



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE CANALES TRP

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VICTOR DE LA ROSA JIMÉNEZ

TUTOR DE TESIS:

DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ (FACULTAD DE MEDICINA)

COMITÉ TUTOR:

DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR (INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ (INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2015



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

A mi tutor León Islas por todo el apoyo y facilidades para la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi jurado, los doctores Takuya Nishigaki, Luis Vaca, Juan Carlos Gómora y la doctora Laura Escobar.

A la doctora Tamara Rosenbaum por sus contribuciones y disposiciones durante todo el proyecto.

A Gisela Rangel por todo el apoyo desde el primer día que llegué al laboratorio, por todo su trabajo y su amistad.

A Alejandra Llorente por su apoyo en el cultivo celular en este proyecto.

A Andrés Jara por todas sus enseñanzas y útiles discusiones. Es un ejemplo a seguir.

A Ernesto Ladrón de Guevara por sus invaluable comentarios respecto a este trabajo. Por ser un buen amigo y compañero.

A mis demás compañeros y excompañeros del laboratorio, Itzel Ishida, Eva Soto, Jorge Romero, Gema Cristobal, Beatriz Rodriguez y Julia Carrasco Zanini.

A Manuel Hernández por su colaboración en la fabricación de instrumental.

Al doctor Ronan Le Legadec y a Omar Saavedra por su ayuda en la síntesis química de compuestos.

Especialmente agradezco a mis padres, E. Victor De la Rosa Morales y Marlene Jiménez Pérez, por el apoyo y la confianza que siempre han tenido conmigo.

A Nancy Molina por su comprensión y cariño.

A Karol, Karla y Santiago, que con una sonrisa mejoran mis días.

Este trabajo fue realizado con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), apoyo 151297; Dirección General de Asuntos del Personal Académico – Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT), apoyo IN209209; Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF), apoyo PIFUTP09-262, otorgados al Dr. León David Islas Suárez.

Esta tesis también fue posible gracias a la beca de CONACyT que me fue otorgada durante la realización de este trabajo. Número de becario: 21367; beca: 309408. Y una beca derivada del proyecto CONACyT, 151297 del Dr. Islas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CANALES TRP.....	6
EL CANAL TRPV1.....	8
Estructura del canal TRPV1.....	8
Agonistas del canal TRPV1.....	11
Modulación del canal TRPV1.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
BIOLOGÍA MOLECULAR.....	16
EXPRESIÓN DE CANALES.....	18
Expresión en las células HEK 293.....	18
Expresión en los ovocitos de rana <i>Xenopus laevis</i>	19
ELECTROFISIOLOGÍA.....	20
Adquisición de datos.....	23
TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA DE FLUORESCENCIA O FRET.....	24
Principios básicos de FRET.....	25
Adquisición de datos y protocolos experimentales.....	28
Modelo para predecir la eficiencia de FRET.....	33
Modelo para correlacionar la eficiencia de FRET con la	

separación de las proteínas fluorescentes a la membrana.	35
MEDICIONES DE ANISOTROPÍA.	37
SOLUCIONES.	38
AGONISTAS.	39
RESULTADOS.	40
MEDICIONES ESTÁTICAS DE LA ORGANIZACIÓN	
DEL CANAL TRPV1.	40
Organización de los dominios terminales del canal	
TRPV1 en el plano paralelo a la membrana.	40
Organización de los dominios terminales del canal	
TRPV1 en el plano perpendicular a la membrana.	46
Orientación espacial entre el C – terminal y el N – terminal.	48
La eficiencia de FRET reporta distancia y no restricción de	
las proteínas fluorescentes.	51
MEDICIONES DE LA ORGANIZACIÓN DEL CANAL	
TRPV1 EN EL ESTADO ACTIVADO.	53
DISCUSIÓN.	59
CONCLUSIONES.	65
PERSPECTIVAS.	66
APÉNDICE I.	67
BIBLIOGRAFÍA.	71

RESUMEN

El canal TRPV1 es un canal iónico involucrado en la transducción de señales, funciona como un integrador de estímulos químicos y térmicos que pueden ser nocivos. El estudio de cómo está ensamblado el canal desde un punto de vista estructural permite el desarrollo de nuevas estrategias para el estudio de este tipo de canales.

En este proyecto se obtuvo la organización molecular y localización de los dominios amino y carboxilo terminales del canal TRPV1 mediante mediciones de FRET. Se unieron genéticamente las proteínas fluorescentes CFP y eYFP a los dominios terminales del canal. Las quimeras se cotransfectaron en células HEK 293 y ovocitos de *Xenopus laevis* y se midió la eficiencia de FRET por el método espectral. Pudimos determinar la arquitectura gruesa de los dominios terminales y su localización respecto al plano de la membrana, además los resultados sugieren un arreglo alternado entre los dominios amino y carboxilo terminales en el tetrámero. Los experimentos se realizaron con el canal en reposo y con activadores, no obstante la eficiencia de FRET no cambió con la presencia de los agonistas indicando que los rearrreglos del canal tras la activación implican cambios discretos en la estructura. Finalmente se mapearon las mediciones obtenidas en la estructura del canal con buena concordancia.

INTRODUCCIÓN

La excitabilidad de las células se debe a la capacidad de mover iones de un lado a otro de la membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática funciona como una barrera que separa los iones del medio intracelular y extracelular generando así una distribución diferencial de éstos a cada lado de la membrana, el resultado es la generación de gradientes electroquímicos dados por la carga y la concentración de cada ión lo que finalmente se traduce como una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana. Aunque existen diferentes tipos de proteínas que son capaces de mover los iones de un lado a otro de la membrana, la señalización en tejidos excitables depende de la capacidad de producir cambios rápidos en el potencial eléctrico a través de las membranas celulares.

Las proteínas responsables de producir estos cambios rápidos en el potencial de membrana reciben el nombre de canales iónicos, que son proteínas integrales de membrana que se encuentran no solamente en los tejidos excitables sino en todas las células del cuerpo, incluso en plantas y en microorganismos. A diferencia de proteínas acarreadoras (transportadoras), los canales iónicos tienen mejor eficiencia de transporte; el flujo de iones es de hasta 100 millones de iones por segundo, no obstante estas proteínas no están acopladas a una fuente de energía para llevar a cabo transporte activo por lo que el flujo de iones siempre es pasivo, siguiendo el gradiente electroquímico del ión en cuestión. Los principales iones que pasan a través de los canales iónicos son: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , que son considerados los principales generadores de la actividad eléctrica en las células [7].

A pesar de su habilidad de conducir iones rápidamente, los canales iónicos son altamente selectivos, cada tipo de canal permite el paso de un tipo o algunos tipos de iones, por ejemplo, los canales de potasio que determinan el potencial de membrana de una neurona, son 100 veces más permeables a K^+ que a Na^+ . Mientras que un poro estrecho permite el paso de iones pequeños, los canales iónicos deben ser capaces de diferenciar entre iones de tamaños similares, esto sugiere que se necesitan interacciones más detalladas entre los iones y la proteína pero sin que se pierda la habilidad de conducir rápidamente. Esto se logra con una región estrecha del poro que

se conoce como filtro de selectividad que es capaz de discriminar entre los tipos de iones, mientras que el resto del poro cuando el canal está abierto es más amplio permitiendo una difusión rápida [8, 9]. La selección iónica sucede entonces en una región particular de la vía de conducción de la proteína en la que solo los iones con el tamaño y carga apropiada puedan desolvatarse e interactuar con ciertos aminoácidos y así pasar a través del canal. De hecho, se pueden observar iones ocupando estas regiones en las estructuras cristalográficas de algunos canales iónicos con lo que se pueden determinar las interacciones específicas entre el ión y la proteína.

Otra característica importante de los canales iónicos es que no están abiertos continuamente, tienen un mecanismo de regulación de apertura y cierre, llamado comúnmente *gating*. Los estímulos que ocasionan que ciertos canales iónicos se abran son: el voltaje, pH, ligandos (neurotransmisores, nucleótidos, etc.), estrés mecánico, además hay canales que responden a temperatura, toxinas y a algunos compuestos de plantas y vegetales. Adicionalmente al filtro de selectividad se necesitan dos componentes para el *gating* de un canal iónico. El primero de ellos es un “sensor”, algo que pueda ser utilizado para sentir el cambio en el voltaje, pH, etcétera. La segunda es una compuerta, una región responsable de bloquear el paso de iones cuando el canal se encuentra cerrado y permitir el paso de iones cuando el canal está abierto. El *gating* comprende el acoplamiento de estos dos componentes.

En la activación por voltaje, el sensor lo conforman una serie de aminoácidos cargados (arginina o lisina) separados por residuos no polares. Dichos aminoácidos sentirán una fuerza cuando el potencial eléctrico a través de la membrana cambie induciendo un cambio conformacional de la proteína cambiando la configuración de la compuerta de activación lo que se traduce como la apertura o el cierre del canal.

En los canales activados por ligando, la unión de éste en una parte de la proteína provoca el cambio conformacional para abrir el canal. Esto requiere una notable organización estructural de la proteína para que el cambio conformacional pase rápidamente desde el sitio de unión del ligando hasta la compuerta de activación. En el receptor de acetilcolina por ejemplo, la unión al ligando sucede en una asa localizada a 50 Å de la compuerta del canal, a partir de esta asa los cambios conformacionales se

propagan como una onda que incluye movimientos rígidos de estructuras propias del canal [10]. Es clara entonces la importancia de la relación de la estructura con la función de los canales iónicos.

Cada canal iónico cumple un papel distinto, de manera general es correcto decir que los canales de Na^+ y K^+ son los responsables de la actividad eléctrica, mientras que los canales de Ca^{2+} son necesarios para convertir estas señales eléctricas en procesos intracelulares. En realidad los canales de Ca^{2+} también participan en la actividad eléctrica pero tienen un papel fundamental al iniciar cascadas de señalización intracelulares. Los canales de Cl^- así como las proteínas acarreadoras o transportadoras son las encargadas de mantener el gradiente de concentración de los iones a través de la membrana. Una de estas últimas es la bomba de Na^+ y K^+ que mueve iones Na^+ al medio extracelular mientras que al mismo tiempo introduce iones K^+ a la célula. La acción de estas proteínas acarreadoras así como la de algunos canales iónicos de K^+ que se encuentran abiertos constitutivamente generan un perfil iónico particular para cada tipo celular, no obstante, el potencial eléctrico intracelular de todas las células en condiciones basales es negativo con respecto al medio extracelular y es semejante al potencial electroquímico del K^+ .

El potencial electroquímico de cualquier ión puede estimarse de la ecuación de Nernst (Figura 1). La membrana puede estudiarse como un capacitor en el que la diferencia de carga entre el lado intracelular y el extracelular genera una diferencia de potencial. Si se abren canales a través de la membrana, un flujo neto de iones pasará a través debido al gradiente de concentración y de potencial hasta que el capacitor se descargue. Si por dichos canales pasara únicamente K^+ , el potencial eléctrico de la membrana no se vería afectado debido a que como se menciona antes, éste es semejante al potencial electroquímico del K^+ . Por otro lado, si pasara Na^+ , el potencial de membrana tendería a moverse al potencial de equilibrio de Na^+ que en condiciones fisiológicas es positivo. Y si nuevamente se abrieran canales iónicos por el que fluya ahora K^+ , el potencial de membrana tendería a moverse nuevamente al potencial de equilibrio de K^+ .

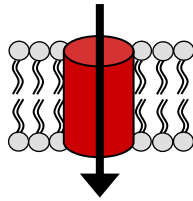
La interacción de estas conductancias es lo que permite cambiar la polaridad de la membrana localmente, este fenómeno puede propagarse en microáreas vecinas

A

$$V_X = \frac{k_B T}{z} \ln \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

Extracelular

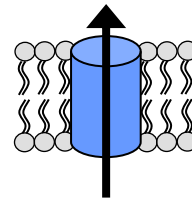
Intracelular



$$[\text{Na}]_e = 140 \text{ mM}$$

$$[\text{Na}]_i = 14 \text{ mM}$$

$$V_{\text{Na}} = 60 \text{ mV}$$



$$[\text{K}]_e = 4 \text{ mM}$$

$$[\text{K}]_i = 145 \text{ mM}$$

$$V_{\text{K}} = -90 \text{ mV}$$

B

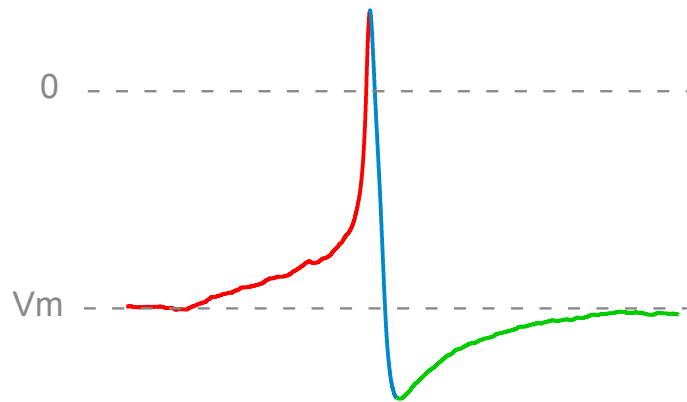


Figura 1. Potencial de equilibrio de un ión y potencial de acción. (A) la apertura de un canal iónico permite el flujo de iones debido al gradiente electroquímico de cada ión. El potencial de equilibrio se puede calcular a partir de la ecuación de Nernst que se muestra en la parte superior. k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, $[X]$ es la concentración molar del ión intra (i) o extracelular (e). Las concentraciones iónicas semejantes a las de una neurona de mamífero se muestran en la figura y con ellas se calculó el potencial de equilibrio para sodio (V_{Na}) y potasio (V_{K}). La flecha indica la dirección del flujo de iones por el canal de sodio (rojo) y potasio (azul). (B) potencial de acción de una neurona del ganglio de la raíz dorsal de rata. La parte ascendente en rojo se debe a la apertura de canales de sodio, el potencial de membrana (V_m) tiende a V_{Na} . La parte descendente en azul se debe a la apertura de canales de potasio, V_m tiende a V_{K} . El potencial de reposo se reestablece por la acción de proteínas transportadoras o acarreadoras (verde).

afectando más canales iónicos generando señales eléctricas denominadas potenciales de acción [11], que son la base de la transmisión de los impulsos nerviosos.

Los canales iónicos subyacen la actividad neural, el control motor autónomo y voluntario, la percepción sensorial, etcétera. Por ejemplo, mediante la activación de canales iónicos, un organismo es capaz de experimentar dolor, la activación de canales iónicos por ligandos o estímulos nocivos inicia cambios locales del potencial eléctrico en una terminación nerviosa, estos cambios de potencial activan a canales iónicos dependientes de voltaje generando un potencial de acción y así el estímulo se propaga al resto de la célula. Esta célula es capaz de transmitir la señal a otra mediante la liberación de mensajeros químicos conocidos como neurotransmisores en una región que se conoce como sinapsis que es donde dos células se encuentran físicamente cercanas una de otra. Los neurotransmisores activan canales iónicos dependientes de ligando en la nueva célula afectando nuevamente el potencial eléctrico y generando potenciales de acción. Esta vía aferente llega al cerebro donde se llevan otros procesos que le indican al organismo que está experimentando una sensación nociva y más aún puede mandar una señal eléctrica a través de otra célula que haga sinapsis con células musculares para alejarse del estímulo nocivo.

Canales TRP

El primer miembro de la familia de canales *transient receptor potencial*, TRP fue descrito en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En una mutante de estas moscas, la exposición sostenida de luz solo inducía un *potencial receptor transitorio* mientras que en las moscas silvestres, la respuesta era sostenida [12]. La diferencia en la respuesta se atribuyó a la expresión del gen *trp* [13] y posteriormente se sugirió que la proteína codificada por este gen era un canal permeable a calcio [14].

La familia de canales TRP constituyen una diversa familia de proteínas que se expresan en varios tejidos y diferentes tipos de células, se encuentran conservados a través de la evolución sirviendo como sensores que desencadenan una respuesta a estímulos como la temperatura, presión osmótica, estrés mecánico, productos irritantes, son responsable de mediar el dolor inducido por la inflamación, así mismo se han asociado

a los sentidos del gusto, olfato y juegan un papel importante en el sistema auditivo y vestibular [15]. La importancia fisiológica de estos canales recae además en la relación que guardan con ciertas enfermedades desde hipomagnesemia hasta enfermedad poliquística renal y enfermedades neurodegenerativas [2, 16].

Mediante homología entre las proteínas, los miembros de la familia de canales TRP se clasifican en siete subfamilias divididas en dos grupos [16]. Los primeros miembros se nombraron como canónicos y se agruparon en la subfamilia TRPC, los nombres de las

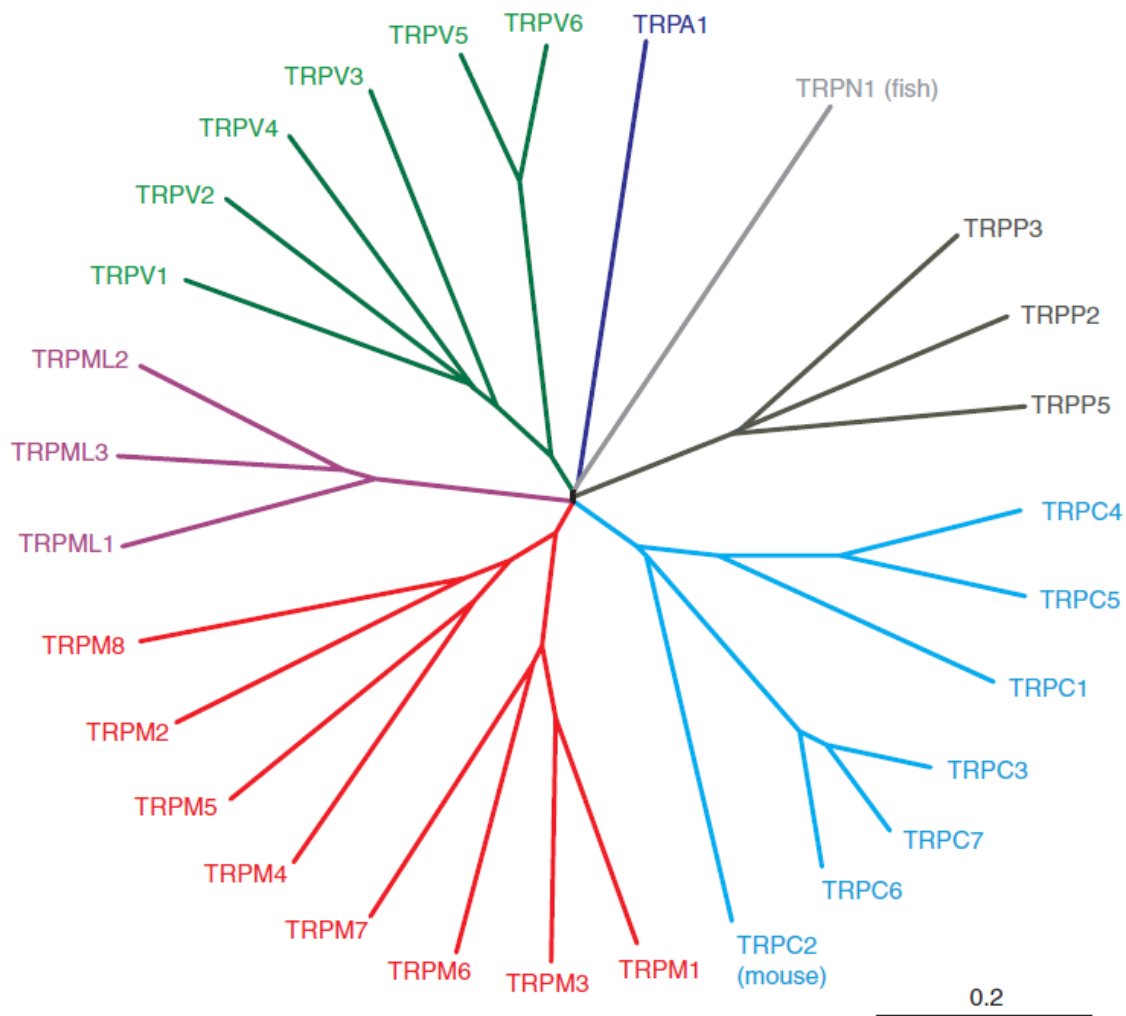


Figura 2. Árbol filogenético de los canales TRP en el humano, la homología de las secuencias clasifica a los canales en siete subfamilias. Los canales TRPC2 y TRPN1 no se encuentran en el humano por lo que se muestran el canal de ratón y pez respectivamente. Tomado de Nilius y Owslanik, 2011 [2]

otras subfamilias se designaron de acuerdo a la designación del primer miembro de cada subfamilia. La subfamilia TRPV (vainiloide) se nombró a partir del receptor vainiloide 1 (ahora TRPV1). La subfamilia TRPM por melastatina 1 (ahora TRPM1). Las subfamilias TRPML y TRPP por mucolipina y policistina respectivamente. Se ha identificado un solo miembro de la subfamilia TRPA que contiene 14 repeticiones de anquirina en su estructura. La subfamilia TRPN se nombró a partir de canal mecanopotencial C (NOMP-C) de *C. elegans* y, hasta ahora se ha encontrado un solo miembro de la familia TRPN en vertebrados, en el pez cebra.

Las subfamilias del grupo 1: TRPC, TRPV, TRPM, TRPN y TRPA comparten homología significativa en los dominios transmembranales mientras que los del grupo 2 (TRPML y TRPP) solo están relacionados lejanamente con los del grupo 1 debido a la baja similitud en su secuencia (Figura 2) y a que presentan un asa grande entre el primer y segundo segmento transmembranal.

El canal TRPV1

El canal TRPV1 es un canal que se expresa principalmente en el sistema nervioso central y periférico, particularmente en neuronas de los ganglios sensoriales y en las fibras C y A δ que son fibras nociceptivas [17, 18]. El TRPV1 también puede encontrarse en tejidos no sensoriales como los queratinocitos, tejido muscular liso, vejiga, hígado, riñones, bazo y pulmones [19-21]. Es un canal catiónico no selectivo, que exhibe una preferencia por cationes divalentes, siendo principalmente permeable a Ca²⁺ [17].

Estructura del canal TRPV1

El canal TRPV1 es un tetrámero [4, 6, 22, 23] formado por cuatro subunidades iguales en el que cada subunidad esta formada por seis segmentos transmembranales con los dominios amino (N-) y carboxilo (C-) terminales en la parte intracelular. El dominio N – terminal contiene seis repeticiones de anquirina [24], mientras que en dominio C – terminal se encuentra el dominio TRP que es una secuencia conservada en esta familia de canales.

Los segmentos transmembranales cinco (S5) y seis (S6) y el asa que une a éstos, forman el poro y filtro de selectividad del canal. En la vía de conducción del canal, se ha descrito que existen dos constricciones relevantes, una proximal a la parte intracelular de canal que limita el paso de iones grandes [25-27] y otra constricción mas pequeña que limita el paso de iones pequeños y que constituye la compuerta de activación del canal [27].

Hasta hace unos meses, solo se conocía la estructura de las repeticiones de anquirina [28] en el amino terminal, se había determinado la estructura del canal completo a baja resolución por crioelectromicroscopia (cryo-EM) [4] y se contaba con modelos estructurales [29, 30]. Actualmente se ha determinado la estructura a 3.4 Å de resolución del canal TRPV1 por cryo-EM [6], en la que se pudo resolver los segmentos transmembranales, así como el dominio TRP en la parte proximal del C – terminal, las ultimas 4 anquirinas del N – terminal y el segmento o *linker* que conecta las repeticiones de anquirina con el segmento S1 (Figura 3A). Esta estructura carece de los residuos iniciales, la torreta y los residuos finales de la secuencia del canal por lo que al menos para los dominios de anquirina, se ha utilizado la estructura cristalográfica de esos dominios para tener un mejor modelo. Finalmente se cuenta con un modelo compuesto por los residuos 111 a 603 y 627 a 719 de los 838 aminoácidos que conforman el canal TRPV1. La estructura de los dominios transmembranales se asemeja a la de otros iónicos activados por voltaje. Uno de los motivos que mas llaman la atención en la estructura es el que forma el *linker* entre el dominio de anquirinas y el S1, ya que una parte tiene una estructura tipo hoja – β antiparalelas que hacen contacto con dos repeticiones de anquirinas de la subunidad adyacente, esta interacción podría tener un rol en la oligomerización del canal o mas interesante aún, un rol en la activación del canal. El dominio que se encuentra en la parte proximal del C – terminal del TRPV1, el dominio TRP, es blanco de moléculas activadoras y reguladoras [31, 32] como se menciona mas adelante. En la estructura del canal, este dominio forma una hélice paralela a la membrana interaccionando con el segmento S4 – S5 y una hélice llamada S0 localizada antes del primer segmento transmembranal, pudiendo funcionar como un puente alostérico que modifique la conformación del poro.

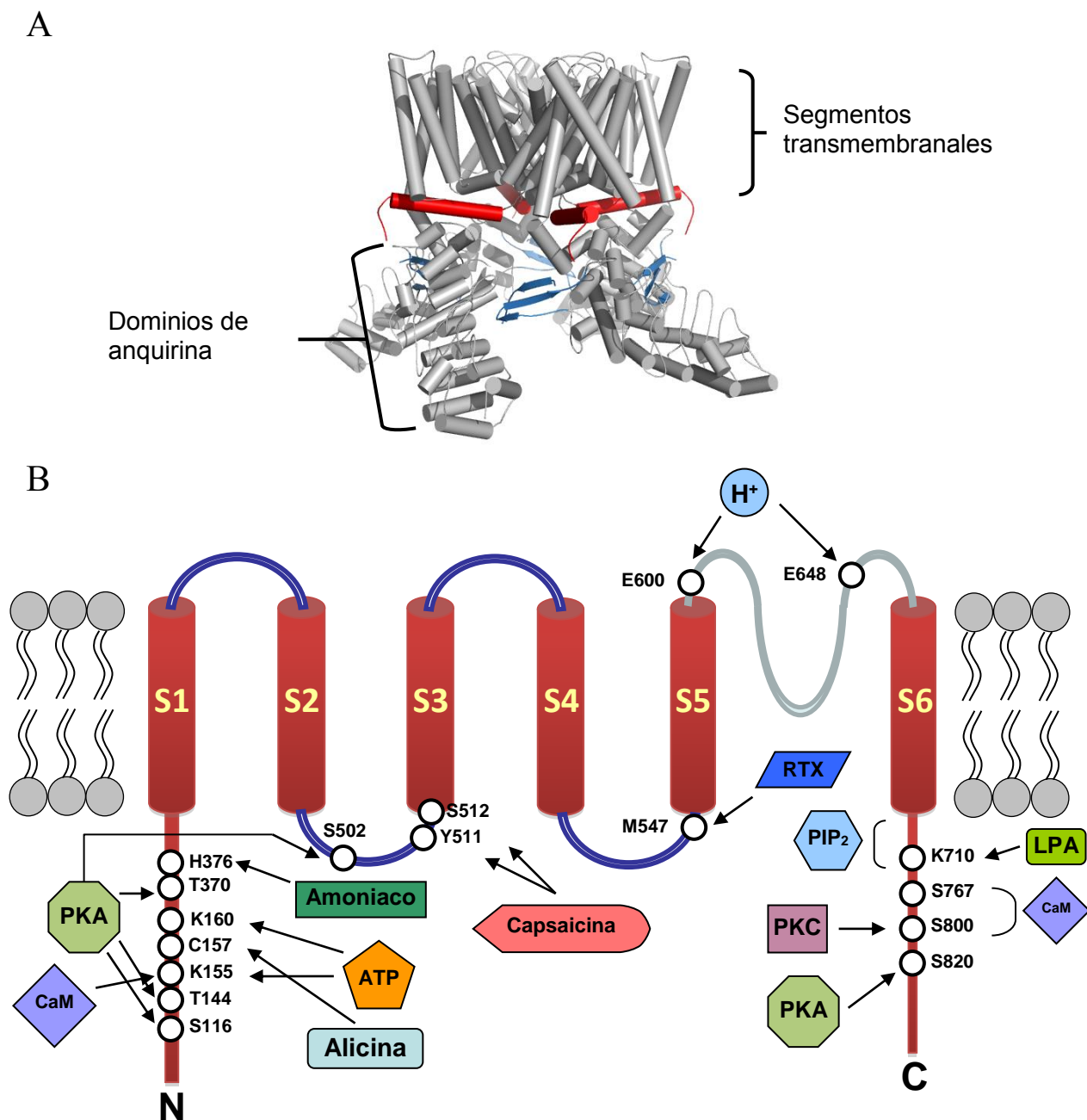


Figura 3. (A) Estructura del canal TRPV1 obtenida por cryo-EM (PDB: 3J5P). En rojo se resalta el dominio TRP paralelo a la membrana y, en azul, el *linker* entre el dominio de anquirinas y el S1 que interacciona con las anquirinas adyacentes. (B) Esquema de una subunidad del canal TRPV1, los dominios terminales se encuentran en la parte intracelular. Se marcan algunos de los sitios de interacción de ligandos y moduladores del canal. Modificado de Jara-Oseguera et al., 2008 [3].

Agonistas del canal TRPV1

Funcionalmente, el TRPV1 es un receptor polimodal, es decir, que se activa directamente por una variedad de estímulos dentro de los que se encuentran compuestos presentes en algunos productos naturales como la capsaicina, que es el compuesto pungente en los chiles del género *Capsicum* [17, 33]; esta molécula es lipofílica y puede permear la membrana celular e interactuar con sitios de unión en la parte intracelular de canal [33] (Figura 3B).

Existen compuestos endógenos que mantienen cierta similitud estructural con la capsaicina, pero que son agonistas de receptores a cannabinoides y por tanto se denominan endocannabinoides como por ejemplo la N – araquidonil dopamina [34, 35] y la anadamina [36], esta última fue la primera molécula vainiloide endógena que se identificó y que se ha mostrado que activa al canal TRPV1 en sistemas de expresión heteróloga aunque con menor afinidad que la capsaicina, mas aun, se ha mostrado que esta molécula desplaza a la resiniferatoxina (RTX) de su sitio de unión al canal [37], indicando que probablemente el sitio de unión sea el mismo para capsaicina, vainiloides endógenos y RTX. La RTX es otro activador del canal TRPV1 que proviene del cactus *Euphorbia resinifera*, y cuya afinidad es mayor al de la capsaicina [17].

Otros productos naturales que son agonistas del canal TRPV1 son: el alcanfor, que se utiliza como analgésico tópico [38], la zingerona que es extraída del jengibre, la piperina que proviene de la pimienta [39], y la alicina presente en plantas del género *Allium* como la cebolla y el ajo, esta última molécula activa al canal mediante la modificación covalente de una sola cisteína en la segunda repetición de anquirina en el N – terminal [40].

Algunos lípidos también actúan como agonistas como los son el oleoilacetilglicerol [41] que es un análogo de diacilglicerol y, el ácido lisofosfatídico (LPA) [31] al que se le ha relacionado con el dolor neuropático y la hiperalgesia.

Los cambios en el pH también tienen una fuerte influencia en el canal TRPV1. La acidificación ($\text{pH} < 6$) del medio extracelular provoca que la respuesta a otros estímulos como la capsaicina y la temperatura se vea incrementada [42, 43]. En un medio aún más ácido ($\text{pH} < 5$), el canal se activa directamente por los protones. Los sitios en

donde los protones actúan son distintos para la potenciación de la respuesta y la activación *per se* del canal, pero ambos se encuentran en la parte extracelular de la proteína [44].

El canal TRPV1 se activa débilmente por voltaje [45-47]. A diferencia de otros canales dependientes de voltaje, el TRPV1 no tiene residuos cargados ordenados en el S4 de los segmentos transmembranales, por tanto se ha sugerido que los residuos cargados que se encuentren tanto en el S4 como en la cadena que une al S4 – S5, sean los responsables de la sensibilidad al voltaje. No obstante, las mutantes que se han dirigido a los residuos cargados, muestran que además de afectar la sensibilidad al voltaje, también afectan la sensibilidad a otros agonistas del canal [48] indicando que estos residuos no solo están involucrados en la sensibilidad al voltaje.

