



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL COLESTEROL SOBRE EL  
CANAL TRPV1

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
GIOVANNI PICAZO JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR  
DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. FROYLAN GOMEZ LAGUNAS  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013



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***

*Quiero empezar por agradecer a mi tutora de doctorado, la Dra. Tamara Rosenbaum, por toda su asesoría e interés puesto en el desarrollo de este proyecto, así como en mi formación.*

*Agradezco a quienes formaron parte de mi comité tutorial. A la Dra. Diana Escalante y al Dr. Froylán Gómez por su asesoría y contribuciones a este trabajo.*

*Al Dr. León Islas por sus valiosas observaciones y contribuciones durante la realización del proyecto que aquí se presenta.*

*A la Biol. Alejandra Llorente Gil por su apoyo en toda la parte de biología molecular en esta tesis.*

*Al M. en C. Ernesto Ladrón por sus contribuciones a este proyecto en la parte de modelado computacional.*

*Agradezco al Instituto de Fisiología Celular y a la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme los medios y espacios para mis estudios de doctorado.*

*Este trabajo recibió apoyos para la realización de experimentos de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (129474) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-PAPIIT (IN204111) otorgados a la Dra. Tamara Rosenbaum.*

*También agradezco a la Fundación Miguel Alemán y a la Fundación Marcos Moshinsky por los recursos aportados para este proyecto.*

*La realización de esta tesis también fue posible gracias a la beca de CONACyT (No. de becario 379880) que me fue otorgada durante la realización de este trabajo.*

# Índice

<b>Índice</b> .....	1
<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>1.-Introducción</b> .....	6
<b>1.1.-La familia de los canales TRP</b> .....	8
<b>1.2.-El canal TRPV1</b> .....	11
<b>1.2.1.-Características generales y expresión del TRPV1</b> .....	11
<b>1.2.2-Estructura del canal TRPV1</b> .....	12
<b>1.2.3-Agonistas y moduladores del canal TRPV1</b> .....	13
<b>1.2.4-Desensibilización del canal TRPV1</b> .....	15
<b>1.2.5-El papel de TRPV1 en el dolor e inflamación</b> .....	15
<b>2.-Planteamiento del problema</b> .....	16
<b>3.-Hipótesis</b> .....	20
<b>4.-Objetivo general</b> .....	20
<b>5.-Objetivos particulares</b> .....	20
<b>6.-Metodología</b> .....	21
<b>6.1.-Reactivos</b> .....	21
<b>6.2.-Mutagénesis dirigida</b> .....	21
<b>6.3.-Cultivo celular</b> .....	22
<b>6.4.-Transfección transitoria</b> .....	22
<b>6.5.-Preparación de la solución de M<math>\beta</math>CD:Coolesterol (10:1)</b> .....	24
<b>6.6.-Registros electrofisiológicos</b> .....	25
<b>6.7.-Registros de canales únicos</b> .....	26
<b>6.8.-Registros con temperatura y voltaje</b> .....	26
<b>6.9Análisis de ruido</b> .....	27
<b>6.10.-Análisis estadístico</b> .....	27
<b>7.-Resultados</b> .....	28
<b>7.1.-El coolesterol reduce de forma reversible las corrientes del canal rTRPV1</b> .....	27
<b>7.2.-El coolesterol reduce el número de canales activables</b> .....	31

7.3.-El epicolesterol no afecta las corrientes del canal rTRPV1.....	33
7.4.-Mutaciones en el S5 transmembranal de rTRPV1 afectan la respuesta a colesterol.....	34
7.5.-El colesterol tiene distintos efectos en las variantes I585 e I585V de hTRPV1.....	36
7.6.-La mutación de I585L en hTRPV1 confiere sensibilidad a colesterol.....	38
<b>8.-Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>9.-Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
<b>10.-Perspectivas.....</b>	<b>51</b>
<b>11.-Bibliografía.....</b>	<b>52</b>
<b>12.-Apéndice.....</b>	<b>61</b>

## Abreviaturas

12-HPETE	12-hidroperoxi-eicosatetraenoico
ATP	Adenosin trifosfato
CaMKII	Cinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
CaM/ $Ca^{2+}$	Calmodulina dependiente de $Ca^{2+}$ o $Ca^{2+}$ /calmodulina
CGPRC	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CHO	Células de ovario de hámster chino
CRAC	Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus
DRM	Membrana resistente a detergentes
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
DSM	Membrana soluble en detergentes
HEK293	Células de riñón de embrión humano
hTRPV1	Canal TRPV1 de humano
LPA	Ácido lisofosfatídico
M $\beta$ CD	Metil-beta-ciclodextrina
MTSET	2-(trimetilamonio)etil metanotiosulfonato
NADA	N-araquidonil dopamina
NGF	Factor de crecimiento neuronal
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PKC	Proteína cinasa A
rTRPV1	Canal TRPV1 de rata
RTX	Resiniferatoxina
TRP	<u>T</u> ransient <u>R</u> eceptor <u>P</u> otential o potencial transitorio del receptor
S5	Segmento transmembrana 5

## Resumen

El TRPV1 es un canal polimodal que funciona como un integrador de estímulos ambientales, participando de forma importante en la detección de una gran variedad de estímulos químicos y termales que pueden ser nocivos. Dado que este canal ha sido ampliamente asociado a procesos de dolor, inflamación e isquemia, resulta un blanco interesante para la generación de posibles terapias para tratar estas afecciones.

La actividad del canal TRPV1 puede ser modulada por moléculas de diversa naturaleza y entre ellas se encuentran algunos lípidos como el colesterol, que se ha sugerido puede ser importante para su función. Mediante el uso de técnicas de electrofisiología, biología molecular y bioquímicas, en esta tesis se ha logrado caracterizar el efecto del incremento del colesterol membranal sobre la función del canal TRPV1.

Los experimentos que aquí se detallan demuestran que un incremento en los niveles de colesterol membranal puede modular de forma negativa la actividad del canal rTRPV1 por medio de una interacción directa del colesterol con un motivo consenso de aminoácidos de reconocimiento del colesterol (CRAC). Los resultados muestran que este motivo CRAC se encuentra localizado en el segmento transmembranal S5 del canal, donde el residuo L585 es de vital importancia para la interacción entre el colesterol y el TRPV1. También se detalla el mecanismo biofísico que subyace a la modulación negativa del canal TRPV1 por el colesterol, mismo que se debe a la estabilización del estado cerrado del canal que, a su vez, resulta en un cambio en el número de canales activables en la membrana celular enriquecida con colesterol, pero no en cambios ni en la corriente unitaria ni en la probabilidad de apertura del canal.

Adicionalmente, se obtuvieron datos que sugieren que el efecto del colesterol sobre la función del canal TRPV1 es dependiente de la especie, ya que las dos variantes naturales del canal TRPV1 de humano en la posición 585 (I585 y V585), responden de forma distinta al lípido.

Así, los resultados de este trabajo muestran que el colesterol, uno de los componentes mayoritarios de las membranas celulares de todos los vertebrados, puede modular la función del canal TRPV1. Esto es importante ya que contribuye a nuestro conocimiento de cuáles son las bases moleculares que podrían estar regulando la actividad canal bajo ciertos contextos fisiológicos donde las concentraciones de colesterol podrían verse afectadas.

## **Abstract**

The TRPV1 ion channel is a polymodal protein that functions as an integrator of environmental stimuli, participating in the detection of a great variety of potentially noxious chemical and thermal stimuli. Since this channel has been extensively associated to pain, inflammation and ischemic processes, it has become a target for the generation of possible therapeutic therapies.

The activity of TRPV1 can be modulated by molecules of a very diverse nature, among which we find some lipids such as cholesterol that has been put forward as an important regulator of TRPV1 function. Through a combination of electrophysiological, molecular biology and biochemical techniques, in this dissertation we have characterized the effects of increasing membrane cholesterol on TRPV1 function.

The experiments detailed here demonstrate that an increase in the levels of membrane cholesterol can negatively modulate rTRPV1's function through a direct interaction with a cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif that we have located to the S5 transmembranal domain of the channel, and in which residue L585 seems to play a pivotal role in the interaction of the lipid with the channel. Moreover, here we describe that the underlying biophysical mechanism responsible for the down-regulation of TRPV1's activity by cholesterol is the stabilization of the closed state of the channel, that results in a decrease in the number of channels that can respond to a given stimulus with no change in the unitary conductance or in the open probability.

Additionally, the experiments suggest that the effects of cholesterol on TRPV1 activity are species specific, since this lipid differently modulates two natural human TRPV1 variants of residue 585, hTRPV1-I585 and hTRPV1-V585.

Thus, the results shown in this study demonstrate that cholesterol, a major component of biological membranes, can modulate the function of TRPV1. This is an important observation because this lipid could possibly regulate the activity of the channel under conditions in which cholesterol concentrations in the organism are subject to change.



## 1.-Introducción

En la actualidad el árbol filogenético está compuesto por tres dominios: Eukarya, Bacteria y Archaea; cada uno de estos dominios engloba a diferentes reinos con diferentes filos, los cuales se distinguen entre sí por diversos caracteres que son únicos para cada uno de ellos. Así, la diversidad de organismos existentes en la Tierra da como resultado también la existencia de una gran diversidad de mecanismos y/o procesos celulares que regulan la función de estos organismos<sup>1</sup>. Sin embargo, algunos de estos mecanismos son conservados entre los miembros de los tres dominios de la vida. Uno de estos, es el uso del flujo de iones a través de la membrana celular como un mecanismo que da origen a diferentes señales en las células<sup>2</sup>.

Las membranas celulares funcionan como una barrera que impide que muchas sustancias atraviesen al interior (o exterior) celular libremente. Sin embargo, en la membrana celular existen proteínas específicas (canales, transportadores y bombas) que permiten que se lleven a cabo el transporte y el flujo de iones<sup>3</sup>.

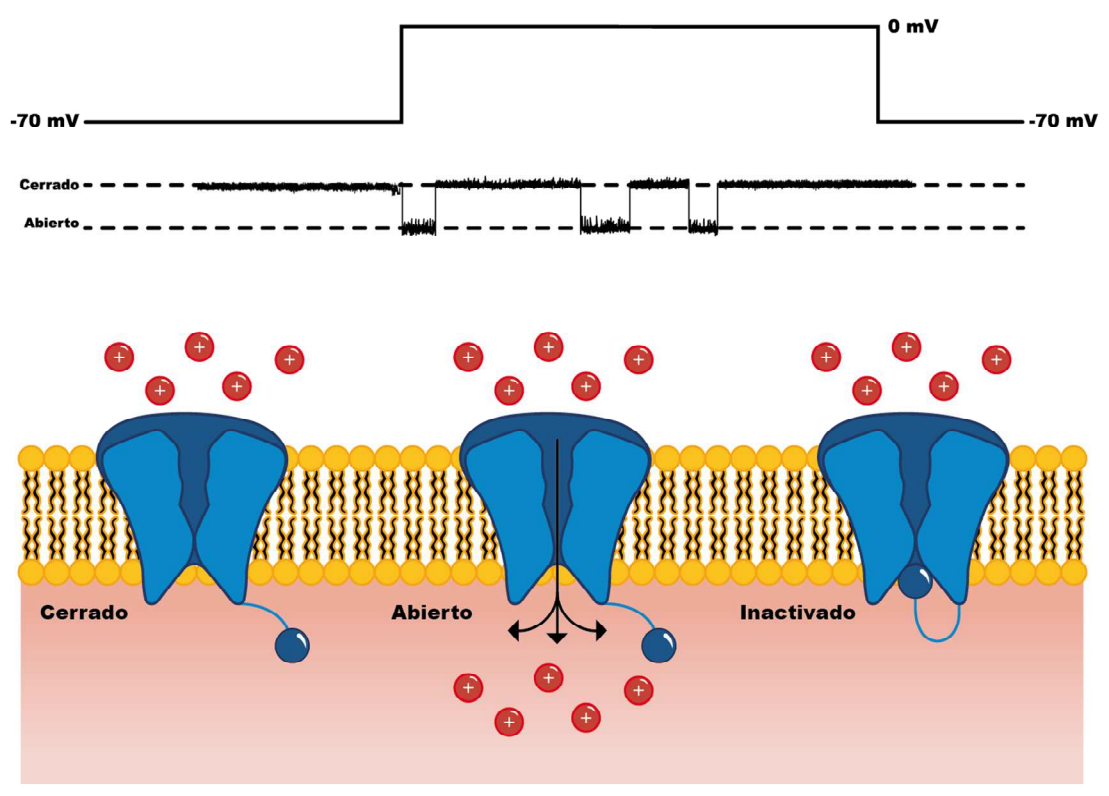
Entre estas proteínas están los canales iónicos, que son proteínas transmembranales que permiten el flujo pasivo de iones a través de la membrana celular, direccionado por su gradiente electroquímico de una manera regulada y altamente eficiente ( $\sim 10^7$  iones  $s^{-1}$  por canal) (Fig. I). Dado que son de vital importancia fisiológica, estas proteínas se encuentran presentes prácticamente en todos los tipos celulares, en diversos tipos de organismos, que van desde animales y plantas hasta bacterias e incluso en virus como los de la influenza A y B<sup>4,5</sup>.

Los canales iónicos son proteínas muy heterogéneas con diversas características estructurales que participan en numerosos procesos celulares. Su papel funcional puede variar dependiendo del tipo celular y tejido en el que se expresen dentro de un mismo organismo, además de que su distribución membranal también puede variar y, por si esto no fuera suficiente, pueden ser modulados por diversos estímulos y por una gran variedad de moléculas<sup>3</sup>.

En los animales multicelulares, los canales iónicos tienen un papel muy importante en diversos procesos, tales como: proliferación celular, transducción de señales, balance de

sales y agua, secreción hormonal, excitación muscular y nerviosa, memoria y aprendizaje, fertilización, muerte celular, sólo por citar algunos <sup>3</sup>. Los defectos en la función de canales iónicos a menudo tienen profundos efectos fisiológicos, los cuales pueden dar como resultado distintos tipos de enfermedades, las llamadas “canalopatías”, lo cual hace de los canales iónicos un atractivo objeto de estudio<sup>3</sup>.

Un enfoque para el estudio de los canales iónicos es la correlación entre la estructura y su función, la cual nos brinda la oportunidad de conocer de manera más detallada cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen a la modulación de estas proteínas por parte de varios compuestos y estímulos a los que son sensibles e incluso por parte del microambiente que las rodea.



**Figura I. Los canales iónicos permiten el flujo pasivo de iones bajo su gradiente electroquímico.** El esquema ejemplifica un canal de sodio dependiente de voltaje que se abre o cierra en presencia de un estímulo (voltaje en este caso, línea sólida), lo cual da lugar al flujo de iones (esferas rojas) asociada a la apertura de un canal unitario (línea punteada). Después de la apertura el canal puede entrar en un estado inactivado (no conductor). La apertura y cierre del canal es un evento estocástico, donde la frecuencia con la que ocurre cada uno de ellos, se ve influenciada por la presencia o ausencia de un estímulo, como por ejemplo el cambio en el voltaje o la presencia de un ligando (Modificado de Ashcroft <sup>3</sup>).

Existe una gran variedad de canales iónicos, sin embargo, en esta tesis me centraré en hablar de una de las familias de canales que es de vital importancia para la sensación de una gran variedad de estímulos ambientales en los organismos. Estos son los receptores del potencial transitorio o TRP, por sus siglas en inglés.

### **1.1.-La familia de los canales TRP**

La historia de los canales TRP comienza en el año de 1969, cuando Cosens y Manning identificaron una mutante visual de *Drosophila melanogaster*, en cuyos fotorreceptores la respuesta a la luz decaía a la basal de 10 a 15 segundos durante periodos de iluminación prolongada. Después del decaimiento en la corriente, las moscas permanecían ciegas, requiriendo de al menos un minuto de oscuridad antes de recuperar la sensibilidad a la luz<sup>6</sup>. Debido a este fenotipo que fue caracterizado en el electroretinograma de la mosca, la mutante fue llamada “*transient receptor potential*” o *trp* dado que “el potencial del receptor era transitorio”. Posteriormente, en el año de 1982, Manning y Levy mapearon la posición del *locus* de *trp* en el tercer cromosoma del genoma de *Drosophila*<sup>7,8</sup>.

En el año de 1989, veinte años después del hallazgo de la mutante de *Drosophila*, Montell y Rubin reportaron que el gen *trp* codificaba para una proteína de 1275 aminoácidos<sup>9</sup>. En 1992, Hardie y Minke demostraron que en la mosca *trp* la relación de permeabilidad  $P_{Ca}/P_{Na}$  estaba reducida aproximadamente 10 veces, lo cual sugirió fuertemente que el gen *trp* codificaba para un canal que era permeable a  $Ca^{2+}$ . Fue en 1995 cuando la primera secuencia del homólogo humano de este gen fue reportado y se le llamó TRPC1. El gen *trpc1* mostró un 37% de identidad con el gen *trp* de *Drosophila*<sup>10</sup>.

Existen dos principales clases de canales permeables a  $Ca^{2+}$ : los conocidos como operados por voltaje y los operados por ligando<sup>8</sup>, donde los canales TRP se clasificaron como parientes distantes de los canales activados por voltaje<sup>10</sup>. Varios miembros de la familia de los canales TRP están directamente involucrados en la percepción sensorial, participando en la visión, gusto, olfato, audición, tacto, percepción térmica y nocicepción. Es un tema recurrente la idea de que los organismos multicelulares usan

vías dependientes de los canales TRP para detectar estímulos del ambiente que los rodea, y más a nivel celular, en el ambiente local en que se encuentran, los canales TRP permiten a las células responder a cambios en este microambiente. Algunos miembros de los canales TRP son termosensibles, ya que cambios en la temperatura son capaces de activar a estos canales. Esto se debe a que estas proteínas en particular, tienen un valor de Q10 (coeficiente de temperatura, que es el factor por el cual aumenta la velocidad de un proceso cuando la temperatura aumenta 10°C, es decir, si el valor de ese factor es de 1, la velocidad del proceso no cambia, pero si es de 2 se duplica y si es de 3 se triplica), arriba de 30, para la activación del canal, mientras que el valor de Q10 para otros canales iónicos es cercano a 2<sup>11</sup>.

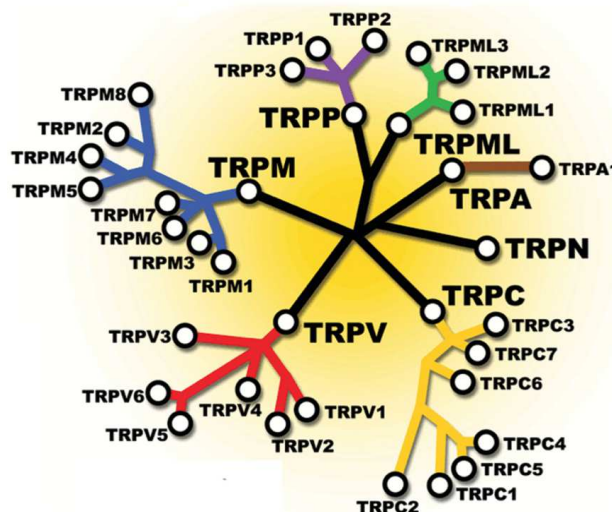
Así, el papel crucial que juegan los canales TRP como sensores en la fisiología celular, hace de ellos un atractivo e increíble blanco de estudio<sup>10</sup>. Esta superfamilia de canales catiónicos se encuentra conservada a través de cada metazoario que ha sido sujeto a análisis de secuencia<sup>12</sup>, encontrados así en invertebrados como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Apis mellifera*, y en vertebrados como *Danio rerio*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens*, sólo por mencionar algunos; también se pueden encontrar en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, e incluso en algas<sup>7,13,14</sup>. En 2007, Christensen y Corey realizaron una revisión en la que reportaron un total de 33 genes que codificaban para canales TRP en mamíferos, cerca de 60 en pez cebra, 30 en miembros de la clase Ascidiacea, 24 en nemátodos, 16 en *Drosophila* y 1 en levadura<sup>12</sup>.

En una revisión publicada en el 2009 por Latorre y colaboradores se menciona que, hasta el año de 2005, existía una lista de al menos 85 canales dentro de la superfamilia de los canales TRP (combinando los reportados para invertebrados y vertebrados), organizados por su similitud de secuencia en siete subfamilias (Fig. II): 1) TRPC es una subfamilia que agrupa canales que presentan un gran número de modos de activación. Algunos son activados por liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares y por estímulos mecánicos, mientras que otros son activados vía el receptor G<sub>q/11</sub> y activados por la producción de diacilglicerol o procesos redox. Los canales TRPC además controlan el crecimiento del cono axonal tanto en mamíferos como en modelos de anfibios. 2) TRPM, que contiene canales que tienen capacidad enzimática ya que su extremo carboxilo terminal contiene un dominio catalítico capaz de mostrar actividad de

proteína cinasa. Además, algunos de los miembros de esta subfamilia también juegan un papel muy importante en la detección de cambios en la temperatura. 3) TRPN, una subfamilia que tiene un único miembro encontrado en moscas, pez cebra y nemátodos, con un papel en la mecano transducción. 4) TRPA, otra familia que contiene sólo a un miembro, el TRPA1 el cual es activado por temperaturas frías en el grado nocivo y distintos compuestos químicos como el alilisotiocianato, que es el principal compuesto pungente del wasabi y del aceite de mostaza. 5) TRPML, que consiste de canales que parecen estar únicamente presentes en vesículas intracelulares y dos de sus miembros (TRPML1 y 2) han sido implicados en audición. 6) TRPP, que está formada por proteínas asociadas a la enfermedad del riñón poliquístico o policistinas. Los complejos heteroméricos de TRPP2-TRPP1 forman canales catiónicos no selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . 7) La subfamilia TRPV, que tiene miembros activados por temperatura y algunos de ellos están también involucrados en detectar cambios en la osmolaridad y estímulos mecánicos<sup>10</sup>.

En el extremo carboxilo terminal se encuentra la única región de secuencia conservada entre los canales TRPC, TRPM y TRPV, conocida como “TRP box” ó dominio TRP.

El dominio TRP se caracteriza por el motivo consenso (E/I/L/V/Y/F)-W-(K/R)-(F/A/L)-(A/Q)-(R/W/V), en donde W es el único residuo invariable y conservado entre estas subfamilias de canales TRP, en tanto que en la mayoría de los canales que presentan este dominio se encuentran aminoácidos cargados positivamente en las posiciones 3 y 6 del motivo<sup>10,15</sup>.



**Figura II. Filogenia de los canales TRP.** El árbol filogenético muestra la relación por homología de secuencia entre las 7 subfamilias de los canales TRP. Nótese que la subfamilia TRPN no se ha identificado en mamíferos y que el canal TRPC2 es un pseudogen en humanos, pero no en rata. (Modificado de Latorre, R. *et al.*<sup>10</sup>)

En la siguiente sección y a lo largo de esta tesis, me enfocaré en el canal TRPV1, el cual es el miembro más estudiado de la familia de los canales TRP y objeto de estudio en nuestro laboratorio.

## **1.2.-El canal TRPV1**

La subfamilia de los TRPV está comprendida por seis miembros (TRPV1-TRPV6). Fue en el año de 1997 cuando se clonó al primer miembro de esta subfamilia, el canal TRPV1, lo cual fue un evento significativo en el campo de estudio de la biología sensorial. El canal TRPV1 ha sido el miembro más estudiado de esta subfamilia en gran medida por las implicaciones que tiene en varios procesos fisiológicos y celulares, incluyendo de manera importante su capacidad para la detección de estímulos químicos y físicos nocivos y su participación en procesos de dolor, inflamación e isquemia<sup>16,17</sup>

### **1.2.1- Características generales y expresión del TRPV1**

El canal TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, el cual no discrimina entre cationes monovalentes, aunque exhibe una notable preferencia por cationes divalentes, presentando la siguiente secuencia de permeabilidad:  $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ \approx K^+ \approx Cs^+$ . Tiene una alta permeabilidad a iones calcio ( $P_{Ca}/P_{Na} = 9.60$  ;  $P_{Mg}/P_{Na} = 4.99$ ) y su relación corriente-voltaje muestra una prominente rectificación saliente<sup>18</sup>. En presencia de sodio como el único ion acarreador, el canal presenta una conductancia unitaria de 76.5 pS a potenciales positivos y de 35.4 pS a potenciales negativos<sup>18</sup>.

El TRPV1 es expresado en el sistema nervioso central y periférico. Se expresa prominentemente en ganglios sensoriales como el trigeminal y los de la raíz dorsal, principalmente en neuronas sensoriales primarias de diámetro pequeño y medio. El ganglio vagal (nodoso y yugular) es otro de los tejidos donde se expresa el TRPV1 y en las fibras C y A $\delta$  donde la activación del canal permite la elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular y la subsecuente liberación de neuropéptidos como sustancia P y del péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGPR)<sup>18-20</sup>. En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) se ha detectado la expresión de TRPV1 en retículo endoplásmico, donde su activación es capaz de inducir movilización de  $Ca^{2+}$  desde almacenes intracelulares<sup>21</sup>.

En el cerebro, el TRPV1 es expresado en neuronas hipotalámicas, cerebelo, estriado, bulbo olfatorio, en neuronas piramidales del hipocampo, en la amígdala central, en la habénula media y lateral, en el núcleo talámico paraventricular y centromedial, en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, en la formación reticular, en la oliva inferior y en la tercera y quinta láminas de la corteza parietal<sup>22,23</sup>. Se ha sugerido que en el cerebro, el canal TRPV1 participa en la termoregulación<sup>24</sup>.

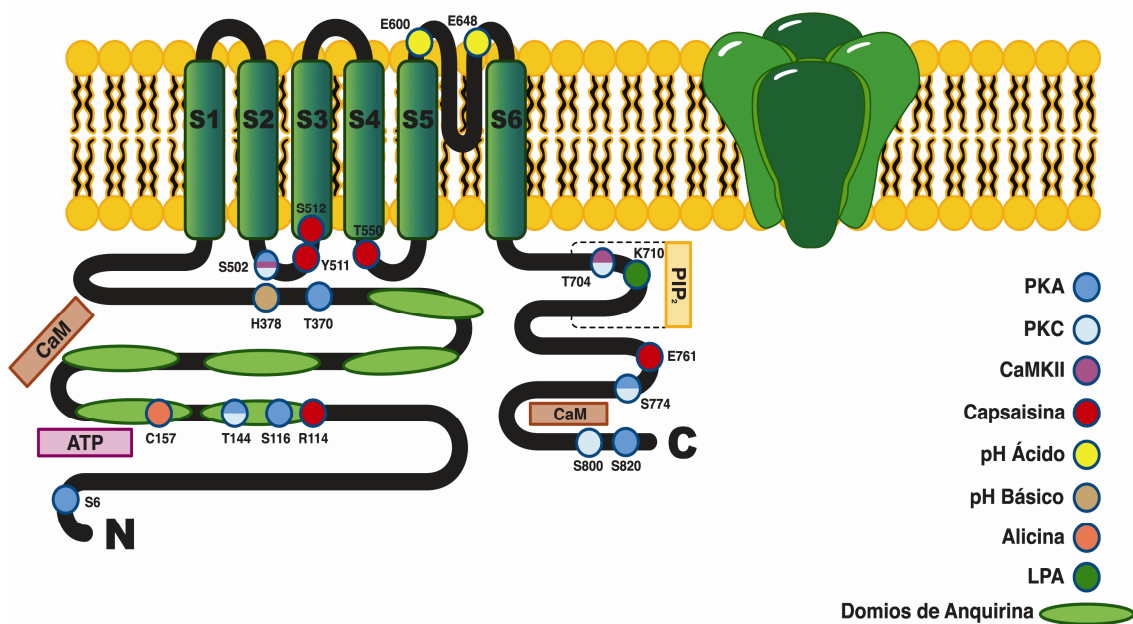
La distribución y expresión del canal TRPV1 va más allá de los tejidos del sistema nervioso central y periférico, ya que se ha confirmado su expresión en otros tejidos como el epitelio de la laringe funcionando como nociceptor, arterias mesentéricas y células endoteliales participando en el proceso de vasorelajación, en preadipocitos y tejido adiposo donde juega un papel en la adipogénesis, en queratinocitos epidermales funcionando como nociceptor químico, en el urotelio de la vejiga participando en la liberación de ATP evocada por cambios de volumen, en el epitelio y endotelio de la córnea participando en la sensación de temperatura y en la secreción de mediadores inflamatorios, en células mononucleares participando en la respuesta inflamatoria, en sinoviocitos jugando un papel en los cambios patológicos en la inflamación artrítica, en músculo liso de las arterias pulmonares y músculo liso vascular participando en vasoconstricción, en líneas celulares derivadas de células  $\beta$  pancreáticas incrementando la secreción de insulina, en células del músculo liso arteriolar provocando vasoconstricción, en el endotelio vascular nasal y glándulas submucosas estimulando la secreción epitelial<sup>24-38</sup>.

### **1.2.2.-Estructura del canal TRPV1**

En cuanto a su estructura, el canal TRPV1 está formado por seis segmentos transmembranales (S1-S6), donde el asa que conecta a los segmentos S5 y S6 forma el poro o vía de conducción iónica y contiene regiones amino y carboxilo intracelulares (Fig. III).

La región amino cuenta con seis dominios de unión a anquirina donde se localizan sitios de unión para ATP, CaM/Ca<sup>2+</sup> y para alicina, compuesto pungente encontrado en el ajo y la cebolla<sup>18,20,39,40</sup>. En la región carboxilo terminal se localiza el dominio TRP, formado por los residuos IWKLQR y contiene sitios de unión para CaM/Ca<sup>2+</sup>, PIP<sub>2</sub> y

LPA<sup>15,41</sup>. El TRPV1 forma preferencialmente homotetrámeros, pero también llega a formar heterotetrámeros, asociándose con el TRPV3 y con el TRPA1 en la membrana plasmática<sup>42-46</sup>. En la parte intracelular del canal se localizan dos constricciones que impiden el acceso de iones: una constricción en la región cercana al residuo L681 impide el acceso de iones del tamaño del 2-(trimetilamonio)etil metanotiosulfonato o MTSET (5.85Å) y otra constricción que representa la compuerta de activación del canal TRPV1 y se encuentra en la región aledaña al aminoácido Y671 que controla el flujo de iones permeables (~2Å)<sup>47</sup>.



**Figura III. Representación esquemática del canal TRPV1.** A la izquierda se muestra una subunidad del canal TRPV1 que está formada por 6 segmentos transmembranales (S1-S6), las regiones amino (N) y carboxilo (C) intracelulares, 6 dominios de unión a anquirina en la región N-terminal y el poro o vía de conducción iónica formada por el asa que conecta a los segmentos S5 y S6. En el esquema se marcan algunos de los sitios importantes para la interacción con activadores y moduladores del canal. A la derecha se muestra un esquema de la proteína tetramérica formada por subunidades como la que se muestra a la derecha y que da lugar al canal funcional (Modificado de Ho K.W. *et al.*<sup>20</sup>).

### 1.2.3.-Agonistas y moduladores del canal TRPV1

El canal TRPV1 es un canal polimodal, es decir que es capaz de responder ante una gran variedad de estímulos. Entre los agonistas del canal TRPV1 se encuentran compuestos presentes en algunas plantas como la capsaicina, el principal ingrediente pungente presente en los chiles del género *Capsicum*<sup>18</sup>, y la resiniferatoxina (RTX) que es un compuesto aislado de la planta *Euphorbia resinifera*<sup>48</sup>, la alicina presente en



plantas del género *Allium* como la cebolla y el ajo<sup>49</sup>, la piperina, la zingerona<sup>50</sup> y el alcanfor<sup>51</sup>. Otros agonistas del canal son endocannabinoides como la anandamida y la N-araquidonil dopamina (NADA)<sup>52</sup> así como los productos de las lipooxigenasas como el ácido 12-hidroperoxi-eicosatetraenoico(12-HPETE)<sup>53</sup>. El canal también puede ser activado por temperaturas en el grado nocivo  $>42\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>18</sup>, por pH ácido extracelular  $\leq 5.9$  y pH básico intracelular  $\geq 8$ <sup>54,55</sup>, por voltaje (aunque débilmente)<sup>56</sup>, por lípidos como el ácido lisofosfatídico<sup>41</sup> y por vanilotoxinas (VaTx1, VaTx2 y VaTx3) presentes en algunos venenos como el de la tarántula *Psalmopoeus cambridge* o el de la araña *Ornithoctonus huwena*<sup>57</sup>.

De la misma forma en la que el TRPV1 es activado por múltiples estímulos, este canal también es modulado por múltiples moléculas y vías de señalización. Algunas de estas moléculas y vías incluyen a las que se mencionan a continuación.

La CaMKII (cinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina) es capaz de fosforilar a los residuos S502 y T704, modulando positivamente la activación por compuestos de tipo vaniloide en el canal TRPV1<sup>58</sup>.

La fosforilación por PKC (Proteína cinasa C) juega un papel muy importante en la modulación de la función de TRPV1 ya que es capaz de sensibilizar al canal. Esta fosforilación no es capaz de activar al canal TRPV1 por sí sola<sup>59</sup>; sin embargo lo sensibiliza reduciendo el umbral de activación del canal por temperatura, ya que el canal puede activarse incluso a temperatura ambiente en ausencia de cualquier otro agonista<sup>60</sup>. El péptido pro inflamatorio bradiquinina, el ATP y la anandamida, logran inducir e incrementar respectivamente la actividad de TRPV1 de una forma dependiente de PKC $\epsilon$ <sup>60,61</sup>.

El ATP puede potenciar a TRPV1 a través de su acción en receptores metabotrópicos de ATP de una forma dependiente de la PKC en neuronas DRG<sup>62</sup>. Adicionalmente el ATP intracelular es capaz de sensibilizar y unirse directamente al canal, interactuando con residuos localizados en los dominios de unión a anquirina en el extremo N-terminal del canal, este sitio de interacción se traslapa con el sitio de unión a la CaM/ $\text{Ca}^{2+}$ <sup>39</sup>.

La activación del receptor TrkA por el factor de crecimiento neuronal (NGF), provoca la fosforilación en un residuo de tirosina (Y200) del canal, lo que conlleva la sensibilización del canal TRPV1<sup>61</sup>. Mediadores inflamatorios de tipo lipídico tales como las prostaglandinas E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> respectivamente) juegan un papel importante en la sensación de dolor e hiperalgesia y además modulan positivamente a TRPV1<sup>63</sup>.

Existen otros lípidos que pueden modular la actividad de TRPV1. Uno de ellos es el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), el cual se une a la región proximal del C-terminal del canal y es necesario para que el canal pueda ser activado por capsaicina<sup>15</sup>.

#### **1.2.4.-Desensibilización del canal TRPV1**

Una característica del canal TRPV1 es que presenta dos tipos de desensibilización, la desensibilización aguda dependiente de Ca<sup>2+</sup> y la taquifilaxis. La primera se caracteriza por una rápida pérdida de la función del canal aún en presencia del agonista; esto se debe a la calmodulina (CaM) que actúa como un sensor de Ca<sup>2+</sup> para el canal y provoca un decremento en su actividad en respuesta a un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, llevándolo a un estado cerrado<sup>16,40</sup>. La segunda se refiere a la pérdida o disminución gradual de la función del canal en respuesta a estimulaciones repetidas con agonista<sup>64</sup>. Se ha reportado que la exposición prolongada de TRPV1 a agonistas induce endocitosis y degradación lisosomal del canal TRPV1 en neuronas sensoriales y en sistemas de expresión heteróloga<sup>65</sup>.

Este tipo de respuestas de desensibilización permiten que el sistema en el cual se expresa el canal pueda regular su actividad ya que, por ejemplo, un influjo continuo de Ca<sup>2+</sup> a la célula por medio de este canal podría llevar a la muerte de la célula. Más aún, como se menciona a continuación, el TRPV1 se encuentra relacionado a diversos procesos dolorosos, y la desensibilización es un mecanismo que también permite terminar con el dolor producido por la activación de este canal.

#### **1.2.5.-El papel de TRPV1 en el dolor e inflamación.**

Varios miembros de la familia de los canales TRP, entre los que se encuentra TRPV1, contribuyen de manera importante a la génesis de la señalización del dolor inflamatorio a través de mecanismos periféricos (sensibilización periférica) y a través de mecanismos

en la médula espinal (sensibilización central)<sup>66</sup>. Así, el TRPV1 tiene un papel central en la iniciación de la respuesta inflamatoria neurogénica y en la transducción del dolor, ya que, como se ha mencionado anteriormente, este canal se distribuye en sitios donde se liberan neuropéptidos pro-inflamatorios que pueden iniciar una cascada bioquímica que conlleva procesos de inflamación y de dolor neuropático. Siendo el canal TRPV1 un canal polimodal, es capaz de funcionar también como un integrador molecular de varios mediadores inflamatorios.

Las neuronas de ratones TRPV1<sup>-/-</sup> pierden la capacidad de responder a capsaicina, pH ácido y temperaturas elevadas y los ratones “knockout” de TRPV1 dejan de presentar comportamiento doloroso inducido por vaniloides y tampoco presentan hiperalgesia termal bajo condiciones de inflamación o daño. Sin embargo, siguen exhibiendo una respuesta normal a estímulos mecánicos nocivos y a estímulos termales nocivos. Lo anterior deja en claro que el TRPV1 es requerido para la sensibilización inflamatoria a estímulos termales nocivos; sin embargo también muestra que existen mecanismos alternativos que son suficientes para la sensación normal de temperaturas elevadas nocivas<sup>67,68</sup>.

Debido al papel que juega TRPV1 en los procesos que se han mencionado, no es de extrañar que la búsqueda de antagonistas de TRPV1 sea de gran interés, ya que representa una nueva estrategia para mitigar el dolor, ya que a diferencia de los analgésicos tradicionales que bloquean la respuesta inflamatoria, la propagación y transmisión del dolor, los antagonistas de TRPV1 pueden prevenir el dolor al inhibir este importante transductor de estímulos nocivos en diversos tipos celulares<sup>69</sup>.

## **2.-Planteamiento del problema**

Como ya se mencionó anteriormente, el canal TRPV1 es una proteína polimodal cuya actividad es modulada por varios tipos de moléculas entre las cuales se encuentran algunos tipos de lípidos. Dado que las membranas biológicas son complejos moleculares, formados por una diversa variedad de lípidos que forman una bicapa, no es de extrañar que el ambiente lipídico de estas estructuras no sólo confieran un ambiente ideal para la correcta función de un diverso número de proteínas de membrana<sup>70,71</sup>, sino

que es enteramente posible que afecten la función de las proteínas que se encuentran embebidas por medio de interacciones específicas de los lípidos con los aminoácidos de las proteínas o por efectos relacionados a las propiedades físicas de las membranas como son la curvatura y la rigidez<sup>71</sup>.

La bicapa lipídica que forma las membranas celulares está en su mayoría compuesta de fosfolípidos, que se orientan con los grupos polares que conforman su cabeza hidrofílica viendo hacia el medio acuoso, en tanto que sus cadenas alifáticas forman un núcleo hidrofóbico al interior de la membrana<sup>70</sup>, lo cual permite que estos lípidos sean importantes moduladores de la estructura y función de las proteínas que se encuentran embebidas o asociadas a la membrana plasmática.

Otra molécula lipídica que se encuentra en la membrana plasmática y que actualmente se sabe que interactúa directamente con numerosas proteínas es el colesterol<sup>72</sup>. El colesterol es uno de los principales componentes de las membranas celulares de los mamíferos, que juega un papel crucial en la organización, dinámica y función de la membrana y las proteínas que hay en ella. El colesterol representa cerca del 30-40% de los lípidos celulares totales, distribuido desigualmente entre las membranas celulares, siendo la membrana plasmática más rica en colesterol comparada con las otras membranas celulares<sup>72</sup>.

El colesterol es una molécula predominantemente hidrofóbica, que puede ser dividida estructuralmente en tres partes: el grupo 3 $\beta$  hidroxilo, un esqueleto rígido de anillos esteroides y una cadena alquil flexible. El grupo 3 $\beta$  hidroxilo provee al colesterol su carácter anfifílico que le ayuda a orientarse, anclarse a la membrana y a permanecer próximo al enlace éster de los fosfolípidos. La base del esqueleto hidrocarbonado del colesterol y de otros esteroides encontrados en los eucariotas es el esterano, el cual es resistente a ataques microbianos y altamente estable por largos periodos de tiempo (Fig IV) . La ausencia de grupos polares en los anillos que conforman este esqueleto facilita el contacto entre el núcleo esteroide y las cadenas de los fosfolípidos<sup>71</sup>. Así, el colesterol está orientado en la bicapa en un eje perpendicular al plano de la membrana<sup>70</sup>.

Como resultado de su estructura rígida, el colesterol decrece la movilidad de las cadenas de acil de los fosfolípidos lo cual a su vez tiene efectos en las propiedades mecánicas de

la bicapa lipídica tales como la fluidez, curvatura y elasticidad, lo que puede proveer una explicación de los efectos del colesterol en la función de algunas de las proteínas de membrana.

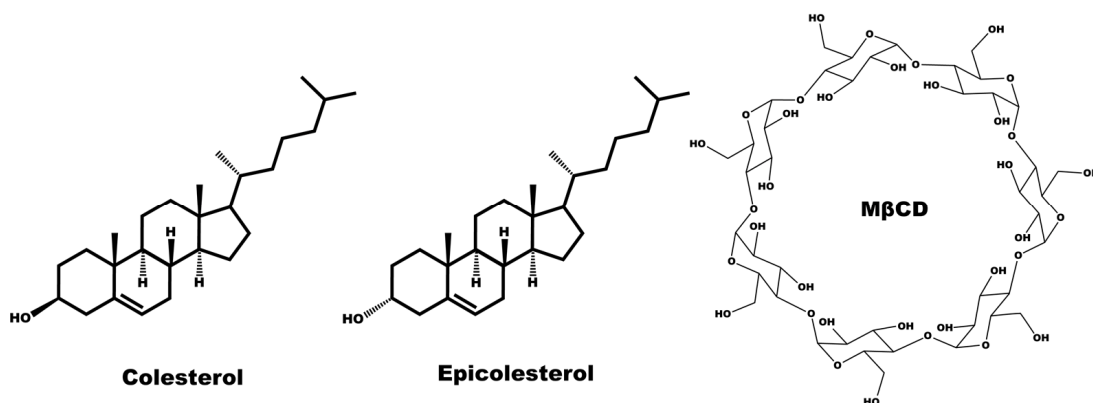
De las características expuestas arriba se derivan, por lo menos, dos posibilidades que podrían afectar la función de algunos canales iónicos: el colesterol puede interactuar directamente con dominios transmembranales de los canales iónicos o bien puede funcionar por medio de una vía indirecta a través de la alteración de las propiedades físicas de la membrana y/o por la asociación de los canales iónicos con dominios de membrana ricos en colesterol, comúnmente llamados balsas lipídicas<sup>71,73</sup>.

