



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIOS SOBRE EL ALOSTERISMO DEL CANAL IÓNICO TRPV1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
RICARDO ANTONIO CONTRERAS CERVERA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

DRA. NINA PASTOR COLÓN
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., noviembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por permitirme crecer como profesionalista y hacerme sentir un puma de corazón.

Le agradezco a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir, mi tutora, por aceptarme en su laboratorio y por instruirme en el estudio de los canales iónicos.

Al Dr. León David Islas Suárez por su colaboración y enseñanzas, bastante enriquecedoras, para la realización de este trabajo y por permitirme realizar gran parte de mis experimentos en su laboratorio.

A la Bióloga Alejandra Itzel Llorente Gil, técnico del laboratorio de la Dra. Rosenbaum, por su apoyo y enseñanzas en mi primer acercamiento al cultivo celular y registro electrofisiológico.

A la Dra. Gisela Rangel Yescas, técnico del laboratorio del Dr. Islas, por su dedicación, apoyo y enseñanzas en los experimentos de biología molecular y cultivo celular. Por ser increíblemente paciente para transmitir sus conocimientos de la mejor manera.

A la C. D. María José Gómora Herrera por su apoyo en la obtención de imágenes y el manejo del Microscopio Confocal de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina.

A la Dra. Sara Luz Morales Lazo por sus comentarios y apoyo en dudas a lo largo de mi maestría.

A mi comité tutorial: la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y la Dra. Nina Pastor Colón por sus comentarios, sugerencias y preguntas que sirvieron de guía para este trabajo y ayudaron a formarme durante la maestría.

A los miembros del jurado de examen profesional: la Dra. Myrian Velasco Torres, el Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, el Dr. José de Jesús García Valdés, el Dr. Arturo Hernández Cruz y el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, por sus comentarios y correcciones que enriquecieron esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quisiera agradecer profundamente a todas las personas que a lo largo de estos dos años estuvieron conmigo, me brindaron su amistad y siempre serán parte de esta maravillosa experiencia.

A mis compañeros del laboratorio BL-303 del Instituto de Fisiología Celular por todos los momentos compartidos y sus ánimos.

A mis compañeros del laboratorio de canales iónicos del quinto piso de la Torre de Investigaciones de la Facultad de Medicina por todas las reuniones, seminarios, risas y momentos compartidos que siempre recordaré.

Agradezco a Miriam, mi compañera en todas las clases de la maestría y amiga quién estuvo ahí para resolver mis dudas como foráneo, gracias por escucharme y darle un toque muy particular a esta experiencia.

Agradezco a Aymé, mi compañera de laboratorio y amiga, por siempre estar pendiente de mí y por tantas pláticas amenas, gracias por ser la cubana más buena gente que conozco.

Agradezco a Aldair, mi amigo desde la prepa, por haberme convencido a vivir esta aventura de estudiar lejos de casa y haber sido mi roomie durante estos dos años, por ser mi familia en la Ciudad de México.

Agradezco a Estefania, Adriana y Jessica por estar presentes durante estos dos años, por los paseos y por los momentos de diversión, por ser mi familia en la Ciudad de México.

También agradezco a mis amigos de toda la vida: Marianne, Monse, Cinthia, Diana, Mary, Miguel, Edwin y Toni quiénes aún a distancia siempre estuvieron pendientes de mi y procuraron que no me sintiera solo.

Por último pero no menos importante a mi familia adorada, mi pilar emocional y a quienes les debo la persona que soy, mis valores y principios: a mis padres José Antonio y María Elena por demostrarme que con esfuerzo y trabajo constante siempre se pueden alcanzar los sueños. A mis hermanos Diana y Amado por preocuparse y estar al pendientes de mi. A mis sobrinos José Miguel y Victor Alejandro que son mi motor de felicidad.

Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. León David Islas Suárez y financiado con el soporte del proyecto No. 77 “Nuevos paradigmas en el estudio del alosterismo de proteínas de membrana” del programa de Investigación en Fronteras de la Ciencia (IFC-2015-1/77), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico – Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (IN200717) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en su apartado de Ciencia Básica CB-2014-01-238399, otorgados a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

Esta tesis también fue posible gracias al apoyo del CONACyT por la beca: 450848 que se me otorgó con el número de becario: 609531, para la realización de la maestría en el período de agosto de 2016 a julio de 2018.

ÍNDICE

	Página
Resumen _____	1
Introducción _____	2
1. Canales iónicos_____	2
2. Canales TRP_____	2
2.1. Clasificación_____	3
3. TRPV1_____	6
3.1. Respuesta a estímulos_____	6
3.2. Estructura del canal_____	7
4. Alosterismo del canal TRPV1_____	9
5. Cambios conformacionales finos_____	11
5.1. Incorporación de aminoácidos no canónicos_____	11
5.2. L-Anap_____	14
5.3. Estudios de fluorescencia_____	15
5.4. Confirmación de incorporación_____	17
Justificación _____	18
Hipótesis _____	19
Objetivos _____	20
Metodología _____	21
A) Biología molecular_____	21
I. Fusión de canal TRPV1 a proteína fluorescente mCherry (TRPV1_Cherry)_____	21
II. Generación de mutantes en fondo TRPV1_Cherry_____	22
B) Expresión de canales_____	23
I. Cultivo celular_____	23

II. Pase de células_____	24
III. Transfección_____	24
C) Electrofisiología_____	25
I. Soluciones de registro_____	25
II. Fijación de voltaje en microárea de membrana (<i>Patch Clamp</i>) _____	25
III. Activación por capsaicina_____	27
IV. Activación por calor_____	28
• Microcalentador_____	28
• Calibración de temperatura_____	28
• Estimulación por temperatura_____	30
V. Análisis de datos_____	31
D) Incorporación de L-Anap_____	31
I. Microscopía confocal_____	31
II. Microscopía epifluorescencia_____	32
III. Fotoblanqueo_____	33
IV. Deroofing_____	33
V. Cambios de la fluorescencia de L-Anap_____	34
Resultados _____	35
1.Funcionalidad del molde TRPV1_Cherry_____	35
2.Selección de sitios a mutar_____	37
3.Comprobación de incorporación_____	38
3.1.Confocal_____	38
3.2.Epifluorescencia_____	41
3.2.1.Fotoblanqueo de fluoróforos_____	42
3.2.2.Cambios de fluorescencia de L-Anap_____	44
3.3.Fragmentos de membrana_____	45

4.Funcionalidad de mutantes_____	47
4.1.Activación con capsaicina_____	47
4.2.Activación por temperatura_____	50
Discusión_____	53
Conclusiones_____	65
Perspectivas_____	66
Anexos_____	67
A. Selección del mejor agente de transfección_____	67
B. Estandarización de la incorporación de L-Anap en proteína mCherry__	68
C. Confocal_____	70
D. Cambios en la fluorescencia de L-Anap_____	75
Referencias_____	76

RESUMEN

La familia de canales *Receptores del Potencial Transitorio* (TRP, por sus siglas en inglés) ha sido muy estudiada en las últimas décadas por su papel en la respuesta a estímulos físicos como químicos. Particularmente el canal TRPV1 o vaniloide 1, conocido como el receptor a la capsaicina (compuesto pungente presente en los chiles del género *Capsicum*), es un canal polimodal que responde a otros estímulos entre los que se encuentran temperaturas cercanas a los 42°C, cambios en el pH intra y extracelulares y algunos compuestos químicos endógenos como el ácido lisofosfatídico (LPA).

El campo de la biofísica de canales iónicos se ha enfocado en dilucidar los mecanismos por los cuales diferentes estímulos pueden permitir cambios conformacionales al unirse a sitios distintos de la estructura de estas proteínas y converger en la misma respuesta, es decir, la apertura del poro y el flujo de iones a través de las células. Sin embargo, ha sido difícil determinar cómo ocurren esos cambios conformacionales de manera detallada.

En este trabajo se estandarizaron las metodologías para estudiar dichos cambios conformacionales finos empleando la técnica de la incorporación de un aminoácido no canónico fluorescente, L-Anap, que tiene la propiedad de variar su espectro de emisión dependiendo de la posición inicial o cambio que ocurra en la estructura del canal iónico. Así se logró la incorporación exitosa de L-Anap en algunos sitios de la estructura del TRPV1 y se caracterizaron las propiedades funcionales de estas mutantes en sitios que son relevantes para la activación del canal por capsaicina y temperatura.

INTRODUCCIÓN

Los cambios que ocurren en el medio ambiente son detectados por los seres vivos como un mecanismo de homeostasis y supervivencia (Moran y Clapham, 2004). En las células existe una barrera física llamada membrana celular que permite tener una composición química del medio intracelular distinta de la extracelular. Esta es una característica esencial para los procesos biológicos como el intercambio de solutos, gases (oxígeno y dióxido de carbono), moléculas hidrofóbicas, azúcares, iones y otras moléculas polares o cargadas (Dahl *et al.*, 2004).

1. Canales iónicos

La generación de señales celulares en respuesta a algunos estímulos ambientales ocurre por la acción de proteínas embebidas en la membrana plasmática. Los canales iónicos son proteínas de membrana capaces de formar poros que regulan el paso de moléculas cargadas de un lado de la membrana al otro a favor de un gradiente electroquímico (Zheng, 2013; Hille, 2001).

A diferencia de las proteínas acarreadoras (transportadoras), los canales iónicos tienen una mejor eficiencia de transporte. En ellos el flujo de iones es de hasta 100 millones por segundo y es pasivo ya que no se requiere acoplamiento a una fuente de energía para realizar el transporte (Hille, 2001).

Los canales iónicos son capaces de transmitir señales y efectuar una respuesta ante los estímulos, que en algunos casos pueden ser nocivos. Una clase de canales iónicos que participa en la respuesta a estímulos locales y ambientales está bien representada por la superfamilia de receptores del potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) (Zheng, 2013; Fernandes *et al.*, 2012).

2. Canales TRP

Los canales TRP son una superfamilia de canales de cationes no selectivos (Venkatachalam y Montell, 2007), que permiten reconocer cambios ambientales y

locales. Su activación desencadena la despolarización de la membrana celular dando como resultado un cambio en la concentración de cationes intracelulares, principalmente Ca^{+2} y Mg^{+2} (Nilius *et al.*, 2011). Estos canales están presentes en una gran variedad de organismos, desde levaduras, moscas, gusanos y peces cebra hasta mamíferos como el humano (Venkatachalam y Montell, 2007). El primer canal TRP se encontró en la mosca *Drosophila melanogaster* donde se observó un cambio en la respuesta transitoria a la luz permanente, por ello recibieron el nombre de *Receptores del Potencial Transitorio*, pero fue hasta 1989 por Montell y Rubin que se encontró el gen que codifica para la proteína responsable de este fenómeno (Nilius y Owsianik, 2011). Se han identificado al menos 28 genes que codifican para canales TRP en humanos (Moran y Clapham, 2004).

Varios canales TRP son polimodales ya que responden a estímulos de diferente naturaleza como luz, sonido, compuestos químicos, temperatura, estímulos mecánicos y estrés o cambios en la osmolaridad (Falsig *et al.*, 2005).

2.1. Clasificación

En principio, los canales TRP se clasifican por la secuencia de aminoácidos conservados en los dominios que conforman la estructura y no por los agonistas que pueden provocar una respuesta en ellos, debido a la complejidad y variedad de estos estímulos (Moran y Clapham, 2004). Están clasificados en dos grupos y a su vez se dividen en siete subfamilias, como se observa en la Figura 1.

El grupo 1 consiste en cinco subfamilias: TRPC (canónico), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPN (no potencial mecánico) y TRPV (vaniloide), todas relacionadas por homología estructural, presentando seis segmentos transmembranales, la mayoría presentan repeticiones de anquirina en el extremo amino y un dominio conservado en el extremo carboxilo llamado Caja TRP, al que se unen algunos ligandos (Venkatachalam y Montell, 2007).

El grupo 2 lo conforman dos subfamilias: TRPML (mucolipina) y TRPP (policistina), compartiendo la característica estructural de tener una asa larga que separa el primer y segundo dominio transmembranal (Venkatachalam y Montell, 2007).

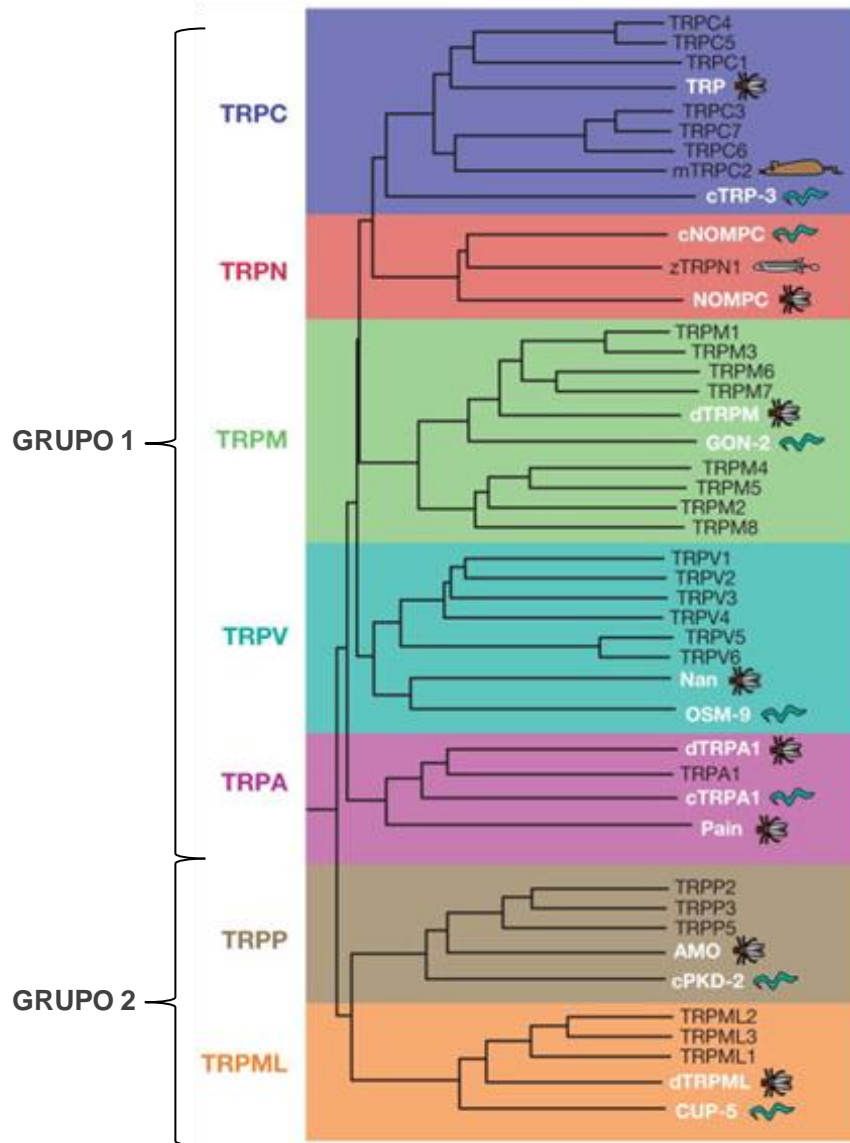


Figura 1. Esquema de árbol filogenético mostrando la relación de los canales TRP. El dendrograma de TRPs en vertebrados incluye mayoritariamente a los TRPs en humano, excepto por TRPC2 en el ratón y el TRPN1 de pez cebra. El texto en blanco y las caricaturas remarcadas son de TRPs de gusano y mosca con un miembro en *C. elegans* y uno en *Drosophila*. Modificada de Venkatachalam y Montell, 2007.

La temperatura es un factor limitante en la distribución, adaptación y supervivencia de todos los organismos vivos (Funjul e Hiriart, 2009), por lo que estos canales han desarrollado mecanismos para sentir los cambios en la temperatura y poder responder a los mismos (Zhang, 2015).

Otra forma de clasificar a los canales TRP es por la fascinante característica que presentan cuatro subfamilias de estos canales (TRPV, TRPM, TRPC y TRPA) al ser termosensibles, denominándolos como TermoTRPs (Figura 2). Existen algunos de éstos que son activados por temperaturas cálidas de hasta 52°C como el TRPV2, mientras que otros son activados por temperaturas frías cercanas a los 10°C como el TRPA1 (Latorre *et al.*, 2009; Venkatachalam y Montell, 2007; Baez *et al.*, 2014). Dentro de esta clasificación se encuentra el canal TRPV1, mismo que se estudió en el presente proyecto.

La termosensación forma parte del sentido del tacto, uno de los sentidos más complejos. En mamíferos, la temperatura, el dolor, las fuerzas mecánicas y algunos estímulos químicos son detectados por neuronas sensoriales (aférentes primarias) pertenecientes a los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y a los ganglios trigeminales (Patapoutian *et al.*, 2003).

El canal TRPV1 fue el primer termoTRP en ser identificado y caracterizado. Su umbral de activación es cercano a los 42°C (Figura 2). Posteriormente fueron identificados los demás, que detectan casi todas las temperaturas relevantes en mamíferos (Patapoutian *et al.*, 2003). A continuación se detallan las características de este canal.

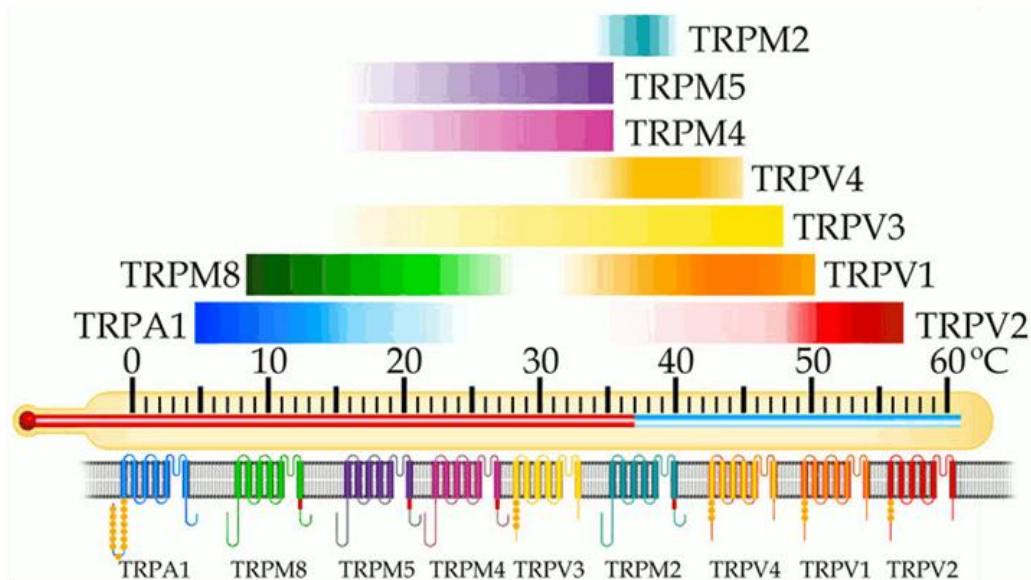


Figura 2. TermoTRPs, miembros de los canales TRP que responden al estímulo de temperatura. Modificada de Latorre *et al.*, 2009.