Una de las propiedades más relevantes de algunos miembros de las familias de canales TRPM y TRPV, incluyendo al TRPV1, es la alta sensibilidad a la temperatura con valores de Q_{10} mayores a 20 mientras que otros canales como los de potasio activados por voltaje, tienen una Q_{10} alrededor de 2. El umbral para la activación del TRPV1 por temperatura es de 43 °C [17]. Se cree que debería existir un sensor dentro de la estructura del canal que le confiera la alta dependencia a temperatura. Tanto el poro [49, 50] como el dominio C-terminal [51] se han implicado en dicha sensibilidad. Se ha mostrado que mutaciones en la torreta del poro comprometen la apertura del canal por temperatura [49] y recientemente se han encontrado residuos en el poro que presentan conformaciones distintas dependiendo de la temperatura [52]. Además quimeras entre el canal TRPV1 y TRPM8 en las que se intercambia el dominio C-terminal, confiere a las quimeras polaridad invertida en la sensibilidad a temperatura [51], es decir, el canal TRPM8 con el C-terminal del TRPV1 se activa a temperaturas altas mientras que el canal TRPV1 con el C-terminal del TRPM8 se activa a temperaturas bajas. Recientemente se ha mostrado que la región del N-terminal que conecta a los dominios de anquirina con el transmembranal S1, es crucial para la sensibilidad [53] y que alteraciones de otras regiones del canal solo afectan el umbral o la cinética de activación (y no la sensibilidad), indicando que las otras regiones se encuentran río abajo en la vía de activación por temperatura.

Modulación del canal TRPV1

La función del TRPV1 esta modulada por varias moléculas, algunas de ellas provenientes de vías de señalización como los son las cinasas. Por ejemplo, se ha mostrado que la respuesta a capsaicina esta regulada por la actividad de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMKII) y también de la proteína cinasa A (PKA) [54-56]. La proteína cinasa C (PKC) sensibiliza al canal a vainiloides, pH ácido y al calor, permitiendo que el canal se active a la temperatura corporal sin necesidad de otro agonista [57-59]. Estas proteínas cinasas son la vía común final de varias moléculas proinflamatorias que actúan sobre receptores asociados a proteínas G y que ocasionan hiperalgesia como lo son, bradiquinina [60], quimiocinas [61, 62], sustancia P [62], serotonina [63], ATP [64] entre otros.

Además de unirse a receptores, el ATP es capaz de unirse directamente en residuos del N – terminal del TRPV1 sensibilizando al canal [28]. El sitio de unión a ATP se sobrepone con el sitio de unión a Ca^{2+} / Calmodulina (Ca^{2+} - CaM) que media la desensibilización aguda del canal. Esta región del N – terminal interactúa con CaM de manera dependiente de Ca^{2+} provocando una disminución de la probabilidad de apertura a pesar de tener un agonista presente [65]. Dado que el sitio de CaM y ATP se sobreponen, es de esperar que ambas moléculas estén compitiendo por el sitio, provocando que el canal se potencie o se desensibilice [28]. La desensibilización por Ca^{2+} - CaM también depende de una región en el C – terminal de canal, existe por tanto la posibilidad de que ambos sitios interactúen mediante un cambio conformacional de los dominios terminales del canal provocando dicha desensibilización [28, 29].

Los lípidos también son moléculas que modulan la actividad del canal TRPV1. Uno de ellos es el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), un lípido de la membrana plasmática, el cual tiene un efecto potenciador en la respuesta a capsaicina al unirse a una región proximal del C – terminal del canal [32]. Otro componente de la membrana que tiene un efecto sobre el canal es el colesterol. En un estudio reciente se mostró que el colesterol reduce progresivamente la actividad del canal desestabilizando el estado abierto, este efecto esta mediado por un sitio de unión a colesterol en el segmento transmembranal S5 [66].

JUSTIFICACIÓN

Las estructuras en alta resolución son la piedra angular para entender como funcionan las proteínas de membrana, no obstante, estas estructuras solo son el punto de partida para entender su comportamiento. Las estructuras de las proteínas por rayos – X, proveen una representación de una conformación en particular, sin embargo, las proteínas son altamente dinámicas, fluctúan entre diferentes estados y mas aún, estas fluctuaciones y movimientos influyen en su función [67].

En un canal iónico, los activadores deben influenciar una región particular del canal y posteriormente la señal debe converger en la compuerta de activación para permitir el paso de iones. Cuando se planteó este proyecto, solo se conocían aspectos generales de la estructura del canal TRPV1 y la idea general de este proyecto fue determinar algunos aspectos estructurales gruesos del canal y determinar posibles cambios estructurales asociados a la activación mediante técnicas espectroscópicas.

La espectroscopia de fluorescencia en particular se ha convertido en una herramienta muy útil para estudiar la arquitectura y los rearrreglos estructurales de las proteínas de membrana [68]. Uno de los procesos espectroscópicos más utilizados para estos fines es el fenómeno de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET, por sus siglas en inglés), este fenómeno es una interacción distancia- dependiente entre dos moléculas fluorescentes y sirve como una regla molecular en el rango de dimensiones de moléculas biológicas incluyendo canales iónicos. Una de las ventajas de esta metodología es que puede ser aplicada en membranas y en células vivas, permitiendo el estudio de proteínas en su medio nativo.

OBJETIVO GENERAL

Obtener una aproximación a la organización molecular del canal TRPV1 y obtener información respecto a algunos de los procesos que llevan a la activación de este canal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir quimeras entre el canal TRPV1 y las proteínas fluorescentes cyan y amarilla (CFP y eYFP, respectivamente).
- Conocer la separación entre los dominios C – terminales del canal TRPV1 en el estado de reposo, midiendo la eficiencia de FRET.
- Conocer la separación entre los dominios N – terminales del canal TRPV1 en el estado de reposo, midiendo la eficiencia de FRET.
- Conocer la localización de los dominios terminales respecto al plano de la membrana, en el estado de reposo del canal.
- Caracterizar cambios conformacionales de los dominios terminales del canal tras la activación.

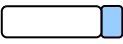
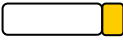
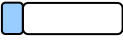
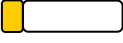
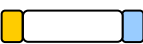


METODOLOGÍA

Biología Molecular.

Se insertaron las proteínas fluorescentes amarilla, eYFP y cian, CFP en los extremos amino o carboxilo terminal, o ambos del canal de rata TRPV1 (Tabla 1).

Las proteínas fluorescentes (FP) se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, a partir de los plásmidos peYFP o pAmCyan (Clontech) introduciendo un sitio de restricción diferente en cada extremo, así como la secuencia de unión o “*linker*” GGSGGSGGS en todos los casos. Los sitios de restricción que se introdujeron también cortan al vector del canal rTRPV1. Los vectores del rTRPV1 y los productos de

Tabla 1. Quimeras construidas entre el canal TRPV1 y las proteínas fluorescentes

Construcción	Descripción
TRPV1 – CFP 	CFP unida al C – terminal de cada subunidad del TRPV1
TRPV1 – eYFP 	eYFP unida al C – terminal de cada subunidad del TRPV1
CFP – TRPV1 	CFP unida al N – terminal de cada subunidad del TRPV1
eYFP – TRPV1 	eYFP unida al N – terminal de cada subunidad del TRPV1
eYFP – TRPV1 – CFP 	eYFP unida al N – terminal y CFP unida al C – terminal de cada subunidad del TRPV1
TRPV1 – TRPV1 – CFP 	Dos subunidades concatenadas del TRPV1 unidas a la CFP en el extremo C – terminal
TRPV1 – TRPV1 – eYFP 	Dos subunidades concatenadas del TRPV1 unidas a la CFP en el extremo C – terminal

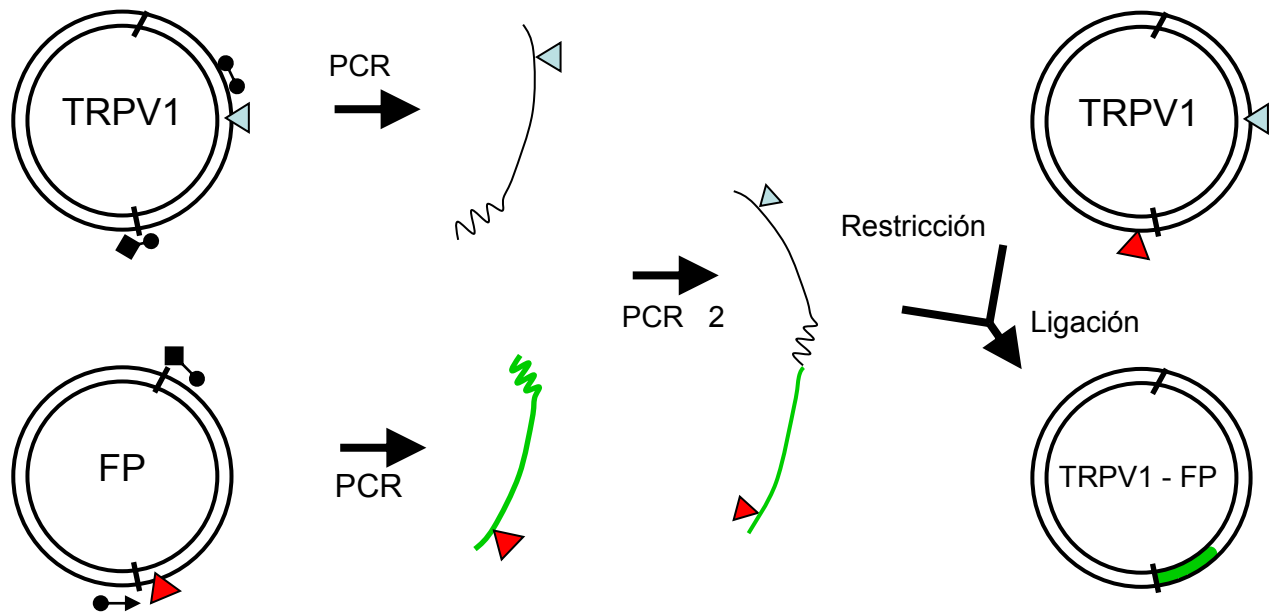


Figura 4. Técnica utilizada para unir una proteína fluorescente al canal TRPV1 en el carboxilo terminal. Los símbolos [•-•], [•->] indican oligos de extensión que introducen sitios de restricción (triángulos) y los símbolos [♦-•] introducen una secuencia complementaria entre el fragmento del canal y la proteína fluorescente que sirve para llevar a cabo la segunda PCR. El fragmento resultante tiene sitios de restricción que también se encuentran en el canal. Se realizó la restricción del fragmento y del canal y la posterior ligación para obtener la construcción TRPV1- FP. Se utilizó la misma técnica para obtener las construcciones FP-TRPV1.

PCR se digirieron y posteriormente se ligaron uno a uno para obtener las cuatro construcciones, eYFP – TRPV1, TRPV1 – eYFP, CFP – TRPV1 y TRPV1 – CFP (Figura 4).

La construcción con las dos proteínas fluorescentes, eYFP – TRPV1 – CFP se obtuvo a partir de las construcciones previas eYFP – TRPV1 y TRPV1 – CFP, utilizando el primero como molde y utilizando los sitios de restricción NotI al inicio del TRPV1 – CFP y SacII dentro de la secuencia del canal.

El dímero concatenado rTRPV1 – rTRPV1 se generó con una técnica similar reportada por Gordon y Zagotta [69] para canales activados por nucleótidos cíclicos. Las proteínas fluorescentes se insertaron en el extremo carboxilo del dímero; se inserto un sitio de

restricción BlnI al inicio de las construcciones marcadas en el C – terminal (TRPV1 – FP), este sitio se inserto mediante una sola reacción de PCR con la enzima KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen), el producto de la PCR se trató con la enzima DpnI hidrolasa (New England Biolabs), que degrada el molde dejando únicamente el DNA mutado con el sitio de restricción, en donde el promotor A del dímero junto con el *linker* de 21 aminoácidos QQQQQQQQIEGRQQQQQQQA fue introducido.

Todas las construcciones fueron clonadas en el vector pcDNA3 (Clontech).

El canal Hv1 con las proteínas mCitrine o mCerulean insertadas en el extremo carboxilo fueron donadas por el Dr. Justin Taraska del NHLBI, National Institutes of Health, E.U.A.. Estas construcciones están clonadas en pcDNA6.2-DEST.

Para la expresión en ovocitos, los plásmidos pcDNA3 fueron linearizados con NotI, y los plásmidos pcDNA6.2-DEST con AgeI. El mRNA fue sintetizado in vitro utilizando el kit de transcripción mMessage mMACHINE T7. El mRNA se precipitó con etanol y cloruro de litio y se resuspendió en agua tratada con dietil – pirocarbonato, DEPC, para inactivar RNAsas, a una concentración final de entre 0.5 y 1 µg/ml.

Todas las enzimas de restricción fueron de New England Biolabs.

Expresión de canales

Se utilizo la línea celular *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) y ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Estos modelos de expresión heteróloga muestran pocas corrientes iónicas endógenas.

Expresión en las células HEK293

Las células HEK293 se cultivaron en 10 ml de medio de cultivo liquido en cajas Petri de 10 cm de diámetro a 37°C en una atmosfera húmeda controlada de 95 % aire y 5 % CO₂, el medio de cultivo utilizado fue DMEM suplementado con 5 % de suero bovino fetal y 1 % de penicilina – estreptomycin. Las células fueron despegadas con 1 ml Tripsina – EDTA incubando por 4 - 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrego 1 ml

de medio de cultivo para inactivar la tripsina y las células se disgregaron mecánicamente con una pipeta. Las células se siembran en cajas de 35 mm en 2 ml de medio de cultivo en cuyo fondo se han colocado cuadros de cubreobjetos estériles de aproximadamente 5 mm por lado, previamente cubiertos con 0.5 mg/ml de polilisina (Sigma). Las células sembradas en los pequeños cuadros de vidrio se mantuvieron en incubación con las mismas condiciones antes descritas. Todos los productos para el cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen.

La transfección transitoria se realizó un día después de sembradas las células con los agentes Lipofectamina (Invitrogen) o JetPei (Polyplus transfection). En general se transfectaron 1600 ng de DNA totales por cada transfección, para las cotransfecciones se utilizaron proporciones 1:1, 1:2 y 1:4 de los DNAs que codifican para el canal marcado con eYFP y CFP respectivamente.

Para las transfecciones se siguieron los protocolos descritos por el fabricante. Para Lipofectamina, el DNA se mezcló con 100 μ l de medio sin suero ni antibióticos y se mezcló con 5 μ l del agente diluido también en 100 μ l de medio, la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de agregarla a la caja Petri de 35 mm en donde se han incubado las células a la que previamente se le cambió el medio por uno sin aditivos. La transfección se incubó a 37 °C durante 6 horas y después se reemplazó el medio por uno con suero bovino fetal y antibióticos.

Para el caso de las transfecciones con JetPei, se disolvieron 3 μ l del agente y el DNA por separado en 100 μ l de NaCl 150 mM, se agregó el agente al DNA y la mezcla se incubó de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregarla a las cajas de 35 mm con las células incubadas. Las células fueron registradas o fotografiadas 2 o 3 días después de la transfección.

*Expresión en los ovocitos de rana *Xenopus laevis**

La extracción de los ovocitos se realizó como previamente se ha descrito [70]. Las ranas *Xenopus laevis* fueron anestesiadas sumergiéndolas en una solución de Tricaina al 0.2 % y pH 7 hasta que no se detectaran movimientos voluntarios. Posteriormente se realizó una pequeña incisión en un costado del vientre de la rana y se extrajo una

sección del ovario. El músculo de la rana se suturó con catgut crómico y la piel con sutura de nylon (Atramat). La piel de la rana se mantuvo húmeda durante el procedimiento quirúrgico y finalmente se dejó recuperar a la rana en un tanque con agua.

Los sacos con los ovocitos se colocaron en solución OR2 que contiene (en mM): 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES; a pH 7.5 ajustado con NaOH. Los sacos con los ovocitos se disgregaron en cúmulos pequeños y se cambiaron a OR2 con 1.2 mg/ml de colagenasa de *Clostridium histolyticum* tipo IA (Sigma) y se mantuvieron en agitación lenta. Después de 30 minutos, se reemplazó la solución por una sin colagenasa y los ovocitos se mantuvieron en agitación leve por 15 minutos más. Posteriormente se cambió la solución OR2 por ND96 que contiene (en mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 ácido pirúvico, 20 µg/ml gentamicina; a pH 7.5 ajustado con NaOH.

Al menos 6 horas después de su extracción, los ovocitos se inyectaron con 36 nl de mRNA utilizando un microinyector motorizado Nanoject II (Drummond Scientific) y pipetas de aproximadamente 20 µm de diámetro de apertura, y se transfirieron a pozos individuales con solución ND96. Para incrementar la supervivencia de los ovocitos, en algunos experimentos se suplementó la solución ND96 con 5 % de suero bovino fetal (Gibco) y 1 % de penicilina / estreptomina (Gibco). Los ovocitos se mantuvieron en una incubadora a 18 °C. Los experimentos se realizaron entre 3 y 5 días después de la inyección.

Electrofisiología

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando el método de fijación de voltaje en microáreas de membrana, *Patch – clamp*.

Esta técnica permite obtener registros de la corriente que fluye a través de los canales en la membrana con alta resolución temporal. Técnicamente consiste en formar sellos de alta resistencia entre la punta de una pipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura 5). A partir de esta configuración que se conoce como *on – cell*, *cell – attached* o célula adherida, que permite mantener el ambiente interno de la célula nativo, se

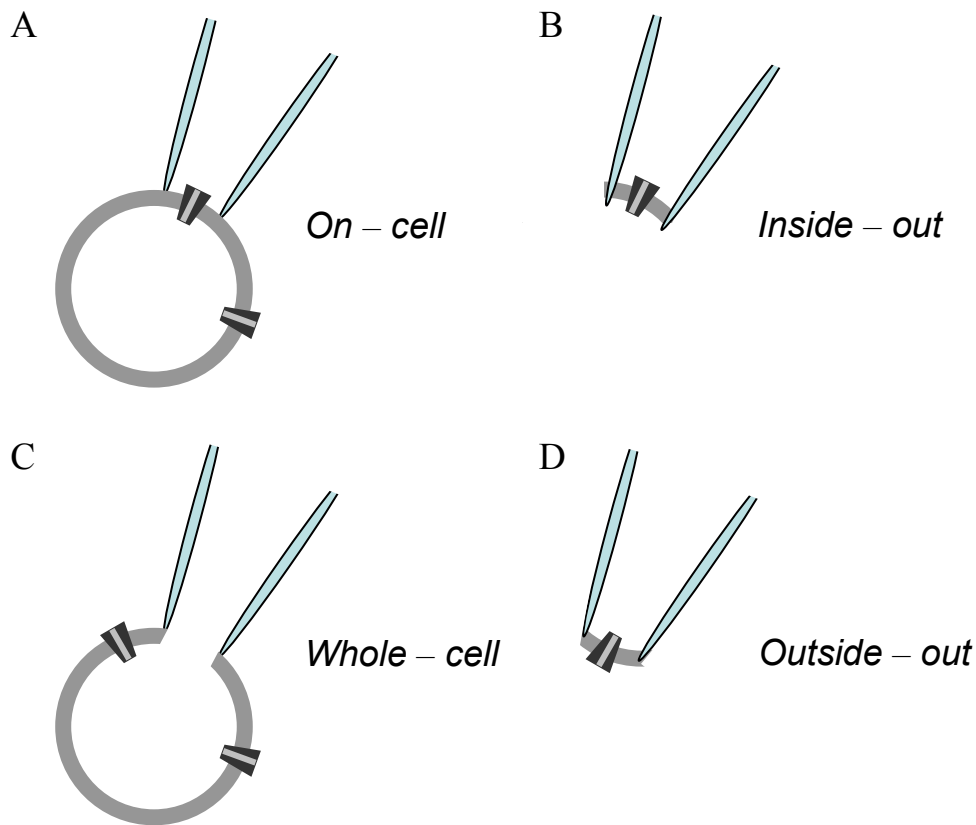


Figura 5. Configuraciones del parche de membrana en la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*. (A) configuración *on – cell*. Se esquematiza la pipeta y una célula con canales iónicos en la membrana, en esta configuración el medio intracelular es el propio de la célula. (B) *inside – out*. La cara intracelular de la membrana es accesible al baño de registro. (C) *whole – cell*. La solución de la pipeta es continua al interior de la célula. (D) *outside – out*. La cara extracelular de la membrana queda en contacto con el baño de registro, se hace notar que a diferencia de la configuración en (B), el canal se encuentra invertido.

derivan otras configuraciones. Si se retira la pipeta después de haber hecho el sello, se obtiene la configuración *inside – out* o dentro fuera, que permite tener acceso a la cara intracelular de la membrana. Si se tiene el sello y se aplica succión a la pipeta, se rompe la membrana que esta en la boca de la pipeta, teniendo acceso y continuidad eléctrica con el interior celular, a esta configuración se le conoce como *whole – cell* o célula completa. Finalmente a partir de esta última configuración, puede obtenerse la

configuración *outside – out* retirando la pipeta de la célula, obteniendo un parche con la cara extracelular de la membrana hacia el baño de registro.

Una vez obtenida la configuración deseada, se mantiene el voltaje transmembranal y se miden las corrientes en respuesta a los cambios del voltaje.

Un esquema simplificado del circuito del *patch clamp* se muestra en la figura 6. El *patch clamp* utiliza un amplificador operacional que compara la entrada del potencial de la pipeta V_P con el potencial deseado o de referencia V_{REF} , la salida de este amplificador esta conectada a una resistencia de retroalimentación R_F . Cuando se aplica un potencial deseado V_{REF} , se genera una corriente debido a la activación de canales iónicos, esta corriente I_P causa una caída en el voltaje V_P . La diferencia entre V_P y V_{REF} se compensa aplicando un voltaje igual a la salida del amplificador. La diferencia entre la salida del amplificador operacional y V_{REF} es igual al producto de la corriente que fluye por los canales I_P y R_F , es decir: $V=I_P R_F$. Mientras mas grande sea R_F , más sensibilidad se obtendrá en un registro. Finalmente esta diferencia se amplifica por un

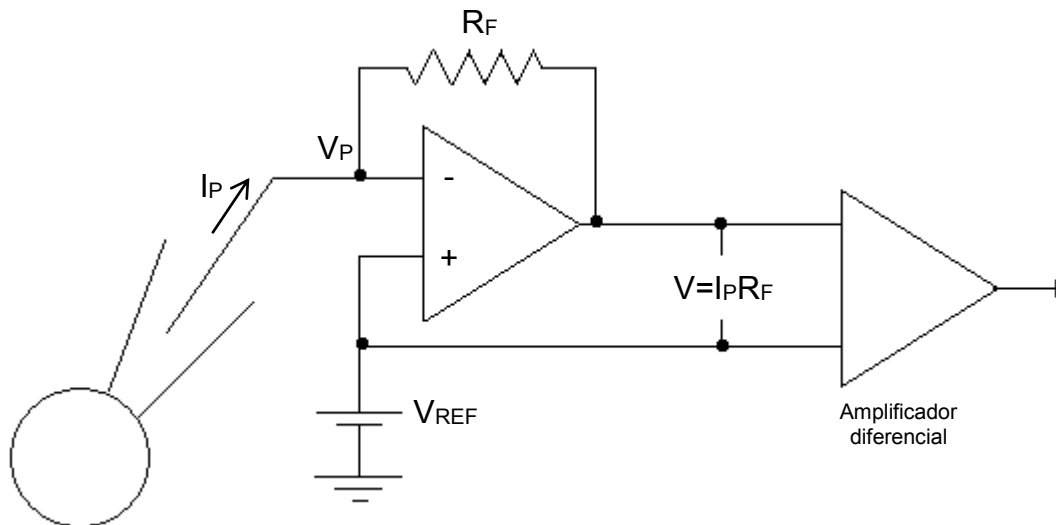


Figura 6. Esquema simplificado de un circuito de *patch clamp*. La diferencia entre el potencial de la pipeta V_P y el potencial deseado V_{REF} en la salida del amplificador operacional, es retroalimentada por R_F que iguala el valor de V_P y V_{REF} . La diferencia entre la salida del amplificador operacional y V_{REF} es proporcional a la corriente que fluye por la pipeta.

amplificador diferencial para su adquisición.

Adquisición de datos

La caracterización de las construcciones del canal TRPV1 unido a las FPs, se realizó en células HEK 293. Los experimentos se hicieron en la configuración *inside – out* de la técnica de fijación de voltaje. Se utilizaron pipetas de vidrio de borosilicato (Warner Instruments) cuya punta se pulió con una microforja MF-830 (Narishige). La resistencia de las pipetas en la solución de registro fue de entre 2 y 4 MΩ. Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo a temperatura ambiente (21 – 23 °C) usando un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik), las corrientes microscópicas se adquirieron a 10 kHz y se filtraron a 2kHz. Los datos se adquirieron con el programa Pulse (HEKA Elektronik) y se analizaron con el programa Igor Pro (Wavemetrics).

Se utilizó un protocolo de registro en el que el parche se mantuvo inicialmente a 0 mV y posteriormente se aplicaron pulsos desde -120 mV hasta 120 mV en intervalos de 10 mV con duración de 100 ms. Este protocolo sirvió para caracterizar la curva que relaciona la corriente en función del voltaje. Para obtener la curva dosis respuesta a capsaicina se utilizó un protocolo con un solo pulso de voltaje, de 0 mV a 80 mV con duración de 100 ms; las soluciones con diferentes concentraciones de capsaicina se profundieron por gravedad y se cambiaron con un intercambiador rápido de soluciones RSC-200 (Molecular Kinetics).

Las concentraciones que se utilizaron de capsaicina fueron desde 10 nM hasta 4 μM. Se midió la amplitud de la corriente y se normalizó a la corriente máxima obtenida con capsaicina 4 μM y se graficó en función del logaritmo de la concentración de capsaicina. Las funciones resultantes se ajustaron a una ecuación de Hill:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \left(\frac{[capsaicina]}{[capsaicina] + K_{1/2}} \right)^s$$

Donde, $K_{1/2}$ es la concentración a la cual se obtiene la mitad de la activación (CE_{50}) y s es el coeficiente de Hill que da un estimado del número de moléculas requeridas para activar al canal.

Se graficó el promedio de la corriente normalizada \pm desviación estándar.

Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia o FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o de Förster o FRET por sus siglas en ingles, es un fenómeno físico en el que la energía absorbida por un fluoróforo donador se transfiere a otra molécula aceptora mediante un proceso no radiativo. Este fenómeno es dependiente de la distancia de separación entre la molécula donadora y la aceptora, por tanto es posible utilizar el fenómeno como una regla molecular. En la figura 7 se muestra el diagrama de energía de Jablonski que ilustra las transiciones acopladas del estado excitado entre la emisión del donador y la absorción del aceptor cuando sucede FRET. La relajación no radiativa del donador es la transición que se acopla con la excitación del aceptor. Cuando hay un aceptor presente, la fluorescencia del donador puede transferir su energía del estado excitado

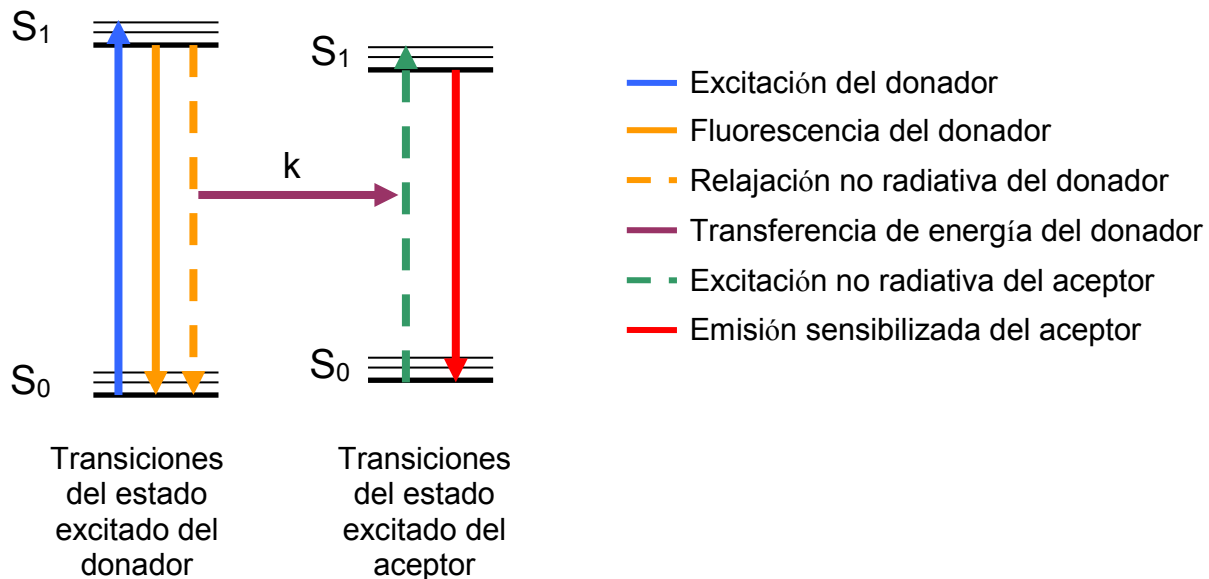


Figura 7. Diagrama de Jablonski de la transferencia de energía por resonancia de Förster. Las transiciones acopladas se muestran en líneas discontinuas. El fluoróforo donador puede transferir su energía al aceptor sin emitir un fotón (representado por la línea morada), la consiguiente emisión sensibilizada tendrá características del espectro de emisión del aceptor.

Modificado de Lakowicz [1]

hacia el aceptor sin emitir un fotón, la emisión sensibilizada resultante tendrá las características del espectro de emisión del aceptor, si es que el aceptor es un fluoróforo. Este fenómeno puede suceder aun si la molécula aceptora no es un fluoróforo.

Históricamente, uno de los obstáculos para utilizar FRET en sistemas biológicos, ha sido la falta de métodos eficientes para marcar específicamente proteínas con los fluoróforos apropiados. El desarrollo de proteínas fluorescentes con diferentes características espectrales, así como el estudio de otros marcadores como los metales [71] que permiten medir distancias mas pequeñas con mejor precisión, ha permitido generar mejores pares FRET (par donador – aceptor) que pueden ser utilizados en sistemas biológicos. El uso de proteínas fluorescentes, ya sea marcando una molécula con un solo par FRET o marcando diferentes proteínas o subunidades independientemente, cada una con una proteína fluorescente, ha permitido el estudio de interacciones proteína – proteína, incluyendo oligomerización de receptores. No obstante, en este ultimo ejemplo, la interpretación de resultados es mas compleja debido la estequiometría de estas proteínas, sin embargo este tipo de trabajo puede proporcionar valiosos resultados si los controles y la interpretación es precisa.

Principios básicos de FRET

Para que ocurra FRET, se deben cumplir tres condiciones (Figura 8). 1) El espectro de emisión del donador, se debe sobreponer con el espectro de absorción de aceptor. 2) El dipolo de emisión del donador y el dipolo de absorción del aceptor no deben estar alineados perpendicularmente uno del otro. Si los dipolos estuvieran alineados perpendicularmente las oscilaciones se cancelarían entre ellas y no habría transferencia de energía. 3) El donador y el aceptor deben estar separados por no mas de 10 nm uno del otro.