El papel regulador del colesterol en los diferentes tipos de canales iónicos es altamente heterogéneo. El efecto más común es el decremento en la actividad del canal que puede incluir un decremento en la probabilidad de apertura, conductancia unitaria y/o el número de canales activos en la membrana. Este efecto ha sido observado en algunos tipos de canales de  $K^+$ , canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  operados por voltaje y en canales aniónicos regulados por volumen al adicionar colesterol de la membrana plasmática<sup>73-76</sup>. Sin embargo, se ha observado también que varios tipos de canales iónicos tales como los canales epiteliales de  $Na^+$  (eNaC) y algunos miembros de la familia de los TRP tales como TRPC1, TRPC4, TRPC5 son inhibidos por la remoción de colesterol de la membrana. Otro caso es el del TRPM8 que ha sido localizado dentro de balsas lipídicas y donde se ha visto que las respuestas mediadas por mentol o por temperatura son incrementadas cuando el canal se encuentra fuera de estas balsas<sup>73</sup>.

Dado que moléculas de carácter lipídico (LPA,  $PIP_2$ , prostaglandinas, ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6 y las resolvinas)<sup>15,41,63,66,77,78</sup> activan y modulan al canal TRPV1, era probable que otros lípidos como el colesterol también pudieran influenciar la actividad de TRPV1. De hecho, Liu *et al.* han mostrado que el colesterol es necesario para la correcta función del canal TRPV1<sup>79</sup>. Mediante registros hechos con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp) en la configuración de célula completa, estos autores encontraron que las corrientes inducidas por capsaicina en células DRG son reducidas por el tratamiento con el quelante de colesterol, metil-beta-ciclodextrina (M $\beta$ CD) (Fig. IV). Sin embargo, los autores de este trabajo también señalaron que el tratamiento con M $\beta$ CD modifica el tráfico de colesterol a la membrana

plasmática, por lo cual no pudieron discernir si el efecto del colesterol sobre las corrientes del TRPV1 era debido a cambios en el número de canales que alcanzaban la membrana<sup>79</sup>.

Por estas razones fue del interés de nuestro laboratorio enfocarnos a estudiar y determinar los efectos que el colesterol pudiera tener sobre la función del canal TRPV1. Los estudios que aquí se muestran se llevaron a cabo usando la técnica de patch-clamp en su configuración de parche de membrana escindido para poder aislar al canal del complejo ambiente celular que lo rodea y así estudiar interacciones específicas lípido-proteína y determinar con detalle cómo el canal TRPV1 es regulado por el colesterol.



**Figura IV. Estructuras del colesterol, epicolesterol y la MβCD.** Se esquematiza la estructura del colesterol (izquierda), la cual es similar a la su análogo quiral, el epicolesterol (centro) que varían en la orientación del grupo –OH en la posición 3 y que fue usado en este estudio debido a que esta molécula tiene efectos similares al colesterol sobre las propiedades físicas de la membrana plasmática. También se esquematiza la estructura de la metil-beta-ciclodextrina (derecha), un oligosacárido cíclico, que se usó como agente quelante de colesterol de las membranas plasmáticas y también como vehículo para incrementar los niveles de colesterol en las membranas en este estudio, mediante la formación de complejos MβCD:Colesterol.

### **3.-Hipótesis**

El colesterol afecta la actividad del canal TRPV1 a través de una interacción directa con la proteína y no a través de un efecto sobre la membrana plasmática, ni por un mecanismo que involucra el tráfico celular.

### **4.-Objetivo general**

Elucidar los mecanismos por medio de los cuales el colesterol afecta la actividad del canal TRPV1.

### **5.-Objetivos particulares**

- 1) Caracterizar los efectos del colesterol sobre la función del canal TRPV1 en parches escindidos de membrana.
- 2) Determinar si el colesterol interactúa con una región específica del canal TRPV1.
- 3) Establecer las determinantes estructurales de la interacción del colesterol con el TRPV1.

## 6.-Métodos

### 6.1.-Reactivos

Colesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), epicolesterol (Steraloids Inc., Newport, RI), M $\beta$ CD (Sigma-Aldrich). Todos los reactivos fueron almacenados siguiendo las indicaciones del proveedor.

### 6.2.-Mutagénesis dirigida

Se identificaron las regiones de interés y se diseñaron oligonucleótidos para introducir las mutaciones correspondientes por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la secuencia de ADN silvestre del rTRPV1 y hTRPV1, así como un sitio de restricción nuevo y específico (Tabla I).

Tabla I	
Mutante	Oligonucleótidos
R575Q	DIR-ATGATCCTCCAAGACCTGTGC COM-GCACAGGTCTTGGAGGATCAT
R575D	DIR-GAGAAGATGATTCTAGACGACCTGTGCCGGTTTATGTTTCGTC COM-GACGAACATAAACC GG CACAGGTCGTCTAGAATCATCTTCTC
R579Q	DIR-CTCAGAGATCTGTGCCAGTTTATGTTTCGTC COM-GACGAACATAAACTGGCACAGATCTCTGAG
R579D	DIR-GAGAAGATGATCCTCAGGGACCTGTGCGACTTTATGTTTCGTCCTACCTCGTG COM-CACGAGGTAGACGAACATAAAGTCGCACAGGTCCTGAGGATCATCTTCTC
F582Q	DIR-AAGATGATCCTACGTGACCTGTGCCGGTTTATGCAGGTCCTACCTCGTGTTCTTG COM-CAAGAACACGAGGTAGACCTGCATAAACC GG CACAGGTCACGTAGGATCATCTT
L585I	DIR-GATGATCCTCAGGGACCTGTGCCGGTTTATGTTTCGTCCTACATCGTGTCTTGTGGATTTCCACAGC COM-GCTGTGGAAAATCCAAACAAGAACACGATGTAGACGAACATAAACC GG CACAGGTCCTGAGGATCATC
F589Q	DIR-GTCTACCTCGTGTTCTTGGCAGGGATTTTCCACCGCGGTGGTGACACTG COM-CAGTGTCAACACCGCGGTGGAAAATCCCTGCAAGAACACGAGGTAGAC
F589A	DIR-GTCTACCTCGTGTTCTTGGCTGGATTTTCCACCGCGGTGGTGACACTG COM-CAGTGTCAACACCGCGGTGGAAAATCCAGCCAAGAACACGAGGTAGAC



Posteriormente, se llevó a cabo una segunda PCR usando otro par de oligonucleótidos para amplificar la secuencia de ADN en donde ya había sido insertada la mutación de interés junto con el nuevo sitio de restricción. El sitio de restricción nuevo fue utilizado para identificar a la secuencia de ADN modificada una vez que ésta fue introducida en un vector para expresión en células de mamífero (pcDNA3) por medio de una reacción de ligación y de que se replicara el ADN en bacterias. Finalmente, la presencia de la mutación insertada se confirmó también con la secuenciación del ADN.

### **6.3.-Cultivo celular**

Los experimentos para determinar los efectos del colesterol y epicolesterol sobre el TRPV1 fueron realizados en un modelo de expresión heteróloga, las células HEK293.

Los protocolos usados para el cultivo de células HEK293 se describen a continuación. Las células HEK293 fueron cultivadas en cajas p100 con 10 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de glutamina y 0.5% de penicilina-estreptomicina. Posteriormente se sembraron  $0.75-1.5 \times 10^5$  células sobre cubreobjetos de vidrio previamente cubiertos con poli-D-lisina (1mg/ml, Sigma-Aldrich) en cajas pequeñas con 2 ml de medio y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas antes de ser transfectadas.

### **6.4.-Transfección transitoria**

Las células HEK293 fueron cotransfectadas con 800 ng de ADN que codifica para el canal TRPV1 silvestre (WT) de rata o humano (rTRPV1.pcDNA3 o hTRPV1 pcDNA3) según fuese el caso, o con las distintas mutantes de este, junto con 800 ng de un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), para identificar a aquellas células que fueron transfectadas exitosamente. La transfección se realizó utilizando lipofectamina (Invitrogen) o JetPEI (PolyPlus).

El procedimiento usado para la transfección con lipofectamina fue el siguiente:

- 1.-El día de la transfección se removió el medio de las células y se remplazo con 0.8 ml de DMEM sin suero y libre de antibiótico.

2.-Para cada caja de células que fue transfectada, se mezclaron 800ng de DNA que codifica para TRPV1 o las diferentes mutantes y 800ng del DNA que codifica para la GFP en 100  $\mu$ l de DMEM sin suero y libre de antibiótico en un tubo Eppendorf de 1.5ml (a) y en otro tubo (b) se mezcló 0.5 $\mu$ l de lipofectamina en 100 $\mu$ l de DMEM sin suero y libre de antibiótico. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mezclaron suavemente el tubo a y el tubo b y se incubaron por 15-20 minutos a 37°C para formar los complejos DNA-Lipofectamina

3.-Después de los 15-20 minutos de incubación se adicionaron los 200 $\mu$ l del complejo DNA-Lipofectamina a cada caja de células con 0.8 ml de DMEM con suero y libre de antibiótico y se mezcló suavemente. Se incubaron las células a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> por 6 horas.

4.-Después de las 6 horas, se cambió el medio por DMEM con suero y antibiótico. Se incubaron las células por 24-48 horas.

Para la transfección con JetPEI el procedimiento fue el siguiente:

1.- El día de la transfección se removió el medio de las células y se reemplazó con 1.8 ml de DMEM con suero y antibiótico.

2.- Para cada caja de células que fue transfectada, se mezclaron 800ng de DNA que codifica para TRPV1 o las diferentes mutantes y 800ng del DNA que codifica para la GFP y se diluyeron en un volumen total de 100 $\mu$ l de 150mM de NaCl estéril en un tubo Eppendorf de 1.5ml (a) y en otro tubo (b) se mezcló 6 $\mu$ l de JetPEI en 94 $\mu$ l de 150mM de NaCl estéril para un volumen total de 100  $\mu$ l. Ambos tubos a y b se mezclaron en vortex por 10 segundos.

3.-Se tomó el contenido del tubo b que contiene JetPEI y se agregó al tubo a y se mezcló por vortex por 15 segundos. Se incubó la mezcla por 20-30 minutos a temperatura ambiente.

4.-Después de los 20-30 minutos de incubación de la mezcla, se adicionaron los 200 $\mu$ l del complejo DNA-JetPEI a cada caja de células con 1.8 ml de DMEM con suero y antibiótico y se mezcló suavemente. Se incubaron las células a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>.

5.-Las células fueron utilizadas de 24-48 horas después de la transfección para la realización de registros electrofisiológicos.

### 6.5.-Preparación de la solución de M $\beta$ CD:Colesterol (10:1)

La solución de M $\beta$ CD:Colesterol (10:1) se realizó basándose en el protocolo establecido por Christian *et al.* (1997)<sup>80</sup>, el cual consiste en los siguientes pasos:

- 1.-Preparar una solución que contenga 2.5 mM de M $\beta$ CD, mediante la disolución de 334.5 mg de M $\beta$ CD en 100 ml de solución de registro y burbujear con nitrógeno por al menos 10 minutos.
- 2.-Preparar una solución madre de 50 mg/ml de colesterol en una mezcla de cloroformo: metanol (1:1).
- 3.-Tomar 160  $\mu$ l de la solución madre de colesterol y colocarla en un tubo Falcon de 15 ml.
- 4.-Evaporar el solvente mediante un ligero flujo de nitrógeno, de tal forma que el colesterol quede impregnado en las paredes del tubo hasta que desaparezca todo el solvente.
- 5.-Colocar 10 ml de la solución 2.5 mM de M $\beta$ CD al tubo Falcon que contiene colesterol y sonicar hasta que el colesterol quede disuelto y totalmente desprendido de las paredes del tubo (aprox. 10-15 min).
- 6.-Agregar el colesterol disuelto en el tubo Falcon a la solución de M $\beta$ CD conservando los 100 ml de volumen.
- 7.-Incubar la solución de M $\beta$ CD: colesterol a 37°C en agitación toda la noche.

La solución madre de colesterol debe ser almacenado en un desecador a -20°C y la M $\beta$ CD en desecador a temperatura ambiente. El protocolo para la preparación de la solución que contenía M $\beta$ CD:Epicolesterol (10:1) fue el mismo que para la preparación de la solución de M $\beta$ CD:Colesterol (10:1).

Para todos los experimentos la concentración final de M $\beta$ CD fue de 3.34 mg/ml y la concentración final de colesterol y epicolesterol fue de 0.08 mg/ml.

## 6.6.-Registros Electrofisiológicos

Los registros se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp), en la configuración “inside-out” y “outside-out”, por lo cual los diferentes químicos fueron aplicados en la cara intracelular del canal que se encuentra expuesta a las soluciones del baño o en la cara extracelular de la membrana respectivamente y se midieron los efectos de incubación de los parches a distintos tiempos en presencia de diferentes químicos sobre la amplitud de la corriente máxima generada por 4  $\mu\text{M}$  de capsaicina.

Se usaron soluciones isométricas bajas en iones divalentes compuestas de: NaCl 130 mM, HEPES 3 mM (pH 7.2) y EDTA 1 mM, ajustado a pH 7.2 con NaOH. Los parches de membrana de células HEK293 fueron expuestos durante 60-120 minutos a alguna de las siguientes soluciones dependiendo del experimento: una solución de M $\beta$ CD disuelta en solución de registro con una concentración final de 3.3mg/ml, otra solución de M $\beta$ CD: epicolesterol (10:1) y una de M $\beta$ CD: colesterol (10:1), las cuales fueron preparadas de acuerdo al protocolo seguido por Christian *et al.* descrito en la sección anterior.

Para la construcción de curvas corriente a voltaje (I-V), se usaron pulsos de voltaje de 100 ms de duración para despolarizar desde -120 mV a 120 mV, con incrementos de 10 mV entre cada pulso y un potencial de mantenimiento de 0 mV.

Para construir curvas dosis-respuesta se aplicaron concentraciones crecientes de capsaicina de 10 nM a 4  $\mu\text{M}$ . Los datos se normalizaron a la corriente máxima obtenida con capsaicina 4  $\mu\text{M}$  para obtener la fracción total de corriente activada. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a la ecuación de Hill:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \left( \frac{[cap]}{[cap] + K_{1/2}} \right)^{n_H} \quad (\text{Eq.1})$$

Para así obtener la constante de disociación aparente ( $K_{1/2}$  ó  $K_D$ ), la cual es una medida de afinidad del canal por el agonista, y el coeficiente de Hill (n), el cual nos dice el número aproximado de moléculas requeridas para activar al canal.

Se usaron pipetas de vidrio de borosilicato con una resistencia de entre 3 y 11 M $\Omega$  dependiendo del nivel de expresión de nuestro canal en las células que se registraron. Las corrientes fueron filtradas a 2 kHz y muestreadas a 10 kHz con un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik), las gráficas y trazos mostrados en este trabajo fueron analizadas con Igor Pro 6.22A (Wavemetrics Inc.).

### **6.7.-Registro de canales únicos**

Los experimentos de canales únicos, fueron llevados a cabo en la configuración inside-out, a temperatura ambiente en parches de membrana de células HEK293. Se usaron pipetas con una resistencia de 20-30M $\Omega$  y se registraron células transfectadas entre 18-24 horas antes de comenzar el registro. Las corrientes fueron filtradas a 2 kHz y muestreadas a 5 kHz.

Se obtuvieron de 30 a 50 pulsos, cada uno de ellos con una duración de 500 ms a 60 mV cada 200 ms, en presencia de capsaicina antes y después de la incubación con M $\beta$ CD: colesterol.

### **6.8.-Registros con Temperatura y Voltaje**

Para la activación con temperatura se usó una cámara de registro con control de temperatura, Bipolar Temperature Controller TC-202, Medical Systems Corp, Greenvale, NY, con la cual se elevó la temperatura del baño a 52°C, en donde se tomó un registro inicial de la activación del canal, para después reducir la temperatura del baño a 24°C aproximadamente y después incubar el parche de membrana durante 60 minutos con M $\beta$ CD: colesterol; al termino del tratamiento se volvió a elevar la temperatura a 52°C y se midió una vez más la corriente activada.

Para los registros de activación por voltaje se usó la solución de registro previamente descrita, aumentando la fuerza iónica elevando la concentración de NaCl a 200mM, HEPES 3 mM (pH 7.2) y EDTA 1 mM, ajustado a pH 7.2 con NaOH. Para la construcción de curvas I-V, se usaron pulsos de voltaje de 50ms de duración para despolarizar desde -120mV a 200mV, con incrementos de 20mV entre cada pulso y un potencial de mantenimiento de 0mV.

## 6.9.-Análisis de ruido

Para determinar el valor de la probabilidad de apertura ( $P_o$ ), el número de canales en el parche ( $N$ ) y la corriente unitaria ( $i$ ), se realizó análisis de ruido estacionario de corrientes macroscópicas activadas por capsaicina a un voltaje de 100mV. Para cada parche, la media ( $I$ ) y la varianza ( $\delta^2$ ) fueron determinadas a partir de 50-80 trazos de corriente usando el algoritmo de Heinemann y Conti<sup>81</sup>. Los trazos fueron registrados al incrementar gradualmente las concentraciones de capsaicina a partir de 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 4  $\mu$ M con lo cual la probabilidad de apertura fue cambiando al variar la concentración de capsaicina antes y después de la incubación con M $\beta$ CD: colesterol.

Los valores graficados de media versus varianza fueron ajustados a la función:

$$\delta^2 = iI - \frac{I}{N} \quad (\text{Eq.2})$$

La probabilidad de apertura fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$P_o = \frac{I}{iN} \quad (\text{Eq.3})$$

## 6.10.-Análisis estadístico

La comparación estadística fue hecha con un análisis de varianza, donde una  $p < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa. Todos los datos son mostrados como la media  $\pm$  el error estándar.

## 7.-Resultados

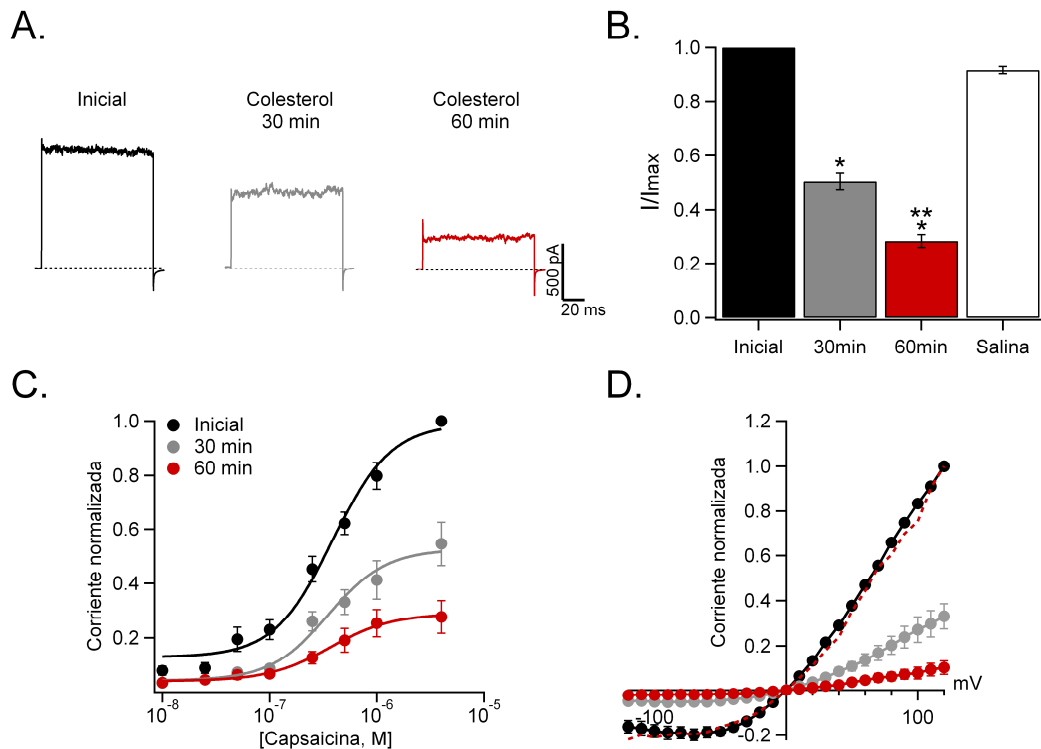
El objetivo original de esta tesis fue el de estudiar los efectos del colesterol sobre la función del canal TRPV1, mismos que se describen en esta sección y que se encuentran ya publicados en el artículo incluido en el apéndice 1 y cuya cita es: Picazo-Juárez G, Romero-Suárez S, Nieto-Posadas A, Llorente I, Jara-Oseguera A, Briggs M, McIntosh TJ, Simon SA, Ladrón-de-Guevara E, Islas LD, Rosenbaum T. “Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel”. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 24966–76 (2011).

### 7.1.-El colesterol reduce de forma reversible las corrientes del canal rTRPV1

Como una primera aproximación para determinar los efectos del colesterol sobre el canal rTRPV1 se realizaron experimentos en parches escindidos de membrana de células HEK293 que contienen al canal rTRPV1 expresado heterológamente. Para identificar la presencia del canal TRPV1 en parches de membrana en la configuración inside-out, se aplicó una concentración saturante de capsaicina (4 $\mu$ M), y posteriormente se expuso el parche a la solución de M $\beta$ CD:Colesterol durante 60 minutos, lo cual produjo una reducción de las corrientes macroscópicas generadas por capsaicina (Fig. 1A-B). Esta reducción no se asocia a la duración del experimento, ya que la exposición de parches de membrana a solución salina durante 120 minutos no causa por sí sola una reducción de las corrientes generadas por capsaicina (Fig.1B).

La reducción de las corrientes evocadas por capsaicina podría deberse a que el colesterol modificara la afinidad de la capsaicina por el canal. Debido a esto se realizaron curvas dosis respuesta a capsaicina antes y después de aumentar los niveles de colesterol mediante la exposición del parche de membrana a la solución de M $\beta$ CD:Colesterol. Los resultados obtenidos muestran que no parece haber cambios aparentes en la  $K_D$ , ni en la pendiente (n) (Fig. 1C), ya que si todas las curvas son normalizadas al valor máximo se superponen perfectamente, indicando que la disminución de la magnitud de la corriente no conlleva un cambio en la afinidad por el agonista. De igual forma las curvas I-V obtenidas muestran que la característica de rectificador saliente del canal TRPV1 no se modifica después de 60 minutos de

exposición de los parches de membrana a M $\beta$ CD:Coolesterol, ya que si las curvas I-V también son normalizadas al valor máximo inicial, éstas se superponen, indicando que esta característica intrínseca del canal permanece sin cambios (Fig. 1D).

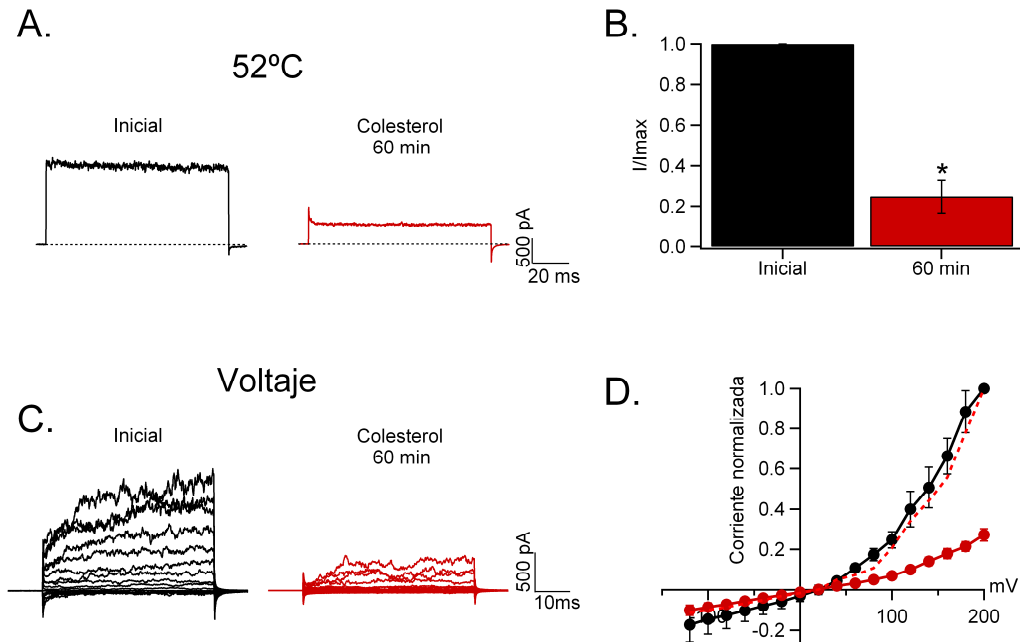


**Figura 1.- El colesterol causa la reducción de corrientes macroscópicas evocadas por capsaicina del canal rTRPV1.** **A)** Trazos representativos de corrientes a 120mV. Corriente inicial evocada por 4 $\mu$ M de capsaicina, antes del tratamiento con M $\beta$ CD:Coolesterol (negro) y a los 30 (gris) y 60 minutos (rojo) después de la exposición al tratamiento. **B)** Promedio de la fracción de corriente activada por 4  $\mu$ M de capsaicina a 120mV después de 30 (gris;  $0.50 \pm 0.03$ , N=38) y 60 minutos (rojo;  $0.28 \pm 0.02$ , N=31) de exposición del parche de membrana al tratamiento con M $\beta$ CD:Coolesterol y 120 minutos (blanco;  $0.92 \pm 0.01$ , N=5) de exposición a solución salina, normalizadas con respecto a la activación inicial (Negro;  $1 \pm 0$  N=38). **C)** Curva dosis respuesta a capsaicina normalizada respecto a la corriente inicial obtenida a 120mV antes (negro;  $K_D=317 \pm 33.3$  nM y pendiente  $n= 1.6 \pm 0.05$ ) y después de 30 (gris;  $K_D=349 \pm 35$  nM y pendiente  $n=1.5 \pm 0.1$ ) y 60 minutos (rojo;  $K_D=323 \pm 23$  nM y una  $n=1.5 \pm 0.3$ ) de exposición a M $\beta$ CD:Coolesterol. Las líneas representan el ajuste de los datos a una ecuación de Hill y se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (N=5 para todos los tiempos). **D)** Curvas corriente-voltaje (I-V) obtenidas en presencia de 4  $\mu$ M de capsaicina a diferentes tiempos de incubación con M $\beta$ CD:Coolesterol: inicial (negro), 30 (gris) y 60 minutos (rojo). La línea punteada (rojo) representa la normalización de los datos obtenidos a los 60 minutos respecto al valor máximo inicial. \* denota una diferencia significativa entre la fracción inicial y los 30 minutos ( $p<0.01$ ) y \*\* denota diferencia significativa entre 30 y 60 minutos ( $p<0.01$ ) obtenidas por medio de una prueba de ANOVA.

El TRPV1 es un canal polimodal, esto nos hizo preguntarnos si el colesterol también era capaz de causar una reducción de las corrientes del canal evocadas por otros estímulos



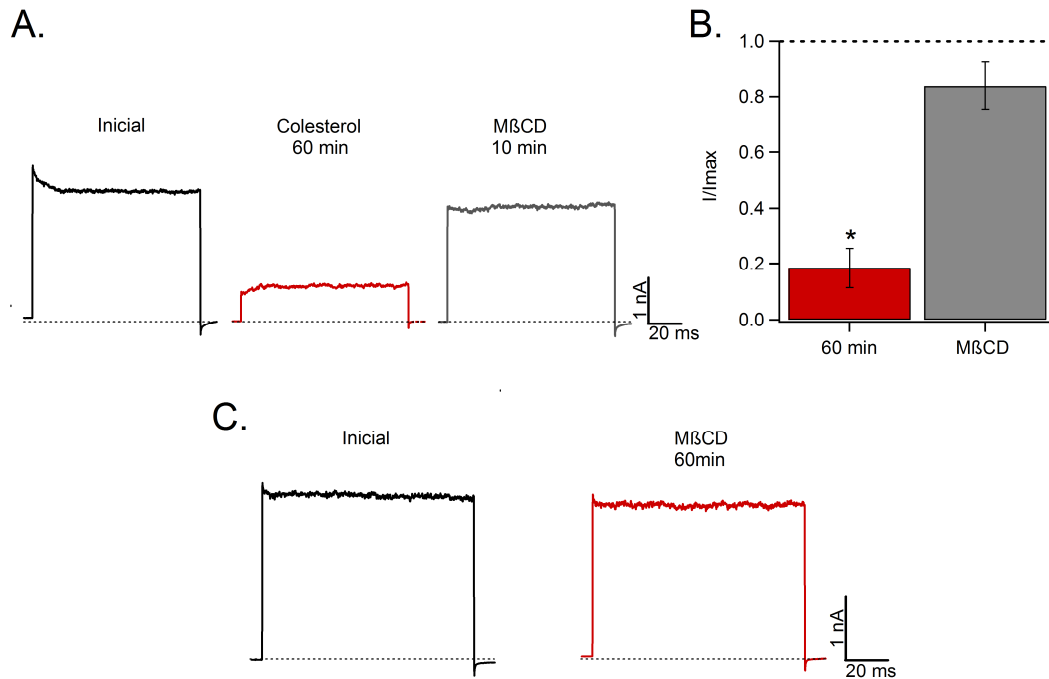
tales como la temperatura y el voltaje. Experimentos activando el canal tanto a 52°C como con voltaje antes y después de 60 minutos de tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol, muestran que el colesterol también reduce las corrientes del canal generadas por estos estímulos (Fig.2 A-D).



**Figura 2.- El colesterol causa la reducción de corrientes evocadas por temperatura y voltaje.** **A)** Trazos representativos de corrientes a 120mV. Corriente inicial evocada a 52°C de temperatura, antes del tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol (negro) y a 60 minutos después de la exposición al tratamiento (rojo). **B)** Promedio de la fracción de corriente activada a 52°C con un pulso de 120mV, en la en la configuración inside-out después de 60 minutos de exposición del parche de membrana a M $\beta$ CD:Colesterol (rojo;  $0.25 \pm 0.08$ , N=5). **C)** Familias de corrientes representativas evocadas por voltaje, antes (negro) y después de 60 minutos de tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol (rojo) . **D)** Curva corriente voltaje (IV) promedio obtenida a diferentes tiempos: inicial (negro) y 60 minutos (rojo). La línea punteada (rojo) representa la normalización de los datos obtenidos a los 60 minutos respecto al valor máximo inicial. \* denota una diferencia significativa entre la fracción inicial y los 60 minutos ( $p < 0.01$ ) obtenidas por medio de una prueba de ANOVA.

Una vez que se estableció que el colesterol puede reducir las corrientes del canal generadas por varios estímulos, se generó la pregunta de si este efecto del colesterol es reversible, por lo cual se realizaron experimentos donde primero se causó la reducción de las corrientes evocadas por capsaicina del canal rTRPV1 por tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol durante 60 minutos y posteriormente se expuso el mismo parche de membrana a 1mM de M $\beta$ CD entre 10 -30 minutos. Los resultados obtenidos muestran que las corrientes reducidas por colesterol se pueden recuperar significativamente por tratamiento con el quelante de colesterol (Fig.3A-B). Cabe destacar que la exposición de

parches de membrana únicamente a 1mM de M $\beta$ CD no tiene ningún efecto sobre las corrientes macroscópicas evocadas por capsaicina (Fig. 3C).

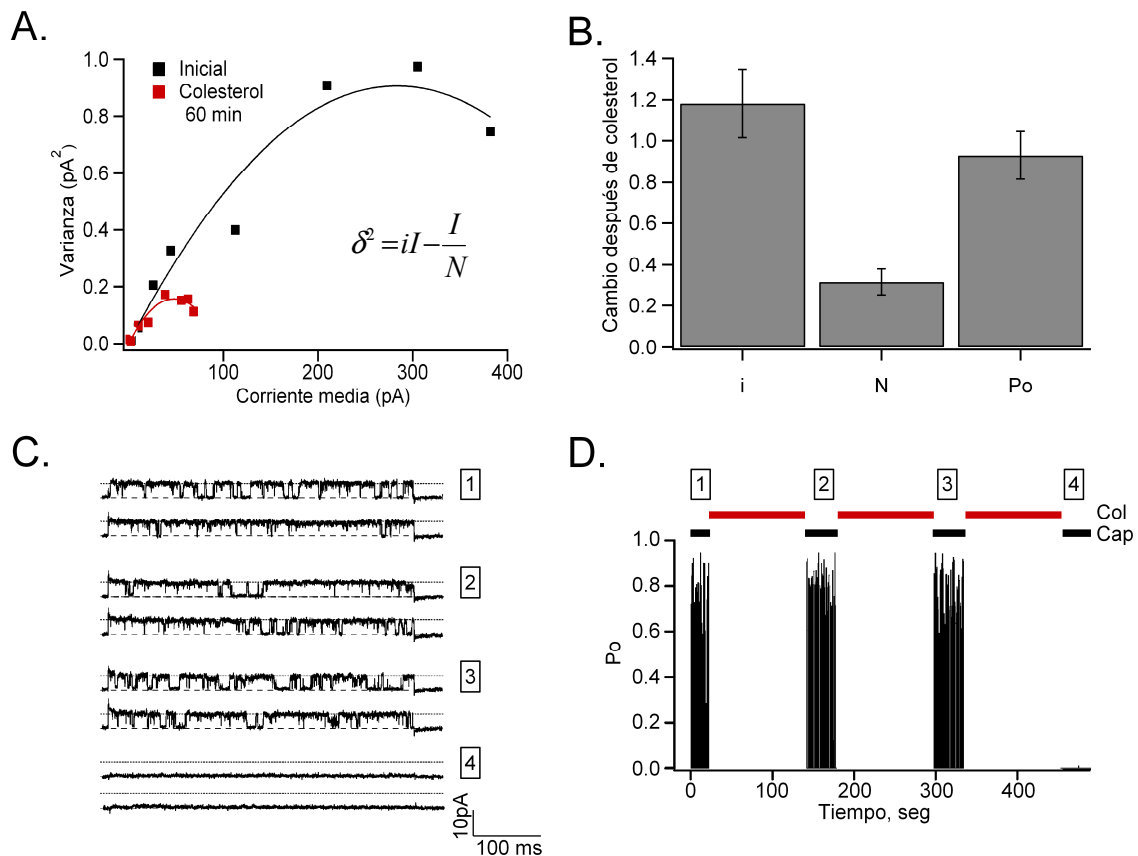


**Figura 3.-El efecto del colesterol es reversible.** **A)** Trazos representativos obtenidos a 120 mV. Corriente inicial (negro), después de 60 minutos de con M $\beta$ CD:Colesterol (rojo) y 10 minutos después del tratamiento con 1mM de M $\beta$ CD (gris) **B)** Promedio de la fracción de corriente activada por 4  $\mu$ M de capsaicina a 120mV después de 60 minutos de exposición del parche de membrana a M $\beta$ CD:Colesterol (rojo;  $0.18 \pm 0.07$ ) y posterior a 10-30 minutos de tratamiento con 1mM de M $\beta$ CD (gris;  $0.83 \pm 0.08$ ) (N=5); la línea punteada denota la corriente inicial. **C)** Trazos representativos de corrientes a 120 mV. Corriente inicial (negro) evocada por 4 $\mu$ M de capsaicina y corriente obtenida después de 60 minutos de tratamiento con 1mM M $\beta$ CD (rojo). \* denota una diferencia significativa entre los 60 minutos de tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol y el tratamiento 1mM de M $\beta$ CD ( $p < 0.01$ ).

## 7.2.-El colesterol reduce el número de canales activables

El mecanismo biofísico por el cual el colesterol causa una reducción de las corrientes del canal rTRPV1, puede ser debido a cambios en alguno de los siguientes parámetros: cambios en la corriente unitaria ( $i$ ), en la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) o en el número de canales activos ( $N$ ). Para dilucidar cual es el mecanismo relacionado con el efecto del colesterol sobre el canal, se realizó análisis de ruido en estado estacionario y registros de canal único.

De los experimentos de análisis de ruido se obtuvo que la probabilidad de apertura permanece sin cambios antes y después de colesterol ( $Po_{max}=0.95 \pm 0.17$  y  $0.89 \pm 0.33$  respectivamente). De la misma forma la corriente unitaria no muestra cambios antes y después del tratamiento con colesterol ( $i=6.85 \pm 1.41$  pA y  $7.96 \pm 1.75$  pA, respectivamente). Sin embargo la  $N$ , que es el número de canales activos en el parche, se redujo cerca de un 70% respecto del número de canales activables que existían al inicio del experimento ( $N_{después}/N_{antes}=0.32 \pm 0.06$ ) (Fig. 4A-B). Estos resultados indican que el efecto del colesterol es debido a la reducción del número de canales activos en el parche, lo cual fue confirmado mediante registros de canal único, en donde se observa que la corriente unitaria y la probabilidad de apertura permanecen sin cambios a través del tiempo, hasta que súbitamente el canal desaparece del registro después del tratamiento con M $\beta$ CD:colesterol y ya no es capaz de activarse en presencia de capsaicina (Fig. 4C-D), lo cual probablemente es debido a la estabilización del estado cerrado del canal, que se refleja como un cambio en el número de canales activables.



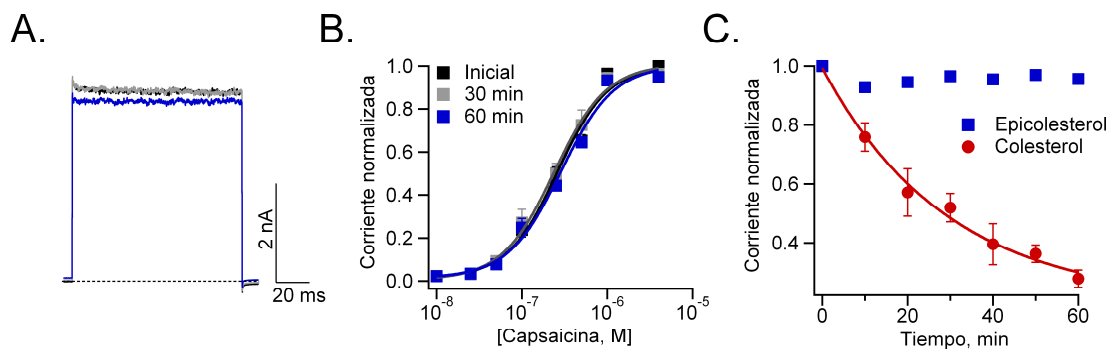
**Figura 4. Análisis de ruido y registro de canal único sobre el efecto del colesterol en las corrientes del canal rTRPV1.** A) Se muestra la relación media-varianza de parches de membrana a 120 mV antes (negro) y después de la incubación con M $\beta$ CD:colesterol (rojo). Los ajustes fueron obtenidos usando la ecuación 2 y son mostrados como curvas sólidas; arrojan los siguientes parámetros: antes de colesterol la corriente

unitaria fue de  $i=6.4$  pA, el número de canales funcionales en el parche fue  $N=88$  y la probabilidad de apertura  $P_o=0.67$ . Después de la incubación con M $\beta$ CD: colesterol la corriente unitaria fue de  $i=6.5$  pA, la  $N=15$  y la  $P_o=0.7$ . **B)** Gráfica de barras que muestra el cambio en los parámetros anteriormente mencionados como resultado de la aplicación de M $\beta$ CD: colesterol ( $N=5$ ). **C)** Trazos de corriente consecutivos obtenidos a 60 mV, antes (1) y después de 2 minutos (2), 4 minutos (3) y 5 minutos (4) de aplicación de M $\beta$ CD: colesterol. La corriente unitaria ( $i$ ) antes y después de M $\beta$ CD: colesterol fue  $5.96 \pm 1.2$  pA y  $5.75 \pm 1.4$  pA respectivamente. **D)** Probabilidad de apertura obtenida de registros de canales únicos en función del tiempo. El tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol fue aplicado por 2 minutos en tres ocasiones antes de que el canal desapareciera del registro. Los números en los recuadros corresponden a los trazos en C.

### 7.3.-El epicolesterol no afecta las corrientes del canal rTRPV1

Existía la posibilidad de que el efecto del colesterol sobre el canal rTRPV1 pudiera deberse a una interacción directa entre esta molécula y el canal o bien debido a los efectos que tiene el colesterol en la regulación de las propiedades físicas de la membrana.

Para determinar si el efecto del colesterol sobre rTRPV1 se debe o no a una interacción directa con el canal, como una primera aproximación se realizaron experimentos de exposición de parches de membrana a epicolesterol, un análogo quiral del colesterol. Si bien ambos esteroides tienen efectos muy similares sobre las propiedades biofísicas de la membrana, su efecto sobre el canal rTRPV1 es muy diferente, ya que a diferencia del colesterol, el epicolesterol no causa reducción de las corrientes macroscópicas evocadas por capsaicina en el canal rTRPV1 (Fig. 5A-C). Esto indica que la modulación de la actividad del canal rTRPV1 por colesterol se debe probablemente a una interacción directa entre el canal y el esteroil.



**Figura 5.- El epicolesterol no tiene efecto sobre las corrientes del canal rTRPV1. A)** Trazos representativos de corrientes a 120mV. Corriente inicial antes del tratamiento con M $\beta$ CD:Epicolesterol (negro), a los 30 minutos (gris) y 60 minutos después de la aplicación de M $\beta$ CD:Epicolesterol (azul). Escala: 2 nA, 20 ms.

exposición al tratamiento (azul). Cerca del 96%  $\pm$ 0.008% (N=5) de la corriente se conserva a los 60 minutos respecto de la inicial. **B)** Curva dosis respuesta a capsaicina normalizada respecto a la corriente inicial obtenida a 120mV antes (negro;  $K_D=263 \pm 9$ nM y pendiente  $n= 1.6 \pm 0.1$ ), después de 30 (gris;  $K_D=260 \pm 16$  y pendiente  $n=1.5 \pm 0.4$  nM) y 60 minutos (Azul;  $K_D=234 \pm 34$  nM y una  $n=1.6 \pm 0.11$ ) de exposición a M $\beta$ CD:Epicolesterol (N=5 para cada caso). **C)** Cursos temporales de los tratamientos con M $\beta$ CD:Coolesterol (rojo,  $\tau= 27 \pm 5$  min. ) y M $\beta$ CD:Epicolesterol (azul). Cada punto representa el valor promedio obtenido a 120mV en presencia de 4 $\mu$ M de capsaicina en tanto que la línea roja representa un ajuste con una exponencial simple (N=6).

