



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN AL  
ATP EN LOS RECEPTORES P2X1 DE HUMANO**

Tesis que presenta

**Estefanía Tejeda Jaramillo**

Para obtener el grado de

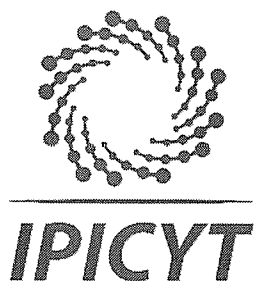
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Codirectores del trabajo de tesis:

**Dr. Carlos Barajas López**

**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2018



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Identificación de los sitios de unión al ATP en los receptores P2X1 de humano**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Estefanía Tejeda Jaramillo** y aprobada el trece de diciembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**  
Codirector de la tesis

**Dr. Antonio De León Rodríguez**  
Miembro del Comité Tutorial

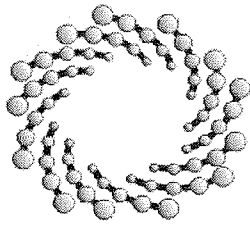
**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Carlos Barajas López y el Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. De registro 614323) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 186 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de diciembre del año 2018, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Braulio Gutiérrez Medina</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Estefanía Tejeda Jaramillo**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación de los sitios de unión al ATP en los receptores P2X1 de humano*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Carlos Barajas López**  
**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**

El Jurado, después de deliberar, determinó

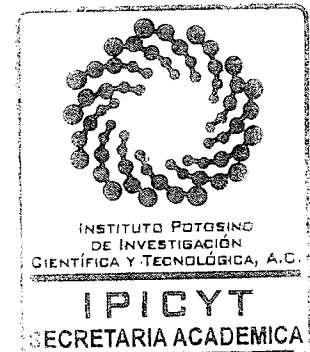
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de diciembre de 2018.

  
**Mtra. Ivenne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

A mis padres, Ángel Tejeda y Estela Jaramillo.

A mis hermanos, Cristian y Natalia.

A mi familia Tejeda y mi familia Jaramillo.

A mis amigos, Cris, Sandy, Daniel, Luis y Ricardo

A Héctor Arismendi.

Especialmente a mi jefe y amigo el Dr. Carlos Barajas López.

¡Para ustedes con todo mi amor!

## **Agradecimientos**

A los Doctores Carlos Barajas y Sergio Nemorio Hidalgo por permitirme trabajar bajo su dirección, por su apoyo, guía y enseñanzas que me brindaron a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Antonio De León por sus revisiones y correcciones hacia mi trabajo.

A la Enf. Rosa Espinosa Luna por todo el apoyo y buenos consejos brindados tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al Conacyt por el apoyo económico que me otorgó para poder llevar a cabo mi trabajo y al IPICYT por permitir desarrollarme dentro de sus instalaciones.

Al Instituto Karolinska y al laboratorio Lindskog por las enseñanzas y por formar una parte importante en mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Erika Vázquez Juárez y al Dr. Hugo Balleza por adoptarme y apoyarme de todas las formas posibles estando en tierras extranjeras.

A mis compañeros y amigos Karen, Jessica, Nikte y Alejandro por ayudarme con las técnicas y resolver pacientemente todas mis dudas.

A todo el laboratorio 5 por acompañarme y hacer ameno el trabajo del día a día.

A mi familia por ser mi motor, por alentarme y apoyarme desde la distancia.

A Héctor, por inspirarme a mejorar cada día y por todo su apoyo incondicional.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos Institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Resumen</b>	<b>x</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>METODOS</b>	<b>5</b>
Preparación de la base de datos: Alineamientos iniciales y búsqueda de plantillas	<b>5</b>
Modelado de los receptores hP2X1 y hP2X1del.	<b>5</b>
Armado y validación de los receptores hP2X1 y hP2X1del para el acoplamiento molecular.	<b>5</b>
Análisis de cavidades en el receptor hP2X1.	<b>7</b>
Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1 y hP2X1del.	<b>7</b>
Mutación sitio dirigida	<b>8</b>
Transformación de bacterias E. coli Top10.	<b>8</b>
Selección de clonas.	<b>9</b>
Extracción de ADN plasmídico.	<b>9</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>11</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>14</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>18</b>
<b>TABLAS</b>	<b>19</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>21</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>36</b>

## Lista de tablas

Tabla 1. Resultados del BLASTp de la secuencia de aminoácidos del receptor hP2X1 contra la base de datos del PDB. 19

Tabla 2. Resultados del BLASTp de la secuencia de aminoácidos del receptor hP2X1 *del* contra la base de datos del PDB. 19

Tabla 3. Diseño de oligos basado en las especificaciones del protocolo <sup>TM</sup>QuickChange. 20



## Lista de figuras

Figura 1. Multialineación para la construcción del receptor hP2X1.	21
Figura 2. Alineación para la construcción del receptor hP2X1 <i>del</i> .	22
Figura 3. Etapas de las cadenas en el proceso de limpieza hasta llegar al armado de los receptores hP2X1 y hP2X1 <del>.</del>	23
Figura 4. Análisis de validación global de puntuación Z de los hP2X1 y hP2X1 <i>del</i> .	24
Figura 5. Gráfico de Ramachandran de validación local de los hP2X1 y hP2X1 <i>del</i> .	25
Figura 6. Gráfico de validación local por análisis energético de aminoácidos.	26
Figura 7. Análisis de cavidades en el receptor hP2X1.	27
Figura 8. Vista superficial de los sitios de unión al ATP de los receptores hP2X1 y hP2X1 <i>del</i> .	28
Figura 9. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.	29
Figura 10. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.	30
Figura 11. Esquema 2D de la interacción del ATP con los aminoácidos circundantes en el 2° sitio de unión propuesto en el receptor hP2X1.	31
Figura 12. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.	32
Figura 13. Amplificación del receptor hP2X1 con los oligos diseñados para generar la mutación puntual R197A.	33
Figura 14. Resultado de la secuenciación del receptor hP2X1 ligado al vector PCDNA 3	33

## Resumen

### Identificación de los sitios de unión a ATP en los receptores P2X1 de humanos

Los receptores P2X son canales catiónicos no selectivos activados por trifosfato de adenosina (ATP), involucrados en diversos procesos fisiológicos como neurotransmisión, nocicepción e inflamación. La determinación de la estructura cristalina del receptor P2X4 de pez cebra y recientemente de los receptores P2X3 y P2X7 de humano ha proporcionado información esencial sobre su organización tridimensional que ha servido como base para interpretar información de estudios bioquímicos y de mutagénesis dirigida para localizar el sitio de unión a ATP. La farmacodinámica de los receptores es variable entre cada una de los subtipos, la farmacodinámica del receptor P2X1 había sido descrita por estudios electrofisiológicos como una respuesta sensible a bajas concentraciones (nM) de ATP y con una desensibilización rápida. Sin embargo, un estudio reciente demuestra que además es sensible a altas concentraciones de ATP (mM), generando una corriente lenta con una cinética muy diferente, así, las corrientes generadas aumentan con el tiempo de exposición al agonista. Esta cinética es muy similar a la respuesta que genera una variante de edición del hP2X1 (hP2X1 *del*), estas observaciones apoyan la hipótesis que el segmento deletado en el receptor hP2X1 *del* es responsable del sitio de unión de alta afinidad al ATP pero mantiene el segundo sitio de unión de baja afinidad. Por lo anterior, en este estudio se utilizó por primera vez la técnica de modelado por homología con base en estructuras de referencia de la familia P2X (hP2X3 y hP2X7) para construir los receptores hP2X1 y hP2X1 *del* y que en combinación con estudios de mutagénesis dirigida se usaron para realizar una exploración de los sitios de unión al ATP. Nuestros resultados sugieren la existencia de un sitio adicional de unión al ATP en el receptor hP2X1 que probablemente se encuentra conservado en el receptor hP2X1 *del*, el cual, podría ser responsable de la activación de los receptores que activan la corriente lenta.

**Palabras clave:** ATP, P2X, homología, acoplamiento molecular, mutagénesis.

## Abstract

### ATP binding sites identification on P2X1 human receptors

P2X receptors are non-selective cationic channels gated by adenosine triphosphate (ATP); they are involved in many physiologic processes like neurotransmission, nociception and inflammation. The resolution of the P2X4 crystalline structure from zebrafish and recently from human P2X3 and P2X7 has provided essential information about the three-dimensional structure of these receptors, which facilitates the interpretation of information on biochemical and site-directed mutagenesis studies aimed to localize the ATP binding site. The pharmacodynamics of these receptors is variable among each of the subtypes, regarding the P2X1 receptor pharmacodynamics, it has been described by electrophysiological studies as a unique response sensitive to low ATP concentrations (nM), response that rapidly desensitizes. Another recent study shows that these receptors generate a quite different current when high ATP concentrations (mM) are used. This current increased slowly its amplitude during the agonist exposure. This latter current, but not the desensitizing response, is preserved in the splicing variant of hP2X1 (*hP2X1~~del~~*), which supports the hypothesis that the deleted segment in *hP2X1~~del~~* is related to the high sensitive ATP binding site but maintains the low sensitive binding site. We used by first time homology modeling technique based on reference structures of the P2X family (*hP2X3* and *hP2X7*) to determine the 3-D structure of the *hP2X1* and *hP2X1~~del~~* receptors and in combination with directed mutagenesis studies We performed an exploration of the ATP binding sites. Our results suggest the existence of an additional ATP binding site in the *hP2X1* receptor and probably it is conserved in the *hP2X1~~del~~* receptor.

**Key words:** P2X, P2X, homology, molecular docking, mutagenesis.

## INTRODUCCIÓN

Los receptores P2X son canales catiónicos no selectivos (permeables principalmente al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  y  $\text{K}^+$ ) activados por trifosfato de adenosina (ATP). El ATP, además de ser la principal fuente de energía celular, puede ser liberado de la célula y actuar como transmisor químico extracelular, dentro de los estímulos que promueven la liberación del ATP se encuentran: impulsos eléctricos, estímulos mecánicos, el cambio de volumen celular, la isquemia, la hiperoxia y la lisis celular (Chadwick & Goode 2008; Novak 2003).

En los mamíferos los receptores P2X forman una familia de 7 subtipos de receptores llamados  $\text{P2X}_{1-7}$ ; su unidad biológica funcional está conformada por tres subunidades asociadas y pueden formar complejos homéricos o heterómicos, con un 40% a 50% de identidad entre ellos (North 2002). Cada subunidad P2X está formada por: dos dominios transmembranales, un dominio extracelular (DEC) y los grupos amino y carboxilo terminales que se encuentran ubicados en la región intracelular. En el dominio extracelular se encuentra el sitio de unión al ligando.

Los receptores P2X en el ser humano se encuentran principalmente presentes en neuronas, células sanguíneas y células musculares y están involucrados en procesos como control neuronal de la contracción muscular, liberación de neurotransmisores (Burnstock 2006), sensación de dolor e inflamación, así como también están implicados en enfermedades neurodegenerativas (Chataigneau et al. 2013), por lo cual son un blanco terapéutico de gran interés.