3. TRPV1

El canal TRPV1 fue el primer miembro de la subfamilia TRPV en ser descrito y es activado por compuestos de tipo vaniloide (Fernandes *et al.*, 2012). Este canal es catiónico no selectivo, permite el influjo de Ca^{+2} a la célula de forma preferencial y ha sido ampliamente asociado a procesos de dolor e inflamación (Winter *et al.*, 2013). Se expresa en terminaciones nerviosas libres de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y de los ganglios trigeminales (TG) (Falsig *et al.*, 2005), aunque también se expresa en tejidos no neuronales como el tejido adiposo, glándulas de la submucosa, epitelio, vejiga urinaria, entre otros (Fernandes *et al.*, 2012).

3.1. Respuesta a estímulos

Entre sus particularidades, el TRPV1 es un canal de baja respuesta al voltaje y tiene la propiedad de ser sensibilizado y desensibilizado por una diversidad de estímulos (Figura 3), como pH extracelular inferior a 6.0 (Caterina *et al.*, 1997), pH intracelular elevado (>9.3) (Dhaka *et al.*, 2009), compuestos químicos como la resiniferatoxina presente en los cactus (Szallasi y Blumberg, 1989), alicina (compuesto presente en el ajo y la cebolla) (Salazar *et al.*, 2008), capsaicina (compuesto pungente de los chiles del género *Capsicum*) (Caterina *et al.*, 1997), y otros agonistas más. Sin embargo, también se han encontrado moduladores que inhiben su actividad como la capsazepina, cuya estructura es similar a la capsaicina (Inoue *et al.*, 2002) y el ácido oleico (Morales-Lázaro *et al.*, 2016), entre otros.

Las proteínas tienen cierta dependencia de la temperatura y un ejemplo clásico de esto son aquellas con acción enzimática ya que su velocidad se modifica cuando varía la temperatura. Por otra parte, existen proteínas que pueden ser directamente activadas por temperatura, como los canales TRP, en los que se han caracterizado y descrito que responden a temperatura como un estímulo de su activación (Jara-Oseguera e Islas, 2013).

El canal TRPV1 es un termosensor intrínseco, ya que cuando fue reconstruido en liposomas artificiales se demostró que se activa por temperatura (Cao *et al.*, 2013 citado en Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

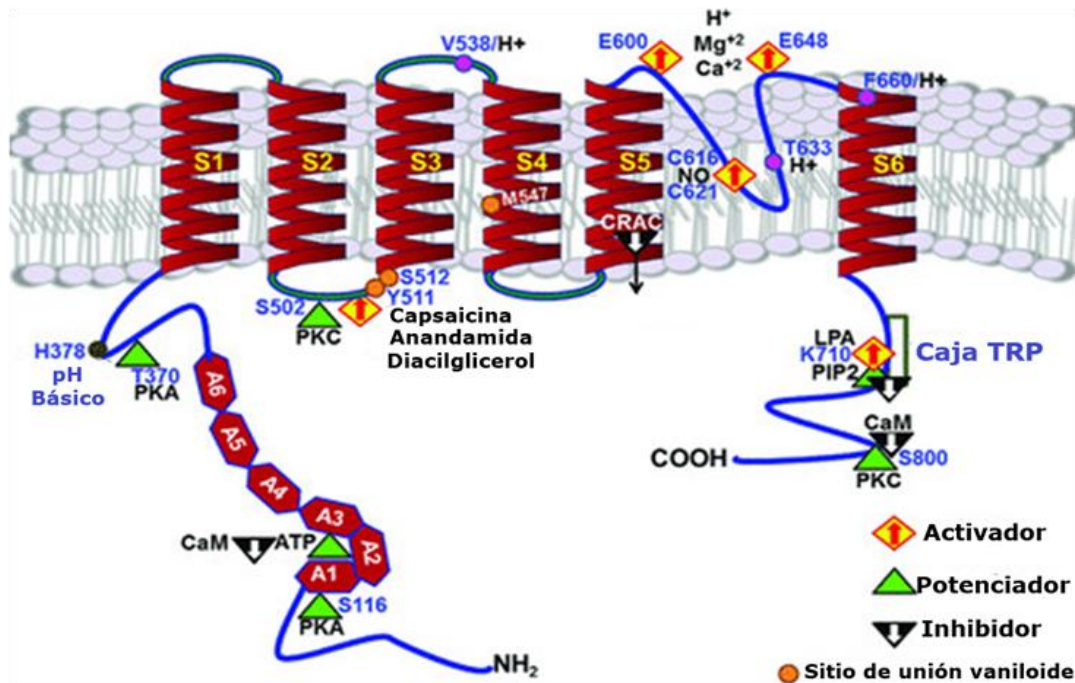


Figura 3. Esquema de una subunidad del canal TRPV1 en membrana y algunos sitios de interacción con ligandos. La figura muestra la organización topológica de una subunidad del canal TRPV1 en la membrana, la distribución de los pasos transmembranales (S1-S6); el asa en la región que da lugar a la formación de un poro como homotetrámero entre los dominios S5 y S6. Cerca del amino intracelular destaca el dominio de repeticiones de anquirina (A1-A6) y en el extremo carboxilo intracelular el dominio caja TRP. Activador (rombo amarillo), potenciador (triángulo verde), inhibidor (triángulo negro), sitio de unión a vaniloide (esfera naranja). Modificada de Morales-Lázaro *et al.*, 2013.

3.2. Estructura del canal

El canal TRPV1 se expresa en forma de tetrámero en la membrana plasmática y cada monómero está compuesto por aproximadamente 840 aminoácidos (Figura 4), dependiendo de la especie, con un peso molecular de 95 kDa (Fernandes *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013). Además, comparte similitudes estructurales con otros miembros de la superfamilia TRP y los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales son intracelulares (Zheng, 2013). Estudios de criomicroscopía electrónica han podido reconstruir una estructura tridimensional del canal con una resolución de 3.4 Å que constituye la primera estructura general de esta

superfamilia de canales, donde se observan los principales dominios presentes en la proteína (Liao *et al.*, 2013).

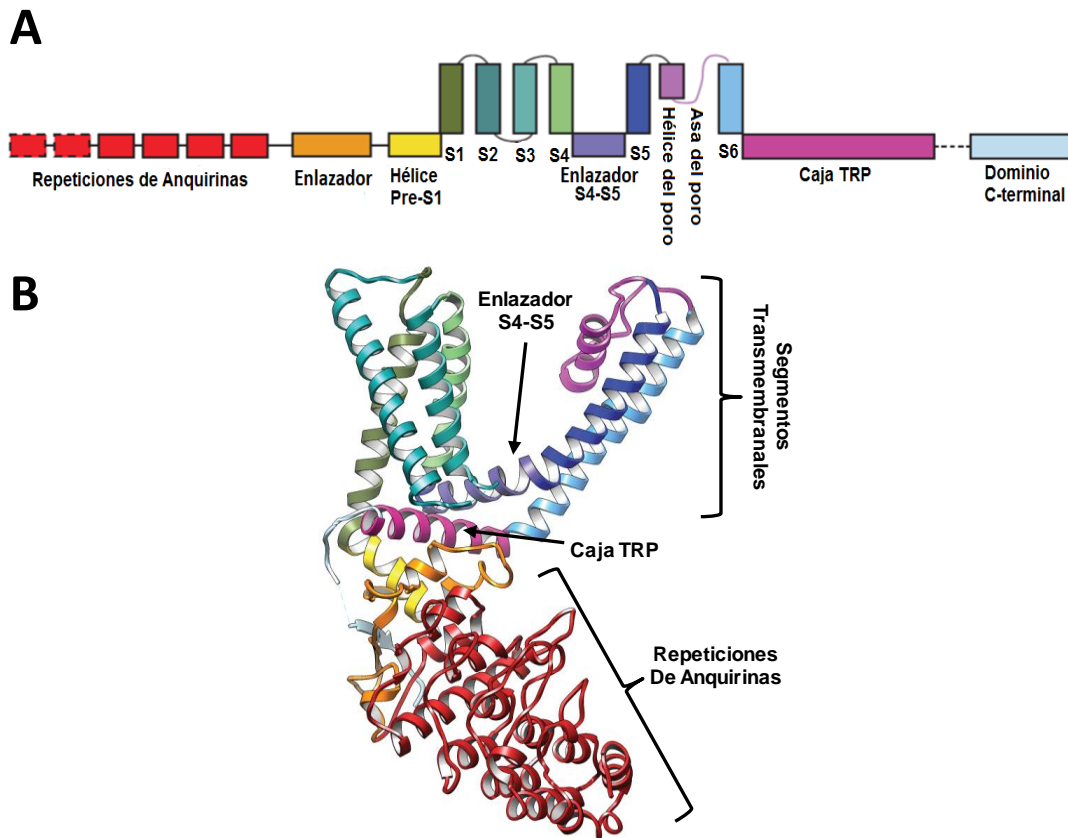


Figura 4. Esquema de los dominios presentes en la estructura TRPV1. A. Se presentan las repeticiones de anquirina (rojo), región enlazadora (naranja), hélice pre-S1 (amarillo), segmentos transmembranales S1-S6 (diferentes colores de verde y azul), región enlazadora S4-S5 (morado), hélice reentrante del poro (lila), caja TRP (rosa). B. Modelo de listones respetando los colores de los dominios. Modificado de Liao *et al.*, 2013.

El primer dominio presente en la estructura son las 6 *repeticiones de anquirina* (ARD, por sus siglas en inglés), en el extremo amino intracelular, conformadas por aproximadamente 300 aminoácidos. Seguido de ese dominio se encuentra una *región enlazadora*, que comprende del residuo Pro360 a la Val415, que está conservada en los miembros de la subfamilia Vaniloide. Luego le sigue una hélice *pre-S1* previa a la primera hélice transmembranal, compuesta del residuo Glu416 a la Arg428 y que es una región que puede interactuar con el extremo carboxilo y el dominio de anquirinas para favorecer el plegamiento de la proteína (Liao *et al.*, 2013).

La región transmembranal se compone de seis cruces de alfa hélices, denominadas S1 a S6. El poro del canal está formado por los dominios S5, S6 de cuatro monómeros y hélices reentrantes que unen a los dominios S5 y S6 (Liao *et al.*, 2013; Jara-Oseguera *et al.*, 2016). Entre los dominios S4 y S5 existe una hélice enlazadora, compuesta por aminoácidos aromáticos, Tyr441, Tyr444, Tyr554, Tyr555, que le confieren características hidrofóbicas estabilizando la estructura del canal (Fernandes *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013).

En el extremo carboxilo proximal hay un dominio característico llamado *caja TRP*, hélice de 23 a 25 residuos, que se ubica paralela a la membrana celular y es una subunidad de ensamblaje y modulación alostérica de la apertura del canal (Liao *et al.*, 2013; Jara-Oseguera *et al.*, 2016). Al plegarse, los dominios presentan interacciones electrostáticas entre ciertos residuos que permiten la estabilidad y correcto ensamble de la estructura del canal y, de hecho, algunas de estas interacciones han sido objeto de interés para comprender los cambios conformacionales presentados por activación alostérica del canal (Dhaka *et al.*, 2009).

4. Alosterismo del canal TRPV1

En el campo de la biofísica es de gran interés dilucidar los cambios conformacionales que ocurren en canales iónicos. Para el canal TRPV1 se ha demostrado que distintos residuos en dominios separados pueden ser reconocidos por ciertos agonistas provocando la activación del canal. Tal es el caso de la capsaicina (Figura 5), que se propone interacciona formando puentes de hidrógeno con los residuos Tyr512 y Glu571, así como interacciones hidrofóbicas con Phe544 y Thr551 (Yang *et al.*, 2015).

Otro ejemplo es el del ácido lisofosfatídico (LPA) (Figura 3), que interacciona formando un puente iónico entre la cabeza polar del LPA con el extremo cargado del residuo Lys710 en la caja TRP (Morales-Lázaro *et al.*, 2013), ambos agonistas convergen en la apertura y activación del poro, permitiendo el paso de cationes.

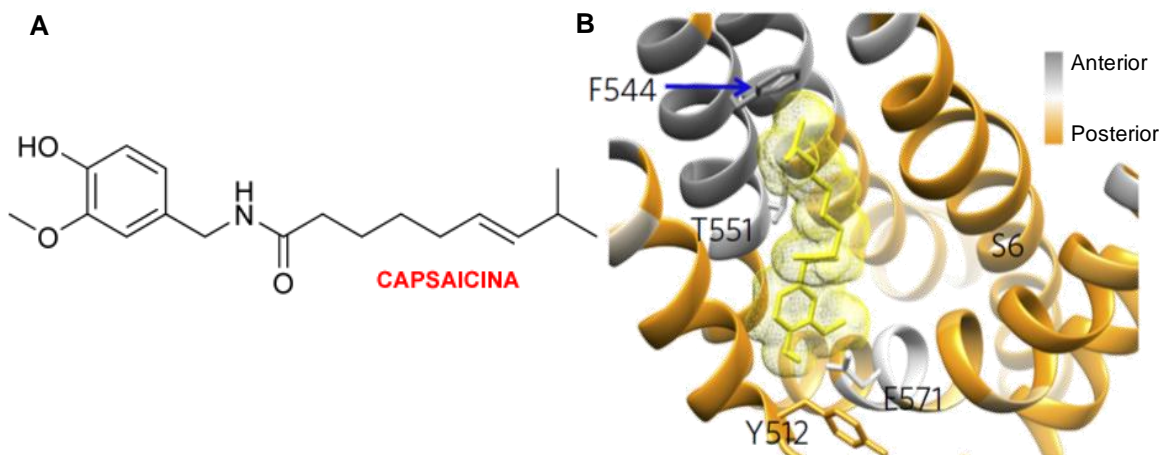


Figura 5. Interacción de la capsaicina con el canal TRPV1. A. Estructura de la capsaicina. B. Esquema tridimensional de los residuos de los segmentos transmembranales con los que interacciona la capsaicina, formando puente de hidrógeno entre su cabeza polar y los residuos Y512, E571 e interacciones hidrofóbicas con los residuos F544 y T551, con la cadena carbonada. Modificado de Yang *et al.*, 2015.

Algunos estudios mediante mutagénesis y la creación de quimeras entre el canal TRPV1 con otros miembros termoTRPs han postulado que existen varios dominios o regiones relacionadas con el fenómeno de termosensación y umbral de respuesta a la temperatura (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

Entre las regiones más relevantes se encuentra el dominio próximo a membrana (MPD, por sus siglas en inglés) conformado por la hélice enlazadora y la hélice pre-S1 (Figura 4). En un estudio donde se generaron quimeras entre los canales TRPV1 y TRPV3 sugieren que, al intercambiar unos residuos del asa del MPD, los canales quiméricos responden a la temperatura independiente del uso (Yao, Liu y Qin, 2011; Liu y Qin, 2017).

Estudios en la región de la torreta del poro de TRPV1, en una secuencia de 24 aminoácidos entre S5 y la hélice del poro, muestran que está involucrada en la activación del canal inducido por calor (Yang *et al.*, 2010). Mientras que otro grupo muestra que la eliminación de una secuencia de la torreta del poro no tiene efecto en la activación por temperatura del canal (Yao, Liu y Qin, 2010).

En el caso del extremo C-terminal, un estudio en donde se generaron quimeras entre los canales TRPM8 y TRPV1 sugirió que, al intercambiar estos dominios, se

producen canales que responden a temperaturas distintas a las que responden los canales silvestres (Brauchi *et al.*, 2006).

5. Cambios conformacionales finos

Los estudios de mutagénesis dirigida en el canal TRPV1 han aportado información sobre los mecanismos que regulan la activación del canal, identificando sitios de unión a agonistas e inhibidores (Caterina *et al.*, 1997; Salazar *et al.*, 2008; Morales-Lázaro *et al.*, 2016). De igual forma, por medio de la resolución de su estructura por criomicroscopía electrónica (Liao *et al.*, 2013), así como por estudios de acoplamiento del canal a proteínas fluorescentes se ha podido obtener más información acerca de su estructura tridimensional (De-la-Rosa *et al.*, 2013).

La inserción de proteínas fluorescentes como la GFP (proteína verde fluorescente), en diferentes regiones y subunidades de los canales iónicos, ha permitido estudiar algunos aspectos de la función y estequiometría de los mismos. Sin embargo, no permiten discernir de forma muy sensible los cambios finos que se generan durante el proceso de apertura o “gating” de los canales (De-la-Rosa *et al.*, 2013). Debido a su tamaño, las proteínas fluorescentes pueden provocar una variación en la estructura y función de los canales, por ello se han buscado técnicas que permitan medir cambios de forma más detallada y una de éstas es la incorporación de aminoácidos no canónicos en la secuencia de los canales iónicos.

5.1. Incorporación de aminoácidos no canónicos

Una metodología para estudiar los cambios conformacionales finos consiste en la utilización de aminoácidos no canónicos (aaNC), que al incorporarlos a ciertos sitios aporten información sobre la estructura debido a las propiedades de éstos. Tal es el caso de los aaNC fluorescentes que permiten identificar distancias o cambios estructurales al variar su espectro de emisión por estar cerca de agentes que absorben la energía emitida (Wals y Ovaa, 2014; Gahl *et al.*, 2015).