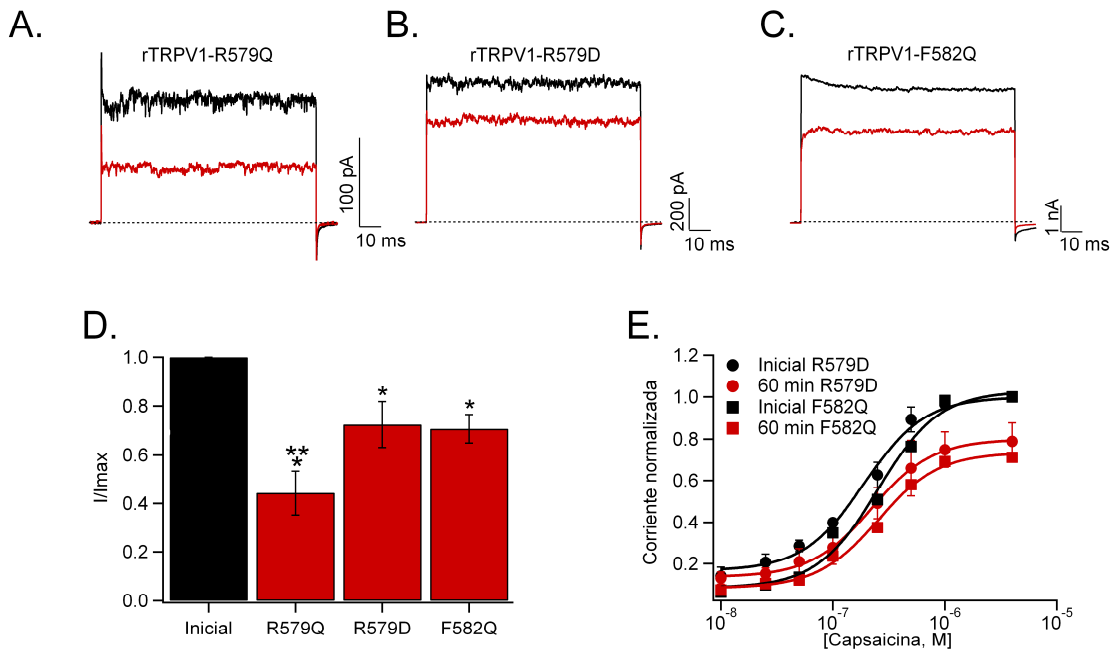
#### **7.4.-Mutaciones en el S5 transmembranal de rTRPV1 afectan la respuesta a coolesterol**

El siguiente objetivo después de determinar que el efecto del coolesterol sobre el canal rTRPV1 se debe a una interacción directa, fue el de identificar cuál era el sitio de interacción entre este esterol y el canal. Se examinó la secuencia del canal rTRPV1 en la búsqueda de motivos de unión a coolesterol, localizándose un motivo CRAC (Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus, por sus siglas en inglés) en el segmento transmembranal 5 (S5) del canal rTRPV1 (Fig.8). El motivo CRAC está definido por una secuencia como la que sigue -(Leu/Val-(X)1-5-Tyr-(X)1-5-Arg/Lys)-<sup>82</sup>. A partir de ello se decidieron llevar a cabo diferentes mutaciones en el segmento que contenía el motivo en S5 y probar el efecto del tratamiento con M $\beta$ CD: coolesterol en parches de membrana que expresaran estos canales mutantes. Entre las mutaciones que se produjeron y estudiaron se encuentran las siguientes: R575Q, R575D, R579Q, R579D, F582Q, L585I ,F589Q y F589A.

Los canales con las mutaciones R579Q, R579D y F582Q presentaron una reducción parcial en la respuesta a coolesterol; la mutante R579Q presento una respuesta a coolesterol ligeramente menor respecto al control, en tanto que los canales mutantes R579D y F582Q respondieron menos a coolesterol que el canal mutante R579Q y el control (Fig. 6A-C.).

Se realizaron curvas dosis respuesta para verificar si se modificaba la unión de capsaicina al canal en los canales mutantes, ya que era importante corroborar que los resultados obtenidos no eran debidos a cambios en la sensibilidad a la capsaicina, es decir, que la curva de activación a capsaicina no esté corrida ya sea hacia el lado izquierdo (más sensible) o hacia el derecho (menos sensible) respecto de la curva dosis-

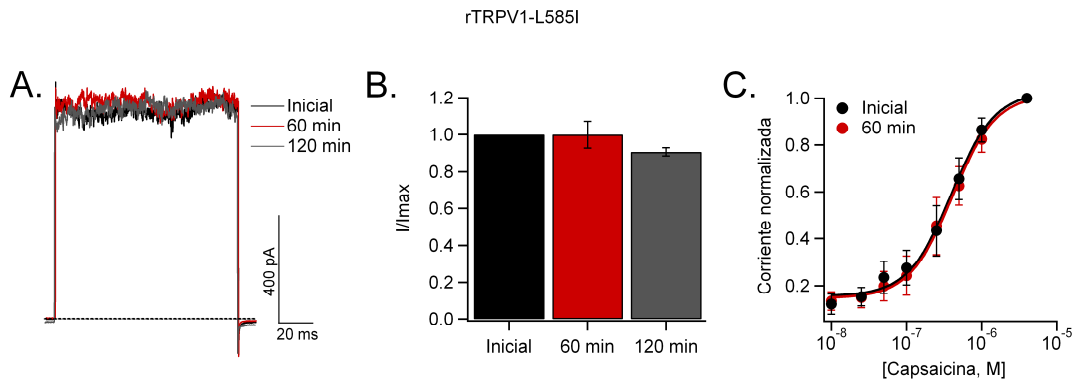
respuesta reportada para el canal silvestre. Es necesario asegurarse de que no haya variaciones en las curvas, ya que de ser así significaría que ocurrió un cambio alostérico debido sólo a la mutación y que las conclusiones que se puedan derivar a partir de estos experimentos no sean correctas. Los resultados muestran que no hay cambios aparentes en la  $K_D$ , ni en la pendiente (Figura 6D), así que se concluyó que las mutaciones no producían cambios alostéricos apreciables en la respuesta a capsaicina.



**Figura 6.-Mutaciones en el motivo CRAC de rTRPV1 reducen parcialmente la respuesta a colesterol.** Trazos representativos de corrientes a 120mV. **A)** Corrientes evocadas por 4 $\mu$ M de capsaicina en R579Q, antes (negro) y 60 minutos (rojo) después de la exposición al tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol. **B)** Corrientes evocadas por 4 $\mu$ M de capsaicina en R579D, antes (negro) y 60 minutos (rojo) después de la exposición al tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol. **C)** Corrientes en F582Q, antes (negro) y 60 minutos (rojo) después de exposición al tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol. **D)** Promedio de la fracción de corriente activada por 4  $\mu$ M de capsaicina a 120mV antes (negro) y después de 60 minutos (rojo; R579Q=0.44  $\pm$  0.09, R579D=0.72  $\pm$  0.09 y F582Q=0.70  $\pm$  0.06) de tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol (N=5 para todos los casos) **E)** Curva dosis- respuesta a capsaicina normalizada respecto a la corriente inicial, antes (negro;  $K_D$ =192 $\pm$  14 nM y pendiente n= 1.6  $\pm$  0.25 y  $K_D$ =237 $\pm$  49 nM y pendiente n= 1.7  $\pm$  0.3 para R579D y F582Q respectivamente) y después de 60 minutos (rojo;  $K_D$ =218  $\pm$  32 nM y pendiente n=1.5  $\pm$  0.15 y  $K_D$ =250 $\pm$  32 nM y pendiente n= 1.7  $\pm$  0.23 para R579D y F582Q respectivamente) de tratamiento con M $\beta$ CD: colesterol . Las líneas representan el ajuste de los datos a una ecuación de Hill y se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (N=5). \* denota una diferencia significativa entre la fracción inicial y los 60 minutos (p<0.01) y \*\* denota diferencia significativa entre R579Q y R579D (p<0.01) obtenidas por medio de una prueba de ANOVA.

Por otra parte la mutación L585I de rTRPV1 es suficiente para eliminar el efecto del colesterol sobre las corrientes del canal, después de 60 y 120 minutos de tratamiento

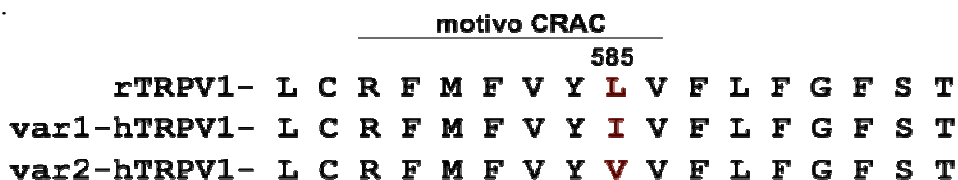
con M $\beta$ CD:Coolesterol (Fig.7A-B). Las curvas dosis respuesta del canal mutante L585I no muestran cambios aparentes en la K<sub>d</sub>, ni en la pendiente (Figura 7C).



**Figura 7.- La mutación L585I es suficiente para eliminar la respuesta a coolesterol.** **A)** Trazos representativos de corrientes a 120mV. Corriente inicial evocada por 4 $\mu$ M de capsaicina (negro), después de 60 y 120 minutos (rojo y gris respectivamente) de exposición al tratamiento con M $\beta$ CD:Coolesterol. **B)** Promedio de la fracción de corriente activada por 4  $\mu$ M de capsaicina a 120mV, después de 60 minutos (rojo;  $1 \pm 0.07$ , N=10) y 120 minutos (gris;  $0.91 \pm 0.02$ , N=5) de tratamiento con M $\beta$ CD:Coolesterol. **C)** Curva dosis respuesta a capsaicina normalizada respecto a la corriente inicial obtenida a 120mV antes (negro; K<sub>D</sub>=382  $\pm$  16 nM y pendiente n= 1.6  $\pm$  0.03) y después de 60 minutos (rojo; K<sub>D</sub>=396  $\pm$  5 nM y pendiente n=1.5  $\pm$  0.02) de tratamiento con M $\beta$ CD:Coolesterol. Las líneas representan el ajuste de los datos a una ecuación de Hill y se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (N=4 en ambos casos).

### 7.5.-El coolesterol tiene distintos efectos en las variantes I585 e I585V de hTRPV1

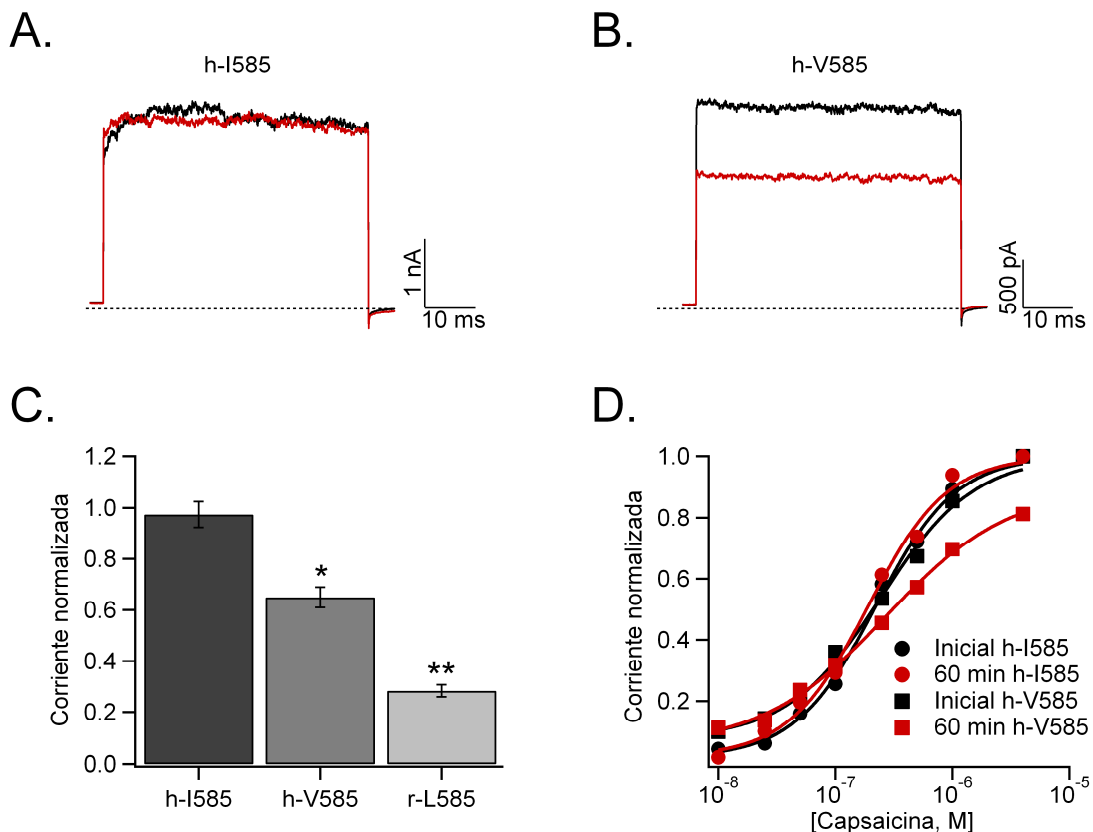
Se ha reportado la existencia de algunas variaciones en la secuencia de aminoácidos que hay entre el canal rTRPV1 y hTRPV1. Una de estas diferencias se encuentra en el S5 del canal y consiste en la sustitución de un residuo de leucina en la posición 585 de rTRPV1 por una isoleucina o una valina también en la misma posición pero en hTRPV1<sup>83</sup> (Fig. 8). Lo anterior es de gran interés puesto que, como se mostró en la sección anterior, la mutación L585I en rTRPV1 elimina la respuesta a coolesterol del canal.



**Figura 8. Alineación de secuencias del S5 de rTRPV1 y de dos variantes de hTRPV1.** La línea sólida indica la posición del motivo CRAC en S5. En rojo destaca el residuo 585, el cual es esencial para la respuesta a coolesterol.

Debido a lo anterior se decidió investigar el efecto del colesterol sobre la variante I585 de hTRPV1 y realizar una mutación puntual en este aminoácido, la mutación I585V, correspondiente a otra de las variantes de hTRPV1 existentes. Los parches de membrana que expresaban a la variante I585 que fueron tratados con M $\beta$ CD:Colesterol durante 60 minutos no muestran una reducción en las corrientes macroscópicas evocadas por capsaicina (Fig. 9B y C), lo cual concuerda con el resultado obtenido en la mutante L585I de rTRPV1 en donde se pierde la respuesta del canal a colesterol.

En el caso de la mutación I585V de hTRPV1 existe un decremento de las corrientes evocadas por capsaicina después de 60 minutos de tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol. Este decremento es significativo respecto a la fracción inicial de esta mutante y respecto a la fracción correspondiente a los 60 minutos de tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol en I585 (Fig. 9B y C), pero con una menor intensidad que en el canal silvestre rTRPV1 con L585. Se realizaron curvas dosis respuesta a capsaicina en I585 y en I585V, los resultados no mostraron cambios aparentes en la  $K_D$ , ni en la pendiente (Fig. 9D).



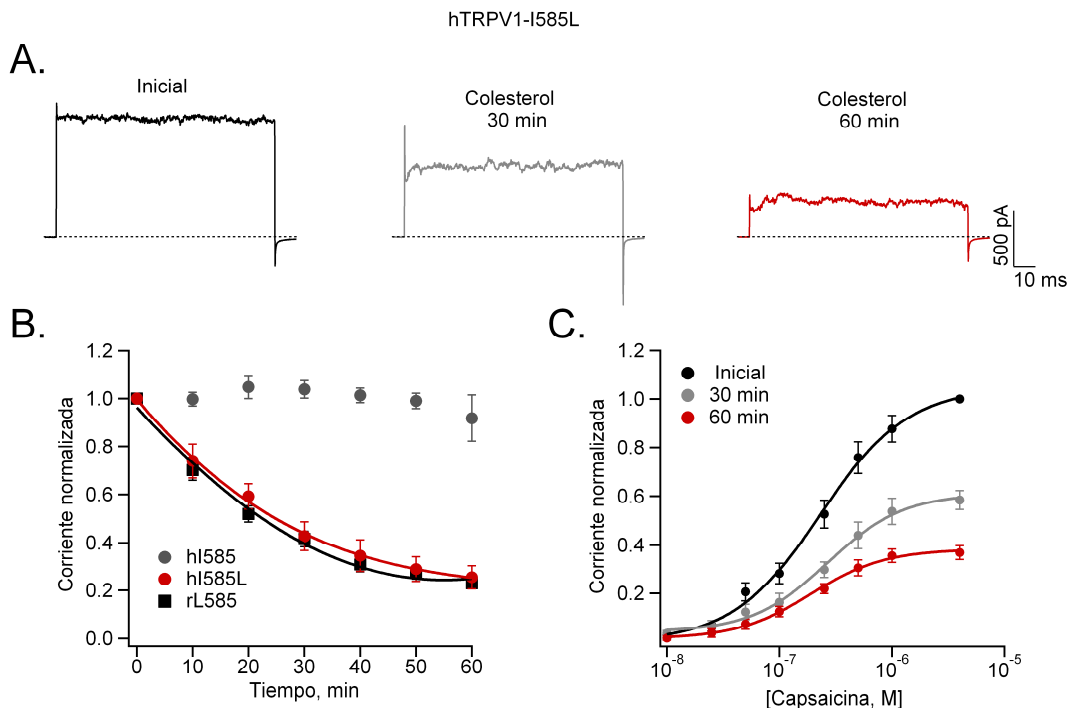
**Figura 9.-Respuesta diferencial a colesterol en tres distintas variantes del residuo 585 en TRPV1. A-B)** Trazos representativos de corrientes a 120mV de I585 y de I585V respectivamente. Corriente inicial (negro) y 60 minutos después del tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol (rojo). **C)** Fracción de la corriente activada por 4  $\mu$ M de capsaicina en las variantes I585 ( $0.97 \pm 0.05$ ; N=9), I585V ( $0.65 \pm 0.04$ ; N=8) de hTRPV1 y L585



( $0.28 \pm 0.02$ ;  $N=31$ ) en rTRPV1 después de 60 minutos de exposición a M $\beta$ CD:Coolesterol. **D**) Curva dosis respuesta a capsaicina normalizada respecto a la corriente inicial, antes (negro) y después de 60 min de exposición a M $\beta$ CD:Coolesterol (rojo). Para h-I585 inicial (negro,  $K_D=217 \pm 28$  nM y  $n=1.4 \pm 0.08$ ), y para h-I585V inicial (negro,  $K_D=232 \pm 26$  nM y  $n=1.4 \pm 0.07$ ); después de 60 minutos para h-I585 (rojo,  $K_D=185 \pm 30$  nM y  $n=1.5 \pm 0.08$ ) y para h-I585V (rojo,  $K_D=204 \pm 37$  nM y  $n=1.4 \pm 0.09$ ) ( $N=5$  para todos los casos). \* denota una diferencia significativa entre la fracción de corriente activada en h-I585 y respecto a la mutante h-I585V ( $p<0.05$ ) después de 60 minutos de exposición a coolesterol; \*\* denota diferencia significativa entre h-I585, de h-I585V y rTRPV1 ( $p=0.05$ ).

### 7.6.-La mutación de I585L en hTRPV1 confiere sensibilidad a coolesterol

Tanto la variante I585 de hTRPV1 como la mutación L585I en rTRPV1 no responden a coolesterol, así que se llevó a cabo la mutación puntual I585L de hTRPV1 con la finalidad de investigar si el cambio puntual de este residuo es capaz de conferir al canal hTRPV1 sensibilidad a coolesterol. El tratamiento de parches de membrana que expresaban canales hTRPV1 con la mutación I585L con M $\beta$ CD:Coolesterol durante 60 minutos, exhiben una reducción de las corrientes macroscópicas evocadas por capsaicina (Fig. 10A-B). Al igual que en los casos anteriores parece no haber cambios aparentes en la  $K_D$ , ni en la pendiente correspondientes a la curva dosis respuesta en esta mutante (Fig. 10C).



**Figura 10.-La mutación I585L confiere al canal hTRPV1 sensibilidad a coolesterol .**  
**A)** Trazos representativos de corrientes a 120mV . Corriente inicial (negro) y después

del tratamiento con M $\beta$ CD: Colesterol a los 30 (gris) y 60 minutos (rojo). **B)** Cursos temporales de los tratamientos con M $\beta$ CD: colesterol en hI585 (gris), hI585L (rojo;  $\tau=32 \pm 7$ ) y L585 de rTRPV1 (Negro;  $\tau=27 \pm 5$  min.) (N=5). Cada punto representa la corriente obtenida a 120mV en presencia de 4 $\mu$ M de capsaicina. **C)** Curva dosis respuesta a capsaicina antes (negro;  $K_D=195 \pm 36$  nM y pendiente  $n=1.5 \pm 0.3$ ), después de 30 (gris;  $K_D=225 \pm 41$  nM y  $n=1.4 \pm 0.09$ ) y de 60 minutos de exposición a M $\beta$ CD: Colesterol (rojo;  $K_D=202 \pm 34$  nM y  $n=1.5 \pm 0.3$ ) (N=5 para todos los casos).

## 8.-Discusión

En este trabajo se incrementó la concentración de colesterol en parches escindidos de membrana de células HEK293 que expresaban heterológicamente al canal rTRPV1. Los resultados demuestran que el colesterol, uno de los componentes estructurales mayoritarios de las membranas celulares en los vertebrados, es capaz de modular de forma negativa a la actividad del canal polimodal TRPV1, causando una reducción de las corrientes del canal evocadas por capsaicina, temperatura y voltaje (Fig. 1-2). Más aún, se encontró que el efecto del colesterol es reversible por el tratamiento con M $\beta$ CD, un agente quelante de colesterol (Fig. 3A-B).

Los resultados obtenidos contrastan con los publicados previamente por Liu *et al*<sup>79</sup>, quienes reportaron que el colesterol es necesario para la función del canal rTRPV1, ya que la incubación de células DRG con M $\beta$ CD, que disminuye los niveles de este lípido en las membranas celulares, resultaba en la reducción de las corrientes del canal rTRPV1 evocadas por diversos estímulos en registros de célula completa.

De forma similar Szőke *et al.*<sup>84</sup>, reportaron que en experimentos de medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular, la depleción del colesterol de las membranas de neuronas del ganglio trigeminal disminuían las corrientes generadas por capsaicina y resiniferatoxina, en tanto que en células CHO sólo se reducían las corrientes evocadas por capsaicina, pero no las generadas por resiniferatoxina o por protones. Los autores de este trabajo sugirieron que la diferencia en la respuesta a la reducción de colesterol obtenida entre tipos celulares puede ser debida a la diferente composición lipídica de las membranas en las que se encuentra embebido el canal.

Así, los estudios reportados por Liu *et al.* y Szőke *et al.*<sup>84</sup>, sugieren que el canal rTRPV1 es únicamente funcional cuando se encuentra dentro de regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol como lo son los microdominios mejor conocidos como “balsas lipídicas”. Sin embargo, es importante mencionar que los experimentos de depleción de colesterol en los estudios de Liu *et al.*, no sólo muestran que ocurre una reducción de las corrientes del canal, sino que también muestran que hay una disminución de los niveles de proteína del canal rTRPV1 en la membrana plasmática. Debido a esto, es difícil distinguir si los efectos observados se deben a si el rTRPV1 se encuentra en balsas lipídicas o a si hay alteraciones en los mecanismos de tráfico celular. Ambos reportes sugieren que el canal rTRPV1 se encuentra en balsas lipídicas<sup>79,84</sup>. Sin embargo, en experimentos de aislamiento de membranas resistentes a detergentes (DRMs) y membranas solubles en detergentes (DSMs) realizados en células HEK293 que fueron llevados a cabo por nuestros colaboradores en la Universidad de Duke (y publicados en nuestro trabajo), se demuestra que en células sin tratamiento y tratadas tanto con M $\beta$ CD como con M $\beta$ CD:Colesterol, la proteína rTRPV1 no fue detectada por Western blot en fracciones pertenecientes a DRMs en donde las concentraciones de colesterol son elevadas. Es decir, estos experimentos demuestran que la señal del canal rTRPV1 se localiza en regiones DSMs que son pobres en colesterol (Fig. suplemental 4 en Picazo-Juárez *et al.*), proporcionando una fuerte evidencia a favor de que el canal rTRPV1 no se encuentra localizado dentro de balsas lipídicas, lo cual también ha sido reportado para otros canales TRP como el TRPC3, TRPC6<sup>85</sup> y TRPM7<sup>86</sup>.

Experimentos realizados durante nuestra investigación donde se agotaron los niveles de colesterol mediante el tratamiento con M $\beta$ CD, demuestran que la reducción de la concentración de este lípido en la membrana no modifican sustancialmente la función del canal TRPV1 en los parches escindidos (Fig. 3C). Estos resultados también contrastan con los reportados por Liu *et al.*<sup>79</sup> y Szőke *et al.*<sup>84</sup> ya que, como se menciona arriba, en estos estudios usando células completas, las corrientes del canal TRPV1 disminuyen<sup>79</sup>.

Una diferencia fundamental entre ambos estudios es justamente la configuración del patch-clamp que se usó para estudiar los efectos del colesterol. Nuestros datos no descartan que puedan estar involucrados componentes celulares en los efectos del

colesterol sobre la función del canal, pero nuestros experimentos nos permitieron estudiar los efectos de este lípido sobre el canal aislándolo de los complicados procesos celulares.

Por otro lado, nuestros datos son consistentes con otro estudio donde se ha reportado la ausencia de efectos de la disminución de los niveles de colesterol sobre la actividad del canal rTRPV1, en donde la remoción de este lípido no causa cambios en las corrientes evocadas por temperatura en el rango de 44 a 50°C, en tanto que en este mismo estudio, el aumento de los niveles de colesterol eleva el umbral de activación del canal por temperatura en experimentos realizados en célula completa<sup>87</sup>. En el caso del canal TRPM8 se ha demostrado que la remoción de colesterol con M $\beta$ CD provoca una disminución de la localización dentro de balsas lipídicas, lo cual potencia las corrientes generadas por mentol y temperatura, cambiando el umbral de activación por temperatura hacia temperaturas más cálidas cuando este canal tiende a activarse por temperaturas templadas<sup>88</sup>. En un estudio posterior, Veliz *et al.* demostraron que el canal TRPM8 se encuentra dentro de estructuras vesiculares unidas a la membrana plasmática, y que la remoción de colesterol con M $\beta$ CD estabiliza al canal en la membrana plasmática, lo cual provoca un aumento en el número de canales funcionales y, por tanto, un aumento en las corrientes evocadas por temperatura<sup>89</sup>.

Después de que en el presente estudio se caracterizaron los efectos del colesterol en registros de corrientes macroscópicas y que se estableció que el rTRPV1 no se localiza en balsas lipídicas, se procedió a determinar que el incremento de los niveles de colesterol que causa la reducción de las corrientes del canal rTRPV1 sensibles a capsaicina no se debe a que el colesterol provoca cambios aparentes en la afinidad de la capsaicina por su sitio de unión en el canal. Esto se concluye a partir de los resultados que muestran que la forma de las curvas dosis-respuesta al agonista no cambia y a que el valor de  $K_D$  obtenido en cada curva dosis-respuesta llevada a cabo antes y después del tratamiento con colesterol (Fig. 1C) tampoco se modifica sustancialmente.

Más aún, tampoco se observaron modificaciones en la forma de la relación corriente-voltaje, ya que la característica de rectificador saliente del canal rTRPV1 se conserva, antes y después de colesterol (Fig. 1D), definiendo también que el efecto del colesterol no es dependiente del voltaje ya que ocurre tanto a voltajes negativos como positivos.

Para fundamentar aún más nuestras conclusiones, decidimos realizar experimentos de análisis de ruido y de registro de canales únicos para tratar de dilucidar cual es el mecanismo biofísico que subyace a la disminución de las corrientes del canal rTRPV1.

El análisis de ruido no muestra cambios en los parámetros correspondientes a la corriente unitaria ( $i$ ) y a la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) después del incremento de la concentración de colesterol en membrana. Sin embargo, sí se presenta una disminución en el número de canales activables en el parche ( $N$ ), los cuales ya no logran responder a capsaicina después del tratamiento con M $\beta$ CD:Colesterol (Fig. 4A-B). Esto es consistente con los resultados obtenidos mediante registros de canal único donde tampoco se modifica la  $P_o$  ni la  $i$  durante el experimento, hasta que súbitamente el canal desaparece del registro debido a que el colesterol probablemente provoca que el canal entre a un estado no conductor dando como resultado que se vuelva “silente”. Este mismo fenómeno ha sido documentado para otros canales como es el caso de los Kir2, donde la elevación de los niveles de colesterol también estabiliza su estado cerrado<sup>73,90</sup>. Es interesante notar que aunque el resultado final es el contrario, Veliz *et al.* observan un fenómeno similar mediante análisis de ruido en células HEK293 transfectadas con el canal TRPM8, donde la disminución de colesterol aumenta la corriente media evocada por temperatura, a través de un aumento en el número de canales funcionales, sin afectar la  $P_o$  ni la  $i$ <sup>89</sup>.

Apoyándonos en nuestros resultados de análisis de ruido y registros de canal único, concluimos que, como se ha reportado en experimentos de análisis de ruido en el canal Kir2.1<sup>90</sup>, el colesterol se une al canal rTRPV1 y produce un cambio conformacional que estabiliza al canal en el estado cerrado.

Hasta este punto, los resultados obtenidos no nos permitían distinguir si el efecto del colesterol sobre el canal rTRPV1 era debido a una interacción directa con el canal o bien debido a una consecuencia indirecta de los efectos de esta molécula en las propiedades físicas de la membrana plasmática.

Como una primera aproximación para resolver este punto, se realizaron experimentos con epicolesterol, un análogo quiral del colesterol donde solo el grupo hidroxilo cambia de posición  $\beta$ -3-OH a  $\alpha$ -3-OH (Fig.4). Este análogo quiral, tiene efectos similares en

la modificación de las propiedades físicas de la membrana y ha sido usado para descartar efectos membranales o efectos directos del colesterol en diversos estudios<sup>91-93</sup>.

Los resultados obtenidos con el epicolesterol muestran una ausencia de efecto del mismo sobre las corrientes y la afinidad de la capsaicina por su sitio de unión en el canal rTRPV1 (Fig. 5). Esta es una fuerte evidencia a favor de que los efectos no son a través de las propiedades de la membrana, sino más bien un efecto directo al interactuar con el canal rTRPV1 en algún sitio específico. Un resultado similar se ha observado en los canales BK<sub>Ca</sub><sup>93</sup>, en miembros de la subfamilia de canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes Kir2.1<sup>91</sup>, KirBac3.1<sup>94</sup> y KirBac1.1<sup>92</sup>.

Una vez llevada a cabo la caracterización de los efectos del colesterol y del epicolesterol, nos dedicamos a la búsqueda del posible sitio de unión del colesterol en el canal rTRPV1.

En 1998, Li y Papadopoulos describieron un sitio de unión a colesterol en la proteína translocadora de la membrana mitocondrial externa (TSPO), anteriormente conocida como proteína de unión a benzodiazepinas de tipo periférico. Dicho sitio de unión a colesterol estaba formado por la secuencia: VLNYYVWR (los residuos subrayados indican el motivo CRAC). Basados en la similitud observada con el motivo en otras proteínas que unen colesterol, los autores propusieron la existencia de un motivo CRAC (Cholesterol Recognition Amino acid Consensus), definido por el siguiente patrón de secuencia: Leu/Val-(X)<sub>1-5</sub>-Tyr-(X)<sub>1-5</sub>-Arg/Lys, donde (X)<sub>1-5</sub> indica la posibilidad de tener de uno a cinco residuos cualesquiera<sup>95</sup>. Este motivo CRAC también ha sido identificado en proteínas de tipo viral como las M1 y M2 del virus de la influenza A y en el intercambiador cardíaco humano Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup><sup>96</sup>.

Se ha descrito que el colesterol interactúa con el motivo CRAC de las proteínas mediante fuerzas de van der Waals entre superficies hidrofóbicas y a través de interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente y el grupo -OH del colesterol<sup>82,97,98</sup>. Además, se ha reportado para la estructura cristalográfica del receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico humano, un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), que es capaz de asociarse con dos moléculas de colesterol por receptor. Además tiene un sitio de unión situado entre las α-hélices I, II, III y IV, donde las interacciones de van der

Waals entre el colesterol y residuos aromáticos, y las interacciones electrostáticas con residuos cargados de las hélices, son las que promueven la estabilidad térmica del receptor. Esto definió la presencia de motivos consenso a colesterol (CCM), conservados entre GPCRs clase A de humanos que es de tipo: Arg/Lys-(X)<sub>7-10</sub>-Trp/Tyr-(X)<sub>4</sub>-Ile/Val/Leu<sup>99</sup>.

La unión de colesterol en otros sitios que no son motivos CRAC o CCM, se ha mostrado también en la proteína precursora amiloide que une colesterol de manera directa en un motivo VGSNK, similar al motivo CRAC. Esta interacción es necesaria para que la proteína pueda localizarse dentro de balsas lipídicas, para poder ser cortada por la  $\alpha$ -secretasa y seguir su camino en la formación del péptido  $\beta$ -amiloide, que es importante en la enfermedad de Alzheimer<sup>100,101</sup>.

El estudio que aquí se presenta, indica que existe un motivo CRAC ubicado entre los residuos 579 a 586 del segmento S5 transmembrana del canal rTRPV1 (Fig. 8), donde el residuo L585 juega un papel fundamental en la respuesta a colesterol, ya que la mutación L585I elimina por completo la respuesta a colesterol (Fig. 7). La importancia de este residuo y la presencia de un motivo CRAC en el segmento S5 del canal fueron confirmadas además en experimentos llevados a cabo con diferentes variantes del canal hTRPV1 (Fig. 9), donde la variante I585 de hTRPV1 tampoco responde a colesterol, lo cual es consistente con los datos obtenidos con la mutante L585I de rTRPV1, en tanto que la variante V585 de hTRPV1 sí presenta una respuesta al colesterol, pero menos acentuada que la que presenta el canal silvestre rTRPV1.

El hecho de que la mutación de L585I en rTRPV1 elimine la respuesta a colesterol y que la mutación inversa I585L de L585I en rTRPV1 elimine la respuesta a colesterol y que la mutación inversa I585L en hTRPV1 confiera la sensibilidad a colesterol, muestra que las interacciones hidrofóbicas son importantes y también refleja la importancia de factores estéricos en la interacción entre el colesterol y el canal.

Otros dos aminoácidos de importancia dentro del motivo CRAC del segmento S5 del canal rTRPV1 son los residuos R579 y F582. La mutación R579D reduce la respuesta del TRPV1 a colesterol, esto sugiere que el cambio de carga de positiva a negativa en esa posición altera las interacciones electrostáticas entre el grupo -OH del colesterol y el residuo R579 lo suficiente para desestabilizar la interacción entre el colesterol con el

canal, pero no logra eliminar por completo la sensibilidad a colesterol como en el caso de la mutante L585I. La importancia de esta interacción se confirma en los experimentos con la mutación R579Q donde solamente se neutralizó la carga del residuo y que resultó en canales cuya respuesta al colesterol es mayor que comparada con la de los canales con la mutación R579D, pero menor que la respuesta de los canales silvestres.

Finalmente, los canales con la mutación F582Q muestran una respuesta similar a la de los canales con la mutación R579D, hecho que también resalta la importancia de este residuo en las interacciones hidrofóbicas entre este aminoácido y el colesterol.

Adicionalmente a estos resultados, en colaboración con el M. en C. Ernesto Ladrón y el Dr. León Islas de la Facultad de Medicina, se realizó la construcción de un modelo del sitio de unión a colesterol en el segmento S5 del canal rTRPV1 (Fig. 9 en Picazo-Juárez *et al.*). En este modelo el grupo  $-OH$  del colesterol apunta hacia el residuo R579 posiblemente estableciendo interacciones electrostáticas. En concreto, la cara  $\alpha$  del colesterol, la cual es esencialmente plana, establece interacciones hidrofóbicas de tipo  $\pi$ -alifáticas con el residuo F582, en tanto que la cola alifática del colesterol ocupa una pequeña cavidad en la cual interactúa con el residuo L585 y otros residuos hidrofóbicos del canal rTRPV1. Cuando se producen canales con la mutación L585I, se propone que el tamaño de la cavidad se reduce, lo cual podría explicar la pérdida del efecto del colesterol en esta mutante y en la variante I585 de hTRPV1.

Este mismo modelo se realizó en presencia de epicolesterol, donde se mantiene la interacción con el residuo L585, pero el hecho de que la posición del grupo  $-OH$  cambie de  $\beta$  a la posición  $\alpha$  podría incrementar su volumen de van der Waals, comparado con el colesterol, lo que podría dificultar la interacción del residuo F582 con la cara  $\alpha$  del epicolesterol. En síntesis, esto provoca que la interacción con los tres residuos importantes dentro del motivo CRAC del segmento S5 sea más desfavorable energéticamente comparada con la interacción con colesterol.

La existencia de una interacción directa entre el canal rTRPV1 y el colesterol a través de un motivo CRAC fue confirmada por tres distintos tipos de experimentos: 1) por los



experimentos usando epicolesterol, que no tiene ningún efecto sobre la actividad del canal rTRPV1; 2) por experimentos de medición de las corrientes evocadas por capsaicina en mutantes del segmento S5 donde se encuentra ubicado el motivo CRAC y 3) por los experimentos realizados en las variantes I585 y V585 de hTRPV1 que responden pobremente al colesterol.

En los canales BK<sub>Ca</sub> se ha determinado la presencia de siete motivos CRAC en el carboxilo terminal de la subunidad Slo1, donde el motivo CRAC4 adyacente a la membrana es el que provee la sensibilidad a colesterol. En esta subunidad se encuentran los residuos V444, Y450 y K453 que son requeridos para la interacción con el colesterol y la formación de puentes de hidrógeno. Además, se ha propuesto que las interacciones hidrofóbicas participan en el reconocimiento y localización del colesterol en estos canales<sup>102</sup>.

Estudios llevados a cabo por Rosenhouse-Dankster *et al.* y Epshtein *et al.* arrojan resultados similares a los nuestros para el canal Kir 2.1 donde la mutación de residuos del dominio C-terminal, como la L222I elimina la respuesta a colesterol del canal, en tanto que las mutaciones N216D y K219Q afectan la respuesta a colesterol del canal Kir2.1.<sup>103,104</sup> También reportan que la mutación I214L en el canal Kir2.3 confiere sensibilidad al colesterol<sup>104</sup>. Así, mediante experimentos electrofisiológicos, de mutagénesis y modelado, estos estudios muestran que la sensibilidad a colesterol en Kir2.1 está controlada por un cinturón de residuos que están posicionados alrededor del poro citosólico del canal, afectando la apertura del canal en una forma en la que se estabiliza el estado cerrado<sup>103</sup>.

En estudios realizados con la proteína gp41 del VIH, se ha encontrado también que la mutación del residuo L679 a I679 dentro de un motivo CRAC (LWYIK a IWYIK) resulta en una interacción reducida con el colesterol, afectando la interacción de esta proteína con balsas lipídicas y reduciendo la fusión de membranas y la formación de sincicios<sup>97</sup>.

La existencia de dos alelos muy comunes del canal hTRPV1 (V585 e I585) fue descrita en un principio por Hayes *et al.*<sup>83</sup>, quienes observaron que un polimorfismo en el nucleótido 1753, con la substitución de una guanina por una adenina, resulta en un

cambio de una valina a una isoleucina en la posición 585 de la proteína. Además, reportan que ambos alelos son comunes en humanos, con una proporción del 51% de los individuos son heterocigotos (Ile/Val), un 34% son homocigotos de Ile/Ile y un 15% son homocigotos de Val/Val. Según los experimentos de otros grupos de investigación, las variantes I585 y V585 de hTRPV1 no presentan diferentes respuestas funcionales a capsaicina, pH y temperatura mediante experimentos de imágenes de calcio y registros electrofisiológicos en la modalidad de célula completa<sup>83</sup>. Sin embargo, sí existen estudios que han descrito que estas variantes podrían estar implicadas en procesos de tipo patológico. Por ejemplo, Cantero-Recasens *et al.* reportan, en un estudio realizado en niños, que el 61% de la población presenta el alelo correspondiente a TRPV1-Ile-585. También demuestran que la variante V585 de hTRPV1 está asociada a una modesta pero significativa disminución del riesgo de presentar ciertos síntomas en el asma infantil, como tos y sibilancia. La presencia de estas variantes podría explicar la heterogenicidad clínica del asma infantil<sup>105</sup>.

Otro estudio muestra que quienes son homocigotos para Ile/Ile y por lo tanto presentan la variante I585 de hTRPV1, presentan una baja sensibilidad al dolor producido por temperaturas altas, lo cual se ha asociado con un bajo riesgo de sintomatología de osteoartritis en rodillas<sup>106</sup>.

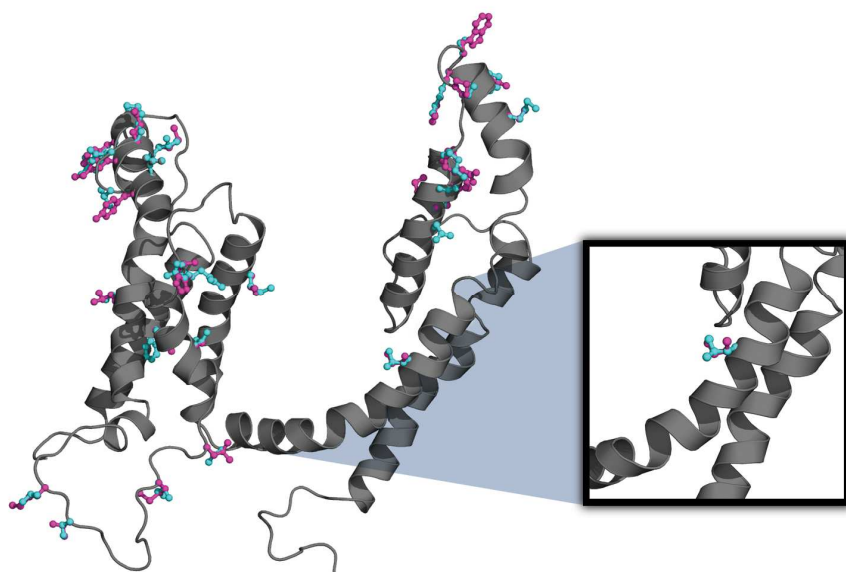
Adicionalmente, Kim *et al.* muestran que mujeres americanas de descendencia europea y que presentan el alelo homocigoto para Val/Val exhiben menores tiempos de tolerancia a bajas temperaturas, es decir que un incremento en la sensibilidad a bajas temperaturas les induce dolor<sup>107</sup>. Así, aunque se han reportado al menos seis polimorfismos en el gen del canal hTRPV1, no se han realizado estudios sistemáticos para caracterizar sus consecuencias funcionales<sup>108</sup>.

Nuestros resultados revelan una respuesta diferencial al incremento de los niveles de colesterol membranal entre el canal rTRPV1 que responde fuertemente al colesterol en comparación con las dos variantes del canal hTRPV1, lo cual nos sugiere que el efecto del colesterol es dependiente de la especie y de la identidad del aminoácido en la posición 585 de cada variante. Sin embargo, hasta el momento nosotros desconocemos las implicaciones fisiológicas de la respuesta diferencial entre estas variantes del canal hTRPV1. Pensamos que quizá la expresión de las variantes Val/Val o Ile/Ile en

diferentes tipos celulares con diferentes concentraciones de colesterol pudiera estar regulando la actividad del canal TRPV1.