Diferentes estrategias como mutaciones sitio dirigidas, lecturas electrofisiológicas, y cristalografía de rayos X (Allsopp et al. 2011) han contribuido para comprender las bases moleculares y el mecanismo por el cual el ATP se une al receptor para abrir el canal. Con la resolución de la estructura cristalina del receptor P2X4 de pez cebra (zP2X4) (Kawate et al. 2010), se logró comprender con mayor precisión la zona de acción y reconocimiento del ATP en los receptores P2X, sin embargo, la sensibilidad al ATP así como las propiedades funcionales de cada uno de los receptores varía ampliamente y desafortunadamente solo se han resuelto experimentalmente las estructuras de los receptores P2X3 y P2X7 del humano. En trabajos previos la farmacodinámica del receptor hP2X1 había sido descrita mediante estudios electrofisiológicos como una respuesta única sensible a bajas concentraciones (nM) de ATP y con una desensibilización rápida, mediante estudios de mutación sitio dirigida se identificó el sitio de unión al ATP y se determinó que los aminoácidos 68K, 70K otorgaban estabilidad a la unión del ATP (Ray et al. 2012; Roberts et al. 2012; Lörinczi et al. 2012). No obstante, un estudio reciente (López-López *et al.* en el 2016) describe que el receptor hP2X1 mantiene la sensibilidad a altas concentraciones de ATP (mM) observando una segunda cinética no antes descrita muy similar a la respuesta que genera la variante de edición del hP2X1 denominada hP2X1~~del~~ que había sido reportada como no funcional (Greco et al. 2016). Sin embargo, en el mismo estudio (López-López *et al.* en el 2016) se demostró que el receptor hP2X1~~del~~ sí genera corrientes pero únicamente a altas concentraciones de ATP. Esta última respuesta crece en función del tiempo de exposición al agonista. Estas últimas observaciones apoyan la hipótesis que el segmento deletado en el receptor hP2X1~~del~~ es responsable del

sitio de unión de alta afinidad al ATP pero estos receptores mantienen el segundo sitio de unión de baja afinidad.

Conocer la estructura tridimensional de los receptores hP2X1 y hP2X1 *de/* nos permitiría explorar los sitios de reconocimiento al ATP y comprender las bases moleculares de la modulación y apertura de sus canales. Sin embargo, a la fecha no se han resuelto sus estructuras experimentalmente. Una alternativa para solventar este problema es utilizar métodos bioinformáticos, como el modelado por homología, para construir su estructura tridimensional.

## OBJETIVOS

- Determinar la estructura tridimensional de los receptores hP2X1 y hP2X1 *de/* utilizando la técnica de modelado por homología.
- Utilizar los modelos tridimensionales obtenidos para identificar los sitios de unión al ATP no explorados y determinar los aminoácidos involucrados.
- Realizar mutaciones puntuales a los aminoácidos determinados importantes para la interacción del ATP en el receptor hP2X1.

## METODOS

*Preparación de la base de datos: Alineamientos iniciales y búsqueda de plantillas.*

Con el fin de seleccionar la mejor plantilla homóloga para la construcción del receptor hP2X1, se obtuvo su secuencia de aminoácidos con código de acceso P51575 en formato FASTA de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En el caso del receptor hP2X1~~del~~, de la secuencia P51575 se eliminaron los aminoácidos 176-192, mismos que el receptor canónico pierde en esta variante de edición. Se utilizó el servidor de BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) para realizar la búsqueda de potenciales templados homólogos de las secuencias de aminoácidos hP2X1 y hP2X1~~del~~ en la base de datos del PDB (Protein Data Bank) (Tabla 1-2.).

*Modelado de los receptores hP2X1 y hP2X1del.* Cien modelos 3D de una subunidad del receptor hP2X1 y cien más para el receptor hP2X1~~del~~ fueron generados utilizando el software de modelado por homología Modeller 9.18 mediante una multialineación tridimensional con las secuencias de los templados seleccionados contra las secuencias problema (hP2X1, hP2X1~~del~~). Por medio del programa Molsoft 3.8-5, cada uno de los cien modelos fue analizado y se seleccionó el mejor modelo para el receptor hP2X1 y hP2X1~~del~~, respectivamente.

*Armado y validación de los receptores hP2X1 y hP2X1del para el acoplamiento molecular.* Dado que las regiones de interés del receptor para este estudio eran la transmembranal y la extracelular, las secciones amino y carboxilo terminales



en cada cadena fueron removidas usando el programa de acceso libre Pymol v1.8.6.0, a este procedimiento le denominamos “limpieza”, posteriormente las cadenas fueron ionizadas mediante el servidor MolProbity. El armado del receptor se llevó a cabo utilizando en conjunto los programas MolSoft 3.8-5 y Pymol v1.8.6.0. Finalmente, en el caso particular del receptor hP2X1, con el fin de refinar el modelo, se llevó a cabo 1 ns de dinámica molecular con el software VMD 1.9.3. Se realizó análisis energético de aminoácidos como método de validación local y análisis de puntuación Z y gráficos de Ramachandran como métodos de validación general para cada receptor con el servidor ProSa (Proteine analysis) y MolProbity (Davis et al. 2007).

*Optimización de modelo de P2X1 a través de Dinámica Molecular.* La simulación de dinámica molecular del receptor P2X1 fue realizada iniciando con la estructura del modelo con mejor puntaje obtenida a través de modelado por homología. Durante la ejecución de la simulación, NAMD produce archivos de trayectoria que contienen información sobre coordenadas, energías y velocidades de cada átomo. El sistema se colocó en una caja cúbica y se estableció su carga neta en cero mediante la adición de iones (0.15 mol/L de NaCl), y las moléculas de agua fueron representada aleatoriamente. El campo de fuerza CHARMM36 junto con el modelo de agua TIP3 se emplearon para detallar el sistema. Durante las simulaciones se aplicó un corte de 14.0 Å a corto alcance para moléculas no enlazadas, mientras que las interacciones electrostáticas de largo alcance se tratan con la malla del método de partículas de Ewald (PME). Se empleó 2 fs de integración de tiempo para toda la simulación. El sistema fue equilibrado antes de que se ejecutara la

simulación. Durante este proceso se estableció un rango de temperatura de 100 K y 1 atm para que el sistema alcance el equilibrio. Posteriormente, fue corrida una simulación de 1 ns.

*Análisis de cavidades en el receptor hP2X1.* Para buscar un posible segundo sitio de unión al ATP en el receptor hP2X1 se realizó un análisis de cavidades o análisis de superficie basado en potenciales electrostáticos. Se utilizó el programa PyMol v1.8.6.0 para su visualización y análisis.

*Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1 y hP2X1del.* Los estudios de acoplamiento molecular sobre el receptor hP2X1 se llevaron a cabo tanto en el sitio de unión antes reportado (primer sitio) como en el sitio de unión propuesto en este estudio (segundo sitio). El acoplamiento molecular sobre el primer sitio del receptor trimérico se realizó con el programa Autodock 1.5.6rc3, las dimensiones del *grid box*, el cual representa el espacio en el que el ligando se puede mover, fueron de 50x50x50 puntos separados por 0.375 Å y para centrar el *grid* se seleccionaron las coordenadas del ATP de la plantilla del hP2X3 que cubría los LYS60, LYS70 y ARG292 antes reportados como importantes en para unión del ligando. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano (AGL) para los cálculos energéticos y se realizaron 100 corridas conformacionales del ATP flexible sobre el receptor rígido. Para el acoplamiento molecular en el segundo sitio del receptor hP2X1 y en el receptor hP2X1del los parámetros se definieron de igual manera; dimensiones del *grid box* de 60x60x60 puntos separados por 0.375 Å con 100 corridas conformacionales del ATP flexible sobre el receptor rígido con

el AGL para los cálculos energéticos. Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se utilizaron los siguientes criterios:

Criterio 1. Energía de unión del complejo: se toma como mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses obtenidas.

Criterio 2. Distribución de energía (cluster): se toma como mejor pose aquella que ocupa la primera posición dentro del clúster más poblado.

*Mutación sitio dirigida.* Para llevar a cabo la mutación puntual, se diseñaron oligos siguiendo las especificaciones del protocolo <sup>TM</sup>QuickChange en el programa SnapGene 4.1 y fueron analizados con el programa OligoAnalyzer 3.1 (Tabla 3). Se estandarizó el protocolo de PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Platinum SuperFi (100 U, Invitrogen), y como templado se usó el plásmido pCDNA3 con el inserto del receptor hP2X1. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 30 segundos a 98°C, después 35 ciclos de desnaturalización por 15 segundos a 98°C, alineamiento por 20 segundos a 68°C y extensión por 5 minutos a 72°C con una extensión final por 5 minutos a 72°C. Posteriormente el producto de PCR fue tratado con la con 0.25 uL de enzima Anza Dpn1 (20 U/μl, New England Biolabs) y se incubó por 45 min a 37°C. Finalmente se visualizó el producto por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1%, 100 V por 30 minutos.

*Transformación de bacterias E. coli Top10.* Se tomó una alícuota del producto de PCR; el receptor mutado y clonado en el vector pCDNA3 y se adicionó a un tubo con bacterias calcio competentes E. coli Top10, se dejó la mezcla en hielo por 20

minutos y posteriormente se llevó a cabo el shock térmico (42°C por 45 segundos). Posteriormente se adicionaron 300 µL de medio LB (10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de NaCl en 1 L de dH<sub>2</sub>O, pH=7) y se colocó en incubación por 2 horas con agitación a 37°C. Finalmente se cultivó en placa con medio LB solido (agar 1.5%, ampicilina 100 µg /mL) durante 16 horas a 37°C.

*Selección de clonas.* En campo estéril se seleccionarán 6 colonias aisladas y se sembraron en un tubo con 30 mL de medio LB (10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de NaCl en 1 L de dH<sub>2</sub>O, pH=7, ampicilina 100 µL/mL), y se incubaron por 16 horas a 37°C.

*Extracción de ADN plasmídico.* Un tubo con un volumen aproximado de 30 mL de cultivo saturado se centrifugó por 15 minutos a 14500 rpm, se descartó el sobrenadante y se trató con 4 mL de buffer solución I (glucosa 50 mM, Tris. HCL pH=8, EDTA 10 mM pH=8,) 4 mL de buffer solución II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y 4mL de buffer solución III (Acetato de potasio 5M, ácido acético glacial, dH<sub>2</sub>O) y se incubo en hielo por 20 minutos para llevar a cabo la lisis alcalina, en seguida se agregó RNasaA (10 mg/mL) y se incubó 45 minutos a 37°C. Después se agregó isopropanol para precipitar el ADN, posteriormente se lavó con EtOH al 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O milliQ.

*Purificación y cuantificación del ADN plasmídico.* Se llevó a cabo la purificación del ADN plasmídico por el método fenol-cloroformo. Para comenzar se agregó acetato de sodio 3M a un volumen 1:1, en seguida se adicionó fenol:cloroformo:alcohol

isoamilica a un volumen 1:1 y se centrifugó a 14500 rpm por 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa, después se agregó acetato de sodio 5M a un volumen 1:10 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar a -70°C por 1 hora. Se centrifugó por 15 minutos a 14500 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol absoluto, finalmente se resuspendió en H<sub>2</sub>O milliQ. Las muestras purificadas fueron cuantificadas utilizando el equipo NanoDrop® ND-1000 UV-Vis.

