto, decidimos utilizar la estructura del canal Kv1.2⁶⁸ ya que la estructura de este canal es análoga a la del canal TRPV1, para producir un modelo del canal

TRPV1 que fuera compatible con nuestros datos funcionales. Un alineamiento de secuencias y de estructuras terciarias entre el TRPV1 y el Kv1.2 reveló que la estructura de esta región entre los dos canales es muy parecida. La región “PVP” que, en los canales Kv1.2 es la responsable de la flexibilidad y es donde se encuentra la compuerta de activación de este canal, esta localizada cerca del residuo Y671 del canal TRPV1 (Figura 30 A). Aún más interesante es que este residuo se encuentra en la misma posición en los canales TRPV2 y coincide con la fenilalanina, otro residuo aromático, en los canales TRPV3 y TRPV4 (Figura 30 B). Aun se necesitan más estudios que aclaren la importancia de esta región en el resto de la familia TRP.

El modelo final que mostramos está basado en nuestros datos funcionales y constituye la primera descripción de los elementos estructurales del segmento S6 que controlan la apertura del canal TRPV1. Estos datos pueden servir como base para encontrar los determinantes moleculares de la compuerta de activación de otros canales pertenecientes a la familia TRP e incluso para futuros estudios asociados al diseño de fármacos que interactúen con sitios específicos del canal TRPV1 para inhibir su actividad y diseñar fármacos selectivos para tratar el dolor e inflamación en donde este canal juega papeles fundamentales.

CONCLUSIONES.

- Los agentes MTS activan al canal en ausencia de la capsaicina promoviendo un cambio en la probabilidad de apertura del canal TRPV1.
- Los extractos de ajo y cebolla así como la alicina promueven una activación del canal TRPV1 similar a la que se observa con los agentes MTS.
- El canal TRPV1 sin cisteínas se activa por capsaicina pero no por los agentes MTS ni por la alicina.
- La activación del canal por los agentes MTS y la alicina es un proceso dependiente de la modificación de la cisteína C157 de la región N-terminal del canal TRPV1. Esta modificación promueve un cambio conformacional que se traduce en la apertura del canal.
- Existe una compuerta para moléculas del tamaño del MTSET 5.8 Å o mayores en la región donde se encuentra el aminoácido L681.
- La región en la cual se encuentra el residuo Y671 se encuentra la compuerta iónica del canal TRPV1 que regula el flujo de iones a través de este canal.
- Los residuos L681 y Y671 en el estado cerrado se encuentran por lo menos a una distancia de 4Å
- El segmento S6 forma una estructura de alfa hélice en base a los datos obtenidos con las tasa de modificación por Ag⁺.

BIBLIOGRAFIA.

1. Benham, C.D., Gunthorpe, M.J. & Davis, J.B. TRPV channels as temperature sensors. *Cell calcium* **33**, 479-487 (2003).
2. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524 (2003).
3. Caterina, M.J., *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824 (1997).
4. Szallasi, A. & Blumberg, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**, 159-212 (1999).
5. Szallasi, A., *et al.* Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res* **703**, 175-183 (1995).
6. Szallasi, A. & Blumberg, P.M. Characterization of vanilloid receptors in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Res* **547**, 335-338 (1991).
7. Szolcsanyi, J., Szallasi, A., Szallasi, Z., Joo, F. & Blumberg, P.M. Resiniferatoxin. An ultrapotent neurotoxin of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Ann N Y Acad Sci* **632**, 473-475 (1991).
8. Szolcsanyi, J., Szallasi, A., Szallasi, Z., Joo, F. & Blumberg, P.M. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **255**, 923-928 (1990).
9. Fischer, M.J., Reeh, P.W. & Sauer, S.K. Proton-induced calcitonin gene-related peptide release from rat sciatic nerve axons, in vitro, involving TRPV1. *Eur J Neurosci* **18**, 803-810 (2003).
10. Bernardini, N., Neuhuber, W., Reeh, P.W. & Sauer, S.K. Morphological evidence for functional capsaicin receptor expression and calcitonin gene-related peptide exocytosis in isolated peripheral nerve axons of the mouse. *Neuroscience* **126**, 585-590 (2004).
11. Price, T.J. & Flores, C.M. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain* **8**, 263-272 (2007).
12. Price, T.J., *et al.* Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion. *BMC neuroscience* **6**, 4 (2005).
13. Mezey, E., *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3655-3660 (2000).
14. Inoue, K., *et al.* Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 124-129 (2002).
15. Stander, S., *et al.* Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* **13**, 129-139 (2004).
16. Biro, T., *et al.* Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol* **126**, 1909-1912 (2006).

17. Bodo, E., *et al.* A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol* **166**, 985-998 (2005).
18. Bodo, E., *et al.* Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol* **123**, 410-413 (2004).
19. Szallasi, A., Conte, B., Goso, C., Blumberg, P.M. & Manzini, S. Characterization of a peripheral vanilloid (capsaicin) receptor in the urinary bladder of the rat. *Life Sci* **52**, PL221-226 (1993).
20. Siegmund, S.V., Uchinami, H., Osawa, Y., Brenner, D.A. & Schwabe, R.F. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* **41**, 1085-1095 (2005).
21. Russell, J.A. & Lai-Fook, S.J. Reflex bronchoconstriction induced by capsaicin in the dog. *J Appl Physiol* **47**, 961-967 (1979).
22. Lundberg, J.M., Martling, C.R. & Saria, A. Substance P and capsaicin-induced contraction of human bronchi. *Acta Physiol Scand* **119**, 49-53 (1983).
23. Ramsey, I.S., Delling, M. & Clapham, D.E. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 619-647 (2006).
24. Reaves, B.J. & Wolstenholme, A.J. The TRP channel superfamily: insights into how structure, protein-lipid interactions and localization influence function. *Biochem Soc Trans* **35**, 77-80 (2007).
25. Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T. & Nilius, B. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 685-717 (2006).
26. Jordt, S.E., Tominaga, M. & Julius, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8134-8139 (2000).
27. Reeh, P.W. & Kress, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 45-51 (2001).
28. Dhaka, A., *et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* **29**, 153-158 (2009).
29. Zygmunt, P.M., *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452-457 (1999).
30. Xu, H., Blair, N.T. & Clapham, D.E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* **25**, 8924-8937 (2005).
31. Szallasi, A. & Blumberg, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**, 515-520 (1989).
32. Jung, J., *et al.* Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* **19**, 529-538 (1999).
33. Macpherson, L.J., *et al.* The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* **15**, 929-934 (2005).
34. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M. & Gordon, S.E. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of general physiology* **123**, 53-62 (2004).
35. Sedgwick, S.G. & Smerdon, S.J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences* **24**, 311-316 (1999).

36. Jin, X., Touhey, J. & Gaudet, R. Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25006-25010 (2006).
37. McCleverty, C.J., Koesema, E., Patapoutian, A., Lesley, S.A. & Kreusch, A. Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci* **15**, 2201-2206 (2006).
38. Phelps, C.B., Huang, R.J., Lishko, P.V., Wang, R.R. & Gaudet, R. Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* **47**, 2476-2484 (2008).
39. Garcia-Sanz, N., *et al.* Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* **24**, 5307-5314 (2004).
40. Chang, Q., *et al.* Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *The Journal of biological chemistry* **279**, 54304-54311 (2004).
41. Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Niemeyer, B.A. Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *The Journal of biological chemistry* **279**, 34456-34463 (2004).
42. Arniges, M., Fernandez-Fernandez, J.M., Albrecht, N., Schaefer, M. & Valverde, M.A. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1580-1586 (2006).
43. Zerangue, N., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3591-3595 (2000).
44. Jenke, M., *et al.* C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *The EMBO journal* **22**, 395-403 (2003).
45. Quirk, J.C. & Reinhart, P.H. Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels. *Neuron* **32**, 13-23 (2001).
46. Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905-918 (2007).
47. Ahern, G.P., Brooks, I.M., Miyares, R.L. & Wang, X.B. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci* **25**, 5109-5116 (2005).
48. Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J. & Vlachova, V. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci* **30**, 207-217 (2005).
49. Ahern, G.P., Wang, X. & Miyares, R.L. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 8991-8995 (2006).
50. Ryu, S., Liu, B. & Qin, F. Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR1 receptors. *The Journal of general physiology* **122**, 45-61 (2003).
51. Liu, B., Yao, J., Wang, Y., Li, H. & Qin, F. Proton inhibition of unitary currents of vanilloid receptors. *The Journal of general physiology* **134**, 243-258 (2009).

52. Baumann, T.K., Burchiel, K.J., Ingram, S.L. & Martenson, M.E. Responses of adult human dorsal root ganglion neurons in culture to capsaicin and low pH. *Pain* **65**, 31-38 (1996).
53. Samways, D.S., Khakh, B.S. & Egan, T.M. Tunable calcium current through TRPV1 receptor channels. *The Journal of biological chemistry* **283**, 31274-31278 (2008).
54. Ferrer-Montiel, A., *et al.* Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* **271**, 1820-1826 (2004).
55. Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J.M. & Ferrer-Montiel, A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *The Journal of biological chemistry* **275**, 32552-32558 (2000).
56. Salazar, H., *et al.* Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nature structural & molecular biology* **16**, 704-710 (2009).
57. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical journal* **66**, 1061-1067 (1994).
58. Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G. & Nilius, B. Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *The Journal of biological chemistry* **279**, 15223-15230 (2004).
59. Dodier, Y., *et al.* Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 6853-6862 (2004).
60. Dodier, Y., Dionne, F., Raybaud, A., Sauve, R. & Parent, L. Topology of the selectivity filter of a TRPV channel: rapid accessibility of contiguous residues from the external medium. *American journal of physiology* **293**, C1962-1970 (2007).
61. Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A. & Surprenant, A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature neuroscience* **2**, 315-321 (1999).
62. Khakh, B.S., Bao, X.R., Labarca, C. & Lester, H.A. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature neuroscience* **2**, 322-330 (1999).
63. Chung, M.K., Guler, A.D. & Caterina, M.J. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nature neuroscience* **11**, 555-564 (2008).
64. Webster, S.M., Del Camino, D., Dekker, J.P. & Yellen, G. Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* **428**, 864-868 (2004).
65. del Camino, D. & Yellen, G. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* **32**, 649-656 (2001).
66. Ding, S., Ingleby, L., Ahern, C.A. & Horn, R. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *The Journal of general physiology* **126**, 213-226 (2005).
67. Lu, Z., Klem, A.M. & Ramu, Y. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *The Journal of general physiology* **120**, 663-676 (2002).
68. Long, S.B., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science (New York, N.Y)* **309**, 897-903 (2005).

69. Caprini, M., *et al.* Molecular compatibility of the channel gate and the N terminus of S5 segment for voltage-gated channel activity. *The Journal of biological chemistry* **280**, 18253-18264 (2005).
70. Lee, S.Y., Banerjee, A. & MacKinnon, R. Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS biology* **7**, e47 (2009).
71. Labro, A.J., *et al.* Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues. *The Journal of general physiology* **132**, 667-680 (2008).
72. Armstrong, C.M. & Hille, B. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *The Journal of general physiology* **59**, 388-400 (1972).
73. Armstrong, C.M. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *The Journal of general physiology* **58**, 413-437 (1971).
74. Jara-Oseguera, A., Llorente, I., Rosenbaum, T. & Islas, L.D. Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *The Journal of general physiology* **132**, 547-562 (2008).
75. Oseguera, A.J., Islas, L.D., Garcia-Villegas, R. & Rosenbaum, T. On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophysical journal* **92**, 3901-3914 (2007).
76. Susankova, K., Ettrich, R., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci* **27**, 7578-7585 (2007).
77. Yang, N. & Horn, R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**, 213-218 (1995).
78. Matulef, K. & Zagotta, W.N. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 23-44 (2003).
79. Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. A cysteine scan of the inner vestibule of cyclic nucleotide-gated channels reveals architecture and rearrangement of the pore. *The Journal of general physiology* **121**, 563-582 (2003).
80. Rosenbaum, T. & Gordon, S.E. Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* **33**, 703-713 (2002).
81. Rosenbaum, T., Castanares, D.T., Lopez-Valdes, H.E. & Hiriart, M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. *The Journal of membrane biology* **186**, 177-184 (2002).
82. Cornette, J.L., *et al.* Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *Journal of molecular biology* **195**, 659-685 (1987).
83. Komiya, H., Yeates, T.O., Rees, D.C., Allen, J.P. & Feher, G. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: symmetry relations and sequence comparisons between different species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 9012-9016 (1988).
84. Li-Smerin, Y. & Swartz, K.J. Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels. *The Journal of general physiology* **117**, 205-218 (2001).