La teoría de la transferencia de energía fue desarrollada por Theodor Förster, aunque la teoría es compleja, solamente se describen las ecuaciones finales, para mayores detalles se refiere a [1]. Esta teoría muestra que la eficiencia de FRET varia al inverso de la sexta potencia de la distancia entre dos moléculas:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (\text{Eq. 1})$$

donde r es la distancia entre donador y aceptor, R_0 es la distancia característica en Angstroms donde la eficiencia de FRET es 50 %, esta R_0 puede calcularse para cualquier par donador – aceptor y depende de las características espectroscópicas de

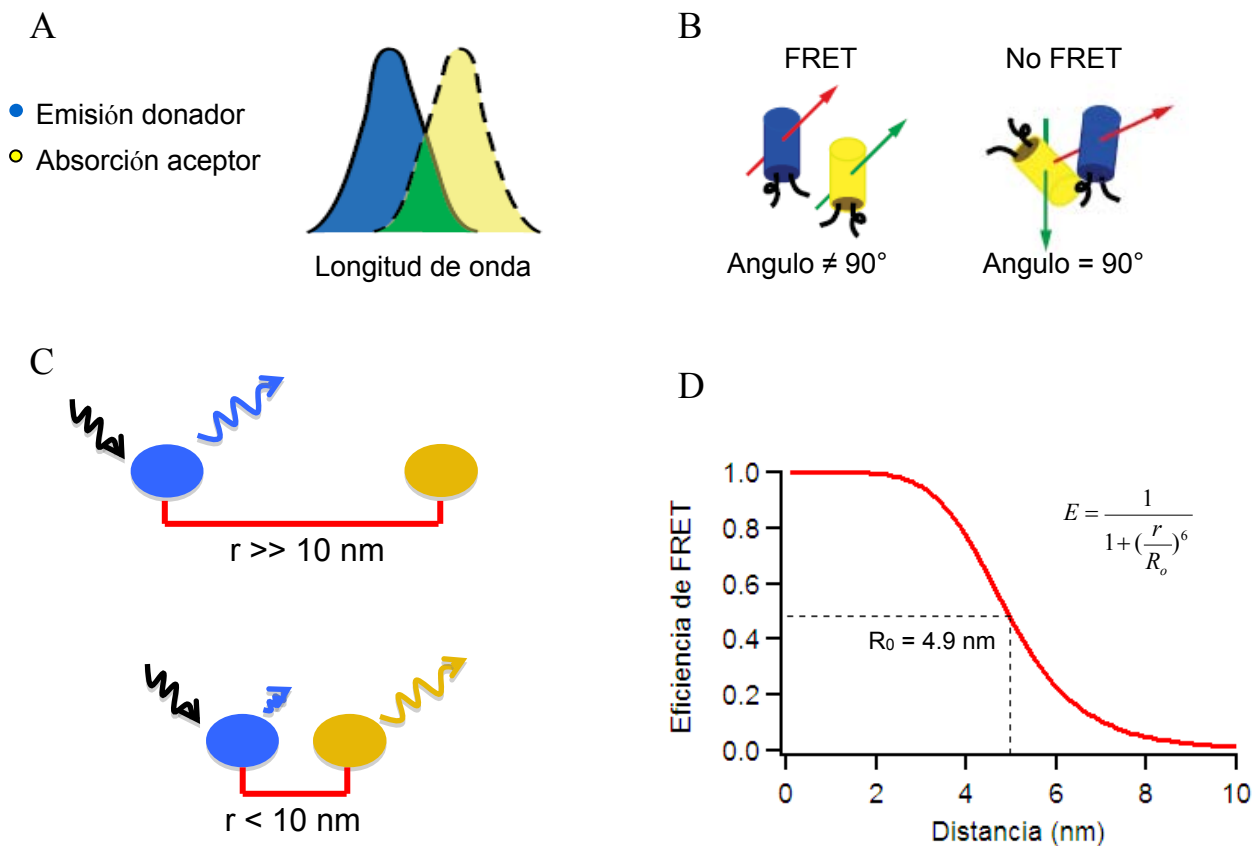


Figura 8. Principios básicos de FRET. (A) el espectro de emisión del donador se superpone con el de absorción del aceptor. El aceptor no necesariamente debe ser un fluoróforo. (B) Los dipolos del donador y aceptor no deben alinearse perpendicularmente. (C) el donador y el aceptor deben estar a una distancia de al menos 10 nm. (D) grafico de la ecuación de Förster que correlaciona eficiencia de la transferencia de energía en función de la distancia. La distancia en la que la eficiencia es el 50% es la distancia característica R_0 para el par FRET utilizado; para el caso del par CFP – eYFP, la R_0 es 4.9 nm. Modificado de Vogel et al. [5]

dichas moléculas, de las características entre ellas y del medio en el que se encuentren:

$$R_0 = 0.211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad (\text{Eq. 2})$$

donde κ^2 representa el factor de orientación entre los dipolos del donador y aceptor. n es el índice refractivo del medio. Q_D es la eficiencia cuántica del donador en ausencia del aceptor. $J(\lambda)$ es la integral del solapamiento del espectro de emisión del donador y espectro de absorción del aceptor y esta determinado por:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{Eq. 3})$$

donde F_D es la intensidad del donador en el rango de λ , con la intensidad total normalizada a la unidad (el área bajo la curva). ε_A es el coeficiente de extinción molar del aceptor en λ .

El factor de orientación κ^2 se define por la posición angular del aceptor con relación al vector del dipolo de emisión del donador θ y, la orientación del vector del dipolo de absorción del aceptor con relación al campo eléctrico del donador ω [72].

$$\kappa^2 = (1 + 3 \cos \theta) \cos \omega \quad (\text{Eq. 4})$$

Esta forma de κ^2 se refiere al campo eléctrico del donador, donde ω es el ángulo entre este campo eléctrico y el momento de transición del aceptor. Dado que $\cos^2 \theta$ y $\cos^2 \omega$ pueden tener valores entre 0 y 1, κ puede tener valores entre 0 y 4. En experimentos de FRET biológicos, los valores de θ y ω y por tanto el de κ son desconocidos. Para donadores y aceptores en solución o unidos por una cadena flexible a una molécula biológica, se asume que los valores de θ y ω tienen orientaciones aleatorias y por tanto la distribución de probabilidad de los valores de κ será entre 0 y 4, con un promedio de 2/3 [73]. Esto es porque el valor promedio de un ángulo polar es 1/3, y si ambos θ y ω son ángulos polares independientes, a partir de la ecuación 4, el valor promedio de κ^2 es 2/3.

Adquisición de datos y protocolos experimentales

La eficiencia aparente de FRET se midió por el método espectral. Se utilizó un microscopio invertido de epifluorescencia TE-2000U (Nikon) al cual se le acoplo un Láser Ar-Ion 163C (Spectra-Physics) como fuente de luz de excitación; el láser esta acoplado a una fibra óptica multimodal utilizando un lente bola de 3 mm. La luz divergente que sale de la fibra esta acoplada al puerto de iluminación por un lente colimador de 50 mm de distancia focal y después se enfoca al objetivo por un lente de 300 mm de distancia focal.

Para disminuir el componente dado por la interferencia de intensidades del láser (*Speckle*), se colocó un vibrador en contacto con la cubierta de la fibra óptica con lo que se obtuvieron imágenes de fluorescencia más homogéneas.

El láser cuenta con tres líneas principales: 458, 488 y 514 nm. Se utilizaron las primeras dos líneas como fuente de excitación. Para seleccionar cada una de estas líneas del láser, se utilizo un filtro de excitación, un espejo dicroico y un filtro de emisión pasa largo, con el siguiente arreglo:

Línea	Filtro de excitación	Espejo dicroico	Filtro de emisión
458	457/10x	z458rdc	HQ465lp
488	488/10x	z488rdc	HAQ495lp

Para mantener valores constantes de luz de excitación entre las dos líneas del laser utilizadas, se utilizaron filtros de densidad neutra ND con valores de 10 para la línea de 458 nm y de 20 para la línea de 488 nm, estos filtros se colocaron en un riel antes del filtro de excitación en el puerto de iluminación del microscopio. El tiempo de iluminación del láser hacia la muestra, se controló con un obturador Uniblitz VMM-D1 (Vincent Associates) colocado antes de la fibra óptica y controlado por el software Micromanager [74].

Las células se observaron con un objetivo apocromático de inmersión en aceite 60X con una apertura numérica de 1.4 (Nikon). El microscopio se acopló a un espectrógrafo de gradilla Spectra Pro 2150i (Acton Instruments) que fue controlado por su propio software; la luz se colectó con una cámara EMCCD modelo DL-658M-TIL (Luca, Andor) controlada por Micromanager. En la figura 9 se muestra un arreglo general del equipo.

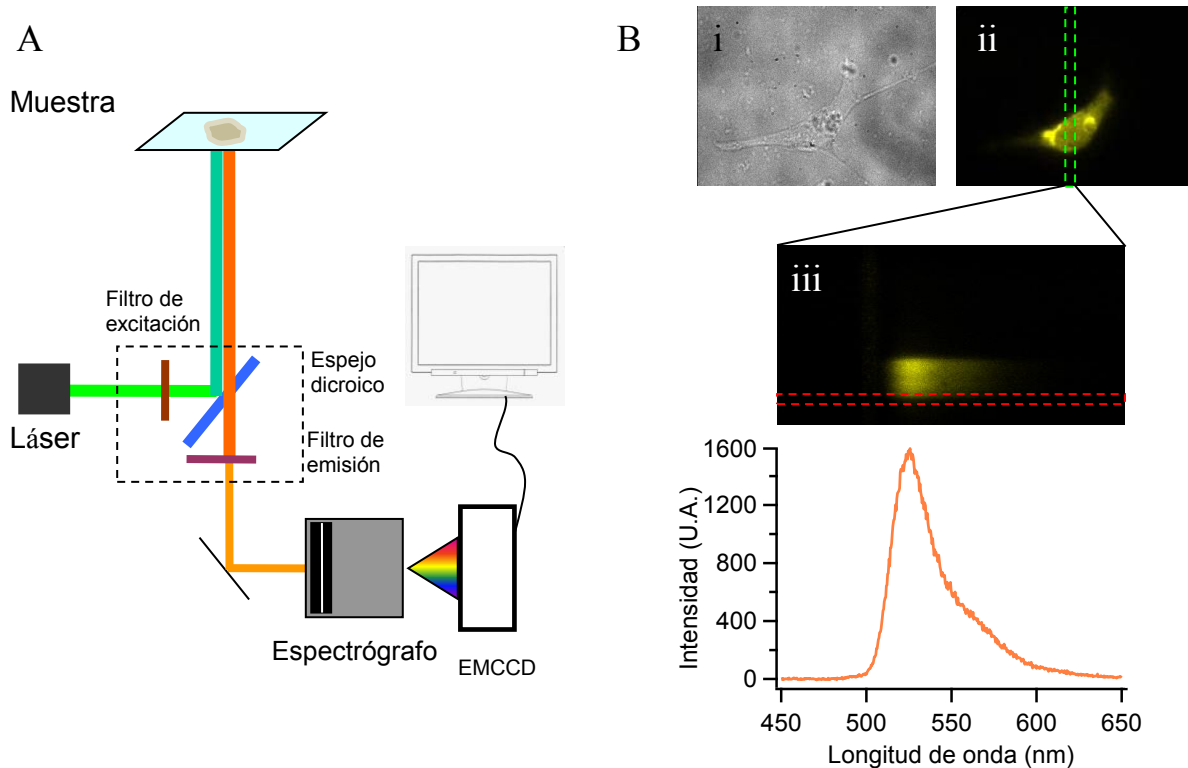


Figura 9. (A) esquema general del arreglo del equipo experimental para obtener los espectros de emisión de los fluoróforos utilizados. El rectángulo con líneas punteadas indica el cubo donde se colocan los filtros y espejos para seleccionar las longitudes de onda de interés. (B) Método de obtención del espectro de emisión de la eYFP. (i) fotografía en fondo claro de la célula de interés. (ii) Fluorescencia de eYFP en la misma célula que en (i), la línea punteada verde indica la zona en la que la rendija del espectrógrafo limita la entrada de luz. (iii) imagen espectral de la zona limitada en (ii), el eje de las ordenadas continúa siendo el eje de posición de la célula mientras que el eje de las abscisas es la longitud de onda. Haciendo un *line scan* de la zona de interés limitada por el recuadro en rojo, donde se encuentra la membrana, se obtiene el espectro de emisión mostrado abajo.

Los parámetros de la cámara EMCCD para los experimentos fueron: Ganancia = 100; Temperatura = -20; Bin = 1; Exposición = 200 ms.

Los espectros de emisión se obtienen de la siguiente manera: El espectrógrafo cuenta con una rendija que limita el paso de la luz, lo cual permite obtener la fluorescencia de una pequeña parte de la célula. La luz colectada se proyecta hacia la gradilla del espectrógrafo que la descompone, con lo cual se obtiene una imagen espectral captada por la cámara (Figura 9). El eje de las ordenadas en esta imagen continua representando la posición espacial de la célula, mientras que en el eje de las abscisas representa la longitud de onda. Por tanto, se puede seleccionar la zona de la célula de la cual se obtiene el espectro de emisión, en los experimentos se seleccionó únicamente la zona correspondiente a la membrana plasmática. Dicho espectro se obtiene midiendo la intensidad en una línea horizontal en la imagen o *line scan*.

Para determinar la eficiencia aparente de FRET, es necesario primero conocer los espectros de emisión de cada una de las proteínas fluorescentes. Se transfectaron células únicamente con una construcción marcada con CFP que es el donador, o con eYFP que funciona como aceptor. La excitación de la CFP se hizo con la línea de 458 nm y la de eYFP con 488 nm con el set de filtros descritos anteriormente. Dado que eYFP se excita también con la línea de 458 nm, es necesario conocer el porcentaje de excitación por esta longitud de onda. Esta excitación directa se conoce como *Crosstalk* y en nuestros experimentos se llamará *ratioA₀* y se determinó midiendo el cociente de las intensidades de emisión de la eYFP excitando a 458 nm y a 488 nm (Figura 10v).

Las células cotransfectadas con construcciones marcadas con CFP y con eYFP se excitan a 458 nm, el espectro de emisión de muestra dos picos (Figura 10i), el primero de ellos se encuentra a 488 nm y se debe a la emisión de la CFP, el segundo pico se encuentra en 525 nm y se debe a la emisión de la eYFP. El segundo pico tiene un componente que se debe al solapamiento de la emisión de la CFP o *bleed-thru*, un componente que se debe a la excitación directa por 458 nm descrita anteriormente (*crosstalk*) y otro componente debido a la transferencia de energía o FRET. Para cuantificar la eficiencia de FRET, se escala el espectro de CFP sola (obtenido anteriormente) (Figura 10ii) al primer pico del espectro y se resta, de esta manera se

quita el primer componente o *bleed-thru*. El espectro sustraído resultante es la emisión de la eYFP (Figura 10iii). Las células cotransfectadas también se excitan a 488 nm esto es para conocer la intensidad de la emisión de la eYFP en estas células y poder conocer que porcentaje del espectro sustraído se debe a la excitación directa o *crosstalk*. Se obtiene entonces el cociente del espectro sustraído y el espectro de emisión de eYFP excitando a 488 nm, a este cociente se le llamará *ratioA* (Figura 10iv). La eficiencia de FRET, E_{app} se obtiene como la diferencia:

$$E_{app} = ratioA - ratioA_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Si hay transferencia de energía, la emisión del aceptor, eYFP debe incrementar por tanto el valor de *ratioA* debe ser mayor al de la excitación directa cuando solo hay eYFP. Este método semeja a un experimento de emisión sensibilizada.

A partir de los espectros de emisión de la CFP y eYFP en las células cotransfectadas, se midió la intensidad del donador (I_d) y la intensidad del aceptor (I_a).

Para los experimentos con el canal Hv1, el donador fue la proteína mCerulean y el aceptor mCitrine.

La separación entre la membrana y las proteínas fluorescentes localizadas en los dominios terminales del canal, se calculó midiendo la transferencia de energía entre la eYFP, que en este caso funciona como donador, y la molécula Dipicrilamina (DPA), que es una molécula cargada negativamente, que se intercala en la membrana, no es fluorescente pero su espectro de absorción se sobrepone con el espectro de emisión de las proteínas fluorescentes funcionando como aceptor [75]. Esta molécula fue sintetizada por mitración a partir de 2-4-dinitro-N-fenilalanina (Sigma) en el laboratorio del Dr. Ronan Le Legadec en el Instituto de Química por Ernesto Ladrón de Guevara Reyes y Omar Saavedra Díaz, siguiendo protocolos ya antes descritos [76].

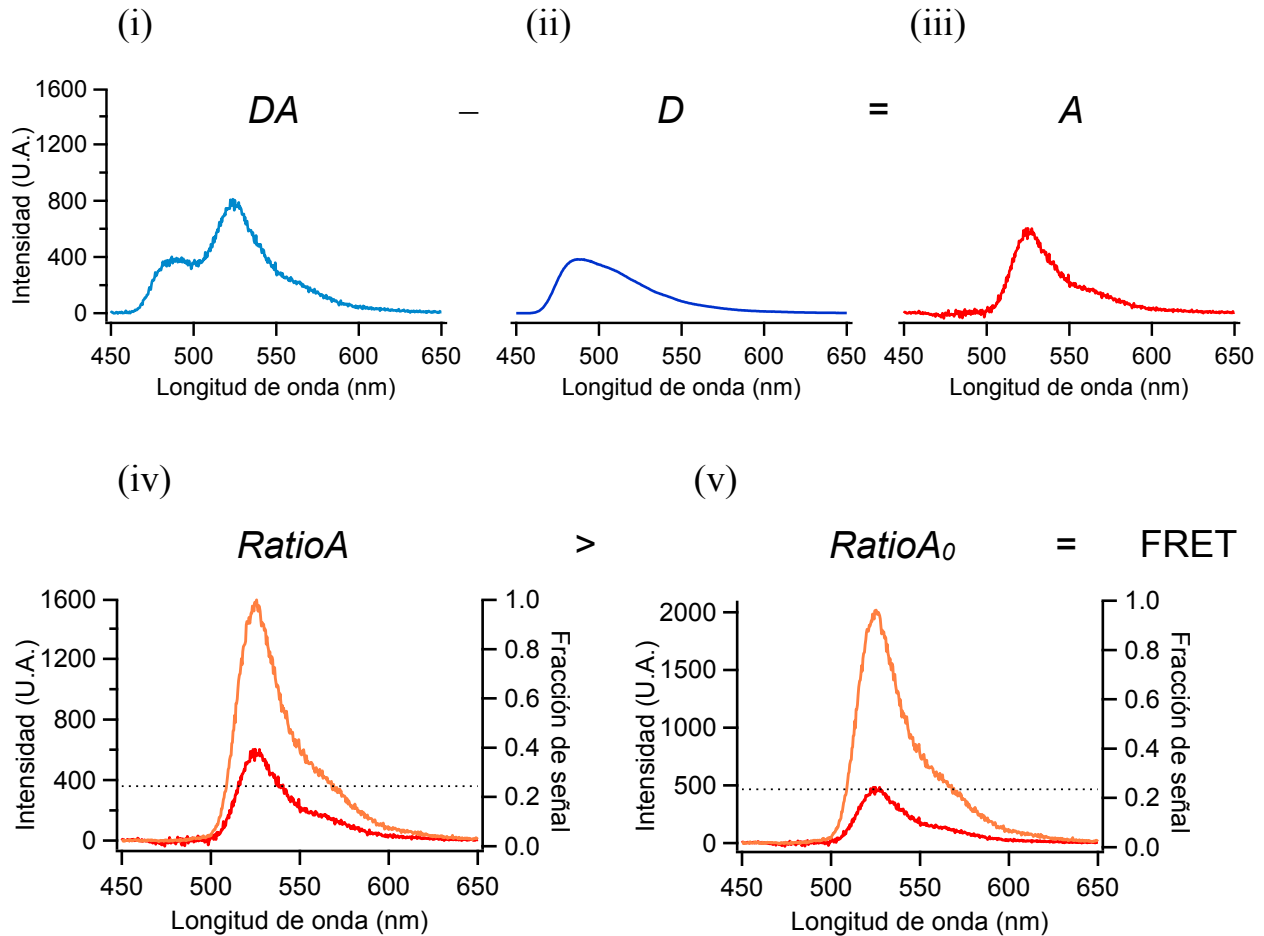


Figura 10. Determinación de la eficiencia de FRET. (i) espectro de emisión de las células cotransfectadas con donador y aceptor, DA excitando a 458 nm. (ii) espectro de emisión de CFP sola obtenido en células que solo expresan canales marcados con CFP, este espectro se escala al primer pico del espectro en (i) y se resta. La diferencia resulta en el espectro del aceptor A (iii). Se obtiene el espectro de la eYFP excitando la misma célula que en (i) a 488 nm (iv). $RatioA$ es el cociente del espectro A en (iii) y el de la eYFP, si es mayor al $RatioA_0$, indica que hubo transferencia de energía. $RatioA_0$ es la excitación directa de eYFP con 458 nm o *crosstalk*.

Se expresaron canales únicamente marcados con eYFP, o mCitrine para el caso del canal Hv1, en ovocitos de rana. La membrana vitelina se retiró del ovocito mediante pinzas y los ovocitos se colocaron en una cámara cuyo fondo de vidrio se cubrió previamente con polilisina. Después de 30 a 40 minutos el ovocito se retiró mecánicamente mediante succión con una pipeta Pasteur, este procedimiento deja un

pequeño segmento de membrana adherido al fondo de la cámara ideal para realizar experimentos de FRET [77]. Como en esta serie de experimentos el aceptor no es fluorescente, únicamente se cuantifica la intensidad de la emisión de la eYFP. Se obtuvo una imagen espectral cada dos minutos siguiendo el apagamiento de la eYFP después de aplicar DPA 20 μ M. El apagamiento se debe a que hay transferencia de energía hacia el DPA.

Los parámetros de la cámara EMCCD para esta serie de experimentos fueron: Ganancia = 100; Temperatura = -20; Bin = 2 o 4 dependiendo de la expresión de los canales; Exposición = 400 ms.

Las imágenes espectrales se analizaron con el programa ImageJ [78] y los espectros de emisión se analizaron con el programa Igor Pro (Wavemetrics).

Modelo para predecir la eficiencia de FRET

La eficiencia aparente de FRET que se determina en los experimentos, es producida por los canales formados con subunidades marcadas con donador (CFP) o aceptor (eYFP), como la interacción de las subunidades es independiente en el ensamblaje de la estructura cuaternaria del canal, se formarán diferentes poblaciones de canales con distintas cantidades de subunidades marcadas con donador o con aceptor. Si el canal en estudio es un tetrámero, existen 6 posibilidades en que el canal se puede ensamblar (Figura 11A): eYFP⁴, eYFP³:CFP, eYFP²:CFP², eYFP²:CFP² (con diferente organización), eYFP:CFP³, CFP⁴.

Cada una de estas poblaciones tienen diferente eficiencia de FRET, con excepción de la primera (eYFP⁴) y la última (CFP⁴) en las que no se tiene par para la transferencia de energía, no obstante estas poblaciones sí contribuyen a la fluorescencia en las células experimentales.

Por tanto lo que se mide es la eficiencia aparente de FRET, y hay que considerar entonces la fluorescencia total del donador, la del aceptor y la probabilidad de formación de cada una de las poblaciones en cada región de la membrana de la célula en la que se realiza la medición. En la figura 11B se muestra la probabilidad de aparición de cada

una de las poblaciones respecto a la cantidad de donador y aceptor para un tetrámero y, en la figura 11C, se grafica la eficiencia aparente como función del cociente de las intensidades del mismo canal tetramérico, tomando en cuenta la probabilidad de aparición de las poblaciones y la eficiencia de FRET de cada una (con una $R_0 = 50 \text{ \AA}$ y una separación entre subunidades de 60 \AA), esta relación esta determinada por:

$$E_{app} = \frac{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} E_{n_d(T-n_d)}}{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)}} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$I_d = \sum_{n_d=0}^T n_d P_{n_d(T-n_d)} (1 - E_{n_d(T-n_d)}) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$I_a = \sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} (1 + E_{n_d(T-n_d)}) \frac{\epsilon_d}{\epsilon_a} \quad (\text{Eq. 8})$$

Donde E_{app} es la eficiencia aparente de FRET, T es el numero de subunidades, n_d es el número de donadores, $(T - n_d)$ es el número de aceptores, $P_{n_d(T-n_d)}$ es la probabilidad de ocurrencia del canal con n_d donadores y $(T - n_d)$ aceptores, $E_{n_d(T-n_d)}$ es la eficiencia intrínseca del mismo canal.

I_d e I_a , son las intensidades del donador y del aceptor respectivamente y, ϵ_d y ϵ_a son los coeficientes de extinción molar del donador y del aceptor a la longitud de onda de excitación del donador.

Debido al componente estequimétrico, las distancias no se obtienen directamente de la eficiencia de FRET, por eso es necesario completar una curva de datos que podamos simular (eficiencia aparente como función del cociente de las intensidades) para obtener un valor aproximado.

Los detalles del modelo para predecir la eficiencia de FRET se encuentran en el APÉNDICE I.

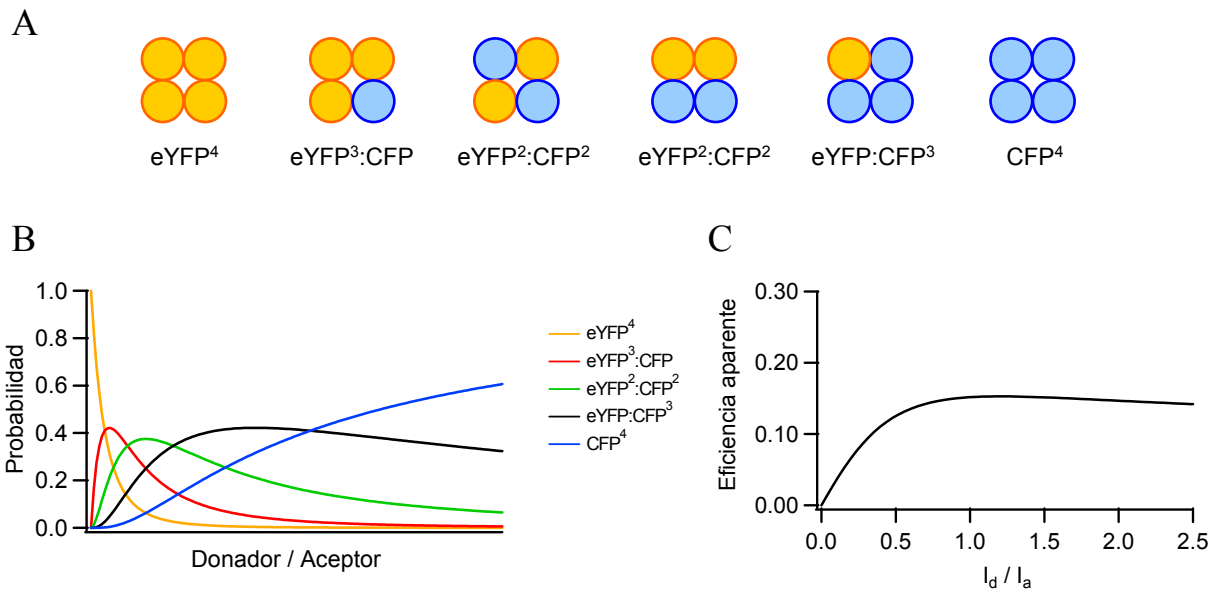


Figura 11. (A) poblaciones de canales formadas por la interacción independiente de subunidades marcadas con CFP o con eYFP en un tetrámero, la probabilidad de aparición de estas poblaciones se muestra en (B) respecto a la cantidad de donador y de aceptor. El modelo considera la probabilidad de aparición de estas poblaciones y la eficiencia intrínseca de cada población. El resultado del modelo para un tetrámero con una $R_0 = 50 \text{ \AA}$ y una separación entre subunidades de 60 \AA se muestra en (C).

Modelo para correlacionar la eficiencia de FRET con la separación de las proteínas fluorescentes a la membrana.

La eficiencia de FRET esta dada por el donador eYFP y el aceptor DPA que se intercala en la membrana. Se desarrolló un modelo para este par FRET que toma en cuenta su localización espacial (Figura 12). Para el canal TRPV1 se asume que hay cuatro proteínas fluorescentes idénticas y múltiples moléculas de DPA en la membrana colocadas aleatoriamente en la cara intracelular. La disposición de las moléculas de DPA considera el espacio en donde se encontrarían los dominios transmembranales del canal (espacio vacío en el centro del disco en la figura 12). En la simulación cada una de las proteínas fluorescentes transfiere energía a cada una de las moléculas de DPA

en la membrana y la eficiencia de FRET se calcula para 4 donadores y n_a aceptores de acuerdo a (ver APÉNDICE I):

$$E_{4_d n_a} = \frac{1}{4_d} \sum_{i=1}^{4_d} \left[\frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}} \right] \quad (\text{Eq. 9})$$

En donde r_{ij} es la distancia que hay entre la j molécula de DPA y la i eYFP y se calcula como:

$$r_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (\text{Eq. 10})$$

Donde x, y, z son las coordenadas de DPA y de eYFP en Angstroms. La sumatoria que va desde j a n_a en la ecuación 9, significa que la simulación corre hasta alcanzar el número de moléculas de DPA, este valor se fija a 1400.

Dado que el apagamiento de la proteína fluorescente por DPA se traduce directamente como eficiencia de FRET, y si conocemos las coordenadas x_i, y_i de experimentos anteriores, solo es necesario variar la coordenada z_i hasta que el resultado de la ecuación se aproxime al valor de apagamiento de la emisión de eYFP experimental.

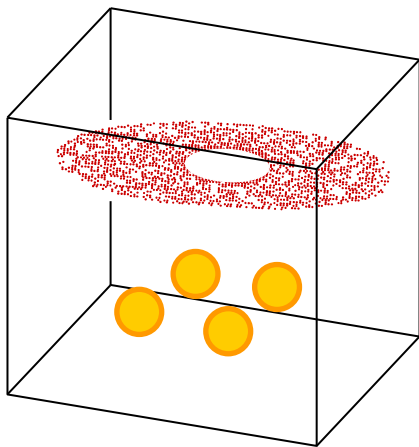


Figura 12. Descripción de la localización espacial de las proteínas fluorescentes (esferas amarillas) y las moléculas de DPA colocadas en un arreglo de disco con el centro vacío indicando la localización de los dominios transmembranales del canal.

Mediciones de Anisotropía

La eficiencia de FRET depende de la orientación entre los dipolos del donador y el aceptor (ver el apartado *Teoría de FRET*). Dado que en experimentos biológicos esta orientación no se puede determinar con exactitud, es necesario al menos evaluar la movilidad del donador y del aceptor midiendo la anisotropía y justificar la validez del valor de $\kappa^2 = 2/3$ utilizado para determinar la eficiencia de FRET.

Se midió la anisotropía de la eYFP unida al amino y al carboxilo terminal del canal TRPV1 expresado en células HEK 293. El microscopio de epifluorescencia tiene la misma configuración utilizada para los experimentos de FRET, únicamente se colocó un polarizador antes del filtro de excitación en posición horizontal y otro polarizador en la emisión, abajo del cubo de filtros donde se controló la dirección de la polarización horizontal y vertical. Se obtuvieron dos imágenes, una con el set de polarizadores en posición horizontal (posición paralela) y otra cambiando el polarizador de la emisión a posición vertical (posición perpendicular). Se midieron las intensidades y la anisotropía en estado estable A se calculo como:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (\text{Eq. 11})$$

Donde I_{\parallel} es la intensidad en paralelo y I_{\perp} es la intensidad en perpendicular con respecto a la polarización de la excitación.

Los valores de anisotropía medidos en un microscopio pueden ser distintos a los valores medidos en un espectrofluorímetro, además resulta complicado determinar las propiedades intrínsecas del sistema de detección (factor G). Por tanto se midió la anisotropía de fluoresceína isotiocianato (Pierce) disuelta en agua y en concentraciones crecientes de glicerol, de 0% a 99%. Los valores de anisotropía obtenidos en el microscopio se compararon con valores obtenidos en un espectrofluorímetro ISS – PC1 (Champaign), obteniendo de esta manera un factor de corrección para los experimentos. La concentración final de la fluoresceína fue siempre 10 μ g/ml.

Soluciones

Solución salina para experimentos de electrofisiología, FRET y anisotropía (*Salina*).

130 mM NaCl

3 mM HEPES

1 mM EDTA pH 7.2 con NaOH

Solución con calcio para experimentos de FRET (*Solución 2*).

130 mM NaCl

3 mM HEPES

2 mM CaCl₂ pH 7.2 con NaOH

Agonistas

Capsaicina (Sigma). Se diluyó en etanol a una concentración stock de 4 mM. Las concentraciones finales se diluyeron en solución a partir de este stock.