El proceso normal de traducción de polipéptidos está descrito por 64 diferentes codones, en forma de tripletes de nucleótidos, conformando la secuencia del ARN mensajero (ARNm). Cada triplete corresponde a uno de los 20 aminoácidos canónicos que se adicionan a la cadena polipeptídica por acción del ribosoma, exceptuando a 3 codones que no codifican para aminoácidos, sino indican el punto final de la traducción mediante el reclutamiento y liberación de factores proteicos que se unen al ribosoma bloqueándolo. Estos codones de paro, como son comúnmente llamados, son ocre (TAA), ópalo (TGA) y ámbar (TAG) (Wals y Ovaa, 2014).

La traducción es muy específica, requiere de ciertos componentes (Figura 6, A), como un molde de ARNm que será el marco de lectura, ARNs de transferencia (ARNt) para cada aminoácido, que contienen una secuencia anticodón que interacciona con el ARNm en el codón específico por acción del ribosoma. El ARNt se carga con el aminoácido específico a incorporar, por acción de una enzima llamada aminoacil-ARNt sintetasa (aaRS) que lo reconoce y lo une en el hidroxilo del extremo 3' del correspondiente ARNt. Existen 20 aaRS, una para cada aminoácido canónico (Wals y Ovaa, 2014; Wang y Schultz, 2005).

Los métodos de mutagénesis dirigida clásicos están limitados a la incorporación de los 20 aminoácidos canónicos como bloques de construcción de polipéptidos (Wang y Schultz, 2005; Chin *et al.*, 2003). En la actualidad se ha desarrollado una técnica donde se incorporan aminoácidos no canónicos, mediante modificaciones genéticas de los ARNt para reconocer a uno de los 3 codones de paro, principalmente el codón ámbar (TAG) al ser el menos utilizado biológicamente y porque raramente participa en terminación de genes esenciales (Wals y Ovaa, 2014).

El proceso modificado de traducción (Figura 6, B) descrito en 2005 ha sido aplicado para el estudio de mecanismos enzimáticos y de problemas con el empaquetamiento y señalización (Wang y Schultz, 2005), reportando incorporaciones eficientes (Wang y Wang, 2008). El ARNt y aaRS empleados para estas modificaciones provienen de organismos ortogonales, es decir, de especies

diferentes pero que realizan la misma función biológica. Así, se han descrito 3 pares ARNt-aaRS ortogonales:

1. TyrARNt-TyrRS^{CUA} obtenido de *Methanococcus jannaschii*, normalmente introduce tirosina en el codón ámbar (Wang and Schultz, 2005); este sistema se estudió en *Escherichia coli* para expresar este aminoácido en el codón de paro y es un par ortogonal para levaduras y células de mamífero (Wang y Wang, 2008).
2. PylARNt-PylRS^{CUA} obtenido de otras arqueas metanógenas, donde incorpora pirrolisina en el codón ámbar normalmente; es ortogonal para *E. coli*, levaduras y células de mamífero (Schmied *et al.*, 2014).
3. LeuARNt-LeuRS^{CUA} obtenido en *Escherichia coli*, incorpora leucina e isoleucina (en bajo porcentaje); se considera ortogonal para levaduras y células de mamífero (Lee *et al.*, 2009).

Los pares aaARNt-aaRS son modificados por mutagénesis dirigida y reconocen aaNC como Dansil, Coumarina y L-Anap para así emplearlos como herramientas de estudio en cambios conformacionales finos. Para su expresión es necesario insertarlos en plásmidos que contengan promotores específicos para el organismo hospedero (Wang y Wang, 2008).

Para evaluar la incorporación de los aaNC se emplean proteínas fluorescentes, acopladas en el extremo C final de la estructura a estudiar, y al incorporar el aaNC en el sitio de interés se expresa la secuencia completa de ambos polipeptidos, presentando ambas señales fluorescentes. Al agregar un codón de paro, en el sitio a estudiar de la proteína, se requiere identificar si es reconocido por el par aaARNt-aaRS ortogonal, que incorporan al aaNC, o es reconocido por un factor de terminación de la traducción y la proteína se degrada sin presentar señal fluorescente (Wals y Ovaa, 2014; Gordon *et al.*, 2016).

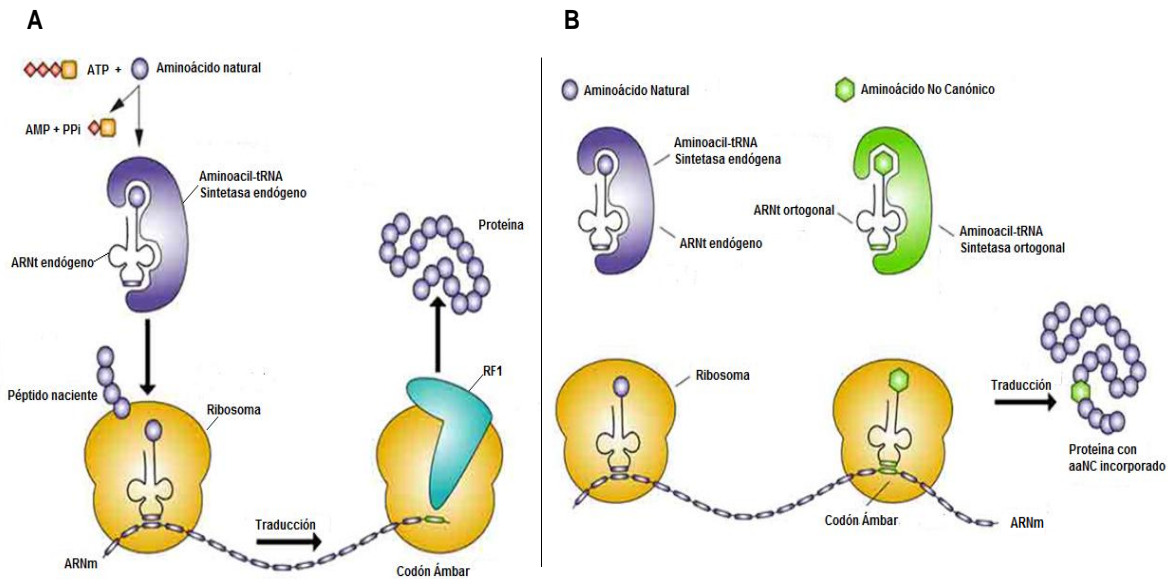


Figura 6. Traducción. A. proceso normal de traducción y los elementos que participan: aminoácido natural, aminoacil-ARNt sintetasa y ARNt endógeno (azul), ARNm, ribosoma (amarillo) y factor de terminación (azul claro) en codón de paro. B. proceso modificado de traducción y los elementos que participan: aminoacil-ARNt sintetasa y ARNt ortogonales (verde), aminoácido no canónico (hexágono verde), ARNm, ribosoma (amarillo). Modificada de Wang y Schultz, 2005.

5.2. L-Anap

El ácido 3-(6-acetilnaftalen-2-ilamino)-2-aminopropanoico (L-Anap) (Figura 7), es un aaNC derivado sintético del 6-propionil-2-(*N,N*-dimetil)-aminonaftaleno (Prodan), un fluoróforo usado en bioquímica y biología celular (Chatterjee *et al.*, 2013). El L-Anap es fluorescente, con una λ max de excitación de 360 nm y una λ max de emisión de 490 nm. Esta propiedad es sensible a cambios de polaridad y solvataciones locales, haciéndolo un reportero o etiqueta fluorescente de cambios conformacionales en sitios puntuales de la estructura (Sakata *et al.*, 2016; AsisChem Inc. Catalog: ASIS-0146).

Entre sus características tiene un peso molecular de 286 Da, es decir, es un compuesto pequeño en comparación con las proteínas fluorescentes (>20 kDa) (Chatterjee *et al.*, 2013). Tiene un tamaño similar al de los aminoácidos canónicos, su incorporación causa una ligera perturbación de la estructura proteica debido a sus enlaces químicos (Sakata *et al.*, 2016), comparándolo con otros aaNC como Dansil o Coumarina, el L-Anap ha mejorado la sensibilidad a la polaridad del microambiente presentando un incremento en la intensidad de fluorescencia (Lee

et al., 2009). Aunque los mecanismos detallados de variación de emisión de L-Anap no se conocen hasta el momento, se ha reportado su utilidad en determinar cambios conformacionales de proteínas activadas por voltaje (Sakata *et al.*, 2016).

Se ha estudiado que una concentración de 10 μM de L-Anap es suficiente para la incorporación y expresión de proteínas expresadas en ovocitos de *Xenopus*, levaduras (Lee *et al.*, 2009) y células de mamífero (ovario de hámster chino CHO y riñón de embrión humano HEK293) (Chatterjee *et al.*, 2013). La esterificación del L-Anap en el extremo carboxilo (Figura 7, A), le permite atravesar la membrana y entrar a la célula donde, por acción de las esterasas inespecíficas, se escinde el grupo metilo dejando disponible al aaNC en el citoplasma para su incorporación (Zagotta *et al.*, 2016). Una cantidad mayor a 500 μM es tóxica para las células de mamífero (Chatterjee *et al.*, 2013). Entre las aplicaciones de este sistema se han podido medir cambios conformacionales inducidos por ligandos y estudios biofísicos en proteínas (Lee *et al.*, 2009).

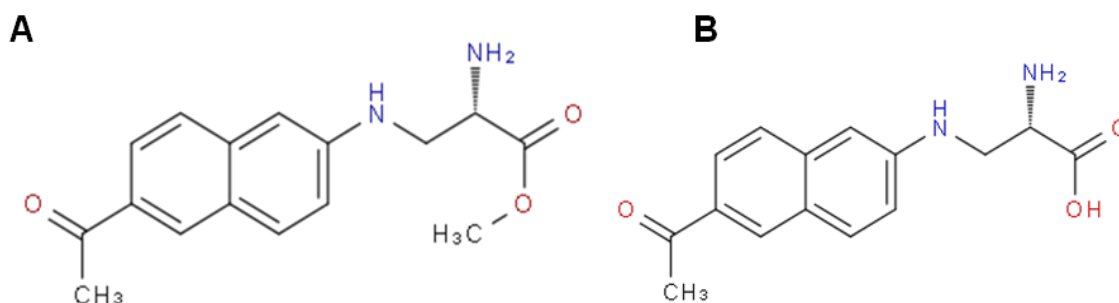


Figura 7. L-Anap. A. Estructura esterificada. B. Estructura sin el metil en el extremo carboxilo. Tomada de AsisChem Inc. Catalog: ASIS-0146

Para la incorporación de L-Anap se requiere sustituir el codón del aminoácido, del sitio a estudiar, por un codón sin sentido ámbar (UAG). Se utiliza un Leu-ARNt^{CUA} y una Leu-ARNt sintetasa ortogonales, provenientes de *Escherichia coli*, para incluir el L-Anap en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Lee *et al.*, 2009).

5.3. Estudios de fluorescencia

Una forma de medir los cambios conformacionales finos en proteínas que incorporan aaNCs es por estudios de fluorescencia en los que se recurre a las propiedades del L-Anap. La λ max de emisión de éste (490 nm) puede solaparse

con las λ max de excitación de compuestos que absorben la fluorescencia y disminuyen dicha emisión si se encuentran a distancias de 10 a 100 Å, como la dipicrilamina (DPA) (Figura 8, A). La DPA es un compuesto aniónico lipofílico no fluorescente que se internaliza en la membrana plasmática y funciona como aceptor de energía mediante interacciones dipolares entre la conjugación con fluoróforos localizados en una proteína de membrana. En particular este compuesto puede localizarse específicamente de un lado u otro de la membrana al aplicar un campo eléctrico, permitiendo estimar distancias entre la membrana y residuos cercanos mediante el apagamiento de la fluorescencia (Figura 8, C) (Gahl *et al.* 2015; Miller, 2016).

En estudios recientes se ha observado que utilizando la transferencia de energía por iones metálicos de transición, se puede determinar las distancias entre aminoácidos fluorescentes y cobalto Co^{2+} unido a la superficie intracelular de la membrana plasmática por un lípido sintético que tiene un grupo quelante en la cabeza, conocido como ácido estearoil-nitrilotriacético (C18-NTA) (Figura 8, B). Esto ofrece un enfoque prometedor para medir las distancias en la estructura y el reordenamiento de éstas en relación con la membrana celular nativa (Gordon *et al.*, 2016).

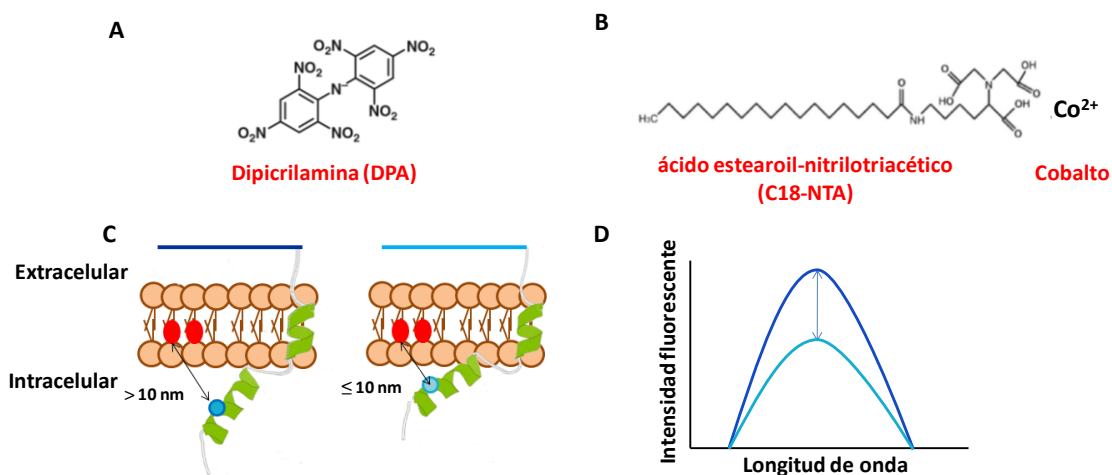


Figura 8. Medición de distancias mediante el apagamiento de fluorescencia. A. Estructura de dipicrilamina, DPA. B. Estructura del ácido estearoil-nitrilotriacético, C18-NTA. C. Caricatura de la simulación de un estado conformacional donde el aminoácido fluorescente (círculo azul) está lejos (izquierda) o cerca (derecha) del apagador, pudiendo ser DPA o C18-NTA+ Co^{2+} (círculo rojo). D. Diferencia de la intensidad de fluorescencia cuando el sitio del fluoróforo está lejos (azul oscuro) o cerca (azul claro) del apagador. Modificado de Miller, 2016 y Gordon *et al.*, 2016.

5.4. Confirmación de incorporación

Existen estudios donde se ha comprobado que el L-Anap es un aminoácido que puede incorporarse de forma adecuada a la secuencia de la proteína de interés (Lee *et al.*, 2009, Chatterjee *et al.*, 2013, Zagotta *et al.*, 2016). Esto se ha confirmado mediante la obtención de espectros de fluorescencia del L-Anap en células completas, por epifluorescencia y en fragmentos o sábanas de membrana celular, adheridos al fondo de un vidrio, mediante una técnica conocida como “*Deroofing*” o “*Unroofing*”, después de un tratamiento con soluciones hipotónicas, las células se hinchan dejando débiles las membranas y al aplicar un pulso ultrasónico (Figura 9) se rompen, quedando fragmentos de membrana adheridos al vidrio en donde se realizan mediciones de fluorescencia (Gordon *et al.*, 2016; Heuser, 2000).

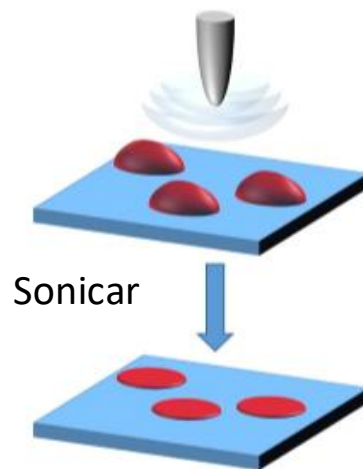


Figura 9. *Deroofing* o técnica de fragmentos de membrana adheridos a vidrio. Modificado de Gordón, 2016.

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de estructuras en alta resolución por análisis *in silico* es un primer acercamiento para entender cómo se encuentra la arquitectura de una proteína de membrana. Sin embargo, la información debe complementarse con estudios funcionales que permitan comprender de forma más amplia a los canales iónicos. Son estructuras altamente dinámicas que pueden fluctuar entre diferentes estados, donde movimientos sutiles podrían ser suficientes para diferenciar un estado de otro.

A la fecha se sabe poco acerca de los cambios conformacionales que ocurren en el canal TRPV1 ante sus distintos moduladores. Por ende, es importante entender cómo ocurre este proceso con el fin de dilucidar cómo funciona la proteína. Más aún, el uso de aminoácidos no canónicos y moléculas fluorescentes para definir cambios conformacionales finos es un acercamiento al campo de estudio de las relaciones entre la función y estructura de las proteínas en general, y ha empezado a implementarse en algunos laboratorios como una herramienta útil para el estudio de estas moléculas.

HIPÓTESIS

La activación del canal TRPV1, por capsaicina y temperatura, es un proceso alostérico de acoplamiento entre la detección del estímulo, por diversos módulos en la proteína, y la apertura del poro. La incorporación del aminoácido fluorescente no canónico, L-Anap, permitirá revelar cambios no caracterizados.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer la técnica de incorporación de L-Anap en sitios específicos de la estructura del canal TRPV1 para estudiar la activación alostérica por diferentes agonistas.

Objetivos particulares

- Construir un canal TRPV1 fusionado a una proteína fluorescente.
- Comprobar que la expresión del canal TRPV1 fusionado a una proteína fluorescente no interfiere con la actividad del canal.
- Diseñar mutantes del canal TRPV1 en sitios que probablemente exhiben cambios conformacionales durante su activación.
- Estandarizar metodologías para la comprobación y caracterización de la incorporación de L-Anap.
- Lograr la expresión de canales TRPV1 funcionales con aminoácidos no canónicos incorporados.
- Caracterizar la activación de mutantes que incorporan L-Anap en el canal TRPV1, empleando capsaicina y temperatura.