85. Geourjon, C., Combet, C., Blanchet, C. & Deleage, G. Identification of related proteins with weak sequence identity using secondary structure information. *Protein Sci* **10**, 788-797 (2001).
86. DeLano, W.L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Current opinion in structural biology* **12**, 14-20 (2002).
87. Salazar, H., *et al.* A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature neuroscience* **11**, 255-261 (2008).
88. Macpherson, L.J., *et al.* Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541-545 (2007).
89. Julius, D. From peppers to peppermints: natural products as probes of the pain pathway. *Harvey lectures* **101**, 89-115 (2005).
90. Moiseenkova-Bell, V.Y., Stanciu, L.A., Serysheva, II, Tobe, B.J. & Wensel, T.G. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7451-7455 (2008).
91. Perez-Garcia, M.T., *et al.* Mechanisms of sodium/calcium selectivity in sodium channels probed by cysteine mutagenesis and sulfhydryl modification. *Biophysical journal* **72**, 989-996 (1997).
92. Contreras, J.E., Srikumar, D. & Holmgren, M. Gating at the selectivity filter in cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3310-3314 (2008).
93. Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C. & Vargas, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell calcium* **42**, 427-438 (2007).
94. Doyle, D.A., *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y)* **280**, 69-77 (1998).
95. Eisenberg, D. The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principal structural features of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11207-11210 (2003).
96. Chung, S.H. & Corry, B. Conduction properties of KcsA measured using brownian dynamics with flexible carbonyl groups in the selectivity filter. *Biophysical journal* **93**, 44-53 (2007).
97. Cortright, D.N., Krause, J.E. & Broom, D.C. TRP channels and pain. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 978-988 (2007).
98. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417 (2007).
99. Bautista, D.M., *et al.* TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-1282 (2006).
100. Bautista, D.M., *et al.* Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12248-12252 (2005).
101. Vyklicky, L., Lyfenko, A., Susankova, K., Teisinger, J. & Vlachova, V. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* **111**, 435-441 (2002).
102. Susankova, K., Touseva, K., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol* **70**, 383-394 (2006).

103. Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. & Stamler, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150-166 (2005).
104. Yoshida, T., *et al.* Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* **2**, 596-607 (2006).
105. Jones, R.C., 3rd, Xu, L. & Gebhart, G.F. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* **25**, 10981-10989 (2005).
106. Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M. & Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19564-19568 (2006).
107. Corey, D.P., *et al.* TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-730 (2004).
108. Howard, J. & Bechstedt, S. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol* **14**, R224-226 (2004).
109. Michaely, P., Tomchick, D.R., Machius, M. & Anderson, R.G. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *The EMBO journal* **21**, 6387-6396 (2002).
110. Magidovich, E. & Yifrach, O. Conserved gating hinge in ligand- and voltage-dependent K⁺ channels. *Biochemistry* **43**, 13242-13247 (2004).
111. Mohapatra, D.P. & Nau, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 13424-13432 (2005).
112. Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E. & Yellen, G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**, 175-184 (1997).
113. Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y. & Yellen, G. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* **35**, 797-804 (1996).
114. Grandl, J., *et al.* Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nature neuroscience* **11**, 1007-1013 (2008).
115. Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E. & Latorre, R. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* **26**, 4835-4840 (2006).
116. Yeh, B.I., Kim, Y.K., Jabbar, W. & Huang, C.L. Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. *The EMBO journal* **24**, 3224-3234 (2005).
117. Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.Y. & Jurman, M.E. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophysical journal* **66**, 1068-1075 (1994).
118. Zheng, J. & Sigworth, F.J. Selectivity changes during activation of mutant Shaker potassium channels. *The Journal of general physiology* **110**, 101-117 (1997).
119. Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D.M. & Martinac, B. Site-directed spin-labeling analysis of reconstituted MscL in the closed state. *The Journal of general physiology* **118**, 193-206 (2001).

APENDICE.

Artículos publicados con los resultados de esta tesis.

Structural determinants of gating in the TRPV1 channel

Héctor Salazar^{1,4}, Andrés Jara-Oseguera^{2,4}, Enrique Hernández-García^{1,4}, Itzel Llorente¹,
Imilia I Arias-Olguín¹, Manuel Soriano-García³, León D Islas² & Tamara Rosenbaum¹

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels mediate several types of physiological responses. Despite the importance of these channels in pain detection and inflammation, little is known about how their structural components convert different types of stimuli into channel activity. To localize the activation gate of these channels, we inserted cysteines along the S6 segment of mutant TRPV1 channels and assessed their accessibility to thiol-modifying agents. We show that access to the pore of TRPV1 is gated by S6 in response to both capsaicin binding and increases in temperature, that the pore-forming S6 segments are helical structures and that two constrictions are present in the pore: one that impedes the access of large molecules and the other that hampers the access of smaller ions and constitutes an activation gate of these channels.

Transient receptor potential (TRP) channels participate in a wide variety of physiological processes, including detection of sensory stimuli, osmoregulation, intracellular calcium homeostasis, chemotaxis and cell proliferation, among others¹. A member of the TRP family, the TRPV1 nonselective cation channel, is expressed in sensory neurons and in several other tissues^{1–3}, where it functions as an integrator of noxious chemical and physical stimuli^{4–9}. TRPV1 has been linked to processes mediating inflammatory and neuropathic pain^{8,10}, a finding that has led to a recent surge in research aimed at designing TRPV1-targeted pain-relieving therapies^{11,12}.

Despite the clear physiological relevance of TRPV1 and of TRP channels in general, little structural information is currently available^{13–17}. Sequence homology of TRPV1 to ion channels of known structure suggests a subunit topology similar to that of voltage-activated potassium (Kv) channels, with each subunit formed by six transmembrane domains (S1–S6), intracellular N and C termini, and a pore domain formed by S5, S6 and the loop between them. Nonetheless, the topology of the pore and the location of the activation gate of TRPV1 or of any other TRP channel remain unknown. Therefore, we set out to establish the location of the molecular determinants of channel gating to obtain insight into the structural properties of the pore of TRPV1 channels.

Using the substituted cysteine accessibility method (SCAM) to scan the entire S6 segment of the rat TRPV1, we have made the following discoveries, which constitute the first molecular characterization of the activation gate of a TRP channel. First, the finding that the accessibility of the introduced cysteines is state-dependent indicated the presence of two intracellular constrictions: the most intracellular one located at Leu681, which closes the ion conduction pathway for large molecules (~6 Å), and one located at Tyr671, which obstructs the conduction pathway for small permeating ions (~2 Å) and constitutes the activation gate of TRPV1. An important result is

that the region we define as the activation gate of TRPV1 gates the channel in response to both capsaicin and heat, revealing the physical point of convergence of these two pathways of activation.

Second, use of our recently engineered cysteine-less TRPV1 (18-TRPV1)⁴ has allowed us to study the formation of disulfide bonds between cysteines introduced at key S6 locations, unequivocally confirming proximity among the residues involved in gated access of ions in these channels. Third, we have observed a marked periodicity in our accessibility data that is consistent with an α -helical structure for the S6. Our results allow us to propose a structural homology model that neatly incorporates our observations and provides a structural basis to explain gating in TRPV1, which will prove useful in understanding gating of other TRP channels.

RESULTS

TRPV1-C157A as a tool for SCAM analysis

Our previous experiments using blocking ions of known dimensions suggested the existence of gated access to the pore of TRPV1 channels from the intracellular side¹⁸, as observed in Kv channels. We sought to identify the existence of such an activation gate by probing the S6 transmembrane domain using SCAM to insert cysteines into the TRPV1-C157A background. **Figure 1a**, above, shows the sequence of the putative S6 region of the TRPV1 channel.

TRPV1-C157A yields adequate expression levels and is unresponsive to cysteine-modifying compounds such as methanethiosulfonate (MTS) reagents, as no shift in the response to capsaicin or changes in channel conductance were observed after exposure to these molecules⁴ (**Figs. 1b,c**). Notably, TRPV1-C157A resembles wild-type TRPV1 in its core biophysical properties, such as voltage-dependence, single-channel conductance (data not shown) and its response to capsaicin⁴ (**Supplementary Fig. 1**).

¹Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina and ³Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.R. (trosenba@ifc.unam.mx).

Received 15 January; accepted 4 June; published online 28 June 2009; doi:10.1038/nsmb.1633

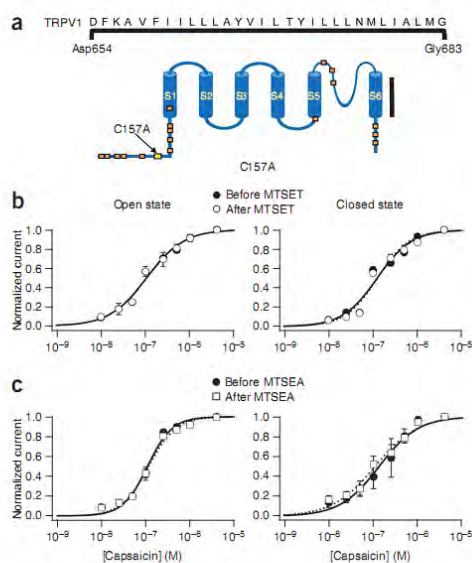


Figure 1 TRPV1-C157A can be used as a template for SCAM analysis of the channel pore. (a) Above, amino acid sequence of the putative S6 segment of the TRPV1. Below, cartoon of one TRPV1 subunit. Transmembrane segments are shown in blue, approximate positions of 17 of the 18 native cysteines in orange and Cys157 in yellow. (b) TRPV1-C157A dose-response curves to capsaicin obtained before (filled symbols) and after (open symbols) exposure to MTSET applied in the open (left) or closed (right) state. Lines are fits to the Hill equation before (solid lines) and after (dotted lines) treatment with MTS reagents. K_d values before and after MTSET applied in the open state are 106 ± 28 nM and 106 ± 20 nM, respectively. K_d values before and after MTSET applied in the closed state are 124 ± 21 nM and 125 ± 28 nM, respectively. (c) TRPV1-C157A dose-response curves to capsaicin obtained before and after exposure to MTSEA applied in the open or closed state. K_d values before and after MTSEA applied in the open state are 116 ± 27 nM and 134 ± 37 nM, respectively. K_d values before and after MTSEA applied in the closed state are 134 ± 10 nM and 109 ± 9 nM, respectively. No statistically significant differences were found between data obtained before and after treatment with MTS reagents (Student's *t*-test, $P > 0.1$). Group data are presented as mean \pm s.e.m., $n = 5$.

State-dependence of S6 cysteine reactivity

We introduced cysteines along the putative S6 segment of TRPV1-C157A (Fig. 1a) as targets for chemical modification by MTS reagents. All mutants were functional and had a response to capsaicin that did not substantially differ from that of the wild-type channel (Supplementary Fig. 1).

On the basis of our previous findings suggesting the presence of an intracellular gate for large cations (~ 9 Å)¹⁸, we initially used MTSET to probe the pore of TRPV1. First, we measured the dose-response relationships for capsaicin before and after treatment with MTSET in either the open or closed state for channels in which one of the two most intracellular residues of the S6 segment was substituted by a cysteine (Fig. 2a,b). The effect of MTSET on G683C was an almost complete inhibition of the current. On the other hand, M682C showed a strong potentiation of the current upon MTSET exposure. However, both mutants had

When we exposed TRPV1-C157A to either MTSET (2-(trimethylammonium) ethyl methanethiosulfonate) or MTSEA (2-aminoethyl methanethiosulfonate) (Fig. 1b,c), we observed no changes in the capsaicin dose response in either the open or closed state. The response of TRPV1-C157A to capsaicin remained unchanged even during exposure to the MTS reagents for periods as long as 30 min (data not shown).