Diferencias en la sensibilidad a colesterol, como la que muestran nuestros resultados entre rTRPV1 y hTRPV1 han sido observadas en otros canales. Tal es el caso de los canales  $K_{ATP}$  que son regulados por hipercolesteremia *in vivo*<sup>73</sup>, pero el modo de regulación aun es controversial debido a que la sensibilidad a colesterol es diferente entre un modelo porcino comparado con un modelo en conejo. En este caso, en el modelo porcino se sugiere una activación funcional en condiciones de hipercolesteremia<sup>109</sup> en tanto que en el modelo de conejo se suprime la actividad del canal  $K_{ATP}$  bajo condiciones de hipercolesteremia<sup>110</sup>.

La respuesta diferencial a colesterol entre el canal rTRPV1 y hTRPV1 no es la única existente entre estos canales, ya que con anterioridad se han reportado diferencias farmacológicas entre los canales rTRPV1 y hTRPV1. Por ejemplo, se ha reportado que la capsazepina y el rojo de rutenio bloquean con más potencia las corrientes evocadas por capsaicina en hTRPV1 que en rTRPV1. Adicionalmente, la capsazepina bloquea las corrientes generadas por protones en hTRPV1 pero no en rTRPV1, al igual que la capsazepina inhibe más efectivamente las corrientes evocadas por temperatura en hTRPV1 que en rTRPV1<sup>111</sup>. Estas respuestas disímiles ante estos compuestos se deben probablemente a diferencias estructurales entre los canales de humano y rata (Figura V).



**Figura V. Diferencias estructurales entre los segmentos transmembrana de los canales hTRPV1 y rTRPV1.** Del lado izquierdo se muestra un modelo donde se

sobreponen las estructuras de los segmento transmembrana de un monómero del canal hTRPV1 y rTRPV1, en el modelo destacan lo residuos que varían entre el TRPV1 de rata (azul) y humano (rosa). Del lado derecho se muestra un acercamiento al segmento transmembrana S5 donde el único residuo que varia entre rata (leucina) y humano (isoleucina) esta en la posición 585. El modelo presentado fue realizado en SWISS-MODEL versión 8.05.

En resumen, dado que el canal TRPV1 es un detector importante de estímulos ambientales, tanto de estímulos térmicos y químicos nocivos, que además participa en varias condiciones patológicas donde ocurren procesos de dolor e inflamación, es fundamental saber como se regula bajo varias condiciones. Por ejemplo, será interesante saber en un futuro cómo el canal TRPV1 puede ser regulado por situaciones de hipercolesteremia *in vivo*. En experimentos *in vitro* será importante extender los estudios a otras especies pero también, dentro de una misma especie, será interesante saber si hay diferencias en la regulación de la actividad del canal por colesterol dentro de los diferentes tipos celulares en los que se expresa.

## 9.-Conclusiones

- El incremento de la concentración de colesterol en la membrana regula de forma negativa y reversible la actividad del canal TRPV1.
- El colesterol ejerce su efecto mediante su interacción directa con un motivo CRAC ubicado en el segmento S5 transmembrana del canal TRPV1 que estabiliza al estado cerrado del canal, provocando una reducción en el número de canales activables .
- El residuo L585 dentro del motivo CRAC es de vital importancia para la interacción del colesterol con el canal, ya que el solo mutar este residuo a L585I es suficiente para eliminar por completo la respuesta del canal TRPV1 al colesterol.
- La respuesta del canal TRPV1 a colesterol parece ser dependiente de la especie. El canal rTRPV1 responde mejor al lípido mientras que las variantes de hTRPV1 (V585 e I585) o no presentan respuesta al lípido o la respuesta se encuentra disminuida.

## 10.-Perspectivas

El colesterol además de ser uno de los principales componentes de las membranas plasmáticas es de vital importancia para otros procesos, ya que a partir de esta molécula se sintetizan muchas de las hormonas presentes en los mamíferos. Entre las hormonas que se sintetizan a partir del colesterol se encuentran la pregnenolona, la dehidroepiandrosterona (DHEA), así como las hormonas sexuales femeninas progesterona y  $17\beta$ -estradiol y hormonas masculinas como la testosterona. Existen reportes de que algunas de estas hormonas son capaces de regular diferentes tipos de canales iónicos, entre los que se encuentran CatSper,  $GABA_A$ , receptores NMDA, de glicina y el  $5-HT_3$ <sup>112,113</sup>.

Los canales TRP no son la excepción ya que se ha demostrado que algunos de ellos son regulados por hormonas y otros compuestos esteroides, tal es el caso de TRPM3, TRPC3, TRPC4, TRPC5 y TRPC6<sup>114-116</sup>.

Para el TRPV1, Chen *et al.* reportaron que en estudios realizados con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa en neuronas DRG, esteroides como el DHEA y del  $17\beta$ -estradiol, son capaces de modular la actividad del canal TRPV1, probablemente a través de una interacción directa con el canal<sup>117</sup>.

De estos antecedentes surge la pregunta de si otras moléculas con núcleo esteroide, tanto de origen natural como sintético pueden regular algún aspecto de la función del canal TRPV1 o bien de la respuesta eléctrica de las células que expresan a este canal.

Por ende, el trabajo presentado en esta tesis referente a la determinación de los efectos del colesterol sobre la función del canal TRPV1 constituye la antesala para el estudio del efecto de otras moléculas con núcleo esteroide sobre la función del canal TRPV1.

## 11.-Bibliografía

1. Martinac, B. & Kloda, A. Evolutionary origins of mechanosensitive ion channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **82**, 11–24 (2003).
2. Tasneem, A., Iyer, L. M., Jakobsson, E. & Aravind, L. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome biology* **6**, R4 (2005).
3. Ashcroft, F. M. From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–7 (2006).
4. Darszon, a, Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. & Treviño, C. L. Ion transport in sperm signaling. *Developmental biology* **240**, 1–14 (2001).
5. Tieleman, D. P., Biggin, P. C., Smith, G. R. & Sansom, M. S. *Simulation approaches to ion channel structure-function relationships. Quarterly reviews of biophysics* **34**, 473–561 (2001).
6. Cosens, D. J. & Manning, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285–7 (1969).
7. Hardie, R. C. A brief history of *trp*: commentary and personal perspective. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **461**, 493–8 (2011).
8. Minke, B. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of neurogenetics* **24**, 216–33 (2010).
9. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–23 (1989).
10. Latorre, R., Zaelzer, C. & Brauchi, S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly reviews of biophysics* **42**, 201–46 (2009).
11. Brauchi, S. & Orio, P. Voltage sensing in thermo-TRP channels. *Advances in experimental medicine and biology* **704**, 517–30 (2011).
12. Montell, C. The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **461**, 499–506 (2011).
13. Christensen, A. P. & Corey, D. P. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 510–21 (2007).
14. Kohno, K., Sokabe, T., Tominaga, M. & Kadowaki, T. Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *The Journal of neuroscience* **30**, 12219–29 (2010).

15. Ufret-Vincenty, C. a, Klein, R. M., Hua, L., Angueyra, J. & Gordon, S. E. Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. *The Journal of biological chemistry* **286**, 9688–98 (2011).
16. Jara-Oseguera, A., Simon, S. A. & Rosenbaum, T. TRPV1: on the road to pain relief. *Current molecular pharmacology* **1**, 255–69 (2008).
17. Bishnoi, M. & Premkumar, L. S. Possible consequences of blocking transient receptor potential vanilloid. *Current pharmaceutical biotechnology* **12**, 102–14 (2011).
18. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–24 (1997).
19. Helliwell, R. J. *et al.* Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neuroscience letters* **250**, 177–80 (1998).
20. Ho, K. W., Ward, N. J. & Calkins, D. J. TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American journal of neurodegenerative disease* **1**, 1–14 (2012).
21. Liu, M., Liu, M.-C., Magoulas, C., Priestley, J. V & Willmott, N. J. Versatile regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> by vanilloid receptor I in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of biological chemistry* **278**, 5462–72 (2003).
22. Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C. & Kuraishi, Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**, 2045–8 (1998).
23. Mezey, E. *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3655–60 (2000).
24. Fernandes, E. S., Fernandes, M. a & Keeble, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British journal of pharmacology* **166**, 510–21 (2012).
25. Hamamoto, T., Takumida, M., Hirakawa, K., Tatsukawa, T. & Ishibashi, T. Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx. *Acta oto-laryngologica* **129**, 560–8 (2009).
26. Yang, D. *et al.* Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell metabolism* **12**, 130–41 (2010).
27. Zhang, L. L. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circulation research* **100**, 1063–70 (2007).



28. Inoue, K. *et al.* Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **291**, 124–9 (2002).
29. Birder, L. a *et al.* Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13396–401 (2001).
30. Mergler, S. *et al.* TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Experimental eye research* **90**, 758–70 (2010).
31. Zhang, F. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *Journal of cellular physiology* **213**, 730–9 (2007).
32. Saunders, C. I., Kunde, D. a, Crawford, A. & Geraghty, D. P. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Molecular immunology* **44**, 1429–35 (2007).
33. Kochukov, M. Y., McNearney, T. a, Fu, Y. & Westlund, K. N. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* **291**, C424–32 (2006).
34. Yang, X.-R., Lin, M.-J., McIntosh, L. S. & Sham, J. S. K. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **290**, L1267–76 (2006).
35. Kark, T. *et al.* Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Molecular pharmacology* **73**, 1405–12 (2008).
36. Akiba, Y. *et al.* Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **321**, 219–25 (2004).
37. Cavanaugh, D. J. *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *The Journal of neuroscience* **31**, 5067–77 (2011).
38. Seki, N. *et al.* Expression and localization of TRPV1 in human nasal mucosa. *Rhinology* **44**, 128–34 (2006).
39. Lishko, P. V, Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905–18 (2007).
40. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M. & Gordon, S. E. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of general physiology* **123**, 53–62 (2004).

41. Nieto-Posadas, A. *et al.* Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology* **8**, 78–85 (2012).
42. Kedei, N. *et al.* Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28613–9 (2001).
43. Tominaga, M. & Tominaga, T. Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **451**, 143–50 (2005).
44. Ferrer-Montiel, A. *et al.* Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 1820–6 (2004).
45. Smith, G. D. *et al.* TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186–90 (2002).
46. Staruschenko, A., Jeske, N. a & Akopian, A. N. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *The Journal of biological chemistry* **285**, 15167–77 (2010).
47. Salazar, H. *et al.* Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nature structural & molecular biology* **16**, 704–10 (2009).
48. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**, 515–20 (1989).
49. Salazar, H. *et al.* A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature neuroscience* **11**, 255–61 (2008).
50. Liu, L. & Simon, S. A. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *Journal of neurophysiology* **76**, 1858–69 (1996).
51. Xu, H., Blair, N. T. & Clapham, D. E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 8924–37 (2005).
52. Price, T. J., Patwardhan, A., Akopian, A. N., Hargreaves, K. M. & Flores, C. M. Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonyl-2-chloroethylamide. *British journal of pharmacology* **141**, 1118–30 (2004).
53. Hwang, S. W. *et al.* Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6155–60 (2000).

54. Tominaga, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–43 (1998).
55. Dhaka, A. *et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *The Journal of neuroscience* **29**, 153–8 (2009).
56. Nilius, B. *et al.* Gating of TRP channels: a voltage connection? *The Journal of physiology* **567**, 35–44 (2005).
57. Siemens, J. *et al.* Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* **444**, 208–12 (2006).
58. Jung, J. *et al.* Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7048–54 (2004).
59. Bhawe, G. *et al.* Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12480–5 (2003).
60. Premkumar, L. S. & Ahern, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**, 985–90 (2000).
61. Zhang, X., Huang, J. & McNaughton, P. a. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO journal* **24**, 4211–23 (2005).
62. Tominaga, M., Wada, M. & Masu, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6951–6 (2001).
63. Moriyama, T. *et al.* Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular pain* **1**, 3 (2005).
64. Koplas, P. a, Rosenberg, R. L. & Oxford, G. S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience* **17**, 3525–37 (1997).
65. Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A. & Planells-Cases, R. Agonist- and Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 19462–71 (2012).
66. Park, C.-K. *et al.* Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience* **31**, 18433–8 (2011).

67. Davis, J. B. *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183–7 (2000).
68. Caterina, M. J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)* **288**, 306–13 (2000).
69. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. a & Eid, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 357–72 (2007).
70. Miller, W. L. & Bose, H. S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of lipid research* **52**, 2111–35 (2011).
71. Paila, Y. D. & Chattopadhyay, A. Membrane cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Sub-cellular biochemistry* **51**, 439–66 (2010).
72. Lee, A. G. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends in biochemical sciences* **36**, 493–500 (2011).
73. Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A. & Romanenko, V. Cholesterol and ion channels. *Sub-cellular biochemistry* **51**, 509–49 (2010).
74. Lundbaek, J. a *et al.* Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *The Journal of general physiology* **123**, 599–621 (2004).
75. Schmidt, D. & MacKinnon, R. Voltage-dependent K<sup>+</sup> channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19276–81 (2008).
76. Yuan, C., O'Connell, R. J., Jacob, R. F., Mason, R. P. & Treistman, S. N. Regulation of the gating of BKCa channel by lipid bilayer thickness. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7276–86 (2007).
77. Matta, J. a, Miyares, R. L. & Ahern, G. P. TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of physiology* **578**, 397–411 (2007).
78. Xu, Z.-Z. *et al.* Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine* **16**, 592–7, 1p following 597 (2010).
79. Liu, M., Huang, W., Wu, D. & Priestley, J. V. TRPV1, but not P2X, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *The European journal of neuroscience* **24**, 1–6 (2006).
80. Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. & Rothblat, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research* **38**, 2264–72 (1997).

81. Heinemann, S. H. & Conti, F. Nonstationary noise analysis and application to patch clamp recordings. *Methods in enzymology* **207**, 131–48 (1992).
82. Epanand, R. M. Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Progress in lipid research* **45**, 279–94 (2006).
83. Hayes, P. *et al.* Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**, 205–15 (2000).
84. Szoke, E. *et al.* Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *European journal of pharmacology* **628**, 67–74 (2010).
85. Brownlow, S. L. & Sage, S. O. Transient receptor potential protein subunit assembly and membrane distribution in human platelets. *Thrombosis and haemostasis* **94**, 839–45 (2005).
86. Yogi, A., Callera, G. E., Tostes, R. & Touyz, R. M. Bradykinin regulates calpain and proinflammatory signaling through TRPM7-sensitive pathways in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**, R201–7 (2009).
87. Liu, B., Hui, K. & Qin, F. Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophysical journal* **85**, 2988–3006 (2003).
88. Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H. & Viana, F. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9215–24 (2009).
89. Veliz, L. a *et al.* Near-membrane dynamics and capture of TRPM8 channels within transient confinement domains. *PloS one* **5**, e13290 (2010).
90. Romanenko, V. G. *et al.* Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophysical journal* **87**, 3850–61 (2004).
91. Romanenko, V. G., Rothblat, G. H. & Levitan, I. Modulation of endothelial inward-rectifier K<sup>+</sup> current by optical isomers of cholesterol. *Biophysical journal* **83**, 3211–22 (2002).
92. Singh, D. K., Rosenhouse-Dantsker, A., Nichols, C. G., Enkvetchakul, D. & Levitan, I. Direct regulation of prokaryotic Kir channel by cholesterol. *The Journal of biological chemistry* **284**, 30727–36 (2009).
93. Bukiya, A. N., Belani, J. D., Rychnovsky, S. & Dopico, A. M. Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *The Journal of general physiology* **137**, 93–110 (2011).
94. D'Avanzo, N., Hyrc, K., Enkvetchakul, D., Covey, D. F. & Nichols, C. G. Enantioselective protein-sterol interactions mediate regulation of both

- prokaryotic and eukaryotic inward rectifier K<sup>+</sup> channels by cholesterol. *PLoS one* **6**, e19393 (2011).
95. Li, H. & Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* **139**, 4991–7 (1998).
  96. Schroeder, C. Cholesterol-binding viral proteins in virus entry and morphogenesis. *Sub-cellular biochemistry* **51**, 77–108 (2010).
  97. Epan, R. F. *et al.* Juxtamembrane protein segments that contribute to recruitment of cholesterol into domains. *Biochemistry* **45**, 6105–14 (2006).
  98. Epan, R. M. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 1576–82 (2008).
  99. Hanson, M. A. *et al.* A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* **16**, 897–905 (2008).
  100. Beel, A. J., Sakakura, M., Barrett, P. J. & Sanders, C. R. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochimica et biophysica acta* **1801**, 975–82 (2010).
  101. Abad, C., Martínez-Gil, L., Tamborero, S. & Mingarro, I. Membrane topology of gp41 and amyloid precursor protein: interfering transmembrane interactions as potential targets for HIV and Alzheimer treatment. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 2132–41 (2009).
  102. Singh, A. K. *et al.* Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-gated K<sup>+</sup> (BK) channels. *The Journal of biological chemistry* **287**, 20509–21 (2012).
  103. Rosenhouse-Dantsker, A., Logothetis, D. E. & Levitan, I. Cholesterol sensitivity of Kir2.1 is controlled by a belt of residues around the cytosolic pore. *Biophysical journal* **100**, 381–9 (2011).
  104. Epshtein, Y. *et al.* Identification of a C-terminus domain critical for the sensitivity of Kir2.1 to cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8055–60 (2009).
  105. Cantero-Recasens, G. *et al.* Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma. *The Journal of biological chemistry* **285**, 27532–5 (2010).
  106. Valdes, A. M. *et al.* The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **70**, 1556–61 (2011).

107. Kim, H. *et al.* Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain* **109**, 488–96 (2004).
108. Xu, H. *et al.* Functional effects of nonsynonymous polymorphisms in the human TRPV1 gene. *American journal of physiology. Renal physiology* **293**, F1865–76 (2007).
109. Mathew, V. & Lerman, A. Altered effects of potassium channel modulation in the coronary circulation in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **154**, 329–35 (2001).
110. Genda, S., Miura, T., Miki, T., Ichikawa, Y. & Shimamoto, K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology* **40**, 1339–46 (2002).
111. McIntyre, P. *et al.* Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British journal of pharmacology* **132**, 1084–94 (2001).
112. Lishko, P. V., Botchkina, I. L. & Kirichok, Y. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature* **471**, 387–91 (2011).
113. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M. & Wehling, M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological reviews* **52**, 513–56 (2000).
114. Wagner, T. F. J. *et al.* Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology* **10**, 1421–30 (2008).
115. Mieke, S. *et al.* Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PloS one* **7**, e35393 (2012).
116. Majeed, Y. *et al.* Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *British journal of pharmacology* **162**, 1509–20 (2011).
117. Chen, S.-C., Chang, T.-J. & Wu, F.-S. Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **311**, 529–36 (2004).

## **12.-Apéndice**

En la presente sección se muestra el artículo publicado que derivó del proyecto presentado en esta tesis, así como un artículo adicional que se obtuvo durante la realización de mis estudios de posgrado.



# Identification of a Binding Motif in the S5 Helix That Confers Cholesterol Sensitivity to the TRPV1 Ion Channel\*<sup>§</sup>

Received for publication, March 4, 2011, and in revised form, April 25, 2011. Published, JBC Papers in Press, May 9, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.237537

Giovanni Picazo-Juárez<sup>†1</sup>, Silvina Romero-Suárez<sup>‡</sup>, Andrés Nieto-Posadas<sup>‡</sup>, Itzel Llorente<sup>‡</sup>, Andrés Jara-Oseguera<sup>§</sup>, Margaret Briggs<sup>¶</sup>, Thomas J. McIntosh<sup>¶</sup>, Sidney A. Simon<sup>||</sup>, Ernesto Ladrón-de-Guevara<sup>§</sup>, León D. Islas<sup>§</sup>, and Tamara Rosenbaum<sup>‡2</sup>

From the <sup>‡</sup>Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular and the <sup>§</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, México and the Departments of <sup>¶</sup>Cell Biology and <sup>||</sup>Neurobiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710

The TRPV1 ion channel serves as an integrator of noxious stimuli with its activation linked to pain and neurogenic inflammation. Cholesterol, a major component of cell membranes, modifies the function of several types of ion channels. Here, using measurements of capsaicin-activated currents in excised patches from TRPV1-expressing HEK cells, we show that enrichment with cholesterol, but not its diastereoisomer epicholesterol, markedly decreased wild-type rat TRPV1 currents. Substitutions in the S5 helix, rTRPV1-R579D, and rTRPV1-F582Q, decreased this cholesterol response and rTRPV1-L585I was insensitive to cholesterol addition. Two human TRPV1 variants, with different amino acids at position 585, had different responses to cholesterol with hTRPV1-Ile<sup>585</sup> being insensitive to this molecule. However, hTRPV1-I585L was inhibited by cholesterol addition similar to rTRPV1 with the same S5 sequence. In the absence of capsaicin, cholesterol enrichment also inhibited TRPV1 currents induced by elevated temperature and voltage. These data suggest that there is a cholesterol-binding site in TRPV1 and that the functions of TRPV1 depend on the genetic variant and membrane cholesterol content.

The transient receptor potential (TRP)<sup>3</sup> family of ion channels is found throughout the animal kingdom and has been shown to subserve numerous functions. One extensively studied member of this family is the TRPV1 (Vanilloid 1) channel. Structurally, TRPV1 is thought to be a tetramer comprised of subunits each with six transmembrane domains (S1–S6), with the putative pore of the channel located between S5 and S6. It also contains large intracellular amino and carboxyl termini that have been shown to be involved both in channel gating and

regulation (for review, see Ref. 1). Electrophysiological studies have shown that TRPV1 is an outwardly rectifying, non-selective, and calcium-permeable cation channel (2).

Although TRPV1 is found in many organs, it is predominantly expressed in primary sensory neurons where it acts as a sensor and integrator for noxious stimuli (2). In addition to being a temperature sensor and weakly voltage-dependent, TRPV1 is sensitive to a variety of chemicals (1). Among its many chemical agonists is capsaicin, the principal pungent compound in chili peppers. The intracellular binding pocket for capsaicin has been identified in a region that spans from S2 to S4 (for review, see Ref. 1). In addition to capsaicin, many complex amphiphilic molecules have been shown to activate or inhibit TRPV1. These include polyring compounds such as resiniferatoxin (3), quinazolinone (4), evodiamine (5), 17- $\beta$ -estradiol (6), as well as molecules with long acyl and amide chains such as anandamide (7, 8), olvanil, and omega-3 polyunsaturated fatty acids (for review, see Ref. 1). Moreover, TRPV1 activity is regulated by the membrane lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (9–11).

Another important membrane lipid in terms of TRPV1 activity is cholesterol (Fig. 1). Cholesterol is a major component of plasma membranes where it increases bilayer mechanical strength, thereby helping to prevent cell lysis (12). Importantly, cholesterol has been shown to modify the function of many classes of ion channels (for review, see Ref. 13). Cholesterol can modify channel activity indirectly by altering the thickness and elastic properties of the surrounding lipid bilayer (14). In addition, in recent years compelling evidence has shown a specific interaction between cholesterol and several protein channels (13, 15). That is, based on experiments with structural analogs of cholesterol and channels with specific point mutations, it has been found that cholesterol binds to certain channel proteins, including some with structural similarities to TRPV1 (16). For either of these indirect or direct mechanisms, cholesterol modifies the energy difference between the open and closed states of the channel.

Previous studies of the effect of cholesterol on TRPV1 in whole cells showed that cholesterol depletion by incubation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) causes large decreases in capsaicin-evoked responses (17, 18). Both studies suggest that these effects could be due to TRPV1 being functional only when present in cholesterol-rich plasma membrane microdomains (rafts) that can modulate the activity of some receptors and

\* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants GM27278 (to T. J. M.) and DC-01065 (to S. A. S.) and grants Dirección General de Asuntos del Personal Académico-PAPIIT IN204111-3, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 129474, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-SNI 102152, and a grant from Fundación Miguel Alemán (to T. R.), and IN209209 and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal PIFUTP09-262 (to L. D. I.).

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

<sup>1</sup> Performed in partial fulfillment of the requirements for a Doctoral degree in Biomedical Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-55-5622-56-24; Fax: 52-55-5622-56-07; E-mail: [trosenba@ifc.unam.mx](mailto:trosenba@ifc.unam.mx).

<sup>3</sup> The abbreviations used are: TRP, transient receptor potential; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; CRAC, cholesterol recognition amino acid consensus; DRM, detergent-resistant membranes; DSM, detergent-soluble membranes.

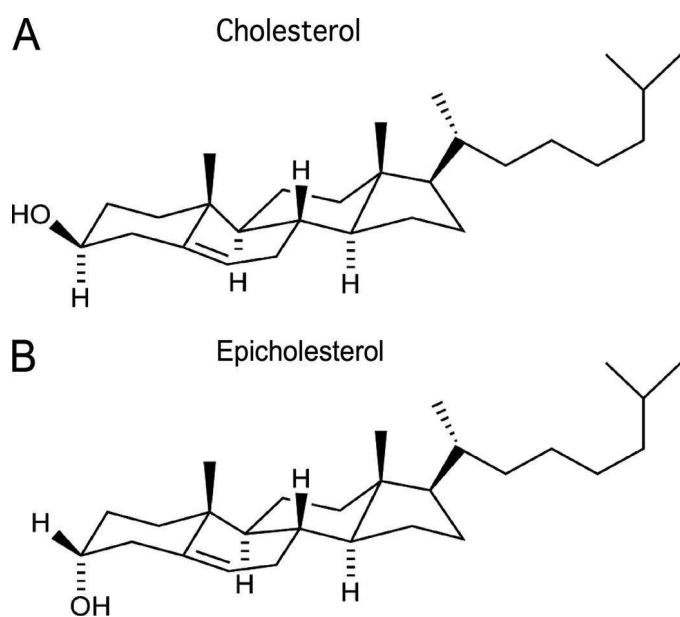


FIGURE 1. Molecular structures of cholesterol (A) and epicholesterol (B) ( $\alpha$ -3-OH-cholesterol epimeric form).

transport proteins. However, cholesterol depletion from whole cells also reduces TRPV1 concentration in the plasma membrane, thus making it difficult to determine whether the observed results are due to cholesterol effects on: 1) TRPV1 located in the plasma membrane or 2) TRPV1 trafficking in the cell (17).

Given this information, we thought it important to further explore the mechanisms by which cholesterol modifies TRPV1 activity. To avoid possible effects of TRPV1 cellular trafficking, we measured capsaicin-activated currents by patch clamping excised plasma membranes from HEK293 cells containing heterologously expressed rTRPV1. We found that the rTRPV1 currents were not changed by cholesterol depletion, but were markedly decreased by cholesterol enrichment, indicating that rTRPV1 function was modulated by cholesterol concentration in the plasma membrane. Therefore we also determined the membrane microdomain location of rTRPV1.

To determine whether there were specific cholesterol-binding sites in rTRPV1 three additional series of patch clamp experiments were performed. First, epicholesterol ( $\alpha$ -3-OH-cholesterol epimeric form) was substituted for cholesterol (see Fig. 1), as previously done with other channels (16, 19). Second, capsaicin-induced currents were measured for membranes transfected with rTRPV1s with specific point mutations in the S5 transmembrane helix, which has a sequence consistent with the cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequence found in several transmembrane proteins that bind cholesterol (20, 21). Third, currents were measured for two common hTRPV1 variants with the same S5 sequence as wild-type rTRPV1 except for one amino acid residue in the hydrophobic region of the helix. In addition, experiments were performed to determine whether cholesterol enrichment also modified heat-activated and voltage-activated TRPV1. The results from these experiments indicate that there is a cholesterol-

binding site in the TRPV1 S5 helix that when occupied by cholesterol prevents the channels from opening.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**HEK293 Cell Culture and Capsaicin-induced Currents**—HEK293 cells expressing large T antigen were transfected with wild-type and mutant pCDNA3-rTRPV1 and pIRES-GFP (BD Biosciences) with Lipofectamine (Invitrogen) following previously described methods (22, 23). Inside-out and outside-out patch clamp recordings of TRPV1 were made using  $\text{Ca}^{2+}$ -free symmetrical solutions consisting of 130 mM NaCl, 3 mM HEPES (pH 7.2), and 1 mM EDTA. Solutions were changed with an RSC-200 rapid solution changer (Molecular Kinetics, Pullman, WA). Unless otherwise indicated, all chemicals were purchased from Sigma.

Capsaicin-activation curves were measured at 120 mV and normalized to a saturating capsaicin concentration (4  $\mu\text{M}$ ). Dose-response relationships were fitted with the Hill equation,

$$\frac{I}{I_{\max}} = \left( \frac{[\text{cap}]}{[\text{cap}] + K_{1/2}} \right)^{n_H} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $I$  is the mean current,  $I_{\max}$  is the maximum current,  $K_{1/2}$  is the capsaicin concentration at  $I = I_{\max}/2$ ,  $n_H$  is the Hill coefficient, and  $[\text{cap}]$  is the capsaicin concentration.

Currents were low-pass filtered at 2 kHz and sampled at 10 kHz with an EPC 10 amplifier (HEKA Elektronik GmbH, Pfalz, Germany). For macroscopic current recordings, the following voltage protocol was used: patches were initially held at 0 mV for 10 ms, and voltage was then stepped from 0 to  $-120$  to  $120$  mV in 10-mV increments for 100 ms, and then returned back to 0 mV for 10 ms. These recordings were performed at room temperature ( $19 \pm 3$  °C). For all experiments, leak currents in the absence of capsaicin were subtracted from currents in the presence of capsaicin.

Time courses of modification by cholesterol and epicholesterol were obtained by holding the membrane potential to 0 mV and then pulsing to  $+120$  mV for 100 ms every 10 min in the presence of 4  $\mu\text{M}$  capsaicin. Data were acquired and analyzed with PULSE software (HEKA Elektronik, Germany) and were plotted and analyzed with programs written using Igor Pro (Wavemetrics Inc., Portland, OR).

**Noise Analysis**—To determine the value of the open probability ( $P_o$ ), the number of channels in the patch ( $N$ ), and the single-channel current ( $i$ ), we performed stationary noise analysis of macroscopic current traces activated by capsaicin at a voltage of 100 mV. Because currents activated instantaneously with voltage pulses, we changed the open probability by varying the concentration of capsaicin. For each patch, the mean ( $I$ ) and variance ( $\delta^2$ ) were determined from 50 to 80 current traces using the algorithm of Heinemann and Conti (24). Traces were recorded for increasing capsaicin concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 4  $\mu\text{M}$  before application of M $\beta$ CD:cholesterol and again after 60 min in the presence of M $\beta$ CD:cholesterol. Mean *versus* variance plots were fitted to the function in Equation 2.

$$\delta^2 = iI - \frac{I^2}{N} \quad (\text{Eq. 2})$$

## Direct Binding of Cholesterol Regulates TRPV1 Activity

The open probability was calculated from the relationship in Equation 3.

$$P_o = I/iN \quad (\text{Eq. 3})$$

Single-channel currents were recorded at room temperature in inside-out patches using the same solutions as for macroscopic currents. Pipettes were pulled from borosilicate glass, covered with dental wax to reduce stray capacitance, and fire polished to a resistance of 10–15 M $\Omega$  (22, 23). Currents were filtered at 2 kHz and sampled at 5 kHz. Thirty to fifty 500 ms pulses obtained at 60 mV were delivered every 200 ms and collected continuously in the presence 4  $\mu$ M capsaicin before and after exposure to cholesterol:M $\beta$ CD. Single-channel openings were detected with the 50% threshold crossing technique (25). Single channel traces were leak subtracted with a leak template formed by the average of 5–10 null sweeps. The open probability of each sweep was calculated and plotted as a function of time.

**Temperature- and Voltage-induced Currents**—For heat activation experiments, we used a temperature controlling recording chamber (Bipolar Temperature Controller TC-202, Medical Systems Corp, Greenvale, NY). The bath temperature was measured with a thermistor (Warner Instruments, Hamden, CT). Experiments were conducted at 52 °C for initial and cholesterol:M $\beta$ CD-exposed currents (60 min). At this temperature the maximal thermally induced current is evoked.

Currents activated exclusively by voltage were recorded at room temperature in the presence of Ca<sup>2+</sup>-free symmetrical solutions consisting of 200 mM NaCl, 3 mM HEPES (pH 7.2), and 1 mM EDTA. The voltage protocol used was: patches were initially held at 0 mV for 10 ms, and voltage was then stepped from –120 to 200 mV in 20-mV increments for 50 ms, and then returned back to 0 mV for 10 ms.

**Modeling of TRPV1-Cholesterol Interaction**—The structure of TRPV1 used for docking is that proposed by Fernández-Ballester and Ferrer-Montiel (26), which is a homology model based on the x-ray crystal structure of Kv1.2 (27). All dockings were carried out with the program Autodock 4.2 (28) with a Lamarckian genetic algorithm running on a desktop PC. Autodock Tools (ADT) was used to prepare files. The calculation was performed with 2.5 million evaluation steps for each conformation. The resulting 200 low-energy structures were grouped into clusters with structural deviations below 2.0-Å root mean square deviations (28). A highly populated cluster is used by Autodock as a criterion to validate the possibility of a real interaction (28). Our calculations resulted in several docking sites with similar conformations, including a single cluster of 36 conformations with cholesterol bound to the CRAC site (20, 21) in the S5 helix. Only the more populated clusters with lowest energy dockings were analyzed for protein-ligand contacts (LPC/CSU server) (see Ref. 29) (data not shown).

**Cholesterol and Epicholesterol Treatments**—To decrease or increase the membrane cholesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) content the patch was incubated with M $\beta$ CD (Sigma) or 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol, respectively (30). For all experiments the concentration of M $\beta$ CD was 3.3 mg/ml and for M $\beta$ CD:cholesterol the concentration was 0.08 mg/ml.

Epicholesterol (Fig. 1B) (Steraloids Inc., Newport, RI) was added to the membrane by incubating the patch with 10:1 M $\beta$ CD:epicholesterol (0.08 mg/ml) (31, 32).

**Site-directed Mutagenesis**—Constructs were generated by introducing mutations into the wild-type rTRPV1 and into the hTRPV1-Ile<sup>585</sup> channels. Point mutations were constructed by a two-step PCR procedure as previously described (33).

**Detergent Isolation**—Detergent-resistant membranes (DRMs) and detergent-soluble membranes (DSMs) were separated by standard techniques (34). HEK293 cells were treated with 1% Triton X-100 for 30 min at 4 °C and then applied to a discontinuous (5/35/45%) sucrose density gradient and analyzed by Western blots using a TRPV1 antibody obtained from Santa Cruz Biochemicals. Raft fractions were identified by blotting of the raft lipid GM1 with HRP-labeled cholera toxin (35, 36). Detergent isolations were performed with no pretreatments, as well as with the same treatments with M $\beta$ CD:cholesterol and M $\beta$ CD used in the patch clamp experiments.

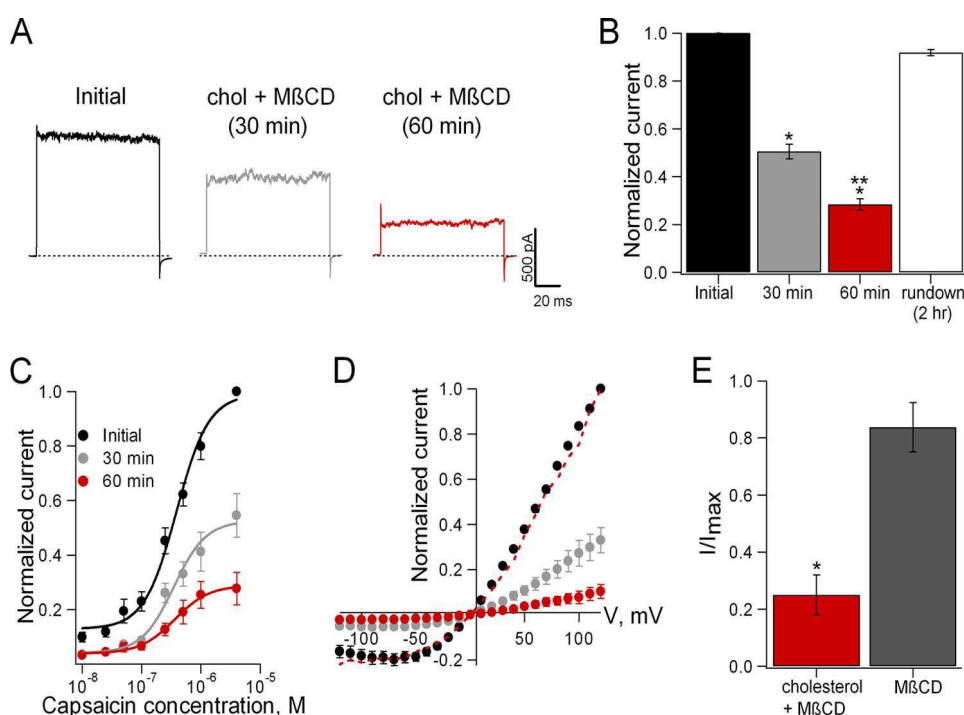
**Statistical Analysis**—Statistical comparisons were made with an analysis of variance test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. All pooled data are presented as mean  $\pm$  S.E.

## RESULTS

**Increased Membrane Cholesterol Decreased Capsaicin-induced rTRPV1 Currents**—Cholesterol is known to modify the trafficking of TRPV1 to the plasma membrane (17), as well as regulate the activity of some classes of channels (13). To isolate the effects of cholesterol on TRPV1 in the membrane from cellular trafficking processes, we measured currents from excised membrane patches of HEK293 cells containing heterologously expressed rat or human TRPV1. These patches were incubated with M $\beta$ CD or 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol to modify membrane cholesterol content (30).

Depletion of membrane cholesterol with M $\beta$ CD had no effect on capsaicin-induced rTRPV1 currents ([supplemental Fig. S1A](#)). However, at room temperature, augmentation of cholesterol with M $\beta$ CD:cholesterol significantly decreased capsaicin-evoked currents (Fig. 2). Representative current traces at 120 mV (Fig. 2A) showed that after a 60-min incubation with M $\beta$ CD:cholesterol the capsaicin-induced current decreased about 70% (Fig. 2B). Control experiments showed that even after longer incubation times in the absence of M $\beta$ CD:cholesterol, the currents did not markedly decrease (rundown) (Fig. 2B). In the presence of 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol, the capsaicin-evoked current decreased exponentially with a time constant of  $\tau = 29$  min (shown in Fig. 4C). Importantly, we found that the decrease in current seen upon cholesterol addition was reversible. That is, after a subsequent 10-min incubation of the cholesterol-enhanced patch with M $\beta$ CD alone, the current increased to  $83 \pm 8\%$  of control values (Fig. 2E and [supplemental Fig. S1B](#)).

We also measured the effects of cholesterol on capsaicin dose-response curves and current-voltage (I-V) relationships. Dose-response relationships showed that the cholesterol-induced reduction in current at 30 and 60 min incubation with M $\beta$ CD:cholesterol occurred over a range of capsaicin concentrations (Fig. 2C). The capsaicin dose-response curves were fit to the Hill equation (Equation 1) and the  $K_{1/2}$  values were  $317 \pm$



**FIGURE 2. Cholesterol enhancement reduced currents in TRPV1-expressing plasma membrane patches.** *A*, representative current traces elicited by 4  $\mu\text{M}$  capsaicin at 120 mV from inside-out patches before (*black*), 30 min (*gray*), and 60 min (*red*) after the application of 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol (0.08 mg/ml). *B*, bar chart of average currents as in *A* before (*black*,  $n = 38$ ) and after 30 min (*dark gray*,  $0.5 \pm 0.03$ ,  $n = 38$ ) and 60 min (*red*,  $0.28 \pm 0.02$ ,  $n = 31$ ) of M $\beta$ CD:cholesterol exposure. The *white bar* is current “rundown” after 2 h in the absence of M $\beta$ CD:cholesterol ( $0.92 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ). Data were normalized to initial currents (*black bar*). \* denotes  $p < 0.01$  between the initial current and 30 or 60 min with M $\beta$ CD:cholesterol, and \*\* between 30 and 60 min with M $\beta$ CD:cholesterol. *C*, dose-response relationship for capsaicin activation before (*black*,  $K_{1/2} = 317 \pm 33$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.1$ ) and after 30 min (*gray*,  $K_{1/2} = 349 \pm 35$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.1$ ) or 60 min (*red circles*,  $K_{1/2} = 323 \pm 23$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.3$ ) exposure to M $\beta$ CD:cholesterol. Smooth curves are fits with the Hill equation (Equation 1) ( $n = 6$ ). *D*, current-voltage relationships before (*black*), after 30 (*gray*) and 60 min incubation with M $\beta$ CD:cholesterol (*red*). The *red dotted curve* represents normalized currents after 60 min of cholesterol with respect to its own maximal current value. *E*, cholesterol-induced current-reduction was reversible (also see [supplemental Fig. S1](#)); the *red bar* is the average current after 60 min of M $\beta$ CD:cholesterol ( $0.25 \pm 0.07$ ) and the *gray bar* represents currents after subsequent 1 mM M $\beta$ CD treatment for 10–30 min ( $0.83 \pm 0.08$ ,  $n = 5$ ).

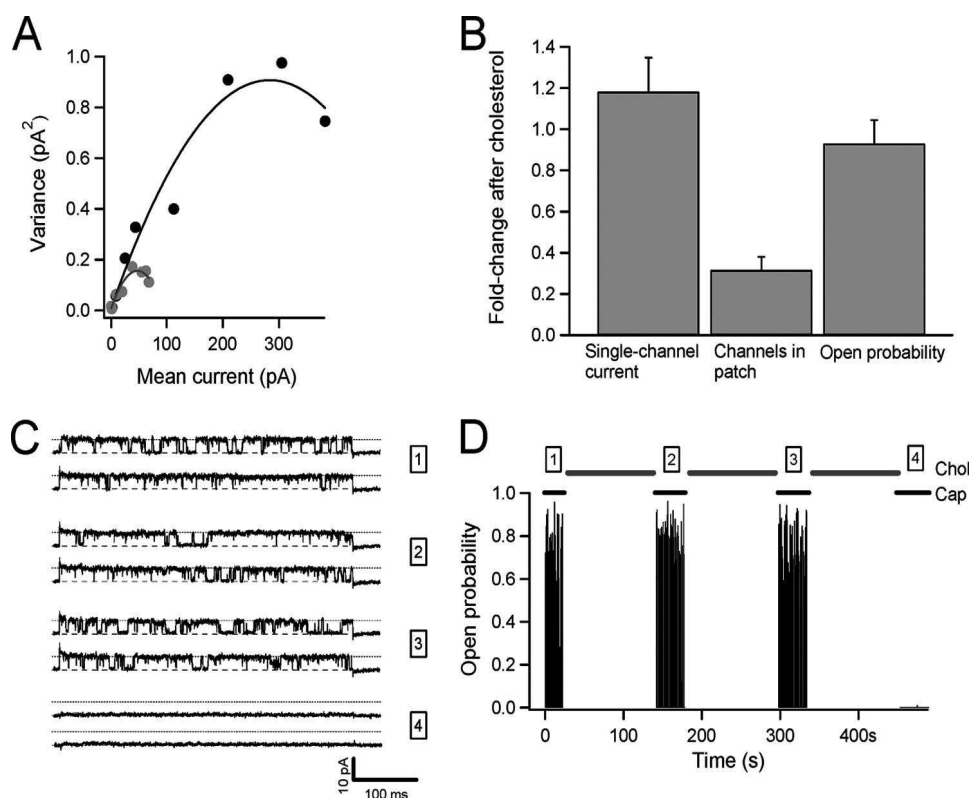
33 nM (mean  $\pm$  S.E.) before M $\beta$ CD:cholesterol treatment,  $323 \pm 23$  nM after a 30-min M $\beta$ CD:cholesterol treatment, and  $349 \pm 35$  nM after a 60-min M $\beta$ CD:cholesterol treatment, respectively. The Hill coefficients ( $n_H$  values) were  $1.6 \pm 0.1$  before M $\beta$ CD:cholesterol treatment,  $1.5 \pm 0.1$  after 30 min M $\beta$ CD:cholesterol treatment, and  $1.5 \pm 0.3$  after 60 min M $\beta$ CD:cholesterol treatment, respectively. The observation that these values of  $K_{1/2}$  and  $n_H$  were not statistically changed ( $p > 0.05$ ) provides evidence that the binding of capsaicin to its sites on TRPV1 was not markedly altered by the addition of cholesterol. In the absence of additional cholesterol, the observed TRPV1 current-voltage relationship was, as expected, outwardly rectifying with a reversal potential of near 0 mV (Fig. 2*D*). Although the addition of cholesterol decreased the capsaicin-evoked current over 60 min, it did not appreciably alter the outwardly rectifying nature of the I-V relationship (Fig. 2*D*), as the scaling of the I-V relationship at 30 and 60 min gave shapes similar to the initial I-V relationship (see *red dotted line* representing normalization of data for 60 min of cholesterol exposure to its own maximal current value). Thus, the addition of cholesterol reversibly decreased the capsaicin-induced current, without changing the binding of capsaicin to the channel or the outwardly rectifying nature of the current-voltage relationship.