Acido lisofosfatídico, LPA (Avanti Polar Lipids). Se preparó en medio DMEM (Invitrogen) con 1% de suero bovino fetal libre de ácidos grasos (Roche) a una concentración stock de 10mM, como se ha reportado anteriormente [31].

Alicina. El stock lo otorgó la Dra. Tamara Rosenbaum del Instituto de Fisiología Celular, la concentración final utilizada fue de 200 μ M [40].

Para los experimentos de FRET, todos los agonistas se diluyeron a una concentración saturante. Para los experimentos para la activación del canal TRPV1 con calor, la temperatura se controló con un sistema peltier PTC-10 (NPI Electronics) y se monitoreó con un termistor CL-100 (Warner Instruments) colocado cerca de las células o de las membranas de los ovocitos.

Por simplicidad, a lo largo de este trabajo se le nombrará a la primera solución como “salina”, los agonistas se diluyeron en esta solución a menos que se indique que tiene calcio, en cuyo caso, el agonista se diluyo en la solución 2. Los experimentos con temperatura se llevaron a cabo en solución salina.

RESULTADOS

Mediciones estáticas de la organización del canal TRPV1

Organización de los dominios terminales del canal TRPV1 en el plano paralelo a la membrana.

Para llevar a cabo las mediciones de la eficiencia de FRET, fue necesario determinar la sensibilidad del equipo y el análisis de datos. Para esto, se utilizó al canal de protones activado por voltaje, Hv1, marcado con las proteínas fluorescentes mCerulean y mCitrine en el extremo carboxilo terminal (C – terminal). Se ha determinado que este canal se ensambla como un dímero [79, 80] y esta interacción esta mediada principalmente por el extremo C – terminal que forma una hélice superenrollada (*coiled – coil*) por lo que estos dominios en el dímero se encuentran cerca uno del otro [81, 82]. La cercanía en la que se encontrarían las proteínas fluorescentes en el canal marcado y la estequiometría simple de este canal lo hacen un buen candidato para ser utilizado como control positivo de FRET. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 13, la eficiencia de FRET en los canales marcados crece en función del cociente de la intensidad del donador y del aceptor (I_d / I_a) hasta llegar a un valor constante. Dado que el modelo para predecir la eficiencia de FRET depende de la estequiometría del canal, la distancia característica para el par donador – aceptor (R_0) y la distancia interfluoróforo (r), se graficó la ecuación 6 en función del cociente de las ecuaciones 7 y 8 utilizando un valor reportado de $R_0 = 53 \text{ \AA}$ para el par mCerulean – mCitrine [83] y se varió el valor de r hasta que la función resultante describiera mejor los datos. Como se muestra en la figura 13A, los datos ajustan mejor cuando se tiene una distancia $r = 4.7 \text{ nm}$ y la estequiometría es la de un dímero.

Los datos anteriores muestran que el método utilizado es capaz de determinar la eficiencia de FRET y que además, el modelo puede discriminar entre los diferentes niveles de oligomerización del canal. Cabe señalar que la distancia entre los extremos C – terminal en el *coiled – coil* del canal Hv1 es menor a la estimada por este experimento, no obstante es necesario considerar el tamaño del *linker* entre el extremo

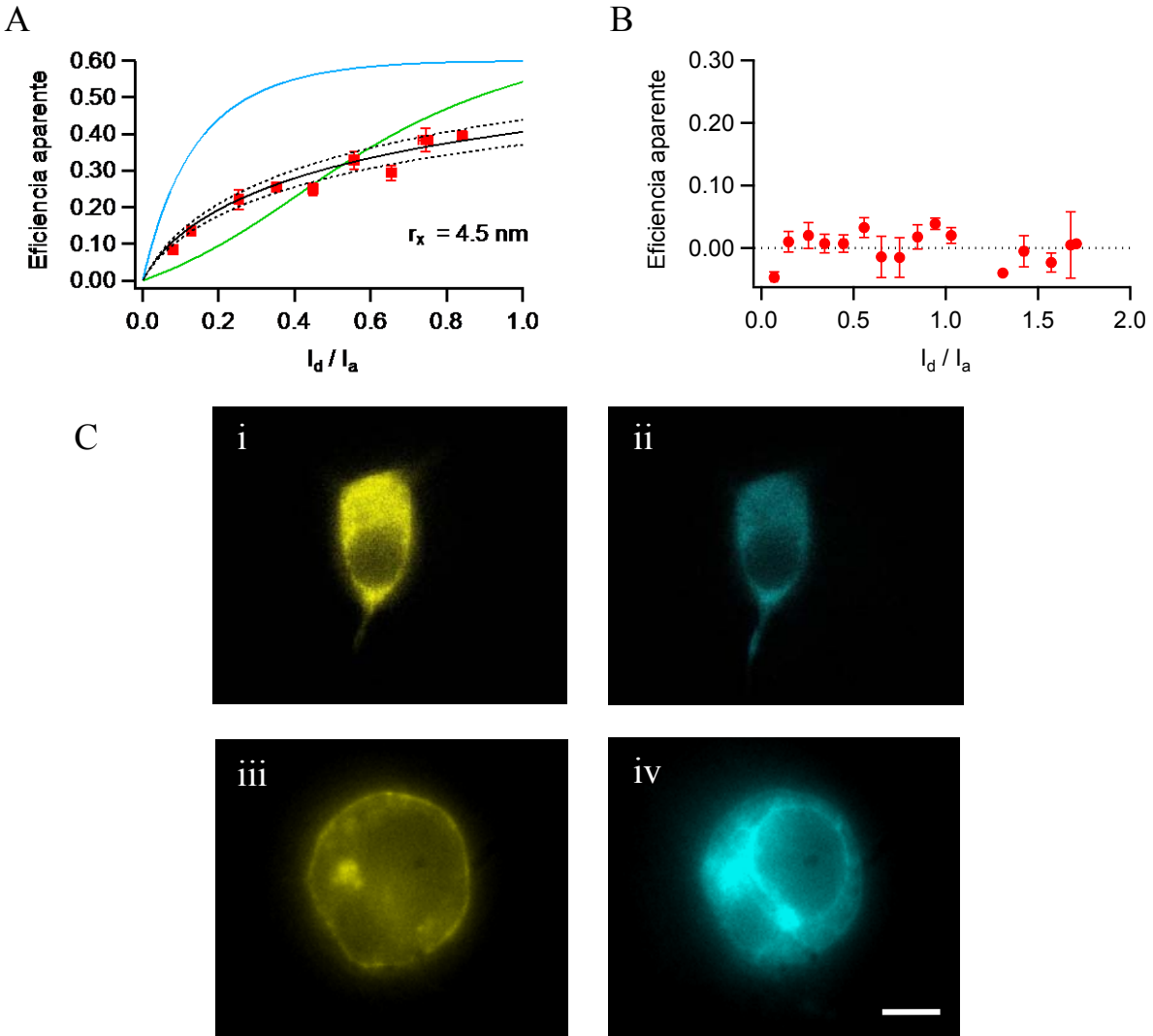


Figura 13. (A) FRET entre las proteínas fluorescentes mCerulean y mCitrine unidas al C – terminal del canal Hv1. Las líneas son predicciones para una separación de las proteínas fluorescentes de 4.5 nm de acuerdo al modelo descrito en la metodología. Las líneas negras corresponden a la estequiometría de un dímero con 0.2 nm de desviación estándar. La línea verde es la predicción para un trímero y la línea azul para un tetrámero. En (B) se muestran los resultados de cotransfectar la quimera TRPV1 – CFP junto con Hv1 – mCitrine, la eficiencia aparente es prácticamente cero. (C) Las fotografías *i* y *ii* son de una célula cotransfectada con Hv1 – mCitrine (*i*) y Hv1 – mCerulean (*ii*). La distribución de los canales marcados es la misma a diferencia de una célula cotransfectada con Hv1 – mCitrine (*iii*) y TRPV1 – CFP (*iv*). La escala es de 10 μM .

del canal y la proteína fluorescente en cada subunidad, el cual probablemente permitiría a las proteínas fluorescentes alejarse una de otra con cierta libertad de movimiento.

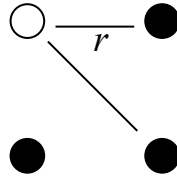
Como control negativo de FRET, se coexpresaron subunidades del canal Hv1 – mCitrine junto con subunidades del canal TRPV1 – CFP. Estas proteínas no deberían asociarse y por tanto no debería haber FRET entre ellas. Como era de esperarse, la eficiencia de FRET en esta cotransfección es prácticamente cero (Figura 13B) y sirve como referencia para los experimentos siguientes. Este resultado también sugiere que la eficiencia de FRET observada se debe a la cercanía entre fluoróforos dentro del propio canal en cuestión y no a la cercanía entre fluoróforos de diferentes canales.

La expresión de canales TRPV1 marcados con las proteínas fluorescentes CFP y eYFP en el extremo C – terminal del canal, resulta en canales funcionales activados por capsaicina de manera dosis – dependiente (Figura 14A, B). La concentración efectiva media (CE_{50}) para la quimera TRPV1 – CFP fue de 330 nM, mientras que la de la quimera TRPV1 – eYFP fue de 280 nM. Las corrientes iónicas de estas quimeras muestran características similares a las del canal silvestre como lo es la dependencia del voltaje y la rectificación saliente en la relación corriente – voltaje (IV). Además la CE_{50} de capsaicina en ambas quimeras no es muy distinta a la del canal silvestre que tiene un valor de 232 nM.

De las células transfectadas únicamente con una quimera, TRPV1 – CFP o TRPV1 – eYFP se pudo constatar que los espectros de emisión obtenidos son semejantes a los espectros de emisión reportados para estas proteínas fluorescentes [84, 85]. Esto indica que en estas quimeras, tanto el canal TRPV1 como las proteínas fluorescentes se pliegan correctamente. Haciendo posible determinar la distancia entre las proteínas fluorescentes unidas al C – terminal del canal TRPV1 mediante FRET.

Se midió la eficiencia de FRET en células HEK cotransfectadas con estas quimeras y se graficó como función de la intensidad del cociente del donador y el aceptor (I_d / I_a) (Figura 14C). De manera similar a lo que se muestra para el canal Hv1, los datos se compararon con el modelo para predecir la eficiencia de FRET. Con una $R_0 = 49.2 \text{ \AA}$ para el par CFP – eYFP, la predicción que mejor describe los resultados en este caso,

es la función para un tetrámero, con una $r = 6.6$ nm. Esta distancia r se refiere a la distancia entre fluoróforos adyacentes en un tetrámero porque la distancia entre fluoróforos colocados en diagonal es $r\sqrt{2}$, donde r es la distancia entre fluoróforos adyacentes.



De acuerdo a este resultado, la distancia entre fluoróforos colocados en diagonal en un tetrámero, $r\sqrt{2}$, es igual a 9.5 nm. Para obtener una estimación experimental de esta distancia, se coexpresaron los dímeros concatenados del canal TRPV1 con las proteínas fluorescentes en el extremo C – terminal, TRPV1 – TRPV1 – CFP y TRPV1 – TRPV1 – eYFP (Figura 14D, E, F). La expresión independiente de estas quimeras resulta en canales funcionales que responden de manera dosis – dependiente a capsaicina de manera similar al canal silvestre. Se espera que en células cotransfectadas con ambas quimeras se ensamblen canales con un solo par FRET, con el donador y el aceptor colocados en diagonal dentro del tetrámero, por tanto la predicción de la eficiencia de FRET por el modelo se hace tomando en cuenta la estequiometría de un dímero. La distancia interfluoróforo que resulta por el modelo es de 8 ± 2 nm, que está dentro del valor calculado del experimento anterior de 9.5 nm y da credibilidad a la aseveración de que el arreglo conformacional de los dominios C – terminal del canal en un plano se asemeja al de un cuadrado. Posteriormente se determinó la eficiencia de FRET en los canales marcados con las proteínas fluorescentes en el extremo amino terminal (N –terminal). Estas quimeras son funcionalmente semejantes al canal silvestre y responden a capsaicina de manera dosis – dependiente con una $CE_{50} = 181$ nM para la quimera CFP – TRPV1 y de 174 nM para eYFP – TRPV1 (Figura 15). De manera similar a las quimeras anteriores, los espectros de emisión de las proteínas fluorescentes concuerdan con los espectros ya reportados, no obstante la cotransfección de estas quimeras da una eficiencia de FRET casi nula, lo

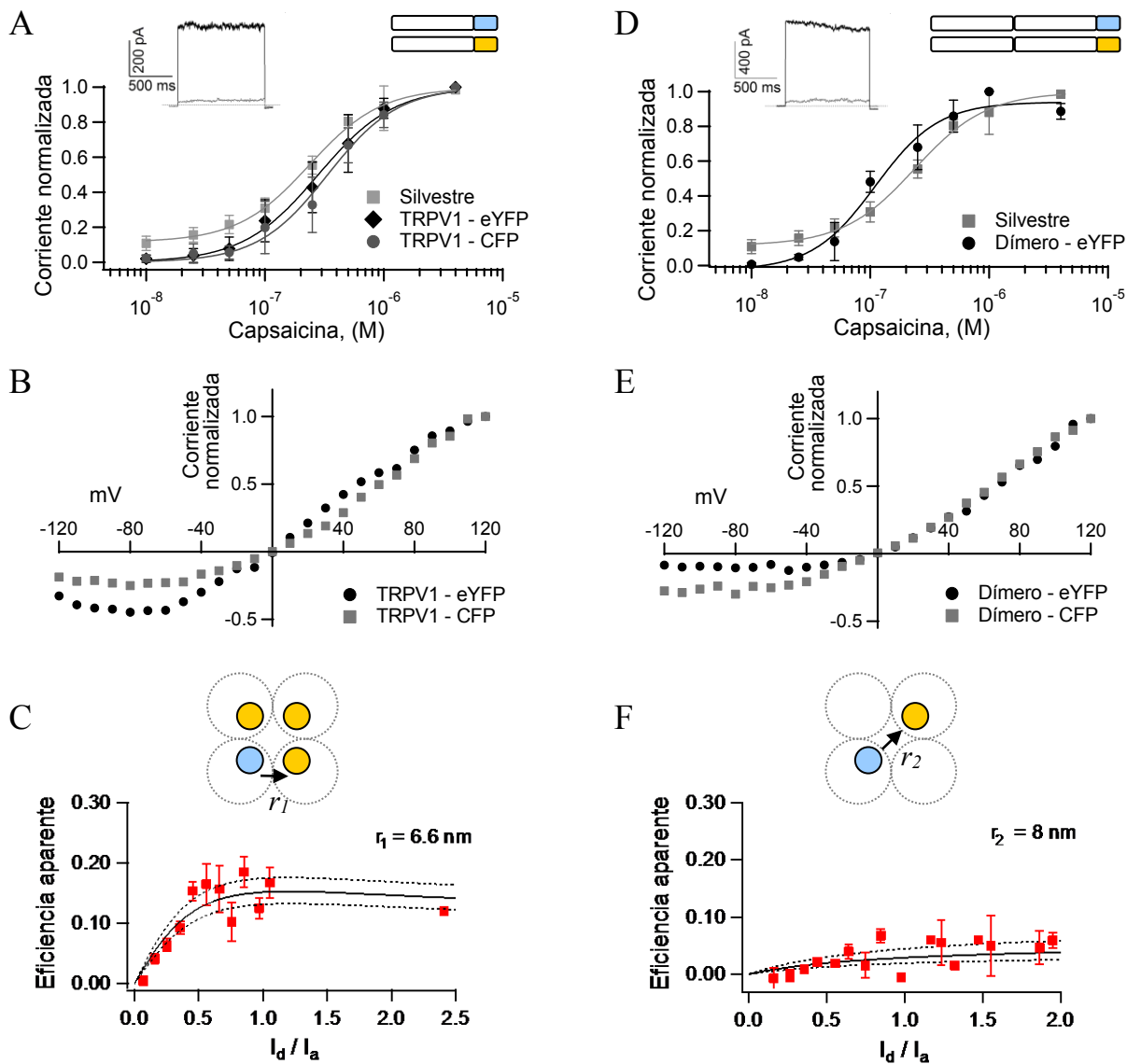


Figura 14. FRET en las construcciones con la FP en el C – terminal. (A) Curva dosis – respuesta a capsaicina de las quimeras TRPV1 – CFP, TRPV1 – eYFP y el canal silvestre, en el recuadro se muestra un ejemplo de la corriente iónica activada por capsaicina en el canal TRPV1 - CFP. (B) curvas IV de las quimeras. Las curvas muestran la rectificación saliente característica del canal. Las curvas se normalizaron al valor de la corriente a +120 mV. (C) FRET entre las proteínas fluorescentes CFP y eYFP unidas al C – terminal del canal TRPV1. Las líneas son predicciones para una separación de las proteínas fluorescentes adyacentes de 6.6 ± 0.2 nm para un tetrámero de acuerdo al modelo descrito en la metodología. En (D, E,) se muestran la curva dosis – respuesta, las curvas IV respectivamente de los dímeros concatenados TRPV1 – TRPV1 – FP, el recuadro en (D) es un ejemplo de la corriente de la quimera activada por capsaicina. En (F) la eficiencia de FRET resultado de la cotransfección de los dímeros. La distancia según la predicción entre las proteínas fluorescentes es de 8 ± 2 nm.

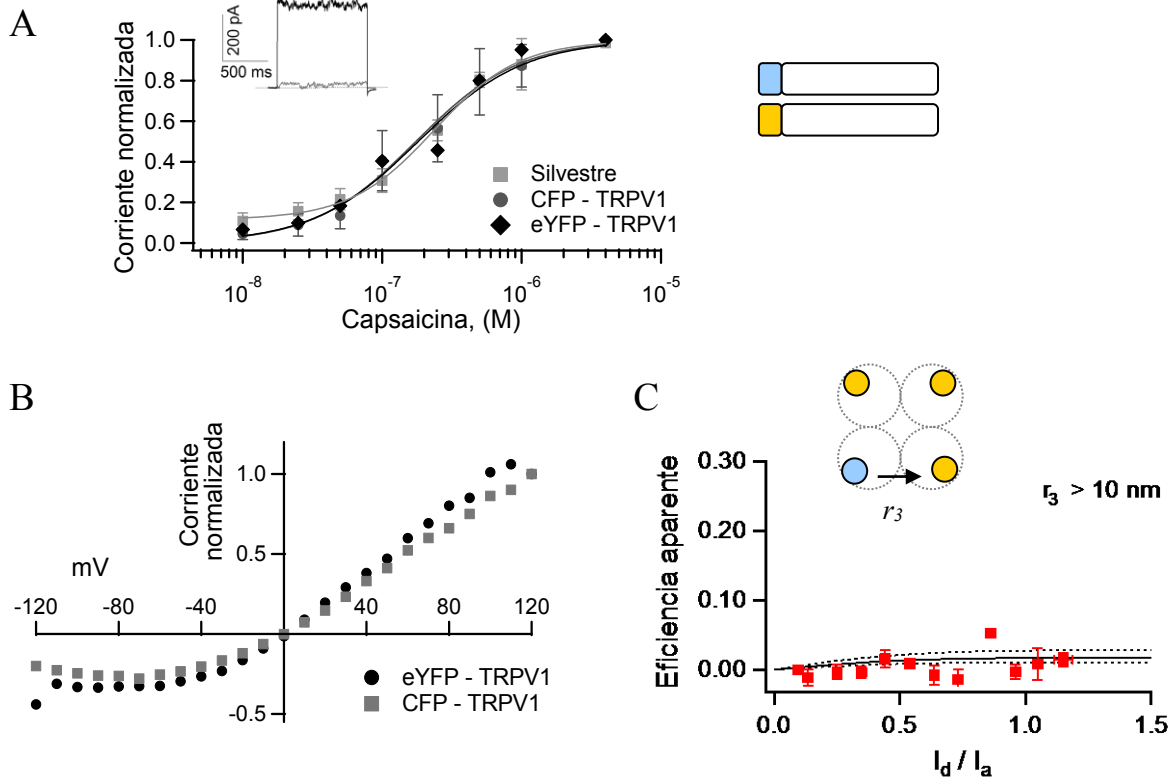


Figura 15. FRET en las construcciones con la FP en el N – terminal. (A) curvas dosis – respuesta de las quimeras CFP – TRPV1 y eYFP – TRPV1 comparadas con la del canal silvestre, el recuadro es un ejemplo de la corriente activada por capsaicina en el canal CFP – TRPV1. Ambas quimeras muestran una curva IV característica del canal (B). Las curvas se normalizaron al valor de la corriente a +120 mV. (C) la cotransfección de ambas quimeras resulta en canales esencialmente sin FRET por tanto se estima que la separación de las proteínas adyacentes es ≥ 10 nm.

que significa que las proteínas fluorescentes en los dominios N – terminal están lo suficientemente alejadas para que la transferencia de energía sea poco eficiente. Como es de esperarse, la predicción del modelo considerando nuevamente la estequiometría tetramérica del canal, da como resultado una distancia entre fluoróforos adyacentes de 10 nm o más. Estos resultados sugieren que los dominios N – terminal del canal, se encuentran en la periferia de los dominios C – terminal.

Organización de los dominios terminales del canal TRPV1 en el plano perpendicular a la membrana.

Para tener una visión mas completa de la organización de los dominios terminales del canal, es necesario conocer su localización respecto al plano de la membrana. Para estos experimentos se utilizó la molécula Dipicrilamina (DPA), que es una molécula no fluorescente que se intercala en la membrana y que funciona como aceptor para la emisión de eYFP, por tanto la separación entre los dominios terminales del canal y la

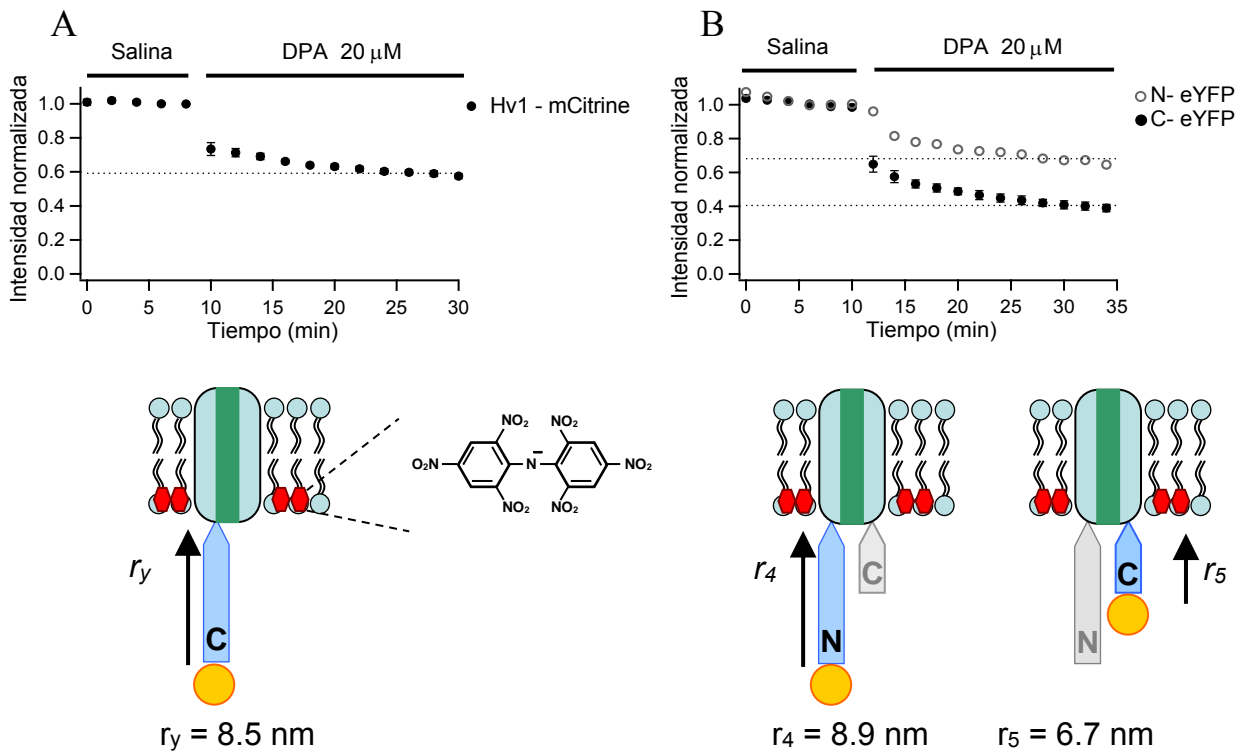


Figura 16. Apagamiento de las proteínas fluorescentes unidas a los dominios terminales de los canales Hv1 y TRPV1 por DPA. (A) DPA apaga aproximadamente 40 % de la emisión de la mCitrine unida al C – terminal del canal de protones Hv1. (B) el apagamiento de eYFP es distinto si se encuentra unido al extremo N – terminal o al C – terminal del canal TRPV1. La simulación descrita en la sección de metodología, da como resultado una separación de 8.5 nm para mCitrine y DPA intercalado en la membrana y para la eYFP y DPA de 8.9 nm y 6.7 nm si la proteína fluorescente se encuentra en el amino o en el carboxilo terminal del TRPV1 respectivamente. En el esquema de (A) se muestra la molécula de DPA.

membrana, puede determinarse midiendo la eficiencia de FRET entre este par donador - aceptor. Aunque la CFP es mejor par para DPA que la eYFP, se decidió utilizar esta última debido a que las quimeras con esta proteína fluorescente tienen mejor expresión, mejorando la relación señal – ruido en los experimentos. Este ensayo se hizo en segmentos de membrana de ovocitos y se construyó un curso temporal del apagamiento de la eYFP.

La aplicación de DPA 20 μM [86] a membranas de ovocito expresando la quimera TRPV1 – eYFP, provoca la reducción de la intensidad de la emisión de la eYFP en un 60 %. En contraste, la reducción de la emisión de eYFP cuando esta unida al N – terminal, en la quimera eYFP – TRPV1, es menor, apagando solo el 30 % de la fluorescencia (Figura 16B).

La correlación del apagamiento de la fluorescencia y la separación de las proteínas fluorescentes se hizo con el modelo descrito en la sección de metodología utilizando las coordenadas de las proteínas fluorescentes x_i, y_i que se obtuvieron en los experimentos anteriores, para las proteínas fluorescentes dispuestas en el C – terminal se utilizaron las coordenadas en Angstroms, {30, 30} (ya que se mide desde el centro de un plano, la suma sería semejante a 60 Å obtenida de los experimentos), y para las proteínas fluorescentes que se encuentran en el N – terminal del canal se utilizaron {50, 50}. Se varió la coordenada z_i que es la distancia entre las eYFP y las moléculas de DPA en la membrana hasta que la eficiencia fue igual al nivel de apagamiento, esto es, 0.6 para eYFP en el C – terminal y 0.3 para eYFP en el N – terminal.

De acuerdo a esta aproximación, se determinó que la separación de las eYFP localizadas en el C – terminal a la membrana es de 6.7 nm, mientras que si se encuentran en el N – terminal es de 8.9 nm.

Se ha reportado que el apagamiento de la fluorescencia de GFP en solución por DPA a la concentración que se utilizó es de solo 3 % [86]. Se puede asumir que el apagamiento de la eYFP en solución es similar pues la R_0 de ambas proteínas fluorescentes con el aceptor es similar, 31 Å para el par eYFP – DPA y 37 Å para el par GFP – DPA. Por tanto el apagamiento observado en los experimentos mayor a 3 %

sugiere que la eYFP unida a los dominios terminales del canal se encuentran lo suficientemente cerca del DPA intercalado en la membrana para que exista transferencia de energía.

Como un control, se utilizó al canal Hv1 marcado con la proteína fluorescente mCitrine en el C – terminal. Como se menciona anteriormente, se conoce la estructura de los segmentos transmembranales y el *coiled – coil* del C – terminal [81, 82], por tanto es posible comparar los resultados de FRET con la estructura cristalográfica. El apagamiento de la fluorescencia de mCitrine por DPA para este canal fue de 40 %, este valor de apagamiento se traduce como un eficiencia de 0.4. Para el par mCitrine – DPA, la $R_0 = 32 \text{ \AA}$. La aproximación matemática para determinar la separación entre las proteínas fluorescentes y el DPA intercalado en la membrana debe modificarse ya que el canal Hv1 es un dímero, por tanto solo hay dos donadores por canal. Las coordenadas espaciales x_i, y_i de los donadores se fijaron en {2.2, 2.2} según los propios resultados experimentales mostrados en la figura 13A. La separación estimada entre mCitrine y DPA en la membrana fue de 8.5 nm (Figura 16A). El *coiled – coil* del Hv1 mide ~6.5 nm, al final de esta estructura se encuentra la mCitrine cuyo fluoróforo se encuentra casi en el centro de su estructura, además de que existe un *linker* entre la mCitrine y el C – terminal del canal. Haciendo una suma de las distancias extras a la estructura del *coiled – coil* del canal, la separación de la mCitrine a la membrana es de ~9 nm lo cual es consistente con la aproximación matemática de los datos experimentales.

Orientación espacial entre el C – terminal y en N – terminal

Hasta ahora se ha determinado la localización espacial de los dominios terminales de canal TRPV1 independientemente. Para obtener una idea de la relación espacial entre el C – terminal y en N – terminal, cotransfectamos las quimeras eYFP – TRPV1 y TRPV1 – CFP. En el tetrámero formado por la interacción de estas subunidades, la eficiencia de FRET esta dominada por la transferencia de energía de la proteína

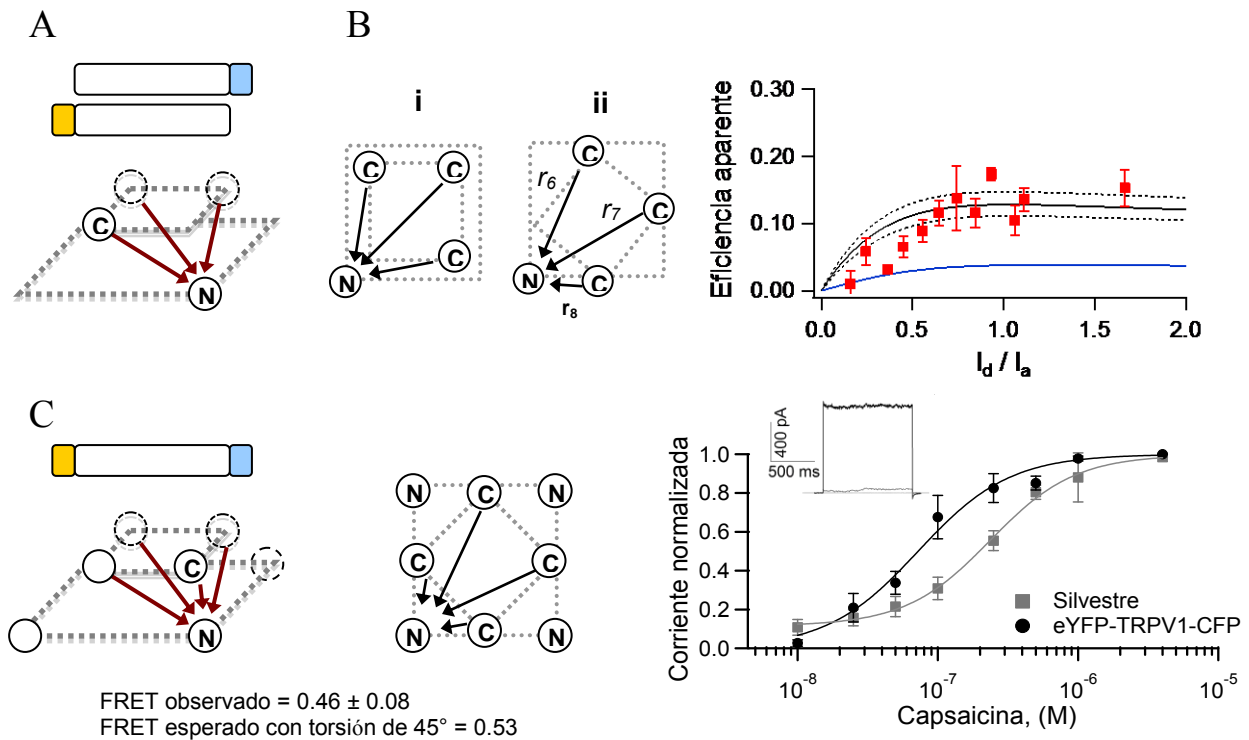


Figura 17. Posible torsión angular entre los planos del N – terminal y del C – terminal. (A) Modelo en tres dimensiones mostrando la localización de los dominios terminales según los resultados previos. En canales formados por subunidades de las quimeras TRPV1 – CFP y eYFP – TRPV1, la eficiencia de FRET está determinada por la transferencia de energía de la FP en el C – terminal a la FP en el N – terminal (flechas rojas). (B) Eficiencia de FRET del experimento descrito en (A), la línea azul en la grafica indica la predicción de la eficiencia de FRET si los dominios se encuentran organizados como en el esquema (i) sin torsión angular entre los planos. El único arreglo en el que los resultados pueden ser descritos es con una torsión angular de aproximadamente 40° entre los planos del C y del N – terminal como se esquematiza en (ii). (C) el canal eYFP – TRPV1 – CFP presenta múltiples vías de transferencia de energía entre las proteínas fluorescentes, la eficiencia de FRET esta dada por la transferencia de las FP en el C – terminal hacia las FP en el N – terminal (flechas rojas). El FRET observado en este canal es consistente con una torsión angular de los planos de 45° . Este canal con ocho proteínas fluorescentes se activa de manera dosis dependiente por capsaicina. El recuadro en la gráfica es un ejemplo de la corriente iónica activada por capsaicina en la quimera.

fluorescente del C – terminal a la proteína fluorescente del N – terminal. Como se ha determinado la separación de las proteínas fluorescentes adyacentes y su relación con el plano de la membrana es posible inferir la eficiencia de FRET si las proteínas fluorescentes localizadas en el amino y en el carboxilo terminal tienen la misma orientación. Esto es posible haciendo un modelo en tres dimensiones de la localización de las proteínas fluorescentes según los resultados descritos hasta ahora (Figura 17A). Los valores utilizados para el modelo fueron: 6.6 nm entre C – terminales, 10 nm entre N – terminales y 2.2 nm entre N y C – terminales en el plano perpendicular a la membrana.