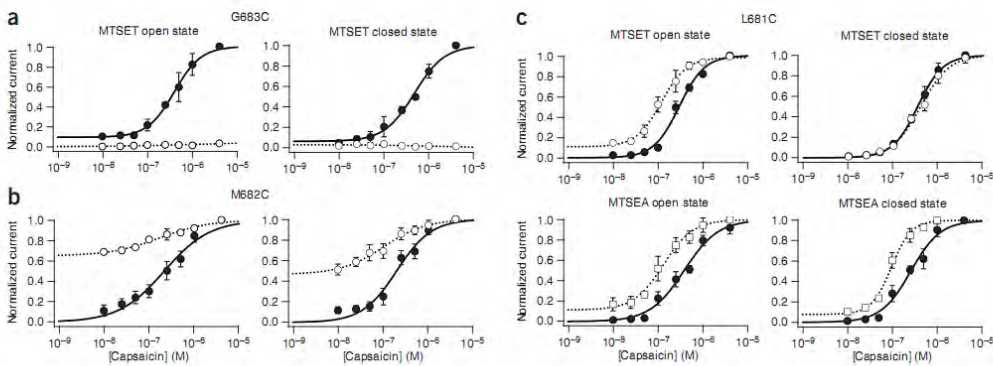


Figure 2 Residue Leu681 restricts the entrance of large cations. Dose-response curves for G683C (a) and M682C (b) mutants before and after treatment with MTSET (filled and empty circles, respectively) in the open (left) or closed state (right). (a) K_d values for G683C before MTSET application in the open or closed states of the channels were 397 ± 55 and 397 ± 8 nM, respectively. After MTSET, currents were abolished and fits could not be performed. (b) K_d values of M682C for MTSET applied in the open state were 218 ± 24 nM before treatment and 2 ± 10 nM after. K_d values for MTSET applied in the closed state were 199 ± 52 nM before treatment and 11 ± 7 nM after. (c) Above, L681C K_d values were 295 ± 18 nM before and 98 ± 9 nM after MTSET was applied in the open state. In the closed state were 347 ± 34 nM before and 405 ± 74 nM after MTSET treatment. Modification is significantly state-dependent (Student's *t*-test, $P < 0.01$). Below, dose-response curves for L681C before (filled circles) and after treatment with MTSEA (empty squares) in the open or the closed state were not significantly different (Student's *t*-test, $P > 0.1$). K_d values were 356 ± 48 nM before and 131 ± 16 nM after MTSEA in the open state and 259 ± 87 nM before and 98 ± 4 nM after MTSEA in the closed state. Group data are presented as mean \pm s.e.m., $n = 5$.

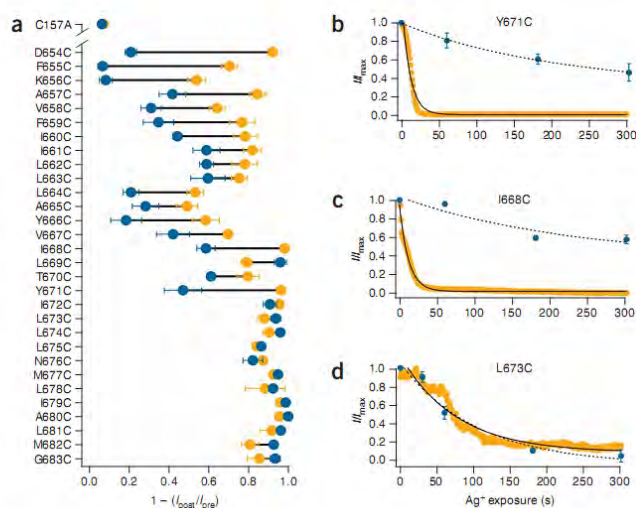


Figure 3 Ag⁺ modification reveals the presence of an intracellular gate for small ions at Tyr671. **(a)** Fractional modification for C157A and each of the 30 S6 mutants by treatment with Ag⁺ in the presence (orange symbols) or absence (blue symbols) of 4 μM capsaicin. Thick black bars serve as a visual aid. **(b–d)** Time courses of modification of the Y671C **(b)**, I668C **(c)** and L673C **(d)** mutants by Ag⁺ in the open (orange symbols) and closed state (blue symbols). Open-state modification data are from a representative experiment for each mutant, whereas closed-state modification data are from averages (mean ± s.e.m., $n = 6–8$ for each data point) obtained as described in the Online Methods section. Open-state modification second-order rates (k_{O}) are expressed as mean ± s.e.m., $n = 6–8$. Closed-state modification second-order rates (k_{C}) are the result of an exponential fit (dashed lines) to the final time course curve. In **b**, Y671C shows state-dependent modification, with $k_{\text{O}} = 8.6 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{C}} = 0.13 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In **c**, Modification of I668C is state-dependent, with $k_{\text{O}} = 13.8 \pm 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{C}} = 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In **d**, modification of L673C is state-independent, with $k_{\text{O}} = 0.86 \pm 0.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{C}} = 1.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. I , current obtained after Ag⁺ treatment; I_{max} , current obtained with 4 μM capsaicin.

a state-independent response, indicating that there is no change in accessibility for MTSET during gating in this region.

The mutant L681C, corresponding to the next residue in S6, showed a notable response: MTSET had a potentiating effect when applied in the open state but had no effect at all in the closed state (Fig. 2c, top). This state-dependent behavior suggests that the accessibility of L681C to MTSET may be hindered by a constriction of the pore in the closed state. To further validate this hypothesis, we performed the same experiment with MTSEA, which has a smaller diameter (3.6 Å)¹⁹, and found that MTSEA also had a potentiating but state-independent effect (Fig. 2c, below). These data suggest that access to Leu681 is restricted for cations the size of MTSET but not for molecules the size of MTSEA, suggesting the presence of an intracellular constriction located near this residue that controls the access for large cations. Nonetheless, in contrast to MTSET, which is positively charged at any pH, MTSEA is neutral at pH 7, allowing it to access residues in the protein through pathways other than the pore²⁰. Moreover, MTSEA is still a large molecule when compared with ions such as Na⁺ (0.97 Å), Ca²⁺ (0.94 Å) or even K⁺ (1.33 Å)^{21,22}. For this reason, MTSEA does not constitute an adequate reagent for probing the pore for state-dependent accessibility of smaller ions than MTSET. We decided to perform SCAM analysis of S6 using Ag⁺ because it reacts effectively with cysteines, it is nearly the same size of the permeant ions Na⁺ and K⁺ and it has been previously used as a probe for the accessibility of small ions in Kv channels^{21–23}.

Gated access of small ions through the TRPV1 pore

We first confirmed that Ag⁺ does not affect the activity of TRPV1-C157A by measuring the effects of Ag⁺ applied in the open or the closed state. We repeated this same measurement in each of the 30 cysteine-substituted mutants of the S6 and, in all cases where it had an effect, the presence of Ag⁺ caused a reduction of the initial capsaicin-activated current (Fig. 3a).

L681C and the following nine mutants (A680C to I672C) showed state-independent modification by Ag⁺, in agreement with

the results obtained with MTSEA. However, when we tested the Y671C mutant for state-dependent modification by Ag⁺, a strong effect became apparent: as Ag⁺ was applied in the open state, we observed an almost complete reduction of the current upon subsequent activation with capsaicin. When the patches were exposed to Ag⁺ in the closed state, only a fraction of the current was eliminated. Notably, all mutants above Tyr671 (less intracellular) showed the same state-dependent behavior (Fig. 3a). These data argue that access to Tyr671 and the residues above is gated for small permeant ions the size of Ag⁺, indicating that the activation gate of the TRPV1 channel resides just below the region where this tyrosine residue is located.

The data in Figure 3a were obtained by comparing the degree of modification between the open and closed states at a single time point. However, if the limiting effect of Ag⁺ is attained before the measured 5-min time point, a state-dependent modification could be falsely interpreted as state-independent. To discount this possibility, we measured the rates of modification in the closed and open states of key sites in the S6 segment (Fig. 3b–d and Supplementary Fig. 2). In accordance with our previous results, the modification rates of Y671C and of the more N-terminal I668C remain clearly state-dependent (Fig. 3b,c and Supplementary Fig. 2), whereas for residues that are more intracellular (L673C and L675C) than Tyr671, these rates remain basically unchanged in the closed and open states (Fig. 3d and Supplementary Fig. 2).

If the pore of TRPV1 had two constrictions located at Leu681 and Tyr671, it might be expected that disulfide bonds may be formed in a state-dependent manner between cysteines at any of these two sites because this type of interaction occurs if the two sulfhydryl groups are up to 4 Å apart^{24,25}. We explored this possibility by inducing the formation of disulfide bonds using copper phenanthroline (CuP), an oxidizing agent.

We introduced cysteines at positions 681 or 671 of the cysteineless TRPV1 channel, 18[–]TRPV1, and determined the effects of CuP on formation of disulfide bonds in the open state (Fig. 4a) (Supplementary Methods). CuP failed to produce a response in the

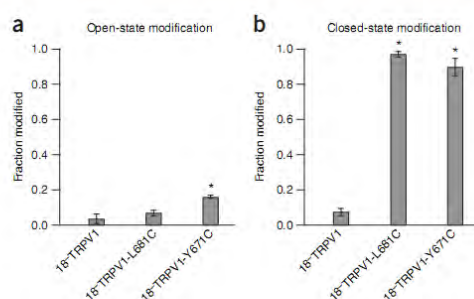


Figure 4 CuP induces state-dependent disulfide bonds in 18-TRPV1-L681C and 18-TRPV1-Y671C. (a) Bar graphs representing the fraction of current modified by copper phenanthroline (CuP) applied concomitantly with 4 μ M capsaicin (open state) for the 18-TRPV1, 18-TRPV1-L681C and 18-TRPV1-Y671C mutants. There are no significant differences between the cysteine-less channel 18-TRPV1 (0.035 ± 0.025) and 18-TRPV1-L681C (0.069 ± 0.016) after CuP treatment (Student's *t*-test, $P > 0.1$). A statistically significant difference (Student's *t*-test, $P < 0.005$) is seen when CuP is applied to 18-TRPV1-Y671C (0.16 ± 0.009) as compared to 18-TRPV1. (b) Bar graphs representing the effect of CuP applied in the absence of agonist (closed state) for the 18-TRPV1 (0.075 ± 0.02), 18-TRPV1-L681C (0.97 ± 0.01) and 18-TRPV1-Y671C (0.89 ± 0.05) mutants. A statistically significant (Student's *t*-test, $P < 0.001$) reduction of the current is seen for 18-TRPV1-L681C and 18-TRPV1-Y671C as compared to 18-TRPV1. Group data are presented as mean \pm s.e.m., $n = 5-7$.

18-TRPV1 background and in the 18-TRPV1-L681C mutant. In the case of 18-TRPV1-Y671C, however, we observed a small but statistically significant ($P < 0.005$; Fig. 4a) reduction in the current after treatment with CuP at saturating capsaicin concentration. This may be explained either by the unfavorable formation of a disulfide bond in the open state or, alternatively, by bonds formed cumulatively during the brief dwells of the channels into the closed state. Thus, we next analyzed the effects of CuP applied to the closed state of the channels. As expected, the treatment had no effect on activation of 18-TRPV1 channels (Fig. 4b). Conversely, both 18-TRPV1-L681C and 18-TRPV1-Y671C showed a strong sensitivity to CuP treatment, as evidenced by an almost complete reduction in the current. This reduction was not reversed by washout of CuP but was partially upturned by treating the patches with 20 mM DTT (that is, DTT application recovered $52 \pm 10\%$ and $50 \pm 4\%$ of channel function in 18-TRPV1-L681C and 18-TRPV1-Y671C, respectively). DTT had no effect on capsaicin-activated currents before CuP treatment (data not shown). These results support the hypothesis that both Leu681 and Tyr671 are part of regions that constrict upon closure of the channel, blocking the ion-conduction pathway.