To further explore the underlying cause of these observed cholesterol decreases in capsaicin-induced rTRPV1 currents, we performed noise analysis on rTRPV1 channels (37) in the presence and absence of cholesterol. Fig. 3*A* presents the experimental results at varying concentrations of capsaicin, showing

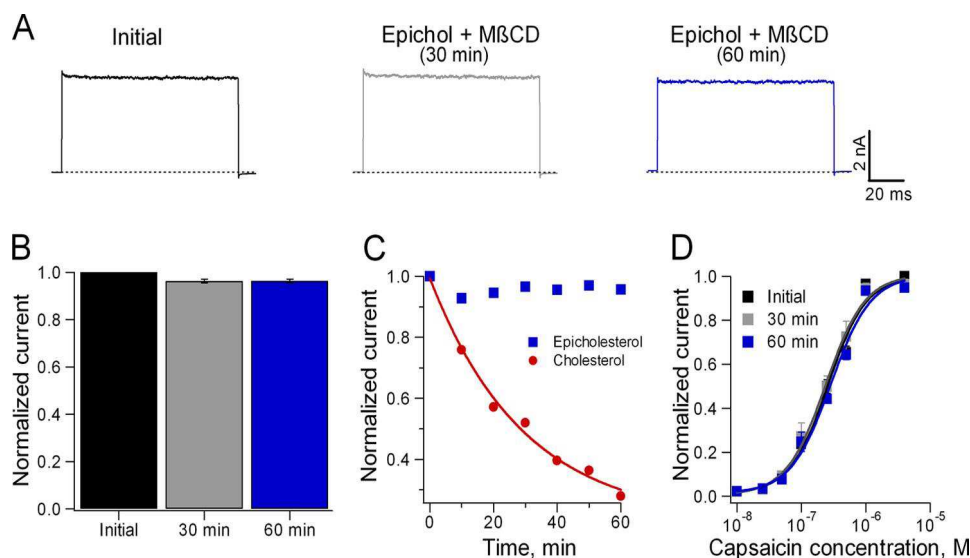
good parabolic fits to current-variance *versus* the mean current both before and after M $\beta$ CD:cholesterol incubation. Note that the initial slope of the curves before (*black*) and after M $\beta$ CD:cholesterol incubation (*gray*) were almost the same, suggesting that the open channels were unchanged. Values of  $P_o$ ,  $i$ , and  $N$  obtained from the fits shown in Fig. 3*A* and the relationship  $P_o \text{ max} = I/iN$  showed that after incorporation of cholesterol both  $i$  ( $6.85 \pm 1.41$  pA and  $7.96 \pm 1.75$  pA, before and after cholesterol, respectively) and  $P_o \text{ max}$  ( $0.95 \pm 0.17$  and  $0.89 \pm 0.33$  before and after cholesterol, respectively) remained nearly constant, whereas  $N$  decreased about 70% after a 60-min incubation ( $N_{\text{after}}/N_{\text{before}} = 0.32 \pm 0.06$ ) (Fig. 3*B*). The noise data suggests that the effect of cholesterol is to reduce the number of functional channels in the patch. In single-channel recordings we confirmed that cholesterol enhancement did not alter the single-channel current and that there were not appreciable changes in open probability (Fig. 3, *C* and *D*), until the channel suddenly disappeared from the recording after a few minutes in the presence of M $\beta$ CD:cholesterol (Fig. 3, *C* and *D*).

Thus, the incorporation of cholesterol into the membrane markedly and reversibly decreased capsaicin-induced rTRPV1 currents. We next considered if these current decreases were due to a specific cholesterol interaction with rTRPV1 by measuring currents for: 1) membranes augmented with epicholesterol and 2) membranes containing rTRPV1 with point mutations in the S5 helix at the interface with the plasma membrane.

## Direct Binding of Cholesterol Regulates TRPV1 Activity



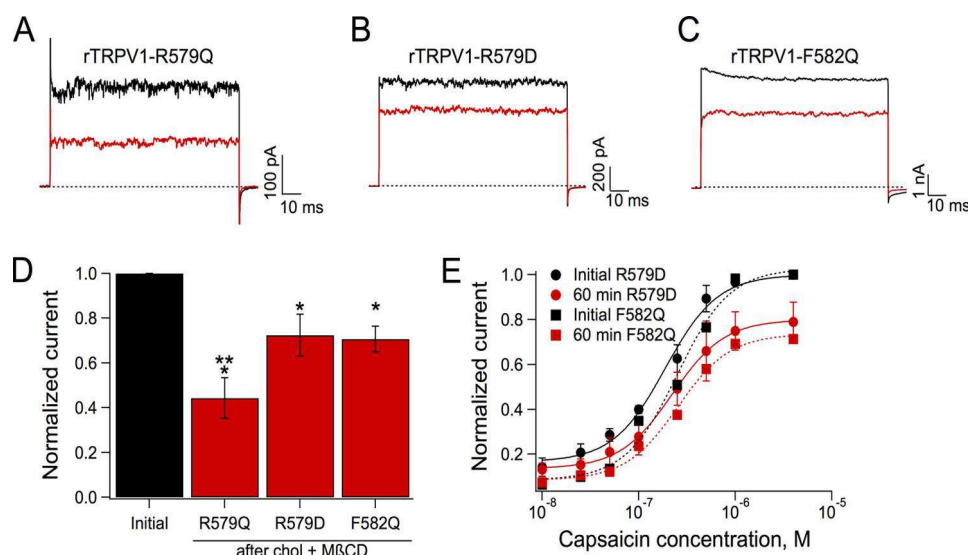
**FIGURE 3. Noise and single-channel analysis of the cholesterol effect on TRPV1 currents.** *A*, the mean variance relationship of membrane patches at 120 mV before (*black*) and after 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol applied for 60 min (*gray*). The fits using Equation 2 under “Experimental Procedures” are shown as *solid curves* and give the following parameters: before cholesterol, single channel current,  $i = 6.4$  pA, number of functional channels in the patch,  $n = 88$ , open probability ( $4 \mu\text{M}$  capsaicin),  $P_o = 0.67$ . After cholesterol,  $i = 6.5$  pA,  $n = 15$ , and  $P_o = 0.7$ . *B*, bar graph depicting the fold-change in these channel parameters as a result of M $\beta$ CD:cholesterol application for  $n = 5$  patches. *C*, consecutive current traces before (1), after 2 min (2), 4 min (3), and 5 min (4) of M $\beta$ CD:cholesterol application. The channel parameters are not altered by cholesterol until the channel can no longer be opened by capsaicin. The single channel current,  $i$ , before and after M $\beta$ CD:cholesterol are  $5.96 \pm 1.2$  and  $5.75 \pm 1.4$  pA, respectively, as estimated from the all points histogram. *D*, single-channel open probability as a function of time calculated from each current trace at 60 mV. 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol was applied for 2 min in three occasions before the channel was unable to open in the presence of  $4 \mu\text{M}$  capsaicin. The numbers in boxes correspond to the traces in *C*.



**FIGURE 4. Epicholesterol, a  $\alpha$ -3-OH diastereoisomer of cholesterol, does not mimic the effects of cholesterol on TRPV1-mediated currents.** *A*, representative current traces from inside-out excised patches elicited as described in the legend to Fig. 2. The *black trace* represents the initial current before the application of 10:1 M $\beta$ CD:epicholesterol ( $0.08 \text{ mg/ml}$ ) for 30 min (*gray trace*) and 60 min (*blue trace*). *B*, bar chart of average of currents elicited by  $4 \mu\text{M}$  capsaicin before (*black*,  $n = 5$ ), after 30 (*gray*;  $0.96 \pm 0.007$ ,  $n = 5$ ) and 60 min (*blue*,  $0.96 \pm 0.008$ ,  $n = 5$ ) of M $\beta$ CD:epicholesterol exposure. Data were normalized to the initial currents obtained in the presence of  $4 \mu\text{M}$  capsaicin (*black bar*). *C*, time courses for current reduction by treatment with M $\beta$ CD:cholesterol (*red circles*) and M $\beta$ CD:epicholesterol (*blue squares*). For M $\beta$ CD:cholesterol, the *solid curve* represents a single exponential fit with a time constant of  $\tau = 27 \pm 5$  min,  $n = 6$  for each case. *D*, dose-response curves to capsaicin before (*black*,  $K_{1/2} = 263 \pm 9 \text{ nM}$ ,  $n_H = 1.6 \pm 0.1$ ) and after incubation with M $\beta$ CD:epicholesterol for 30 min (*gray*,  $K_{1/2} = 260 \pm 16 \text{ nM}$ ,  $n_H = 1.5 \pm 0.4$ ), and for 60 min (*blue*,  $K_{1/2} = 234 \pm 34 \text{ nM}$ ,  $n_H = 1.6 \pm 0.11$ ) at 120 mV. Data were normalized to the current obtained in the presence of  $4 \mu\text{M}$  capsaicin. The *solid curves* are fits of the data with the Hill equation,  $n = 5$  for each case.

*Epicholesterol Had No Effects on Capsaicin-induced rTRPV1 Currents*—The incubation of a membrane patch with M $\beta$ CD:epicholesterol produced no significant decreases in capsaicin-

evoked currents (Fig. 4, *A* and *B*) over the same time course used for cholesterol treatment (Fig. 4*C*). Moreover, the observed capsaicin dose-response relationship overlapped in



**FIGURE 5. Amino acids Arg<sup>579</sup> and Phe<sup>582</sup> in S5 constitute part of a binding site for cholesterol.** Representative current traces (as in Fig. 1) for A, rTRPV1-R579Q, B, rTRPV1-R579D, and C, rTRPV1-F582Q in inside-out excised patches before (black) and after incubation with 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol for 60 min (red). D, bar chart of average of currents elicited by 4  $\mu$ M after 60 min of exposure to M $\beta$ CD:cholesterol for rTRPV1-R579Q ( $0.44 \pm 0.09$ ,  $n = 5$ ), rTRPV1-R579D ( $0.72 \pm 0.09$ ,  $n = 5$ ), and rTRPV1-F582Q ( $0.70 \pm 0.06$ ,  $n = 5$ ) mutants. Data were normalized to the initial currents obtained in the presence of 4  $\mu$ M. \* denotes significant differences with respect to initial values ( $p < 0.01$ ) and \*\* with respect to R579D and F582Q ( $p < 0.01$ ). E, capsaicin dose-response curves before (black circles and squares,  $K_{1/2} = 192 \pm 14$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.25$  and  $237 \pm 49$  nM,  $n_H = 1.7 \pm 0.3$  for rTRPV1-R579D and rTRPV1-F582Q, respectively) and after treatment with M $\beta$ CD:cholesterol (red circles and squares,  $K_{1/2} = 218 \pm 32$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.15$  and  $250 \pm 32$  nM,  $n_H = 1.7 \pm 0.23$  for rTRPV1-R579D and rTRPV1-F582Q, respectively).  $n = 5$  for each case.

the absence and presence of epicholesterol (Fig. 4D), giving  $K_{1/2} = 260 \pm 16$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.4$ , and  $K_{1/2} = 234 \pm 34$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.11$  after M $\beta$ CD:epicholesterol incubation for 30 and 60 min, respectively. That cholesterol and epicholesterol had significantly different effects on capsaicin-induced rTRPV1 currents (Fig. 4) suggests that there is stereospecificity in the ability of cholesterol to inhibit the capsaicin-evoked currents.

**Currents from rTRPV1 with Point Mutations in Transmembrane Helix S5**—We next measured capsaicin-induced currents from control and M $\beta$ CD:cholesterol-treated patches containing heterologously expressed rTRPV1 with point mutations at different positions in transmembrane helix S5 where we had found a CRAC sequence (Fig. 7A). Fig. 5 shows the effects of changing the positively charged arginine (Arg) with the negatively charged aspartic acid (Asp) at residue 579 (near the edge of the transmembrane region), and the aromatic phenylalanine (Phe) with the polar amino acid glutamine (Gln) at position 582 (in the hydrophobic region). Cholesterol augmentation reduced the measured currents for both rTRPV1-R579D and rTRPV1-F582Q (Fig. 5, B–D). Both mutants gave similar capsaicin dose-response curves (Fig. 5E). The coefficients before M $\beta$ CD:cholesterol treatment were  $K_{1/2} = 192 \pm 14$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.25$  and  $237 \pm 49$  nM,  $n_H = 1.7 \pm 0.3$  for rTRPV1-R579D and rTRPV1-F582Q, respectively, and after treatment with M $\beta$ CD:cholesterol  $K_{1/2} = 218 \pm 32$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.15$  and  $250 \pm 32$  nM, and  $n_H = 1.7 \pm 0.23$  for rTRPV1-R579D and rTRPV1-F582Q, respectively. Moreover, when residue 579 was changed to an electrically neutral amino acid (R579Q), the effects of cholesterol on capsaicin-activated currents were augmented with respect to the R579D mutation, thereby pointing to the importance of the presence of the charge at this site (Fig. 5, A and D).

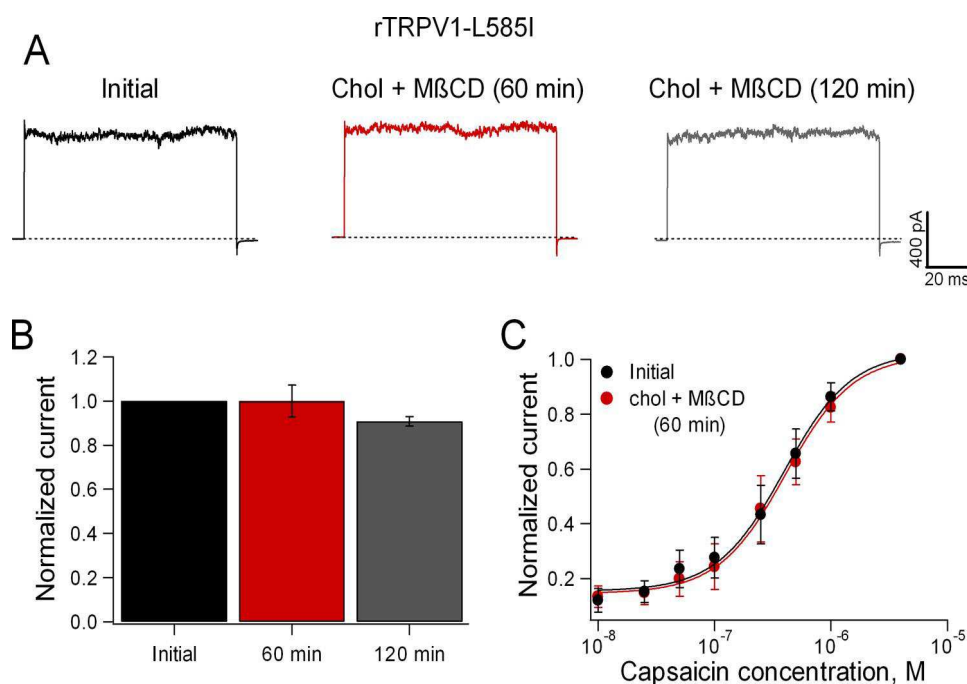
Representative current traces (Fig. 6A) and normalized currents (Fig. 6B) from membrane patches containing rTRPV1-

L585I showed that the capsaicin-induced current was essentially unchanged after M $\beta$ CD:cholesterol treatment, as were the capsaicin dose-response curves (Fig. 6C), giving  $K_{1/2} = 382 \pm 16$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.03$  before treatment and  $K_{1/2} = 396 \pm 5$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.02$  after M $\beta$ CD:cholesterol for 60 min. Thus, this single point mutation at residue 585 in S5 essentially abolished the large inhibitory cholesterol effects of wild-type rTRPV1 (Fig. 2). Consistently, the addition of cholesterol did not noticeably alter the shape of the I-V relationship in this mutant (data not shown).

**Comparisons of rTRPV1 and hTRPV1 Variants**—Human TRPV1 has two common variants containing natural point mutations at residue 585, with isoleucine (variant 1) or valine (variant 2) at that residue (38) (Fig. 7A). Cholesterol augmentation with M $\beta$ CD:cholesterol had quite different effects for variant 1 and for this variant mutated at position 585 to have the same S5 sequence as variant 2 (hTRPV1-I585V). Specifically, cholesterol augmentation had no appreciable effect on capsaicin-induced currents for membranes containing hTRPV1-Ile<sup>585</sup> (Fig. 7, B and D), whereas cholesterol augmentation reduced by about 35% the currents for membranes with hTRPV1-I585V (Fig. 7, C and D). However, the decrease in currents produced by cholesterol augmentation was greater for wild-type rTRPV1 than for either hTRPV1 variant (Fig. 7D). The values of  $K_{1/2}$  were not significantly different for the two hTRPV1 variants before ( $217 \pm 28$  and  $232 \pm 26$  nM for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> and hTRPV1-I585V, respectively) and after treatment with M $\beta$ CD:cholesterol ( $185 \pm 30$  and  $204 \pm 37$  nM for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> and hTRPV1-I585V, respectively) (Fig. 7E). Incubation with M $\beta$ CD:cholesterol did not alter the shape of the I-V relationship for either hTRPV1-Ile<sup>585</sup> or hTRPV1-I585V (Fig. 7, F and G).

We next measured capsaicin-induced currents and cholesterol sensitivity for hTRPV1-I585L, which was of interest because it has the same S5 sequence as wild-type rTRPV1 (Fig.

## Direct Binding of Cholesterol Regulates TRPV1 Activity



**FIGURE 6. Mutation of amino acid Leu<sup>585</sup> in the S5 transmembrane segment abolishes the effects of cholesterol on rTRPV1-mediated currents.** *A*, representative current traces from inside-out excised patches expressing the rTRPV1-L585I mutant elicited as described in the legend to Fig. 2 before (black) and after incubation of membrane patches for 60 (red) and 120 min (gray) with 10:1 MβCD:cholesterol. *B*, bar chart of average currents elicited by 4 μM capsaicin before (black,  $n = 5$ ), after 60 (red,  $1 \pm 0.07$ ,  $n = 10$ ) and 120 min (gray,  $0.91 \pm 0.02$ ,  $n = 5$ ) MβCD:cholesterol exposure. Data were normalized to the initial currents obtained in the presence of 4 μM (black bar). *C*, dose-response curves to capsaicin with Hill equation fits before (black,  $K_{1/2} = 382 \pm 16$  nM,  $n_H = 1.6 \pm 0.03$ ) and after MβCD:cholesterol for 60 min (red,  $K_{1/2} = 396 \pm 5$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.02$ ). Data were normalized to the current obtained in the presence of 4 μM capsaicin ( $n = 4$  for each case).

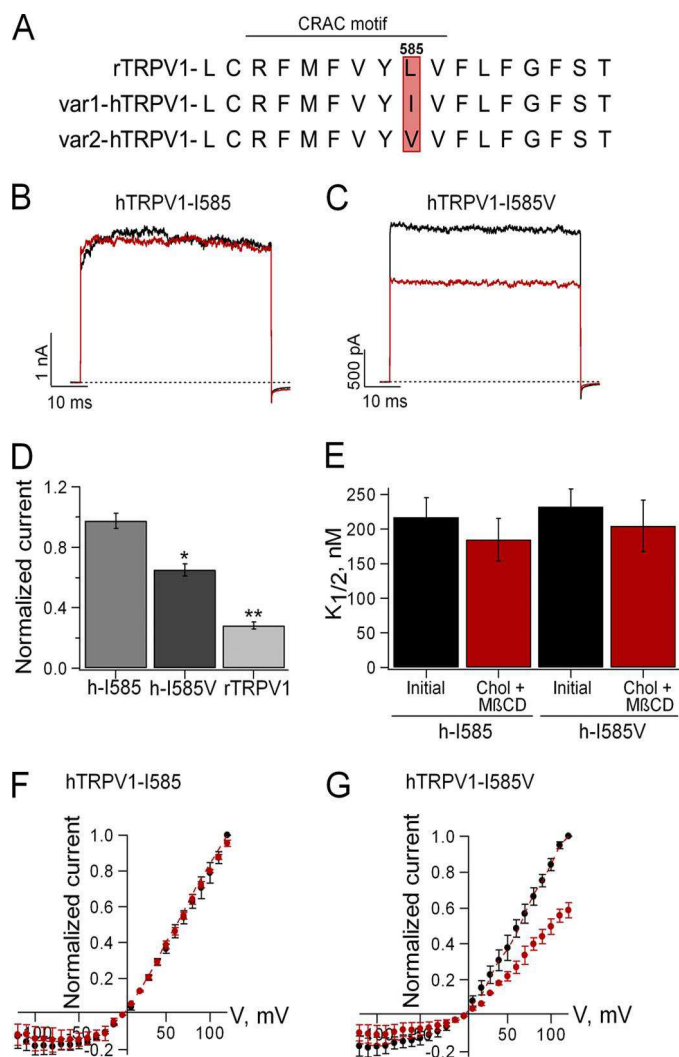
7A). For hTRPV1-I585L augmentation of cholesterol decreased the capsaicin-induced currents (Fig. 8A) to about the same extent and with the same time course as wild-type rTRPV1 (Fig. 8B). Moreover, the Hill parameters were unchanged from that of rTRPV1 (Fig. 8C) and so was the I-V relationship (data not shown). These electrophysiological data demonstrate the importance of residue 585 in S5 for the cholesterol sensitivity of TRPV1. Importantly, the inhibitory effects of cholesterol enhancement on capsaicin-induced rTRPV1 currents were also found in the absence of capsaicin when rTRPV1 was activated thermally at 52 °C (supplemental Fig. S2, A and B) as well as by voltage (supplemental Fig. 2, C and D).

**Model of Cholesterol-binding Site**—The three residues we show here to be important for cholesterol binding are predicted to be in the S5 transmembrane segment and would be facing the same side of this  $\alpha$ -helix. In other proteins (20) a cholesterol consensus motif has been proposed to be formed by a cleft in the membrane protein located at a membrane interfacial region and containing at least a positively charged residue and an aromatic residue.

To get an idea of the physical appearance of the CRAC sequence in TRPV1, we examined the two available homology models of the transmembrane domains of TRPV1 (26, 39). In both cases, amino acids Arg<sup>579</sup>, Phe<sup>582</sup>, and Leu<sup>585</sup> are facing the lipid-exposed side of the S5 helix and the sequence is very similar to the cholesterol consensus motif in  $\beta$ -adrenergic receptors (20). We carried out a docking experiment using the model of Fernández-Ballester and Ferrer-Montiel (26) as a docking template and cholesterol as the ligand. Fig. 9 shows the 5 best structures of cholesterol docked in the S5 of TRPV1. These correspond to a larger cluster (36 of 200 results with root

mean square deviations below 2 Å) interacting at the site identified by mutagenesis, calculated with the Autodock suite. In this model of cholesterol binding, the OH group makes a possible electrostatic interaction with Arg<sup>579</sup> and the flat  $\alpha$ -face of cholesterol is stacked against Phe<sup>582</sup>, which is an interaction seen very often in crystal structures of proteins bound to cholesterol and other sterols (20, 40). The important interaction with residue Leu<sup>585</sup> seems to be mediated by the aliphatic tail of cholesterol, which enters an incipient cavity formed by Leu<sup>585</sup> and other hydrophobic residues. When Leu<sup>585</sup> is mutated to an Ile residue, the cavity is reduced in size, suggesting an explanation for the lack of effect of cholesterol in L585I and the Ile<sup>585</sup> human isoform. Modeling also suggests a reason why epicholesterol might not be able to favorably interact with TRPV1. Epicholesterol can be docked in the same general site as cholesterol with poor clustering results (9/200 below 2-Å root mean square deviations, see “Experimental Procedures”) (supplemental Fig. S3). The aliphatic tail of epicholesterol makes an interaction with Leu<sup>585</sup>, but the position of the OH group on the  $\alpha$ -face (Fig. 9) increases its van der Waals volume, as compared with cholesterol, making it difficult for Phe<sup>582</sup> to interact with the  $\alpha$ -face of epicholesterol. The increased volume also makes the simultaneous interaction with all three residues more energetically unfavorable.

**TRPV1 Was in Detergent-soluble Membranes**—Because previous electrophysiological studies have suggested that rTRPV1 is primarily localized in membrane raft microdomains (17, 18), we performed studies to determine whether rTRPV1 extracts with DSMs or DRMs from HEK293 cells. DSMs, which contain relatively low concentrations of cholesterol, and DRMs, which have higher cholesterol concentrations, are thought to corre-



**FIGURE 7. Cholesterol enhancement of responses for two human TRPV1 variants.** *A*, sequence alignment of the S5 transmembrane segment of rTRPV1 and two common hTRPV1 variants, variant "1" with Ile<sup>585</sup> and variant "2" with Val<sup>585</sup>. The CRAC motif is noted. The red box highlights amino acid 585. Representative current traces from inside-out excised patches elicited by 4  $\mu$ M capsaicin before (black) and after 60 min (red) incubation with 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol for *B*, hTRPV1-I585, and *C*, hTRPV1-I585V. *D*, bar chart of average currents elicited by 4  $\mu$ M after 60 min of exposure to M $\beta$ CD:cholesterol for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> ( $0.97 \pm 0.05$ ,  $n = 9$ ) and hTRPV1-I585V ( $0.65 \pm 0.04$ ,  $n = 8$ ) variants and rTRPV1 ( $0.28 \pm 0.02$ ,  $n = 31$ ). M $\beta$ CD:cholesterol data were normalized to the initial currents obtained in the presence of 4  $\mu$ M. \* denotes significant differences with respect to hTRPV1-Ile<sup>585</sup> ( $p < 0.05$ ) and \*\* denotes a difference of rTRPV1 with respect to both human variants ( $p < 0.01$ ). *E*, capsaicin sensitivities before (black,  $K_{1/2} = 217 \pm 28$  nM,  $n_H = 1.4 \pm 0.08$  and  $232 \pm 26$  nM,  $n_H = 1.4 \pm 0.07$  for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> and hTRPV1-I585V, respectively) and after treatment with M $\beta$ CD:cholesterol (red,  $K_{1/2} = 185 \pm 30$  nM,  $n_H = 1.5 \pm 0.08$  and  $204 \pm 37$  nM,  $n_H = 1.4 \pm 0.09$  for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> and hTRPV1-I585V).  $n = 5$  for each case. *F* and *G*, current to voltage relationships for hTRPV1-Ile<sup>585</sup> and hTRPV1-I585V variants, respectively, before (black symbols) and after (red symbols) a 60-min M $\beta$ CD:cholesterol treatment. Dotted curves are the data after cholesterol application normalized to their maximal value.

spond to putative non-raft and raft microdomains, respectively (34). Both before and after M $\beta$ CD or M $\beta$ CD:cholesterol treatment, rTRPV1 was found in DSM fractions and there was no detectable rTRPV1 in DRM fractions (supplemental Fig. S4).

## DISCUSSION

In these studies we have shown that cholesterol, an important component of cell plasma membranes, modulates the function of the cation-selective channel TRPV1. Although

depletion of membrane cholesterol had no effect on capsaicin-induced TRPV1 currents, augmentation of cholesterol markedly reduced these currents in both wild-type rat TRPV1 and one of the major human variants of TRPV1. Specifically, we found that the addition of cholesterol inhibits TRPV1 by binding to specific sites along the S5 helix having a putative CRAC motif. These data suggest the extent cholesterol alters the function of TRPV1 is dependent on the species and membrane cholesterol content.

All of the electrophysiology experiments reported in this article were performed on patches excised from HEK293 cells with heterologously expressed rTRPV1 channels. Therefore, the observed effects of membrane cholesterol depletion or augmentation had to be due to changes within this excised membrane, rather than to possible modifications in cell trafficking. We found that cholesterol depletion had no effect on the currents (Fig. 2), which contrasts to electrophysiological data from whole cells where cholesterol depletion reduced capsaicin-induced currents (17, 18). We argue that this means that the observed results in whole cells upon M $\beta$ CD treatment were due to the role of cholesterol in membrane trafficking in the cell, consistent with the observation that cholesterol depletion decreased the concentration of rTRPV1 in the plasma membrane (17). Moreover, this interpretation is consistent with the results of Liu *et al.* (41) who found for whole cells that cholesterol removal caused no appreciable change in temperature-induced rTRPV1 currents over a range of temperatures (44 to 50  $^{\circ}$ C).

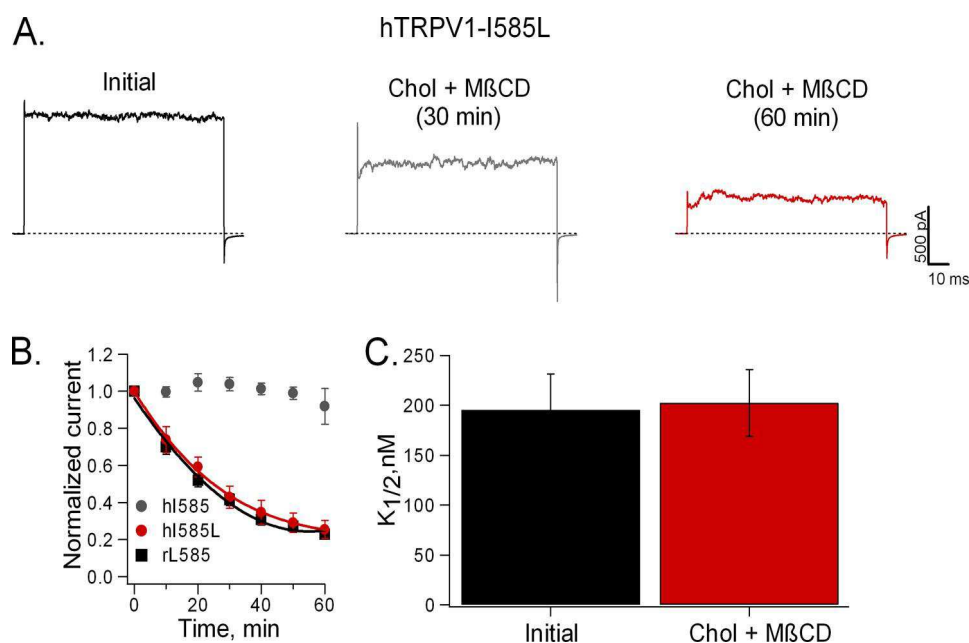
In contrast to the non-effect of cholesterol depletion, cholesterol augmentation significantly and reversibly reduced capsaicin-induced rTRPV1 currents (Fig. 2). In terms of molecular mechanism, the similarity in shape of the dose-response curves before and after cholesterol augmentation (Fig. 2C) suggests that cholesterol addition had no appreciable effect on the affinity of capsaicin to its binding site. The similar shapes of the I-V curves (Fig. 2D) suggest that there was little change in the voltage-sensing domain. Importantly, the noise analysis experiments revealed that the decrease in current with cholesterol addition did not arise from a significant change in the conducting channels as reflected in no appreciable changes in the single channel current ( $i$ ) or open probability ( $P_o$ ), but rather a decrease in the number of agonist-responsive channels in the patch (Fig. 3B). Our single-channel recordings also suggest that cholesterol sequesters the channel in a non-conducting state. These data could be interpreted to mean that cholesterol impedes channel opening (see Refs. 19 and 42).

Unlike cholesterol, epicholesterol did not modify the capsaicin-evoked current (Fig. 4), indicating that the effect of cholesterol is not due to a nonspecific membrane effect, but rather to a stereospecific binding site. Similar results with other channels, including inward-rectifier K<sup>+</sup> channels and large-conductance voltage/Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channels, have also been interpreted to mean that the effect of cholesterol are not due to an indirect modification of lipid bilayer properties, but rather to a stereospecific interaction at the surface of the protein (19, 32).

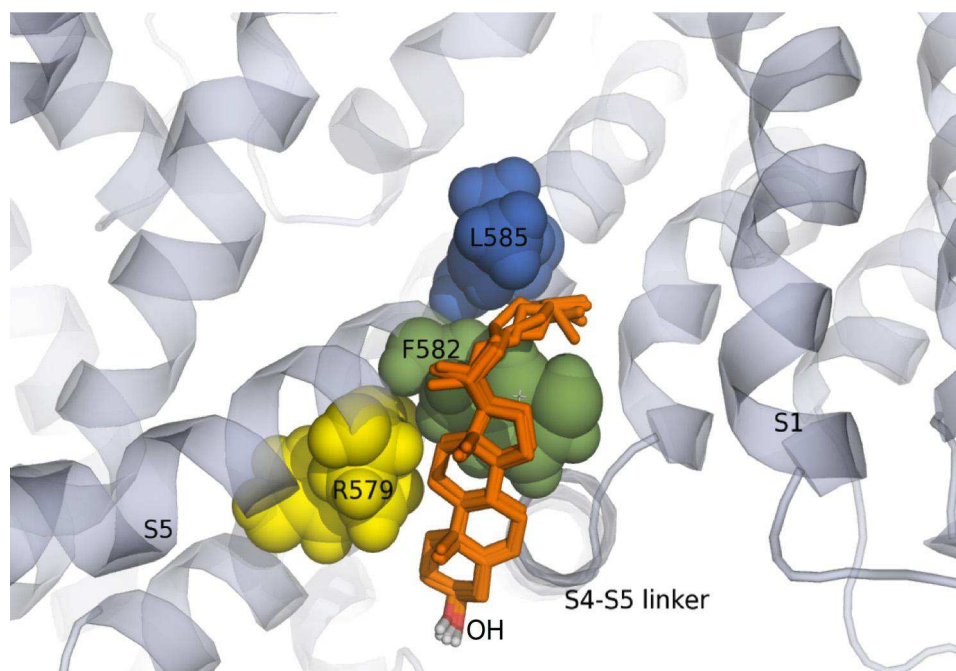
We consequently explored rTRPV1 for possible cholesterol-binding sites. One established sequence selective for binding cholesterol is the putative CRAC motif, first identified in the



## Direct Binding of Cholesterol Regulates TRPV1 Activity



**FIGURE 8. The I585L substitution in hTRPV1 renders the channel cholesterol-sensitive.** *A*, representative current traces from inside-out excised patches before (*black*) and after incubation with 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol for 30 (*gray*) and 60 min (*red*). *B*, time course for effects of cholesterol. Application of M $\beta$ CD:cholesterol for 60 min to the hTRPV1-Ile<sup>585</sup> variant did not decrease the current (*gray circles*,  $n = 5$ ). The hTRPV1-I585L mutant responded to cholesterol with a  $\tau$  of  $32 \pm 7$  min (*red circles*,  $n = 5$ ), similar to that of the rat TRPV1 (*black squares*,  $\tau = 27 \pm 5$  min;  $n = 5$ ). Data were fit to a single exponential. *C*, capsaicin sensitivity of hTRPV1-I585L before (*black*,  $K_{1/2} = 195 \pm 36$  nM and  $n_H = 1.5 \pm 0.3$ ) and after cholesterol (*red*,  $K_{1/2} = 202 \pm 34$  nM and  $n_H = 1.5 \pm 0.3$ ).  $n = 5$  for each case.



**FIGURE 9. Model for cholesterol binding to S5 in TRPV1.** The best five conformations of cholesterol docked to the S5 of the TRPV1 model. These are the lowest energy conformations (between  $-7.15$  and  $-7.06$  kcal/mol) taken from the cluster of 36 similar dockings. In this binding conformation, cholesterol occupies a groove formed between S5 and the putative voltage-sensing domain of the adjacent subunit. The bulky  $\beta$ -face of cholesterol points away from the S5 helix, the OH group (*red* and *white*) points toward Arg<sup>579</sup> (*yellow*), possibly establishing an electrostatic interaction. The  $\alpha$ -face of cholesterol, which is essentially flat, makes a hydrophobic  $\pi$ -aliphatic interaction with Phe<sup>582</sup> (*green*). The aliphatic tail in cholesterol occupies a small cavity in which it interacts with Leu<sup>585</sup> (*blue*) of the rat TRPV1, a position in which I and V can be found for the human TRPV1 orthologue.

benzodiazepine receptor (43) and later identified in many other proteins and peptides (40, 44, 45). This motif is defined as a sequence pattern of  $-(\text{Leu/Val}-(X)_{1-5}-\text{Tyr}-(X)_{1-5}-\text{Arg/Lys})-$ , in which  $(X)_{1-5}$  represents between one and five residues of any amino acid (40, 45). Cholesterol interacts with the CRAC motif with both attractive van der Waals interactions between hydrophobic surfaces and electrostatic interactions between the positively charged Arg or Lys residue and the cholesterol -OH

group (40, 45). In a study of a peptide from the fusogenic gp41 protein of HIV-1, Epan *et al.* (40) found that the single Leu to Ile substitution in the CRAC motif (from LWYIK to IWYIK) resulted in no preferential interaction with cholesterol (33). Another cholesterol binding motif, called the cholesterol consensus motif, also found in many proteins, has three sites (Trp/Tyr)-(Ile/Val/Leu)-(Lys/Arg) on one helix and one site (Phe/Tyr/Trp) on an adjoining helix (20). For example, in the crystal

structure of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor, Hanson *et al.* (20) found that cholesterol binds in a shallow groove between these helices. As with the CRAC motif, key features of the cholesterol consensus motif are the van der Waals interactions of the cholesterol with the aromatic residues and electrostatic interactions with positively charged residues (20).

A cholesterol-binding motif in rTRPV1 is located in the S5 helix, which contains a CRAC sequence from residue 579 to 586 (Fig. 7A). Our experiments showing different sensitivities to cholesterol augmentation of specific rat mutants (Figs. 5 and 6) and human variants (Figs. 7 and 8) provide strong evidence for the presence of a cholesterol-binding site in helix S5. Two points here are worth discussing. First, the abrogation of most of the sensitivity to cholesterol augmentation by the rTRPV1-L585I mutation (Fig. 6) and the restoration of this sensitivity by the inverse mutation in hTRPV1-I585L (Fig. 8), shows the importance of hydrophobic interactions for this cholesterol effect. Given that the Leu to Ile mutation is rather subtle, its effect also highlights the importance of steric factors in the interaction. Second, given that the CRAC sequence contains a positively charged (Arg or Lys) residue, it might seem surprising that the R579D mutation (positive to negative charge with different side chain volumes) retained sensitivity to cholesterol augmentation, albeit reduced (Fig. 5B). However, the interaction with the -OH dipole can occur with charges of either sign (20) in a manner that may be enough to stabilize the interaction of cholesterol with the protein. Our data imply that in the case of rTRPV1, the positive charge Arg<sup>579</sup> contributed a fraction of the stabilization energy because charge neutralization (R579Q) rendered TRPV1 more sensitive to cholesterol than charge reversal (R579D) (Fig. 5).

Recently, Rosenhouse-Dankster *et al.* (46) have further characterized the interaction of Kir2.1 channels with cholesterol. By using a combination of electrophysiological recordings and mutagenesis as well as modeling based on the crystal structure of Kir2.1 they have concluded that cholesterol does not appear to have a typical binding pocket in Kir2.1. Rather they found that a more complex belt-like structure is formed to contain the apex of the flexible G-loop near the interface with the transmembrane region, affecting channel gating in a manner that stabilizes the closed state of the channel (46). The question remains whether other regions of TRPV1 also interact with the S5 CRAC motif to form a more complex cholesterol-stabilizing structure.

Although there are many variants of human hTRPV1 subunits (47), two very common alleles (I and V) were identified at position 585 (see Fig. 7A). In a genetic and functional screening of hTRPV1 variants obtained from a human population, Cantero-Recasens *et al.* (48) found that at amino acid 585, 51% are heterozygous (Ile/Val), 15% are homozygous for Val/Val, and 34% homozygous for Ile/Ile. They found these variants could be activated by capsaicin, which we have confirmed. Moreover, we found that the two variants had different responses to cholesterol addition (Fig. 7, B–D), which represents, to our knowledge, the first demonstrated functional difference between these two variants. Given that rTRPV1-L585I was insensitive to cholesterol augmentation (Fig. 6), it was gratifying to find that hTRPV1-Ile<sup>585</sup>, with the same S5 sequence as rTRPV1-L585I,

was also insensitive to cholesterol augmentation (Fig. 7B). Thus, a single amino acid substitution dramatically altered the sensitivity of TRPV1 to cholesterol among species.

It follows that the observed decreases in capsaicin-induced currents by cholesterol augmentation were due to specific interactions with a cholesterol-binding site in the S5 transmembrane helix of TRPV1. We have identified critical amino acids on the S5 helix that greatly affected how TRPV1 responds in the presence of cholesterol. Based on the similarities of capsaicin dose-response and I-V curves before and after cholesterol addition, the cholesterol effects are not due to changes in capsaicin binding or channel selectivity. Rather we argue that cholesterol binding must cause a conformational change in TRPV1 that stabilizes the closed state(s) (41) of the channel. A similar conclusion was reached in a noise analysis study of Kir2.1 channels (19).