METODOLOGÍA

A) Biología molecular

I. Fusión de canal TRPV1 a la proteína fluorescente mCherry (TRPV1_Cherry)

Para el diseño de la secuencia de canal TRPV1 enlazado a una proteína fluorescente (mCherry), se empleó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando copias del ADN del canal TRPV1 con un enlazador de glicinas y serinas, 5'-GGSGGSGGS-3', en el extremo 3' sustituyendo el codón de paro. También se amplifican copias del ADN que codifica para la proteína fluorescente mCherry con el mismo segmento enlazador 5'-GGSGGSGGS-3' en el extremo 5'. Posteriormente se realizó una PCR de solapamiento para obtener la secuencia TRPV1-GGSGGSGGS-Cherry, como se muestra en la Figura 10. Este ADN fue introducido en un plásmido vector, pcDNA3. Se transformaron bacterias competentes *E. coli* cepa DH5 α para crecer cultivos que expresaron copias de dicho plásmido (Figura 11).

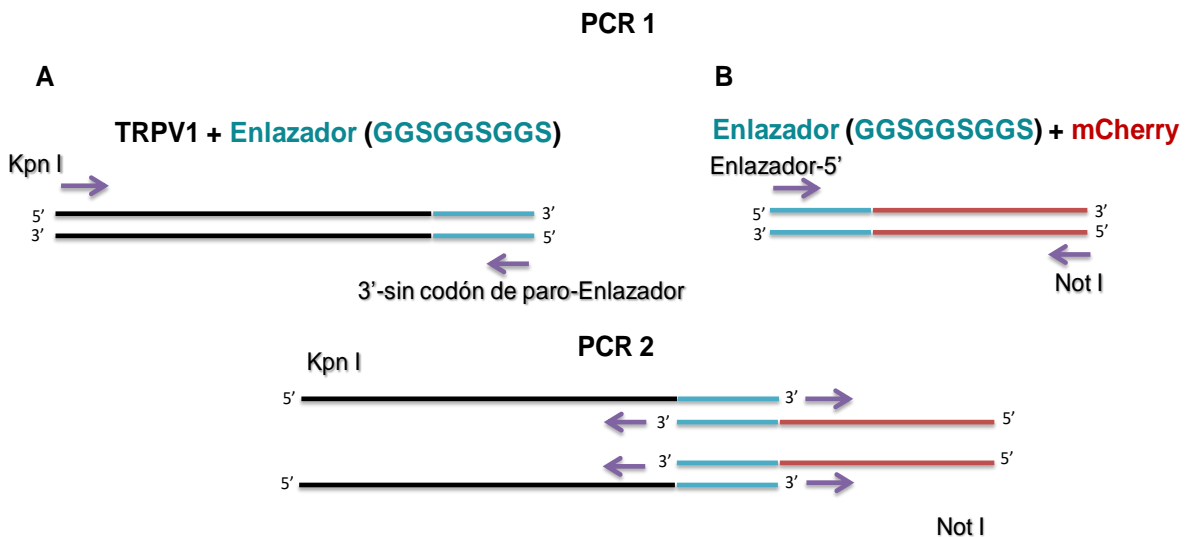


Figura 10. Técnica de solapamiento de PCR para generación de fusión de proteínas. En la PCR 1A se emplean los oligonucleótidos Kpn I dando inicio a la replicación en el extremo 5' de la secuencia del ADN que codifica para TRPV1 (línea negra) y el oligonucleótido 3'-sin codón de paro-Enlazador que se une a la secuencia 3' del enlazador adicionado (línea azul). En la PCR 1B se emplean los oligonucleótidos Enlazador-5' que se une al extremo 5' del enlazador adicionado (línea azul) y el oligonucleótido Not I que inicia la replicación en el extremo 3' de la proteína mCherry (línea roja). En la PCR 2 se emplean Kpn I y Not I para completar las secuencias.

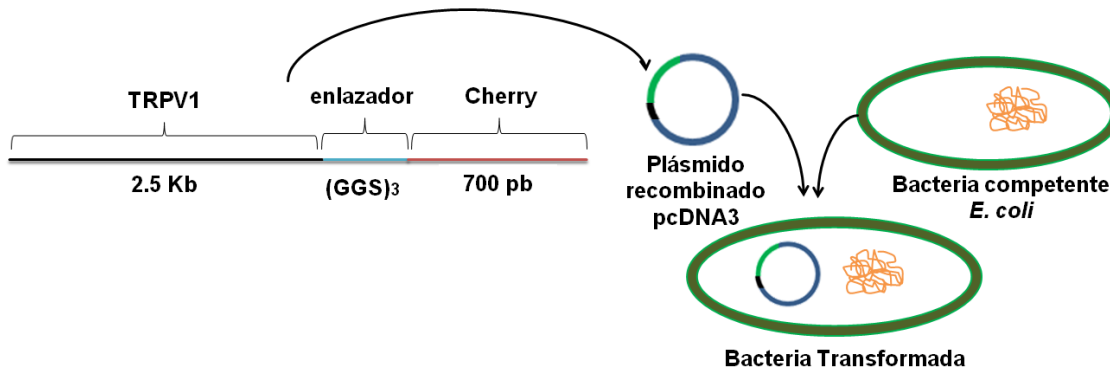


Figura 11. Transformación de bacterias. Se adiciona el ADN a un plásmido pcDNA3 que es introducido a bacterias competentes *E. coli* (DH5 α).

II. Generación de mutantes en fondo TRPV1_Cherry

Para el diseño de los oligonucleótidos se generó la secuencia directa para cada mutante de 39 nucleótidos, teniendo la mutación TAG en el centro; la secuencia complementaria se obtuvo con el programa Chromas Pro®.

Posteriormente, se empleó la técnica de amplificación de plásmido completo (Figura 12, A), utilizando una reacción con enzima polimerasa KOD Hot Start, enzima de corrección única y alta fidelidad que permite una amplificación de mayor longitud de lectura, que sustituye la secuencia con el codón ámbar en el molde de la construcción del canal TRPV1_Cherry. El protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue de 94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 68°C por 30 s, elongación a 72°C por 10 min, al finalizar un periodo de 72°C por 10 min, y de 4°C por tiempo indefinido.

Se utilizó una digestión enzimática con 9 μ L del amplificado y 1 μ L de enzima DPN1 (Figura 12, B), encargada de degradar la cadena molde por reconocimiento de secuencias metiladas, a 37°C por 4 horas. Con dicho amplificado tratado se transformaron bacterias competentes, *E. coli* cepa DH5 α , para generar copias del plásmido que tendrá la mutación ámbar en el sitio de interés (Figura 12, C) y finalmente se purificó para su utilización en la transfección de la línea de células embrionarias de riñón humano o HEK293 (American Type Culture Collection).

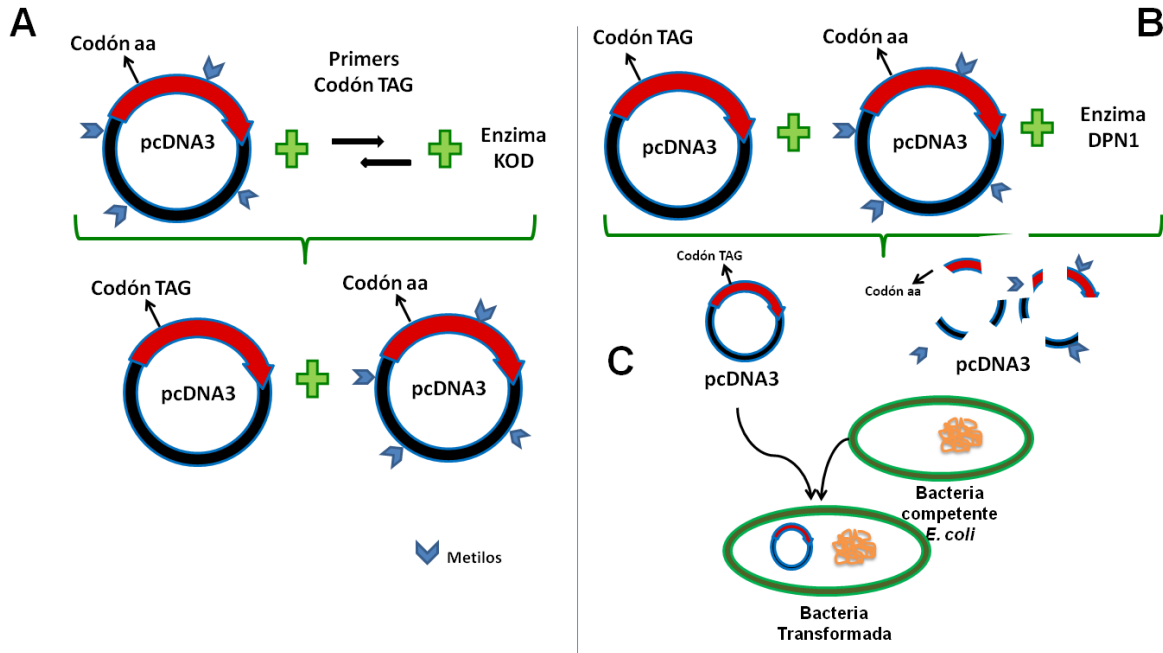


Figura 12. Generación de ADN de canales TRPV1_Cherry mutantes. A. Amplificación de plásmido completo, empleando oligonucleótidos con el codón TAG y una enzima de alta procesividad (KOD). B. Tratamiento con enzima DPN1 para eliminar al plásmido molde metilado. C. Transformación de bacterias competentes con el plásmido de interés.

B) Expresión de canales

I. Cultivo celular

Se empleó un sistema de expresión heteróloga con células de riñón de embrión humano (HEK293), normal y adherente (dependiendo el experimento a realizar), ya que esta línea celular presenta pocos canales iónicos endógenos. Las células HEK293 adherentes se emplearon en experimentos de imagenología para tener fotos de las señales fluorescentes ya que por sus propiedades éstas se extienden mejor en el fondo de las cajas.

El cultivo se realizó a una temperatura de 37°C con una atmosfera de humedad de 95% y CO₂ de 5%. Se utilizó el medio DMEM o Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®, Invitrogen) que contiene 25 mM de glucosa, 1 mM de piruvato sódico y 4 mM de L-glutamina, suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 3.7% de bicarbonato de sodio y 1% de penicilina/estreptomina para mantener a las células en cultivo.

II. Pase de células

El pase celular consistió en succionar el medio de cultivo DMEM de la caja principal de 100 mm x 20 mm (Corning Industries) y posteriormente agregar 1 mL de tripsina-EDTA (Gibco®, Invitrogen) para despegar a las células del fondo de la caja, pues dichas células se caracterizan por adherirse al sustrato. Una vez que se incubaron por 3 a 5 min con tripsina-EDTA, se les agregó 1 mL de medio DMEM para inactivar la tripsina, y se procedió a despegarlas con una micropipeta al cargar y descargar 1 mL de la solución hasta que se observaron pocos conglomerados celulares. Finalmente, se sembraron alrededor de 200 μ L de la suspensión celular en una caja de plástico nueva de 100 mm x 20 mm con 10 mL de medio de cultivo DMEM.

Para el registro electrofisiológico se emplearon cajas pequeñas de 35 mm x 10 mm (Corning Industries), se colocaron alrededor de 10 a 15 vidrios esterilizados de 5 x 5 mm y se sembraron de 50 a 100 μ L de la suspensión celular en 2 mL de medio según el porcentaje de confluencia de las células. Estas cajas de igual forma se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas.

III. Transfección

Se realizó la transfección usando un acarreador de plásmidos, jetPEI® (Polyplus-Transfection), forma complejos con el ADN en una solución de NaCl 150 mM (Polyplus-Transfection). Para esta reacción se mezclaron 3 μ g totales de ADN del plásmido en 100 μ L de NaCl 150 mM y 6 μ L del reactivo jetPEI® en 100 μ L de NaCl 150 mM, se añadió la mezcla del acarreador a la mezcla del ADN, se homogenizaron e incubaron por 30 minutos. Posteriormente se agregó el complejo acarreador-ADN al cultivo celular. En el caso del canal silvestre se emplearon 3 μ g de un plásmido pcDNA3 que contenía el canal TRPV1_Cherry silvestre. Para las mutantes se emplearon dos plásmidos, 2.25 μ g de un plásmido pcDNA3 que contenía al canal TRPV1_Cherry con la mutación ámbar y 0.75 μ g de un plásmido pcDNA3 que contenía 8 repeticiones en tándem del promotor H1 y el gen ARNt que reconocería al codón ámbar (Leu-ARNt^{CUA}) y al gen de la ARNt sintetasa específica (LeuRS) con su promotor no regulado de Citomegalovirus (CMV),

ambos obtenidos de *Escherichia coli*. 2 horas después de agregar los complejos se añadieron directamente 4 μ L del aminoácido no canónico (L-Anap, AsisChem Inc) [10 mM] al cultivo celular, permitiendo 48 horas de incubación para la expresión de los canales.

C) Electrofisiología

I. Soluciones de registro

Se emplearon diferentes soluciones para los experimentos a realizar:

Solución de registro para capsaicina en configuración inside out: 130 mM de NaCl, 3 mM de HEPES y 1 mM de EDTA, ajustado a un pH de 7.2 con NaOH. Pipeta con solución isométrica.

Solución de registro para calor en configuración inside out: 130 mM de NaCl, 10 mM de HEPES, 5 mM de EGTA y 5 mM de KCl, ajustado a un pH de 7.2 con NaOH. Pipeta con solución isométrica.

Solución de baño de registro para capsaicina en configuración whole cell: 130 mM de NaCl, 10 mM de HEPES y 0.5 mM de CaCl_2 , ajustado a un pH de 7.2, con NaOH. La solución de la pipeta fue la misma que para el registro en configuración *inside out*.

Todos los reactivos empleados para la preparación de soluciones son de la marca Sigma-Aldrich®.

II. Fijación de voltaje en microárea de membrana (*Patch Clamp*)

La actividad de los canales iónicos fue evaluada mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*Patch Clamp*), con la que se logra el registro de corrientes que fluyen a través del canal.

Para esta técnica se emplearon pipetas de borosilicato (Sutter Instruments) que fueron jaladas mediante un estirador (P-27 Sutter Instruments), con un filamento en forma de cubo. Posteriormente, estas pipetas fueron pulidas con calor, y su resistencia final fue aproximadamente de 3-6 M Ω para registros en configuración

inside out y de 2-3 M Ω para registros en configuración *whole cell*. Finalmente, las pipetas se llenaron con las soluciones de registro antes mencionadas para cada configuración y se empleó un micromanipulador (Sutter Instruments) para controlar los movimientos de la pipeta.

Para los registros de capsaicina y calor se empleó la configuración de parche escindido “*inside-out*” (Figura 13), en donde la cara intracelular del canal queda expuesta a las soluciones del baño. De igual forma, para el registro de las mutantes únicamente frente a capsaicina se empleó la configuración de registro en célula completa “*whole cell*” (Figura 13), donde la solución de la pipeta se intercambia con el interior celular por diálisis y se registra una mayor área de superficie, es decir, una mayor cantidad de canales iónicos.

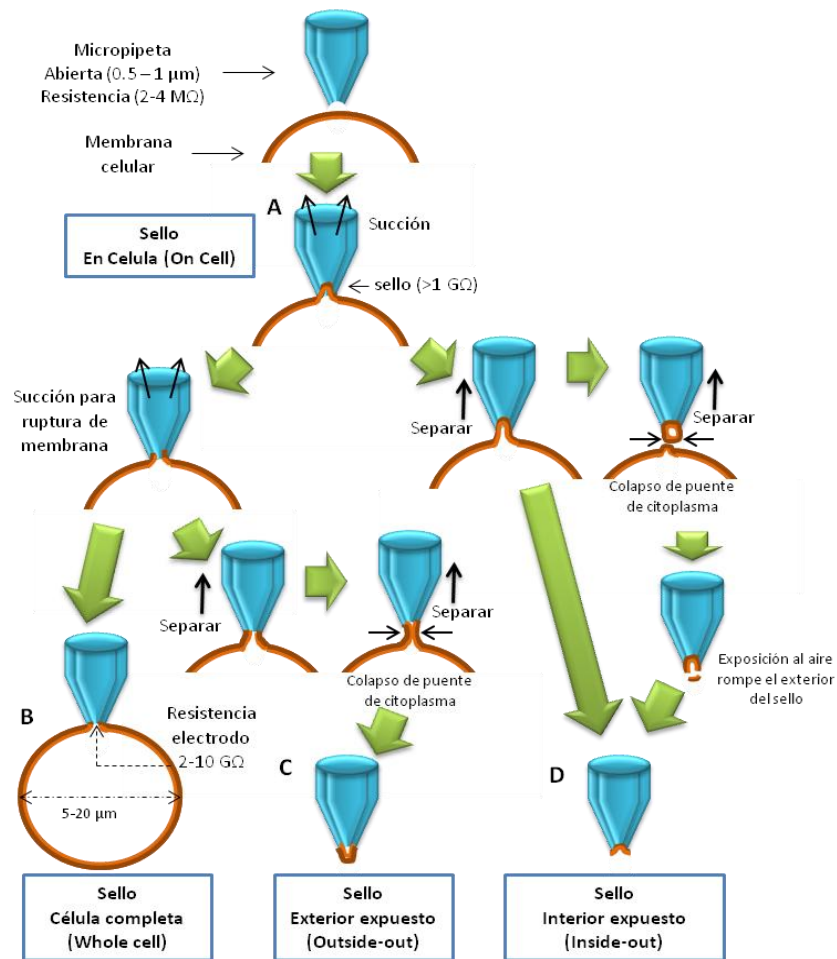


Figura 13. Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *Patch Clamp*. A. Configuración en célula (*on cell*). B. Configuración célula completa (*whole cell*). C. Configuración exterior expuesto (*outside out*). D. Configuración interior expuesto (*inside out*).

III. Activación por capsaicina

La capsaicina (Sigma-Aldrich) se empleó para preparar una solución madre a una concentración de 4 mM, disuelta en etanol absoluto. Dicha solución fue empleada para la preparación de las diluciones de la curva (10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 4 μ M y 10 μ M) disueltas en solución de registro.

Para los registros en “*inside out*” se realizaron curvas de respuesta ante distintas concentraciones de agonista y en algunos casos se registraron las corrientes con una concentración de capsaicina saturante (10 μ M). Los protocolos de voltaje empleados fueron pulsos de -120 y 120 mV con duración de 200 ms y para la obtención de curvas corriente-voltaje (IVs) se aplicaron pulsos cuadrados de -120 a 120 mV con intervalos de 10 mV, con duración de 200 ms, el voltaje de mantenimiento fue de 0 mV (Figura 14).