If indeed Leu681 serves as a gate for large molecules such as MTSET, it is intriguing that CuP, a larger molecule, can reach the more intracellular residue at position 671 to induce disulfide bond formation in the closed state. The ability of CuP to form these disulfide bonds may reside in the fact that it is far more hydrophobic (polar area of 2.7 \AA^2 and apolar area of 601.3 \AA^2) than the MTSET molecule (polar area of 103.9 \AA^2 and apolar area of 311.9 \AA^2). Consequently, CuP may gain access to the 671 site using alternative pathways of lower dielectric constant than the pore, whereas MTSET can access this site only through the pore. If modification by MTSET

of cysteines in S6 is gated at Leu681, then a state-dependence of modification should be observed for residues above this position. In fact, the rates of modification of Y671C and other mutants above Leu681 by MTSET are faster in the open state than in the closed state. Moreover, the rates of modification of G683C by MTSET when applied in the open or the closed state do not differ (Supplementary Fig. 3 and Supplementary Methods), in accordance with the presence of a constriction located at Leu681.

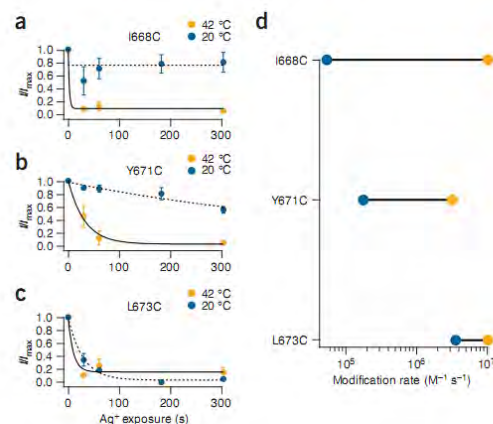
Role of Leu681 and Tyr671 in temperature gating

TRPV1 gating is also controlled by temperature, implying that this channel responds to stimuli that are very different in nature. However, because these activation mechanisms are allosterically coupled²⁶, these two stimuli are expected to converge in the opening of the pore so that conformational changes in the pore domain by either one should not be markedly different.

An implication of the above is that the capsaicin-activated gate should also function as a gate for temperature activation. To test this hypothesis, we measured the rates of modification by Ag^+ in the closed and open states for the I668C, Y671C and L673C mutants when the channel is gated by temperature. We found that I668C and Y671C were modified at a faster rate in the open state as compared to in the closed state, whereas the rate of modification of L673C showed no state-dependence (Fig. 5).



Figure 5 Gating of the TRPV1 channel by temperature. (a-c) Time courses of modification of the I668C (a), Y671C (b) and L673C (c) mutants by Ag^+ applied in either the open (42 °C, orange symbols) or the closed state (20 °C, blue symbols). Continuous or dashed lines are fits of the open- or closed-state modification data to an exponential, respectively. (a) I668C. The open-state modification second-order rate (k_0) of $10.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ is a lower limit because the modification is faster than the earliest obtained data point. The closed-state modification second-order rate (k_C) was estimated to be $0.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, although the process is too slow to be accurately measured. In b, modification of Y671C is state-dependent, with $k_0 = 3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_C = 0.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In c, L673C modification has rates $k_0 = 10.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is within the lower limit, as in a, and $k_C = 3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (d) Comparison of the rates of open-state (orange symbols) or closed-state (blue symbols) modification obtained from (a-c). Thick black bars serve as a visual aid. $n = 3$ for each data point. Group data are presented as mean \pm s.e.m.



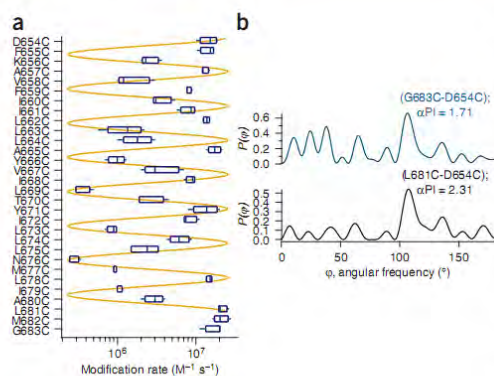


Figure 6 The S6 segment has an α -helical character. (a) Box plot of the open-state modification rates with Ag^+ for each of the 30 mutant channels. The vertical line within each box indicates the median, boxes show the twenty-fifth and seventy-fifth percentiles, and whiskers show the fifth and ninety-fifth percentiles of the data ($n = 5$). A sine function with a period of 3.4 was superimposed to the data (orange line) as a visual aid. (b) Analysis of the periodicity of the S6 segment. The blue trace is the power spectrum of all the S6 residues; the numbering is indicated in the figure, as is the α -periodicity index, αPI . The black spectrum is obtained when the three C-terminal residues (683–681) are removed.

© 2009 Nature America, Inc. All rights reserved.

npg

The α -helical character of S6

The membrane-spanning domains of ion channels are often organized as α -helices^{27,28}. Thus, an α -helical S6 would be exposed to the aqueous hydrophilic environment of the inner pore, to the membrane and to the rest of the protein, with the residues facing the aqueous cavity being more accessible. If the S6 is indeed an α -helix, a periodicity of nearly 3.6 residues per turn would be expected²⁹ in the accessibility of the residues to modifying reagents. To test the helical character of the S6, we measured the rate of modification of each mutant by Ag^+ in the open state (Fig. 6a). As expected, there was a large variation in the time courses for each of the mutants. Consistent with our previous results, both L681C and Y671C are among the residues with the highest modification rates, in agreement with these amino acids facing the pore.

To obtain a quantitative measurement of the periodicity of the modification data, we performed harmonic analysis using a discrete Fourier transform³⁰. The power spectrum, $P(\phi)$, shows a strong peak at 107° (Fig. 6b), which has been suggested to be more typical for membrane-spanning α -helices than the 100° seen in α -helices from soluble proteins³¹. The α -helical character can be quantified by evaluating an α -periodicity index, αPI , where values greater than 2 have been shown to represent amphipathic helices³⁰. The αPI value for all 30 residues is 1.71, which suggests a poor α -helical

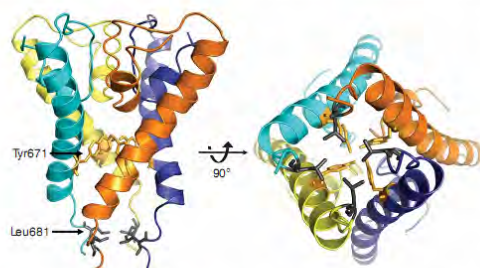


Figure 7 Homology model of TRPV1 based on the Kv1.2 structure. Lateral (left) and bottom (right) views of the helical S6 transmembrane segments are depicted in different colors. Residues Leu681 and Tyr671, which give rise to the two main constrictions in the TRPV1 pore, are depicted as black and orange side chains, respectively.

organization. However, if the three most C-terminal residues (683–681), which have high modification rates, are omitted from the analysis, αPI becomes 2.31, suggesting that those residues do not form part of an α -helix.

An unexpected result is that the modification of some of the uppermost residues in the pore occurs rapidly, although steric hindrances are expected to be larger owing to the presence of the selectivity filter and the putative pore helix. It may be possible that Ag^+ accesses these residues by a non-pore-dependent pathway. On the other hand, if Ag^+ were accessing these residues through the pore, then the presence of an intracellular pore blocker would protect these sites from modification. Consistent with the rest of our data, we found that the rates of modification for two of these more N-terminally located mutants (A657C and D654C) in the presence of capsaicin and the pore-blocker tetrabutylammonium (TBA) are, at least, one order of magnitude slower than in the absence of blocker (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Methods), confirming that Ag^+ reaches these sites through the pore. It is possible that this region of S6 is loosely packed against the pore, allowing for rapid modification of cysteines introduced in this region. Notably, the TRPV1 pore has been shown to be dynamic, as evidenced by gating-induced selectivity changes³². Precise structural data concerning the topology of the upper pore of the channel are required to completely solve this conundrum.

A SCAM-based model for the S6 region of the TRPV1

To include all of our results in a single functional model, we used the Kv1.2 channel as a template to construct a homology model of the pore domain of TRPV1. Our model (Fig. 7 and Supplementary Methods) is consistent with our experimental data showing that the four aromatic residues, Tyr671 located at the middle of the S6 segments, face the hydrophilic lumen of the pore and are close enough to each other to permit interactions between them. Another feature of the model is that the four Leu681 side chains fit well into a large internal hydrophobic pocket at the bottom of the pore domain. Additionally, residues 681–683 are not part of an α -helix, consistent with our periodicity data.

DISCUSSION

We performed a cysteine-accessibility study to gain structural insight into the architecture and possible gating rearrangements of the S6 of TRPV1. This approach revealed that the S6 segment undergoes capsaicin- and temperature-dependent conformational transitions that change its accessibility, suggesting that these movements are responsible for channel activation.

To date, there are only a handful of models describing the activation gate of ion channels based on functional data^{21,33–36}. For TRP channels, such a description is not yet available.

It was previously suggested³⁷ that residues within the inner-pore helix are candidates for sites of the gating apparatus of TRPV1. However, owing to the fact that TRPV1 does not show a canonical

point of flexibility such as glycine or proline, as typically found in K⁺ channels³⁸, this study could not provide functional support for identifying a gating hinge.

We show that Leu681, located quite intracellularly, impedes the access of ions of the size of MTSET (5.8 Å) in the closed state but not of the size of MTSEA (3.6 Å) or Ag⁺ (1.26 Å). Moreover, the state-dependent modification of L681C by MTSET, together with the apparent state-independent block of the TRPV1 by tetraethylammonium (TEA)¹⁸, indicates that a molecule at least the size of TEA (8 Å) can remain inside the closed channel pore.

By using Ag⁺, we were able to determine that a region located further up the S6 segment (near residue 671) does indeed impede the access of smaller ions such as Ag⁺ in a state-dependent fashion. Moreover, we have probed Leu681 and Tyr671 for proximity, using the formation of disulfide bonds as a reporter, and our results support the idea that these regions comprise physical constrictions. Tyr671 has been found to affect Ca²⁺-permeation properties in the TRPV1³⁹, in accordance with this residue facing the lumen of the pore.

Does state-dependence of Ag⁺ accessibility at Tyr671 necessarily imply that this residue provides an energy barrier for the access of permeant ions? Gated access of Ag⁺ may reflect gated access of a permeant ion such as K⁺ or Na⁺, as it shares physical-chemical properties with them. It has been pointed out that, if Ag⁺ ions behave in the channel in a similar manner to the permeant ions, then the fold change in modification rates from the closed to the open state is expected to reflect the conductance fold change for the same process²¹. In our experiments, the rate fold change for Y671C is 0.028. Under our recording conditions, the open single-channel current is ~10 pA, so the current of the channel upon closure of the 671 gate would be ~0.3 pA, and thus indistinguishable from the recording noise, effectively behaving as a closed state.

A notable observation in our Ag⁺-modification experiments is the 'inverted' state-dependence of modification of L669C (Fig. 3a and Supplementary Fig. 2). A possible explanation is that Ag⁺ uses a path other than the pore to gain access to this site and there is a state-dependent conformational change that exposes the residue in the closed state, whereas it remains inaccessible in the open state. A different possibility is that this residue faces the pore lumen in the closed state but not in the open state, as a consequence of the conformational changes in the pore during gating. Because the open probability in the absence of capsaicin is not zero⁴⁰, Ag⁺ would be able to gain access to the channel and stabilize the closed state, raising the rate of modification in the closed as compared to the open state, where the residue remains inaccessible. This 'reversed' state-dependence has been previously observed in similar experiments with other mutant ion channels⁴¹.

Another interesting observation is that a couple of mutants (L681C and M682C) show potentiation in response to capsaicin when treated with MTSEA or MTSET but are inhibited when treated with Ag⁺. These variations may be explained by charge differences between cysteine-modifying agents because both MTSEA and MTSET are charged at pH 7 (ref. 20), whereas Ag⁺ is neutral after reacting with a cysteine. Under this notion, the positive charges from the MTS reagents would come closer to each other during the closed state of the channels, causing electrostatic repulsion and thus destabilizing this state³⁵.

Previous work⁴² showed that some residues of the S6 segment have an important role in the response of TRPV3 to temperature but not to other agonists. We did not explore the effect of mutations in the S6 on temperature sensitivity. However, consistent with the idea that the regions located near Leu681 and Tyr671 are important in the

regulation of access of ions into the TRPV1 pore, we have also demonstrated that, when the channel is activated by heat, these regions continue to behave as physical constrictions for ion flux. It has been suggested that TRP channels are modular proteins in which the different domains or modules are allosterically coupled to each other but function independently^{26,43}. The data presented here are in line with this idea.