*Digestión del ADN plasmídico.* Se agregó a un tubo una alícuota de 1 µL de ADN plasmídico previamente purificado, 0.3 µL de enzima Xba I (20 U/µl, New England Biolabs) y se adicionó H<sub>2</sub>O milliQ hasta alcanzar un volumen final de reacción de 10 µL. La reacción se colocó a 37°C por 3 horas. Finalmente se visualizó el resultado por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1%, 100 V por 30 minutos.

*Secuenciación.* Se enviaron a analizar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) 6 muestras de ADN plasmídico provenientes de colonias aisladas distintas a una concentración de 100 ng/ µL. Las muestras fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## RESULTADOS

**Modelos construidos por homología de los receptores hP2X1 y hP2X1*del* poseen la calidad de receptores resueltos por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear.**

Se seleccionaron como secuencias molde al P2X3 humano (PDBid: 5SVL) y P2X7 de humano (PDBid: 5U1W) que comparten el 47% y 46% de identidad respectivamente con la secuencia del receptor hP2X1 y al receptor P2X3 humano (PDBid: 5SVL) que comparte el 47% de identidad con la secuencia del receptor hP2X1*del* (Tabla 1-2). Se realizó una multialineación con información espacial tridimensional de las secuencias molde para la predicción de las estructuras de los receptores hP2X1 y hP2X1*del* (Fig. 1. y Fig. 2.), el proceso de armado de los receptores se puede observar en la Fig. 3. El mejor modelo de cada receptor fue evaluado y los resultados fueron los siguientes: El análisis de puntuación Z arrojó un valor de -5.54 y -5.13 para el receptor hP2X1 y hP2X1*del* respectivamente (Fig. 4A y 4B), valor que entra en el rango típico para estructuras resueltas por cristalografía de rayos-x y resonancia magnética nuclear (NMR). En el gráfico de Ramachandran del receptor hP2X1 (Fig. 5A) se pueden observar únicamente a los aminoácidos A141, Q142 y D171 fuera de las zonas permitidas y en el caso del receptor hP2X1*del* a los aminoácidos S177 y L188 (Fig. 5B). El análisis energético de aminoácidos muestra que los aminoácidos localizados al inicio y final de la secuencia para ambos receptores poseen la mayor cantidad de energía, por lo tanto son las secciones de mayor inestabilidad en la secuencia (Fig. 6A y 6B). Por lo tanto, los resultados de validación local y general, de estabilidad y organización

estructural en ambos receptores, demuestran la calidad de las estructuras predichas por modelado por homología que es equiparable a la calidad de las estructuras resuelta por rayos X y NMR.

**Los aminoácidos R197 y K232 coordinan la unión del ATP en el segundo sitio propuesto en el receptor hP2X1 y el sitio de unión se conserva en el receptor hP2X1 *del*.**

Se generó el mapa de potencial electrostático del receptor hP2X1 con el objetivo de analizar las cavidades para detectar un sitio de unión a ATP adicional al antes reportado, finalmente se localizó un posible segundo sitio de unión a ATP localizado entre 2 cadenas en la región baja cercana a los dominos transmembranales del receptor hP2X1 (Fig. 7), además, se propone que el sitio se conserva en el receptor hP2X1 *del* (Fig. 8).

Con el fin de analizar la estabilidad de la interacción receptor/ligando, se llevaron a cabo estudio de acoplamiento molecular en las 2 cavidades de interés para este estudio. El acoplamiento molecular en el primer sitio reveló que la energía de unión del ligando en el receptor correspondía a -13.5 Kcal/mol (Fig. 9A), así como se confirmó la coordinación de la interacción por los residuos K68, K70 y R292 (Fig. 9B), tal y como estudios previos lo habían reportado (Ray et al. 2012; Roberts et al. 2012; Lörinczi et al. 2012). El acoplamiento molecular en segundo sitio (cavidad propuesta en este trabajo) reveló que energía de unión del ATP correspondía a -7.0 Kcal/mol (Figura 10), lo que indica que la unión del ATP en este sitio es un 51% menos favorable comparada con el primer sitio de unión, además con éste estudio se determinó que los aminoácidos involucrados en la

coordinación y unión del ATP eran la R197, con la interacción más fuerte, y en seguida la K232 (Fig. 11), siendo la R197 seleccionada para el estudio de mutación sitio dirigida. Adicionalmente se llevó a cabo acoplamiento molecular en el receptor hP2X1~~del~~, utilizando las mismas coordenadas del acoplamiento molecular del segundo sitio del hP2X1, con el fin de comparar entre ellas la similitud de interacción con el ATP, se encontró que la energía de unión de ligando con los aminoácidos circundantes correspondía a -6.1 Kcal/mol (Fig. 12). Esta energía es 87% similar a la energía de unión que existe entre el ATP y el segundo sitio localizado en el receptor hP2X1.

**La estandarización y amplificación del producto de PCR para la mutante K322A del receptor hP2X1 se logró utilizando el protocolo de mutación sitio dirigida.**

Se diseñaron los oligos para realizar el cambio de la lisina 322 por alanina 322 (K322A) sobre el receptor hP2X1, lo que corresponde a una mutación de pérdida de sentido, las características de los oligos *forward* y *reverse* se muestran en la tabla 3. En seguida se llevó a cabo la estandarización de la técnica de PCR y después de la digestión con la enzima Xba I se confirmó la funcionalidad de los oligos diseñados al obtener la amplificación de un producto linealizado de un peso aproximado 6,200 pb (Fig. 13), correspondiente al peso del vector más la secuencia insertada del receptor hP2X1, esto es evidencia indirecta de la presencia de la mutación K322A. Después de realizar el proceso de transformación, extracción y secuenciación del producto de PCR, se confirmó la presencia de la mutación K322A, lo que demuestra la funcionalidad del método estandarizado de mutaciones sitio dirigida basada en el manual <sup>TM</sup>QuickChange.



## DISCUSIÓN

El conocimiento de la estructura tridimensional de las proteínas es fundamental para la investigación detallada de sus propiedades funcionales, los métodos experimentales suelen ser lentos mientras que los métodos computacionales de predicción ofrecen alternativas que se mejoran continuamente, es por eso que en este estudio se utilizó por primera vez la técnica de modelado por homología con base en estructuras de referencia de la familia P2X (hP2X3 y hP2X7) para construir los receptores hP2X1 y hP2X1*del*, obteniendo la resolución y calidad inclusive de estructuras resueltas por cristalografía de rayos-X y NMR. Además, los estudios de acoplamiento molecular nos permitieron proponer y localizar un posible un sitio adicional de unión al ATP en el receptor hP2X1, siendo la A197 localizada como el residuo más importante en esta unión seguido por la K322.

La alta calidad de los modelos construidos por homología la demuestran los resultados de puntuación Z, cuyo valor se muestra en un gráfico que contiene los puntajes Z de todas las cadenas de proteínas determinadas experimentalmente en la actualidad y que se utiliza para verificar si el puntaje de la estructura de entrada está dentro del rango de puntajes encontrado típicamente en proteínas nativas de tamaño similar. También así lo demuestran los gráficos de Ramachandran que en el caso del receptor hP2X1 únicamente 3 aminoácidos y 2 para el hP2X*del*, están en áreas no permitidas que indican ángulos de torsión problemáticos dentro de la estructura, sin embargo se encuentran fuera de las zonas de interés para este estudio. Finalmente el análisis energético de aminoácidos demuestra que el mayor porcentaje de aminoácidos (aproximadamente el 90%) dentro de las estructuras

predichas son estables. Dada la alta calidad de las construcciones de los receptores hP2X1 y hP2X1 *del*, fue posible continuar con los siguientes estudios.

De acuerdo la exploración de cavidades en el receptor hP2X1, se propuso un sitio adicional de unión a ATP localizado en la entre 2 cadenas en la región baja cercana a los d6minos transmembranales ya que el an6lisis muestra que las dimensiones de la cavidad se ajusta para la interacci6n con el ligando y m6s importante a6n, el mapa electroest6tico en el cual se observa un color azul predominante indica una regi6n con carga positiva que correlacionan con sitios con actividad biol6gica o bien con capacidad de uni6n a ligando (M.B. 2011; Mohan et al. 2009), localizaci6n que proponemos se conserva en el receptor hP2X1 *del* ya que como se hab6a reportado anteriormente (Greco et al. 2016) 17 residuos se pierden en 6sta variante de edici6n (residuos 176-192: PALLREAENFTLFIKNS) algunos de ellos localizados en el sitio de uni6n responsables de la corriente r6pida en el receptor can6nico, corriente que se pierde en la variante pero que mantiene la corriente lenta relacionada con el sitio de uni6n propuesto en este trabajo.

Como siguiente paso fue llevar a cabo acoplamiento molecular en los 2 sitios de uni6n a ATP en el receptor hP2X1. El sistema de puntuaci6n que nos indica que tan favorable es la interacci6n entre un receptor y un ligando es la energ6a libre de gibbs, el resultado del acoplamiento molecular en el primer sito fue de -13.5 Kcal/mol mientras que en segundo sitio fue de -7.0 Kcal/mol lo que indica que la interacci6n del ATP en el primer sitio 51% m6s favorable comparada con el primer sitio de uni6n resultados que concuerdan con el comportamiento de la doble cin6tica que presenta el receptor cuando se le aplican altas concentraciones de

ATP (López-López et al. 2016) donde se puede observar una primer respuesta con alta afinidad al ATP y una segunda respuesta de menor afinidad, ahora bien esta segunda respuesta es similar a la que presenta el receptor hP2X1 *del* por ello se decidió llevar a cabo el análisis de acoplamiento molecular utilizando las mismas coordenadas del sitio propuesto en el hP2X1 y encontramos que la energía de unión a ligando correspondía a -6.1 Kcal/mol, esta energía es 87% similar a la energía de unión que existe entre el ATP y el segundo sitio localizado en el recepto hP2X1, la divergencia puede deberse a la diferencia estructural en el acomodo tridimensional entre ambos receptores ya que estos no son idénticos ya que la variante de edición perdió 16 aminoácidos del exón 6, algunos de ellos relacionados con el primer sitio de unión anteriormente relacionados con el receptor canónico (Greco et al. 2016). Estos resultados reafirman la existencia de un sitio adicional de unión a ATP en el hP2X1 que comparte localización con el hP2X1 *del*.

Ahora bien, los estudios de acoplamiento molecular también nos permitieron localizar al residuo K322 como el actor principal entre la interacción del ligando con el receptor en el sitio propuesto, por lo que se decidió crear un receptor hP2X1 mutante con el cambio de la K322 por K322 para llevar a cabo estudios de caracterización farmacodinámica en un futuro.

Para la mutante se utilizó la técnica de mutación sitio dirigida utilizando el método de <sup>Tm</sup>QuickChange el cual permite introducir mutaciones puntuales en plásmidos de ADN bicatenarios por medio de un par de oligos que contienen en medio de su secuencia la mutación que se desea producir. Se diseñaron los oligos de larga secuencia como lo dicta el protocolo y en el centro se encuentra la mutación **CG**

que realizara el cambio de alanina por arginina en la posición 322 sobre receptor hP2X1, así mismo dada la longitud de los oligos su Tm resultante fue alta por lo que fue indispensable para la PCR el uso de una polimerasa que además de poseer alta fidelidad fuera termoestable, adicionalmente se debe destacar que el uso de la enzima Dnpi después de la PCR es de gran importancia ya que esta endonucleasa (secuencia diana: 5'-Gm6ATC-3 ') se utiliza para digerir el ADN templado metilado y para seleccionar el ADN sintetizado no metilado, de esta forma el resultado observado en el gel demuestra la amplificación exitosa por los oligos diseñados, mutación que posteriormente fue confirmada por secuenciación del receptor hP2X1 insertado en el vector PCDNA3.