Como se observa en la figura 17B, la eficiencia de FRET observada en los experimentos es alta. La predicción de la eficiencia aparente si los planos formados por las proteínas fluorescentes en C – terminal y las que están en N - terminal tuvieran la misma orientación es baja respecto a la observada. Una predicción más certera solo puede hacerse si existiera una torsión angular de $\sim 40^\circ$ entre los planos antes mencionados.

En el modelo para predecir la eficiencia de FRET, se consideran ahora tres distancias críticas: r_6 , r_7 , r_8 , a las cuales se les asigno el valor esperado con base al modelo en tres dimensiones. La eficiencia de FRET es baja si los planos tuvieran la misma orientación debido a que la separación de las proteínas fluorescentes en esta disposición es grande. En el caso de una torsión angular entre los planos, las distancias r_7 y r_8 se acortan incrementando la eficiencia de FRET.

Para corroborar estos resultados, se construyó la quimera eYFP – TRPV1 – CFP. El canal ensamblado cuenta con cuatro pares CFP – eYFP. Como la estequiometría de proteínas fluorescentes es fija, cada una de las cuatro CFP en el C – terminal del canal transfiere energía a cada una de las cuatro eYFP en el N – terminal (Figura 17C). Este canal con ocho proteínas fluorescentes es funcional, se activa con capsaicina de manera dosis dependiente al igual que el resto de las construcciones y también muestra rectificación saliente característica del canal. La CE_{50} de la activación por capsaicina es de 73 nM.

La eficiencia de FRET observada en este canal es alta, de 0.46 ± 0.08 debido a las múltiples vías de transferencia de energía. La eficiencia de FRET se calcula con el mismo modelo descrito para cuatro donadores y cuatro aceptores, y agregando una distancia extra r_9 a las distancias descritas en la figura 17A, B. La eficiencia de FRET observada es consistente con la esperada (0.53) en el tetrámero si existe una torsión angular de 45° entre los planos C – terminal y N – terminal.

La eficiencia de FRET reporta distancia y no restricción del movimiento de las proteínas fluorescentes.

La eficiencia de FRET depende de la orientación del dipolo de emisión del donador y el dipolo de absorción del aceptor. Por tanto es importante conocer la movilidad de las proteínas fluorescentes unidas al canal. La anisotropía de fluorescencia puede proveer una idea general de la movilidad de las proteínas fluorescentes y así saber si el hecho de usar un valor de $\kappa^2 = 2/3$ es válido para determinar la eficiencia de FRET [1].

Aunque el valor real de κ^2 no es posible conocerlo mediante mediciones de anisotropía, ha sido posible determinar que el error introducido en la determinación de distancias por FRET al utilizar $\kappa^2 = 2/3$ y la distancia real es de aproximadamente 10 % si los valores de anisotropía en estado estable son igual o menores a 0.3 [87].

Como se describe en la sección de metodología, se utilizó fluoresceína isotiacinato en concentraciones crecientes de glicerol para obtener un factor de corrección para las mediciones en el microscopio. Este factor de corrección fue de 1.45 (Figura 18A).

Se expresaron independientemente canales marcados con eYFP en N – terminal o en C – terminal. La anisotropía fue de 0.1 ± 0.04 y de 0.11 ± 0.07 para las proteínas fluorescentes en amino y en carboxilo respectivamente (Figura 18B). Como control se midió la anisotropía de la GFP monomérica obteniendo un valor de 0.16 ± 0.05 . Estos valores de anisotropía en estado estable concuerdan con los valores reportados tanto para GFP monoméricas como para otras proteínas fluorescentes unidas a otros canales

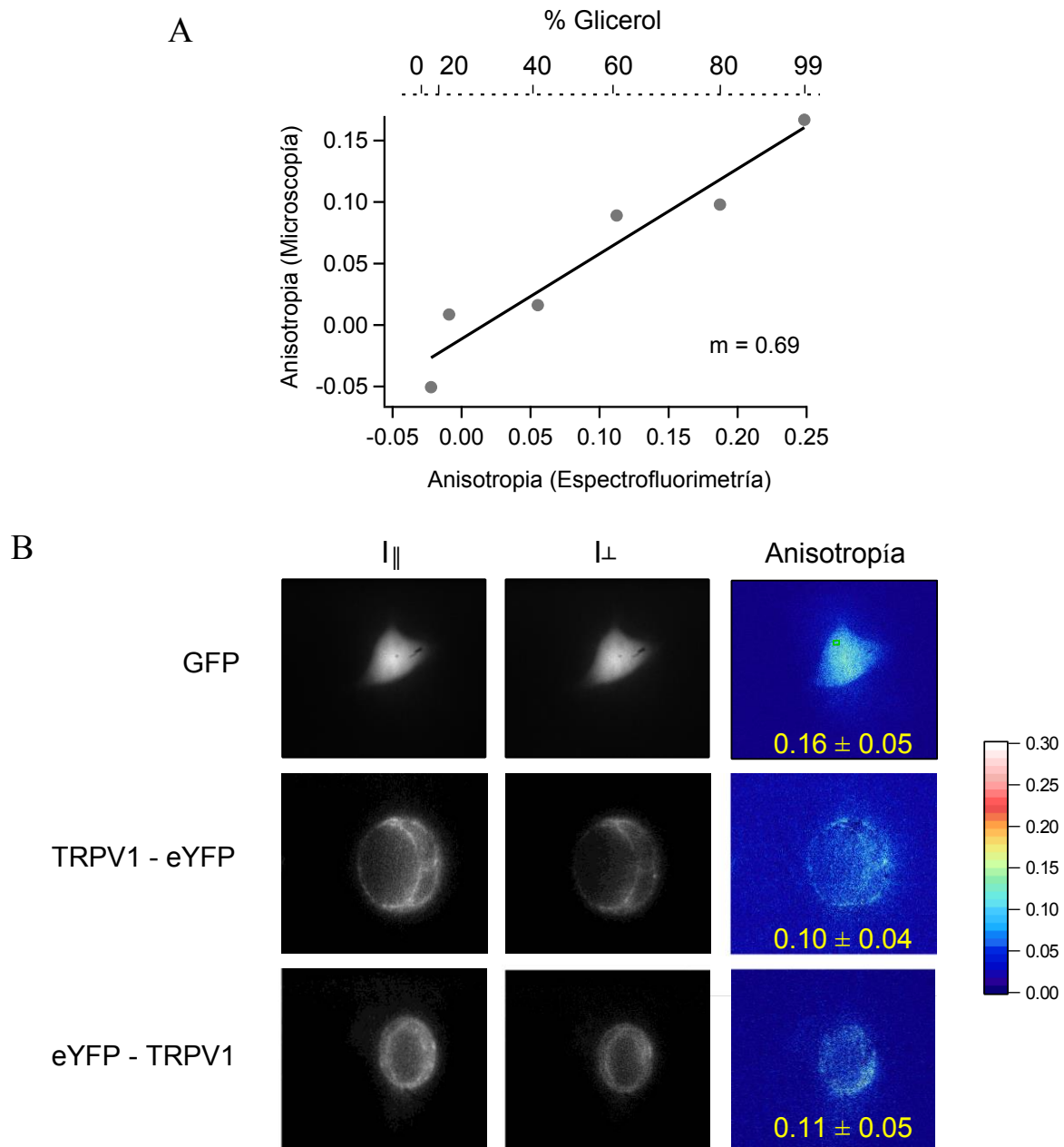


Figura 18. Mediciones de anisotropía de las proteínas fluorescentes. (A) anisotropía de FITC en concentraciones crecientes de glicerol. Se comparó la anisotropía medida en el microscopio con la medida en un espectrofluorímetro para determinar las propiedades intrínsecas del equipo; se obtuvo un factor de corrección $1/m = 1.45$. (B) imágenes de epifluorescencia de células transfectadas con GFP, TRPV1 – eYFP o eYFP – TRPV1. En el panel izquierdo se muestran las imágenes obtenidas con la disposición de los polarizadores en paralelo (I_{\parallel}), en el panel central con los polarizadores en perpendicular (I_{\perp}) y en el panel derecho se muestra la anisotropía calculada pixel a pixel en escala de color.

iónicos [85]. Los valores obtenidos sugieren además que las proteínas fluorescentes unidas al N – o C – terminal del canal, tienen una movilidad similar lo que en conjunto indica que las mediciones de la eficiencia de FRET pueden interpretarse en términos de distancia y no en términos de orientación de los fluoróforos utilizados.

Mediciones de la organización del canal TRPV1 en el estado activado

Para determinar si la activación del canal TRPV1 promueve algún cambio conformacional en los dominios terminales, se midió la eficiencia de FRET en presencia de agonistas del canal en concentraciones saturantes: capsaicina (4 μM), alicina (200 μM), ácido lisofosfatídico (LPA, 5 μM) y a tres temperaturas fijas 22 °C, 32 °C y 42 °C.

Además debido a que la desensibilización del canal por capsaicina es un proceso dependiente de calcio [65], se realizaron experimentos en presencia de 2 mM de calcio y capsaicina.

Se midió la eficiencia de FRET en canales marcados con CFP y eYFP en el extremo C – terminal. Inicialmente los experimentos se realizaron en células HEK 293, se midió la eficiencia de FRET y se graficó como función de la intensidad del cociente del donador y el aceptor (I_d / I_a), como se describe anteriormente. Las células se mantuvieron con el agonista durante todo el experimento. Los datos se ajustaron al modelo antes descrito y los resultados se muestran en la figura 19, la separación entre las proteínas fluorescentes adyacentes (r) en presencia de capsaicina es la misma a la que se muestra en la figura 14C en solución salina. La presencia de calcio tampoco modifica la distancia (r).

Debido a que estos experimentos se realizaron de manera independiente y además que los puntos muestran una alta dispersión sobre todo en presencia de calcio, se hicieron experimentos pareados en membranas de ovocitos inyectados con las quimeras marcadas en el extremo C – terminal del canal TRPV1. En la figura 19D y E se observa

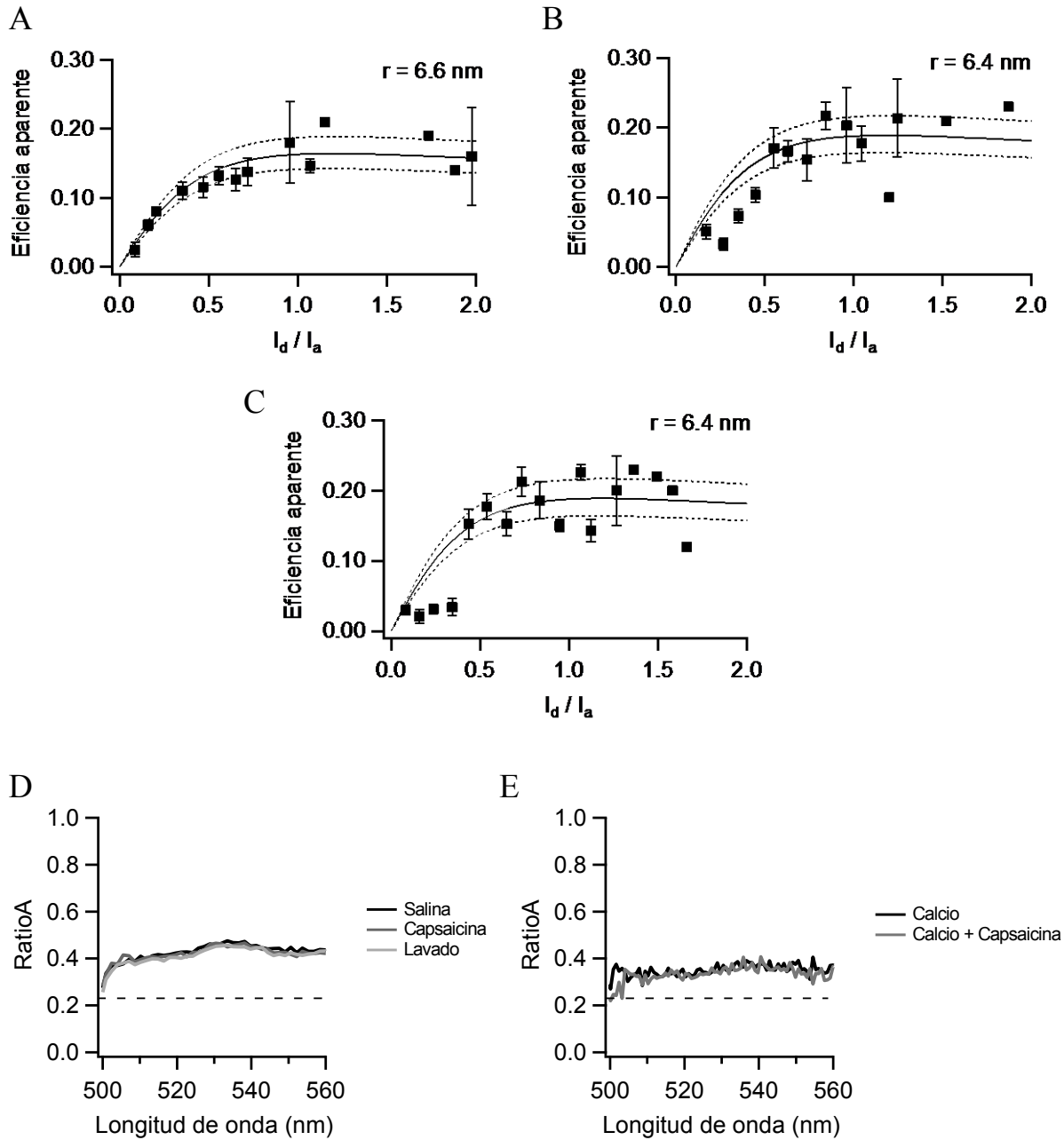


Figura 19. Eficiencia de FRET entre las proteínas fluorescentes localizadas en el C – terminal del canal TRPV1 tras la activación del canal por capsaicina (A), en solución con calcio (B) y en solución con calcio y capsaicina (C); los experimentos fueron realizados en células HEK 293. Las líneas son predicciones del modelo descrito en la metodología. (D, E) $RatioA$ calculado de experimentos pareados en membranas de ovocitos coexpresando las quimeras marcadas en el C – terminal del TRPV1. La línea punteada representa el $RatioA_0$. La cantidad de FRET se obtiene de la diferencia $RatioA - RatioA_0$.

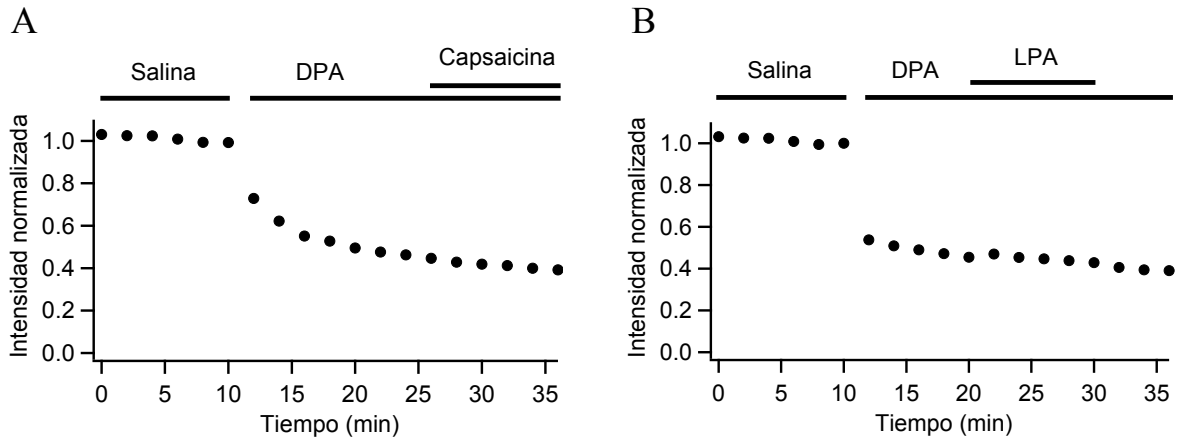


Figura 20. FRET entre eYFP localizada en el C – terminal del TRPV1 y DPA intercalado en la membrana en presencia de capsaicina (A) y LPA (B). El experimento se realizó en membranas de ovocitos.

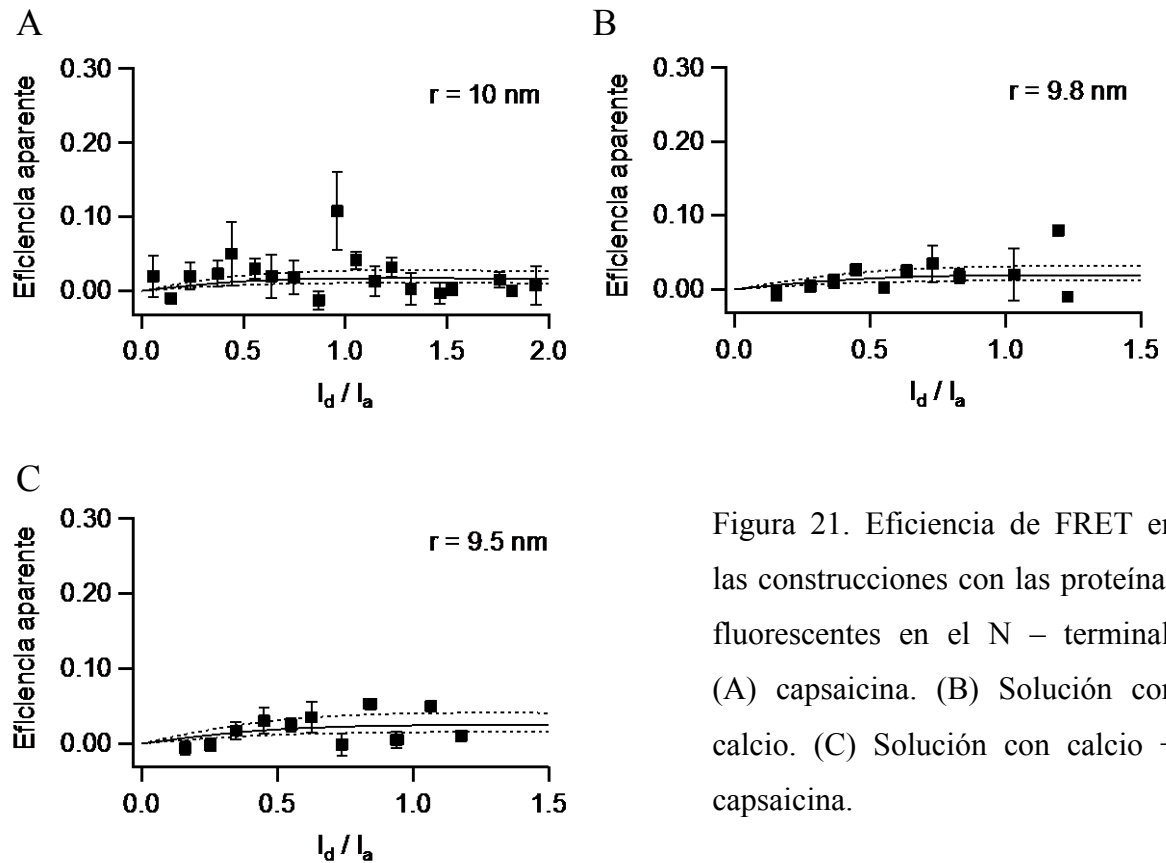


Figura 21. Eficiencia de FRET en las construcciones con las proteínas fluorescentes en el N – terminal. (A) capsaicina. (B) Solución con calcio. (C) Solución con calcio + capsaicina.

que el valor de *RatioA* no se modifica en presencia de capsaicina ni en presencia de calcio.

La eficiencia de FRET entre la proteína eYFP localizada en el extremo C – terminal del TRPV1 y el aceptor DPA intercalado en la membrana no se modificó con la aplicación de capsaicina ni de LPA en membranas de ovocitos (Figura 20).

Para el caso del canal marcado en el extremo N – terminal, no se observó cambio en la eficiencia de FRET en presencia de capsaicina con y sin calcio respecto a la solución salina (Figura 21). Debido a la poca expresión de las quimeras CFP – TRPV1 y eYFP – TRPV1 en ovocitos de rana, no fue posible realizar experimentos pareados.

Se utilizó la construcción que mostró los valores mas altos de FRET en los

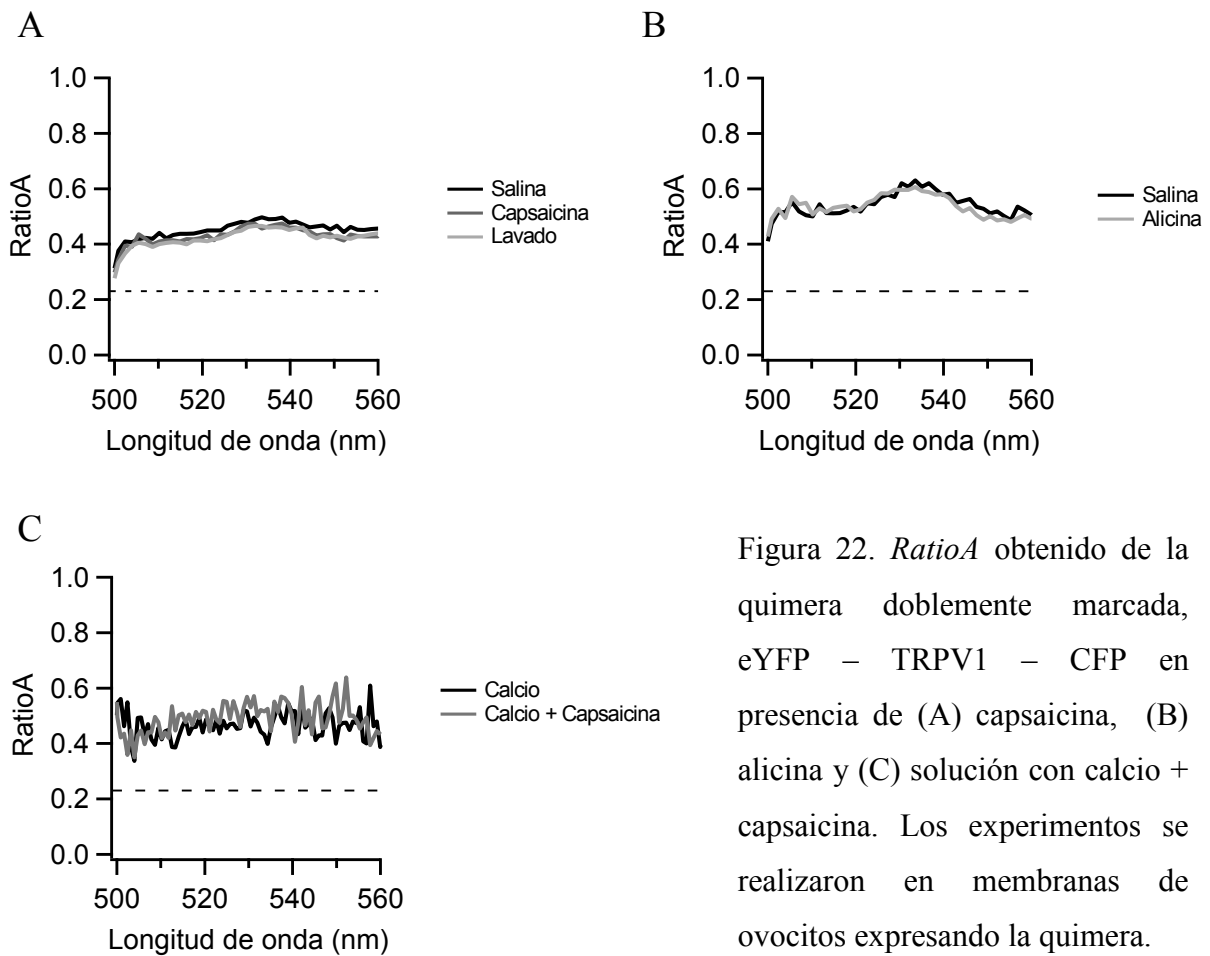


Figura 22. *RatioA* obtenido de la quimera doblemente marcada, eYFP – TRPV1 – CFP en presencia de (A) capsaicina, (B) alicina y (C) solución con calcio + capsaicina. Los experimentos se realizaron en membranas de ovocitos expresando la quimera.

experimentos, el canal doblemente marcado, con la eYFP en el amino terminal y la CFP en el carboxilo terminal. Esta quimera muestra buena expresión en ovocitos de rana por lo que fue posible probar los agonistas en experimentos pareados. Como se muestra en la figura 22, la aplicación de capsaicina, alicina y capsaicina con calcio, no modifica el valor de *RatioA* respecto a la solución salina.

Con el fin de determinar posibles cambios conformacionales asociados a la activación del canal con temperatura, primero se determinó si los saltos de temperatura afectaban la emisión de las proteínas fluorescentes, para esto se obtuvieron los espectros de emisión de la CFP y la eYFP a las tres temperaturas utilizadas en los experimentos. No

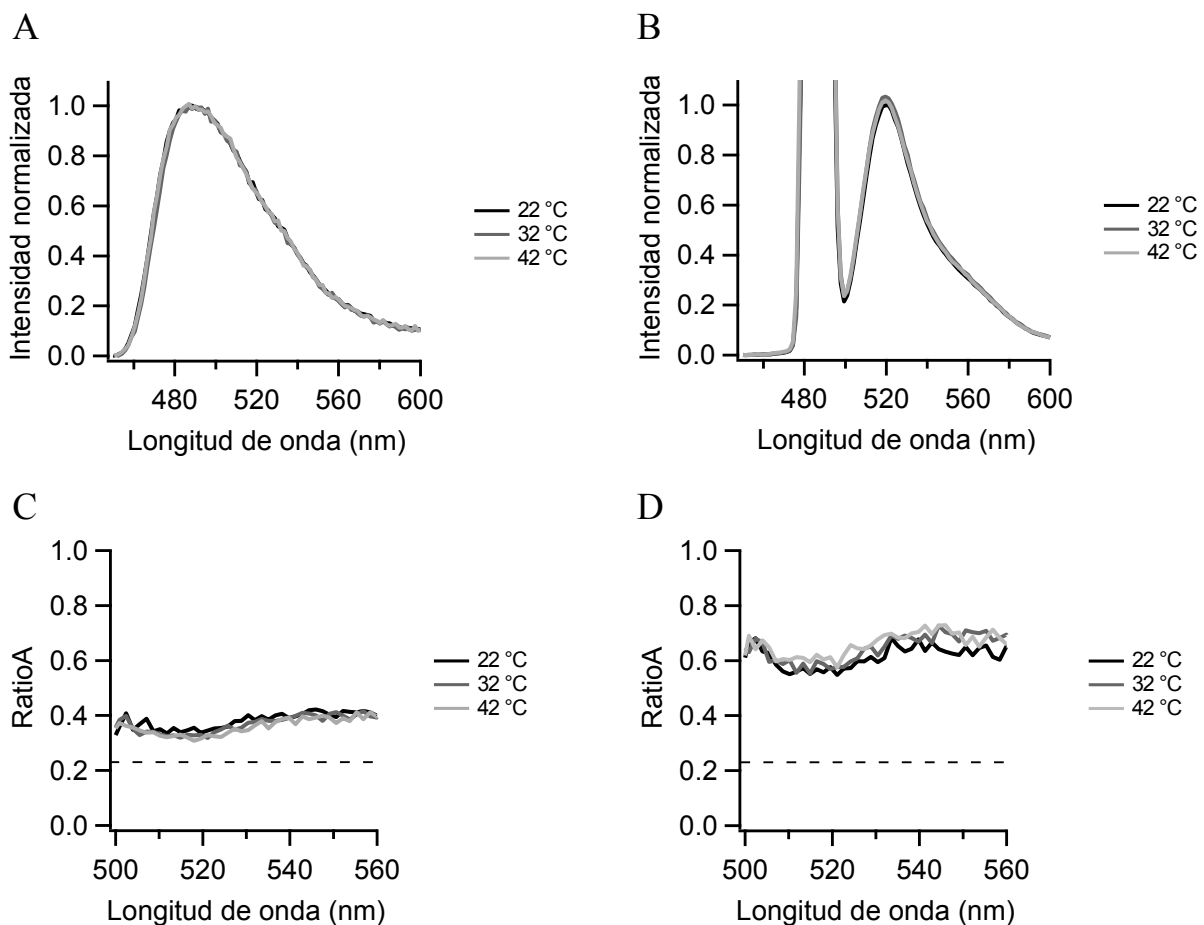


Figura 23. Espectros de emisión de CFP (A) y eYFP (B) a las tres temperaturas utilizadas en los experimentos. (C) *RatioA* calculado de membranas de ovocitos coexpresando las quimeras marcadas en el extremo C – terminal y (D) expresando la quimera doblemente marcada. Se calcularon los valores de *RatioA* para tres temperaturas. No se observaron cambios significativos en el FRET.

se observaron cambios en la forma del espectro de emisión ni en la intensidad de ambas proteínas fluorescentes (Figura 23A, B). La eficiencia de FRET se midió de membranas de ovocito coexpresando las quimeras marcadas con las proteínas fluorescentes en el extremo N – terminal del TRPV1 y en membranas expresando el canal doblemente marcado eYFP – TRPV1 – CFP; no se reportaron cambios en la eficiencia de FRET en ninguno de los dos casos en las tres temperaturas probadas (Figura 23C, D).

En resumen, no se observaron cambios en la eficiencia de FRET tras la activación del canal TRPV1. Una explicación para estos resultados es que la activación del canal, promueva un cambio conformacional que este atrapando a las proteínas fluorescentes en una orientación no favorable, contrarrestando así el cambio en la eficiencia de FRET debido a la distancia. Para explorar esta posibilidad, se midió la anisotropía de la eYFP unida al canal en presencia de capsaicina; la anisotropía de la eYFP resulto ser la misma que en solución salina, indicando que los experimentos reportan distancia cuando el canal se activa.

DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó la arquitectura general de los dominios terminales del canal TRPV1 mediante mediciones de FRET. Encontramos que la fusión de proteínas fluorescentes en la región citoplasmática del canal no compromete la función y que además es posible medir FRET entre las subunidades del canal. Consideramos diferentes niveles de oligomerización del canal y nuestros datos son consistentes con la estequiometría de un tetrámero [4, 6, 22, 23].