By using similar cysteine-accessibility methods, other groups have suggested a role for the pore helix and selectivity filter in the gating process of TRP channels⁴⁴. These data do not conflict with ours because the presence of an intracellular activation gate at the S6 does not preclude state-dependent conformational changes in other regions of the channel such as the S5-S6 loop, as occurs in Kv channels with C-type inactivation⁴⁵ or in the conformational changes of the pore of mutant *Shaker* channels⁴⁶. Notably, the TRPV1 pore is dynamic, allowing changes in selectivity in response to different agonists and exposure times³². Still, we did not observe this phenomenon in our studies, probably because we used only a single permeant ion in our experiments^{18,40}.

The S6 transmembrane region of voltage-gated ion channels has been described as an α -helix²⁷. Studies of accessibility in K⁺-selective channels have also detected α -helical periodicity in other transmembrane segments⁴⁷. We find that some of the cysteines (including Y671C) introduced along S6 contribute to the lining of the pore. We have observed differences in modification rates of introduced cysteines with, presumably, the pore-lining ones being modified at faster rates than those that probably face the lipid interface and show slow modification rates because they might be subjected to stronger steric hindrances. These data reflect the helical character of the S6 domain of TRPV1.

Functional and structural studies in K⁺ channels have provided valuable information on the location and nature of the activation gate in ion channels. In this regard, we have used the Kv1.2 structure²⁷ to produce a model of TRPV1 that correlates with our functional data. Sequence alignment of the S6 of Kv1.2 and TRPV1 reveals conservation of this region among these channels. Notably, the 'Pro-Val-Pro' region of Kv1.2, which is responsible for the flexibility and gated access of ions into the pore of this channel, aligns near Tyr671 of TRPV1 (Supplementary Fig. 5a). Moreover, this residue is found in an identical position in another channel of the TRPV subfamily, TRPV2, and coincides with a phenylalanine, another aromatic residue, in TRPV3 and TRPV4 (Supplementary Fig. 5b). Further investigations should clarify the importance of this region in the rest of the TRP channel family.

The final model we present here, supported by our experimental results, constitutes a new description of structural elements of the S6 transmembrane segment, which gate the access of ions to the pore of a member of the TRP channel family. Our model may prove useful for future understanding of the structure-function relationships in TRP channels.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/nsmb/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Structural & Molecular Biology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Julius at the University of San Francisco for providing the TRPV1 cDNA, and S. Simon at Duke University and M. Rosenbaum at Instituto de Ciencias Nucleares de Universidad Nacional Autónoma de México for thoughtful discussion of this manuscript. We also thank L. Ongay, S. Rojas, A. Aguilera

Jiménez, J. Barbosa, A.M. Escalante and F. Sierra at Instituto de Fisiología Cédular, Universidad Nacional Autónoma de México, for expert technical support. This work was supported by grants from La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) IN200308-3 to T.R. and IN202006-3 to L.D.I., and CONACyT No. 58038 to T.R. and No. 48990 to L.D.I. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Doctorate degree in Biomedical Sciences of H.S. at the UNAM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.S., A.J.-O., E.H.-G. and T.R. performed experiments; I.L. did molecular biology and cell culture; M.S.-G. and I.L.A.-O. performed molecular modeling; L.D.I. and T.R. designed experiments, analyzed data and wrote the paper; all authors discussed the data.

Published online at <http://www.nature.com/nrsmb/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Clapham, D.E., Runnels, L.W. & Strubing, C. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 387–396 (2001).
- García-Martínez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J.M. & Ferrer-Montiel, A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 32552–32558 (2000).
- Montiel, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* **2005**, re3 (2005).
- Salazar, H. et al. A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci.* **11**, 255–261 (2008).
- Macpherson, L.J. et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* **15**, 929–934 (2005).
- Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
- Montiel, C. Thermosensation, hot findings make TRPNs very cool. *Curr. Biol.* **13**, 476–478 (2003).
- Caterina, M.J. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).
- Julius, D. & Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203–210 (2001).
- Huang, J., Zhang, X. & McNaughton, P.A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.* **4**, 197–206 (2006).
- Jara-Oseguera, A.S., S.A. & Rosenbaum, T. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 255–269 (2008).
- Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A. & Eid, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 357–372 (2007).
- Gaudet, R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst.* **4**, 372–379 (2008).
- Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905–918 (2007).
- McCleverty, C.J., Koesema, E., Patapoutian, A., Lesley, S.A. & Kreuzsch, A. Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci.* **15**, 2201–2206 (2006).
- Jin, X., Touhey, J. & Gaudet, R. Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J. Biol. Chem.* **281**, 25006–25010 (2006).
- Moiseenkova-Bell, V.Y., Stanciu, L.A., Serysheva, I.I., Tobe, B.J. & Wensel, T.G. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7451–7455 (2008).
- Jara-Oseguera, A., Llorente, I., Rosenbaum, T. & Islas, L.D. Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *J. Gen. Physiol.* **132**, 547–562 (2008).
- Dodier, Y. et al. Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 6853–6862 (2004).
- Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y. & Yellen, G. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* **35**, 797–804 (1996).
- del Camino, D. & Yellen, G. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron* **32**, 649–656 (2001).
- Greenwood, A. & Earnshaw, N. *Chemistry of the Elements* 2nd edn. 1341 (Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997).
- Lu, Q. & Miller, C. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science* **268**, 304–307 (1995).
- Careaga, C.L. & Falke, J.J. Thermal motions of surface α -helices in the D-galactose chemosensory receptor. Detection by disulfide trapping. *J. Mol. Biol.* **226**, 1219–1235 (1992).
- Kobashi, K. Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by o-phenanthroline copper complex. *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 239–245 (1968).
- Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaezer, C. & Vargas, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**, 427–438 (2007).
- Long, S.B., Campbell, E.B. & Mackinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
- Doyle, D.A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
- Eisenberg, D. The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11207–11210 (2003).
- Cornette, J.L. et al. Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **195**, 659–685 (1987).
- Komiyama, H., Yeates, T.O., Rees, D.C., Allen, J.P. & Feher, G. Structure of the reaction center from *Rhodospirillum rubrum* R-26 and 2.4-Å symmetry relations and sequence comparisons between different species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9012–9016 (1988).
- Chung, M.K. & Caterina, M.J. TRP channel knockout mice lose their cool. *Neuron* **54**, 345–347 (2007).
- Ding, S., Ingleby, L., Ahern, C.A. & Horn, R. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **126**, 213–226 (2005).
- Conrateras, J.E., Srikumar, D. & Holmgren, M. Gating at the selectivity filter in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3310–3314 (2008).
- Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. A cysteine scan of the inner vestibule of cyclic nucleotide-gated channels reveals architecture and rearrangement of the pore. *J. Gen. Physiol.* **121**, 563–582 (2003).
- Li, M., Chang, T.H., Silberberg, S.D. & Swartz, K.J. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **11**, 883–887 (2008).
- Susankova, K., Ettrich, R., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J. Neurosci.* **27**, 7578–7585 (2007).
- Magdovich, E. & Yifrach, O. Conserved gating hinge in ligand- and voltage-dependent K⁺ channels. *Biochemistry* **43**, 13242–13247 (2004).
- Mohapatra, D.P., Wang, S.Y., Wang, G.K. & Nau, C. A tyrosine residue in TM6 of the vanilloid receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 314–324 (2003).
- Oseguera, A.J., Islas, L.D., Garcia-Villegas, R. & Rosenbaum, T. On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophys. J.* **92**, 3901–3914 (2007).
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E. & Yellen, G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**, 175–184 (1997).
- Grandl, J. et al. Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nat. Neurosci.* **11**, 1007–1013 (2008).
- Brauchi, S., Orta, P. & Latorre, R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15494–15499 (2004).
- Yeh, B.L., Kim, Y.K., Jabbar, W. & Huang, C.L. Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. *EMBO J.* **24**, 3224–3234 (2005).
- Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.Y. & Jurman, M.E. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys. J.* **66**, 1068–1075 (1994).
- Zheng, J. & Sigworth, F.J. Selectivity changes during activation of mutant Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **110**, 101–117 (1997).
- Cortes, D.M., Cuervo, L.G. & Perozo, E. Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J. Gen. Physiol.* **117**, 165–180 (2001).

A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic

Héctor Salazar^{1,5}, Itzel Llorente^{1,5}, Andrés Jara-Oseguera^{1,2,5}, Refugio García-Villegas³, Mika Munari⁴, Sharona E Gordon⁴, León D Islas² & Tamara Rosenbaum¹

Some members of the transient receptor potential (TRP) family of cation channels mediate sensory responses to irritant substances. Although it is well known that TRPA1 channels are activated by pungent compounds found in garlic, onion, mustard and cinnamon extracts, activation of TRPV1 by these extracts remains controversial. Here we establish that TRPV1 is activated by pungent extracts from onion and garlic, as well as by allicin, the active compound in these preparations, and participates together with TRPA1 in the pain-related behavior induced by this compound. We found that in TRPV1 these agents act by covalent modification of cysteine residues. In contrast to TRPA1 channels, modification of a single cysteine located in the N-terminal region of TRPV1 was necessary and sufficient for all the effects we observed. Our findings point to a conserved mechanism of activation in TRP channels, which provides new insights into the molecular basis of noxious stimuli detection.

The family of TRP channels is composed of a large variety of cation-permeable channels and shows a great diversity of activation mechanisms. Members of the TRPV subfamily are expressed in sensory neurons and other cell types, and mediate a large number of sensory responses¹. For example, TRPV1 responds to a variety of stimuli, such as high temperatures, tissue damage and exposure to pungent compounds such as capsaicin^{2,3}, all of which converge on these channels and underlie the common perceptual experience of pain.

Recently, pungent or irritant compounds other than capsaicin have been found to activate TRPV1 channels⁴. Some of these compounds are present in plants from the *Allium* genus (that is, onion and garlic)^{5–8}. Notably, the same compounds found in onion and garlic extracts are also capable of activating TRPA1 (refs. 4,9,10), another member of the TRP family. TRPA1 and TRPV1 are expressed in the same subset of dorsal root ganglia (DRG) neurons, and to date there is controversy over whether both or only one of these molecules is the target for pungent compounds.

In the case of TRPA1 channels, activation by some pungent agents occurs through their direct covalent modification of several cysteines in the N-terminal domain⁹.

The crystal structure of the N-terminal region of the TRPV1 channel was recently solved and shown to be formed by ankyrin repeats¹¹. The N-terminus of TRPA1 has also been proposed to be formed by ankyrin repeats. The role of the N-terminal ankyrin repeats in the function of TRP channels has remained obscure; however, recent studies have demonstrated that this region forms a multi-ligand

binding domain that mediates the response to ATP, PIP₂ and calmodulin in TRPV1 (ref. 11).

In this study, we directly addressed the participation of TRPV1 in the response to cysteine-modifying agents, including those compounds found in onion and garlic extracts, and examine the mechanism by which they activate this channel. Using a combination of electrophysiological and behavioral assays in wild-type, TRPV1- and TRPA1-null mice, we established that TRPV1 also participates in the response to allicin *in vivo*. We extended this analysis to activation of heterologously expressed TRPV1 by allicin and other cysteine-modifying compounds. We identified a single cysteine for the interaction of these compounds in the N-terminus of TRPV1 and have produced a functional cysteineless TRPV1 channel, which should prove to be a valuable tool for future structure-function studies. The results reported here provide us with new insights into the regulatory functions of the N-terminal region in the TRPV1 channel.

RESULTS

Both TRPA1 and TRPV1 are activated by allicin

To determine whether TRPV1 could be activated by compounds found in onion and garlic, we explored the effects of these extracts in membrane patches from dissociated mouse DRG neurons. We first applied a saturating concentration of capsaicin (4 μM) to inside-out patches to test for the presence of TRPV1 channels in these cells. After removal of capsaicin, subsequent application of either onion or garlic extract elicited smaller, but considerable, currents. Finally, the currents activated by capsaicin, onion or garlic were all blocked by ruthenium

¹Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Circuito escolar S/N, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México. ³Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México, D.F., 07360, México. ⁴Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, 1705 NE Pacific Street, Seattle, Washington, 98195, USA. ⁵These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.R. (trotenba@ifc.unam.mx).