## CONCLUSIONES

1. Se construyeron exitosamente los receptores hP2X1 y hP2X1 *del* que sirvieron como base para los estudios de acoplamiento molecular y que posteriormente pueden ser utilizados para análisis con dinámica molecular y predicción de unión de otros ligandos.
2. Se propone que el segundo sitio de unión a ATP se localiza en la zona del cuerpo bajo cercano a las regiones transmembranales del receptor hP2X1 y hP2X1 *del*.
3. La energía de unión al ATP en el sitio propuesto en este trabajo sobre el receptor hP2X1 es 51% más débil que la fuerza de unión al ATP que en el sitio antes reportado, por lo cual la afinidad del ATP en el segundo sitio es menor, lo que correlaciona con los estudios previos de farmacodinámica.
4. Los oligos diseñados para las mutaciones puntuales así como la estandarización de la PCR llevaron a cabo la amplificación del producto esperado, el cual posteriormente fue analizado mediante secuenciación, comprobando la mutación A322R sobre el receptor hP2X1.

## TABLAS

**Tabla 1. Resultados del BLASTp de la secuencia de aminoácidos del receptor hP2X1 contra la base de datos del PDB.**

Se resaltan con doble asterisco los resultados seleccionados.

PDB	Receptor	Año	Resolución	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Estado
3H9V	zP2X4	2009	3.1	348	348	87%	2.00E-118	44%	Apo estado
3I5D	zP2X4	2009	3.5	347	347	87%	5.00E-118	44%	Apo estado
4DW0	zP2X4	2012	2.9	332	332	83%	3.00E-112	45%	Apo estado
4DW1	zP2X4	2012	2.8	329	329	83%	5.00E-111	45%	Unido a ATP
<b>**5SVJ</b>	hP2X3	2016	2.98	329	329	89%	1.00E-110	47%	Apo estado
<b>**5U1W</b>	hP2X7	2016	3.4	294	294	81%	3.00E-97	46%	Apo estado
5F1C	gP2X	2015	2.9	269	269	83%	4.00E-87	42%	Unido a ATP y un ion de Zn
2RUP	rP2X4	2014	-	73.2	73.2	14%	3.00E-16	51%	Apo estado
3R00	Carnitiny-CoA hydratase	2011	2.1	29.6	29.6	10%	5.60E+00	37%	Apo estado

**Tabla 2. Resultados del BLASTp de la secuencia de aminoácidos del receptor hP2X1 del contra la base de datos del PDB.**

Se resalta con doble asterisco el resultado seleccionado.

PDB	Receptor	Año	Resolución	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Estado
3H9V	zP2X4	2009	3.1	317	317	86%	2e-106	41%	Apo estado
3I5D	zP2X4	2009	3.5	313	313	86%	6e-105	41%	Apo estado
4DW0	zP2X4	2012	2.9	301	301	82%	3e-100	42%	Apo estado
<b>**5SVJ</b>	hP2X3	2016	2.98	299	299	89%	3e-99	44%	Apo estado
4DW1	zP2X4	2012	2.8	329	329	83%	5.00E-111	45%	Unido a ATP
5SVM	hP2X3	2016	2.9	296	296	89%	5e-98	44%	Unido a agonista
5F1C	gP2X	2015	2.9	247	247	82%	5e-79	40%	Unido a ATP y Zn <sup>+2</sup>
5XW6	cP2X7	2016	2.9	232	232	77%	2e-73	41%	Unido a Zn <sup>+2</sup>

**Tabla 3. Diseño de oligos basado en las especificaciones del protocolo <sup>TM</sup>QuickChange.**

En amarillo se resaltan las bases que se intercambiarán en el receptor hP2X1 para generar la mutación K322A.

<i>Oligos</i>	<i>Secuencia 5' → 3'</i>	<i># Nucleotidos</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>%GC</i>
Forward	CATCCTGGTGGACGGC <b>GC</b> GGCCGGGAAGTTTGAC	35	79.5	61.1
Reverse	GTCAAACCTCCCGGCC <b>CG</b> GCCGTCCACCAGGATG	35	79.5	61.1

# FIGURAS

```

          10      20      30      40      50      60
5SVL  -----WTIGIINRVVQLLIISYFVGWVFLHEKAYQVRDTAIESSVVT
5U1W  -----WIFHALVFSYISFALISDKRYQKKEP-LISSVHT
P2X1  MARRFQEELAAFLFEYDTPRMVLRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVFLYEKGYQTSSG-LISSVSV
          * * * * *
          70      80      90      100     110     120     130
5SVL  KVKGSGLY-----ANRVMDSVDYVTPPQGTSVFVIITKMIVTENQMGGFCPESEE-KYRCV
5U1W  KVKGIAEVKAEILENGMKKMVSGVFDTADYT-FPLQGNSSFVMTNFIKTEGQQQGLCPDFPTARTICS
P2X1  KLKGLAVTQLP-----GLGPQVWDVADYVFPQAQGDNSFVVMTNFIVTPKQTQGYCAEHPE-GGICK
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          140     150     160     170     180     190     200
5SVL  SDSQCGPERLPG--GGILTGRCVNYSSVLRTCIEIQGWCPTVDTVET--PIMMEAENFTIFIKNSIRF
5U1W  SDRGCKKGRMDPQSKGIQTGRCVVYKERLKTCEVSAWCPIEEVKDAPRPALLNSAENFTVLIKNNIDF
P2X1  EDSGCTPGKAKRKAQGI RTGKCVAFNDTVKTCEIFGWCPVEVDDDDIPRPALLREAEENFTLFIKNSISF
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          210     220     230     240     250     260     270
5SVL  PLFNFKEGNLLPNLTARDMKTCRFHPDKDFPCPILRVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVLGKIGWVCDL
5U1W  PGHNYTTRNILPGV----NITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FQETGDSFSDVAIQGGIMGIEIYWDCNL
P2X1  PRFKVNRRLVVEEVNAAHMKTCLFHKTTLHPLCPVVFQLGYVVQESGQNFSTLAEKGGVVGITIDWHCDL
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          280     290     300     310     320     330     340
5SVL  DKAWDQCIPKYSFTRLDSVSEKSSVSPGYNERFAKYYKMENGSEYRTLLKAFGIRFDVLVYGNAGKFN
5U1W  DGWFHHCPRPKYSFRRLLDDKTTSES LYPGYNERYAKYYKE-NNVEKRTLLKVFGIRFDILVFGTGGKFN
P2X1  DWHVRHCRPIYEFHGLYEEKN--LSPGFNERFARHFVE-NGTNYRHLKVFGIRFDILVDGKAGKFD
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          350     360     370     380     390     400
5SVL  IIPTIISSVAFTSVGVGTVLCDIILLN-----F-----L-----
5U1W  VIQLAVYIGSVISYFGLATVFI-----
P2X1  IIPTMTTIGSGIGIFGVATVLCDLLLHILPKRHYYKQKFKFYAEDMGPAAERDLAATSSTLGLQEN
          * * * * *
          5SVL  ----
          5U1W  ----
          P2X1  MRTS

```

**Figura 1. Multialineación para la construcción del receptor hP2X1.**

Multialineación de las plantillas molde 5SVL y 5U1W contra la secuencia problema hP2X1. La multialineación se realizó con el programa Modeller 9.18 como primer paso para la construcción del receptor hP2X1. Los asteriscos muestran los residuos conservados en las 3 secuencias y los residuos en rojo representan los aminoácidos que se han identificado como importantes para la unión de ATP en el receptor hP2X1.



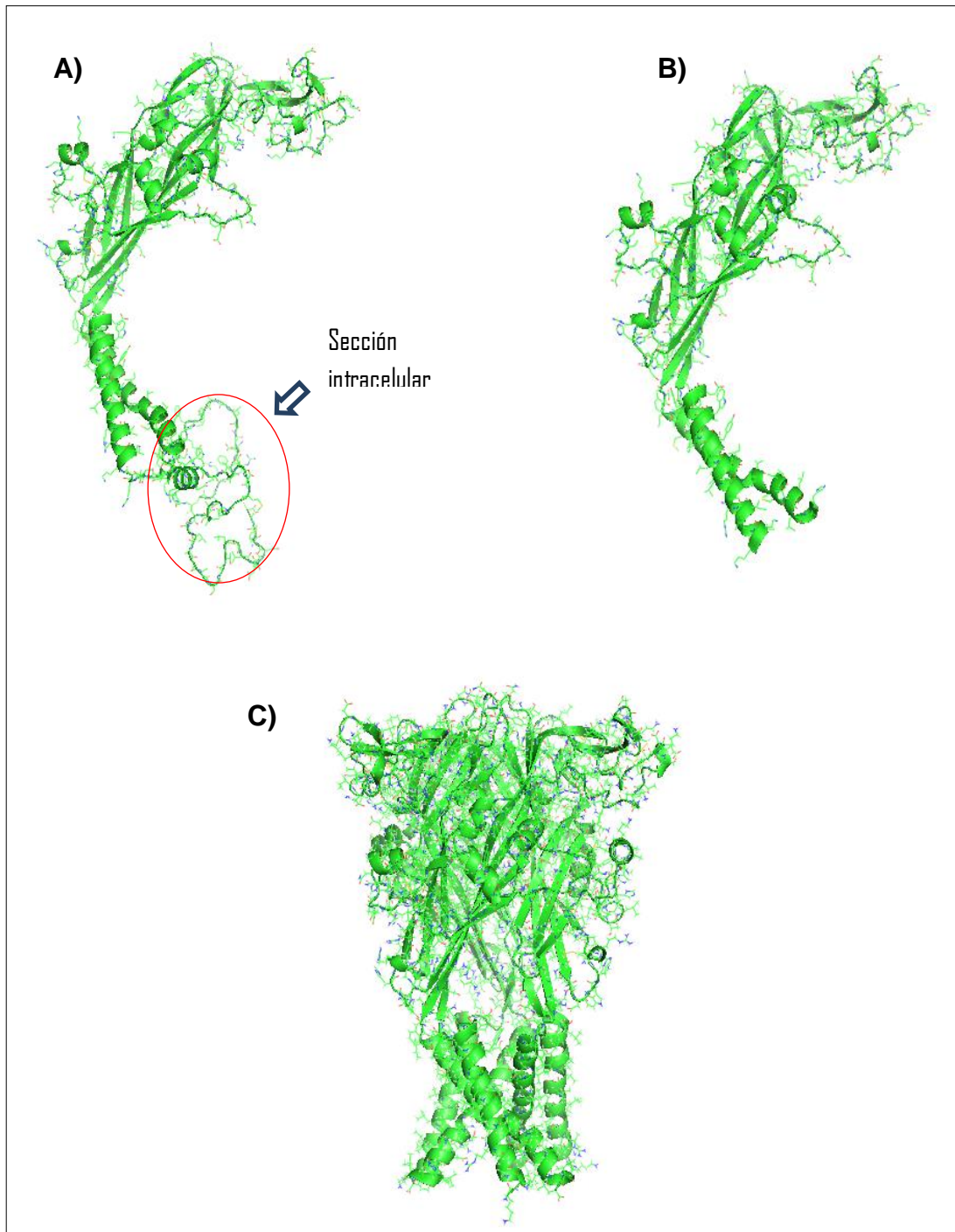
```

          10      20      30      40      50      60
5SVL      -----KSVVVKSWTIGIINRVVQLLIISYFVGWVFLHEKAYQVRDTAISSVVT
P2X1del   MARRFQEELAAFLFEYDTPRMVLRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVFLYEKGYQTSS-GLISSVSV
          * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
          70      80      90      100     110     120     130
5SVL      KVKGSGLYA----NRVMDVSDYVTPPGTTSVFIITKMIVTENQMQGFCPESEEKYRCVSDSQCGP-
P2X1del   KLKGLAVTQLPGLGPQVWDVADYVFPAQGDNSFVVMTNFIVTPKQTQGYCAEHPEGGICKEDSGCTPG
          * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
          140     150     160     170     180     190     200
5SVL      -ERLPGGGILTGRCVNYSSVLRTEIQGWCPTEVDTVETPIMMEAENFTIFIKNSIRFPLFNFEKGNL
P2X1del   KAKRKAQGIRTGKCVAFNDTVKTCEIFGWCPVEVDDIPRI--SFPRFKVNRN-----L
          * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
          210     220     230     240     250     260     270
5SVL      LPNLTARDMKTCTRFHPDKDFPCPILRVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVLGKIGWVCDLKDQAWQCIPK
P2X1del   VEEVNAAHMKTCLFHKTLHPLCPVFQLGYVVQESGQNFSTLAEKGGVVGITIDWHCDLDWHVRHCRPI
          * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
          290     300     310     320     330     340
5SVL      YSFTRLDSVSEKSSVSPGYNFRFAKYKMEGSEYRLLKAFGIRFDVLVYGNAGKFNIIPTIISSVA
P2X1del   YEFHGLY---EEKNLSPGFNFRFARHFV-ENGTNYRHLFKVFGIRFDILVDGKAGKFDIPTMTTIGS
          * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
          350     360     370     380     390     400
5SVL      AFTSVGVGTVLCDIILL-----N-----F-----
P2X1del   GIGIFGVATVLCDLLLHILPKRHYYKQKFKYAEDMGPGAERDLAATSSTLGLQENMRTS
          * * * * *      * *