Nuestras mediciones de FRET indican que los dominios C – terminal de subunidades adyacentes se encuentran mas cerca entre ellos que los dominios N – terminales y además, que los C – terminales se encuentran mas cerca de la membrana que los N – terminales. La eficiencia de FRET entre las proteínas fluorescentes localizadas en los dominios N-terminales del canal es prácticamente cero, indicando que la separación entre los dominios adyacentes es cercana al límite de nuestra resolución (10 nm) o incluso mayor. Esto no parece ser un problema metodológico pues es posible medir la eficiencia de FRET con las mismas proteínas fluorescentes colocadas en otro dominio del canal, incluso en otros canales tal como lo hicimos en el canal de protones Hv1, en donde fue posible validar el método y el modelo para calcular la separación de las proteínas fluorescentes midiendo la eficiencia de FRET ya que al momento de realizar los experimentos se conocía la estructura de los dominios C – terminales de este canal [81] haciendo posible una comparación directa de nuestros resultados con la estructura.

Otra posibilidad es que debido a que el FRET depende de la orientación de los dipolos del donador y del aceptor, los dipolos de las proteínas fluorescentes localizadas en el N – terminal estén en una orientación desfavorable para que ocurra la transferencia de energía. Se ha reportado que el error al estimar distancias entre fluoróforos utilizando un valor de $\kappa^2 = 2/3$ es relativamente pequeño. Si se estima que una molécula tiene una anisotropía menor a 0.3, se puede asumir que el error es de aproximadamente 10 % [87]. Es por esta razón que fue necesario conocer la anisotropía de las proteínas fluorescentes unidas a los dominios terminales del canal, dichas mediciones de anisotropía indican que las proteínas fluorescentes tienen libertad de movimiento en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Estos valores de anisotropía

deben ser tomadas con precaución ya que existe la posibilidad de homoFRET entre las cuatro eYFP que hay en el canal que se utilizó para medir anisotropía. Aun si los fluoróforos no son altamente móviles, la incertidumbre al estimar una distancia utilizando un valor de $\kappa^2 = 2/3$ es pequeña y en la mayoría de los casos cae dentro del intervalo de confianza de 67% en una distribución de incertidumbre en donde el centro de la distribución es cercana a la distancia estimada utilizando un $\kappa^2 = 2/3$ con una diferencia de menos de 8 %. Si los factores de despolarización del donador y el aceptor son aproximadamente iguales, la distancia probable es poco mayor a la esperada con $\kappa^2 = 2/3$. Y si uno de los dos factores de despolarización es cercano a cero, la distancia probable es un poco menor a la esperada [72]. Todo lo anterior sugiere que la eficiencia de FRET calculada en los experimentos reporta distancia y no restricción de las proteínas fluorescentes, por tanto se puede asumir que los dominios N – terminales adyacentes tienen 10 nm o más de separación entre ellos.

Debido a que el canal es simétrico, podemos pensar que las proteínas fluorescentes en el C – terminal o en el N – terminal forman un plano con cada una de las 4 proteínas fluorescentes dispuestas en las esquinas. Según esta conformación, fue posible realizar experimentos con la intención de conocer la separación de las proteínas fluorescentes entre el N – y C – terminal de la misma subunidad, los resultados indican que el plano de carboxilos está rotado 45° con respecto al plano de los aminos terminales formando un arreglo de C – y N – terminales alternados. Aunque se puede argumentar que esta rotación no representa el arreglo de los dominios terminales del canal, sino más bien un empaquetamiento forzado de las proteínas fluorescentes [88], se ha propuesto que existe esta rotación en particular entre los dominios terminales de la misma subunidad que estabiliza la conformación del canal [29].

Para calcular la distancia de las proteínas fluorescentes en los dominios terminales respecto al plano de la membrana, se utilizó el apagamiento de la eYFP por DPA que sucede mediante transferencia de energía. El apagamiento de la eYFP es proporcional a la eficiencia de FRET, debido a que se puede pensar este experimento como uno de recuperación de la fluorescencia para medir FRET [1]. El cálculo de la separación es complicado debido a que el número de moléculas de DPA que se intercalan en la membrana se desconoce. Se hizo una simulación en la que se colocaron 1400

moléculas de DPA en la cara intracelular de la membrana organizadas en modo de disco alrededor del espacio que ocupa el canal, el área total del disco es de aproximadamente 680 nm^2 , esto es equivalente a 2.8×10^{-2} moléculas Å^2 . Se ha estimado que la concentración de DPA en la membrana cuando se coloca en el baño una concentración de $4 \text{ }\mu\text{M}$ es equivalente a la densidad de 10^{-4} moléculas Å^2 [75], por tanto, la estimación hecha para la simulación no es muy distinta y puede explicarse por la concentración mayor utilizada en los experimentos.

No se observó cambio en la eficiencia de FRET tras la activación del canal ya sea con ligandos o con cambios de temperatura indicando que los dominios terminales no cambian de posición respecto a ellos o respecto a la membrana cuando el canal se activa o que los cambios conformacionales son muy discretos como para ser medidos utilizando a las proteínas fluorescentes como sondas.

Se ha propuesto un interacción dependiente de Ca^{2+} - CaM entre el dominio N – y C – terminal que ocurre con la desensibilización del canal [28]. Esto sugiere que la unión de Ca^{2+} - CaM a su sitio de interacción tanto en el amino como en el carboxilo terminal, promueve un cambio conformacional que acerca estos dominios produciendo la desensibilización del canal. Esta hipótesis ha sido incorporada al menos en uno de los modelos de homología [29]. Hipotetizamos que debería ser posible determinar esta interacción en nuestros experimentos. Aunque el FRET observado entre las proteínas fluorescentes localizadas en el extremo amino terminal del canal fue prácticamente nulo, debería ser posible determinar si estas proteínas fluorescentes se acercan entre ellas. La activación del canal por capsaicina en presencia de calcio no incrementó la eficiencia de FRET, sugiriendo que estos dominios terminales no se acercan significativamente entre ellos durante la desensibilización del canal. Se puso principal interés en la quimera doblemente marcada ya que es la que muestra mayor eficiencia de FRET y el valor de ésta se encuentra cerca de la distancia característica R_0 por lo que la sensibilidad de la transferencia de energía con la distancia es mas marcada en esta quimera. De igual manera, tampoco se observó cambio en la transferencia de energía en esta quimera lo que sugiere que los dominios N – terminales no se acercan a los dominios C – terminales durante la desensibilización del canal. Estos resultados

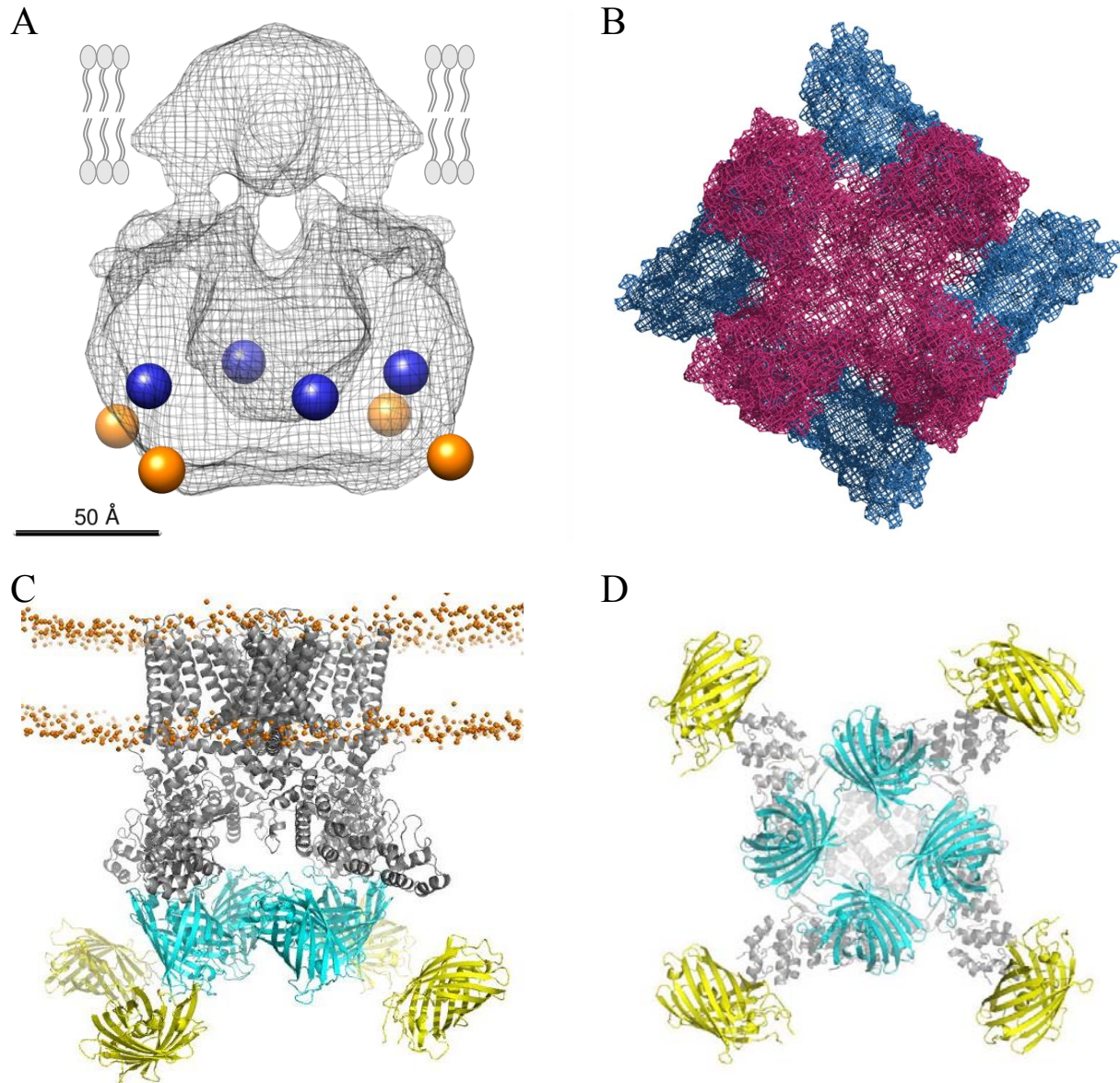


Figura 24. A) mapeo de las distancias determinadas en los experimentos dentro de la estructura del canal TRPV1 a 19 Å de resolución [4]. Las esferas naranjas indican la posición de las proteínas fluorescentes en el N – terminal y las azules en el C – terminal. B) torsión angular de los planos formados por los dominios de anquirinas (azules) y los dominios transmembranales (rojo). La imagen corresponde a la estructura a 3.4 Å de resolución del canal vista desde la parte extracelular PDB 3J5P. C) localización aproximada de las proteínas fluorescentes respecto a la estructura del canal [6]. Las proteínas fluorescentes amarillas están dispuestas en el N – terminal y las cian en el C – terminal. D) vista inferior del modelo en (C).

sugieren que la interacción propuesta entre los dominios terminales del canal durante la desensibilización implican un cambio conformacional discreto.

Una limitante en los experimentos, especialmente al tratar de medir cambios conformacionales tras la activación del canal, es que los cromóforos en las proteínas fluorescentes se encuentran en el centro de un barril de 3 nm de diámetro, y la distancia que se calcula en los experimentos corresponde a la separación de los cromóforos y no a la separación real de los dominios terminales, esto es claramente una limitante en la resolución de las mediciones y en la interpretación de los resultados ya que distancias por debajo de 3 nm no pueden ser medidas. Aun con estas limitantes, es posible determinar cambios conformacionales utilizando proteínas fluorescentes como pares donadores – aceptores en canales iónicos, tal como se ha demostrado para algunos canales de potasio [88-90]. Inicialmente, las estimaciones de la posición de los dominios terminales se mapearon en la estructura del canal TRPV1 a baja resolución (19 Å) [4] (Figura 24A). La densidad se puede dividir en dos partes, una pequeña que corresponde a los dominios transmembranales y la otra más grande con forma de canastilla abierta con un espacio en el centro que corresponde a los dominios terminales. De acuerdo a los resultados de este trabajo, se propuso que en dicho espacio se encuentran los dominios C – terminales y que estos están rodeados por los dominios N – terminales. Además nuestros datos sugieren un arreglo en el que se alternan estos dominios terminales y finalmente que la separación del C – terminal respecto a la membrana es menor que la del N – terminal a la membrana.

Como se ha mencionado, la estructura del canal a 3.4 Å de resolución fue publicada recientemente [6]. Los resultados de este trabajo están en acuerdo de manera general con la estructura del canal, y continúan siendo validos ya que como se ha hecho referencia, los dominios terminales no pudieron ser resueltos en la estructura, no obstante las repeticiones de anquirina del N – terminal ya habían sido cristalizadas independientemente [28] y se utilizaron para completar la estructura general del canal en la que se observa el arreglo de los dominios N – terminales rodeando el espacio en donde estarían los C – terminales y aunque no se puede observar si existe un arreglo en el que se alternen los dominios terminales, si se observa que al menos los dominios de anquirina se curvan hacia la subunidad adyacente quedando este plano rotado

aproximadamente 45° respecto al plano formado por los segmentos transmembranales S1-S4 (Figura 24B). Al mapear las proteínas fluorescentes en la estructura (Figura 24C, D), las proteínas fluorescentes se localizan por debajo de la estructura y a pesar de las limitantes para mapearlas apropiadamente, el arreglo concuerda y puede dar una idea de la localización de los dominios C – terminales.

El mismo grupo obtuvo la estructura del canal TRPV1, publicó la estructura del canal en el estado activado [91] con algunos ligandos, particularmente capsaicina y RTX. Los cambios conformacionales descritos se encuentran principalmente en el poro, argumentando que al menos para esos agonistas, los dominios S1-S4 se encuentran estáticos. Haciendo un análisis de las estructuras en estado cerrado y abierto, se pueden marcar diferencias estructurales en los dominios de anquirinas aunque estos cambios no son tan grandes como en otros canales [88-90, 92] y explican los resultados en este trabajo tras la activación del canal por capsaicina.

Aunque de manera general mostramos datos de FRET robusto, los resultados pueden servir como base para buscar determinantes estructurales finas en el acoplamiento alostérico en la activación del TRPV1 por otros agonistas como alicina, temperatura o en la desensibilización del canal utilizando sondas más pequeñas que permitan con base a la estructura a alta resolución mapear mejor los cambios estructurales fundamentales para la función del canal.

CONCLUSIONES

- Todas las quimeras construidas del canal TRPV1 con las proteínas fluorescentes eYFP y CFP son activadas de manera dosis dependiente por capsaicina.
- Los dominios C – terminales adyacentes se encuentran mas cerca entre sí que los dominios N – terminales adyacentes.
- La conformación que mejor describe los datos es si los dominios N-terminal y C-terminal de la misma subunidad se encuentran desfasados en el plano.
- Los dominios N – terminales del canal TRPV1 se encuentran mas alejados del plano de la membrana que los dominios C – terminales.
- No se reportaron cambios en la eficiencia de FRET tras la activación del canal por capsaicina incluso en presencia de calcio, ni con alicina, LPA o cambios en la temperatura.
- Las proteínas fluorescentes unidas a los dominios terminales del canal reportan distancia en los experimentos de FRET y no restricción de su orientación.
- Estos experimentos demuestran que es posible estimar distancias intramoleculares y además nos permite obtener una aproximación gruesa de la organización molecular del canal TRPV1.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se pudieron hacer mediciones gruesas de la arquitectura de los dominios terminales del canal TRPV1. Como se discute es probable que las sondas que se utilizaron sean demasiado grandes para medir cambios conformacionales finos. El siguiente paso obvio es utilizar sondas más pequeñas para medir FRET, estas sondas pueden ser metales de transición que sean par FRET con fluoróforos pequeños [93], o incluso utilizar aminoácidos no naturales fluorescentes. La ventaja de desarrollar estas metodologías, además de que son moléculas mas pequeñas, es que la distancia característica R_0 es también mas pequeña, siendo posible determinar cambios conformacionales finos en dominios del canal iónico [71].

Sobra decir que este tipo de estudios se puede extrapolar a otros canales iónicos u otras proteínas, como un acercamiento a su estructura y funcionamiento. En este contexto, en el laboratorio en el que se desarrolló este trabajo, se encuentran proyectos en curso sobre el estudio del canal de protones mediante FRET, midiendo simultáneamente la transferencia de energía y las corrientes iónicas del canal.

APÉNDICE I

Predicción de la eficiencia de FRET

La eficiencia de FRET de un par donador – aceptor esta dada por la ecuación de Förster [1]:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Donde r es la distancia entre el donador y el aceptor y R_0 es la distancia característica.

En los experimentos, se tiene una mezcla poblaciones de canales formados por subunidades marcadas con donadores, aceptores y pares donador – aceptor. Para determinar la eficiencia de FRET, hay que notar que las dos primeras poblaciones no contribuyen a la eficiencia pero si a la fluorescencia total.

La tasa de FRET (k) para un par donador – aceptor esta dada por:

$$k = \frac{1}{\tau} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

Donde τ es el decaimiento de la fluorescencia (taza = $1/\tau$) cuando no hay aceptor. Si sólo hay un donador y dos aceptores a dos distancias r_1 y r_2 del donador, la tasa será:

$$k = \frac{R_0^6}{\tau} \left(\frac{1}{r_1^6} + \frac{1}{r_2^6} \right)$$

Y la eficiencia será:

$$E_{12} = \frac{k}{k + \frac{1}{\tau}}$$

En general, para un donador y n_a aceptores:

$$E_{1dna} = \frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}}$$

Si hay mas de un donador, cada uno puede excitar a un aceptor a la vez, por tanto la eficiencia E total será el promedio de de las dos vías de excitación:

$$k = [(k_{d1a1} + k_{d1a2}) + (k_{d2a1} + k_{d2a2})]$$

Y en general para n_d donadores y n_a aceptores, la eficiencia esta dada por:

$$E_{n_d n_a} = \frac{1}{n_d} \sum_{i=1}^{n_d} \left[\frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}} \right]$$

La eficiencia dependerá de la estequiometría de donadores y aceptores. Podemos calcular las probabilidades de formación de diferentes poblaciones de canales por:

$$P_{n_d n_a} = \frac{n_d!}{(n_d - n_a)! n_a!} p y^{n_a} p c^{n_d - n_a}$$

Donde py es la probabilidad del aceptor y pc es la probabilidad del donador.

La eficiencia aparente de FRET para un donador D y un aceptor A , que forman el complejo DA , esta dada por:







$$E_{app} = \frac{DA \cdot E}{DA + A}$$

Y se puede generalizar para describir la eficiencia de un canal con una estequiometría formada por T subunidades:

$$E_{app} = \frac{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} E_{n_d(T-n_d)}}{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)}}$$

Donde T es el numero de subunidades, n_d es el número de donadores, $(T - n_d)$ es el número de aceptores, $P_{n_d(T-n_d)}$ es la probabilidad de ocurrencia del canal con n_d donadores y $(T - n_d)$ aceptores, y $E_{n_d(T-n_d)}$ es la eficiencia intrínseca del mismo canal.

Las probabilidades de formación de diferentes poblaciones de canales tetraméricos con su respectiva eficiencia intrínseca son:

Población de canales ● Donador ○ Aceptor	Probabilidad	Eficiencia de FRET $R_0 = 50 \text{ \AA}$ $r = 60 \text{ \AA}$
	pc4	-
	4py pc3	0.180646
 	6py2 pc2	0.273657
		0.401124
	4py3 pc	0.415771
	py4	-

EL cociente de la fluorescencia Fr esta dado por la intensidad total del donador entre la intensidad total del aceptor.

$$Fr = \frac{I_d}{I_a} \cdot \frac{S_d}{S_a}$$

y estas están dadas por:

$$I_d = \sum_{n_d=0}^T n_d P_{n_d(T-n_d)} (1 - E_{n_d(T-n_d)})$$

$$I_a = \sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} (1 + E_{n_d(T-n_d)}) \frac{\epsilon_d}{\epsilon_a}$$

Donde ε_d y ε_a son los coeficientes de extinción molar del donador y del aceptor a la longitud de onda de excitación del donador, y S_d y S_a son el factor de detección del donador y aceptor respectivamente.

Los datos se graficaron como E_{app} en función del cociente de las intensidades I_d / I_a . Las predicciones de la eficiencia FRET se compararon con los datos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006(v. 1).
2. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels*. *Genome Biol*, 2011. **12**(3): p. 218.
3. Jara-Oseguera, A., S.A. Simon, and T. Rosenbaum, *TRPV1: on the road to pain relief*. *Curr Mol Pharmacol*, 2008. **1**(3): p. 255-69.
4. Moiseenkova-Bell, V.Y., et al., *Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(21): p. 7451-5.
5. Vogel, S.S., C. Thaler, and S.V. Koushik, *Fanciful FRET*. *Sci STKE*, 2006. **2006**(331): p. re2.
6. Liao, M., et al., *Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryomicroscopy*. *Nature*, 2013. **504**(7478): p. 107-12.
7. Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2001.
8. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. *Science*, 1998. **280**(5360): p. 69-77.
9. Roux, B. and R. MacKinnon, *The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations*. *Science*, 1999. **285**(5424): p. 100-2.
10. Grosman, C., et al., *The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(3): p. 327-40.
11. Bean, B.P., *The action potential in mammalian central neurons*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(6): p. 451-65.
12. Cossens, D.J. and A. Manning, *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant*. *Nature*, 1969. **224**(5216): p. 285-7.
13. Hardie, R.C. and B. Minke, *The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors*. *Neuron*, 1992. **8**(4): p. 643-51.
14. Hu, Y., et al., *Appearance of a novel Ca²⁺ influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **201**(2): p. 1050-6.
15. Damann, N., T. Voets, and B. Nilius, *TRPs in our senses*. *Curr Biol*, 2008. **18**(18): p. R880-9.
16. Montell, C., *The TRP superfamily of cation channels*. *Sci STKE*, 2005. **2005**(272): p. re3.
17. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 816-24.
18. Helliwell, R.J., et al., *Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia*. *Neurosci Lett*, 1998. **250**(3): p. 177-80.
19. 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3655-60.
20. Inoue, K., et al., *Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **291**(1): p. 124-9.
21. Szallasi, A., et al., *Characterization of a peripheral vanilloid (capsaicin) receptor in the urinary bladder of the rat*. *Life Sci*, 1993. **52**(20): p. PL221-6.
22. Kedei, N., et al., *Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28613-9.

23. Kuzhikandathil, E.V., et al., *Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. 8697-706.
24. Jin, X., J. Touhey, and R. Gaudet, *Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25006-10.
25. Oseguera, A.J., et al., *On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel*. Biophys J, 2007. **92**(11): p. 3901-14.
26. Jara-Oseguera, A., et al., *Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums*. J Gen Physiol, 2008. **132**(5): p. 547-62.
27. Salazar, H., et al., *Structural determinants of gating in the TRPV1 channel*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(7): p. 704-10.
28. Lishko, P.V., et al., *The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity*. Neuron, 2007. **54**(6): p. 905-18.
29. Fernandez-Ballester, G. and A. Ferrer-Montiel, *Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states*. J Membr Biol, 2008. **223**(3): p. 161-72.
30. Brauchi, S., et al., *Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10246-51.
31. Nieto-Posadas, A., et al., *Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site*. Nat Chem Biol, 2011. **8**(1): p. 78-85.
32. Ufret-Vincenty, C.A., et al., *Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9688-98.
33. Jung, J., et al., *Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel*. J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 529-38.
34. Huang, S.M., et al., *An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8400-5.
35. Chu, C.J., et al., *N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13633-9.
36. Zygmunt, P.M., et al., *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
37. Ross, R.A., et al., *Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(3): p. 631-40.
38. Xu, H., N.T. Blair, and D.E. Clapham, *Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism*. J Neurosci, 2005. **25**(39): p. 8924-37.
39. McNamara, F.N., A. Randall, and M.J. Gunthorpe, *Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1)*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(6): p. 781-90.
40. Salazar, H., et al., *A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic*. Nat Neurosci, 2008. **11**(3): p. 255-61.
41. Jordt, S.E. and D. Julius, *Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers*. Cell, 2002. **108**(3): p. 421-30.
42. Petersen, M. and R.H. LaMotte, *Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells*. Pain, 1993. **54**(1): p. 37-42.

43. Tominaga, M., et al., *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. *Neuron*, 1998. **21**(3): p. 531-43.
44. Jordt, S.E., M. Tominaga, and D. Julius, *Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 8134-9.
45. Piper, A.S., et al., *A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization*. *J Physiol*, 1999. **518 (Pt 3)**: p. 721-33.
46. Gunthorpe, M.J., et al., *Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1)*. *J Physiol*, 2000. **525 Pt 3**: p. 747-59.
47. Voets, T., et al., *The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels*. *Nature*, 2004. **430**(7001): p. 748-54.
48. Boukalova, S., et al., *Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(53): p. 41455-62.
49. Grandl, J., et al., *Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(6): p. 708-14.
50. Cui, Y., et al., *Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations*. *J Gen Physiol*, 2012. **139**(4): p. 273-83.
51. Brauchi, S., et al., *A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels*. *J Neurosci*, 2006. **26**(18): p. 4835-40.
52. Kim, S.E., A. Patapoutian, and J. Grandl, *Single Residues in the Outer Pore of TRPV1 and TRPV3 Have Temperature-Dependent Conformations*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59593.
53. Yao, J., B. Liu, and F. Qin, *Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(27): p. 11109-14.
54. Jung, J., et al., *Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(8): p. 7048-54.
55. Novakova-Tousova, K., et al., *Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization*. *Neuroscience*, 2007. **149**(1): p. 144-54.
56. Rathee, P.K., et al., *PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia*. *J Neurosci*, 2002. **22**(11): p. 4740-5.
57. Premkumar, L.S. and G.P. Ahern, *Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C*. *Nature*, 2000. **408**(6815): p. 985-90.
58. Vellani, V., et al., *Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide*. *J Physiol*, 2001. **534**(Pt 3): p. 813-25.
59. Bhawe, G., et al., *Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12480-5.
60. Cesare, P. and P. McNaughton, *A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15435-9.
61. Zhang, N., et al., *A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(12): p. 4536-41.

62. Zhang, H., et al., *Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia*. J Neurosci, 2007. **27**(44): p. 12067-77.
63. Ohta, T., et al., *Potentialiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 809-22.
64. Tominaga, M., M. Wada, and M. Masu, *Potentialiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6951-6.
65. Rosenbaum, T., et al., *Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin*. J Gen Physiol, 2004. **123**(1): p. 53-62.
66. Picazo-Juarez, G., et al., *Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 24966-76.
67. Taraska, J.W., *Mapping membrane protein structure with fluorescence*. Curr Opin Struct Biol, 2012. **22**(4): p. 507-13.
68. Taraska, J.W. and W.N. Zagotta, *Fluorescence applications in molecular neurobiology*. Neuron, 2010. **66**(2): p. 170-89.
69. Gordon, S.E. and W.N. Zagotta, *Subunit interactions in coordination of Ni²⁺ in cyclic nucleotide-gated channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10222-6.
70. Jara-Oseguera, A., et al., *Uncoupling charge movement from channel opening in voltage-gated potassium channels by ruthenium complexes*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 16414-25.
71. Taraska, J.W., et al., *Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET*. Nat Methods, 2009. **6**(7): p. 532-7.
72. van der Meer, B.W., *Kappa-squared: from nuisance to new sense*. J Biotechnol, 2002. **82**(3): p. 181-96.
73. Vogel, S.S., B.W. van der Meer, and P.S. Blank, *Estimating the distance separating fluorescent protein FRET pairs*. Methods, 2014. **66**(2): p. 131-8.
74. Edelstein, A., et al., *Computer control of microscopes using microManager*. Curr Protoc Mol Biol, 2010. **Chapter 14**: p. Unit14 20.
75. Wang, D., et al., *Improved probes for hybrid voltage sensor imaging*. Biophys J, 2010. **99**(7): p. 2355-65.
76. Marshall, J., *The Preparation of Hexanitrodiphenylamine and Its Use as a Booster for Shell Charges*. Journal of Industrial & Engineering Chemistry, 1920. **12**(4): p. 336-340.
77. Ottolia, M., K.D. Philipson, and S. John, *Xenopus oocyte plasma membrane sheets for FRET analysis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1519-22.
78. Rasband, W.S., *ImageJ*, U.S.N.I.o. Health, Editor. 1997 - 2014, U. S. National Institutes of Health: Bethesda, Maryland, USA.
79. Koch, H.P., et al., *Multimeric nature of voltage-gated proton channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 9111-6.
80. Lee, S.Y., J.A. Letts, and R. Mackinnon, *Dimeric subunit stoichiometry of the human voltage-dependent proton channel Hvl*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7692-5.
81. Fujiwara, Y., et al., *The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H(+) channel Hvl*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 816.

82. Takeshita, K., et al., *X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel*. Nat Struct Mol Biol, 2014.
83. Salonikidis, P.S., et al., *An ion-insensitive cAMP biosensor for long term quantitative ratiometric fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements under variable physiological conditions*. J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23419-31.
84. Overton, M.C. and K.J. Blumer, *G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo*. Curr Biol, 2000. **10**(6): p. 341-4.
85. Zheng, J., M.C. Trudeau, and W.N. Zagotta, *Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit*. Neuron, 2002. **36**(5): p. 891-6.
86. Taraska, J.W. and W.N. Zagotta, *Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(9): p. 854-60.
87. Haas, E., E. Katchalski-Katzir, and I.Z. Steinberg, *Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization*. Biochemistry, 1978. **17**(23): p. 5064-70.
88. Miranda, P., et al., *FRET with multiply labeled HERG K(+) channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(10): p. 1681-99.
89. Kobrinsky, E., et al., *Molecular rearrangements of the Kv2.1 potassium channel termini associated with voltage gating*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19233-40.
90. Miranda, P., et al., *State-dependent FRET reports calcium- and voltage-dependent gating-ring motions in BK channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(13): p. 5217-22.
91. Cao, E., et al., *TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 113-8.
92. Kobrinsky, E., et al., *Voltage-gated mobility of the Ca²⁺ channel cytoplasmic tails and its regulatory role*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5021-8.
93. Taraska, J.W., M.C. Puljung, and W.N. Zagotta, *Short-distance probes for protein backbone structure based on energy transfer between bimane and transition metal ions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16227-32.

Coarse Architecture of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Ion Channel Determined by Fluorescence Resonance Energy Transfer*

Received for publication, April 22, 2013, and in revised form, August 6, 2013. Published, JBC Papers in Press, August 21, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.479618

Víctor De-la-Rosa^{†1}, Gisela E. Rangel-Yescas[‡], Ernesto Ladrón-de-Guevara[‡], Tamara Rosenbaum[§], and León D. Islas^{‡2}

From the [†]Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, and [§]Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F., C.P. 04510, Mexico

Background: Little is known about the structural characteristics of the multimodal TRPV1 ion channel.

Results: FRET measurements show the C terminus surrounded by the N terminus arranged with 4-fold symmetry. The N terminus is further away from the plasma membrane than the C terminus.

Conclusion: Domain organization is consistent with a compact structure of the channel.

Significance: This work presents novel insights regarding the structure of TRPV1.

The transient receptor potential vanilloid 1 ion channel is responsible for the perception of high temperatures and low extracellular pH, and it is also involved in the response to some pungent compounds. Importantly, it is also associated with the perception of pain and noxious stimuli. Here, we attempt to discern the molecular organization and location of the N and C termini of the transient receptor potential vanilloid 1 ion channel by measuring FRET between genetically attached enhanced yellow and cyan fluorescent protein to the N or C terminus of the channel protein, expressed in transfected HEK 293 cells or *Xenopus laevis* oocytes. The static measurements of the domain organization were mapped into an available cryo-electron microscopy density of the channel with good agreement. These measurements also provide novel insights into the organization of terminal domains and their proximity to the plasma membrane.

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)³ ion channel is a sensory transducing ion channel that has been found in multiple species, including human, rat, guinea pig, rabbit, mouse, zebrafish, and pig (1). It is involved in the detection of chemical and thermal stimuli. TRPV1 is a nonselective cation channel with a preference for calcium and is activated by capsaicin (2), anandamine (3), noxious heat, low pH (<5) (4), voltage (5), and some pungent compounds such as those found in

onion and garlic like allicin (6). It is also regulated and activated by some lipids such as phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and lysophosphatidic acid, which have been described as modulator and allosteric activator of the channel, respectively (7, 8).