Received 2 January; accepted 24 January; published online 24 February 2008; doi:10.1038/nn2056



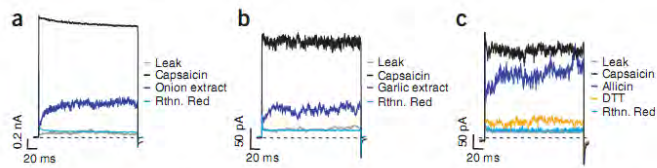


Figure 1 DRG neurons respond to onion and garlic extracts and to alllicin. (a–c) Onion (a) and garlic (b) extracts, as well as alllicin (200 μ M) (c), activate currents in inside-out patches from DRG neurons. Traces shown are representative of five equal experiments obtained by stepping the voltage from 0 mV to 110 mV for 200 ms. Leak currents were obtained before any treatment was applied. Membrane patches from DRG neurons were first exposed to 4 μ M capsaicin to identify TRPV1-expressing cells. Extracts or alllicin were applied to capsaicin-responsive membrane patches after capsaicin had been washed from the bath. All currents were blocked by ruthenium red (Rthn. Red, 10 μ M) applied together with either of the extracts or with alllicin. Application of DTT (10 mM) to patches reversed alllicin effects.

red, a nonspecific blocker of TRP channels (Fig. 1a,b). These results suggest that TRPV1 may be a target of garlic and onion compounds.

We next tested whether the effects of onion and garlic extracts are due to alllicin, the same compound responsible for activation of TRPA1. Alllicin is a cysteine-reactive species and a major component of onion and garlic^{5–8,12}. Application of alllicin to inside-out patches from DRG neurons activated a similar outward current as the one activated by the extracts (Fig. 1c). The mechanism underlying this effect appeared to arise from covalent modification, as currents did not spontaneously reverse on removal of alllicin from the bath. Consistent with this mechanism, application of 10 mM dithiothreitol (DTT), a reducing agent, produced a near-complete reversal of activation by alllicin (Fig. 1c).

Given the present controversy regarding whether alllicin's effects are mediated by TRPA1 or TRPV1 (refs. 4,9,10), we carried out electrophysiological recordings in DRG neurons from *Trpv1*^{-/-} and *Trpa1*^{-/-} mice to establish the physiological response of each of these channels to alllicin and to onion and garlic extracts. Application of 200 μ M alllicin to DRG neurons isolated from these mice elicited a depolarization in the range of 7–20 mV and subsequent action potential firing (Fig. 2a,b). This result clearly indicates that TRPV1 and TRPA1 in DRG neurons are both involved in the response to alllicin.

A cationic current could be activated in response to alllicin in DRG neurons from *Trpv1*^{-/-} and *Trpa1*^{-/-} mice (Fig. 2c,d). Alllicin activation of these currents was characterized by the fractional activation, the ratio

of current activated by alllicin to current activated by each of the well documented agonists for each of the TRP channels addressed in this study, namely capsaicin (4 μ M) or allyl isothiocyanate (AITC, 200 μ M). This fractional activation was 0.4 ± 0.06 ($n = 10$) for the *Trpa1*^{-/-} cells and 0.85 ± 0.05 ($n = 10$) for *Trpv1*^{-/-} cells (data not shown).

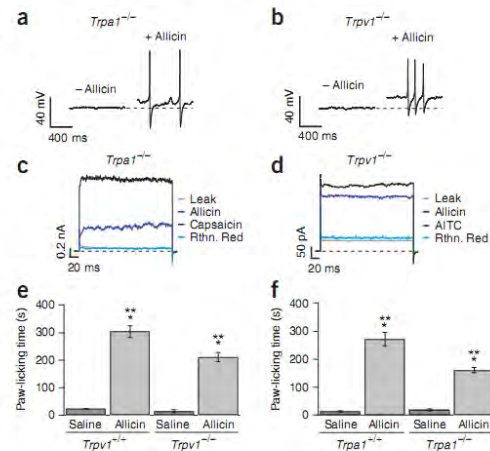
Moreover, in the *Trpa1*^{-/-} mice, where only TRPV1 is present, we found that those cells that did not respond to capsaicin did not respond to alllicin either (19 out of 19 cells), whereas in the TRPV1-null mice, cells that did not respond to alllicin did not respond to AITC (18 out of 18). These data show that the presence of TRPV1 or TRPA1 channels is a requirement for the response to alllicin and that TRPV1 is a target for alllicin.

To assess the physiological role of TRPV1 in pain-related behavior, we injected either saline solution or alllicin-containing solution (2 μ g) into the left front paw of *Trpv1*^{-/-}, *Trpa1*^{-/-} and their littermate wild-type mice, using a protocol similar to one previously reported¹³, and measured the total time that the animals spent licking the affected paw during a 30-min period. *Trpv1*^{-/-} and *Trpa1*^{-/-} mice showed a significant increase in paw-licking time when injected with alllicin as compared with the animals injected with only saline solution ($P < 0.01$; Fig. 2e,f). We found it interesting that the *Trpv1*^{-/-} mice showed a more pronounced reaction to the treatment when compared with the *Trpa1*^{-/-} animals, but the reaction in both types of mice was significantly less intense than that observed for their corresponding wild-type littermates ($P < 0.01$; Fig. 2e,f). These results strongly indicate that alllicin is capable of inducing a painful stimulus that is mediated not only through activation of TRPA1, in *Trpv1*^{-/-} mice, but also through the activation of TRPV1, as evidenced by the behavioral response observed in *Trpa1*^{-/-} mice.

Activation of native and heterologously expressed TRPV1

The subset of DRG neurons that express TRPV1 also express TRPA1 (ref. 14), so the pungent compound-induced currents we observed in

Figure 2 Alllicin induces TRPA1- and TRPV1-mediated action potentials and behavioral pain-like response. (a,b) Alllicin-induced action potentials recorded from mice DRG neurons from *Trpa1*^{-/-} (a) and *Trpv1*^{-/-} (b) mice. Membrane potential before (left) and after (right) application of 200 μ M alllicin. The dotted line denotes resting membrane potential ($n = 6$ per genotype). (c,d) Current activation by alllicin. Representative recordings obtained from *Trpa1*^{-/-} (c) and *Trpv1*^{-/-} (d) DRG neurons ($n = 10$ per genotype). (e,f) Pain-related behavior, as determined by the time spent licking the injected paw. Alllicin-injected animals spent more time licking the affected paw (210 ± 17 s for *Trpv1*^{-/-} and 161 ± 10 s for *Trpa1*^{-/-} mice) than did those injected with saline (14.5 ± 5 s for *Trpv1*^{-/-} and 18.5 ± 4 s for *Trpa1*^{-/-} mice). The response of *Trpv1*^{-/-} and *Trpa1*^{-/-} mice to alllicin was also smaller than the response of their wild-type (WT) littermates (304 ± 21 s for TRPV1-WT background and 271 ± 25 s for TRPA1-WT background). Saline injection into wild-type animals produced a short licking response (22.5 ± 0.25 s for TRPV1-WT background and 13 ± 2 s for TRPA1-WT background). * indicates a significant difference between the saline- and alllicin-injected animals ($P < 0.01$). ** indicates a significant difference ($P < 0.01$) on comparison of wild-type and knockout animals injected with alllicin (Student's *t*-test, $n = 8$ per genotype for all experiments). Data are mean \pm s.e.m.



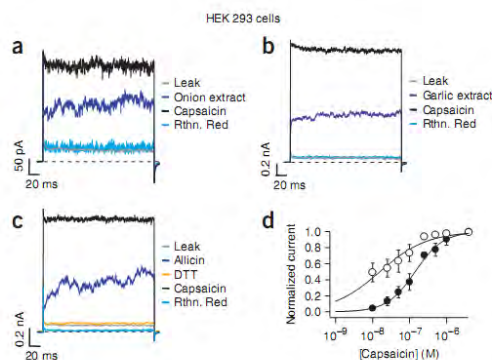


Figure 3 Heterologously expressed TRPV1 channels respond to pungent compounds. (a–c) Currents from inside-out patches were obtained as in Figure 1. Onion (a) and garlic (b) extracts and alllicin (c) activate currents in HEK293 cells expressing TRPV1. (d) Dose response for activation by capsaicin before (filled symbols) and after (empty symbols) exposure of patches from HEK293 cells to alllicin. Smooth curves are fits with the Hill equation. K_D values before (141 ± 39 nM) and after (24 ± 14 nM) alllicin were statistically different (Student's *t*-test, $P < 0.05$, $n = 5$). Data are mean \pm s.e.m.

wild-type cells (Fig. 1) were likely the result of activation of either channel type. To determine whether isolated TRPV1 can be activated by onion and garlic extracts, we examined the responses of TRPV1 heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK293) cells. When onion or garlic extracts or alllicin were applied to inside-out patches from TRPV1-transfected cells, we observed robust channel activation (Fig. 3a–c). TRPV1-mediated currents in HEK293 cells activated by these compounds were blocked by ruthenium red and required DTT to reverse activation. DTT did not affect either capsaicin- or temperature-mediated activation of TRPV1 (Supplementary Fig. 1 online). Patches from HEK293 cells expressing only green fluorescent protein (GFP) did not respond to capsaicin, or to any of the extracts or cysteine-modifying agents used (Supplementary Fig. 2 online). From these experimental data,

we concluded that TRPV1 can be robustly activated by onion and garlic extracts (Fig. 3a,b) and by purified alllicin (Fig. 3c).

To determine whether alllicin is a channel activator or an allosteric regulator of capsaicin activation, we examined whether alllicin could modify the response of TRPV1 to capsaicin. We measured the capsaicin dose-response by applying various concentrations of this agonist to the cytoplasmic surface of inside-out patches from HEK293 cells expressing TRPV1. After carrying out the initial measurements (Fig. 3d, filled symbols), we exposed the patches for 2 min to alllicin and subsequently re-measured the capsaicin-activated currents. We found a decrease in the apparent dissociation constant (K_D), determined from fits to the Hill equation¹⁵ (Fig. 3d, empty symbols). A possible interpretation of these results is that alllicin is capable of making TRPV1 channels more sensitive to capsaicin, presumably through an allosteric coupling mechanism. On the other hand, it is also possible that alllicin acts as an independent activator. We sought to explore these possibilities first by establishing if other cysteine-modifying reagents were capable of supporting channel activation and then by exploring the mechanism of alllicin activation.

Cysteine-modifying reagents induce TRPV1 activation

Activation of TRPA1 by pungent compounds is known to be the result of covalent modification of three cysteine residues in the amino-terminal region. The ability of DTT to reverse TRPV1 activation by onion and garlic extracts and by alllicin suggested that cysteine modification has a role in TRPV1 activation as well. To explore this possibility, we tested whether cysteine-modifying reagents other than alllicin could act as activators of TRPV1. Using inside-out patches from DRG neurons and TRPV1-transfected HEK293 cells, we were able to activate channels by applying 2 mM 2-aminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA). This activation was reversed only after application of DTT, and the currents could be blocked by ruthenium red (Fig. 4a,b). The time course of activation by MTSEA occurred with a time constant of 13.1 ± 2 s ($n = 3$; Fig. 4c). As with alllicin, treatment with MTSEA altered the channel's response to capsaicin, reflected in a leftward shift in the K_D (Fig. 4d). When [2-(trimethylammonium) ethyl] methanethiosulfonate chloride (MTSET) was used, the K_D for capsaicin activation was also decreased (Fig. 4e).