```

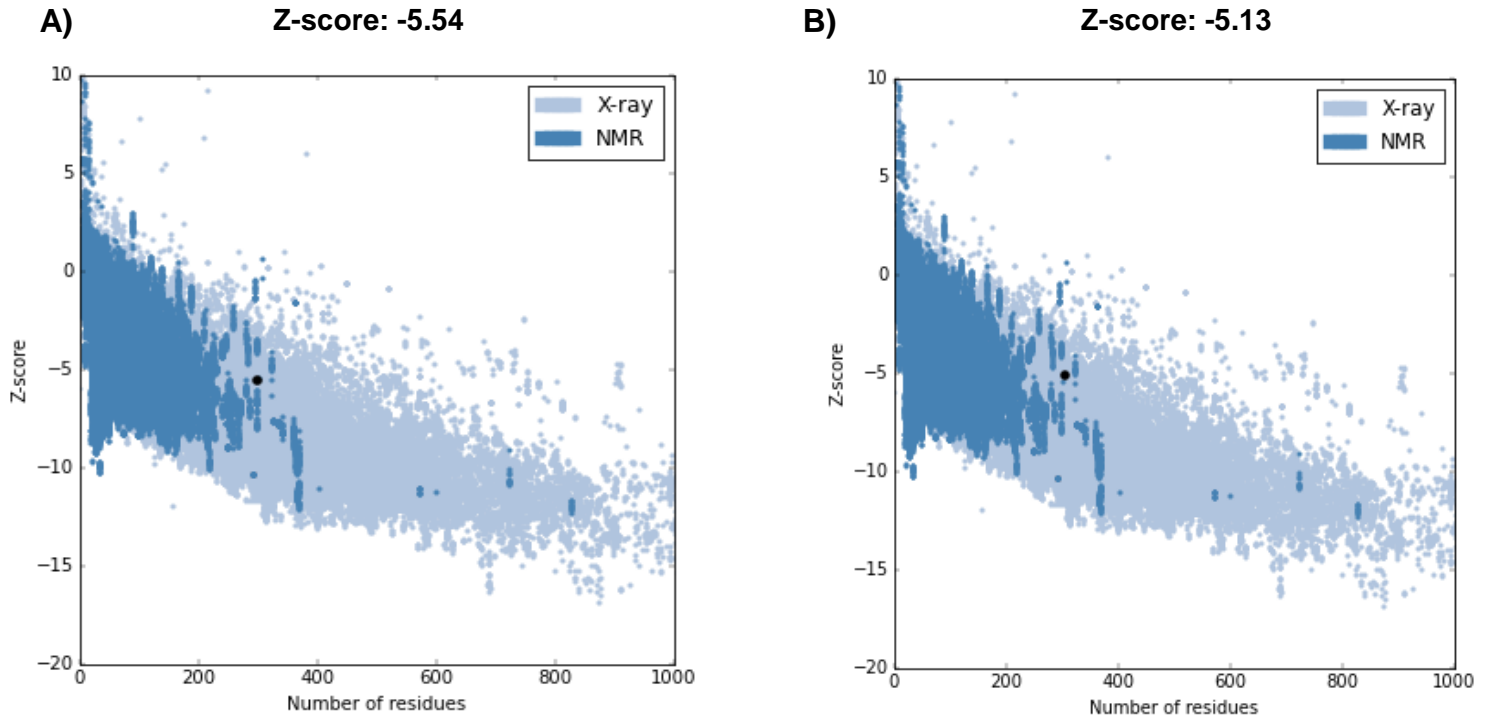
**Figura 2. Alineación para la construcción del receptor hP2X1 del.**

Alineación de la plantilla molde 5SVL contra la secuencia problema hP2X1 del. La multilineación se realizó con el programa Modeller 9.18 como primer paso para la construcción del receptor hP2X1 del. Los asteriscos muestran los residuos conservados en ambas secuencias y los residuos en rojo representan los aminoácidos que se han identificado como importantes para la unión de ATP en el receptor hP2X1 del.



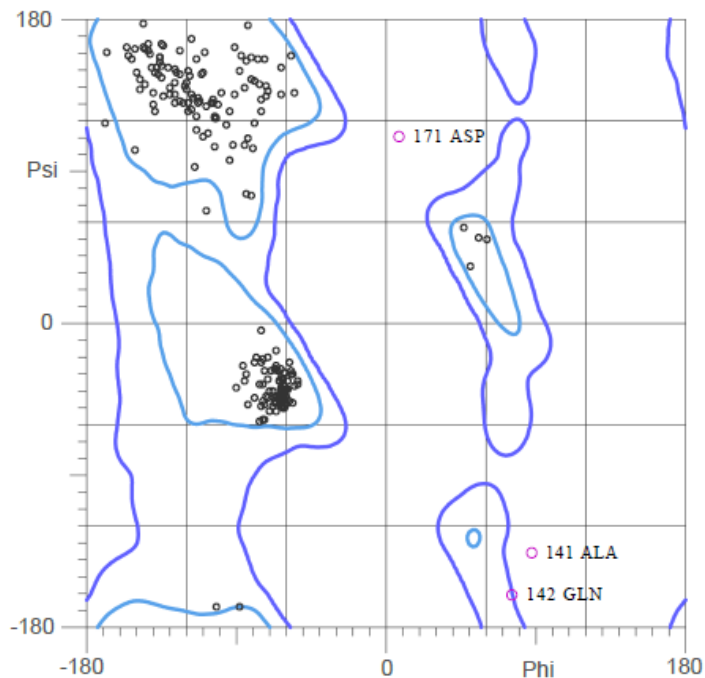
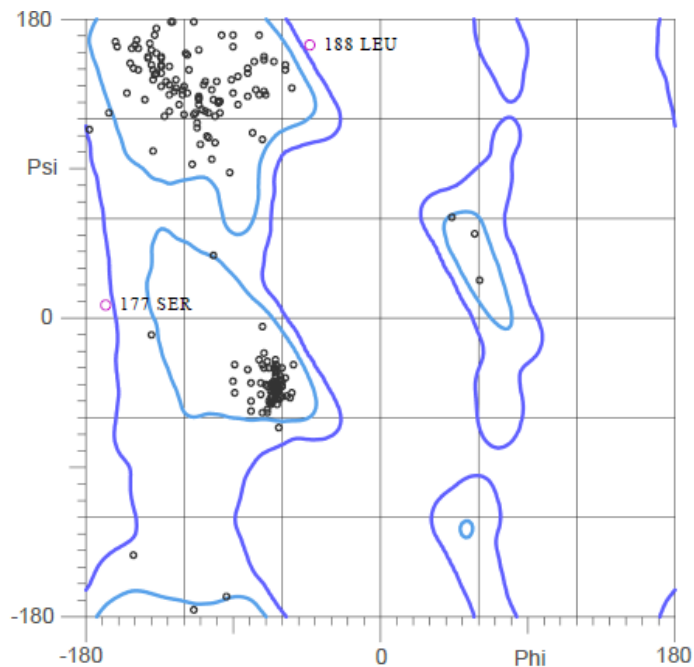
**Figura 3. Estado de las cadenas en el proceso de armado de los receptores hP2X1 y hP2X1~~del~~.**

A) Cadena única del receptor P2X1 con las secciones transmembranales y extra e intra celulares. B) Cadena única del receptor P2X1 con la sección intracelular eliminada de la estructura. C) Representación tridimensional del receptor P2X1 construido mediante la unión de las cadenas A, B y C.