Not much is known about the structural characteristics of TRPV1. Biochemical (9, 10) and biophysical (11, 12) evidence suggest that the functional channel in the membrane is organized as an homotetramer. By homology with voltage-dependent potassium channels, each subunit of the channel is thought to consist of six transmembrane domains with a short amphipathic region between the fifth and sixth domains and intracellular N and C termini.

The evidence indicates that the pore of the channel is formed by the amphipathic region together with the S5 and S6 segments. It has been shown that the activation gate is located at the S6 segment. This region is similar to that of voltage-dependent potassium channels; it adopts an amphipathic α -helical structure forming an aqueous cavity with two constrictions: one that hinders large ion permeation and one for small ion permeation (13, 14).

The N terminus contains a distal section of 100 amino acids followed by six ankyrin repeats and a linker region between these and the first transmembrane domain (15), which has been implicated in temperature sensing (16). A region of the C terminus that is adjacent to the S6 segment is involved in the oligomerization of the channel (17, 18), the C terminus also contains the highly conserved TRP box that has been shown to be important in channel gating (17, 19). Moreover, the C terminus has also been established as an important region for temperature gating (20, 21).

Each of the activators of TRPV1 acts on different channel regions and, as has been shown for several signals (14), they converge in a final event that is the opening of the activation gate, implying an allosteric conformational change that transmits the signal from the site of action of the agonist to the activation gate. For example, in the case of allicin, whose site of action is expected to be relatively far away from the activation gate, in the second ankyrin repeat at the N-terminal (6), it is

* This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Scholarship 309408 (to V. D.-R.), CONACYT Grant 151297, Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) Grant IN209209, and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYT-DF) PIFUTP09-262 (to L.D.I.) and the Marcos Moshinsky Foundation, CONACYT Grant 129474, and PAPIIT Grant IN204111 (to T. R.).

¹ Submitted this work in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree at the Universidad Nacional Autónoma de México.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F., C.P. 04510, Mexico. E-mail: islas@liceaga.facmed.unam.mx.

³ The abbreviations used are: TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1; FP, fluorescent protein; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein; cryoEM, cryo-electron microscopy; DPA, dipicyrlamine.

proposed that the ankyrin domains suffer a conformational change that leads to the opening of the channel. These conformational changes have been reported for other channels, such as cyclic nucleotide-gated channels, where a portion of the gating ring moves parallel to the plasma membrane during activation (22, 23).

Apart from the structure of the ankyrin repeats (24), no structural information at the atomic level is available for the entire TRPV1 channel; however, some insights have been obtained by using different techniques, such as cryo-electron microscopy (cryoEM) (11) and extensive mutagenesis and functional assays (13, 14, 25). The elucidation of how the channel is assembled from a structural point of view will allow the development of new strategies for the study of this class of ion channels.

Here, we have tried to obtain some insight into the basic architecture of the N and C termini of the TRPV1 ion channel by using FRET measurements between donor and acceptor molecules introduced in the channel. We genetically attached the enhanced yellow and cyan fluorescent proteins to the N- or C-terminal ends of the protein, expressed these TRPV1 chimeras into HEK 293 cells and *Xenopus laevis* oocytes, and measured FRET by the spectral FRET method (26). We were able to determine the coarse architecture of the N and C termini within the tetramer and their localization relative to the plane of the membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Molecular Biology—Enhanced yellow and cyan fluorescent proteins (FPs) were inserted in the N or C termini (or both) of the rat TRPV1 channel (rTRPV1). The FPs were amplified by PCR from plasmids pEYFP or pAmCyan (C1 or N1, Clontech) and inserted into the N or C termini of the channel with the linker GGSGGGSGGS in all cases. The construct FP-Linker-rTRPV1-Linker-FP was obtained from the previous FP-Linker-rTRPV1 and rTRPV1-Linker-FP constructs, using NotI and SacII restriction sites. The tandem dimer rTRPV1-rTRPV1 was generated with a similar technique to that reported by Gordon and Zagotta (27) for cyclic nucleotide-gated channels. FPs were inserted at the C terminus of this dimer. A BlnI restriction site was engineered at the beginning of our C-terminally labeled channel (rTRPV1-Linker-FP), where the A protomer of the dimer with a 21-residue linker QQQQQQQQIEGRQQQQQQQA (released by KpnI and BlnI restriction) was introduced. These constructs were cloned into the pcDNA3 vector (Clontech). Hv1-mCitrine and Hv1-mCerulean were a gift from Dr. Justin Taraska from the NHLBI, National Institutes of Health. These constructs contain the FPs at the end of the C terminus and are cloned into pcDNA6.2-DEST. For expression in oocytes, pcDNA3 plasmids were linearized with NotI, and pcDNA6.2-DEST was linearized with AgeI. mRNA was synthesized *in vitro* using the mMessage mMACHINE T7 transcription kit (Ambion). All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs.

Channel Expression—Human embryonic kidney cells (HEK 293) were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen) or JetPei (Polyplus Transfection) following previously described methods (13) with plasmid containing either the individual constructs or cotransfected with eYFP- and CFP-

labeled constructs; experiments were performed 3 or 4 days after transfection.

X. laevis oocytes were surgically extracted and defolliculated as previously described (28). Oocytes were incubated at 18 °C in ND96 solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 2.5 mM pyruvic acid, 20 μg/ml gentamycin (pH 7.5, NaOH). To increase oocyte survival, the ND96 solution was supplemented with 5% fetal bovine serum (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). Oocytes were injected with 36 nl of mRNA (~1 μg/ml) 1 day after harvesting using a Nanostepper (Drummond Scientific) and pipettes of ~20-μm-diameter opening. Experiments were performed 3–5 days after injection.

Electrophysiology—Electrophysiological characterization of the constructs was performed in HEK 293 cells. Inside-out patch clamp recordings were made using symmetrical solutions consisting of 130 mM NaCl, 3 mM HEPES, 1 mM EDTA. Membrane patches were perfused with solutions fed by gravity and changed with an RSC-200 rapid solution changer (Molecular Kinetics). Macroscopic ionic currents were sampled at 10 kHz and filtered at 2 kHz with an EPC 10 amplifier (HEKA Elektronik). Membrane patches were initially held at 0 mV for 10 ms, and the voltage was then stepped from 0 to 80 mV for 100 ms and then returned back to 0 mV for 10 ms. These recordings were performed at room temperature (~23 °C). For all experiments, leak currents in the absence of capsaicin were subtracted from currents in the presence of capsaicin.

FRET Measurements—The apparent FRET efficiency E_{app} was measured by the spectra-FRET method (26) in a home-modified TE-2000U (Nikon) inverted epifluorescence microscope. The excitation light source was an argon ion laser (Spectra-Physics); the laser is coupled to a multimode optical fiber using a 3-mm ball lens. Diverging light coming out of the fiber couples to the illumination port by a 50-mm focal length collimating lens and then is focused into the objective by a 300-mm lens.

Cells were imaged with a Nikon 60× oil immersion objective (numerical aperture 1.4). The microscope is coupled to a spectrograph (Acton Instruments) and a EMCCD camera (Luca, Andor) controlled by Micromanager software (29).

Emission spectra were obtained as follows. The spectrograph slit was partially closed to be able to image a small area of a cell (corresponding to the *vertical lines* in Fig. 1B). The light coming from the cell and passing through the slit was projected across the grating in the spectrograph to obtain a spectral image, which was collected by the camera. From this image, an emission spectrum of the membrane area (see *horizontal lines* in Fig. 1, B–D) was obtained using a line scan along the wavelength axis. The resulting line scans from the spectral images are shown in Fig. 1E. The emission spectrum of cells expressing channel-CFP constructs was first recorded at 458-nm excitation. Direct excitation ($ratioA_0$) of eYFP constructs by 458-nm light was determined as the ratio of the emission intensities observed by exciting the eYFP at 458 and 488 nm.

When cells cotransfected with a CFP and eYFP constructs are excited at 458 nm, the emission spectrum shows two peaks; the first one at 488 nm is the emission of the CFP protein, and the second at 525 nm is the emission of eYFP. This second peak

Domain Organization of TRPV1

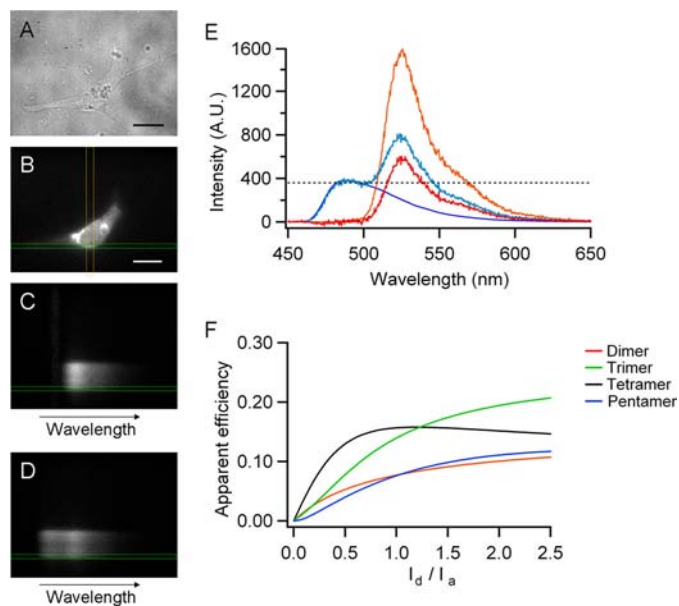


FIGURE 1. FRET was measured by the spectral FRET method. *A* and *B*, HEK293 cell in bright field (*A*) and epifluorescence illumination (*B*). *C* and *D*, emission spectra of the same cell excited at 488 and 458 nm, respectively. The yellow vertical lines indicate the position of the spectrograph slit on the image, and the green horizontal lines indicate the zone where the line scan was performed, corresponding to the spatial coordinate of the membrane shown in *B*. *E*, the CFP spectra (blue line) was scaled to the first peak of the spectra of the experimental cells (light blue) and then subtracted, leaving only the eYFP spectra (*RatioA*, red) that contains two components, the first caused by the direct excitation by 458 nm (*RatioA₀*) and the other caused by FRET with CFP (any value above the dotted line). *F*, predictions for different stoichiometries of the channel with adjacent FPs separated by 6.6 nm. The scale bars in *A* and *B* are 20 μm .

contains three components, the first caused by bleed-through of CFP fluorescence, the second caused by direct excitation of YFP at 458 nm, and the third caused by FRET with CFP. To quantify the FRET efficiency from this spectrum, the CFP-only spectrum, which was obtained separately (Fig. 1*E*, blue line), was scaled to the first peak of the emission spectrum of the experimental cells and then subtracted, leaving only the eYFP spectrum. This subtracted spectrum contains two of the aforementioned components: the direct excitation at 458 nm and the FRET with CFP. E_{app} is obtained as the difference: $E_{\text{app}} = \text{ratioA} - \text{ratioA}_0$, where *ratioA* is the ratio between the subtracted eYFP spectra and a third spectrum obtained by exciting at 488 nm (Fig. 1*E*, red and orange lines, respectively). From the emission spectrum for each cell, the fluorescence intensities of donor (I_d) and acceptor (I_a) were obtained as the peak intensity of the CFP spectrum and the peak intensity of eYFP. Different values of I_d and I_a were attained by varying the expression levels of donor and acceptor by transfecting different ratios of the donor and acceptor DNA.

To measure distances between the membrane and the fluorescent proteins located at the terminal domains of the channel, we used dipicrylamine (DPA) as an energy acceptor pair for eYFP. DPA was synthesized from 2–4-dinitro-*N*-phenylaniline (Sigma) following reported procedures (30). DPA is a small, negatively charged and nonfluorescent molecule that intercalates in the membrane. Its absorption spectra overlaps with the emission spectra of the FPs; therefore it makes for a good FRET pair with eYFP (31). *Xenopus* oocytes expressing eYFP labeled channels were placed in a glass coverslip coated with poly-D-lysine that constituted the bottom of the chamber for FRET

measurements. After 30–40 min, the oocyte was carefully removed from the chamber by suction with a fire-polished glass pipette, leaving a small sheet of membrane attached to the glass (32). After addition of DPA to the chamber, emission intensity of eYFP was followed. Quenching of eYFP is observed because energy is transferred to the DPA acceptors.

TRPV1 Agonists—Capsaicin was obtained from Sigma and dissolved in ethanol in a stock solution at 4 mM. This stock was later diluted to final concentrations ranging from 10 nM to 4 μM in recording solution. Stock solutions of lysophosphatidic acid (Avanti Polar Lipids) were prepared in DMEM (Invitrogen) with 1% fatty acid-free bovine serum albumin following the previously reported methods (8). For FRET measurements, all agonists were diluted from stocks to saturating concentrations. For experiments involving heat activation of TRPV1, temperature was controlled with a PTC-10 Peltier temperature control system (NPI Electronics) and monitored with a thermistor (Warner Instruments) placed near the cells or the membrane sheets.

Predicting FRET Efficiency—The coupling efficiency of a donor-acceptor pair is given by Förster's equation (33),

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (\text{Eq. 1})$$

where r is the donor-acceptor distance, and R_0 is the characteristic distance for transfer.

In our experiments we have a mixture of donors, acceptors, and donor-acceptor pairs. To determine the efficiency of FRET in these conditions, we note that the first two will contribute to the fluorescence but not to the FRET signal.

The rate, k of FRET for a donor-acceptor pair is,

$$k = \frac{1}{\tau} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (\text{Eq. 2})$$

where τ is the fluorescence decay life time (rate = $1/\tau$) when there is no acceptor. If there are two acceptors at distances r_1 and r_2 from one donor, the rate of transfer should be as follows.

$$k = \frac{R_0^6}{\tau} \left(\frac{1}{r_1^6} + \frac{1}{r_2^6}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

The efficiency is as follows.

$$E_{12} = \frac{k}{k + \frac{1}{\tau}} \quad (\text{Eq. 4})$$

In general, for 1 donor and n_a acceptors,

$$E_{1,an_a} = \frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{1j}^6}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Now, if there is more than one donor, each one can excite one acceptor at a time, so the efficiency, E , is the average for the two

excitation pathways: $k = [(k_{d1a1} + k_{d1a2}) + (k_{d2a1} + k_{d2a2})]$. In general for n_d donors and n_a acceptors, the efficiency is as follows.

$$E_{n_d n_a} = \frac{1}{n_d} \sum_{i=1}^{n_d} \left[\frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}} \right] \quad (\text{Eq. 6})$$

The efficiency will depend on the stoichiometry of donors and acceptors. We can calculate the probabilities of forming different populations of channels by,

$$P_{n_d n_a} = \frac{n_d!}{(n_d - n_a)! n_a!} p y^{n_a} p c^{n_d - n_a} \quad (\text{Eq. 7})$$

where py is the probability of acceptor, pc is the probability of donor, n_d is the number of donors, and n_a is the number of acceptors. In this equation, we have assumed independent association of donor and acceptor subunits.

The apparent FRET for a donor, D , and an acceptor, A , that form a complex DA , is given by the following equation.

$$E_{\text{app}} = \frac{DA \cdot E}{DA + A} \quad (\text{Eq. 8})$$

This can be generalized to describe the efficiency for a channel with arbitrary stoichiometry formed by T subunits,

$$E_{\text{app}} = \frac{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} E_{n_d(T-n_d)}}{\sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)}} \quad (\text{Eq. 9})$$

where T is the number of subunits, n_d is the number of donors, $(T - n_d)$ is the number of acceptors, $P_{n_d(T-n_d)}$ is the probability of occurrence of a channel with n_d donors and $(T - n_d)$ acceptors, and $E_{n_d(T-n_d)}$ is the intrinsic efficiency of the same channel. The probabilities of assembly of different tetrameric channel populations and their respective intrinsic efficiency are given in Table 1.

The fluorescence intensity ratio, Fr , is given by the ratio of total donor intensity to total acceptor intensity,

$$Fr = \frac{I_d}{I_a} \cdot \frac{S_d}{S_a} \quad (\text{Eq. 10})$$

where

$$I_d = \sum_{n_d=0}^T n_d P_{n_d(T-n_d)} (1 - E_{n_d(T-n_d)}) \quad (\text{Eq. 11})$$

$$I_a = \sum_{n_d=0}^T (T - n_d) P_{n_d(T-n_d)} (1 + E_{n_d(T-n_d)}) \frac{\epsilon_d}{\epsilon_a} \quad (\text{Eq. 12})$$

and where ϵ_d and ϵ_a are the donor and acceptor molar extinction coefficients at the donor excitation wavelength, and S_a and S_d are the detection factors for donor and acceptors, respectively.

TABLE 1

Probability of assembly of different tetrameric channel populations and their respective calculated intrinsic FRET efficiency for a hypothetical $R_0 = 50 \text{ \AA}$ and separation between adjacent subunits, $r = 60 \text{ \AA}$

Channel populations ● Donor ○ Acceptor	Probability	FRET efficiency $R_0 = 50 \text{ \AA}$ $r = 60 \text{ \AA}$
	pc^4	-
	$4py \text{ pc}^3$	0.180646
	$6py^2 \text{ pc}^2$	0.273657 0.401124
	$4py^3 \text{ pc}$	0.415771
	py^4	-

The measured values of E_{app} are plotted as a function of the fluorescence intensity ratio, I_d/I_a . The predictions for the efficiency of FRET for a given model are compared against data by plotting Equation 9 as a function of Equation 10 (Fig. 1F). All data analysis and modeling were done with programs written in IgorPro (Wavemetrics).

Anisotropy measurements—We measured the emission anisotropy to evaluate mobility of the FPs attached to TRPV1. Anisotropy was measured from HEK 293 cells and oocytes expressing eYFP-channel fusion constructs using an epifluorescence microscope with a 60 \times , 1.4 N.A. objective. An excitation polarizer was placed right before the excitation filter in a horizontal position, and one emission polarizer was placed underneath the filter cube where vertical and horizontal polarization is controlled. Two images were obtained separately from the same sample, one with the two polarizers in the horizontal orientation (parallel position) and the other by switching the emission polarizer to a vertical orientation (perpendicular position). The steady-state anisotropy, A , was calculated as,

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (\text{Eq. 13})$$

where I_{\parallel} is the parallel intensity, and I_{\perp} is the perpendicular intensity with respect to the excitation polarization.

The intrinsic properties of the system were assessed by measuring the anisotropy of fluorescein isothiocyanate (Pierce) dissolved in increasing concentrations of glycerol ranging from 0 to 99%; fluorescein final concentration was always 10 $\mu\text{g/ml}$. Anisotropy was first measured in an PC1 spectrofluorometer (ISS) and then compared with that measured in the microscope (see Fig. 7A), from which a correction factor of 1.45 was calculated and used to calibrate measurements of fluorescence anisotropy of proteins expressed in cells imaged by our microscope.

Domain Organization of TRPV1

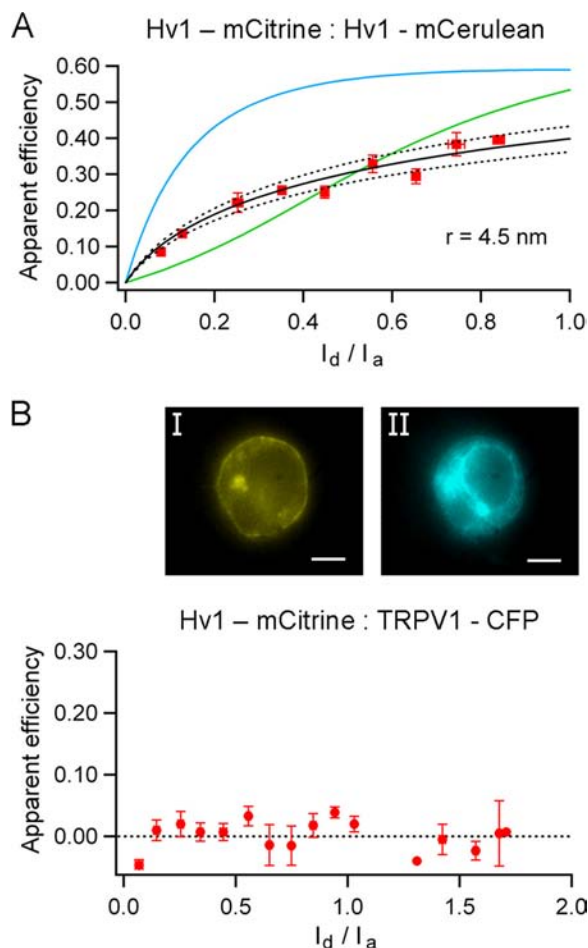


FIGURE 2. FRET in C-terminal constructs. A, FRET between mCitrine and mCerulean at the C terminus of the Hv1 channel. The *black solid* and *dotted lines* are the predictions for a $4.5 \pm 0.2 \text{ nm}$ interfluorophore distance for a single FRET pair, according to Equations 9 and 10 with $T = 2$. The *blue* and *green lines* are predictions for a tetramer and a trimer, respectively, with the same interfluorophore distance. B, cotransfection of Hv1-mCitrine and TRPV1-CFP subunits yields no FRET. The *top images* show the differential expression of Hv1 (*panel I*) and TRPV1 (*panel II*) in the same HEK 293 cell. The *scale bars* are $10 \mu\text{m}$.

RESULTS

Static Measurements of the Domain Organization of TRPV1 Channels—To estimate the dynamic range of the FRET measuring method and the sensitivity of our optical setup, we first carried out control experiments by coexpressing the dimeric proton channel Hv1, tagged at the C terminus with mCitrine or mCerulean fluorescent proteins. Hv1 proton channels have been determined to be functional dimers (34, 35). Structural information available for this protein indicates that the C terminus of the dimer forms a coiled-coil, suggesting that these terminal regions of the protein may be very close (36). In agreement with this, we find that the efficiency of FRET between the fluorescent protein-tagged channels is very high (Fig. 2A). The apparent FRET efficiency increases monotonically as a function of the fluorescence intensity ratio (I_d/I_a) and approaches a constant value, as expected for assembly of channels with fixed stoichiometry. To compare the data with different models of subunit assembly, we plotted Equation 9 as a function of Equation 10 using a known value of $R_o = 53 \text{ \AA}$ (37) for the pair mCitrine-mCerulean and varying the value of the distance

between fluorophores. The data can be best fit by a dimmer with fluorophores separated by 4.7 nm .

These data demonstrate that the FRET method is capable of determining FRET efficiency and that our model predicts accurately the known degree of oligomerization of the channel. As a negative control, we coexpressed Hv1-mCitrine and TRPV1-CFP. These two proteins should not associate and therefore should not produce any FRET. As expected, the FRET efficiency calculated from these cells is essentially zero and serves as a base line for all subsequent measurements (Fig. 2B).

Genetically labeling TRPV1 channels at the C terminus with either eYFP or CFP yielded functional channels that are activated in a dose-dependent manner by capsaicin ($EC_{50} = 280$ and 330 nM , respectively) (Fig. 3A) and preserve other characteristics such as outward rectification of the IV relationship and voltage dependence (data not shown). The EC_{50} for capsaicin of these constructs is very similar to the corresponding value for WT (nontagged) channels of 232 nM . The fluorescence emission spectra of the FPs attached to the channel correspond to previously published spectra for eYFP or CFP (26, 38). To determine the distance between fluorescent proteins attached to the C terminus of the channel, we coexpressed the eYFP labeled and CFP labeled subunits in HEK 293 cells and measured the efficiency of FRET. As with the Hv1 channel, the efficiency of FRET was graphed as a function of the donor to acceptor intensity ratio (I_d/I_a), to compare with the mathematical expressions described under “Experimental Procedures” and estimate the stoichiometry of the channel and the interfluorophore distance. The FRET data for the pair at this position agrees with the prediction that the channel is a tetramer and allowed us to estimate the distance between adjacent FPs. This is because the distance between two diagonally located fluorophores in the same square-shaped plane within a tetramer will correspond to $r\sqrt{2}$, where r is the adjacent interfluorophore distance. Using the value $R_o = 49.2 \text{ \AA}$, the adjacent fluorescent proteins located at the C terminus were determined to be $6.6 \pm 2 \text{ nm}$ apart (Fig. 3C).

According to this result, if the C termini are located at the corners of a square plane, the distance between two diagonally located fluorophores in the same plane would be 9.5 nm . To have an independent estimate of this distance, we coexpressed TRPV1 tandem dimers labeled with eYFP or CFP at the C terminus (one FP/dimer).

The channels generated by these tandem constructs should be dimers of two dimers and have a single FRET pair in diagonally located C termini (27). The relationship between apparent FRET efficiency and fluorescence intensity ratio for these channels can be described by a model with a single FRET pair. The distance estimated for these functional channels was $8 \pm 2 \text{ nm}$, which is similar to the predicted diagonal distance of 9.5 nm (Fig. 3D), and supports the assertion that the C termini are located at the corners of a square plane.

Next, we assessed the FRET efficiency of N-terminally labeled TRPV1 channels with CFP or eYFP (Fig. 4). Both of these chimeras are functional, and the FPs also preserve their emission spectra; they are both activated by capsaicin in a dose-dependent manner, with $EC_{50} = 174 \text{ nM}$ for the eYFP channel and 181 nM for the CFP channel. Analysis of cells cotransfected with these constructs yields almost no FRET efficiency, indicat-

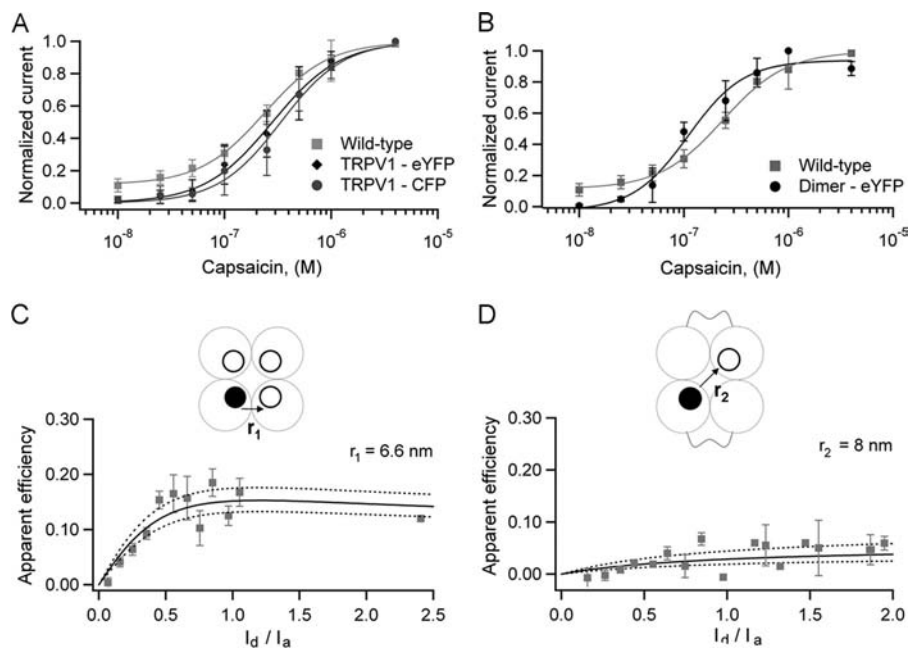


FIGURE 3. **FRET in C-terminal constructs.** *A* and *B*, capsaicin activates the C-terminally FP-labeled channels (*A*, $n = 8$), and the tandem dimer-FP constructs (*B*, $n = 4$) in a dose-dependent manner. *Solid lines* indicate the fit with the Hill equation. *C*, FRET between CFP and eYFP in the C terminus of TRPV1. The data are presented as the average of the efficiency in 0.1 intervals of the intensity ratio. *Solid and dotted lines* are the predictions for adjacent FPs separated by 6.6 ± 0.2 nm (r_1). *D*, FRET in a tetramer made of dimers with a single FRET pair at the C terminus; the prediction for a diagonal distance is 8 ± 0.6 nm (r_2).

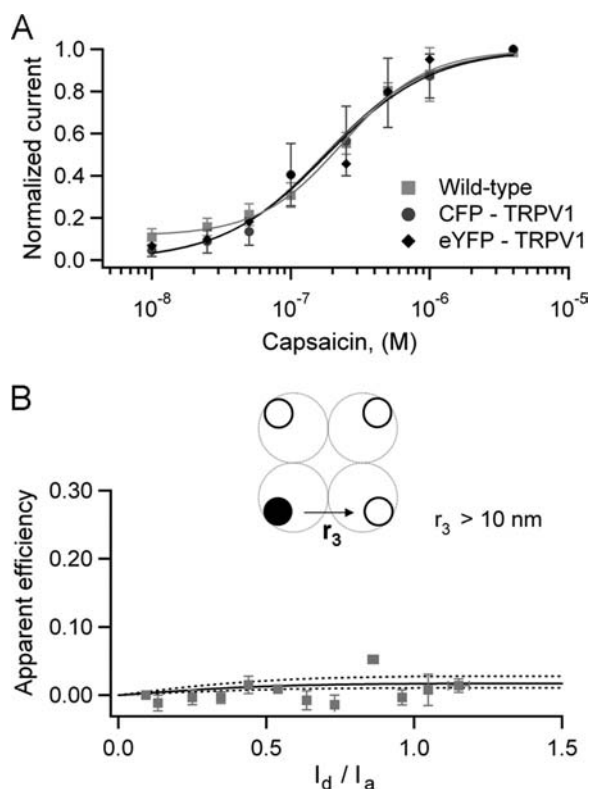


FIGURE 4. **FRET in N-terminal constructs.** *A*, dose-response curves for capsaicin for the N-terminally FP-labeled channels; $n = 2$ for CFP construct and $n = 7$ for eYFP construct. The data were fitted to the Hill equation, and the EC_{50} values are given in the text. *B*, cotransfection of eYFP and CFP subunits yields a channel with essentially no FRET; therefore the predicted separation for the adjacent FPs is ≥ 10 nm (r_3).

ing that the distance for the adjacent FPs at the N terminus is at or beyond the limiting distance for FRET between the CFP and eYFP pair. According to the model, again considering tetra-

meric channels, the distance between FPs at the N terminus was 10 nm or larger.

The results above suggest that the N terminus is located peripherally to the C terminus. To gain a better picture of the organization of terminal domains, we determined the distance of the N- and C-terminal domains in the normal direction to the membrane. To this end, we used DPA, which is a nonfluorescent hydrophobic anion that intercalates in the membrane. DPA functions as an energy acceptor with fluorescent proteins, resulting in quenching of their fluorescence emission by a FRET mechanism (23, 39).

The relative distance between the fluorophores attached to the channel and the membrane can then be determined by measuring the efficiency of FRET between these two probes. For these experiments, we used eYFP labeled TRPV1 channels expressed in oocytes and prepared membrane sheets from them (32) to measure fluorescence emission spectra.

When the C-terminally labeled channel is expressed, addition of $20 \mu\text{M}$ of DPA (23) to the bath solution (intracellular face of the membrane sheet) produces a steady-state reduction of the eYFP fluorescence intensity down to 40% of its initial value. In contrast, when we expressed the N-terminally labeled channel, the eYFP fluorescence was reduced by $20 \mu\text{M}$ of DPA to 70% of its initial value (Fig. 5*B*). It has been reported that fluorescence quenching of free GFP in solution by the same concentration of DPA we used is 3% (23), which is consistent with the fact that, at $20 \mu\text{M}$, the average distance between DPA molecules in solution should be near 10 nm. We can assume that the quenching of free eYFP will be similar because the R_0 for the pair eYFP-DPA is close to that of the GFP-DPA pair (31 and 37 Å, respectively) (31). Therefore, the larger than 3% quenching of fluorescence suggests that eYFP attached to the N or C terminus of the channel was close enough to the DPA intercalated in the membrane to observe FRET.