Because the application of these cysteine-modifying reagents was sufficient to produce TRPV1 current increases, we sought to determine

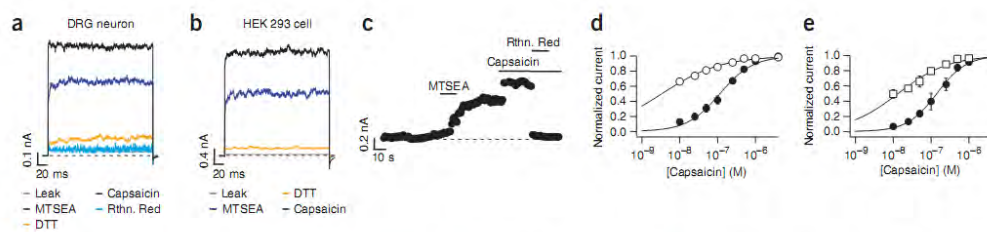


Figure 4 Cysteine-modifying reagents act as activators of TRPV1 channels. (a,b) MTSEA promotes activation of currents in inside-out patches from DRG neurons (a) and HEK293 cells (b). The voltage protocol was the same as in Figure 1. Leak currents and currents after MTSEA (2 mM) were measured and then DTT (10 mM) was applied, followed by capsaicin (4 μ M). Ruthenium red (10 μ M), applied together with MTSEA, blocked currents (representative traces of five experiments). (c) Activation of TRPV1 by MTSEA. Bars indicate the application of 2 mM MTSEA, 4 μ M capsaicin and 10 μ M Ruth. Red. Voltage was stepped from a holding potential of 0 mV to 100 mV at 1 Hz. A 10-s application of MTSEA to membrane patches expressing TRPV1 channels was enough to induce current activation equivalent to 60–70% of the current activated by 4 μ M capsaicin. Ruthenium red blocks the currents to initial leak levels. (d,e) Dose responses for activation of TRPV1 channels by capsaicin before (filled symbols) and after (empty symbols) MTSEA (d) and MTSET (e). Smooth curves are fits with the Hill equation. K_D values before (124 ± 25 nM) and after (4 ± 1 nM) MTSEA or before (158 ± 38 nM) and after (8 ± 3 nM) MTSET were statistically different for both cases (Student's *t*-test, $P < 0.002$; $n = 5$ and $n = 4$, respectively). Data are mean \pm s.e.m.

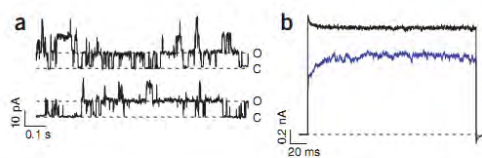


Figure 5 MTSEA increases open probability in TRPV1 in the absence of capsaicin. (a) Channel openings in the absence of agonist in an inside-out membrane patch. (b) Macroscopic currents induced by MTSEA (blue trace) and capsaicin (4 μ M) after MTSEA (black trace) in the same patch as in a. The number of channels in the patch was \sim 133.

whether these compounds promoted activation of the channel by measuring the open probability in the absence of capsaicin. Comparison of the capsaicin-independent opening probability before MTSEA and after cysteine modification resulted in significantly increased open probability (from 0.0016 ± 0.0009 to 0.45 ± 0.08 after exposure to MTSEA, $P < 0.001$, $n = 5$, Student's *t*-test; **Figure 5a,b** and data not shown). The single-channel conductance (g_s) was not affected, as determined by non-stationary noise analysis of macroscopic currents ($g_s = 12.3 \pm 5$ pS and 14.1 ± 3 pS before and after MTSEA modification, $n = 3$; data not shown).

This result indicated that cysteine modification alone was sufficient to produce channel activation, although allosteric interactions between different activation mechanisms are still possible, as is the case for activation by capsaicin and voltage¹⁵, and voltage and temperature-dependent activation¹⁶. It is therefore clear that cysteine modifiers are activators of the channel, as their action did not depend on the presence of capsaicin. Other cysteine-modifying reagents known to activate TRPA1 channels, such as 200 μ M AITC, 100 μ M cinnamaldehyde and 2 mM *N*-ethyl maleimide, did not activate TRPV1 channels, neither in inside-out patches (**Supplementary Fig. 3** online) nor in cell-attached patches (data not shown), in accordance with previous reports^{9,17}.

Residues responsible for TRPV1 activation by allicin

Some of the cysteines in the pore region of TRPV1 are modifiable from the extracellular side^{18,19}. To assess the localization of any of the modifiable cysteines responsible for the effects seen here, we carried out experiments including free cysteine in the patch pipette to act as a scavenger of membrane-permeable reactive compounds, both for inside-out and outside-out patches.

The presence of free cysteine in the opposite side to which MTSEA was applied insured that any molecules that permeated the membrane were quickly reacted, so that modification was only possible on the side of application. When channels in inside-out patches were activated with a subsaturating capsaicin concentration (50 nM) and free cysteine (20 mM) was present in the extracellular side of the channels, currents could be potentiated by the application of MTSEA to the intracellular side (**Supplementary Fig. 4** online). In contrast, in outside-out patches with the excess of free cysteine located at the intracellular face of the channels, MTSEA applied to the extracellular region did not produce current potentiation (**Supplementary Fig. 4**). These results lead us to conclude that the cysteine or cysteines responsible for the activation by modifying agents are located in an intracellular region of the channel.

The rTRPV1 channel contains 18 cysteines in its primary sequence. To identify the cysteine(s) responsible for activation of TRPV1 by cysteine-modifying compounds, we individually mutated each of the 18 cysteines to a conserved or equivalent residue, as determined by the

sequence similarity between TRP family members. We found that substitution of the majority of the cysteines produced functional channels that retained their response to MTSEA. The main effect of cysteine substitution was a reduced expression level, but these channels could still be activated by voltage and capsaicin. At the same time, we identified a single residue responsible for this cysteine modification-dependent activation. Mutation of a single cysteine at position 157 in the N-terminus to alanine (C157A) rendered the channel insensitive to MTSEA (**Fig. 6a**), and the response to capsaicin was unchanged after MTSEA treatment (**Fig. 6b**). C157A channels were also insensitive to activation by onion or garlic extracts (**Supplementary Fig. 5** online). The localization of C157 in the N-terminus was consistent with the intracellular location of the cysteine responsible for activation, (**Supplementary Fig. 4**). These data demonstrate that C157 is necessary for activation of TRPV1 by the cysteine-modifying compounds tested.

To demonstrate that these effects were indeed mediated by a single cysteine, we generated a channel in which all 18 cysteines were substituted and called it 18⁻TRPV1. This channel remained functional and retained sensitivity to capsaicin. As expected, 18⁻TRPV1 channels were not activated by application of MTSEA (**Fig. 7a**) or by onion or garlic extracts (**Supplementary Fig. 5**) and the dose response for activation by capsaicin was not altered (**Fig. 7a, right**).

We next determined whether modification of C157 was sufficient to promote activation by reinserting it into the 18⁻TRPV1 background. These channels, 18⁻TRPV1-C157A, responded to capsaicin similarly to the wild type, were activated by application of MTSEA and this activation was reversed by application of DTT (**Fig. 7b, left**). Reinsertion of C157 into the 18⁻TRPV1 also promoted a reduction in the K_D for activation by capsaicin after treatment with MTSEA (**Fig. 7b, right**). In addition, 18⁻TRPV1-C157 channels recovered activation by onion and garlic extracts (**Supplementary Fig. 5**).

To firmly establish the mechanism of garlic and onion activation of TRPV1, we examined the effects of allicin on TRPV1-C157A, 18⁻TRPV1 and 18⁻TRPV1-C157. The substitution C157A alone produced a construct that did not show changes in K_D induced by allicin application (**Fig. 8a**). This was also true of 18⁻TRPV1 channels, where allicin did not elicit current activation and the K_D values for activation by capsaicin were unchanged (**Fig. 8b**).

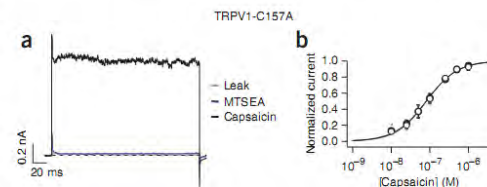


Figure 6 A single cysteine is necessary for activation of the TRPV1 channel by cysteine-modifying reagents. The mutation C157A renders the TRPV1 channel insensitive to MTSEA. (a) Representative traces obtained as in **Figure 1**. The gray trace represents leak current obtained from an inside-out patch from HEK293 cells expressing TRPV1-C157A channels. The blue trace was obtained after applying 2 mM MTSEA to the intracellular face of the membrane patch for 2 min (longer applications of up to 8 min also failed to induce current activation), and the black trace represents currents activated by 4 μ M capsaicin. (b) Dose response for activation by capsaicin before (filled symbols) and after (empty symbols) exposure of the inside-out patch to MTSEA. Smooth curves represent fits with the Hill equation. K_D values before (118 ± 24 nM) and after (133 ± 32 nM) MTSEA for TRPV1-C157A were not statistically different (Student's *t*-test, $P > 0.5$, $n = 5$). Data are mean \pm s.e.m.

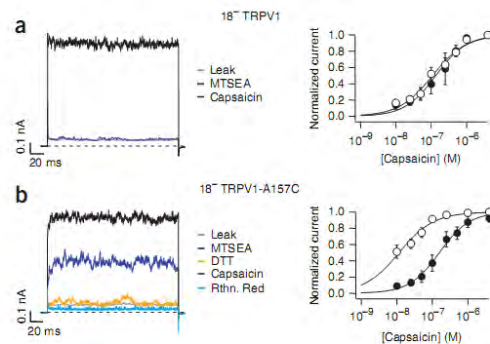


Figure 7 The presence of C157 is sufficient to promote MTSEA effects on TRPV1. (**a,b**) Traces on the left panels were obtained as in **Figure 1**. The right panels depict dose responses for activation by capsaicin before (filled symbols) and after (empty symbols) exposure of the inside-out patches to MTSEA in the different mutant channels. Smooth curves represent fits with the Hill equation. The cysteine-less TRPV1 channel (18^T TRPV1) was functional and resulted in a lack of current activation by MTSEA, whereas application of capsaicin induced current activation (**a**). K_D values before (106 ± 17 nM, filled symbols) and after MTSEA (129 ± 16 nM, empty symbols) for 18^T TRPV1 channels were not statistically different. (Student's *t*-test, $P > 0.5$, $n = 5$). Reintroduction of C157 into the cysteine-less TRPV1 channel promoted recovery of sensitivity to MTSEA (**b**). The traces in the left show that activation by MTSEA could now be attained and reversal of MTSEA effects could be achieved in the presence of DTT. Current activation can be re-attained by application of 4 μ M capsaicin. Finally, application of 10 μ M ruthenium red resulted in current block. K_D values before (128 ± 37 nM) and after (10 ± 2 nM) MTSEA (filled and empty symbols, respectively) for 18^T TRPV1-A157C channels were statistically different (Student's *t*-test, $P < 0.002$, $n = 5$). Data are mean \pm s.e.m.

On the other hand, reinsertion of C157 into the cysteine-less channel recovered sensitivity to allixin (**Fig. 8c**). The data show that modification of the single cysteine C157 is necessary and sufficient to produce activation of TRPV1 by allixin.

DISCUSSION

TRP channels are fundamentally involved in the perception of environmental stimuli and some show sensitivity to cinnamaldehyde, mustard oil and allixin, substances that cause pain-like sensations^{20,21}. To date, there is still controversy over whether TRPA1 is the only target for these compounds and the sole mediator of their effects^{10,22}. Although it seems clear that cinnamaldehyde and mustard oil only activate TRPA1 channels, different reports have had opposite conclusions on whether compounds found in onion and garlic also activate TRPV1 (refs. 10,22,23).