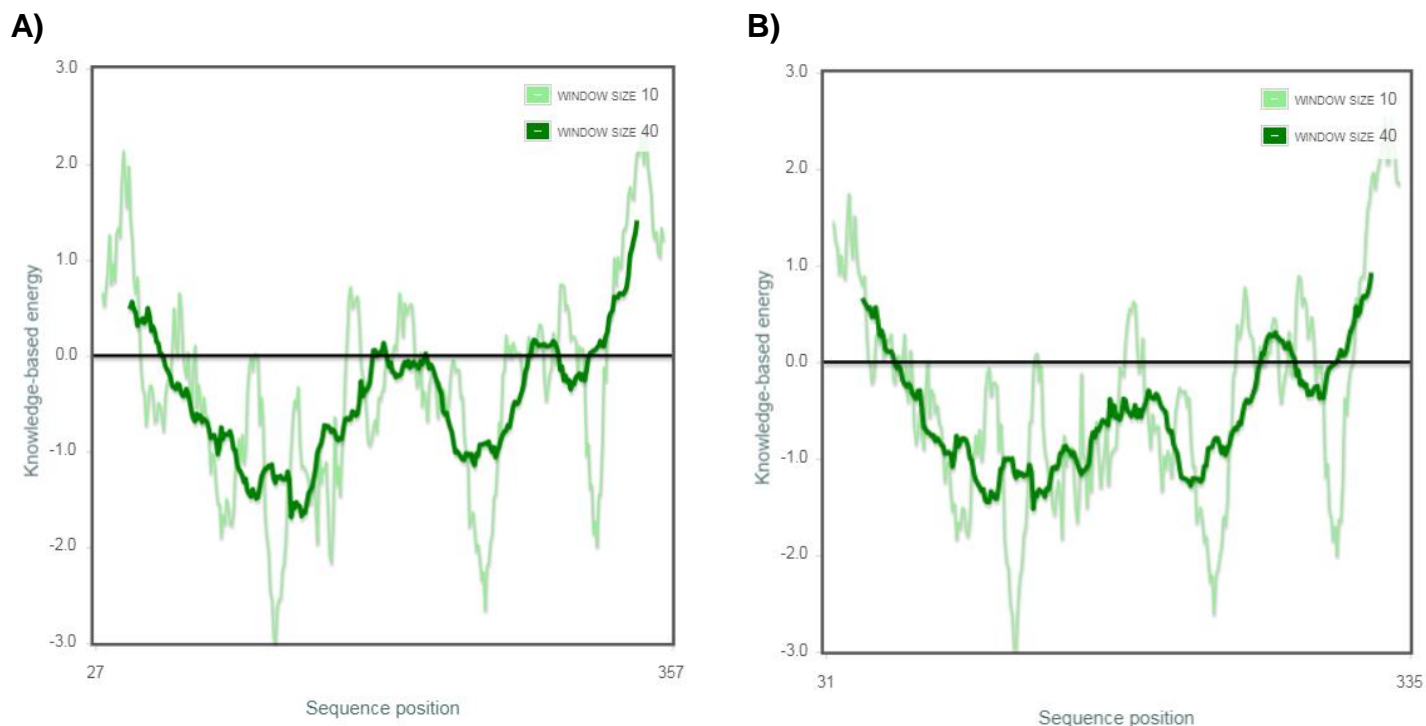
**Figura 4. Análisis de validación global de puntuación Z de los hP2X1 y hP2X1 *del*.**

En el gráfico se observan los puntajes Z de todas las cadenas de proteínas determinadas experimentalmente, en azul fuerte por resonancia magnética nuclear y en azul claro por cristalografía de rayos X, dentro de un rango de puntajes encontrado típicamente en proteínas nativas de tamaño similar. A) La puntuación Z de -5.54 para el receptor hP2X1 cae dentro del rango de calidad de estructuras determinadas experimentalmente. B) Puntuación Z de -5.13 para el receptor hP2X1 *del*, dentro del rango de calidad de estructuras determinadas experimentalmente.

**A)****B)**

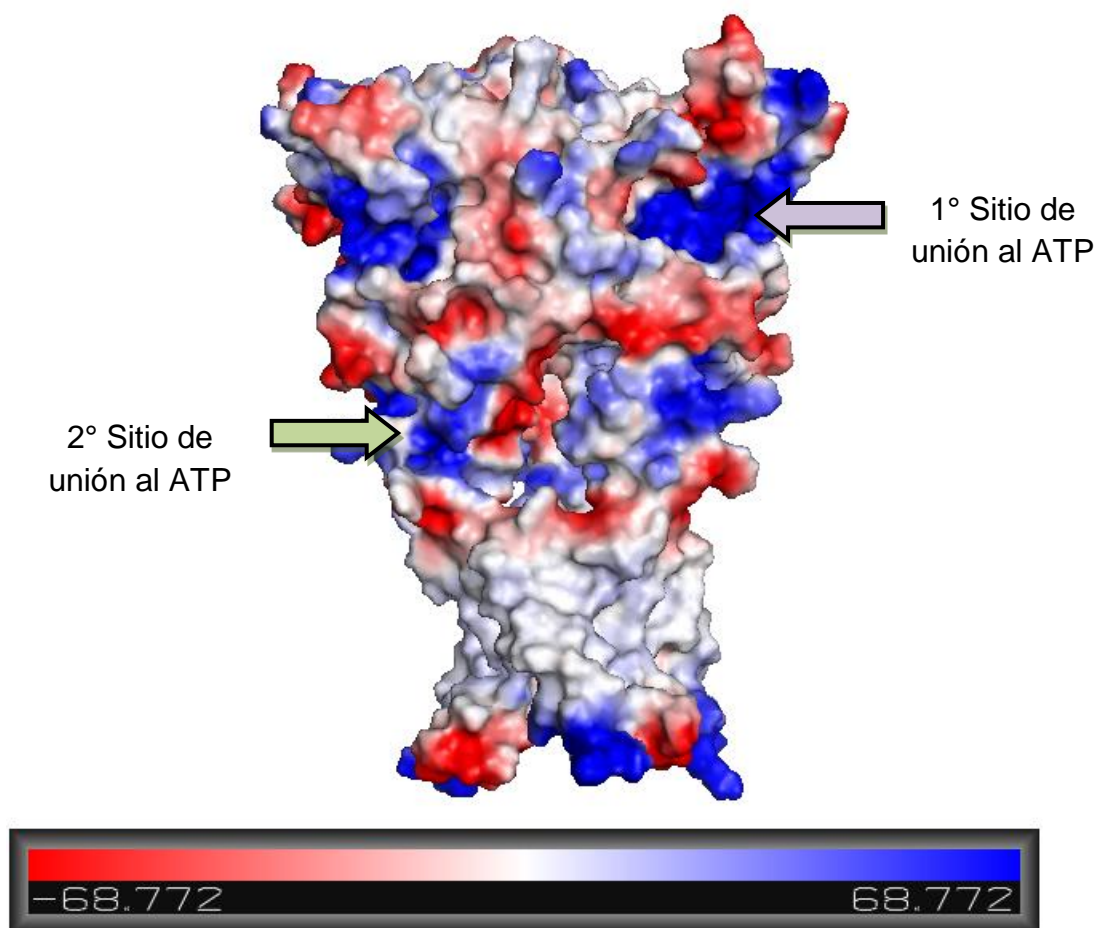
**Figura 5. Gráfico de Ramachandran de validación local de los hP2X1 y hP2X1 *del*.**

A) Gráfico de Ramachandran del receptor hP2X1. Los aminoácidos A141, Q142 y D171 se encuentran fuera de las zonas permitidas dando como resultado 315/318 aminoácidos en regiones favorecidas (99.1%). B) Gráfico de Ramachandran del receptor hP2X1 *del*. Los aminoácidos S177 y L188 fuera de las zonas permitidas dando como resultado 304/306 aminoácidos en regiones favorecidas (99.3%).



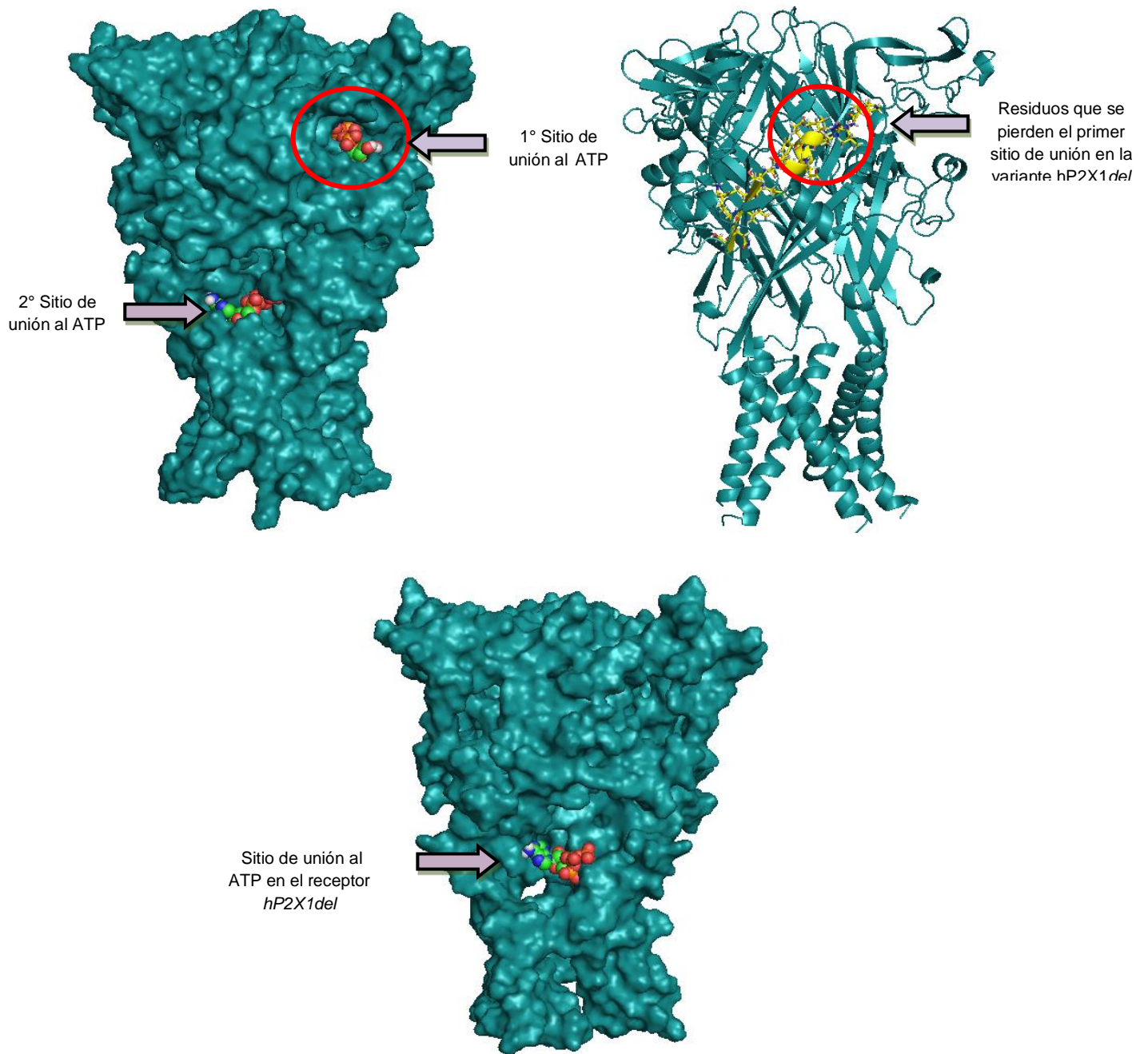
**Figura 6. Gráfico de validación local por análisis energético de aminoácidos.**

Este análisis muestra las energías en función de la posición de la secuencia de aminoácidos. En general, los valores positivos corresponden a partes problemáticas o erróneas de la estructura de entrada. Se promedia la energía en una ventana de 10 aminoácidos (línea verde claro) o 40 aminoácidos (línea verde oscuro) y el promedio se compara con el valor energético por aminoácido. A) Análisis energético del receptor hP2X1. Las secciones consideradas como problemáticas dentro de la estructura se encuentran en la sección inicial y final de la secuencia. B) Análisis energético del receptor del receptor hP2X1 *del*. Las secciones consideradas como problemáticas dentro de la estructura se encuentran en la sección inicial y final de la secuencia.