The time required to inhibit rTRPV1 with M $\beta$ CD:cholesterol incubation was greater than the time for recovery of the current with the same concentration of M $\beta$ CD (Fig. 2 and [supplemental Fig. S1](#)). Let us consider possible reasons for this observation. First, the membrane bilayer contains many more cholesterol-binding sites (each monolayer with its raft and non-raft regions) than do the TRPV1 channels embedded in the bilayer. Thus, from mass action principle, it follows that cholesterol would initially preferentially partition into the bilayer sites and the channel sites would take longer to fill. The TRPV1 channel is formed from tetramers, and cholesterol has to partition between subunits to get to its sites within the protein. Moreover, it may take all four sites to be occupied for the channels to fully close. We argue that this latter process may be the rate-limiting step. One possibility for the faster recovery time is that the removal of cholesterol from only one (or two) of the subunits may be sufficient for the channel to reopen.

Our result (see [supplemental Fig. S4](#)) that rTRPV1 is primarily located in cholesterol-poor DSMs (thought to be related to non-raft microdomains) is similar to results for TRPC3 and TRPC6 (49), but in contrast to other TRP channels, such as TRPC1, TRPC4, and TRPC5 (49) and TRPM8 (42), that have been associated with cholesterol-rich DRMs. Although the reasons for these different microdomain locations are not clear, the different locations can impact on the TRP channels' response to cholesterol. Thus, the cholesterol-rich raft microdomain location of TRPM8 helps to explain why M $\beta$ CD treatment increases cold-evoked TRPM8 currents in cells (42), whereas the non-raft localization of rTRPV1 (data seen in [supplemental Fig. S4](#)) helps explain why M $\beta$ CD treatment does not modify the capsaicin-induced current of this channel in HEK293 cells (Fig. 2 and [supplemental Fig. S1](#)).

TRPV1 is known to serve many physiological functions and is also involved in pathological conditions (for review, see Ref. 1). Here we consider the physiological significance of the observations that the activity of both rTRPV1 and hTRPV1 can be diminished by cholesterol. This is relevant because different cells have different cholesterol concentrations, with the cholesterol unequally partitioned between plasma and organelle membranes. Moreover, many plasma membranes contain transient cholesterol-rich raft and cholesterol-poor non-raft microdomains. Here we have shown that rTRPV1 is located in

## Direct Binding of Cholesterol Regulates TRPV1 Activity

DSM (non-raft) fractions (supplemental Fig. S4). We speculate that the activity of TRPV1 could be regulated by expression of the Val/Val or Ile/Ile variants in cells with different cholesterol concentrations, or by transferring them between non-raft (low cholesterol) and raft (high cholesterol) microdomains within a given plasma membrane. For example, after exposure to bradykinin TRPM7 channels have been shown to relocalize from cholesterol-poor (non-raft) to cholesterol-rich (raft) domains (50). In the future, these variants may prove to display a physiologically important role in humans containing both variants of TRPV1 under conditions of hypercholesterolemia, for instance. Our data also argue in favor of a species-specific sensitivity of TRPV1 to cholesterol as happens for the Kir6 channel, which shows differences in cholesterol sensitivity in a porcine model (51) as compared with a rabbit model (52). These findings and our own suggest that the same channel can be differentially regulated by cholesterol in different species.

*Acknowledgments*—We thank David Julius, University of California at San Francisco, for providing the TRPV1 cDNA and Dr. Wolfgang Liedtke, Duke University, for supplying cells for the detergent extraction experiments. We also thank Félix Sierra, Laura Ongay, Guadalupe Códiz, Ana Escalante, and Francisco Pérez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM and Sukhee Lee, Duke, for expert technical support, and Hiram Picazo for artwork.

### REFERENCES

- Jara-Oseguera, A., Simon, S. A., and Rosenbaum, T. (2008) *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 255–269
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997) *Nature* **389**, 816–824
- Szallasi, A., and Blumberg, P. M. (1989) *Neuroscience* **30**, 515–520
- Culshaw, A. J., Bevan, S., Christiansen, M., Copp, P., Davis, A., Davis, C., Dyson, A., Dziadulewicz, E. K., Edwards, L., Eggelte, H., Fox, A., Gentry, C., Groarke, A., Hallett, A., Hart, T. W., Hughes, G. A., Knights, S., Kotonis, P., Lee, W., Lyothier, I., McBryde, A., McIntyre, P., Paloumbis, G., Panesar, M., Patel, S., Seiler, M. P., Yaqoob, M., and Zimmermann, K. (2006) *J. Med. Chem.* **49**, 471–474
- Pearce, L. V., Petukhov, P. A., Szabo, T., Kedei, N., Bizik, F., Kozikowski, A. P., and Blumberg, P. M. (2004) *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2281–2286
- Xu, S., Cheng, Y., Keast, J. R., and Osborne, P. B. (2008) *Endocrinology* **149**, 5540–5548
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Davis, J. B., Pertwee, R. G., and Di Marzo, V. (2000) *FEBS Lett.* **483**, 52–56
- Ross, R. A. (2003) *Br. J. Pharmacol.* **140**, 790–801
- Stein, A. T., Ufret-Vincenty, C. A., Hua, L., Santana, L. F., and Gordon, S. E. (2006) *J. Gen. Physiol.* **128**, 509–522
- Ufret-Vincenty, C. A., Klein, R. M., Hua, L., Angueyra, J., and Gordon, S. E. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 9688–9698
- Yao, J., and Qin, F. (2009) *PLoS Biol.* **7**, e46
- Salton, M. R. (1968) *J. Gen. Physiol.* **52**, (suppl.) 227–252
- Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., and Romanenko, V. (2010) *Subcell. Biochem.* **51**, 509–549
- Levitan, I., Christian, A. E., Tulenko, T. N., and Rothblat, G. H. (2000) *J. Gen. Physiol.* **115**, 405–416
- Levitan, I. (2009) *IUBMB Life* **61**, 781–790
- Singh, D. K., Rosenhouse-Dantsker, A., Nichols, C. G., Enkvetchakul, D., and Levitan, I. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 30727–30736
- Liu, M., Huang, W., Wu, D., and Priestley, J. V. (2006) *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1–6
- Szoke, E., Börzsei, R., Tóth, D. M., Lengel, O., Helyes, Z., Sándor, Z., and Szolcsányi, J. (2010) *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 67–74
- Romanenko, V. G., Fang, Y., Byfield, F., Travis, A. J., Vandenberg, C. A., Rothblat, G. H., and Levitan, I. (2004) *Biophys. J.* **87**, 3850–3861
- Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y., Velasquez, J., Kuhn, P., and Stevens, R. C. (2008) *Structure* **16**, 897–905
- Oddi, S., Dainese, E., Fezza, F., Lanuti, M., Barcaroli, D., De Laurenzi, V., Centonze, D., and Maccarrone, M. (2011) *J. Neurochem.* **116**, 858–865
- Salazar, H., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., García-Villegas, R., Munari, M., Gordon, S. E., Islas, L. D., and Rosenbaum, T. (2008) *Nat. Neurosci.* **11**, 255–261
- Salazar, H., Jara-Oseguera, A., Hernández-García, E., Llorente, I., Arias-Olguí, II, Soriano-García, M., Islas, L. D., and Rosenbaum, T. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 704–710
- Heinemann, S. H., and Conti, F. (1992) *Methods Enzymol.* **207**, 131–148
- Colquhoun, D., and Sigworth, F. J. (1995) *Fitting and Statistical Analysis of Single-channel Records*, Second Ed., Plenum Publishing Corp., New York
- Fernández-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2008) *J. Membr. Biol.* **223**, 161–172
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) *Nature* **450**, 376–382
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. (2007) *J. Comput. Chem.* **28**, 1145–1152
- Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E. E., and Edelman, M. (1999) *Bioinformatics* **15**, 327–332
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C., and Rothblat, G. H. (1997) *J. Lipid Res.* **38**, 2264–2272
- Romanenko, V. G., Rothblat, G. H., and Levitan, I. (2002) *Biophys. J.* **83**, 3211–3222
- Bukiya, A. N., Belani, J. D., Rychnovsky, S., and Dopico, A. M. (2011) *J. Gen. Physiol.* **137**, 93–110
- Rosenbaum, T., and Gordon, S. E. (2002) *Neuron* **33**, 703–713
- Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533–544
- Tkachenko, E., and Simons, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19946–19951
- Tong, J., Briggs, M. M., Mlaver, D., Vidal, A., and McIntosh, T. J. (2009) *Biophys. J.* **97**, 2493–2502
- Oseguera, A. J., Islas, L. D., García-Villegas, R., and Rosenbaum, T. (2007) *Biophys. J.* **92**, 3901–3914
- Hayes, P., Meadows, H. J., Gunthorpe, M. J., Harries, M. H., Duckworth, D. M., Cairns, W., Harrison, D. C., Clarke, C. E., Ellington, K., Prinjha, R. K., Barton, A. J., Medhurst, A. D., Smith, G. D., Topp, S., Murdock, P., Sanger, G. J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C. D., Randall, A. D., Gloger, I. S., and Davis, J. B. (2000) *Pain* **88**, 205–215
- Brauchi, S., Orta, G., Mascayano, C., Salazar, M., Raddatz, N., Urbina, H., Rosenmann, E., Gonzalez-Nilo, F., and Latorre, R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 10246–10251
- Eband, R. F., Thomas, A., Brasseur, R., Vishwanathan, S. A., Hunter, E., and Eband, R. M. (2006) *Biochemistry* **45**, 6105–6114
- Liu, B., Hui, K., and Qin, F. (2003) *Biophys. J.* **85**, 2988–3006
- Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H., and Viana, F. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 9215–9224
- Jamin, N., Neumann, J. M., Ostuni, M. A., Vu, T. K., Yao, Z. X., Murail, S., Robert, J. C., Giatzakis, C., Papadopoulos, V., and Lacapère, J. J. (2005) *Mol. Endocrinol.* **19**, 588–594
- Eband, R. M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1576–1582
- Eband, R. M. (2006) *Prog. Lipid Res.* **45**, 279–294
- Rosenhouse-Dantsker, A., Logothetis, D. E., and Levitan, I. (2011) *Biophys. J.* **100**, 381–389
- Schumacher, M. A., and Eilers, H. (2010) *Front. Biosci.* **15**, 872–882
- Cantero-Recasens, G., Gonzalez, J. R., Fandos, C., Duran-Tauleria, E., Smit, L. A., Kauffmann, F., Antó, J. M., and Valverde, M. A. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 27532–27535
- Brownlow, S. L., and Sage, S. O. (2005) *Thromb. Haemost.* **94**, 839–845
- Yogi, A., Callera, G. E., Tostes, R., and Touyz, R. M. (2009) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R201–207
- Mathew, V., and Lerman, A. (2001) *Atherosclerosis* **154**, 329–335
- Genda, S., Miura, T., Miki, T., Ichikawa, Y., and Shimamoto, K. (2002) *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1339–1346

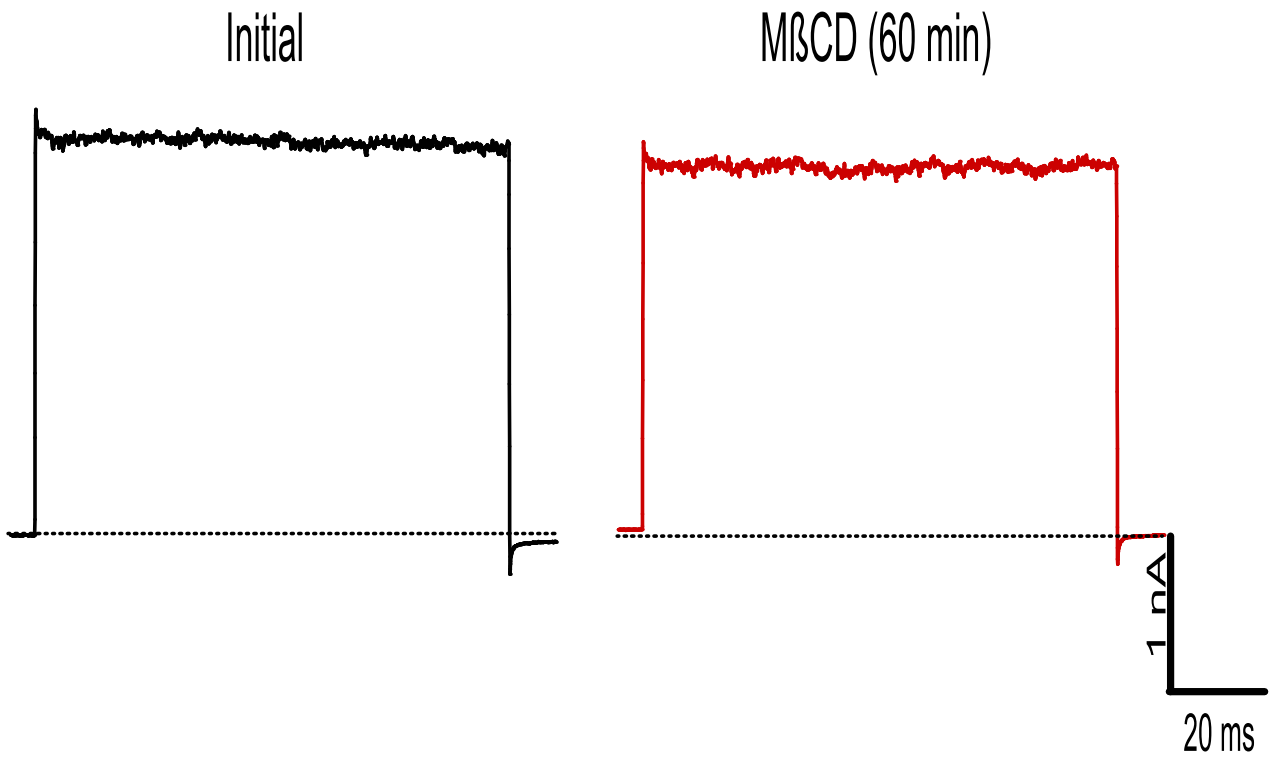
SUPPLEMENTAL FIG.1. **Treatments with M $\beta$ CD.** *A*, Representative current traces of 6 identical experiments from inside-out patches elicited by 4  $\mu$ M capsaicin before (black trace) and after 3 mg/ml M $\beta$ CD. *B*, Representative current traces of 10 identical experiments from inside-out excised patches elicited by 4  $\mu$ M capsaicin before (black trace) and after the application of M $\beta$ CD:cholesterol for 60 min (light grey trace) and after subsequent 10 min of M $\beta$ CD treatment (dark grey trace). The data in *B* demonstrate the reversibility of cholesterol effects. Data were obtained at +120 mV.

SUPPLEMENTAL FIG. 2. **Effects of cholesterol are generalized to different activating stimuli.** *A*, Representative current traces of 5 identical experiments from inside-out patches elicited by a temperature of 52°C before (black) and after 60 min with M $\beta$ CD:cholesterol (red) at +60 mV. *B*, Bar-chart of average currents elicited by 52°C after 60 min of exposure to M $\beta$ CD:cholesterol ( $0.25 \pm 0.08$ , N= 5). Data are normalized to the initial currents elicited by a temperature of 52°C. \* denotes significant differences with respect to initial currents ( $p < 0.01$ ). *C*, Voltage-activated TRPV1 currents before (black) and after M $\beta$ CD:cholesterol (red) from -120 to +200 mV. *D*, Current-voltage relationships before (black symbols) and after an exposure of 60 min to M $\beta$ CD:cholesterol (red symbols). The red dotted line represents normalization of currents after M $\beta$ CD:cholesterol to its own maximal current in order to show the lack of change in the shape of the I-V relationship.

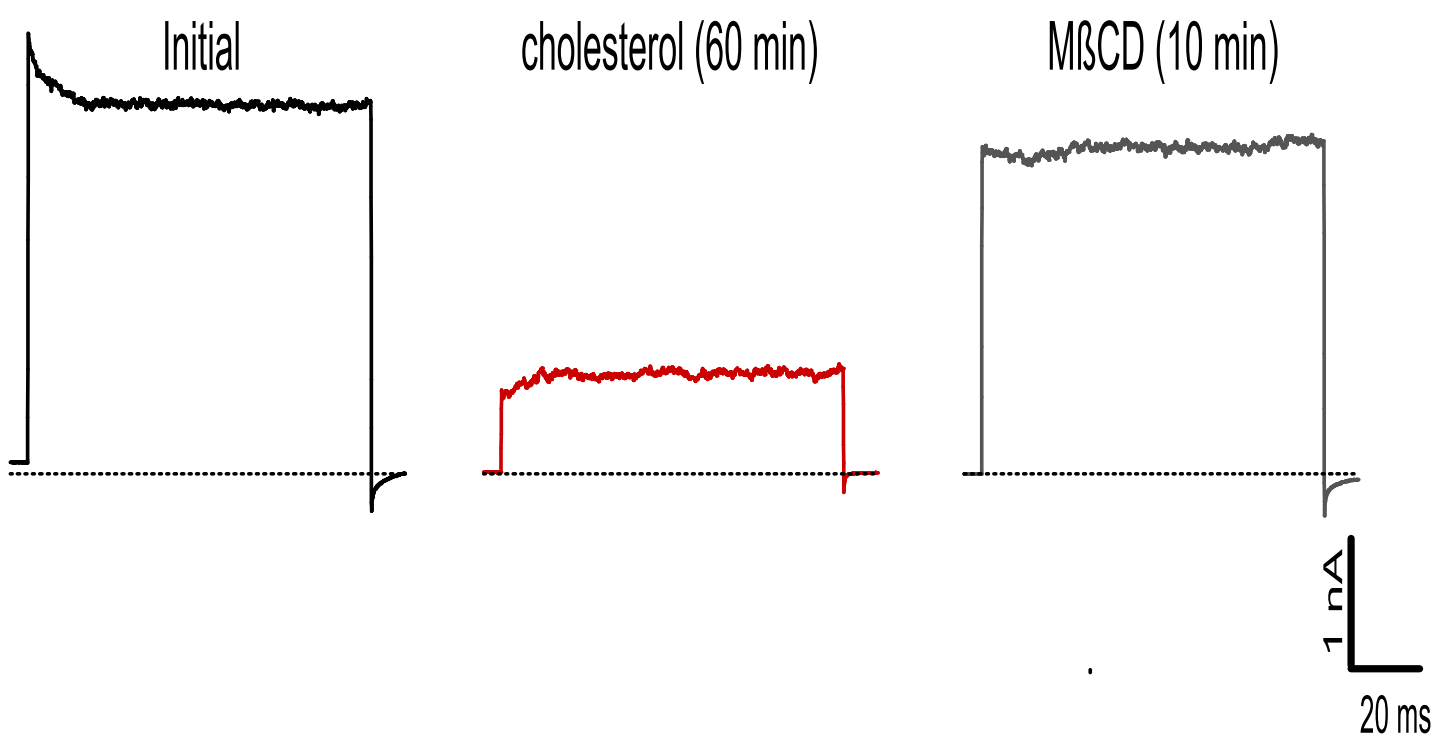
SUPPLEMENTAL FIG. 3. **Model for epicholesterol binding to TRPV1 generated by docking.** The best five conformations of epicholesterol docked to S5 of the TRPV1 model are shown. These are the lowest energy conformations (between -7.13 and -6.82 kcal/mol) taken from the cluster of 9 similar conformations calculated by Autodock. Epicholesterol docks in a conformation similar to that of cholesterol (Fig. 9). The  $\alpha$ -face of epicholesterol, which is more bulky than in cholesterol, interacts with F582, but the larger energy and smaller number of conformations suggests that this interaction is unfavorable. Epicholesterol also makes a hydrophobic  $\pi$ -aliphatic interaction with F582 (green). The aliphatic tail in cholesterol occupies a small cavity in which it interacts with L585 (blue), but the distance from R579 (yellow) to the -OH group is larger than in cholesterol, reducing the probability of an electrostatic interaction.

SUPPLEMENTAL FIG. 4. **Detergent analysis of HEK293 membranes.** Western blots of rTRPV1-GFP in sucrose density gradient fractions from HEK293 cells treated with Triton after incubation with *A*, M $\beta$ CD and *B*, 10:1 M $\beta$ CD:cholesterol. Low-density fractions 4 and 5, which contain the raft lipid GM1 (data not shown) correspond to DRMs, whereas the more dense fractions 8 – 11 correspond to DSMs. Control experiments with either rTRPV1-GFP or rTRPV1 in the absence of M $\beta$ CD:cholesterol or M $\beta$ CD gave identical results (data not shown).

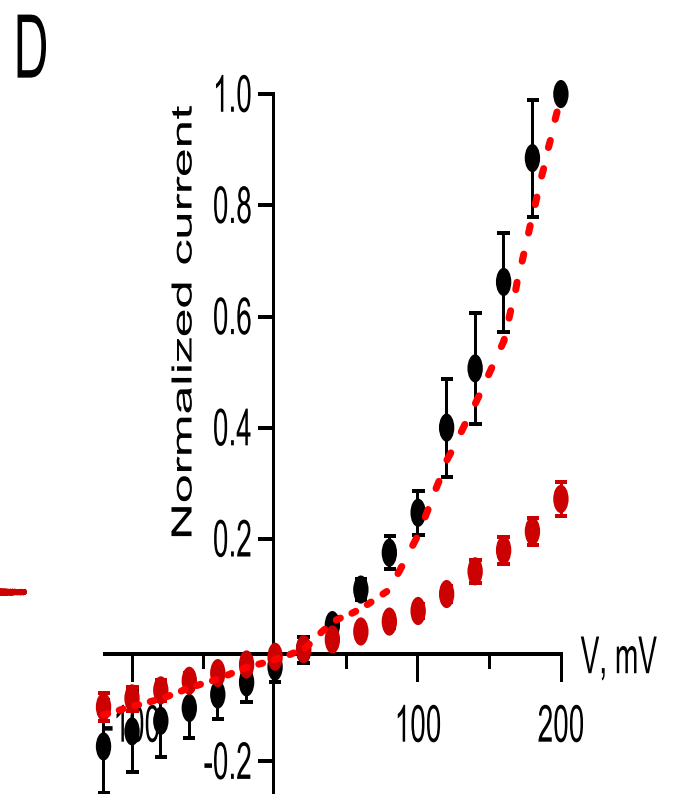
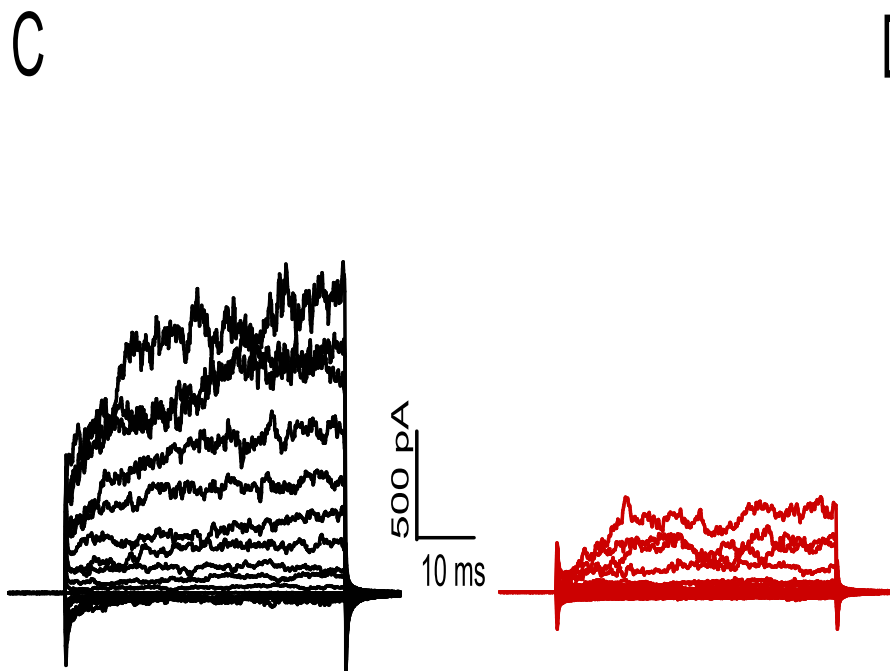
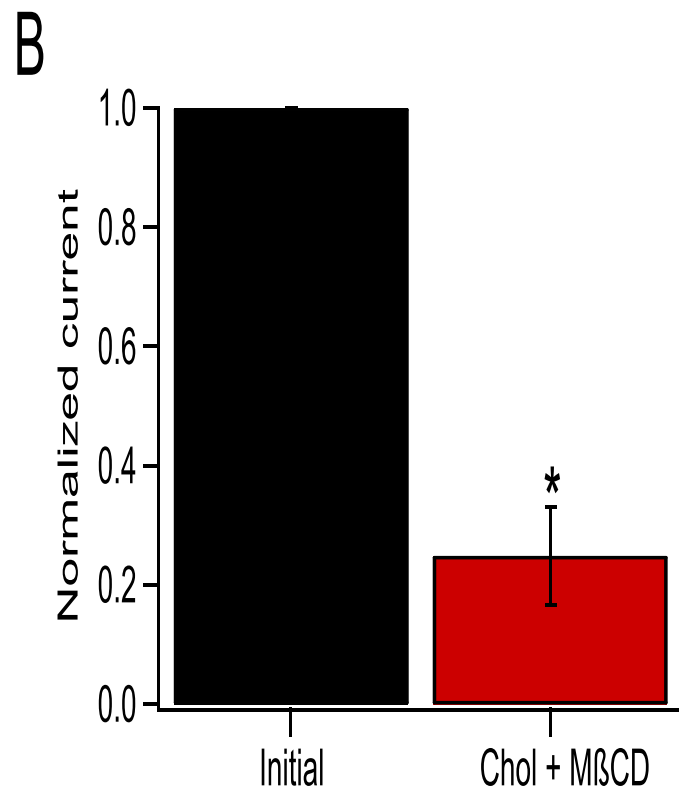
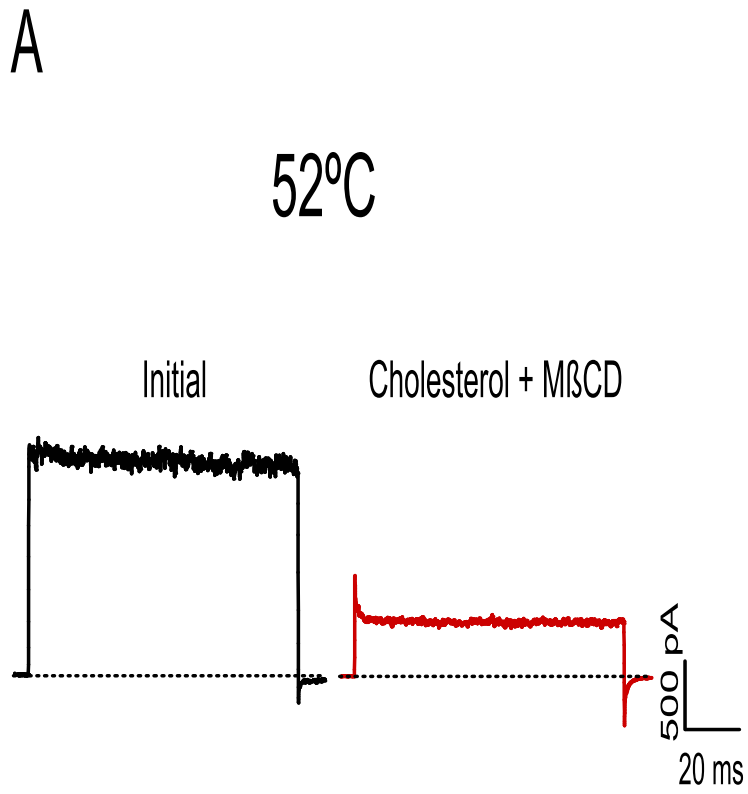
A



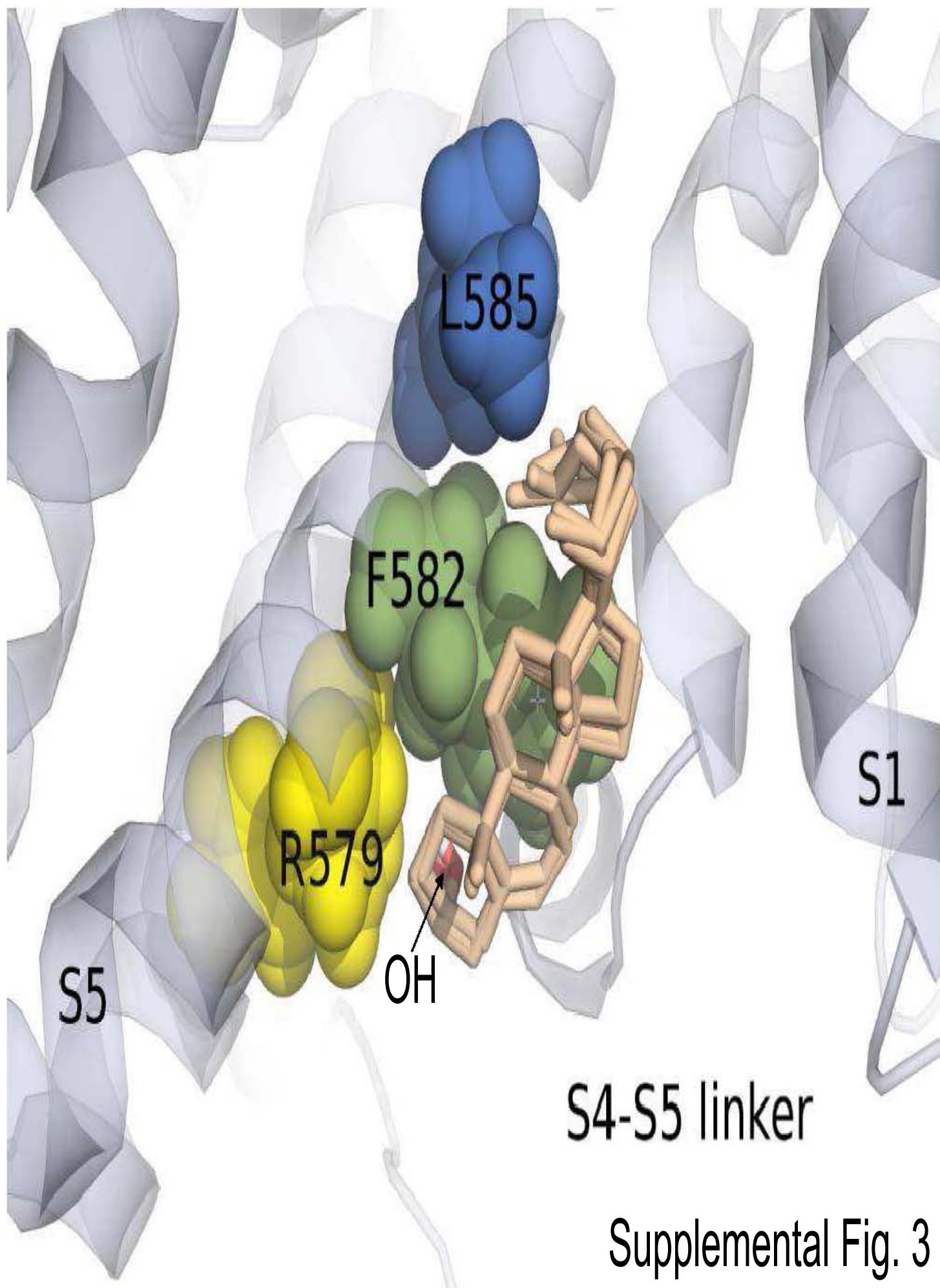
B



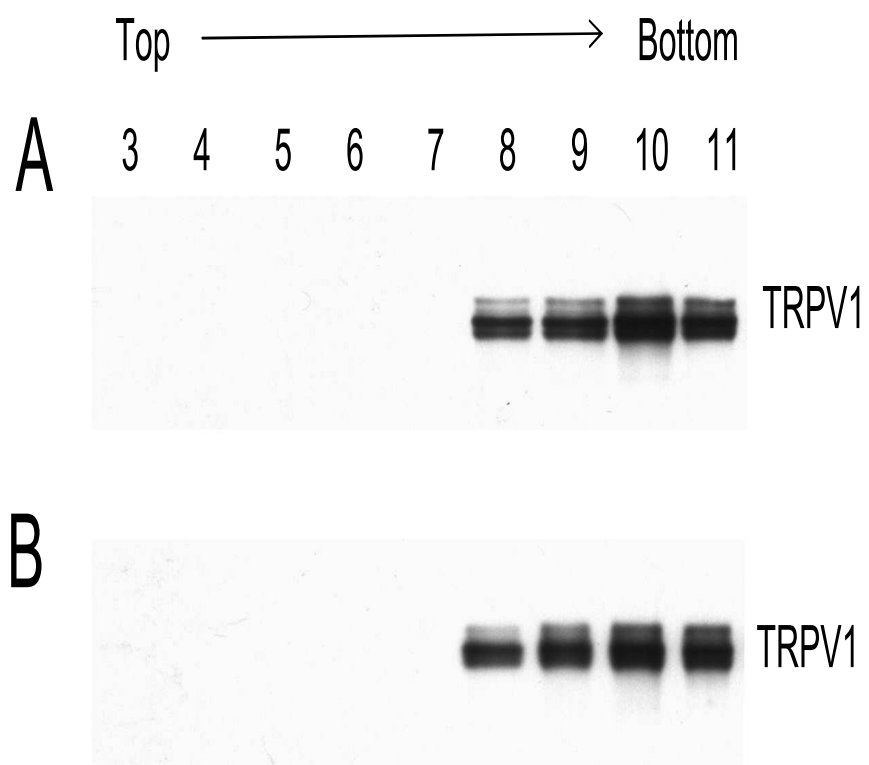
Supplemental Fig. 1



Supplemental Fig. 2



Supplemental Fig. 3



Supplemental Fig. 4



# Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site

Andrés Nieto-Posadas<sup>1</sup>, Giovanni Picazo-Juárez<sup>1</sup>, Itzel Llorente<sup>1</sup>, Andrés Jara-Oseguera<sup>2</sup>, Sara Morales-Lázaro<sup>1</sup>, Diana Escalante-Alcalde<sup>1\*</sup>, León D Islas<sup>2\*</sup> & Tamara Rosenbaum<sup>1\*</sup>

Since 1992, there has been growing evidence that the bioactive phospholipid lysophosphatidic acid (LPA), whose amounts are increased upon tissue injury, activates primary nociceptors resulting in neuropathic pain. The TRPV1 ion channel is expressed in primary afferent nociceptors and is activated by physical and chemical stimuli. Here we show that in control mice LPA produces acute pain-like behaviors, which are substantially reduced in *Trpv1*-null animals. Our data also demonstrate that LPA activates TRPV1 through a unique mechanism that is independent of G protein-coupled receptors, contrary to what has been widely shown for other ion channels, by directly interacting with the C terminus of the channel. We conclude that TRPV1 is a direct molecular target of the pain-producing molecule LPA and that this constitutes, to our knowledge, the first example of LPA binding directly to an ion channel to acutely regulate its function.

Neuropathic pain can occur after trauma to the nervous system or as a result of diseases such as multiple sclerosis and stroke. It is quite common among the human population and includes symptoms such as continuous burning pain, allodynia and hyperalgesia<sup>1</sup>.

The release of certain bioactive lipids contributes to the generation and maintenance of neuropathic pain. However, many of the molecular targets of these molecules remain unknown. Among the molecules for which a role in neuropathic pain has been described is LPA<sup>1</sup>.

LPA is found in serum and plasma where it is synthesized mainly by the enzyme autotaxin from precursor lysophospholipids, which in turn are produced by phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> (ref. 2). Activated platelets<sup>3</sup> and other cell types such as microglia<sup>4</sup> stimulate LPA production, leading to accumulation of micromolar concentrations of the lipid upon tissue damage<sup>3</sup>.

LPA's actions are mediated by G protein-coupled receptors that are specific to LPA (LPA<sub>1</sub>–LPA<sub>6</sub>)<sup>5</sup> and include the regulation of some ion channels through the activation of pathways downstream of the receptors. Effects of LPA on TRP channels have also been reported<sup>6,7</sup>. For example, high concentrations of LPA (100 μM) stimulate Ca<sup>2+</sup> mobilization in B-lymphoblast cell lines by regulating the activity of a TRPC channel<sup>6</sup>. Although they do not experimentally demonstrate it, these authors suggest that LPA-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization could be due to direct channel activation as the process was not sensitive to G<sub>i/o</sub> protein or PLC inhibition<sup>6</sup>. On the other hand, LPA decreases TRPM7 activity in fibroblasts. Because these cells express the LPA<sub>3</sub> (also called EDG-7) receptor, the authors suggest that regulation of TRPM7 by LPA could be due to activation of the G<sub>q</sub>-associated signaling pathway<sup>7</sup>.

The TRPV1 ion channel is activated by a variety of stimuli such as high temperature<sup>8,9</sup>, low pH and pungent compounds<sup>8</sup>. Also, multiple signals that originate from inflammatory processes converge on TRPV1, whose activation in sensory neurons has the final consequence of pain perception.

Because TRPV1 receptors in neurons contribute to hyperalgesia, a connection between TRPV1 and LPA-induced neuropathic pain has been hypothesized<sup>1</sup>. A recent study suggests that pain-related

responses in dorsal root ganglion (DRG) neurons from a rat bone cancer model are due to enhanced expression as well as potentiation of the capsaicin and thermal responses of TRPV1 in this disease. These changes in TRPV1 expression and function were suggested to be caused by the activation of the protein kinase Cε (PKCε) pathway downstream of the LPA<sub>1</sub> receptor<sup>10</sup>.

Because LPA is linked to painful processes involving pain generation during tissue injury and damage and because other lipids such as PIP<sub>2</sub> are known to interact directly with TRPV1 (refs. 11–13), we set out to determine whether LPA could modify TRPV1 function through direct binding to the channel.

The present study shows that LPA does in fact activate TRPV1 by acting directly on its C-terminal region, and this effect contrasts with all other examples of LPA action on ion channels as it is independent of LPA-receptor activation.

## RESULTS

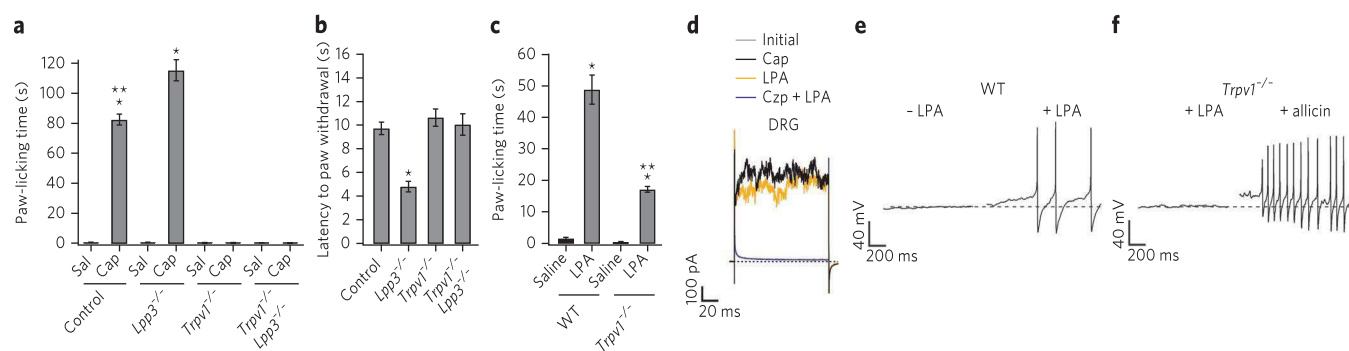
### TRPV1 mediates LPA-induced pain behavior

To investigate the acute effects of LPA on TRPV1-mediated pain-related behavior, we assessed capsaicin- and heat-elicited pain behavior by means of the paw-licking and paw-withdrawal assays in control and littermate mice lacking expression of LPP3 (*Lpp3*<sup>-/-</sup>, or *Ppap2b*<sup>-/-</sup>), an enzyme which degrades LPA<sup>14</sup>, in the nervous system.

We measured the paw-licking time immediately after injection of the test solution. Whereas both wild-type and *Lpp3*<sup>-/-</sup> animals showed a greater painful response when injected with capsaicin than did those injected with saline, *Lpp3*<sup>-/-</sup> mice showed longer paw-licking times after capsaicin injection than did control animals (Fig. 1a). When pain behavior was assayed by the paw-withdrawal assay, we also observed a hyperalgesic response to increased temperature in *Lpp3*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1b). As expected, *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice showed no differences with respect to control animals, consistent with what had been demonstrated for low-intensity (5.5 A) stimulation<sup>15</sup> (Fig. 1b). To confirm that the painful responses to capsaicin and temperature in the *Lpp3*<sup>-/-</sup> mouse model are due to TRPV1, we produced *Trpv1*<sup>-/-</sup> *Lpp3*<sup>-/-</sup> mice and tested their responses to painful stimuli. These double-knockout animals showed no differences

<sup>1</sup>Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

\*e-mail: trosenba@ifc.unam.mx or descalante@ifc.unam.mx or islas@liceaga.facmed.unam.mx



**Figure 1 | TRPV1 responds to LPA.** (a) Paw-licking times for saline and capsaicin, respectively, were: control,  $0.8 \pm 0.1$  s and  $82.5 \pm 4$  s; *Lpp3*<sup>-/-</sup>,  $0.8 \pm 0.2$  s and  $115.42 \pm 7$  s; *Trpv1*<sup>-/-</sup>,  $0.3 \pm 0.1$  s and  $0.4 \pm 0.2$  s; *Trpv1*<sup>-/-</sup> *Lpp3*<sup>-/-</sup>,  $0.3 \pm 0.1$  s and  $0.4 \pm 0.2$  s. \**P* < 0.01 for saline-injected versus capsaicin-injected control and *Lpp3*<sup>-/-</sup> animals; \*\**P* < 0.01 for control mice injected with capsaicin versus *Lpp3*<sup>-/-</sup> and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice injected with capsaicin; ANOVA (*n* = 12). Sal, saline injection; Cap, capsaicin injection. (b) Radiant paw-heating (Hargreaves) assay. Latencies were: control,  $9.7 \pm 0.5$  s; *Lpp3*<sup>-/-</sup>,  $4.8 \pm 0.4$  s; *Trpv1*<sup>-/-</sup>,  $10.6 \pm 0.7$  s; *Trpv1*<sup>-/-</sup> *Lpp3*<sup>-/-</sup>,  $10.1 \pm 0.9$  s. \**P* < 0.01 *Lpp3*<sup>-/-</sup> versus all other groups; ANOVA (*n* = 20). (c) Paw-licking times for saline and LPA, respectively, were: control,  $1.5 \pm 0.3$  s and  $49 \pm 5$  s; *Trpv1*<sup>-/-</sup>,  $0.4 \pm 0.2$  s and  $17 \pm 0.9$  s. \**P* < 0.01 for saline-injected versus LPA-injected animals; \*\**P* < 0.01 for control versus *Trpv1*<sup>-/-</sup> animals injected with LPA; ANOVA (*n* = 12). (d) Representative (*n* = 5) TRPV1 currents (120 mV) from inside-out DRG neuron membrane patches exposed to capsaicin (Cap, 4  $\mu$ M), LPA (5  $\mu$ M, after wash) and LPA (5  $\mu$ M) and capsazepine (Czp, 30  $\mu$ M) together. (e) Membrane potential in a wild-type DRG neuron with or without 5  $\mu$ M LPA. (f) Membrane potential in a *Trpv1*<sup>-/-</sup> DRG neuron with LPA and with alllicin (200  $\mu$ M). Resting potential (dashed line) was near -40 mV (*n* = 8). Group data are reported as the mean  $\pm$  s.e.m.

in their responses to the injection of saline or capsaicin solutions, and their reaction to changes in temperature (paw withdrawal) were similar to those in *Trpv1*<sup>-/-</sup> and control mice (Fig. 1a,b).