Our data show that TRPV1 is a target for garlic actions and that onion extracts are also capable of activating it. Moreover, we found that TRPV1 activation by allixin is of physiological significance, with TRPV1 mediating part of the responses to this compound in isolated DRG neurons and in the *in vivo* model. Both our electrophysiological and behavioral data from TRPV1- and TRPA1-null mice, which allowed the assessment of the role of each of these ion channels separately, indicated that TRPV1 is important in the response to allixin. In fact, DRG neurons from each of the null mice were able to respond to allixin with increased excitability, and this result, combined with the responses obtained from the behavioral

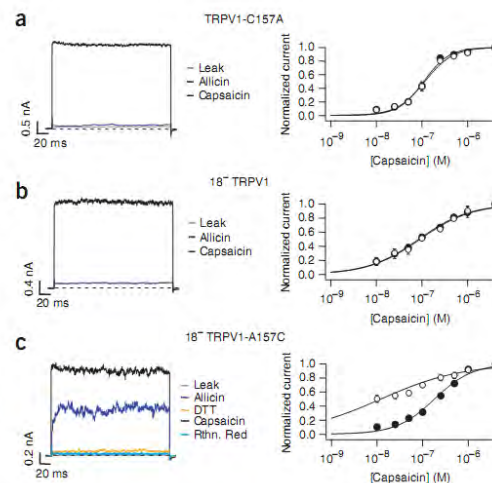


Figure 8 Cysteine C157 is also responsible for the activation of the TRPV1 channel by allixin. (**a–c**) Representative traces shown in the left panel were obtained as in **Figure 1**. The right panel depicts dose responses for activation by capsaicin before (filled symbols) and after (empty symbols) exposure of the inside-out patches to allixin. The mutation of C157 (**a**) and the substitution of all cysteines in the channel sequence (**b**) produced an allixin-insensitive TRPV1 channel ($K_D = 111 \pm 14$ nM and 117 ± 20 nM before and after allixin for TRPV1-C157A, and $K_D = 90 \pm 32$ nM and 96 ± 33 nM before and after allixin for 18^T TRPV1; $n = 5$). Reinsertion of C157 into 18^T TRPV1 restored channel sensitivity to allixin (**c**; $K_D = 177 \pm 12$ nM and 15 ± 5 nM before and after allixin, Student's *t*-test, $P < 0.05$, $n = 5$). Data are mean \pm s.e.m.

assays, clearly indicates that both TRPV1 and TRPA1 channels contribute to the perception of pain induced by allixin.

Cysteine residues are implicated in the modulation of the activity of several types of channels, including TRP channels^{10,18,19,22,24–26}. To explore the mechanism by which allixin activates the TRPV1 channel, we constructed a functional cysteine-less TRPV1 that will be a most valuable tool for future structure-function studies. In this work, we have described a straightforward mechanism by which onion and garlic extracts, as well as allixin, the major active compound found in these extracts, activate TRPV1 through modification of a single cysteine, C157, in the N-terminus of the protein.

The crystal structure of the N-terminal regions of TRPV1 and TRPV2 channels were recently solved and shown to be formed by six ankyrin repeats^{11,27}. It is also established that the N-terminal region of TRPV1 forms a multi-ligand binding domain that mediates the response to ATP, PIP₂ and calmodulin¹¹. Examination of the published structure of the N-terminus of TRPV1¹¹ reveals that C157 localizes to inner helix 2 of the ANK-2 repeat (**Supplementary Fig. 6** online). Perhaps not surprisingly, this is also the region in which multiple other regulatory ligands bind. For example, the nearby sites K155, K160 and L163 in the inner helix 2 of the N-terminus are known to form the ATP-binding site in the TRPV1 channel. Mutation of these sites results in impaired tachyphylaxis in the absence of ATP¹¹. These results and our data suggest that this region may undergo a substantial conformational change that is coupled to channel gating and constitutes an important regulatory region of TRP channel function.

The importance of the N-terminus in TRP-channel function seems to be conserved, as a cluster of three cysteines in this region of TRPA1 (C619, C639 and C663) has been identified as the region that mediates activation by cinnamaldehyde and mustard oil⁹. Moreover, this region in TRPA1, which also contains a stretch of ankyrin repeats, is proposed to be important in TRPA1 activation in response to changes in tension at the cell surface^{28–30}. Other cysteines in the TRPV1 sequence have been described to be partly responsible for activation of TRPV1 by nitric oxide and H₂O₂. It is possible then that modification of C157 mediates part of the effects of these agents²⁶.

Although activation by cysteine modifiers may be a conserved mechanism in TRP channels, the lack of activation of TRPV1 by cinnamaldehyde, N-ethyl maleimide, aldehydes³¹ and particularly by AITC, which is structurally similar to allicin, poses a conundrum in regard to agonist specificity in TRP channels. The fact that both charged and uncharged MTS reagents promoted channel activation strongly suggests that these effects are the result of steric, rather than electrostatic interactions. Also, the fact that capsaicin sensitivity remained intact in C157A and in 18⁻ TRPV1 channels suggests that these two activation mechanisms are separated.

TRPV1 and TRPA1 show only 13% sequence identity (22% conservation). Nonetheless, our results indicate that they share a conserved mechanism of activation. The understanding of the nature of this mechanism should provide us with new insights into the molecular basis underlying the detection of noxious stimuli. Future studies will determine the molecular basis of these distinctions.

METHODS

Preparation of DRG neurons. We isolated DRG neurons by manual dissection from C57BL/6, *Trpa1*^{-/-} and *Trpv1*^{-/-} mice as previously described³², and carried out electrophysiological experiments 6–36 h after plating.

HEK293 cell culture and recording. HEK293 cells expressing large T antigen were transfected with wild-type and mutant rTRPV1-pCDNA3 and pIRES-GFP (BD Biosciences) by lipofectamine (Invitrogen) as previously described¹⁵. Recordings were carried out using symmetrical solutions consisting of 130 mM NaCl, 3 mM HEPES (pH 7.2) and 1 mM EDTA for Ca²⁺-free conditions. Solutions were changed with a RSC-200 rapid solution changer (Molecular Kinetics). Unless otherwise indicated, all chemicals were purchased from Sigma.

Dose-response curves were measured at 100 mV and 24 °C. Dose-response relations were fitted with the Hill equation¹⁵. Electrophysiological experiments were carried out using an EPC 10 amplifier (HEKA Elektronik GmbH).

Data were acquired and analyzed with PULSE software (HEKA Elektronik) and were plotted and analyzed with programs written using Igor Pro (WaveMetrics). Single-channel recording and non-stationary noise analysis were carried out as previously described^{15,33}.

The unliganded open probability, p_{00} , was determined from the ensemble average of 60 traces at 100 mV, and the number of channels, N , was estimated from the formula $I = piN$, where I is the macroscopic current induced by capsaicin, $i = 10.5$ pA, and $P = 0.92$ is the open probability at 4 μM capsaicin. i and p were determined from single-channel recordings.

For action potential recordings, we used the whole-cell configuration to record from acutely dissociated DRG neurons from WT, *Trpv1*^{-/-} or *Trpa1*^{-/-} mice. For these experiments, the pipette solution contained 140 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 5 mM HEPES, 3 mM Mg-ATP and 5 mM glucose (pH 7.2), and the bath solution contained 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ and 10 mM HEPES. The resting membrane potential was recorded continuously and alliin was applied directly to the bath solution.

MTSEA and MTSET were purchased from Toronto Research Chemicals. Onion and garlic extracts were prepared by crushing one white onion or 10 g of fresh garlic into 300 ml and 30 ml of recording solution with a kitchen blender. Extracts were centrifuged for 20 min at 1,500g (5 °C). The supernatants were collected and further diluted in recording solution (1:1,000).

Site-directed mutagenesis. Constructs were generated by introducing mutations into the wild-type and rTRPV1-cysteine-less channel (18⁻ TRPV1). We constructed 18⁻ TRPV1 by introducing the following mutations into the rTRPV1 channel: C21S, C31L, C63L, C73S, C126A, C157A, C257A, C362L, C386S, C390S, C442L, C578L, C616A, C621A, C634A, C715F, C741S and C766N. Mutations were constructed by a PCR method as previously described³⁴.

Pain-related behavioral assays. We obtained mice from strains C57BL/6J, *Trpv1*^{-/-} (B6.129X1-*Trpv1*^{tm1Jul}/J), *Trpa1*^{-/-} and *Trpa1*^{+/-} (B6;129P-*Trpa1*^{tm1Kjw}/J) from the Jackson Laboratory. Mating and genotyping by PCR reactions using gDNA from tail fragments were carried out as previously described^{15,35}.

To perform the behavioral assays, we acclimatized animals for 30 min before experiments. A total volume of 10 μl of either saline solution (0.9% NaCl) or alliin (2 μg) was injected intraplantar using a 30G needle and paw-licking behavior was quantified for 30 min. Animals were handled according to institutional standards from the US National Institutes of Health.

Statistical analysis. Group data are presented as mean ± s.e.m. Statistical comparisons were made with a Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Julius for providing the TRPV1 cDNA and S. Simon and M. Rosenbaum for thoughtful discussion of this manuscript. We also thank L. Ongay, A. Aguilera Jiménez, J. Barbosa, F. Sierra, C. Rivera and H. Malagón for expert technical support and R. Argüello García for his most kind gift of alliin. This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) IN201705 and IN200308 to T.R. and IN202006–39 to L.D.I. and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 58038 to T.R., No. 48990/24777 to L.D.I., and No. 43128 to R.G.-V.; and by a grant from the National Eye Institute to S.E.G.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.S., I.L. and A.J.O. contributed equally to this work. I.L. and T.R. carried out all site-directed mutagenesis experiments. H.S., I.L., A.J.O. and L.D.I. performed electrophysiological recordings. R.G.V. and T.R. carried out DRG neuron and behavioral experiments. L.D.I. and T.R. analyzed the data and wrote the manuscript. S.E.G. and M.M. discussed the results and commented on the manuscript.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

- Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
- Szallasi, A. & Blumberg, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **51**, 159–212 (1999).
- Caterina, M.J. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).
- Macpherson, L.J. *et al.* The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to alliin. *Curr. Biol.* **15**, 929–934 (2005).
- Block, E. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* **252**, 114–119 (1985).
- Block, E. Recent results in the organosulfur and organoselenium chemistry of genus *Allium* and Brassica plants. *Relevance for cancer prevention. Adv. Exp. Med. Biol.* **401**, 155–169 (1996).
- Calvey, E.M., Roach, J.A. & Block, E. Supercritical fluid chromatography of garlic (*Allium sativum*) extracts with mass spectrometric identification of alliin. *J. Chromatogr. Sci.* **32**, 93–96 (1994).
- Calvey, E.M., White, K.D., Matusik, J.E., Sha, D. & Block, E. Allium chemistry: identification of organosulfur compounds in ramp (*Allium tricoccum*) homogenates. *Phytochemistry* **49**, 359–364 (1998).
- Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M. & Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19564–19568 (2006).
- Macpherson, L.J. *et al.* Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541–545 (2007).
- Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905–918 (2007).
- Jones, M.G. *et al.* Biosynthesis of the flavor precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.* **55**, 1903–1918 (2004).

13. Caterina, M.J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306–313 (2000).
14. Story, G.M. *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829 (2003).
15. Jara, A., Islas, L.D., Garcia-Villegas, R. & Rosenbaum, T. On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophys J.* **92**, 3901–3914 (2007).
16. Nilius, B. *et al.* Gating of TRP channels: a voltage connection? *J. Physiol. (Lond.)* **567**, 35–44 (2005).
17. Jordt, S.E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265 (2004).
18. Vyklicky, L., Lyfenko, A., Susankova, K., Teisinger, J. & Vlachova, V. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* **111**, 435–441 (2002).
19. Susankova, K., Tousova, K., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol. Pharmacol.* **70**, 383–394 (2006).
20. Cortright, D.N., Krause, J.E. & Broom, D.C. TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 976–988 (2007).
21. Venkatchaiah, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 387–417 (2007).
22. Bautista, D.M. *et al.* Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12248–12252 (2005).
23. Bautista, D.M. *et al.* TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269–1282 (2006).
24. Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. & Stamlor, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–166 (2005).
25. Matalon, S. *et al.* Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L1184–L1189 (2003).
26. Yoshida, T. *et al.* Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 596–607 (2006).
27. Jin, X., Touhey, J. & Gaudet, R. Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J. Biol. Chem.* **281**, 25006–25010 (2006).
28. Corey, D.P. *et al.* TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723–730 (2004).
29. Howard, J. & Bechstedt, S. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMP-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr. Biol.* **14**, R224–R226 (2004).
30. Michaely, P., Tomchick, D.R., Machius, M. & Anderson, R.G. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J.* **21**, 6387–6396 (2002).
31. Macpherson, L.J. *et al.* An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci.* **27**, 11412–11415 (2007).
32. Stein, A.T., Uffret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F. & Gordon, S.E. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **128**, 509–522 (2006).
33. Sigworth, F.J. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J. Physiol. (Lond.)* **307**, 97–129 (1980).
34. Rosenbaum, T. & Gordon, S.E. Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* **33**, 703–713 (2002).
35. Kwan, K.Y. *et al.* TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception, but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277–289 (2006).