El protocolo de voltaje para registros de capsaicina en célula completa (Figura 14) fue de -120 a 120 mV con intervalos de 20 mV, con duración de 200 ms y voltaje de mantenimiento de 0 mV. En estos experimentos la concentración utilizada de capsaicina fue de 4 μ M. Para este análisis se normalizaron las corrientes con las capacitancias obtenidas de las células de acuerdo a su tamaño, obteniendo las densidades de corriente. La capacitancia (en picofaradios) se calculó a partir del valor mínimo de la integral del área bajo la curva del capacitor de un pulso de -20 mV entre dicho voltaje.

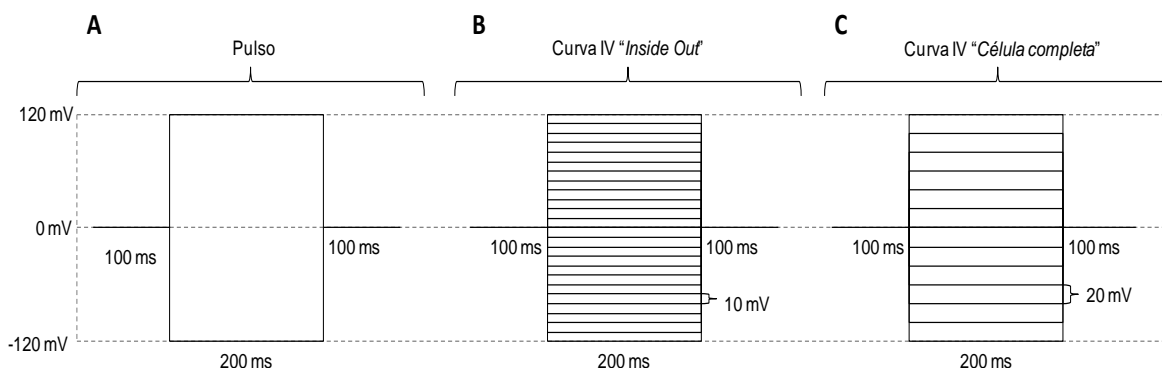


Figura 14. Protocolos de voltaje. A. Pulso de -120 y 120 mV, para registros *inside out*. B. Curva IV para registros *inside out*. C. Curva IV para registros en *célula completa*. mV: milivoltios, ms: milisegundos.

IV. Activación por temperatura

- **Microcalentador**

Se utilizó un equipo diseñado previamente en el laboratorio (Islas *et al.*, 2015) cuyo principio de funcionamiento es el calor producido al administrar una corriente eléctrica por un cable conductor (calentamiento resistivo). Este equipo consiste de un cable de cobre despojado del barniz que lo cubre haciendo pasar por él una corriente suministrada por una fuente de poder (Matrix model: MPS-3010L-1). Este alambre es colocado dentro de un capilar de borosilicato (similar al empleado para hacer las pipetas de registro) y es jalado con el estirador (Sutter Instruments) hasta que el cable queda adherido al vidrio. Después, es doblado en el centro con calor aplicado mediante un soplete, de tal manera que se le da la forma de horquilla (Figura 15).

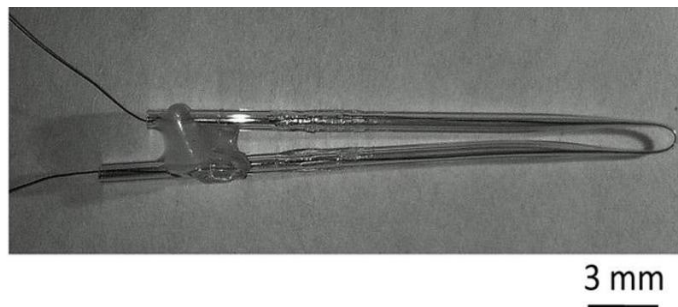


Figura 15. Microcalentador en forma de horquilla. Tomado de Sánchez-Moreno, 2018.

Posteriormente, se le agrega el pegamento epóxico (Henkel) para que los dos brazos del calentador queden unidos; se soldan los extremos de alambre a dos terminaciones en forma de banana para que el calentador pueda ser conectado a una fuente de poder Agilent E3631A, sin olvidar colocar los tubos térmicos que cubren los alambres expuestos del calentador.

Para emplear el microcalentador en el registro electrofisiológico, éste fue montado sobre un cilindro de acrílico, de tal forma que pudiera acomodarse de manera precisa en el ángulo necesario dentro de la solución del baño.

- **Calibración de temperatura**

La temperatura que alcanza el microcalentador varía en función del voltaje y corriente con que se programa la fuente de poder (Agilent E3631A), el voltaje que

se empleó fue siempre de 5 Volts (V) y con base en éste se regularon distintas corrientes. Para conocer dicha temperatura se efectuaron dos experimentos.

Primero, debido a que la resistencia de una pipeta abierta cambia según el cambio de temperatura (mientras la temperatura aumenta la resistencia disminuye), se describió una función previamente en el laboratorio (Sánchez-Moreno, 2018) que relaciona ambos parámetros (Figura 16). Para ello, se colocó una cámara de registro unida a un peltier, fue controlado por una fuente (PTC npi) que le indicaba la temperatura que debería alcanzar (en este caso 50°C). La temperatura fue medida mediante un termistor (Warner Instruments), y la corriente por el electrodo de registro cubierto con una pipeta abierta.

Entonces, con el amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments) en el programa PatchMaster (HEKA Elektronik) el canal uno registró la corriente y el dos la temperatura, se empleó un protocolo con tres pulsos cuadrados de 10 mV separados por uno de 0 mV y se obtuvieron las dos curvas: corriente y temperatura. Mediante la ley de Ohm se obtuvo el cambio en la resistencia a partir de la corriente y el voltaje ($V=RI$ luego entonces, $R=V/I$) y se relacionó con el cambio en la temperatura. Además, se realizó un ajuste a un polinomio de tres términos con ambos ejes, y se obtuvo una ecuación que relaciona la resistencia con la temperatura (Figura 16).

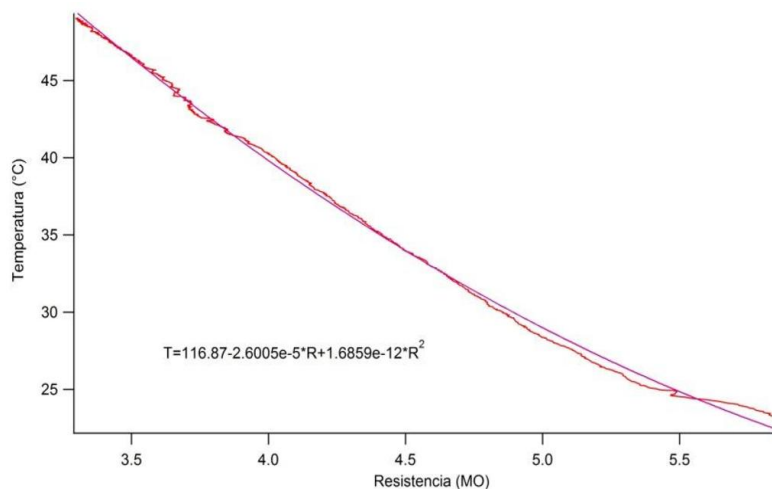


Figura 16. Relación entre la temperatura y la resistencia de una pipeta abierta (línea roja), así como el ajuste a un polinomio de tres términos que da lugar a una ecuación que relaciona ambos parámetros (línea morada). Tomado de Sánchez-Moreno, 2018.

El segundo experimento consistió en colocar una pipeta abierta a cierta distancia del microcalentador, administrarle cierta corriente al microcalentador programada en la fuente de poder para que la corriente que detecta el electrodo en la pipeta abierta fuera registrada con el programa PatchMaster, convertida a resistencia por la ley de Ohm y finalmente en temperatura con la ecuación obtenida en el ajuste (Figura 16). Es importante tomar en cuenta la temperatura del baño de registro al realizar el ajuste. Así, se pueden programar diversas corrientes en la fuente de poder y se calcula la temperatura a la que equivalen.

- **Estimulación por temperatura**

Antes de iniciar el registro electrofisiológico se calibró la temperatura que alcanza el microcalentador según la corriente que se programa. Una vez que se tiene el parche en configuración “*inside out*”, éste se colocó a una distancia aproximada de 27.58 μm del microcalentador (Figura 17) y se procedió a dar los pulsos de temperatura.

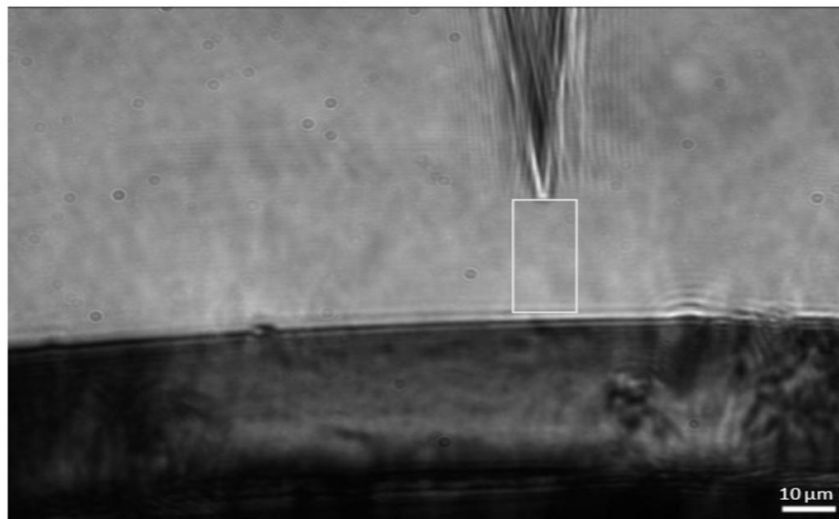


Figura 17. Imagen obtenida con la cámara Micromanager 1.3 (Scion Corporation), muestra al microcalentador (debajo) y la pipeta (arriba) separados a una distancia aproximada de 27.58 μm con el objetivo de 40X (recuadro blanco o ROI, realizado con el programa Image J). Tomada de Sánchez-Moreno, 2018.

Los pulsos de temperatura se aplicaron mediante un microcontrolador Arduino Uno, que controla la ejecución de la fuente de poder que administra corriente al microcalentador. Este microcontrolador tiene dos puntas, una que va a tierra y otra va a la punta digital. A su vez es controlado por el programa Spider (programado

con Python 2.7), se programó una rampa simétrica, en ésta la fuente de poder aplica 20 pulsos consecutivos progresivos desde 0 Amperes (A) hasta la corriente deseada espaciados por 0.09 s, esto es: 0, 0.5, 1 y así sucesivamente hasta la corriente que se requiera. La rampa simétrica dura 2 s de subida y 2 s de bajada (desde la corriente requerida hasta 0 A, mismo proceso).

En ese mismo tiempo, el programa Arduino Uno está acoplado con el programa PatchMaster, que representa la corriente registrada por el amplificador mediante un osciloscopio. En los pulsos de temperatura se utilizó un protocolo continuo que consiste en un pulso continuo de 60 mV (en la calibración es de 10 mV, por la saturación del amplificador) durante 11.3 s. Por el canal 1 se registró la corriente y por el dos se controló el acoplamiento entre los programas PatchMaster y Arduino Uno, de tal manera que en el segundo 2 del pulso continuo se encenderá la fuente de poder, se ejecutará la rampa simétrica, y se apagará en el segundo 6.

V. Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó mediante el programa Igor Pro 6.37 y Microsoft Office Excel 2007.

D) Incorporación de L-Anap

I. Microscopía confocal

Para la visualización de la expresión del canal TRPV1_cherry que incorporó L-Anap en el sitio de mutación TAG determinado, se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5, mediante un láser HeNe se excitaron la células a 543 nm y se registró la señal de emisión entre 580-610 nm para observar la fluorescencia de la proteína mCherry y con un láser de diodos se excitó a 405 nm y se registró emisión a 415-458 nm de la fluorescencia del L-Anap. Se obtuvieron imágenes a 20x y 63x, así como construcciones de células en rebanadas del eje Z (Figura 18), para identificar la distribución de la señal de fluorescencia en las células. Para este procedimiento se emplearon células HEK293 adherentes.

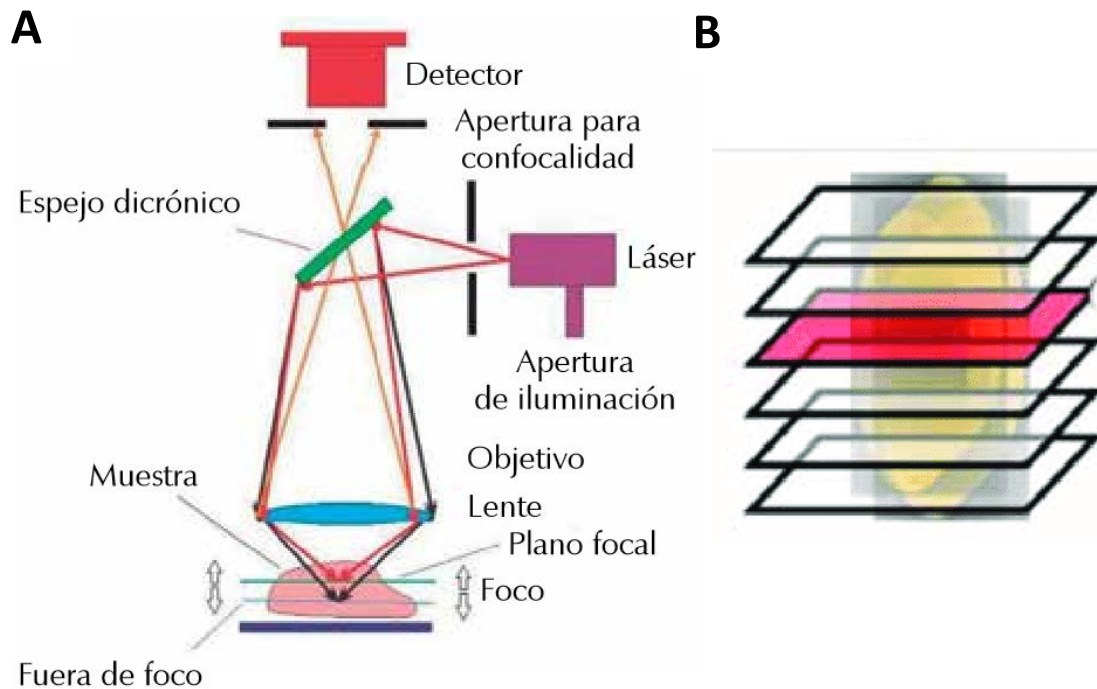


Figura 18. Microscopía confocal. A. Esquema de las partes de un microscopio confocal. B. Esquema de un corte en eje z, por donde pasa el láser. Modificado de López-Macay *et al.*, 2016.

II. Microscopía epifluorescencia

Se empleó un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon ECLIPSE TE2000-U, que emplea una excitación por una fuente de luz de un láser de 514 nm para observar la señal de fluorescencia de la proteína mCherry y un láser de estado sólido de 405 nm (Spectra-Physics) para observar la fluorescencia del L-Anap. Las imágenes fueron tomadas en regiones que presenten fluorescencia roja (mCherry) y azul (L-Anap) que presumiblemente corresponden a canales que han incorporado L-Anap. Se usó un objetivo 60x de inmersión en aceite. El microscopio de epifluorescencia (Figura 19) está acoplado a un espectrógrafo y una cámara CCD controlada por software, y mediante este proceso se obtuvieron los espectros característicos de fluorescencia de mCherry y L-Anap. Para este procedimiento se emplearon células HEK293 adherentes.

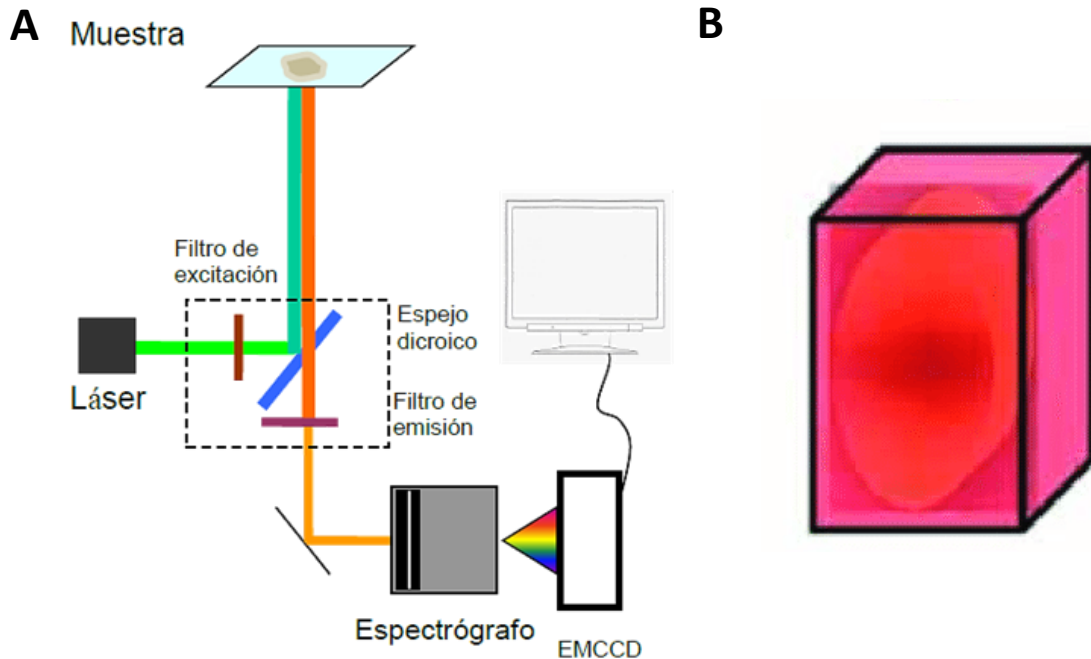


Figura 19. Microscopía epifluorescencia. A. Esquema de las partes de un microscopio de epifluorescencia. B. Esquema de la región que pasa el láser en la célula. Modificado de De-la-Rosa, 2015; López-Macay *et al.*, 2016.

III. Fotoblanqueo

Se empleó un control del fotoblanqueo para ambos fluoróforos realizando un análisis de la variación de intensidad de fluorescencia de espectros durante una exposición de 200 ms, 180 repeticiones en intervalos de 1 s, con una exposición acumulada de 36 s. Para este procedimiento se emplearon células HEK293 adherentes.