Domain Organization of TRPV1

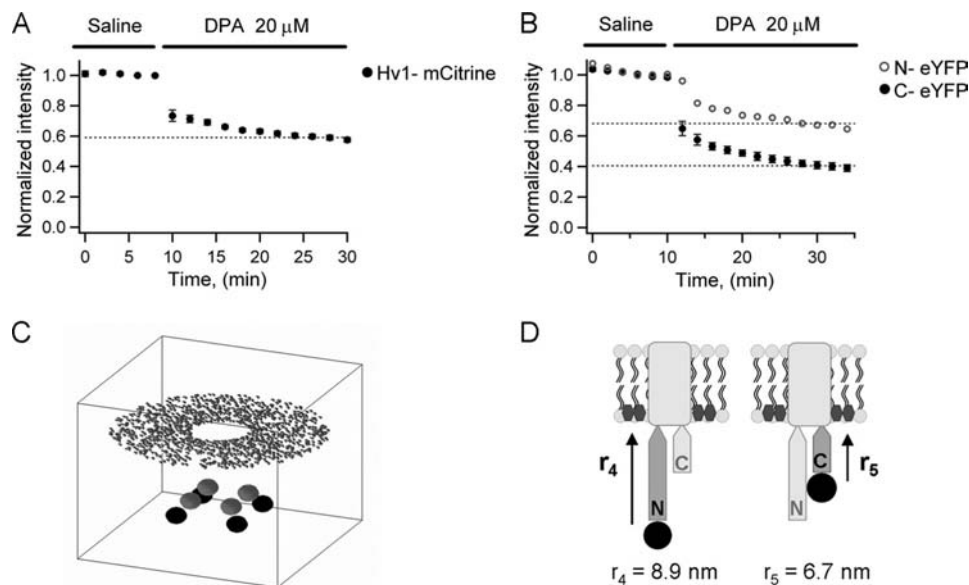


FIGURE 5. Quenching of fluorescent proteins attached to terminal domains of Hv1 and TRPV1 by DPA in *X. laevis* oocyte membrane sheets. *A*, DPA quenches ~40% of the fluorescence of the mCitrine-labeled Hv1 channel. *B*, quenching of eYFP by DPA is different if attached to the N terminus or C terminus of the TRPV1 channel. *C*, quantitative description of the spatial location of FPs in TRPV1 and DPA. Gray and black spheres represent the C-terminal and N-terminal FPs, respectively; the disk-like arrangement of dots represents the multiple DPA molecules with the empty center indicating where the transmembrane domains of the tetramer should be. The calculation is carried out in a box of 40 nm per side. *D*, the simulation of FRET predicts a separation of 8.9 nm (r_4) for the N-terminal and of 6.7 nm (r_5) for the C terminus of the TRPV1 from the membrane.

To relate the magnitude of fluorescence quenching with the separation of the FPs from DPA in the membrane, we developed a quantitative description of FRET between eYFP and DPA that takes into account their relative spatial location. We assumed FRET between a channel with four identical fluorescent proteins and multiple DPA molecules in the membrane (Fig. 5C). In the simulation, each of the four FPs in the channel transfers energy to every DPA molecule in the membrane and the FRET efficiency is calculated according to the following.

$$E_{4,dn_a} = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^{4_d} \left[\frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}} \right] \quad (\text{Eq. 14})$$

In this equation, r_{ij} is the distance from the j th DPA to the i th eYFP molecule calculated as follows.

$$r_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (\text{Eq. 15})$$

In accordance with the adjacent distances we measured previously and keeping 4-fold symmetry, the absolute values of the coordinates x_i, y_i for each of the four eYFPs are, in Angstroms (30, 30) in the C terminus and (50, 50) in the N terminus. The coordinates for each DPA molecule were set randomly on a circular plane around the channel with constant $z_j = 0$. The sum over the index j in Equation 14 runs up to the number of DPA acceptors, which we set to be 1400 and which are placed in the intracellular face of the membrane. Because quenching of eYFP by DPA is a direct estimate of the FRET efficiency between this pair, we only varied the coordinate z_i until Equation 14 gave an efficiency equal to the quenching level: 0.3 for YFP in the N terminus and 0.6 for YFP in the C terminus.

Thus we determined that the separation of eYFP located at the C-terminal from the DPA in the membrane was 6.7 nm, and if located at the N-terminal, this separation was 8.9 nm (Fig. 5D). Given that the average location of DPA normal to the membrane is voltage-dependent (39) and that in our experiments in membrane sheets the membrane potential is 0 mV, a more accurate position for DPA might be the center of the membrane, because the midpoint of DPA-associated charge movement is close to 0 mV (40). This will shorten our measured distances by ~1.5 nm.

As a control, we expressed the C-terminally labeled Hv1 channel, for which an x-ray structure of the coiled-coil C-terminal domain is available (36). The addition of 20 μM of DPA to the bath solution (intracellular face of the membrane sheet) produces a steady-state reduction of the mCitrine fluorescence intensity of 40% of its initial value (Fig. 5A). Assuming this level of quenching is proportional to a FRET efficiency of 0.4 and $R_0 = 32 \text{ \AA}$ for DPA and mCitrine, Equation 14 modified for a dimmer yields a separation between the two mCitrine and DPA in the membrane of 85 \AA . The coiled-coil domain of Hv1 starts almost immediately after the S4 segment and measures ~65 \AA . mCitrine is attached at the end of this domain, and its fluorophore is located approximately in the middle, adding to a total separation from the membrane of ~90 \AA , which is consistent with the estimated separation calculated from the quenching experiment and lends credence to this experimental approach.

Up to here we have determined the spatial location of the terminal domains independent of each other and with respect to the membrane. We next wondered which is the distance and relative orientation of the N and C termini with respect to each other. To this end, we cotransfected N-terminally eYFP-labeled subunits and C-terminally CFP-labeled subunits in HEK 293 cells. Channels formed by these subunits should have FRET

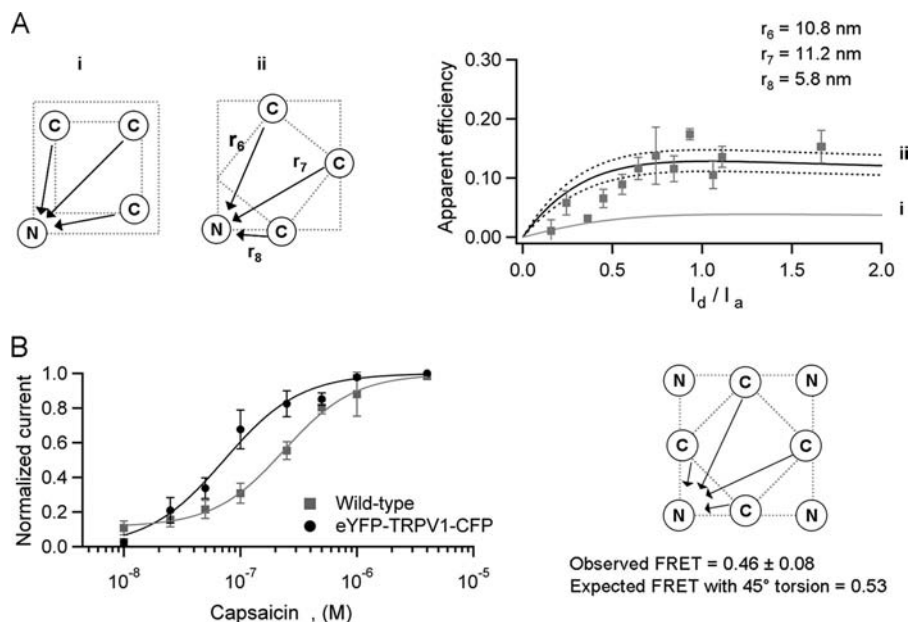


FIGURE 6. Possible angular torsion between the N- and C-terminal planes. A, FRET between N-terminally eYFP-labeled and C-terminally CFP-labeled subunits. The critical distances are represented in the diagrams as r_6 , r_7 , and r_8 . The gray solid line in the right panel is the prediction for no angular torsion between the terminal planes as shown in (panel i). The only arrangement for the observed FRET corresponds to an approximately 40° rotation between the N- and C-terminal planes as shown in panel ii. B, the assembled double labeled channel with eight fluorescent proteins is activated by capsaicin in a dose-dependent manner ($n = 8$). The observed FRET in this channel is consistent with a 45° angular torsion between the N- and C-terminal planes. The arrows in the diagram indicate the direction of the energy transfer for one of the four acceptors.

efficiencies dominated by transfer from the C-terminal to the N-terminal fluorescent proteins.

As shown in Fig. 6A, FRET efficiency at high I_d/I_a ratios is high. Interestingly, an accurate prediction of the observed FRET can be made with a tetrameric model only if there is a $\sim 40^\circ$ angular torsion between the plane of the N termini and the plane of the C termini. If the C- and N-terminal planes had the same orientation, their separation distance would be larger, leading to lower levels of FRET than those observed. To corroborate this result, we constructed and functionally expressed a channel labeled with eYFP in the N terminus and CFP in the C terminus of the same subunit. Thus, this construct should assemble into a tetramer with four CFP-eYFP FRET pairs. This channel with eight fluorescent proteins remained activated by capsaicin in a dose-dependent manner with an $EC_{50} = 73$ nM. Its cellular distribution was the same as all other constructs and retained a similar expression level in the membrane.

The observed FRET efficiency in this doubled-labeled channel was very high, 0.46 ± 0.08 , because of the multiple energy transfer pathways. This value is consistent with the predicted FRET (0.53) of a tetramer with four FRET pairs and a 45° angular torsion between the N- and C-terminal planes (Fig. 6B).

Because FRET efficiency is also dependent on the orientation of the pair of fluorophores, we were interested in determining the mobility of our channel-attached FPs. Fluorescence emission anisotropy measurements can provide an idea of how free the fluorophore is to rotate in space and thus indicate whether a value of the orientation factor, $\kappa^2 = 2/3$, is justified (33). Although a direct estimate of κ^2 from an anisotropy value is not possible, it has been shown that the error between the estimated distance and the actual distance that is introduced by calculating R_0 using $\kappa^2 = 2/3$, is $\sim 10\%$ if the anisotropy is less

than 0.3 (41). Even if fluorophores are not highly mobile, the error introduced in the distance by using $\kappa^2 = 2/3$ falls within the 67% confidence interval (42).

The anisotropy we measured from eYFP was 0.1 ± 0.04 and 0.11 ± 0.07 if attached to the N and C terminus of the channel, respectively (Fig. 7B). These low anisotropy values are very similar to the anisotropy that has been previously measured for GFP and other variants attached to terminal domains of ion channels (26). Also, these measurements indicate that the yellow fluorescent protein was similarly mobile regardless of the terminal domain to which it was attached in the channel, further indicating that the observed FRET most likely reported distance instead of restricted orientation of the fluorescent proteins attached to different intracellular terminal regions.

To summarize these results, we mapped the estimated distances of the terminal domains into the available cryoEM density of the channel (11). As shown in Fig. 8, there is good agreement between our data on the position of N- and C-terminal domains and the oligomeric size of the TRPV1 channel.

Domain Organization of the TRPV1 Channels upon Activation—To determine whether channel activation promotes any conformational changes between the terminal domains, FRET measurements were performed in the presence of capsaicin ($4 \mu\text{M}$), allicin ($200 \mu\text{M}$), and lysophosphatidic acid ($5 \mu\text{M}$) and at three fixed temperatures: 22, 32, and 42°C ; additionally, because TRPV1 channel desensitization by capsaicin occurs in a calcium-dependent manner (43), we measured FRET in the presence of calcium (2 mM) and capsaicin. The results were as follows (Fig. 9).

There was no change in FRET between adjacent FPs located at the C terminus after addition of capsaicin, with respect to

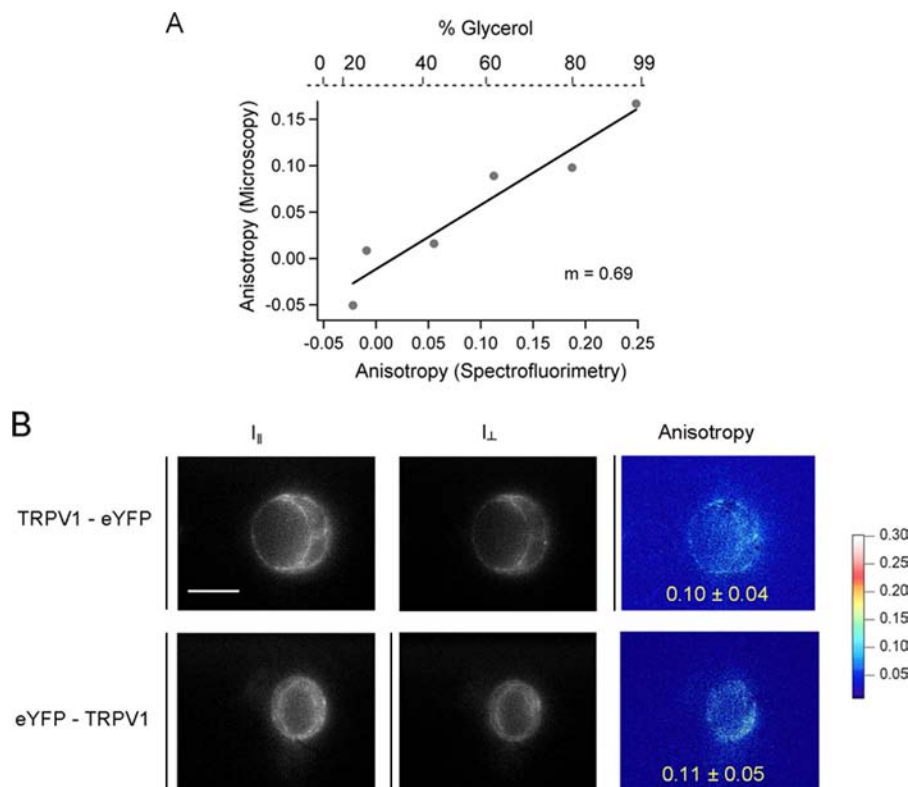


FIGURE 7. Measurements of the anisotropy of fluorescent constructs. *A*, anisotropy of FITC dissolved in increasing concentrations of glycerol. Anisotropy was measured by fluorometry and microscopy to determine the intrinsic properties of the system. The correction factor was $1/m = 1.45$. *B*, epifluorescence images of HEK 293 cells expressing the C-terminally eYFP-labeled (*top panel*) and the N-terminally eYFP-labeled channel (*bottom panel*). *Left panels*, shown in parallel intensity (I_{\parallel}); *middle panels*, shown in perpendicular intensity (I_{\perp}); *right panels*, the calculated anisotropy shown in pseudocolor scale.

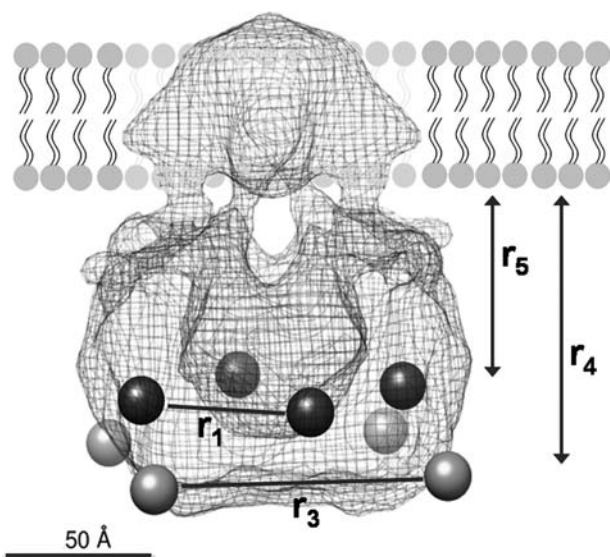


FIGURE 8. Mapping of the distances determined in our experiments into the 19 Å resolution structure of the TRPV1 determined by single particle electron cryoEM (11). The light gray spheres represent the FPs located at the N terminus, and the dark gray spheres represent the FPs at the C terminus. Mapping was performed with the UCSF Chimera software (46).

calcium-free solution either in the presence of calcium in channel-expressing HEK 293 cells or in oocyte membrane sheets. FRET between the C-terminally located eYFP and membrane-intercalated DPA did not change either in the presence of capsaicin, allicin, or lysophosphatidic acid. For the N-terminally labeled channel, there was no change in FRET after addition of

capsaicin with and without calcium with respect to calcium-free solution.

We decided to test the agonists in the construct that yields the maximum amount of FRET in our experiments: the double-labeled channel. The observed FRET was the same as in saline, in the presence of capsaicin or allicin.

To measure possible conformational changes caused by temperature, first we monitored the intensity of the fluorescent proteins alone at all the temperature range tested (from 22 to 42 °C). There were no changes in the emission spectra of the two FPs in this temperature range (data not shown). Experiments were performed in oocyte membrane sheets expressing the C-terminally labeled channels and the doubled-labeled channel; there was no change in FRET in either of the two constructs at the three temperatures tested (Fig. 9, *E* and *F*).

One explanation for the lack of changes in FRET associated with the activation of the channel is that the conformational change fixes the fluorescent protein in an unfavorable orientation, counteracting the change in FRET caused by distance. To explore this possibility, we measured anisotropy of eYFP attached to the C-terminal of the channel in the presence of capsaicin; the anisotropy was the same as in saline solution, indicating that the FPs are not restricted upon activation of the channel and that our FRET efficiency measurements remain valid when the channel is activated.

DISCUSSION

In this work we have determined the coarse architecture and the relative positions of the terminal domains of the TRPV1 ion

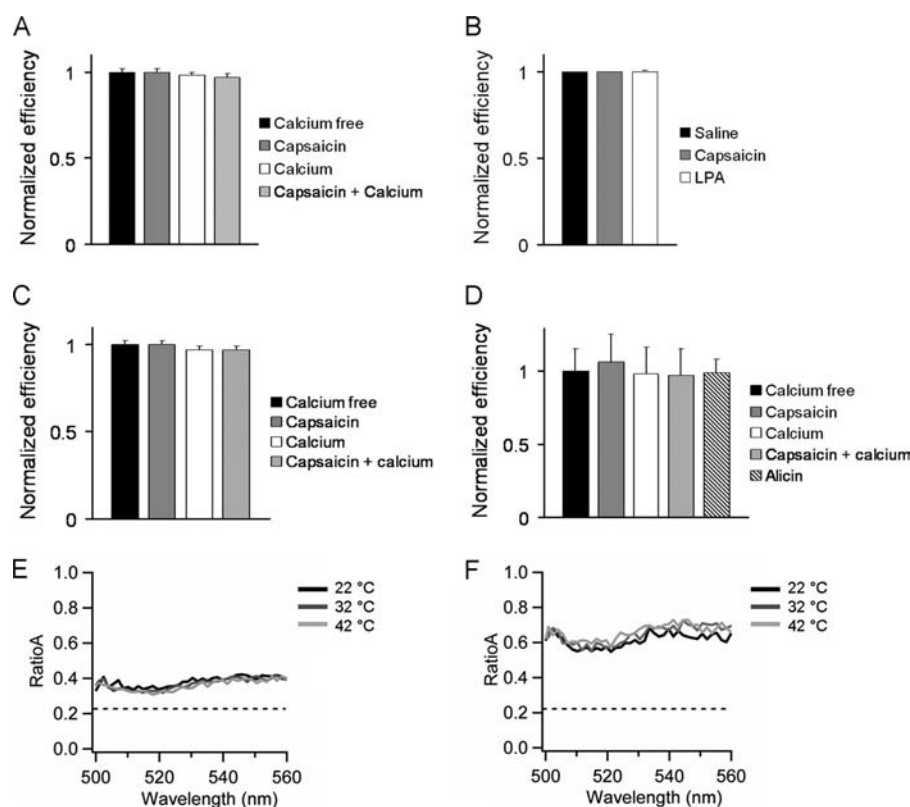


FIGURE 9. A–D, the activation of the channel does not modify the FRET efficiency between the FPs located at the C-terminal domains (A), between the C-terminal located eYFP and DPA intercalated in the membrane (B), between the FPs located at the N terminus of the channel (C), and between the N- and C-terminal domains of the same subunit (D). There was no change in FRET by activating the channel in the presence of calcium. E and F, RatioA calculated from the C-terminally labeled TRPV1 (E) and the doubly labeled channel (F). The dotted line represent the $ratioA_0$. The quantity of FRET is obtained by the difference: $ratioA - ratioA_0$. There was no significant change in FRET at the three temperatures tested.

channel by means of FRET measurements. We found that the fusion of FPs in the cytoplasmic terminal regions of the channel does not compromise channel function and that it is possible to determine FRET within or between channel subunits. We considered different subunit compositions of TRPV1, and the fit to our data is consistent with a tetrameric stoichiometry. This is in accordance with other measurements of the subunit composition of TRPV1 that have also found a tetrameric arrangement (9, 10).

The measured FRET efficiency in our constructs indicates that the C-terminal domains of adjacent subunits are closer than the adjacent N-terminal domains and also that the C-terminals are closer to the membrane than the N termini. The distance determined from FRET efficiency measurements between labeled N termini within a channel is a minimum distance because the FRET efficiency is close to zero. It seems that this is not the result of a methodological problem, because we could reliably measure FRET in other constructs and other channels (see Fig. 2). Another possibility is that, because FRET originates from a dipole-dipole interaction, the donor and acceptor dipoles in the N-terminal constructs were not in a favorable orientation. It has been reported that the error in distance introduced by the orientation factor (assuming $\kappa^2 = 2/3$) is relatively small, for molecules with total anisotropy smaller than 0.3, the error introduced is $\sim 10\%$ (41). Our anisotropy measurements indicate that the FPs attached to either the N or C terminus of the channel are quite mobile under our

experimental conditions, suggesting that the FRET efficiency measurements can be reasonably interpreted in terms of distance and that the adjacent N-terminal domains are at least 10 nm apart from each other.

Our data indicate that the plane of FPs located in the C termini is rotated 45° with respect to the N termini plane, forming an alternating arrangement of C and N termini. Although it could be argued that this proposed rotation does not represent the arrangement of the terminal domains of the channel but instead a forced packing caused by the size of the FPs that do not interfere with its function (44), it has been proposed by molecular modeling (45) that there could exist a particular rotation between the terminal domains of the same subunit that stabilizes the channel conformation.

We also determined the relative distances of the C- and N-terminal labels to the plasma membrane via the quenching of eYFP fluorescence by DPA that occurs through a FRET mechanism. These measurements are complicated by the fact that the number of DPA molecules incorporated into the membrane is unknown. The amount of observed quenching is proportional to the FRET efficiency, because this measurement is equivalent to a donor dequenching experiment (33). To reproduce the observed degree of quenching at $20 \mu\text{M}$ DPA, we carried out a simulation in which 1400 DPA molecules are placed around a channel and occupy a circular area of $\sim 680 \text{ nm}^2$. This is equivalent to a DPA molecular density of $\sim 2.8 \times 10^{-2}$ molecules \AA^{-2} . It has been previously estimated that the concen-

Domain Organization of TRPV1

tration of DPA in the membrane when 4 μM is present in the bath is equivalent to a density of 10^{-4} molecules \AA^{-2} (31). So our estimates are not too different and can be explained by our use of an increased concentration of DPA.

Although very robust FRET was observed between the FPs located at the terminal domains and between membrane-intercalated DPA and the FPs, there was no change in FRET efficiency after activation of the channel either by ligands or temperature changes, indicating that the terminal domains do not move relative to each other or relative to the membrane during activation or that the conformational changes are too small to be detected with these probes.

It has been proposed that a calcium-dependent, CaM-mediated interaction between the N- and C-terminal domains occurs concomitant with the desensitized state of the channel (24). This suggests that Ca^{2+} -CaM binding to its N- and C-terminal sites promotes a conformational change in which these terminal domains get closer, producing the desensitization of the channel. This hypothesis has also been incorporated into a homology model of the channel (45). We hypothesized that it could be possible to determine this interaction in our experiments and tried to determine its extent using several of our constructs. The N-terminally labeled construct did not show an increase in FRET upon activation of the channel in the presence of calcium, indicating that the N termini do not approach each other during desensitization. Also, there was no detectable change in FRET in the double-labeled channel, in which we expected to determine whether the N-terminal domain moves closer to the C terminus, because of the proximity of the FPs (which is close to the R_0 for the eYFP-CFP pair) and the large efficiency of FRET. These results suggest that the proposed interaction between the terminal domains during desensitization involves a discreet conformational change.

A limitation in our experiments, especially for dynamic measurements of changes in FRET efficiency as a result of channel activation, is that the chromophores in the FPs are located in the center of a 3-nm-diameter barrel, so the calculated distances correspond to the distance separating the FPs chromophores and not the distance between the actual terminal residues. We think that this limits the resolution of the measurements and the interpretation of our results, because distances below ~ 3 nm cannot be measured. Despite this limitations, our estimates can be mapped to the available 19 \AA resolution structure of TRPV1 channel determined by single particle cryo-electron microscopy (11). The electron density shows an "open basket" structure with a large void space in its center. Our data provide several insights that cannot be gleaned from this cryoEM structure. On the one hand, the FRET data place the C termini surrounded by the N-terminal domains. Moreover, our data suggest that these terminal domains are arranged in an alternating distribution. Another related discovery is that the C terminus is closer to the plasma membrane than the N terminus.

On the other hand, our data suggests a more compact structure than the one proposed by homology modeling (45). One discrepancy between our data and the cryoEM structure is the fact that there is a big void in the density in the middle of the open basket structure, which our data suggest should be occu-

ried by the C-terminal domains. One interesting explanation is the possibility that the cryoEM structure captured a particular conformation favored by the conditions used to reconstitute the protein.

Acknowledgments—We thank Manuel Hernández (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) for expert instrument fabrication, Itzel Llorente (Instituto de Fisiología Celular) for help with cell culture, and Dr. Ronan Le Legadec and Omar Saavedra for help in chemical synthesis.

REFERENCES

1. Xia, R., Dekermendjian, K., Lullau, E., and Dekker, N. (2011) TRPV1. A therapy target that attracts the pharmaceutical interests. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704**, 637–665
2. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor. A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824
3. Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sörgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457
4. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–543
5. Piper, A. S., Yeats, J. C., Bevan, S., and Docherty, R. J. (1999) A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J. Physiol.* **518**, 721–733
6. Salazar, H., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., García-Villegas, R., Munari, M., Gordon, S. E., Islas, L. D., and Rosenbaum, T. (2008) A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci.* **11**, 255–261
7. Ufret-Vincenty, C. A., Klein, R. M., Hua, L., Angueyra, J., and Gordon, S. E. (2011) Localization of the PIP_2 sensor of TRPV1 ion channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 9688–9698
8. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L. D., and Rosenbaum, T. (2012) Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 78–85
9. Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., and Blumberg, P. M. (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 28613–28619
10. Kuzhikandathil, E. V., Wang, H., Szabo, T., Morozova, N., Blumberg, P. M., and Oxford, G. S. (2001) Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *J. Neurosci.* **21**, 8697–8706
11. Moiseenkova-Bell, V. Y., Stanciu, L. A., Serysheva, I. I., Tobe, B. J., and Wensel, T. G. (2008) Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7451–7455
12. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, M. (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* **118**, 917–928
13. Jara-Oseguera, A., Llorente, I., Rosenbaum, T., and Islas, L. D. (2008) Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *J. Gen. Physiol.* **132**, 547–562
14. Salazar, H., Jara-Oseguera, A., Hernández-García, E., Llorente, I., Arias-Olguín, I. I., Soriano-García, M., Islas, L. D., and Rosenbaum, T. (2009) Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 704–710
15. Gaudet, R. (2009) Divide and conquer. High resolution structural information on TRP channel fragments. *J. Gen. Physiol.* **133**, 231–237
16. Yao, J., Liu, B., and Qin, F. (2011) Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 10000–10005

- Sci. U.S.A.* **108**, 11109–11114
17. García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J. Neurosci.* **24**, 5307–5314
 18. Zhang, F., Liu, S., Yang, F., Zheng, J., and Wang, K. (2011) Identification of a tetrameric assembly domain in the C terminus of heat-activated TRPV1 channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 15308–15316
 19. Valente, P., García-Sanz, N., Gomis, A., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C., and Ferrer-Montiel, A. (2008) Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB J.* **22**, 3298–3309
 20. Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E., and Latorre, R. (2006) A hot-sensing cold receptor. C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J. Neurosci.* **26**, 4835–4840
 21. Gracheva, E. O., Cordero-Morales, J. F., González-Carcacia, J. A., Ingolia, N. T., Manno, C., Aranguren, C. I., Weissman, J. S., and Julius, D. (2011) Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. *Nature* **476**, 88–91
 22. Islas, L. D., and Zagotta, W. N. (2006) Short-range molecular rearrangements in ion channels detected by tryptophan quenching of bimane fluorescence. *J. Gen. Physiol.* **128**, 337–346
 23. Taraska, J. W., and Zagotta, W. N. (2007) Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 854–860
 24. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., and Gaudet, R. (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905–918
 25. Cui, Y., Yang, F., Cao, X., Yarov-Yarovsky, V., Wang, K., and Zheng, J. (2012) Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J. Gen. Physiol.* **139**, 273–283
 26. Zheng, J., Trudeau, M. C., and Zagotta, W. N. (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* **36**, 891–896
 27. Gordon, S. E., and Zagotta, W. N. (1995) Subunit interactions in coordination of Ni²⁺ in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10222–10226
 28. Jara-Oseguera, A., Ishida, I. G., Rangel-Yescas, G. E., Espinosa-Jalapa, N., Pérez-Guzmán, J. A., Elías-Viñas, D., Le Lagadec, R., Rosenbaum, T., and Islas, L. D. (2011) Uncoupling charge movement from channel opening in voltage-gated potassium channels by ruthenium complexes. *J. Biol. Chem.* **286**, 16414–16425
 29. Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R., and Stuurman, N. (2010) Computer control of microscopes using μ Manager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, Chapter 14, Unit 14.20
 30. Marshall, J. (1920) The preparation of exanitrodiphenylamine and its use as a booster for shell charges. *J. Ind. Eng. Chem.* **12**, 336–340
 31. Wang, D., Zhang, Z., Chanda, B., and Jackson, M. B. (2010) Improved probes for hybrid voltage sensor imaging. *Biophys J* **99**, 2355–2365
 32. Ottolia, M., Philipson, K. D., and John, S. (2007) *Xenopus* oocyte plasma membrane sheets for FRET analysis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* **292**, C1519–C1522
 33. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 443–472, Springer-Verlag New York Inc., New York
 34. Lee, S. Y., Letts, J. A., and Mackinnon, R. (2008) Dimeric subunit stoichiometry of the human voltage-dependent proton channel Hv1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7692–7695
 35. Koch, H. P., Kurokawa, T., Okochi, Y., Sasaki, M., Okamura, Y., and Larsson, H. P. (2008) Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9111–9116
 36. Fujiwara, Y., Kurokawa, T., Takeshita, K., Kobayashi, M., Okochi, Y., Nakagawa, A., and Okamura, Y. (2012) The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1. *Nat. Commun.* **3**, 816
 37. Salonikidis, P. S., Niebert, M., Ullrich, T., Bao, G., Zeug, A., and Richter, D. W. (2011) An ion-insensitive cAMP biosensor for long term quantitative ratiometric fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements under variable physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **286**, 23419–23431
 38. Overton, M. C., and Blumer, K. J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers *in vivo*. *Curr. Biol.* **10**, 341–344
 39. Chanda, B., Asamoah, O. K., Blunck, R., Roux, B., and Bezanilla, F. (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**, 852–856
 40. Fernández, J. M., Taylor, R. E., and Bezanilla, F. (1983) Induced capacitance in the squid giant axon. Lipophilic ion displacement currents. *J. Gen. Physiol.* **82**, 331–346
 41. Haas, E., Katchalski-Katzir, E., and Steinberg, I. Z. (1978) Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization. *Biochemistry* **17**, 5064–5070
 42. van der Meer, B. W. (2002) Kappa-squared. From nuisance to new sense. *J. Biotechnol.* **82**, 181–196
 43. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., and Gordon, S. E. (2004) Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.* **123**, 53–62
 44. Miranda, P., Manso, D. G., Barros, F., Carretero, L., Hughes, T. E., Alonson-Ron, C., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2008) FRET with multiply labeled HERG K⁺ channels as a reporter of the *in vivo* coarse architecture of the cytoplasmic domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1681–1699
 45. Fernández-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2008) Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J. Membr. Biol.* **223**, 161–172
 46. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF chimera. A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612