**Figura 7. Análisis de cavidades en el receptor hP2X1.**

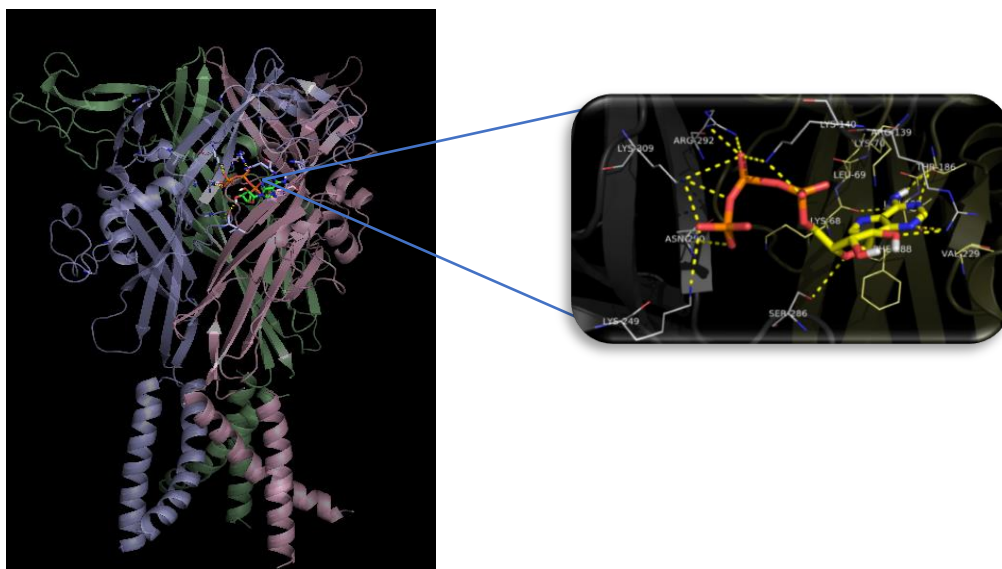
Mapa electroestático del receptor hP2X1 generado y visualizado con el programa Pymol v1.8.6, el color azul representa potenciales positivos, mientras que el rojo representa potenciales negativos. La flecha morada señala el 1° sitio de unión al ATP anteriormente reportado y la flecha verde señala el 2° sitio de unión propuesto.



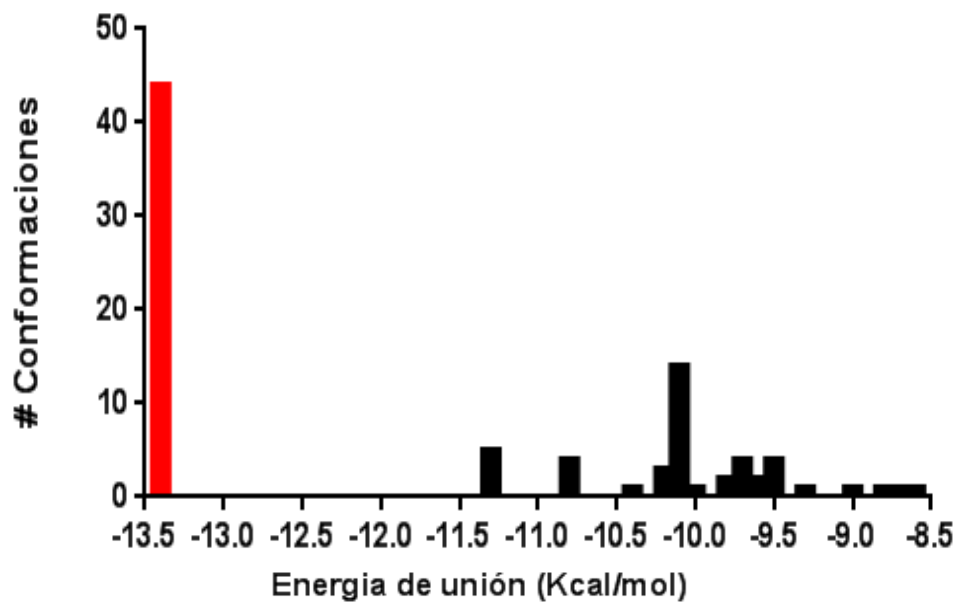
**Figura 8. Vista superficial de los sitios de unión al ATP de los receptores hP2X1 y hP2X1 *del*.**

A) Vista frontal del receptor construido por homología hP2X1 con las moléculas de ATP acopladas a los sitios de unión en el receptor hP2X1, en el círculo rojo se resalta el sitio de unión previamente reportado. B) Receptor hP2X1 resaltando en amarillo los 17 aminoácidos que se pierden en la variante de edición hP2X1 *del*, se puede apreciar que parte de ellos se localizan en el sitio de unión al ATP. C) Vista frontal del receptor construido por homología hP2X1 *del* la molécula de ATP acoplada al sitio de unión propuesto que se encuentra conservado en el receptor hP2X1 canónico.

A)



B)

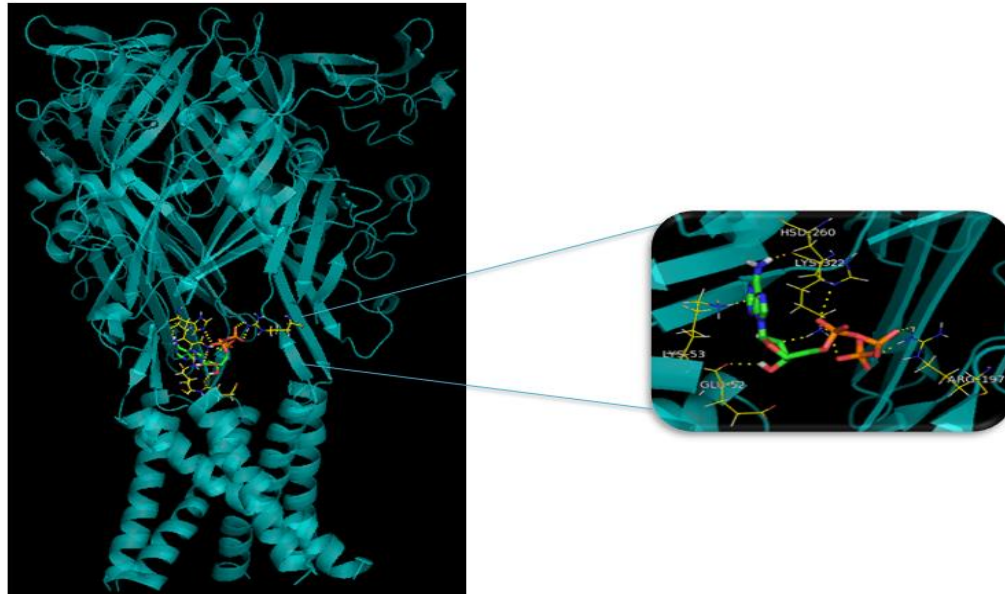


**Figura 9. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.**

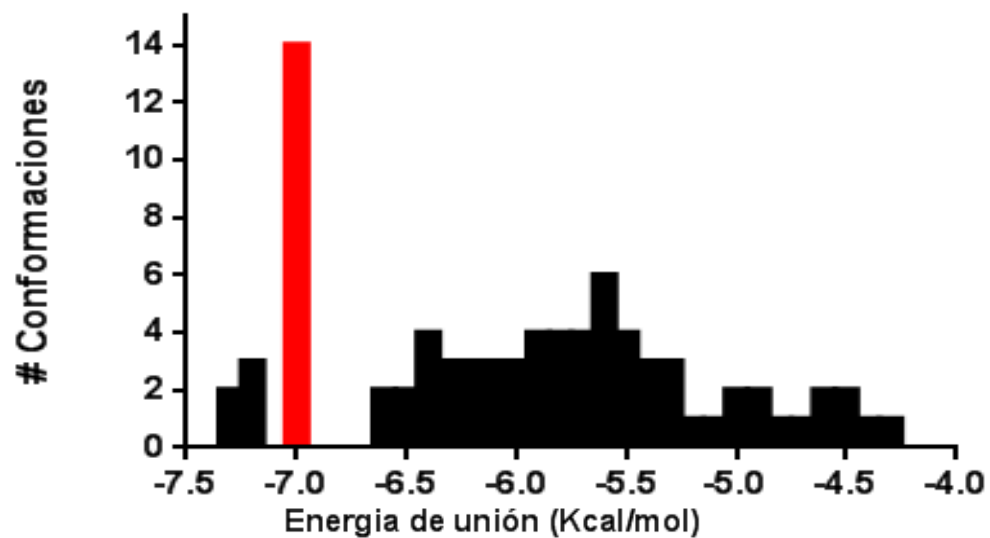
A) Vista frontal del receptor construido por homología P2X1 acoplado al ATP en el primer sitio de unión, se pueden observar los contactos polares entre el ligando y los residuos circundantes. B) En el grafico se observa en número de conformaciones en función de la energía de unión en Kcal/mol. El análisis energético de unión de 100 posiciones distintas del ATP en el 1° sitio del receptor hP2X1 demuestra que la mayoría de las posiciones se unen al receptor con un  $\Delta G = -13.5$  Kcal/mol.



A)

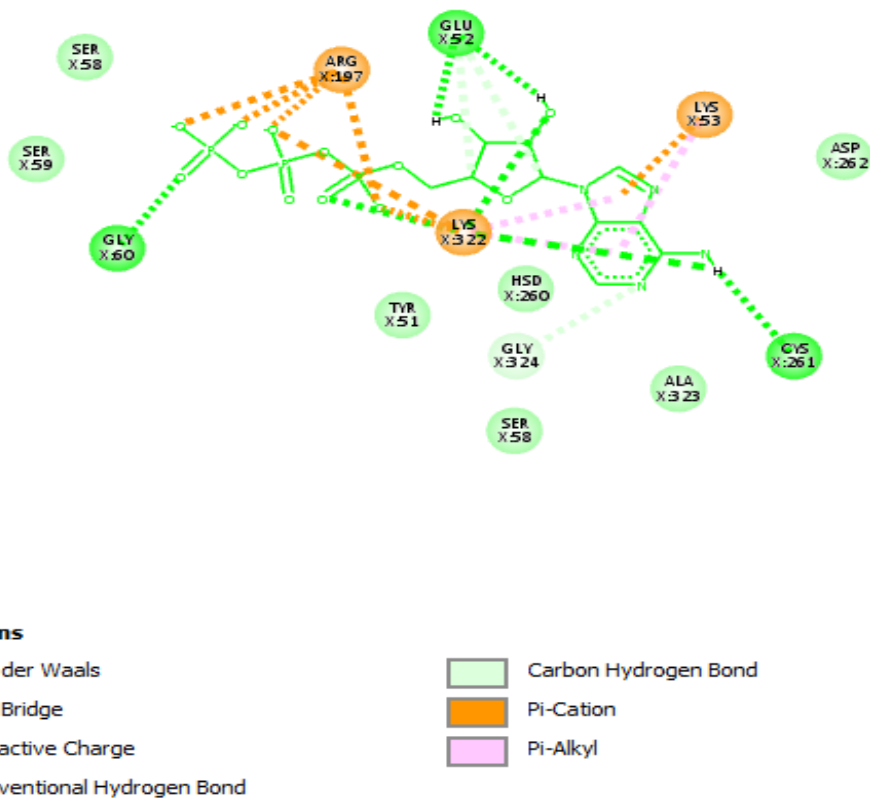


B)