IV. Deroofing

Se realizó una metodología de membrana adherida a vidrio, mediante el lisado de células que expresaron las señales de fluorescencia de proteína mCherry y L-Anap, para corroborar que el canal rescatado se encontrara en la membrana celular. Para ello se utilizaron cajas de cultivo de 25 mm de fondo de vidrio (FluoroDish™, World Precision Instruments) tratadas con poli-D-Lisina 0.10 mg/mL por 15 min previo a la siembra del cultivo celular; dicho cultivo posterior a las 48 horas de transfección, fue tratado con lavados de soluciones hipotónicas: 1) primero 2 mL de solución acondicionadora (2 mM de CaCl₂, 1 mM MgCl₂ disueltos

en PBS ajustado a pH de 7.3) durante 5 min, 3 repeticiones; 2) seguido de 2 mL de poli-D-Lisina 0.1 mg/mL por 15 s, 3) posteriormente 2 mL de solución 2:1 de H₂O:Buffer Estabilizador, por 30 s, 3 repeticiones; 4) por último se agregarón 3 mL de Buffer Estabilizador (70 mM KCl, 30 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, ajustado a pH de 7.4 con KOH). Para el lisado de las células se aplicó un pulso ultrasónico de amplitud de 10% (Figura 20). Se utilizaron las mismas condiciones para la obtención de espectros de fluorescencia con el microscopio de epifluorescencia. Para este procedimiento se emplearon células HEK293 adherentes.

Todos los reactivos empleados para la preparación de soluciones son de la marca Sigma-Aldrich®.

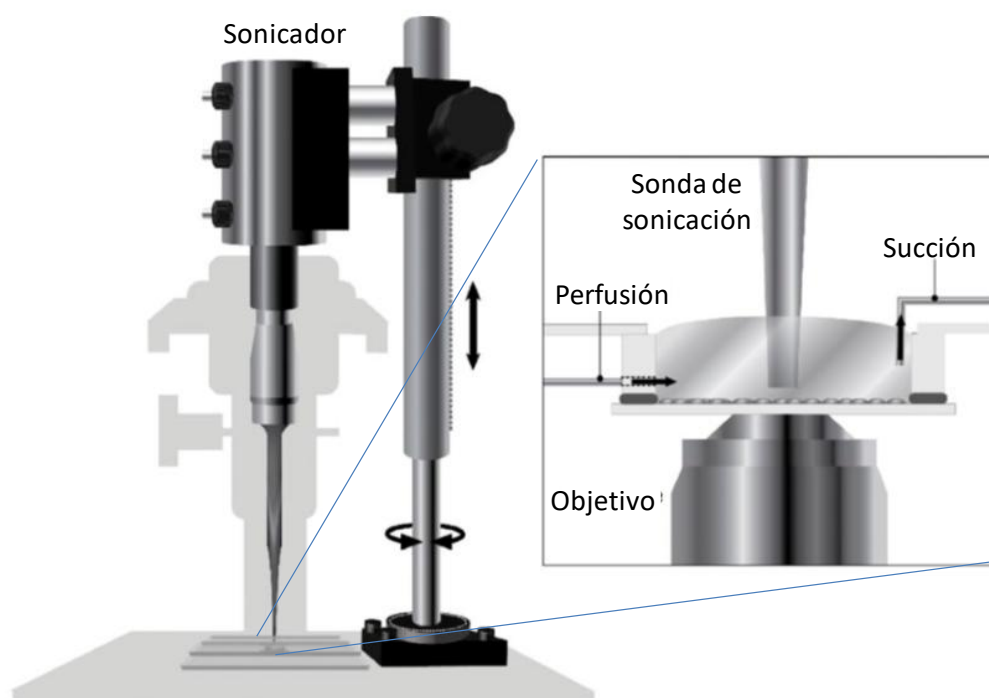


Figura 20. Esquema de sonicador empleado en la técnica de Deroofing. Modificada de Gordon *et al.*, 2016.

V. Cambio de la fluorescencia del L-Anap

Para comprobar el cambio de emisión de fluorescencia del L-Anap se expuso a diferentes soluciones (agua, metanol, isopropanol y 1-decanol). Este experimento se realizó utilizando un espectrofluorómetro de la marca ISS PC1 que emplea un láser de xenón, para excitar al L-Anap a 360 nm.

RESULTADOS

1. Funcionalidad del molde TRPV1_Cherry

La construcción del canal TRPV1 silvestre enlazado a una proteína fluorescente, en este caso mCherry, es requerida como molde fluorescente para evaluar la incorporación del aminoácido no canónico, L-Anap, ya que al incorporarlo se expresa la secuencia completa de ambas proteínas observando la señal fluorescente de mCherry.

Existen estudios previos que comprueban que la fusión de proteínas fluorescentes en los extremos amino y carboxilo de canales iónicos no afectan las funciones de éstos (De-la-Rosa, 2015). Sin embargo, es importante realizar las pruebas correspondientes para descartar que la presencia de la proteína mCherry en el extremo carboxilo de TRPV1 no interfiera con la función del canal y es un modelo adecuado para los siguientes experimentos con L-Anap.

La expresión de canales TRPV1 enlazados con mCherry en el extremo carboxilo (TRPV1_Cherry), resultó en la producción de canales funcionales activados por capsaicina de manera dosis dependiente (Figura 21, A). La concentración efectiva media (CE_{50}) para la fusión fue de 186 ± 19.5 nM, valor similar al del canal silvestre con un valor de 145 ± 14 nM. El número de Hill (n), que representa la unión de un ligando a su sitio de interacción, para el canal silvestre y la fusión también fueron similares con valores de 1.3 ± 0.14 y 1.2 ± 0.13 , respectivamente (Hill, 1910).

La activación del canal TRPV1_Cherry en respuesta a la temperatura fue similar al canal silvestre activándose desde temperaturas cercanas a los 40°C (Figura 21, B). Las corrientes iónicas de esta construcción muestran características similares a las del canal silvestre como lo es la dependencia del voltaje y la rectificación saliente en la relación corriente-voltaje (IV) (Figuras 21, C y D).

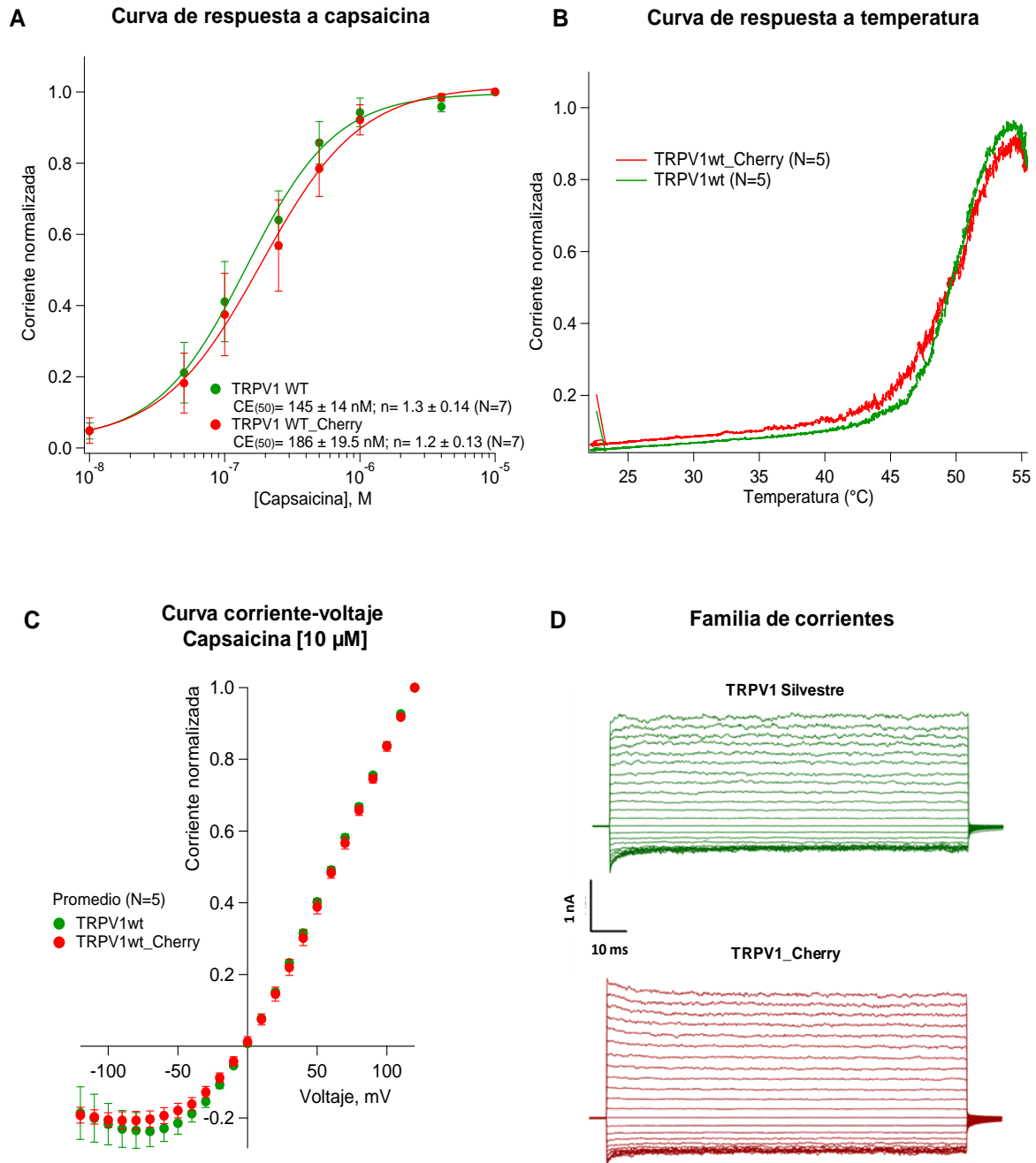


Figura 21. Comparación del canal TRPV1_Cherry (trazos rojos) con el canal TRPV1 silvestre (trazos verdes). A. Curva de respuesta a capsaicina, TRPV1 silvestre con $CE_{50} = 145 \pm 14$ nM, $n = 1.3 \pm 0.14$, promedio (N) de 7 sellos; TRPV1_Cherry con $CE_{50} = 186 \pm 19.5$ nM, $n = 1.2 \pm 0.13$, N=7 sellos. Los errores se expresan como error estándar de la media. B. Curva de respuesta a temperatura, N=5 sellos. C. Curva corriente-voltaje, activando con capsaicina 10μ M, N=5 sellos, aplicando un protocolo de voltaje de -120 a $+120$ mV con intervalos de 10 mV, duración de 200 ms y potencial de mantenimiento de 0 mV. D. Trazos significativo de una familia de corrientes de cada canal silvestre. M: molar, CE_{50} : concentración efectiva media, n: número de Hill, IV: corriente-voltaje, mV: milivolts, nA: nanoamperes, ms: milisegundos.

2. Selección de sitios a mutar

Los resultados anteriores demuestran que TRPV1_Cherry es una construcción funcional con actividad similar al canal TRPV1 silvestre, confirmando que puede ser un buen molde para la realización de mutaciones puntuales para la incorporación de L-Anap. Para ello se requiere de ciertas características: 1) un par aaRS ortogonales que reconozcan el aaNC y lo carguen al ARNt y 2) un codón ámbar (TAG) en la secuencia de ARNm de la proteína, en sitios donde se requiere incorporar.

Mediante un estudio previo en el laboratorio del Dr. León Islas (Ladrón-de-Guevara, *et al.*, en proceso), se realizó una dinámica molecular simulando con variaciones en la temperatura, de 290 a 350 K, se observaron cambios en la cinética de la estructura del canal TRPV1 empleando como modelo la estructura por criomicroscopía electrónica. Se identificaron cinco residuos que presentaron un valor de RMSF elevado (parámetro que evalúa la fluctuación cuadrática media, es decir, un mayor grado de movilidad a lo largo de la simulación). Como se muestra en la Figura 22, estos residuos se encuentran en diferentes dominios de la estructura del canal: cerca de las repeticiones de anquirina, en el dominio próximo a membrana (Pre S1) y en la caja TRP.

Para la generación de las mutantes se mutó el codón del sitio de interés que incorpora el aminoácido silvestre por un codón ámbar, mediante una PCR de plásmido completo. Una vez obtenidas las mutaciones, estas fueron expresadas en células HEK293 adherentes, empleando la cotransfección de dos plásmidos: uno que contiene la secuencia del canal TRPV1 con la mutación TAG fusionado a mCherry (TRPV1_XTAG_Cherry) y otro plásmido (pAnap) que contiene la aminoacil-ARNt sintetasa y el ARNt específicos para reconocer al L-Anap, obtenidos de *E. coli* (Lee *et al.*, 2009). El L-Anap se adicionó directamente a las 2 horas de la transfección en el medio de cultivo ya que, por sus características químicas, no requiere de algún acarreador al ser capaz de atravesar la membrana plasmática.

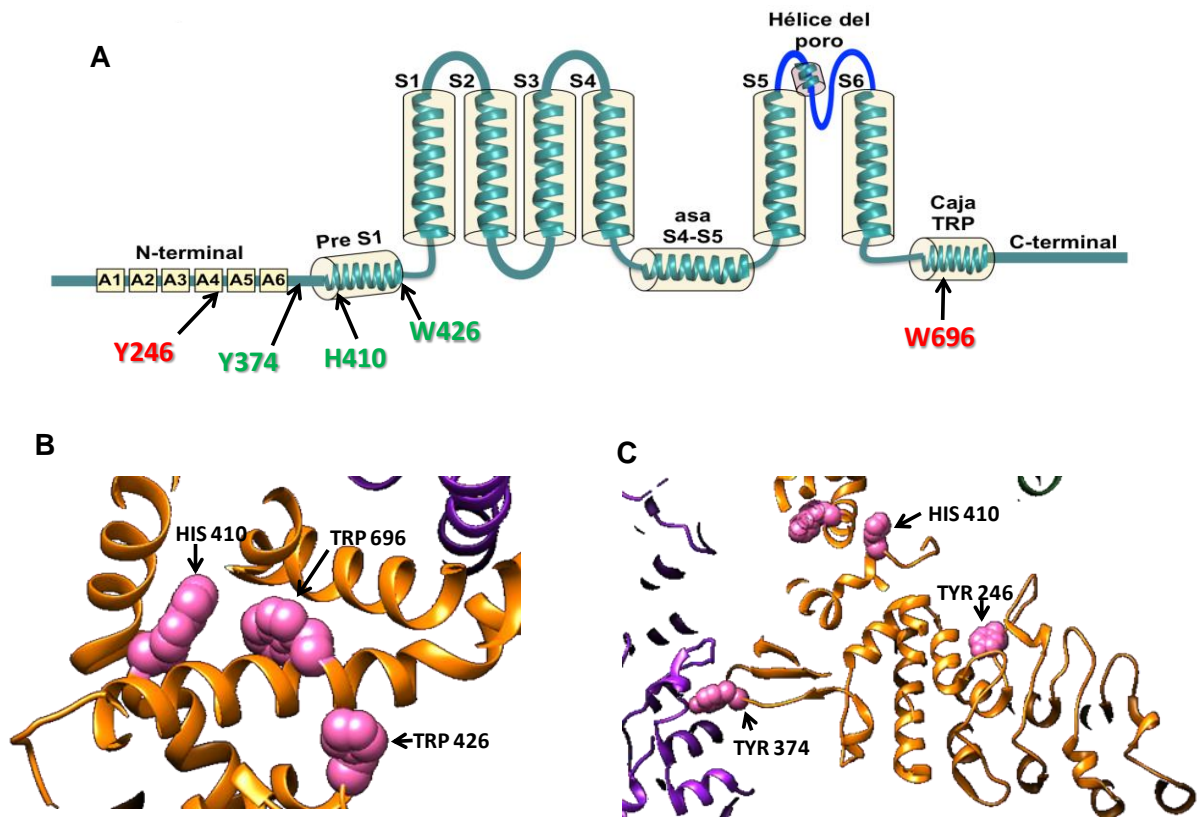


Figura 22. Mutaciones seleccionadas por un estudio de dinámica molecular donde se simula un cambio de temperaturas de 290 a 350 K en la estructura del canal TRPV1 obtenido por criomicroscopía electrónica. A. muestra los sitios seleccionados, en rojo se presentan los que no incorporaron L-Anap y no se expresaron (Y246TAG y W696TAG), en verde se presentan los que si incorporaron L-Anap y si se expresaron funcionalmente (Y374TAG, H410TAG, W426TAG). B. y C. modelos obtenidos por Chimera 1.11 para ejemplificar los residuos a mutar por L-Anap.

3. Comprobación de incorporación de L-Anap

3.1. Confocal

Con la finalidad de estandarizar la proporción de plásmidos necesarios para la incorporación del aminoácido no canónico, L-Anap, así como el mejor agente de transfección, se probaron 3 diferentes agentes acarreadores de plásmidos: Lipofectamina 3000, Mirus y JetPEI, se observaron notables diferencias en la eficiencia de transfección y en la toxicidad de estos hacia las células HEK293 (ver Anexo A, Figuras suplementarias 1 y 2). Los resultados de la Tabla 1, indican que jetPEI es el agente de transfección más viable para la incorporación de un aminoácido no canónico.

Tabla 1. Diferencias observadas entre agentes de transfección en la incorporación de aminoácidos no canónicos.

Características	Lipofectamina 3000	Mirus	JetPEI
Eficiencia de Transfección	Baja (<5%)	Media (~50%)	Alta (~70%)
Morfología celular	Dañadas	Normales	Normales
Cantidad de células muertas	Alta	Baja	Baja
Se emplearon las condiciones y soluciones recomendadas por la compañía productora de cada agente.			

Para estandarizar la metodología de la incorporación de L-Anap, se emplearon la proteína mCherry silvestre y una mutante ámbar en la posición 44 de la secuencia, y se evaluó que los reactivos, las concentraciones y las condiciones fueran las óptimas (ver Anexo B, Figura suplementaria 3).

Una vez obtenidas las condiciones, concentraciones y tiempos para incorporar el aaNC a una mutante ámbar, el siguiente paso consistió en identificar si los sitios seleccionados previamente (Figura 22) eran capaces de incorporar al L-Anap. Esto se realizó mediante la observación y localización de la señal fluorescente mediante microscopía confocal, que permite identificar de forma general la distribución de la fluorescencia en la célula, en cortes localizados en el eje Z (profundidad del campo). Esta metodología se empleó para los procedimientos de estandarización previos.