Finally, we assayed whether injection of LPA into the paws of wild-type and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice elicited pain-like behavior. We found that LPA produces a robust (*P* < 0.01) increase in paw-licking time in wild-type animals compared to controls injected with saline (Fig. 1c). A nearly 60% decrease in the response to LPA was observed in *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type animals, although a remnant of the response to LPA was observed in *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice compared to those injected with saline (Fig. 1c). Furthermore, we acutely inhibited the TRPV1 channel by injecting the TRPV1 inhibitor capsazepine together with capsaicin or LPA in wild-type mice and measured paw-licking time. Consistently, capsazepine reduced the pain-associated responses to both capsaicin and LPA (Supplementary Results; Supplementary Fig. 1a).

These data show that more than half of the response to acute LPA delivery is mediated by TRPV1. Thus, the question arises as to how behavioral phenotypes relate to responses at the cellular level. We first sought to answer this question by applying LPA to inside-out membrane patches from dissociated wild-type mouse DRG neurons. LPA elicited currents from membrane patches, and this effect was blocked in all experiments by 30  $\mu$ M capsazepine applied together with 5  $\mu$ M LPA (Fig. 1d), suggesting that TRPV1 may indeed be a target of LPA.

To establish the physiological role of TRPV1 in the response of DRG neurons to LPA, we performed whole-cell current-clamp recordings in wild-type and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice. Application of 5  $\mu$ M LPA to DRG neurons from wild-type mice elicited a depolarization in the range of 7–20 mV and subsequent action potential firing (Fig. 1e). DRG neurons that responded to LPA also responded to capsaicin (8 out of 8). In contrast, cells that did not respond to capsaicin did not respond to LPA either (10 out of 10). Although no response to LPA in *Trpv1*<sup>-/-</sup> neurons was observed, a clear response to alllicin (which is also mediated by TRPA1 channels) was present, confirming that LPA was applied to the correct subset of small-diameter DRG neurons (Fig. 1f) and indicating that TRPV1 contributes to the electrical response to LPA in DRG neurons.

### LPA activates heterologously expressed TRPV1 channels

LPA applied to inside-out patches from TRPV1-transfected HEK293 cells induced robust channel activation at both

hyperpolarizing and depolarizing voltages (left and right of Fig. 2a, respectively). Furthermore, LPA activated a similar fraction of current with respect to the maximal response to 4  $\mu$ M capsaicin when applied to patches from TRPV1-expressing HEK cells or wild-type mouse DRG neurons ( $0.93 \pm 0.09$  for DRG and  $0.93 \pm 0.03$  for HEK cells; 120 mV, *n* = 10). In contrast, HEK cells expressing only green fluorescent protein (GFP; Supplementary Fig. 1b) did not respond to LPA, and the vehicle used to deliver LPA did not produce TRPV1 channel activation (Supplementary Fig. 1c). Moreover, we measured the response to LPA in heterologously expressed TRPV2, TRPV3 and TRPA1 channels, which in many cases colocalize with TRPV1 in native cells, and found that application of LPA to these channels did not produce current activation (Supplementary Fig. 1d).

LPA activated a larger fraction of current when it was applied intracellularly than when it was applied extracellularly (Fig. 2a,b). The time constants of activation (Fig. 2c) indicate that LPA is more effective from the inside than from the outside and that LPA applied extracellularly may cross the membrane to act on the intracellular side.

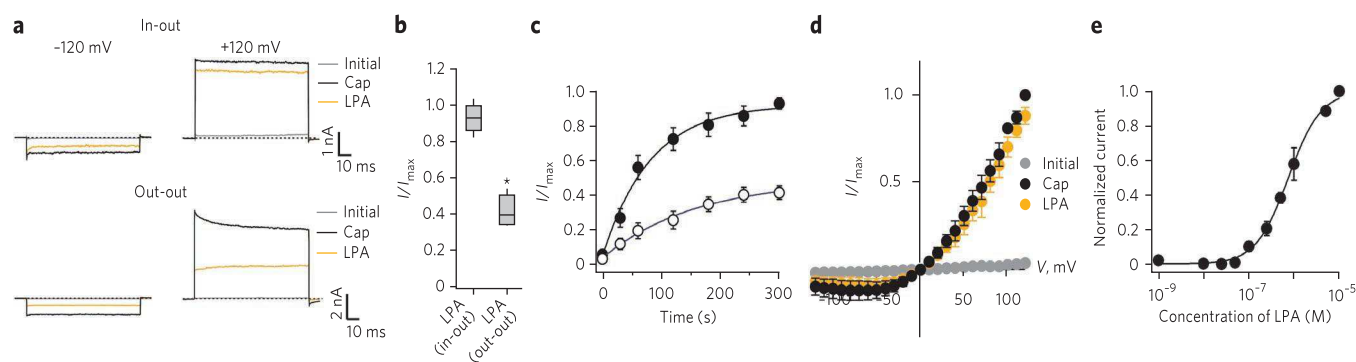
The observed TRPV1 current-voltage relationship was outwardly rectifying with a reversal potential of near 0 mV in the presence of either capsaicin or LPA (Fig. 2d). Activation of TRPV1 by LPA occurs in a dose-dependent fashion, with an apparent dissociation constant (*K*<sub>D</sub>) of 754 nM at 120 mV (Fig. 2e).

We then probed whether TRPV1 responded to molecules with similar structures to LPA and to molecules that are also substrates or products of the LPP3 enzyme. Intracellular application of 5  $\mu$ M of glycerol phosphate, oleic acid, lysophosphatidylcholine, diacylglycerol, ceramide-1-phosphate or sphingosine-1-phosphate did not activate TRPV1, but 5  $\mu$ M phosphatidic acid promoted a small activation of TRPV1 currents (Supplementary Fig. 1e).

These data led us to conclude that a robust and specific activation of TRPV1 can be achieved by LPA. We further studied whether LPA could activate TRPV1 through an LPA receptor-independent pathway.

### LPA receptors are not involved in TRPV1 activation

So far, our data suggest that LPA acts as a ligand of TRPV1 by promoting a conformational change that leads to the opening of the channel. We then asked whether LPA activates endogenous LPA receptors or whether it interacts directly with the channel.



**Figure 2 | Heterologously expressed TRPV1 channels respond to LPA.** (a) Traces shown are representative of five experiments. Currents from inside-out and outside-out HEK cell patches were obtained as in **Figure 1** at  $-120$  mV (left) and  $120$  mV (right). Patches were first exposed to capsaicin (Cap), washed, and then exposed to LPA. (b) Box plot of the fraction of current activated by LPA applied to the intracellular or extracellular face of the channel, normalized to the current with  $4 \mu\text{M}$  capsaicin ( $120$  mV). The horizontal line within each box indicates the median, boxes show the 25th and 75th percentiles, and whiskers show the 5th and 95th percentiles of the data ( $n = 6$ ).  $*P < 0.01$ , ANOVA. (c) Time course of activation by  $5 \mu\text{M}$  LPA in the inside-out (filled symbols) and outside-out (empty symbols) configurations at  $120$  mV ( $n = 5$ ). Data were fit to a single exponential with time constants  $80.5 \pm 24$  s (inside-out) and  $167 \pm 77$  s (outside-out). LPA application started at  $t = 0$  in the abscissa. (d) Current-voltage relationships for initial currents (gray),  $4 \mu\text{M}$  capsaicin (black) and  $5 \mu\text{M}$  LPA (orange) after capsaicin was washed off in the inside-out configuration ( $n = 5$ ). (e) Dose response for activation by LPA at  $120$  mV in the inside-out configuration. Smooth curve is a fit with the Hill equation. The  $K_D$  value was  $754$  nM and the slope was  $1.2$ . Owing to seal instability, a single LPA concentration was tested per membrane patch and normalized to the current at  $10 \mu\text{M}$  LPA in the same patch ( $n = 5$ ). Group data are reported as the mean  $\pm$  s.e.m.

To establish a direct interaction of LPA with the channel, we used the molecule BrP-LPA, which not only closely resembles LPA in structure (**Fig. 3a**) but also is an antagonist of several LPA receptors ( $\text{LPA}_1$ – $\text{LPA}_4$ )<sup>16</sup> and an inhibitor of autotaxin<sup>16</sup>.

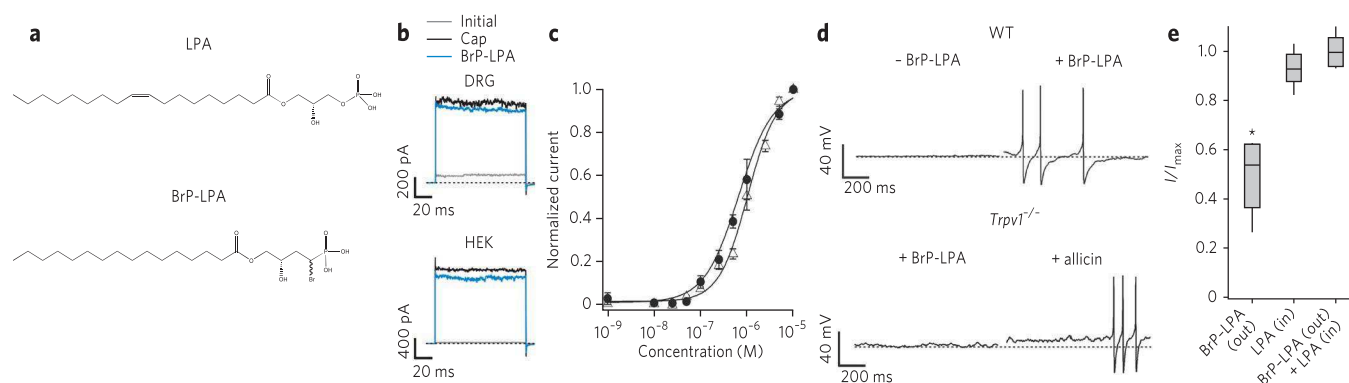
Unexpectedly, BrP-LPA applied to inside-out membrane patches from DRG neurons (which express  $\text{LPA}_1$ ,  $\text{LPA}_3$  and  $\text{LPA}_5$ )<sup>17</sup> and TRPV1-expressing HEK293 cells (which express  $\text{LPA}_5$ )<sup>18</sup>, activated the channel similarly to LPA (**Fig. 3b**). The fraction of current activated by BrP-LPA with respect to the currents activated by  $4 \mu\text{M}$  capsaicin in the same membrane patch at  $120$  mV was  $0.9 \pm 0.04$  for DRG neurons and  $0.91 \pm 0.01$  for HEK cells. Also, the dose response to BrP-LPA ( $K_D = 1.1 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ) was comparable to that for LPA ( $K_D = 754$  nM) (**Fig. 3c**).

Compelled by these results, we studied whether BrP-LPA could mimic LPA's effects at the physiological level. We first examined whether injection of BrP-LPA into the paws of wild-type and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice mimicked the effects of LPA and found that BrP-LPA produced

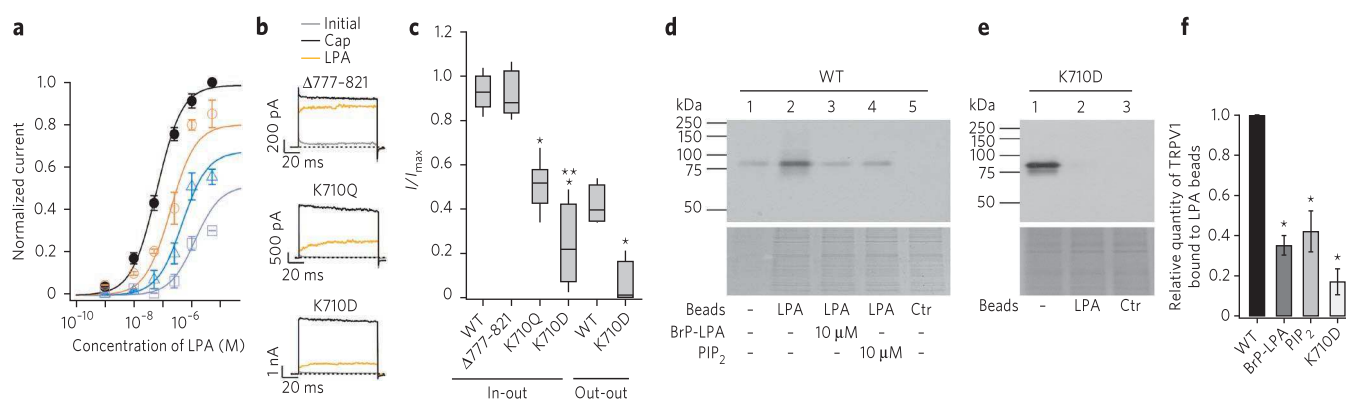
a significant increase in paw-licking time in wild-type animals compared to saline ( $P < 0.01$ ). The response of *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice to BrP-LPA was only about 20% of that in wild-type animals (**Supplementary Fig. 2**), indicating that BrP-LPA induces a painful sensation that is largely mediated through the activation of TRPV1.

It was also shown that BrP-LPA induces action potential firing in DRG neurons from wild-type mice (**Fig. 3d**, top right) and that these effects are not observed when it is applied to neurons from *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3d**, bottom left), although sensitivity to allicin remains (**Fig. 3d**, bottom right).

The data obtained with BrP-LPA suggest that, owing to its structural similarities with LPA, it can activate the channel through the same mechanism as LPA, independently of LPA receptors. To further support our hypothesis, we next performed experiments in which we added both BrP-LPA (BrP-LPA<sub>out</sub>) to the patch pipette in inside-out patches to act as an antagonist of the LPA receptors and LPA to the intracellular face of the patch (LPA<sub>in</sub>). Our results show



**Figure 3 | An antagonist of LPA receptors with a similar structure to LPA activates TRPV1.** (a) Stick representation of the chemical structures of LPA and BrP-LPA. (b) BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ ) activates currents in inside-out patches from DRG neurons (top) and HEK cells (bottom) at  $120$  mV. Representative traces,  $n = 8$ . Membrane patches were first exposed to  $4 \mu\text{M}$  capsaicin (Cap) and washed, and then BrP-LPA was applied. (c) Comparison of BrP-LPA (triangles) and LPA (circles) dose responses at  $120$  mV obtained from inside-out patches from TRPV1-expressing HEK cells. Data for each patch was normalized to the current at  $10 \mu\text{M}$  of either LPA or BrP-LPA. Smooth lines are fits with the Hill equation. The  $K_D$  for BrP-LPA is  $1.1 \pm 0.25 \mu\text{M}$  (slope is  $1.3 \pm 0.21$ ,  $n = 5$ ). (d) Membrane potential in a wild-type (WT) DRG neuron before (top left) and during (top right) application of BrP-LPA and in a *Trpv1*<sup>-/-</sup> DRG neuron during the exposure to BrP-LPA (bottom left) and in the presence of allicin ( $200 \mu\text{M}$ ; bottom right). Resting membrane potential (dashed lines) was around  $-40$  mV ( $n = 9$  per genotype). (e) Activation of TRPV1 ( $120$  mV) by external BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ , out) and by internal LPA ( $5 \mu\text{M}$ , in) in inside-out patches from HEK cells. Data are normalized to activation with saturating capsaicin. The horizontal lines are as in **Figure 2b**.  $*P < 0.01$  with respect to BrP-LPA (out) and LPA (in); ANOVA ( $n = 6$ ). Group data are reported as the mean  $\pm$  s.e.m.



**Figure 4 | Interaction site for LPA in the C terminus of TRPV1.** (a) TRPV1 activation by intracellular LPA after polyK at 120 mV without (filled circles) or with PIP<sub>2</sub> (empty circles, 50 nM; triangles, 100 nM; squares, 200 nM). Curves are fits to **Scheme 1**. (b) Representative currents (120 mV, inside-out patches) containing the deletion mutant ( $\Delta 777-821$ ) and the mutations K710Q and K710D, activated by 5  $\mu$ M LPA or 4  $\mu$ M capsaicin (Cap). (c) Fraction of current activated by intracellular LPA in wild-type and mutant TRPV1 channels (normalized to 4  $\mu$ M capsaicin) and extracellular LPA in K710D mutants and wild type ( $n = 6-10$ ). Horizontal lines are as in **Figure 2b**. \* $P < 0.01$  versus wild-type (WT) and \*\* $P < 0.05$  versus TRPV1<sup>K710Q</sup>; ANOVA test. (d) TRPV1 interaction with LPA-coated beads. Lane 1, input (1  $\mu$ g); 2, TRPV1 bound to LPA beads; 3 and 4, competition of BrP-LPA and PIP<sub>2</sub> for beads, respectively; 5, interaction with control beads. Lanes 2, 3, 4 and 5 contained 30  $\mu$ g of membrane protein. Lower panel shows Coomassie blue-stained supernatant fraction. (e) Interaction of the K710D mutant with LPA-coated beads. Lane 1, the input (5  $\mu$ g) of the K710D mutant; 2, pull-down of TRPV1<sup>K710D</sup> with LPA beads; 3, control beads. Lanes 2 and 3 contain 60  $\mu$ g of membrane protein. Lower panel as in **d**. (f) Bar graph for the relative quantity of pulled-down TRPV1 with LPA beads from experiments as in **d** and **e**. Normalized values with respect to wild-type were: BrP-LPA =  $0.35 \pm 0.04$ ; PIP<sub>2</sub> =  $0.42 \pm 0.09$  and K710D =  $0.17 \pm 0.06$ .  $n = 4-6$  for each case. \* $P < 0.01$  versus wild-type; ANOVA test. Group data are reported as the mean  $\pm$  s.e.m.

that the magnitude of the currents activated by LPA under these conditions was not different from the magnitude of those activated by intracellular LPA alone (**Fig. 3e**). In fact, extracellular BrP-LPA (BrP-LPA<sub>out</sub>) could sustain current activation as effectively as extracellular LPA at the same concentration (**Figs. 2b** and **3e**).

The LPA<sub>5</sub> receptor, which is activated by BrP-LPA<sup>19</sup>, is expressed in DRG neurons<sup>17</sup> and HEK cells (**Supplementary Fig. 3a**). To rule out any contributions of LPA<sub>5</sub> to our electrophysiological recordings, we determined whether the LPA<sub>5</sub> agonist farnesylpyrophosphate (FPP) could activate the TRPV1 channel. **Supplementary Figure 3b** shows that FPP was incapable of eliciting current activation in TRPV1-expressing HEK cells both in the inside-out and on-cell configurations, in accordance with a previous study that also showed a lack of effect of FPP on TRPV1<sup>20</sup>. However, FPP activated heterologously expressed TRPV3 (**Supplementary Fig. 3c**), as previously reported<sup>20</sup>. These data indicate that LPA is able to promote TRPV1 channel function through a mechanism independent of the activation of LPA receptors 1–5 (**Supplementary Fig. 3d**).

To further rule out the involvement of any LPA receptor in TRPV1's response to this lipid, we treated TRPV1-transfected HEK cells with inhibitors of the G protein-coupled signaling pathways that are associated with activation of LPA receptors. We used the inhibitors of phospholipase C (U73122; ref. 21); Rho-associated protein kinases and PKC (Y-27632; ref. 22); G<sub>s</sub>, G<sub>o</sub> and G<sub>i</sub> proteins (pertussis toxin, PTX<sup>23</sup>); the  $\beta\gamma$  subunit of G proteins (C terminus of  $\beta$ -adrenergic kinase 1, Ctr- $\beta$ ARK1; ref. 24); and adenylyl cyclase (2',5'-dideoxyadenosine or 2',5'-dd-Ado<sup>25</sup>). We found that none of the treatments precluded current responses to extracellular LPA in on-cell recordings and that the responses were in fact indistinguishable from those elicited in untreated cells (**Supplementary Fig. 3e**), leading us to conclude that LPA receptor activation is not necessary for TRPV1 activation by LPA.

Because a recent study in an induced bone cancer model shows that LPA might regulate expression and activity of TRPV1 through a PKC-dependent pathway<sup>10</sup>, we tested this possibility in our system. Incubation of TRPV1-transfected HEK293 cells with the PKC inhibitors Y27632 (ref. 22) and BIM I<sup>26</sup> had no effect on LPA activation of TRPV1 in on-cell experiments (**Supplementary Fig. 4a**). PKC $\epsilon$  has been reported to be responsible for LPA-induced potentiation

of TRPV1 by heat and capsaicin<sup>10</sup>. To assess whether this was a possibility, we performed experiments in which we transfected HEK293 cells with a plasmid containing either a dominant-negative form of PKC $\epsilon$ <sup>27</sup> or the wild-type functional version of PKC $\epsilon$ <sup>27</sup> together with TRPV1. Overexpression of either form of PKC $\epsilon$  did not have an effect on acute activation of TRPV1 by LPA (**Supplementary Fig. 4b,c**).

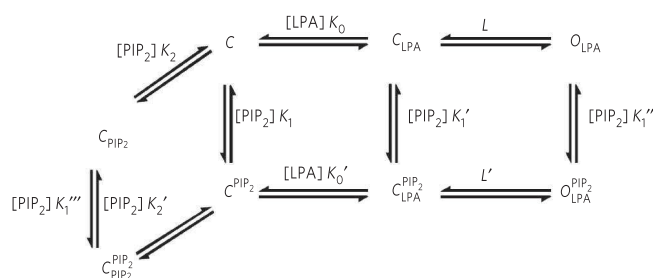
To further establish the lack of a role for PKC $\epsilon$  in our model, we used the specific inhibitor  $\epsilon$ V<sub>1,2</sub> (ref. 10) in whole-cell recordings of DRG neurons to determine whether blockage of this pathway precluded activation of TRPV1. All DRG neurons tested for TRPV1 activation by LPA responded irrespectively of the presence of the specific inhibitor  $\epsilon$ V<sub>1,2</sub> applied in the recording pipette, leading to the conclusion that PKC $\epsilon$  is not necessary for acute LPA activation of TRPV1, contrary to what was previously suggested<sup>10</sup> (**Supplementary Fig. 4d**). Nonetheless, in accordance with the study mentioned above, we, too, observed a potentiating effect of LPA on capsaicin currents (**Supplementary Fig. 5a**).

So far, our data demonstrate that LPA promotes its effects on TRPV1 independently of LPA receptors, most likely through a direct interaction with the channel.

### Interaction site for LPA in the C terminus of TRPV1

Some proteins known to interact with LPA share binding sites with other lipids such as PIP<sub>2</sub> (refs. 28,29). PIP<sub>2</sub> binds directly to TRPV1 and enables the channel's response to capsaicin without activating it<sup>13</sup>. Conversely, depletion of PIP<sub>2</sub> results in decreased channel activity induced by capsaicin<sup>30,31</sup> (**Supplementary Fig. 5b**).

To determine whether LPA could share a binding site with PIP<sub>2</sub>, we performed a competition assay. Using an established approach<sup>7,13</sup>, we constructed a dose-response curve for activation by LPA by first removing endogenous PIP<sub>2</sub> with the scavenger polylysine (polyK) and then applying different concentrations of LPA. Interestingly, removal of PIP<sub>2</sub> with polyK did not preclude TRPV1 activation by LPA (**Fig. 4a**), although polyK did scavenge LPA (**Supplementary Fig. 5c,d**). Moreover, the data in **Figure 4a** show that the dose-response curve for TRPV1 activation by LPA after treatment with polyK is shifted to the left, and the  $K_D$  of TRPV1 for LPA is lower than that measured in the presence of endogenous PIP<sub>2</sub> (71 nM versus 754 nM). We then repeated the experiment described above but



**Scheme 1 Model for TRPV1 modulation by LPA and PIP<sub>2</sub>.** The model considers a shared PIP<sub>2</sub>- and LPA-binding site for which both lipids compete and a second PIP<sub>2</sub> binding site from which PIP<sub>2</sub> modulates LPA binding and channel gating. At equilibrium, the relative current is given by

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{[LPA]K_0L(1 + [PIP_2]K_1''')}{1 + [LPA]K_0 + [LPA][PIP_2]K_0'K_1' + [PIP_2](K_1 + K_2) + [PIP_2]^2K_1K_2' + [LPA]K_0L(1 + [PIP_2]K_1''')}$$

where [LPA] and [PIP<sub>2</sub>] are the lipid's molar concentrations,  $K_0$ ,  $K_0'$ ,  $K_1$ ,  $K_1'$ ,  $K_1''$ ,  $K_1'''$ ,  $K_2$  and  $K_2'$  are association constants between the channel and LPA or PIP<sub>2</sub>, and  $L$  and  $L'$  are equilibrium constants for channel gating. In the  $C_X^Y$  notation used here,  $C$  denotes closed states,  $O$  denotes open states,  $X$  denotes ligand occupancy of the shared LPA- and PIP<sub>2</sub>-binding site and  $Y$  denotes ligand occupancy of the PIP<sub>2</sub>-only site. This equation was used to fit the data in **Figure 4a** with following parameters:  $K_0 = 2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_0' = 17.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_1 = 4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_1' = 3.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_1'' = 3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_1''' = 5.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2 = 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2' = 2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $L = 70$  and  $L' = 7 \times 10^{-3}$ .

applied LPA together with different concentrations of DiC8-PIP<sub>2</sub>, a water-soluble form of PIP<sub>2</sub> (**Fig. 4a** and **Supplementary Fig. 5c,d**).

These data show that with increasing PIP<sub>2</sub> concentrations, the apparent affinity for LPA is diminished, as evidenced by a rightward shift in the dose responses for activation by LPA (**Fig. 4a**). However, the magnitude of the maximum response to LPA was also decreased in the presence of PIP<sub>2</sub>.

In a simple competition, the LPA dose-response curves are expected to be shifted to the right upon increasing PIP<sub>2</sub> concentrations without a change in the maximum response (that is, there should be a concentration of LPA than can actually displace PIP<sub>2</sub> from the binding site). Our results can be explained by the allosteric effect of PIP<sub>2</sub> on the binding of LPA to TRPV1 together with the competition between PIP<sub>2</sub> and LPA for the same binding region (described further in Discussion; **Fig. 4a**, **Scheme 1**).

As LPA is a negatively charged molecule, we mutated sites proposed to interact with PIP<sub>2</sub> because these contain positively charged residues that could bind LPA. We first removed residues 777–821 in the C terminus, which contains several positively charged amino acids<sup>32</sup>, and tested the effects of LPA. LPA activated this deletion mutant similarly to its activation of wild-type channels (**Fig. 4b,c**). We then mutated another positive residue in the C terminus, Lys710 (ref. 11). A charge-neutralization mutation (K710Q) produced a channel with a markedly decreased (nearly 50%) response to LPA (**Fig. 4c**) that retained normal capsaicin activation (**Supplementary Fig. 6a**). We then explored the effects of the charge-reversal mutation K710D and found that it also behaved similarly to the wild type in its response to capsaicin (**Supplementary Fig. 6a**), but nearly 80% of the response of the channel to LPA (**Fig. 4b,c**) and to BrP-LPA (**Supplementary Fig. 6b**) was abolished. Moreover, when we applied LPA to the K710D mutant from the extracellular side, we found that a smaller fraction of current was activated compared to when extracellular LPA was applied to the wild-type channel. These data indicate that the intracellular Lys710 residue accounts for most of the effects of LPA on TRPV1 (**Fig. 4c**).

Finally, we took a biochemical approach to confirm a direct interaction between TRPV1 and LPA. Using membrane-protein extracts from HEK293 cells transfected with TRPV1, we performed pull-down experiments to test for LPA-TRPV1 interactions with agarose beads bound to LPA (LPA beads).

The LPA beads bound to the TRPV1 channel significantly ( $P < 0.01$ ) more than control beads without the lipid (**Fig. 4d** and **Supplementary Fig. 7a**), as evidenced by the differences in signal

intensity of the TRPV1 band (molecular mass of 85–90 kDa<sup>33</sup>), suggesting that TRPV1 physically interacts with LPA.

So far, these results constitute strong evidence for direct interaction of the channel with LPA. To further support this hypothesis, we decided to explore whether BrP-LPA, which seems to activate TRPV1 through the same mechanism as LPA, was able to diminish channel binding to the LPA beads by competing for the same site. As expected, preincubation of membrane-protein extracts with BrP-LPA reduced binding of TRPV1 to LPA beads and decreased the intensity of the TRPV1 signal on the immunoblot (**Fig. 4d** and **Supplementary Fig. 7a**).

Furthermore, we used this assay to test for competition of the LPA-beads with PIP<sub>2</sub> for binding to TRPV1. The data in **Figure 4d** show that PIP<sub>2</sub> can diminish the signal associated with LPA-bead binding to TRPV1, indicating that PIP<sub>2</sub> antagonizes LPA at the level of channel binding, probably in competition for a binding site.

Finally, we tested for a correlation between the lack of a functional response of the K710D mutant to LPA and the effects of this mutation on the binding of TRPV1 to the LPA beads. We found that this charge-reversal mutant bound to LPA beads very poorly (**Fig. 4e** and **Supplementary Fig. 7b**). A quantitative analysis of our pull-down assays is presented in **Figure 4f**. The data obtained strongly suggest that LPA binds to the TRPV1 channel and that the Lys710 site is important for LPA binding.

## DISCUSSION

Many TRP channels play a pivotal role in the detection of environmental stimuli and pain perception. TRPV1 is implicated in several painful processes, and interactions of this channel with some exogenous pain-producing molecules have been demonstrated<sup>8</sup>. However, our knowledge of the molecular mechanisms of TRPV1 activation by substances released during injury or inflammation remains scarce. LPA has an important role in the development of neuropathic pain<sup>34</sup>. It has been suggested that during the development of neuropathic hyperalgesia, an upsurge in LPA production occurs, leading to myelinated A $\delta$  fiber hypersensitivity that is partially due to upregulation of TRPV1 (ref. 35). Despite this clear proposition, to date, the role of TRPV1 in LPA-induced chronic pain had remained unclear and, in the case of acute pain, unaddressed.

Actions of LPA on ion channels in peripheral nociceptors have been classically circumscribed to the activation of receptor-mediated signaling pathways<sup>21,36</sup>. Our work constitutes the first study to show a direct and physiologically relevant interaction of an ion channel and LPA, and several lines of evidence presented here support this

idea: (i) BrP-LPA, an antagonist of LPA receptors structurally similar to LPA, activates TRPV1; (ii) inhibitors of the G protein-coupled receptor signaling pathways, which are coupled to LPA-receptor activation, do not preclude actions of LPA on TRPV1; (iii) blockers and dominant-negative forms of PKC and PKC $\epsilon$ , previously linked to activation of TRPV1 by LPA, had no effects on both a heterologous expression system and the native DRG neurons; (iv) TRPV1 interacts directly with LPA, as shown by pull-down assays; and (v) mutation of a charged residue in the C terminus of TRPV1 considerably reduces the effects of LPA and BrP-LPA on the channel and eliminates interactions of the channel with LPA in pull-down assays.

A recent study shows that application of a LPA receptor antagonist attenuates thermal hyperalgesia in a rat model of bone cancer. On the basis of this observation, the authors propose a possible role for the regulation of TRPV1 activity by LPA receptor-mediated signaling pathways, specifically PKC $\epsilon$ -dependent pathways<sup>10</sup>. However, we did not observe any role of PKC $\epsilon$  for TRPV1 activation by LPA in our experiments. In that respect, the study mentioned above shows experiments performed in a model involving the induction of a cancerous process<sup>10</sup>, which complicates interpretation of the results. For example, after only 9 days of introducing cancerous cells to the animal model, the authors were able to observe an increase in paw-withdrawal latency when animals were injected with an LPA<sub>1</sub>-receptor antagonist<sup>10</sup>. Cancerous processes are accompanied by inflammatory responses, and bone cancers induce demyelination of sensory fibers, a phenomenon that leads to hyperalgesic responses<sup>37</sup>. Furthermore, most osteolytic tumors cause extracellular acidification<sup>38</sup>, which may potentiate TRPV1 activity independently of LPA. The hyperalgesic responses observed in ref. 10 could also be due to the already-demonstrated overexpression of TRPV1 in some cancerous processes<sup>10,39</sup> and the potentiated response of the channel to inflammatory mediators known to modulate its activity through the activation of PKC-dependent pathways<sup>8</sup>. We were able to reproduce the potentiating effect of LPA on the TRPV1 capsaicin response reported in ref. 10, but we conclude that this is just an additive effect of two agonists binding to different regions in the channel.

Other studies in which LPA was delivered intraplantarly to mice show that LPA-induced pain responses can be blocked either by injection of LPA together with PTX or by inhibition of LPA<sub>1</sub> expression<sup>40</sup>, suggesting that acute peripheral nociceptor responses to LPA depend on the G<sub>i/o</sub>-coupled LPA<sub>1</sub> receptor. These data seem to exclude a major role for direct activation of TRPV1 by LPA in nociceptive behavior generation.

However, different lines of evidence from our experiments point to the contrary. First, our findings show that TRPV1, which is expressed in peripheral nociceptors, is robustly and directly activated by LPA and BrP-LPA, an inhibitor of LPA<sub>1</sub>. Second, BrP-LPA produced similar responses to LPA in our behavioral assays and triggered action-potential firing in cultured DRG neurons, indicating that LPA<sub>1</sub> is not essential for the generation of acute pain responses triggered by LPA. Furthermore, the experimental recordings in ref. 40 were performed after prolonged nociceptor stimulation, which favors TRPV1 channel desensitization. The resulting decrease in TRPV1 channel responsiveness to agonists could have obscured its role in the acute response to LPA.

Moreover, the authors in ref. 40 measured pain responses after LPA and PTX were injected together into the paws of mice and showed that, after only 20 min, PTX was able to produce a decrease in the pain response. The pain-related behavior up to 10 min was the same as the control response obtained in the presence of only LPA, consistent with our observations that LPA causes acute pain partly through TRPV1. Responses at longer LPA exposures could indeed stem from other molecular entities such as LPA<sub>1</sub>. It is certain that it is not only a single effector that controls the responses to LPA and other painful stimuli. Our own data show that there are residual responses in the behavioral assay in the TRPV1-null mice after LPA and BrP-LPA

injection (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. 2**) that could be due to other molecules affected by the activation of the signaling pathways resulting from LPA-receptor activation, such as LPA<sub>1</sub> or LPA<sub>5</sub>.

With regard to the nature of the interaction between channel and lipid, we established that one of the proposed PIP<sub>2</sub> binding sites in the TRPV1 channel, the residue Lys710 (ref. 11), in fact mediates binding of LPA. This interaction possibly occurs partly through an electrostatic mechanism, as a charge neutralization of this site is not as effective as a charge reversal in precluding LPA activation of TRPV1, and probably also through hydrophobic interactions with the acyl chain of LPA.

Lys710 is located in the region that constitutes the TRP-like domain and is also a tetramerization domain for the protein, and deletions in this region hinder the formation of stable multimers<sup>41</sup>. From our experiments with the K710D mutant, we observed that nearly 80% (but not all) of the response to LPA is abolished. It is possible that other residues also participate in the stabilization of LPA binding to TRPV1. To determine this, we mutated other charged residues in this region, including the nearby Arg701 residue as well as Lys694, Lys698, Lys714 and Arg718. However, none of these mutations produced functional channels. The deletion of a stretch of residues in the distal C terminus, previously reported as important for interactions of TRPV1 with PIP<sub>2</sub> (ref. 32), also had no effect on LPA activation of TRPV1.

Regarding the effects of PIP<sub>2</sub> on the channel's response to LPA, we found that PIP<sub>2</sub> reduces the apparent affinity of the channel for LPA. This is observed as a reduction in both the affinity for LPA obtained from the dose-response curves and the channel binding to LPA beads when PIP<sub>2</sub> is present. Moreover, the presence of PIP<sub>2</sub> also reduces the channel's maximum response to LPA. The effects on apparent affinity could be due to overlapping binding sites for LPA and PIP<sub>2</sub>. However, the reduction in the maximal response indicates that a complex allosteric interplay between LPA and PIP<sub>2</sub> might be taking place. Allosteric modulation of the effects of LPA by PIP<sub>2</sub> is not surprising because PIP<sub>2</sub> allosterically modulates the activation of TRPV1 by capsaicin through binding to several sites throughout the channel. In accordance with this interpretation, we produced a model that considers the competition between LPA and PIP<sub>2</sub> for a site in the channel and the allosteric modulation of LPA binding and channel activation through a second PIP<sub>2</sub> binding site (**Fig. 4a** and **Scheme 1**) and found that it satisfactorily accounts for our data.

How does LPA reach its intracellular binding site under physiological conditions? Intracellular LPA is produced mainly as a precursor of membrane phospholipids in the endoplasmic reticulum and mitochondria. The role for the intracellular LPA pool in cell signaling is not clear. Moreover, its effects on intracellular protein receptors such as PPAR $\gamma$  have been ascribed to the extracellular LPA pool, which finds its way into the cell<sup>42</sup>. Although LPA is present in serum at elevated concentrations, the large protein-bound fraction thereof reduces its effective concentration and its potency to activate some of its receptors<sup>43</sup>. Nonetheless, autotaxin associates with integrins<sup>44</sup> in the plasma membrane and contains a hydrophobic channel connected with the active site, which has a flat entrance that could interact with the membrane. On the basis of these findings, it has been proposed that the enzyme could locally deliver LPA, which could elevate the local concentration of the lipid above the maximal reported values for serum LPA<sup>45,46</sup>. Although the flip-flop rate of LPA is unknown, activation of the nuclear PPAR $\gamma$  receptor by extracellular LPA has been shown to be physiologically relevant, suggesting that efficient mechanisms of transbilayer movement of LPA exist. The apparent lack of a delay in channel activation by extracellular LPA in our experiments also indicates that the rate of transbilayer movement of LPA is comparable to the rate of channel activation. Also, these mechanisms for extracellular delivery of LPA do not preclude the possible role of intracellularly synthesized LPA in TRPV1 activation.

In this study we provide strong evidence that TRPV1 is directly activated by LPA, a mechanism that further broadens our understanding of how bioactive lipids act on nociceptors to produce and maintain pain. Our results also suggest a broader role of LPA in acute pain responses such as angina pectoris (the atherosclerotic plaque that produces ischemia contains high concentrations of LPA<sup>47</sup>), bites from animals whose venoms contain enzymes that convert lysophosphatidylcholine to LPA (such as those of the brown recluse or violin spider, *Loxosceles reclusa*<sup>48</sup>) or snake venoms that contain phospholipase A<sub>2</sub> (ref. 49), which also catalyzes the formation of LPA.

## METHODS

**Mice strains and genotyping.** C57BL/6J and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Animals with neural inactivation of *Ppap2b* (*Ppap2b*<sup>tm3Stw/tm3Stw</sup>; Nes-cre mouse line), named here for simplicity *Lpp3*<sup>-/-</sup>, were obtained from our animal facility<sup>14</sup>. *Lpp3*<sup>-/-</sup> and *Trpv1*<sup>-/-</sup> animals were mated to obtain double-mutant mice. The C57BL/6J mice were used as controls for the behavioral experiments on *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice, and *Ppap2b*<sup>tm3Stw/tm3Stw</sup> littermates were used as controls for *Lpp3*<sup>-/-</sup> and *Trpv1*<sup>-/-</sup> as well as *Lpp3*<sup>-/-</sup> mouse experiments. For PCR genotyping of complete *Ppap2b* Cre-mediated recombination as well as *Trpv1*<sup>-/-</sup> and Cre genotyping, we followed previously described methods<sup>14,15</sup>.

**Pain-related behavioral assays.** 10  $\mu$ l of either saline solution (0.9% w/v of NaCl) or capsaicin (2.8  $\mu$ g), LPA (4.1  $\mu$ g), BrP-LPA (3  $\mu$ g) or capsazepine (2.2  $\mu$ g) diluted in saline was injected intraplantarly using a 30-gauge needle, and paw-licking behavior was quantified for 10 min immediately after injection. Animals were handled according to institutional standards from the US National Institutes of Health (NIH). Thermal hyperalgesia was assessed by measuring paw withdrawal latency to radiant heat (University of California San Diego Thermal Paw stimulator) as previously described<sup>15</sup>. A current of 5.5 A was applied to each of the hind paws, and the mean of the withdrawal latencies was defined as paw-withdrawal latency.

**Mutagenesis.** Point mutations and deletions in the rTRPV1 channel were constructed by a two-step PCR method as previously described<sup>50</sup>.

**DRG and HEK293 cell culture and recording.** DRG neurons were obtained following previously described procedures<sup>12</sup>. HEK293 cells were transfected with wild-type and mutant pcDNA3-rTRPV1, pIRES-GFP (BD Biosciences) and with FLAG.PKCepsilon (Addgene plasmid 10795) or FLAG.PKCepsilon.K/W (Addgene plasmid 10796) with JetPei (Polyplus Transfection). Currents were recorded using the inside-out, outside-out and on-cell configurations of the patch-clamp technique<sup>44</sup>. Solutions were changed with a RSC-200 rapid solution changer (Molecular Kinetics). The solution for both inside-out and on-cell recording under isometric conditions comprised 130 mM NaCl, 3 mM HEPES (pH 7.2) and 1 mM EDTA. Capsazepine and capsaicin were diluted in DMSO and ethanol, respectively. Experiments were performed at 24 °C. Mean current values for LPA were measured after channel activation had reached the steady state (~5 min). Currents were obtained using voltage protocols with a holding potential of 0 mV. Steps from -120 to 120 mV were applied for 100 ms, and then the voltage was returned to 0 mV. Currents were low-pass filtered at 2 kHz, sampled at 10 kHz with an EPC 10 amplifier (HEKA Elektronik), and plotted and analyzed with Igor Pro (Wavemetrics Inc.).

Whole-cell currents from DRG neurons were recorded following previously described methods<sup>10</sup>. Action potentials were recorded in the whole-cell configuration from acutely dissociated DRG neurons from wild-type or *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice following methods previously described<sup>44</sup>. The membrane potential was recorded continuously, and LPA or allicin were applied directly to the bath solution.

**LPA binding assay.** Plasma membrane proteins from HEK293 cells transfected with wild-type TRPV1 or the K710D mutation were biotinylated and extracted using the Pierce cell-surface protein isolation kit according to manufacturer instructions with minor modifications (elution of proteins was performed with non-ionic detergents). Total membrane-protein extracts were incubated with LPA or control beads (Echelon Biosciences) for 3 h at 4 °C and were washed five times with binding buffer containing 0.5% Igepal (Sigma). To ensure equal protein input between conditions, proteins in equivalent volumes of the first supernatant (50  $\mu$ l) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Coomassie blue staining of the gel.