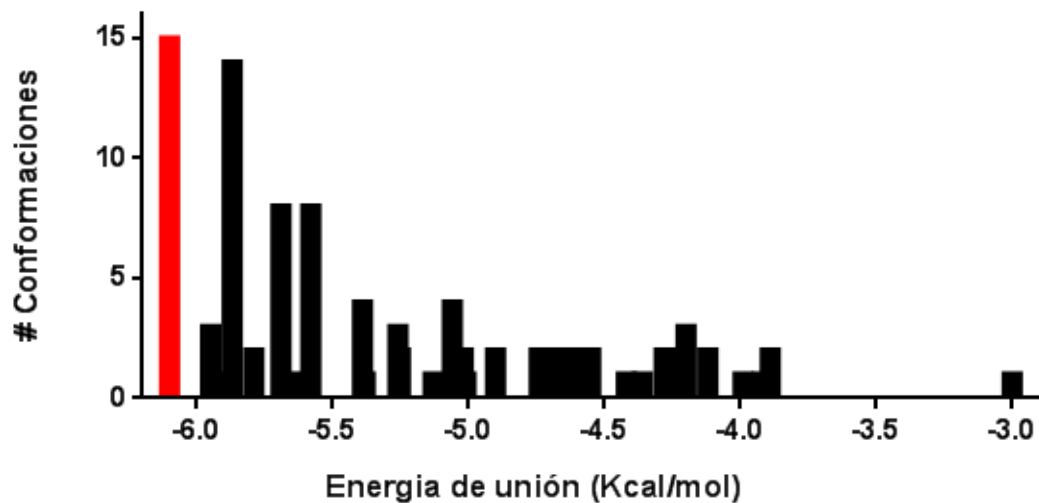
**Figura 10. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.**

A) Vista frontal del receptor construido por homología P2X1 acoplado al ATP en el segundo sitio de unión al ATP, se pueden observar los contactos polares entre el ligando y los residuos circundantes. B) En el gráfico se observa el número de conformaciones en función de la energía de unión en Kcal/mol. El análisis energético de unión de 100 posiciones distintas del ATP en el 2° sitio del receptor hP2X1 demuestra que la mayoría de las posiciones se unen al receptor con un  $\Delta G = -7.0$  Kcal/mol.



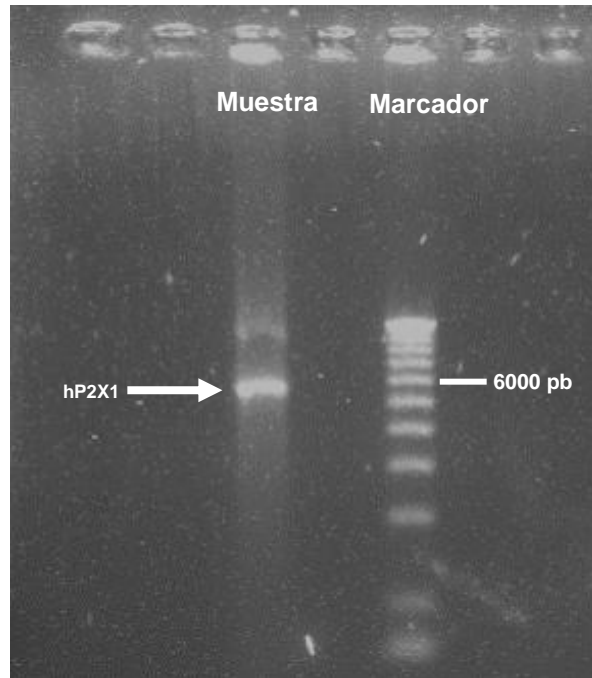
**Figura 11. Esquema 2D de la interacción del ATP con los aminoácidos circundantes en el 2° sitio de unión propuesto en el receptor hP2X1.**

El esquema 2D del acoplamiento molecular en el 2° sitio nos permite visualizar las interacciones que existen entre el ATP y los aminoácidos circundantes. Los aminoácidos que se determinaron como importantes en la unión del ATP son la ARG197 y la LYS322



**Figura 12. Análisis de acoplamiento molecular en el receptor hP2X1.**

En el gráfico se observa en número de conformaciones en función de la energía de unión en Kcal/mol. El análisis energético de unión de 100 posiciones distintas del ATP en el sitio propuesto de unión en el receptor hP2X1 *de* demuestra que la mayoría de las posiciones se unen al receptor con un  $\Delta G = -6.1$  Kcal/mol.



**Figura 13. Amplificación del receptor hP2X1 con los oligos diseñados para generar la mutación puntual K322A.**

Se observa un producto de PCR de un peso aproximado de 6,200 pb, que corresponde al tamaño del receptor hP2X1 inserto en el vector pCDNA3, prueba indirecta de la presencia de la mutación K322A.

CAGTAACGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTG  
CAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTAT  
TCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT  
CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG  
GAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCA  
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC  
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC  
TCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCC  
ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA  
GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTT  
CCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGG  
GGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAA  
ACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTT  
TTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAA  
ACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAAGGGAT  
TTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAATTTA  
ACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGGTGTGAGTTAGGGTGTGGAAAAGTCCC  
CAGGCTCCCCAGCAGGCCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTTAGTC  
AGCAACCAAGGTGGTGGGAAAGGTCCCCCAGGCCTCCCTCAGCCAAGGCAG  
AAGGTATGCTAAAGGCCATGGCAATTCTTCAAATTTAGTCCAGGCAACCATAA  
GTTCCCCGCCCCCTTAACCTCCGCCAATTCCCCGGCCCCCTAACTTCGGGCC  
CCAAGTTTCCGACTCCAAATTTCTTCTCGACCCCCCAATTGATGATGGCAC  
GGCGGTTCCAGGAGGAGCTGGCCGCCTTCTTCTCGAGTATGACACCCCCC  
GCATGGTGCTGGTGCGTAATAAGAAGGTGGGCGTTATCTTCCGACTGATCCA  
GCTGGTGGTCTGGTCTACGTCATCGGGTGGGTGTTTCTCTATGAGAAGGGC  
TACCAGACCTCGAGCGGCCTCATCAGCAGTGTCTCTGTGAAACTCAAGGGCC  
TGGCCGTGACCCAGCTCCCTGGCCTCGGCCCCAGGTCTGGGATGTGGCTG  
ACTACGTCTTCCAGCCCAGGGGGACAACCTCCTTCGTGGTCATGACCAATTT  
CATCGTGACCCCGAAGCAGACTCAAGGCTACTGCGCAGAGCACCCAGAAGG  
GGGCATATGCAAGGAAGACAGTGGCTGTACCCCTGGGAAGGCCAAGAGGAA  
GGCCAAGGCATCCGCACGGGCAAGTGTGTGGCCTTCAACGACACTGTGAA  
GACGTGTGAGATCTTTGGCTGGTGGCCCGTGGAGGTGGATGACGACATCCC  
GCGCCCTGCCCTTCTCCGAGAGGCCGAGAACTTCACTCTTTTCATCAAGAAC  
AGCATCAGCTTTCCACGCTTCAAGGTCAACAGGCGCAACCTGGTGGAGGAGG  
TGAATGCTGCCACATGAAGACCTGCCTCTTTTACAAGACCCTGCACCCCT  
GTGCCAGTCTTCCAGCTTGGCTACGTGGTGTGCAAGAGTCAGGCCAGAACTTC  
AGCACCTGGCTGAGAAGGGTGGAGTGGTTGGCATCACCATCGACTGGCAC  
TGTGACCTGGACTGGCACGTACGGCACTGCAGACCCATCTATGAGTTCCATG  
GGCTGTACGAAGAGAAAAATCTCTCCCCAGGCTTCAACTTCAGGTTTGCCAG  
GCACTTTGTGGAGAACGGGACCAACTACCGTCACCTCTTCAAGGTGTTTGGG  
ATTCGCTTTGACATCCTGGTGGACGGCGCGGCCGGGAAGTTTGACATCATCC

CTACAATGACCACCATCGGCTCTGGAATTGGCATCTTTGGGGTGGCCACAGT  
TCTCTGTGACCTGCTGCTGCTTCACATCCTGCCTAAGAGGCACTACTACAAGC  
AGAAGAAGTTCAAATACGCTGAGGACATGGGGCCAGGGGCGGCTGAGCGTG  
ACCTCGCAGCTACCAGCTCCACCCTGGGCCTGCAGGAGAACATGAGGACATC  
CTGACATAAGACGCGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAAT  
TCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCAGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCC  
CTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTG  
CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC  
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT  
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG

**Figura 14. Análisis de secuenciación del receptor hP2X1 ligado al vector PCDNA3.**

Secuencia de nucleótidos de la proteína hP2X1 ligada al vector PCDNA3. En amarillo se resalta el inicio y fin de la secuencia nucleotídica correspondiente al P2X1 y en verde se resaltan 2 nucleótidos, correspondientes al cambio K322A.

## REFERENCIAS

- Allsopp, R.C. et al., 2011. Cysteine Scanning Mutagenesis ( Residues Glu 52 – Gly 96 ) of the Human P2X1 Receptor for ATP MAPPING AGONIST BINDING AND CHANNEL GATING. *The journal of Biological chemistry*, 286(33), pp.29207–29217.
- Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and Therapeutic Potential of P2X receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(1), pp.58–86.
- Chadwick, D.J. & Goode, J., 2008. *Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions*,
- Chataigneau, T., Lemoine, D. & Grutter, T., 2013. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, pp.1–12.
- Davis, I.W. et al., 2007. MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2).
- Greco, N.J. et al., 2016. Novel structurally altered P 2X1 receptor is preferentially activated by adenosine diphosphate in platelets and megakaryocytic cells. *Blood journal*, 98(1), pp.100–108.
- Kawate, T. et al., 2010. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. , 460(7255), pp.592–598.
- López-López, C. et al., 2016. Two P2X1 receptor transcripts able to form functional channels are present in most human monocytes. *European Journal of Pharmacology*, 793(October), pp.82–88.
- Lörinczi, É. et al., 2012. Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *PNAS*, 109(28), pp.11396–11401.

- M.B., C., 2011. Modelado comparativo de proteínas. *Laboratorio de biología computacional*, 8(40), pp.1–30.
- Mohan, S.S. et al., 2009. Homology modeling of glut4, an insulin regulated facilitated glucose transporter and docking studies with atp and its inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 26(4), pp.455–464.
- North, R.A., 2002. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 82(4). Available at: <http://physrev.physiology.org/content/82/4/1013> [Accessed September 7, 2017].
- Novak, I., 2003. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 18, pp.12–17.
- Ray, D., Allsopp, R.C. & Evans, R.J., 2012. Molecular basis of selective antagonism of the P2X1 receptor for ATP by NF449 and suramin : contribution of basic amino acids in the cysteine-rich loop. *British journal of pharmacology*, 165, pp.390–400.
- Roberts, J.A. et al., 2012. Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. *PNAS*, 12, pp.4663–4667.