De las cinco mutantes seleccionadas, dos de ellas no incorporaron al L-Anap (Y246TAG y W696TAG, presentadas en rojo en la Figura 22) ya que no se observó señal de rescate del TRPV1_Cherry. Esto debido a que el codón ámbar sería reconocido por los factores de terminación de la traducción y la proteína quedaría incompleta y degradada (Wals y Ova, 2014). Las tres mutantes restantes: Y374TAG, H410TAG y W426TAG, si incorporaron al aminoácido L-Anap y completaron el proceso traducción hasta observar las señales fluorescentes de TRPV1_Cherry y L-Anap. Esto se observa en la Figura 23 en la

que se presentan un ejemplo característico de una mutante que no incorpora y uno que si incorpora al L-Anap, Y246TAG y Y374TAG respectivamente.

Cada una de las mutantes tuvo una eficiencia de incorporación distinta, siendo mejor en Y374Anap y menor en W426Anap, como se resume en la Tabla 2. Los resultados con los respectivos controles de cada mutante se pueden ver en el Anexo C, Figuras suplementarias 4-8.

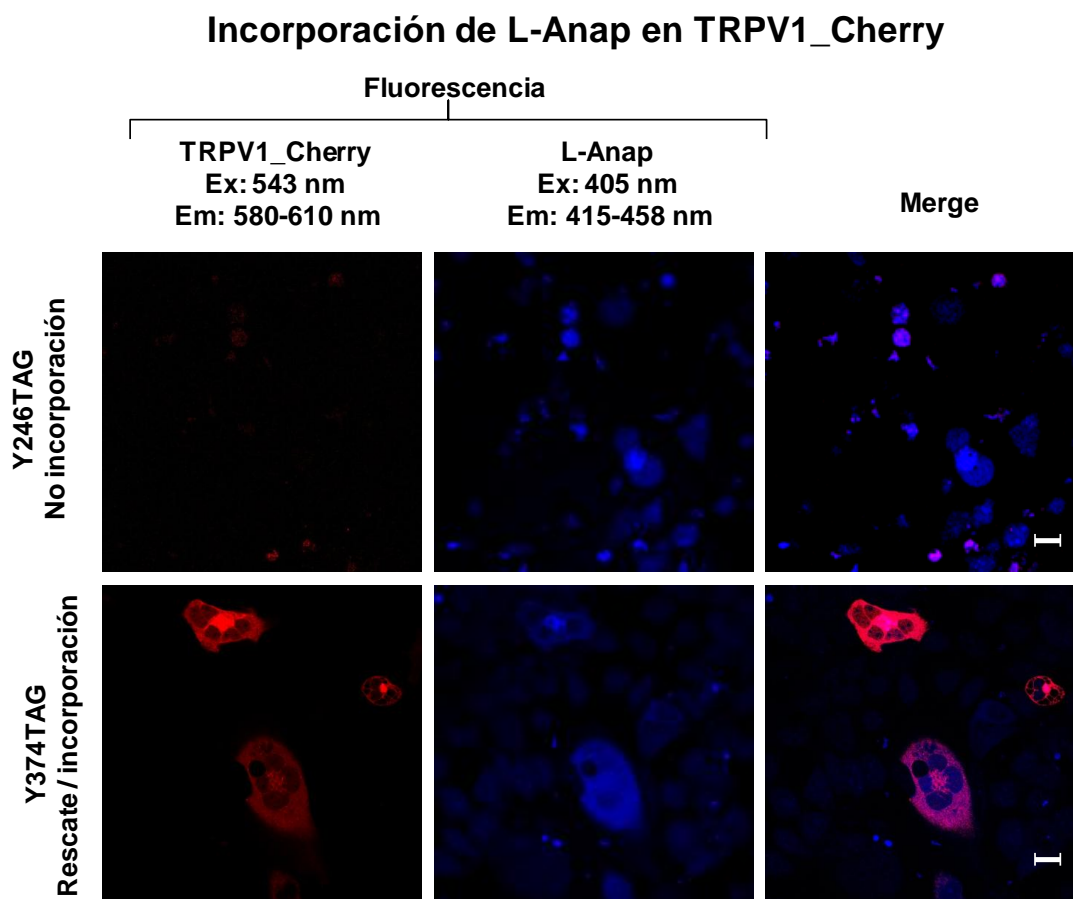


Figura 23. Rescate del canal TRPV1_Cherry por la incorporación de L-Anap. Fila superior Y246TAG no incorpora L-Anap, fila inferior Y374TAG si incorpora L-Anap y hay rescate de TRPV1_Cherry. Fluorescencia de TRPV1_Cherry en rojo, fluorescencia de L-Anap en azul, colocalización en rosa. Imágenes obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x. La barra al final de la serie es equivalente a 20 μ m. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

Tabla 2. Rescate del canal TRPV1_Cherry por incorporación de L-Anap en las mutantes de la primera y segunda generación.

		Dominio	Fluorescencia		Eficiencia de incorporación
			TRPV1_Cherry	L-Anap	
MUTACIONES	Y246	Anquirinas	No	Si	0%
	Y374	Posterior a Anquirinas	Si	Si	~15%
	H410	Inicio Pre-S1	Si	Si	~15%
	W426	Final Pre-S1	Si	Si	~10%
	W696	Caja TRP	No	Si	0%

3.2. Epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia, a diferencia de la confocal, permite una toma completa del campo en el eje z, siendo esta una forma menos detallada de identificar la localización de la fluorescencia pero que permite obtener los espectros de emisión de cada fluoróforo e identificar si corresponden a los reportados en la literatura. Para el caso de L-Anap, la λ máx de emisión debe de ser de aproximadamente 490 nm, dependiendo del solvente en el que se encuentra (AsisChem Inc. Catalog: ASIS-0146) y para mCherry, la λ máx de emisión debe de ser de 610 nm (Shaner *et al.*, 2004).

Una vez corroborada la incorporación de L-Anap en las tres mutantes que presentaron ambas señales fluorescentes en confocal (Tabla 2), se comprobó por la epifluorescencia que los espectros correspondían a éstas. Así se obtuvo que las tres mutantes tuvieron las señales características de L-Anap con una λ máx de emisión a 490 nm y mCherry unido a TRPV1 con una λ máx de emisión a 610 nm, como lo indican las fichas técnicas de cada fluoróforo. Las imágenes tomadas y los espectros obtenidos para cada una de las mutantes y el control de TRPV1_Cherry silvestre se presentan en la Figura 24.

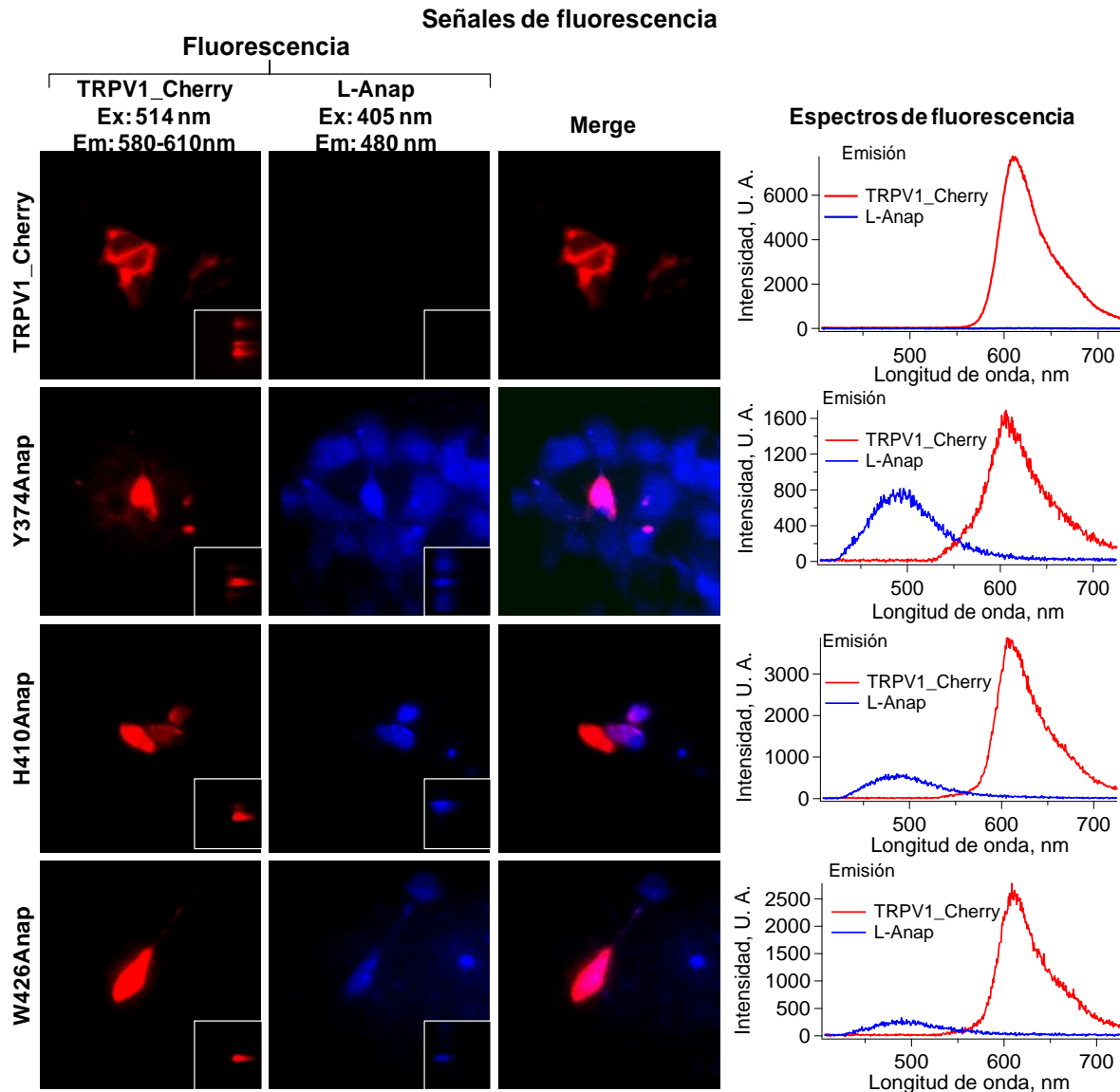


Figura 24. Espectros de fluorescencia del canal TRPV1_Cherry rescatado con L-Anap en las mutaciones Y374Anap, H410Anap y W426Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio de epifluorescencia TE2000-U eclipse de Nikon®, objetivo 60x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia L-Anap (azul), colocalización de fluorescencias (rosa) y los espectros obtenidos. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros, U. A.: unidades arbitrarias.

3.2.1. Fotoblanqueo de fluoróforos

Como parte de la estandarización y obtención de controles de fluorescencia para las pruebas que se realizaron en este proyecto y en otros relacionados, se hizo la evaluación de la estabilidad de los fluoróforos empleados identificando el tiempo mínimo que pueden exponerse al láser, por el fotoblanqueamiento que éste les

podiera generar. El fotoblanqueo es un apagamiento o disminución de la fluorescencia, por lo que es importante conocer qué tan estable es una proteína o compuesto fluorescente.

Para este experimento se realizó una medición de la fluorescencia con una exposición de 200 ms en intervalos de 1 s, obteniendo el fotoblanqueo en un tiempo acumulado de 36 s. Para ambos fluoróforos: mCherry fusionado a TRPV1 y L-Anap, se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia de máximo 0.5% que no es un valor representativo para estudios de fluorescencia.

En la Figura 25 se presentan las gráficas de fotoblanqueamiento obtenidas de un promedio de 10 experimentos, donde se observa que los errores estándar no varían la intensidad de fluorescencia más de 0.5% del máximo y se mantienen estables a lo largo del experimento sin fluctuaciones bruscas en la intensidad. Así mismo, se obtuvo un espectro característico de las longitudes de onda máxima de emisión para cada uno de estos fluoróforos, similares a los observados en los experimentos de epifluorescencia presentados anteriormente para cada una de las mutantes. Sin embargo, en este experimento el espectro de L-Anap corresponde al L-Anap libre dentro de la célula, por ello la intensidad alcanza valores de 1000 unidades arbitrarias (U.A.), en intensidad de fluorescencia. Para el caso de TRPV1_Cherry si corresponde a los canales que se encuentran expresados en la membrana plasmática y de igual forma son cuentas superiores a las 6,000 U.A. en intensidad de fluorescencia al tratarse del canal silvestre fusionado a una proteína fluorescente.

Estos resultados son la base de futuros experimentos de fluorescencia en los que se requiera evaluar la disminución o cambios en la intensidad de estos fluoróforos mediante la utilización de apagadores o blanqueadores que absorben la energía de emisión, disminuyendo la intensidad de fluorescencia de acuerdo a la distancia y accesibilidad que haya entre el L-Anap y el apagador.

Fotoblanqueo

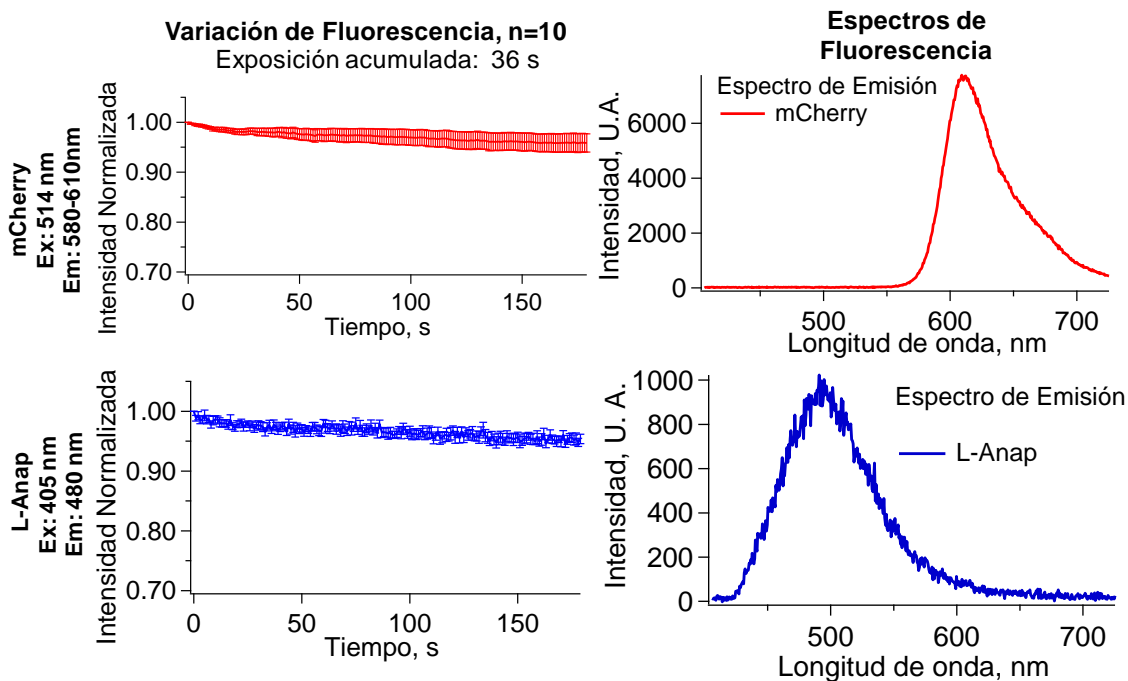


Figura 25. Fotoblanqueo de fluoróforos. Canal TRPV1_Cherry (trazos rojos) y L-Anap (trazos azules). En el lado izquierdo se presentan las variaciones de fluorescencia de un promedio de 10 experimentos, tomando 180 mediciones de 200 ms, en intervalos de 1 s, con exposición acumulada de 36 s. En el lado derecho el espectro de fluorescencia, con su máximo de emisión 610 nm, para TRPV1_Cherry y 490 nm para L-Anap. Datos obtenidos con un microscopio de epifluorescencia TE2000-U eclipse de Nikon®, objetivo 60x. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, U. A.: unidades arbitrarias, nm: nanómetros.

3.2.2. Cambio de fluorescencia de L-Anap

Existen reportes de cambios de emisión de fluorescencia del L-Anap de acuerdo al ambiente polar o solvatación al que se expone (Chatterjee *et al.*, 2013), donde se relaciona el corrimiento de la λ máx de emisión hasta 460 nm sí el L-Anap está expuesto a un ambiente apolar y a 490 nm sí se encuentra expuesto a un ambiente polar.

Para caracterizar a fondo esta propiedad del aminoácido no canónico fluorescente, se realizaron mediciones de fluorescencia en soluciones de L-Anap, empleando diferentes disolventes con polaridad variable como: agua, metanol, isopropanol y 1-decanol. Como se observa en la Figura 26 el compuesto más polar, agua, tiene una longitud máxima de emisión de 485 nm, seguido del metanol con λ max de emisión de 482 nm. Para el isopropanol y el 1-decanol, compuestos menos

polares, las λ s máximas de emisión se desplazaron a 462 y 458 nm, respectivamente.

En intensidad de fluorescencia no hubo una tendencia marcada entre los diferentes solventes utilizados, solo se observa una diferencia en intensidad al emplear agua como solvente. Sin embargo, en las Figuras suplementarias 9-11 del Anexo D se puede observar la variación de la intensidad para cada solvente en diferentes proporciones con agua.