For competition assays, protein extracts were incubated with 10  $\mu$ M BrP-LPA or DiC8-PIP<sub>2</sub> prior to the addition of LPA or control beads. Pulled-down protein from each sample was eluted from the beads by adding an equal volume of 2 $\times$  Laemmli sample buffer to beads and heating to 95 °C for 5 min. Eluted proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using a TRPV1-specific antibody (Alomone Labs). For each experiment, a small sample of the total membrane-protein extract was loaded into the gel as a positive control of TRPV1 protein expression (lane 1 in Fig. 4d,e). Immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence, and densitometric analysis was done using ImageJ software (NIH) and expressed as relative amounts of protein versus the amount of TRPV1 bound to LPA beads.

**Lipids and polylysine.** LPA (Avant Polar Lipids or Sigma) and BrP-LPA (Echelon) dilutions were freshly prepared every day and sonicated in a cold bath. Stock solutions of LPA (10 mM) were prepared in DMEM with 1% fatty acid-free BSA (Roche), and BrP-LPA was prepared in water. Stock solutions were sonicated and frozen before use. DiC8-PIP<sub>2</sub> (Echelon Biosciences) was solubilized in recording solution and frozen at -20 °C. Phosphatidic acid and diacylglycerol (both from Avanti Polar Lipids) were diluted in chloroform, glycerol phosphate in water, sphingosine-1-phosphate in DMEM, oleic acid in ethanol and ceramide-1-phosphate (Avanti Polar Lipids) and lysophosphatidylcholine in chloroform:methanol (1:1), and a final concentration of 5  $\mu$ M was obtained by diluting in recording solution. FPP (Echelon Biosciences) was used at a concentration of 1.5  $\mu$ M.

Experiments to determine the effects of PIP<sub>2</sub> on TRPV1 activation by LPA were performed following previously established methods<sup>13</sup>. Briefly, we applied polyK (15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) to inside-out membrane patches and then measured the response to different concentrations of LPA in the absence and presence of different concentrations of PIP<sub>2</sub> to construct a dose-response curve. Data were normalized to the maximal current obtained in the presence of 5  $\mu$ M LPA without PIP<sub>2</sub>.

**Statistical analysis.** Statistical comparisons were made with a one-way ANOVA test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Group data are reported as the mean  $\pm$  s.e.m. Additional experimental procedures can be found in **Supplementary Methods**.

Received 4 April 2011; accepted 29 August 2011;  
published online 20 November 2011; corrected online 15 June 2012

## References

- Inoue, M. *et al.* Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat. Med.* **10**, 712–718 (2004).
- Okudaira, S., Yukiura, H. & Aoki, J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* **92**, 698–706 (2010).
- Lin, M.E., Herr, D.R. & Chun, J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **91**, 130–138 (2010).
- Ma, L., Nagai, J. & Ueda, H. Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J. Neurochem.* **115**, 643–653 (2010).
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K.R., Spiegel, S. & Moolenaar, W.H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **62**, 579–587 (2010).
- Roedding, A.S., Li, P.P. & Warsh, J.J. Characterization of the transient receptor potential channels mediating lysophosphatidic acid-stimulated calcium mobilization in B lymphoblasts. *Life Sci.* **80**, 89–97 (2006).
- Runnels, L.W., Yue, L. & Clapham, D.E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 329–336 (2002).
- Jara-Oseguera, A., Simon, S.A. & Rosenbaum, T. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 255–269 (2008).
- Yao, J., Liu, B. & Qin, F. Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11109–11114 (2011).
- Pan, H.L., Zhang, Y.Q. & Zhao, Z.Q. Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKC $\epsilon$  pathway in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pain* **6**, 85 (2010).
- Brauchi, S. *et al.* Dissection of the components for PIP<sub>2</sub> activation and thermosensation in TRP channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10246–10251 (2007).
- Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F. & Gordon, S.E. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **128**, 509–522 (2006).
- Ufret-Vincenty, C.A., Klein, R.M., Hua, L., Angueyra, J. & Gordon, S.E. Localization of the PIP<sub>2</sub> sensor of TRPV1 ion channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 9688–9698 (2011).
- Escalante-Alcalde, D., Sanchez-Sanchez, R. & Stewart, C.L. Generation of a conditional *Ppap2b/Lpp3* null allele. *Genesis* **45**, 465–469 (2007).
- Caterina, M.J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306–313 (2000).
- Jiang, G. *et al.*  $\alpha$ -substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem* **2**, 679–690 (2007).
- Oh, D.Y. *et al.* Identification of farnesyl pyrophosphate and N-arachidonylglycine as endogenous ligands for GPR92. *J. Biol. Chem.* **283**, 21054–21064 (2008).
- Alderton, F., Sambhi, B., Tate, R., Pyne, N.J. & Pyne, S. Assessment of agonism at G-protein coupled receptors by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in human embryonic kidney 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 6–9 (2001).
- Zhang, H. *et al.* Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. *Cancer Res.* **69**, 5441–5449 (2009).

20. Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H. & Hwang, S.W. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J. Biol. Chem.* **285**, 19362–19371 (2010).
21. Cohen, A., Sagron, R., Somech, E., Segal-Hayoun, Y. & Zilberberg, N. Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel. *Mol. Cell. Neurosci.* **40**, 382–389 (2009).
22. Uehata, M. *et al.* Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990–994 (1997).
23. Bourinet, E., Soong, T.W., Stea, A. & Snutch, T.P. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1486–1491 (1996).
24. Koch, W.J., Hawes, B.E., Inglese, J., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G $\beta\gamma$ -mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **269**, 6193–6197 (1994).
25. Chaytor, A.T., Edwards, D.H., Bakker, L.M. & Griffith, T.M. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15212–15217 (2003).
26. Tang, L. *et al.* Antinociceptive pharmacology of *N*-(4-chlorobenzyl)-*N'*-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzyl) thiourea, a high-affinity competitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 791–798 (2007).
27. Cenni, V. *et al.* Regulation of novel protein kinase C  $\epsilon$  by phosphorylation. *Biochem. J.* **363**, 537–545 (2002).
28. Mintzer, E., Sargsyan, H. & Bittman, R. Lysophosphatidic acid and lipopolysaccharide bind to the PIP2-binding domain of gelsolin. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 85–89 (2006).
29. Kumar, N., Zhao, P., Tomar, A., Galea, C.A. & Khurana, S. Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **279**, 3096–3110 (2004).
30. Klein, R.M., Ufret-Vincenty, C., Hua, L. & Gordon, S. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 26208–26216 (2008).
31. Yao, J. & Qin, F. Interaction with phosphoinositides confers adaptation to the TRPV1 pain receptor. *PLoS Biol.* **7**, e46 (2009).
32. Prescott, E.D. & Julius, D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* **300**, 1284–1288 (2003).
33. Tominaga, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–543 (1998).
34. Inoue, M. *et al.* Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* **152**, 296–298 (2008).
35. Ueda, H. Peripheral mechanisms of neuropathic pain—involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol. Pain* **4**, 11 (2008).
36. Chemin, J. *et al.* Lysophosphatidic acid-operated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* **280**, 4415–4421 (2005).
37. Kelly, J.J. Jr., Kyle, R.A., Miles, J.M. & Dyck, P.J. Osteosclerotic myeloma and peripheral neuropathy. *Neurology* **33**, 202–210 (1983).
38. Schwei, M.J. *et al.* Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J. Neurosci.* **19**, 10886–10897 (1999).
39. Marincsák, R. *et al.* Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis.* **15**, 328–335 (2009).
40. Renbäck, K., Inoue, M., Yoshida, A., Nyberg, F. & Ueda, H. Vzg-1/lysophosphatidic acid-receptor involved in peripheral pain transmission. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **75**, 350–354 (2000).
41. García-Sanz, N. *et al.* A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel gating. *J. Neurosci.* **27**, 11641–11650 (2007).
42. McIntyre, T.M. *et al.* Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR $\gamma$  agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 131–136 (2003).
43. Hama, K., Bandoh, K., Kakehi, Y., Aoki, J. & Arai, H. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett.* **523**, 187–192 (2002).
44. Salazar, H. *et al.* A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci.* **11**, 255–261 (2008).
45. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 205–212 (2011).
46. Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 198–204 (2011).
47. Karliner, J.S. Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 216–221 (2002).
48. Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L. & King, L.E. Jr. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* **44**, 561–573 (2001).
49. Caccin, P., Rigoni, M., Bisceglie, A., Rossetto, O. & Montecucco, C. Reversible skeletal neuromuscular paralysis induced by different lysophospholipids. *FEBS Lett.* **580**, 6317–6321 (2006).
50. Rosenbaum, T. & Gordon, S.E. Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* **33**, 703–713 (2002).

## Acknowledgments

We thank D. Julius at University of California, San Francisco for providing the TRPV1 and TRPV2 cDNA, A. Patapoutian at the Scripps Research Institute for the TRPA1 cDNA, A. Toker at Harvard Medical School for PKC $\epsilon$  dominant-negative and wild-type plasmids, J.A. García-Sáinz for his kind gift of BIM I and M. Calcagno for helpful discussion. We also thank L. Ongay, A. Escalante and F. Pérez at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for expert technical support and F. Sierra for expert help with DRG neuron culture. We are grateful to C.C. Durán and V.G. Soto for very valuable help with paw-withdrawal experiments. This work was supported by 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) grant PIFUTP09-262 to L.D.I., PAPIIT grants IN216009 and CONACyT 53777 to D.E.-A., and PAPIIT grants IN294111-3 and CONACyT CB-129474 and a grant from Fundación Miguel Alemán to T.R. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for A.N.-P.'s doctoral degree in biomedical sciences at the UNAM.

## Author contributions

A.N.-P., G.P.-J. and A.J.-O. performed electrophysiological experiments. I.L. carried out all site-directed mutagenesis. S.M.-L. performed all animal matings, genotyping and biochemical assays. D.E.-A., L.D.I. and T.R. jointly conceived the study, performed recordings and analysis, and wrote the paper.

## Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

## Additional information

Supplementary information is available online at <http://www.nature.com/naturechemicalbiology/>. Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.R., D.E.-A. or L.D.I.



## CORRIGENDUM

**Lysophosphatidic acid directly activates TPRV1 through a C-terminal binding site**

Andrés Nieto-Posadas, Giovanni Picazo-Juárez, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera, Sara Morales-Lázaro, Diana Escalante-Alcalde, León D Islas & Tamara Rosenbaum

*Nat. Chem. Biol.* **8**, 78–85 (2012); published online 20 November 2011; corrected after print 15 June 2012

In the version of this article initially published, the amount of LPA used in behavioral assays was incorrectly stated in the Methods section as 3  $\mu\text{g}$  when it should have read 4.1  $\mu\text{g}$ . Also, the details of preparation of LPA stock solutions were incomplete in the Methods section. The errors have been corrected in the HTML and PDF versions of the article.

## CORRECTION NOTICE

*Nat. Chem. Biol.* **8**, 78–85 (2012)

## Lysophosphatidic acid directly activates TPRV1 through a C-terminal binding site

Andrés Nieto-Posadas, Giovanni Picazo-Juárez, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera, Sara Morales-Lázaro, Diana Escalante-Alcalde, León D Islas & Tamara Rosenbaum

In the version of this supplementary file originally posted online, the amount of LPA used in behavioral assays was incorrectly stated in the legend of Supplementary Figure 1 as 3 µg when it should have read 4.1 µg. The error has been corrected in this file as of 15 June 2012.

## **Supplementary Information for**

### **Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site**

Andrés Nieto-Posadas, Giovanni Picazo-Juárez, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera,  
Sara Morales- Lázaro, Diana Escalante-Alcalde, León D. Islas, Tamara Rosenbaum

**Supplementary Methods**

**Supplementary Results**

## Supplementary Methods

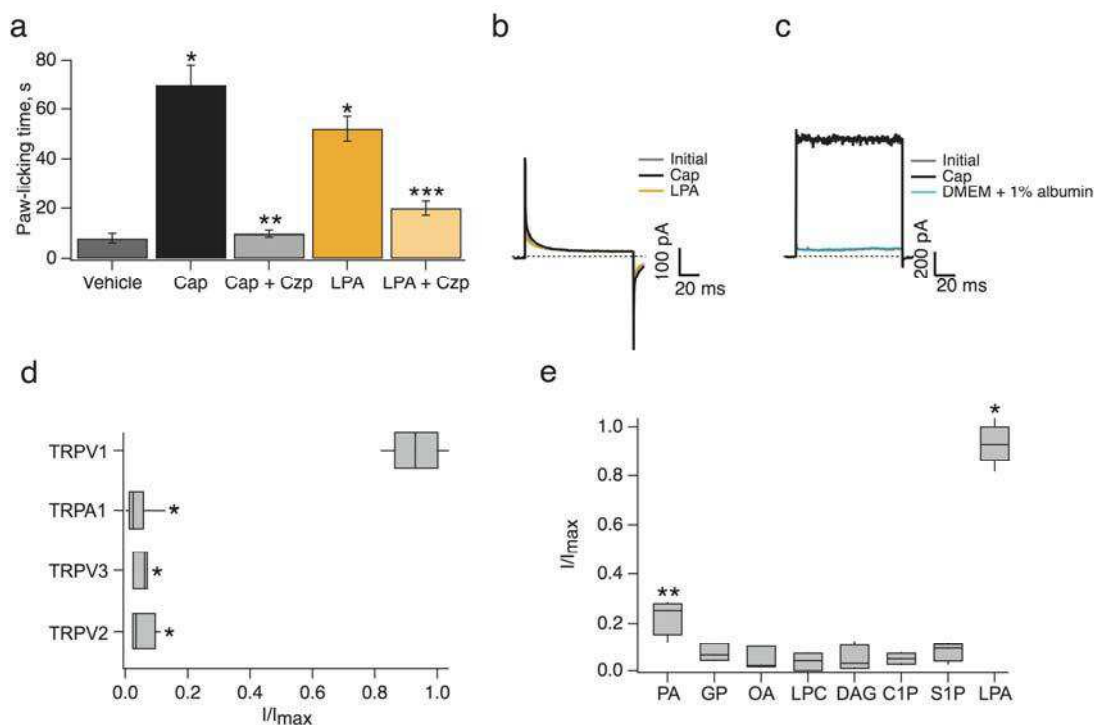
### Reverse Transcription-PCR Analysis

Total RNA was isolated from mouse DRG neurons, Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) and HEK293 cell lines with TRIZOL Reagent (Invitrogen). Two micrograms of total RNA were reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was amplified by PCR using the following primers: for mouse samples mLPA<sub>5</sub>-S (5'-TGGCAGAGTCTTCTGGACACT-3') and mLPA<sub>5</sub>-AS (5'-CCAAAGGCCTGGTATTCAGCG-3'); for human sample hLPA<sub>5</sub>-S (5'-TAACCTCGTCACTTCCTGCT-3') and hLPA<sub>5</sub>-AS (5'-TGTGAAGGAAGACAGAGAGTG-3'). The PCR cycling parameters were as follows: denaturation at 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 45 s. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under a UV light source.

### Treatments with G-protein coupled receptor (GPCR) signaling pathways inhibitors.

For experiments using GPCR-mediated signaling inhibitors, HEK293 cells were incubated over-night with Y27632 (260 μM for PKC and 10 μM for ROCK) and with bisindolylmaleimide I hydrochloride (BIM I, 1 μM); all from Calbiochem, USA. The phospholipase C inhibitor U-73122 (10 μM, Santa Cruz Biotechnology) and the adenylyl-cyclase inhibitor 2', 5'-dideoxyadenosine (500 μM, Sigma) were applied to HEK293 cells for 30 min. Finally, the βγ-subunits of the G-protein scavenger (Ctr-βARK1) was cotransfected with WT TRPV1. Currents were then recorded at 120 mV using the on-cell configuration of the patch-clamp technique and were first exposed to 4 μM capsaicin to obtain maximal-activation values. Then capsaicin was washed off and 5 μM LPA was added to obtain the fraction of current activated by this lipid. Data were compared to cells not incubated with the inhibitors. Epsilon -V1 - 2, epsilon - PKC Inhibitor, Cys - conjugated (εV<sub>1-2</sub>, ANASPEC) was diluted in water and delivered intracellularly to DRG neurons at a concentration of 200 μM via the recording electrode in whole-cell recordings.

## Supplementary Results



### Supplementary Figure 1. Control experiments showing specificity of LPA actions on TRPV1.

(a) Coapplication of capsazepine (Czp) with LPA mimics the pain-like behavior of the TRPV1<sup>-/-</sup> upon LPA injection. Paw-licking time after injection of 2.8  $\mu$ g of capsaicin was  $70 \pm 8$  s vs  $8 \pm 1.8$  s for saline and coinjection of capsaicin + Czp (2.2  $\mu$ g) was  $9.8 \pm 1.3$  s. Paw-licking time after injection of LPA (4.1  $\mu$ g) was  $52 \pm 5$  s and  $20 \pm 2.8$  for LPA + Czp. \*denotes  $p < 0.01$  with respect to vehicle, \*\*  $p < 0.01$  between capsaicin and capsaicin + Czp and \*\*\*  $p < 0.01$  with respect to LPA and LPA + Czp ( $n=10$ ).

(b) GFP-transfected cells are not activated by capsaicin (black trace) nor LPA (orange trace) as compared to leak currents (grey trace) in inside-out membrane patches (120 mV). Representative traces from 5 experiments.

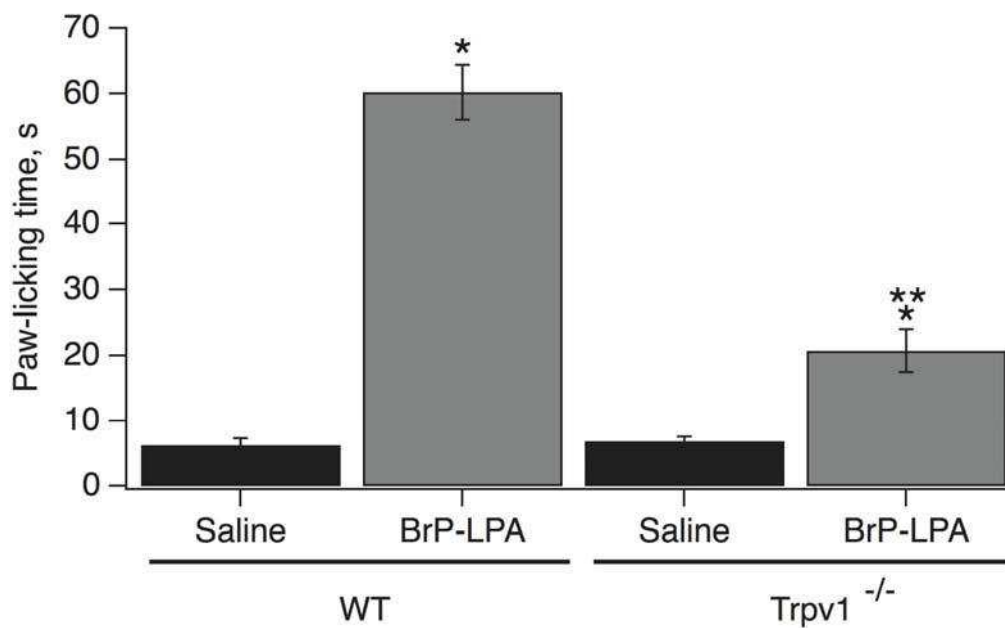
(c) The vehicle where LPA was diluted does not activate TRPV1 expressed in HEK cells. While capsaicin promotes current activation (black trace), currents measured in vehicle (DMEM + 1% fatty acid free-albumin, blue trace) behave like the initial currents (grey trace). Representative traces from 5 experiments for each case (inside-out membrane patches, 120 mV).

(d) TRPA1, TRPV2 and TRPV3 do not respond to LPA. The box-plot depicts the effects of LPA on TRP-channel activation. Data are expressed as the fraction of current in the presence of LPA normalized with respect to maximal activation with each channel's known activator (30  $\mu$ M 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB) for TRPV2 and 2mM for TRPV3, 400  $\mu$ M allicin for TRPA1; 4  $\mu$ M for TRPV1 which is the same data as in Figure 2b). The vertical line within each box indicates the median, boxes show the twenty-fifth and seventy-fifth percentiles, and whiskers show the fifth and ninety-fifth percentiles of the data ( $n = 5$ ).

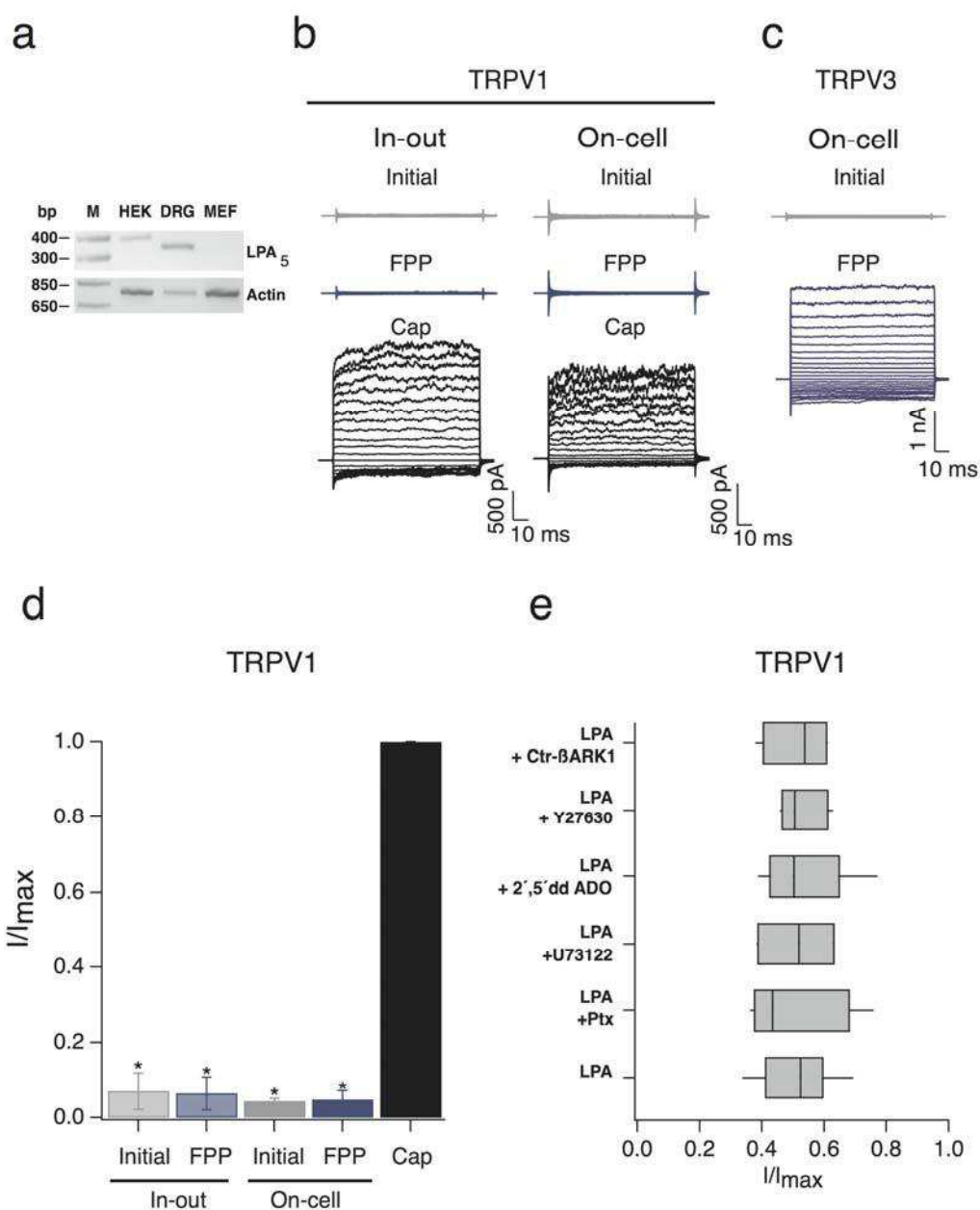
\* \* denotes a significant difference of  $p < 0.01$  between TRPV1 and the other

channels, ANOVA test. All experiments were performed in the inside-out configuration of the patch clamp at 120 mV except with TRPA1, where the cell-attached configuration was used to avoid rundown.

(e) Box-plot depicting the effects of LPA-related molecules on the TRPV1. Phosphatidic acid (PA) produced a small but significant effect on TRPV1-current activation when compared to its own leak currents but glycerol phosphate (GP), oleic acid (OA), lysophosphatidylcholine (LPC), diacylglycerol (DAG), ceramide-1-phosphate (C1P) and sphingosine-1-phosphate (S1P) failed to promote channel activation. All molecules were applied at a concentration of 5  $\mu$ M from the intracellular side of the membrane in TRPV1-expressing HEK-cell patches. Data are expressed as the fraction of current normalized with respect to maximal activation with saturating capsaicin (4  $\mu$ M) at 120 mV. The horizontal line within each box indicates the median, boxes show the twenty-fifth and seventy-fifth percentiles, and whiskers show the fifth and ninety-fifth percentiles of the data (n = 6). \* denotes a significant difference of  $p < 0.01$  between LPA and the other compounds and \*\* denotes significance of  $p < 0.05$  between PA and the rest of the lipids, ANOVA test.



**Supplementary Figure 2. BrP-LPA mimics the pain-like behavior induced by LPA.** Paw-licking time after injection of 3 $\mu$ g BrP-LPA was 60  $\pm$  4 s vs 6  $\pm$  1 s for saline in control and 21  $\pm$  3 s vs 7  $\pm$  0.7 s for saline in *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice. \* denotes  $p < 0.01$  between saline- and BrP-LPA- injected animals and \*\* $p < 0.01$  between control and *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice injected with BrP-LPA, ANOVA test. (n=12)



**Supplementary Figure 3. LPA<sub>5</sub> is not involved in the response of TRPV1 to LPA.**

(a) Lane 1 is the molecular weight marker. LPA<sub>5</sub> cDNA was amplified from reverse transcribed mRNA from HEK293 cells (lane 2), mouse DRG neurons (lane 3), and mouse embryonic fibroblasts (MEF, lane 4). Representative of 3 equal experiments.

(b) Representative current families obtained in the inside-out and on-cell configurations of the patch-clamp technique in response to voltage pulses from -120 to 120 mV in 10 mV increments (n= 5 for each configuration) using TRPV1-transfected HEK cells. Initial currents were first measured in the absence of any compound (grey, top), then in the presence of 1.5 μM FPP (blue, middle) and finally with 4 μM capsaicin (black, bottom).

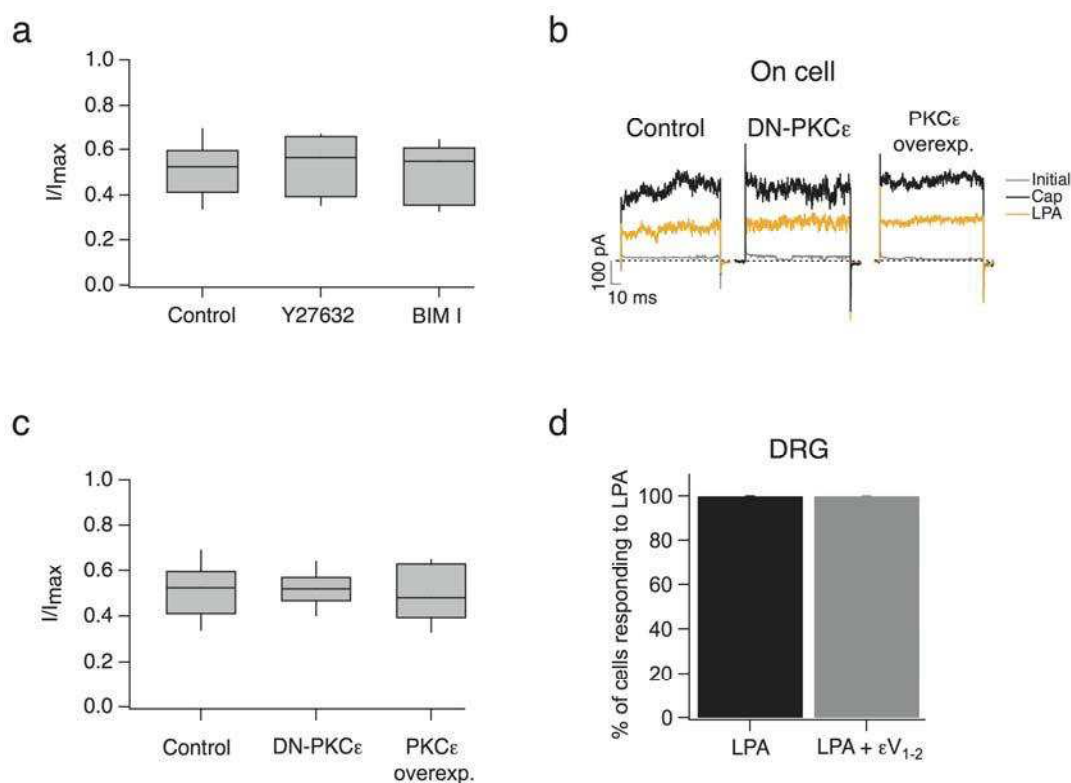
(c) Representative traces in the on-cell configuration of 5 equal experiments from HEK293 cells expressing the TRPV3 channel. Initial currents were first obtained in the absence of any compound (grey, top) and then in the presence of 1.5 μM FPP (blue, bottom).

(d) Bar-chart for averaged data obtained from experiments shown in (b). For inside-



out experiments, the fractions of measured currents at 120 mV with respect to 4  $\mu$ M capsaicin were: initial,  $0.07 \pm 0.04$  and FPP,  $0.06 \pm 0.04$ . For on-cell experiments the fractions were: initial,  $0.04 \pm 0.007$  and FPP,  $0.04 \pm 0.02$ . Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 5$  for each group).

(e) Box-plot of the fraction of current activated by LPA with respect to 4  $\mu$ M capsaicin in the on-cell configuration after the incubation of cells with inhibitors of LPA receptor-associated signaling pathways ( $n = 5$ ). The horizontal line within each box indicates the median, boxes show the twenty-fifth and seventy-fifth percentiles, and whiskers show the fifth and ninety-fifth percentiles of the data.



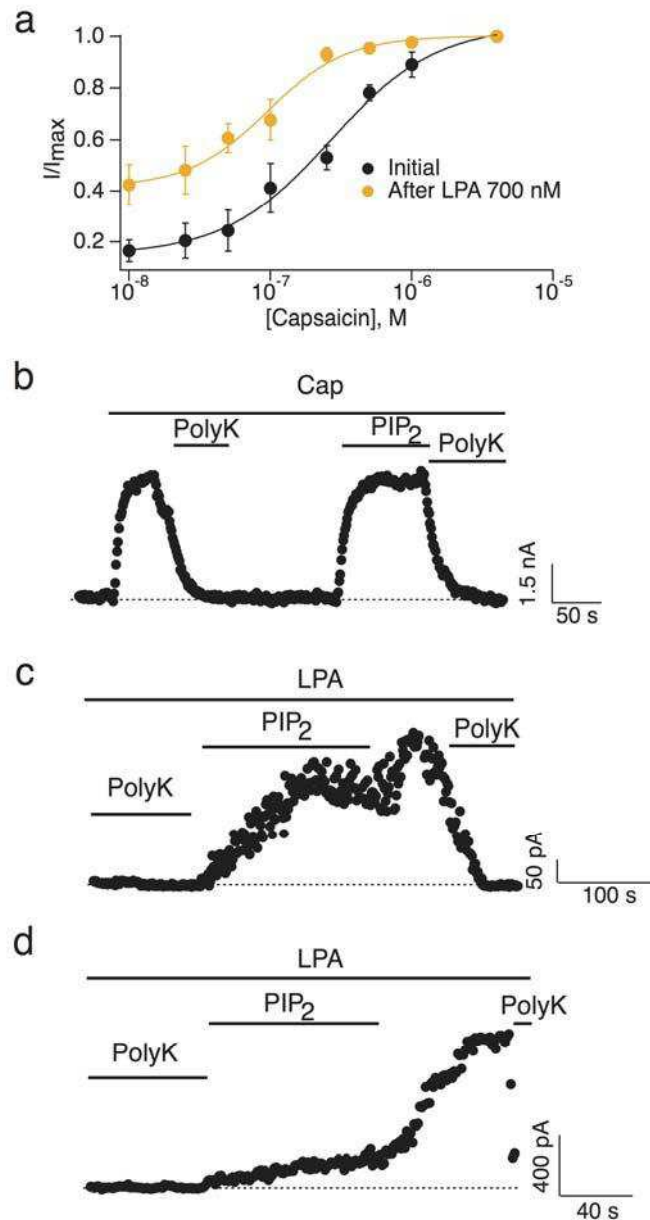
**Supplementary Figure 4. PKC $\epsilon$  is not involved in TRPV1 activation by LPA.**

(a) PKC inhibitors do not abrogate LPA effects. Mean TRPV1-currents recorded in on-cell HEK-cell membrane patches elicited by 5  $\mu$ M LPA at 120 mV after Y27632 (260  $\mu$ M) or BIM I (1  $\mu$ M) treatments and normalized to the mean current in saturating capsaicin. Box-plot content is as in Fig.2b (n = 6).

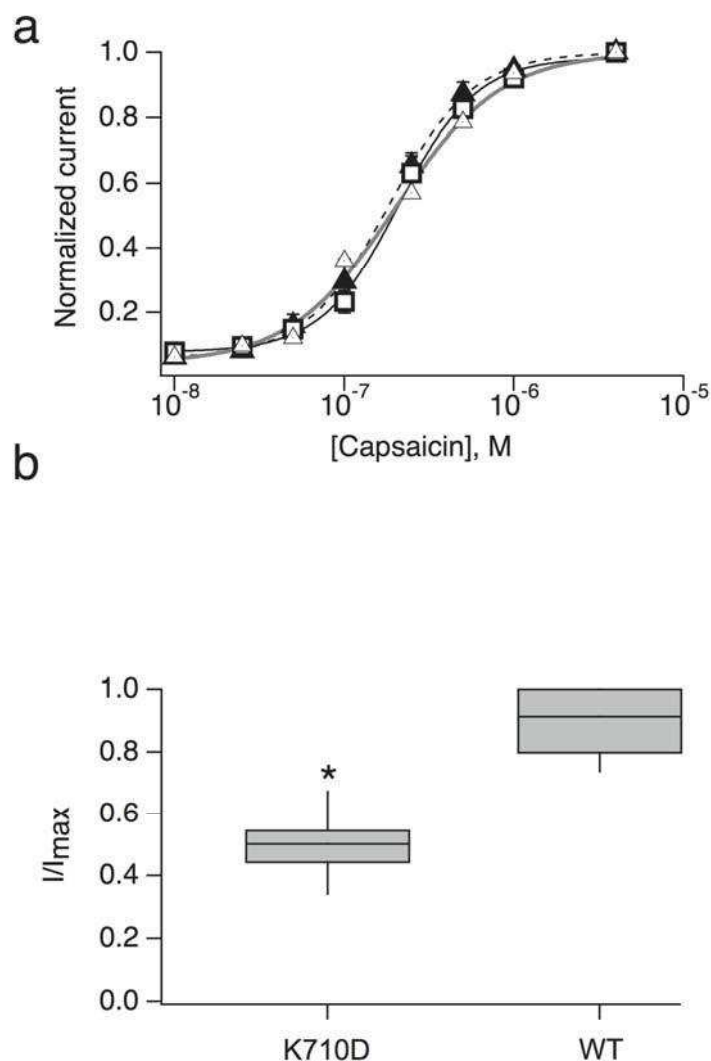
(b) Representative traces (n = 6) for activation of TRPV1 by LPA (on-cell) in a HEK293 cell expressing only TRPV1 (left) or TRPV1 and either the dominant negative PKC $\epsilon$  (middle) or the WT PKC $\epsilon$  (right) at 120 mV.

(c) Box-plot of the fraction of currents activated by LPA relative to 4  $\mu$ M capsaicin for experiments as in (b).

(d) Percentage DRG neurons which responded to LPA with a TRPV1-like current with (left) or without the PKC $\epsilon$  inhibitor  $\epsilon V_{1-2}$  in the pipette solution of whole-cell patches (-60 mV, n = 6).



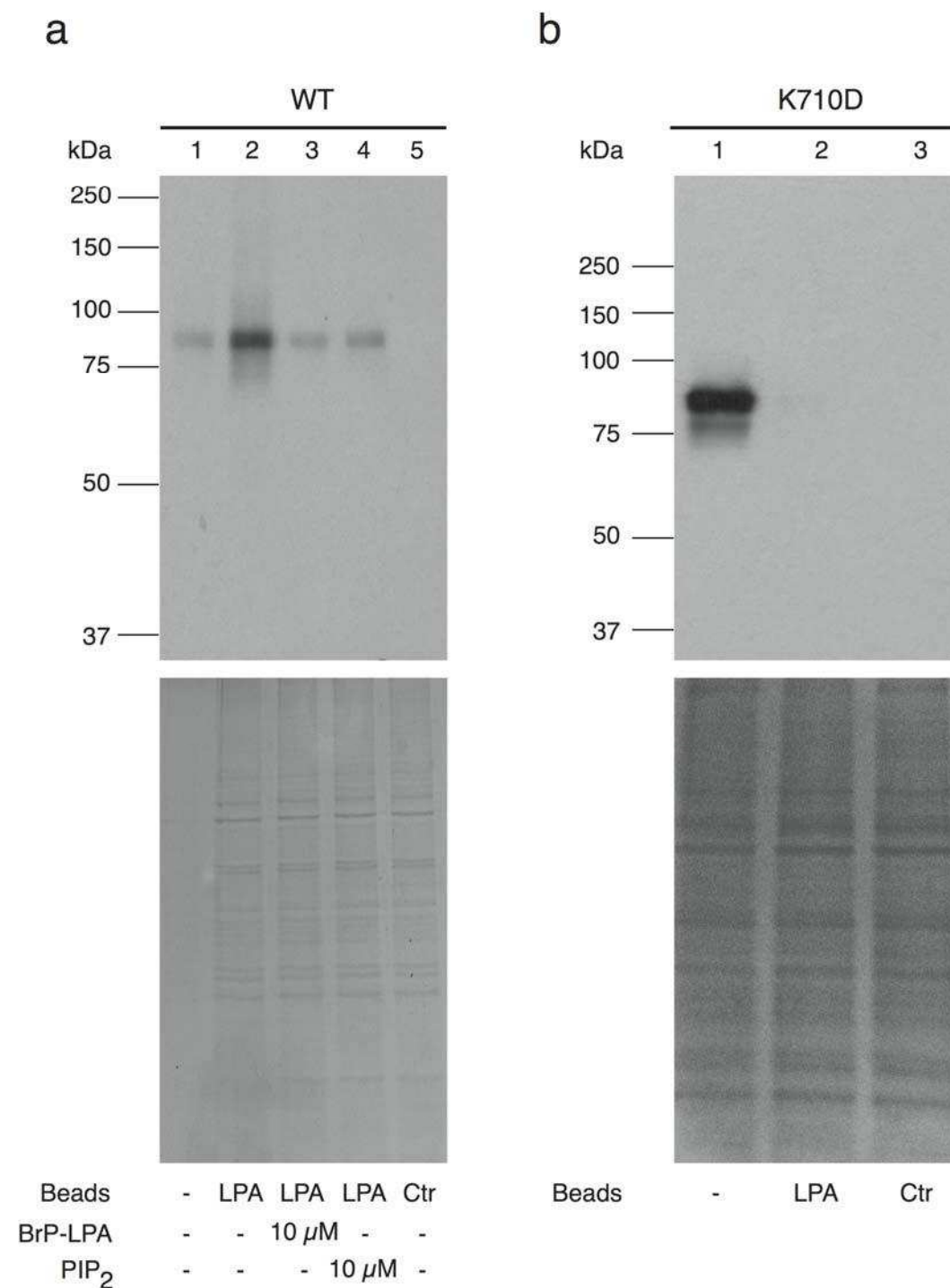
**Supplementary Figure 5. Activation of TRPV1 in the presence of LPA and PIP<sub>2</sub>.**  
 (a) Additive effects of LPA and capsaicin on TRPV1 activation. Initial dose-response to capsaicin alone ( $K_D = 228 \pm 85$  nM and slope =  $1.3 \pm 0.18$ ; black symbols and black curve) and together with 700 nM LPA ( $K_D = 85 \pm 32$  nM and slope =  $1.4 \pm 0.23$ ; orange symbols and orange curve) at 120 mV in inside-out membrane patches. Smooth curves are fits to the Hill equation. Pooled data are presented as mean  $\pm$  s.e.m of 4 equal experiments.  
 (b) DiC8-PIP<sub>2</sub> inhibits the response of TRPV1 to LPA. Time-course of TRPV1-activation by capsaicin (100 nM), inhibition by polylysine (polyK) (15  $\mu$ g/ml) and recovery by addition of DiC8-PIP<sub>2</sub> (200 nM) in inside-out membrane patches.  
 (c and d) Time-course of TRPV1-activation (+120 mV) by LPA (5  $\mu$ M) exhibiting inhibition by polyK (15  $\mu$ g/ml) and 50 nM (c) and (d) 200 nM DiC8-PIP<sub>2</sub> in the inside-out configuration. LPA was present throughout the whole experiment.



**Supplementary Figure 6. Effects of BrP-LPA on the TRPV1-K710D channel.**

(a) The response to capsaisin is not affected in the TRPV1-K710Q and TRPV1-K710D mutants. Dose-response curves to capsaisin of TRPV1-K710Q ( $K_D = 185 \pm 6$  nM; filled triangles and dotted curve) and of TRPV1-K710D ( $K_D = 246 \pm 53$  nM; empty triangles and grey curve) as compared to WT ( $228 \pm 85$  nM; squares and black curve) at 120 mV in inside-out membrane patches. Smooth curves are fits to the Hill equation. Pooled data are presented as mean  $\pm$  s.e.m of 5 equal experiments.

(b) The K710D mutation abrogates BrP-LPA's effects on TRPV1 currents. Box-plot for the fraction of current activated by BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ ) in the TRPV1-K710D mutant as compared to WT and normalized with respect to currents activated by saturating capsaisin. The vertical line within each box indicates the median, boxes show the twenty-fifth and seventy-fifth percentiles, and whiskers show the fifth and ninety-fifth percentiles of the data. The symbol \*denotes significance of  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ , ANOVA test.



**Supplementary Figure 7. Binding of TRPV1 to LPA-beads is specific.**

(a) TRPV1 interaction with LPA-coated beads. Lane 1= input (1  $\mu$ g), 2= TRPV1 bound to LPA-beads, 3 and 4= competition of BrP-LPA and PIP<sub>2</sub> for beads, respectively and 5= interaction with control beads. 2,3,4,5 contained 30  $\mu$ g of membrane protein. Lower panel= Coomassie blue-stained supernatant fraction.

(b) Interaction of K710D with LPA-coated beads. Lane 1= the input (5  $\mu$ g) of the TRPV1-K710D mutant, 2= pull-down of TRPV1-K710D with LPA-beads and 3= control beads. 2 and 3 contain 60  $\mu$ g of membrane protein. Lower panel= Coomassie blue-stained supernatant fraction.