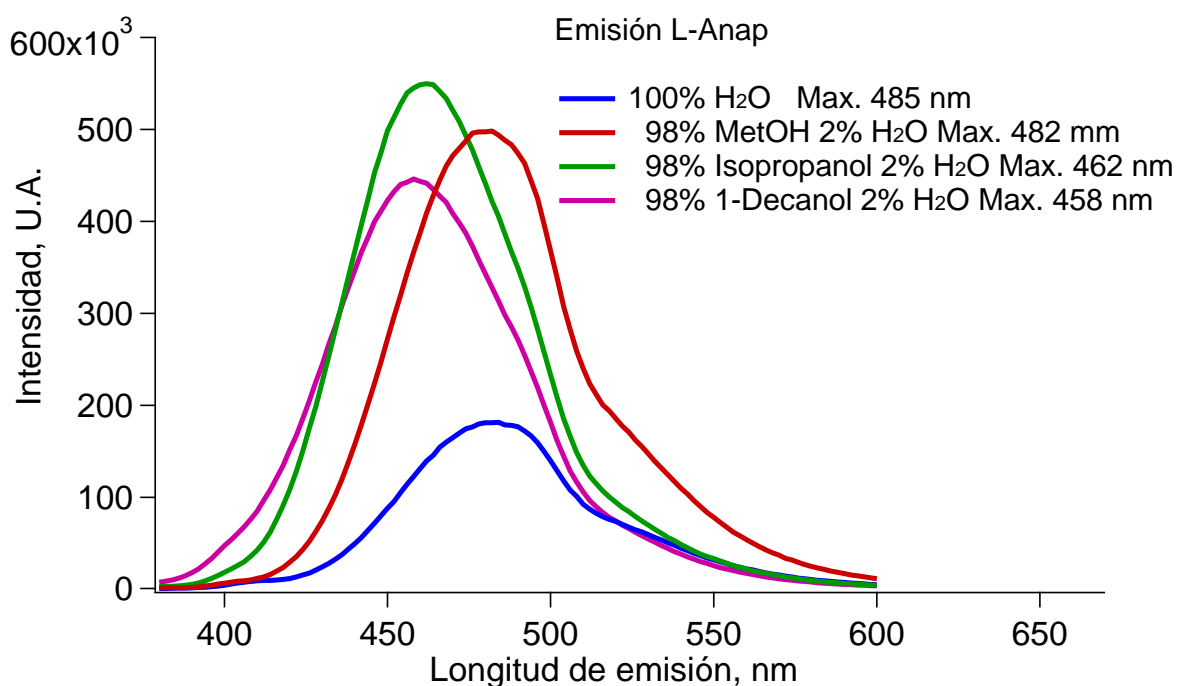


Figura 26. Cambios de fluorescencia de L-Anap al exponerse a solventes de diferente polaridad. Se emplearon solventes como: agua (trazo azul), metanol (trazo roja), isopropanol (trazo verde) y 1-decanol (trazo rosa). U.A.: unidades arbitrarias, nm: nanómetros.

3.3. Fragmentos de membrana

De los resultados de epifluorescencia, se concluyó que las señales de fluorescencia corresponden al rescate de TRPV1_Cherry por la incorporación de L-Anap. Sin embargo, una forma de confirmar que dicha señal fluorescente corresponde a la de un canal que es expresado en la membrana plasmática de las células, es mediante una técnica que ha sido implementada en los últimos años llamada *Deroofing* o fragmentos de membrana adheridos al vidrio. Estos fragmentos son obtenidos por un proceso de hinchar la célula con intercambios de

soluciones hipotónicas y posteriormente el lisado de las mismas, por la aplicación de un pulso ultrasónico (Heuser, 2000).

Para el caso de las tres mutantes que incorporan L-Anap, se identificaron ambas señales fluorescentes de TRPV1_Cherry y L-Anap en las longitudes de emisión correspondientes, en los fragmentos de membrana. Estas señales indican que los canales se expresan en la membrana plasmática. Las imágenes y los espectros de TRPV1_Cherry y las tres mutantes se observan en la Figura 27.

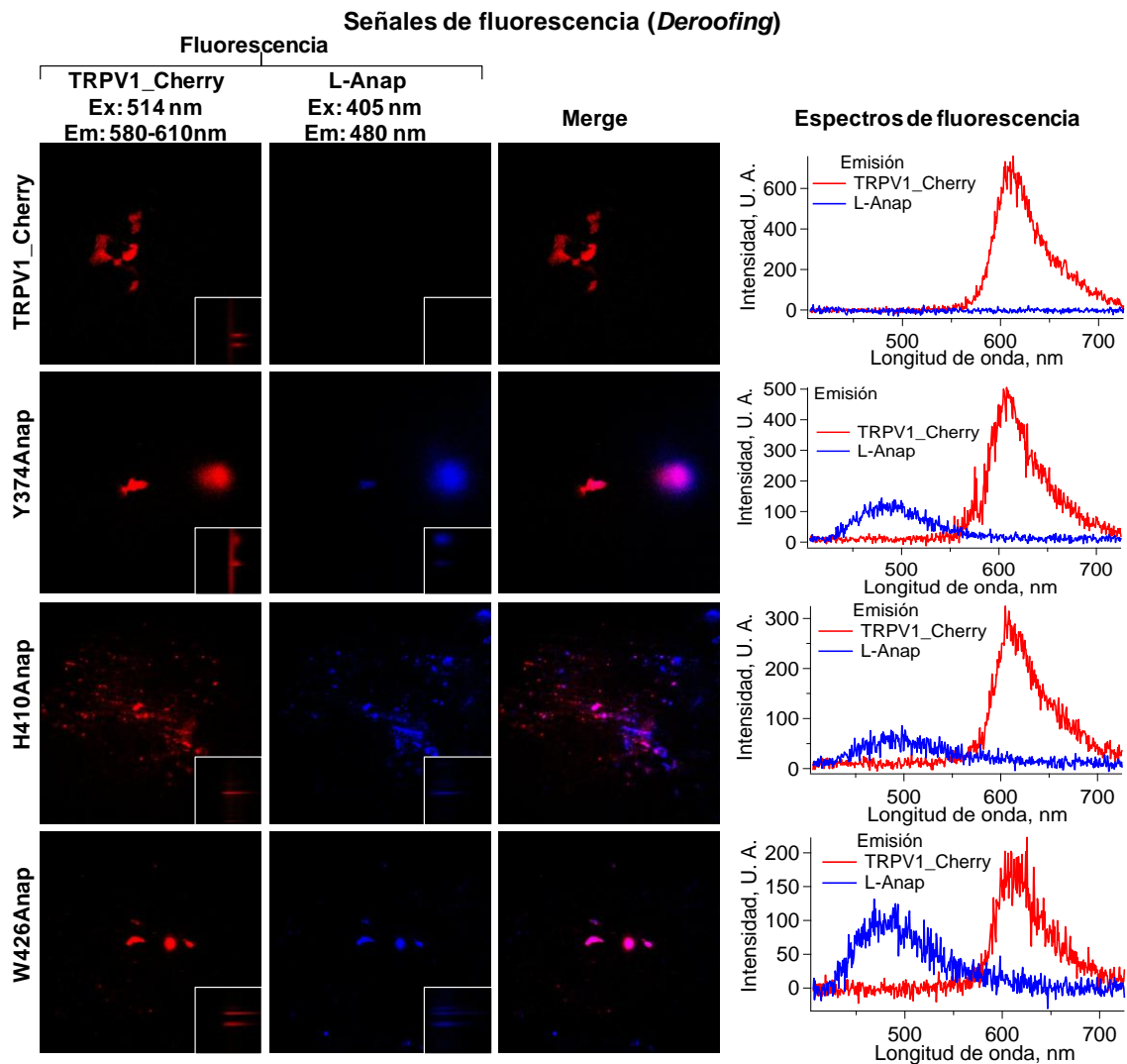


Figura 27. Espectros de fluorescencia del canal TRPV1_Cherry rescatado con L-Anap en las mutaciones Y374Anap, H410Anap y W426Anap, en fragmentos de membrana. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio de epifluorescencia TE2000-U eclipse de Nikon®, objetivo 60x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia L-Anap (azul), colocalización de fluorescencias (rosa) y los espectros obtenidos. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

En la Tabla 3 se resumen las longitudes de onda identificadas para ambos fluoróforos, en cada una de las mutantes que incorporaron de manera exitosa el aminoácido no canónico, en los estudios anteriores.

Tabla 3. Espectros del canal TRPV1_Cherry por incorporación de L-Anap.

	Mutaciones	Dominio	Fluorescencia máxima	
			TRPV1_Cherry	L-Anap
	Y374	Posterior a Anquirinas	610 nm	490 nm
	H410	Inicio Pre-S1	610 nm	490 nm
	W426	Final Pre-S1	610 nm	490 nm

4. Funcionalidad de las mutantes

4.1. Activación con capsaicina

Una vez confirmada la incorporación del aminoácido no canónico, L-Anap, en la secuencia de aminoácidos de la proteína TRPV1_Cherry rescatada, el siguiente paso fue el de evaluar la funcionalidad de los canales mutantes ante su activación por agonistas del canal y poder compararlos con el canal silvestre.

Los registros electrofisiológicos, mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *Patch-Clamp*, son la forma adecuada para evaluar las corrientes por activación con agonistas. Cómo se observó en la Tabla 2, las mutantes incorporan al L-Anap de un ~10 a 15%, siendo la W426Anap la de menor eficiencia y Y374Anap y H410Anap las de mejor eficiencia.

Al registrar la mutante Y374Anap en la configuración de parche escindido *inside-out*, se observaron corrientes muy pequeñas de ~60 pA, utilizando una concentración saturante de 4 μ M de capsaicina (Figura 28). Al ser muy pequeñas estas corrientes se decidió realizar un registro de las corrientes en la configuración de célula completa (*whole cell*).

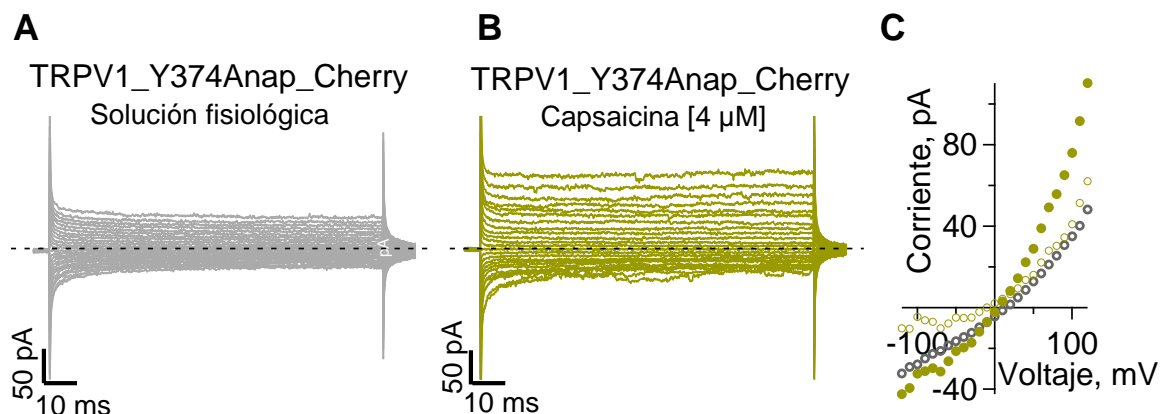


Figura 28. Registro característico de corrientes de TRPV1_Y374Anap_Cherry en configuración *inside-out* (N=7). A. Corriente característica en solución fisiológica. B. Corriente característica a 4 μM de capsaicina. C. Curva corriente-voltaje donde se observa, en círculos color dorado rellenos, la corriente con capsaicina 4 μM , con círculos dorados vacíos la corriente neta por capsaicina 4 μM y en círculos grises vacíos las corrientes en solución fisiológica, aplicando un protocolo de voltaje de -120 a +120 mV con intervalos de 10 mV con duración de 200 ms y un potencial de mantenimiento de 0 mV. pA: picoamperios, μM : micromolar, mV: milivoltios, ms: milisegundos.

Para el registro en configuración de célula completa, es necesario hacer una normalización en función a la corriente (pA) dividida entre la capacidad eléctrica (pF) para obtener una densidad de corriente expresada en pA/pF.

En la Figura 29 se presentan los controles de registro de células HEK293 sin transfectar y células HEK293 transfectadas con el canal TRPV1_Cherry silvestre, ambos activados con capsaicina en una concentración saturante de 4 μM . Estos resultados comprueban que en estas células no existen canales endógenos que respondan a capsaicina. En dicha figura se observa el comportamiento de corriente rectificante saliente propio del canal TRPV1_Cherry ya observado cómo se muestra en la Figura 21C.

Las mutantes presentaron activación con capsaicina 4 μM (Figura 30). Sin embargo, la mutante Y374Anap presentó una activación a voltajes hiperpolarizantes (negativos). Este fenómeno no se observó en H410Anap y W426Anap, esta última se comportó similar en todos los sellos obtenidos.

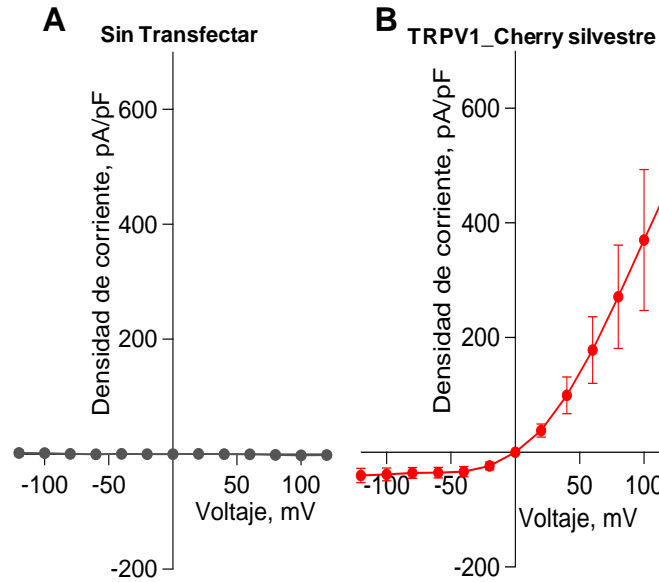


Figura 29. Curvas de densidad de corriente contra voltaje. A. Curva de células HEK293 sin transfectar (trazo gris), de un promedio (N) de 8 sellos. B. Curva del canal TRPV1_Cherry silvestre (trazo rojo), N=8 sellos. Los experimentos se realizaron en la configuración de célula completa aplicando cambios de voltaje de -120 a +120 mV, con intervalos de 20 mV, duración de 200 ms y potencial de mantenimiento de 0 mV. Se empleó capsaicina 4 μ M como agonista. pA: picoamperes, pF: picofaradios, mV: milivoltios.

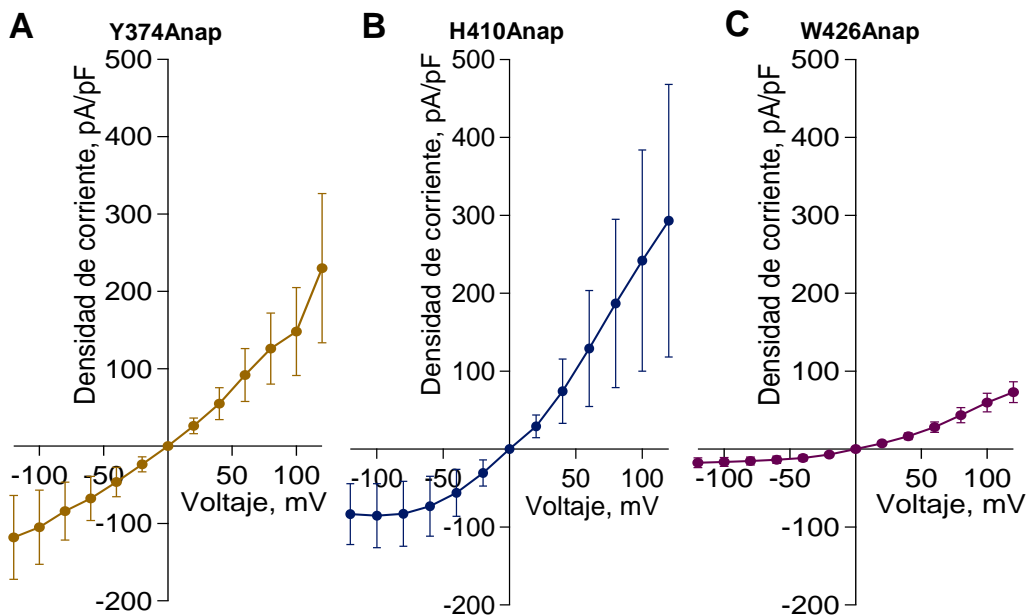


Figura 30. Curvas de densidad de corriente contra voltaje de mutantes. A. Curva de la mutante Y374Anap del canal TRPV1_Cherry (trazo amarillo), N=8 sellos. B. Curva de la mutante H410Anap del canal TRPV1_Cherry (trazo azul), N=8 sellos. C. Curva de la mutante W426Anap el canal TRPV1_Cherry (trazo morado), N=8 sellos. Los experimentos se realizaron en la configuración de célula completa aplicando cambios de voltaje de -120 a +120 mV, con intervalos de 20 mV, duración de 200 ms y potencial de mantenimiento de 0 mV. Se empleó capsaicina 4 μ M como agonista. pA: picoamperes, pF: picofaradios, mV: milivoltios.

4.2. Activación por temperatura

La caracterización de la función de los canales mutantes, con L-Anap incorporado, por temperatura se realizó mediante un sistema diseñado por el Dr. León Islas en 2015, consiste en un microcalentador (Figura 15), que mediante un sistema de calentamiento resistivo puede aplicar cierta energía programada en un pulso de 4 segundos, alcanzando el máximo de temperatura a los 2 segundos y posteriormente enfriarse por 2 segundos. Este procedimiento requiere que la microárea de membrana se aproxime a una distancia de aproximadamente 27 μm del calentador, como se muestra en la Figura 17. Para este procedimiento debe realizarse una calibración de la temperatura alcanzada con el valor de pulso de corriente aplicada al sistema, con la finalidad de determinar la temperatura a la que se quiere trabajar (Sánchez-Moreno, 2018).

Con un antecedente de los experimentos por activación con capsaicina, se decidió emplear la configuración de célula completa para caracterizar la activación por temperatura ($\sim 49^\circ\text{C}$), observando en la Figura 31A que en el canal silvestre TRPV1_Cherry se presenta el fenómeno de inactivación por temperatura, descrito por Sánchez-Moreno *et al.*, en 2018. Este fenómeno se observa al aplicar rampas consecutivas de temperatura que resultan en una disminución en la corriente del canal. Por otra parte, para la mutante TRPV1_Y374Anap_Cherry se observó (Figura 31C) un fenómeno diferente, ya que al aplicar una segunda rampa de temperatura aumentan las corrientes que pasan por el canal, es decir, se presenta un fenómeno de potenciación.

El registro en célula completa en esta metodología se dificulta ya que el tratar a las células con tripsina para despegarlas del vidrio, sellarlas y aproximarlas al calentador provoca un daño en la membrana. De igual forma, la temperatura por si misma debilita la membrana evitando que los sellos puedan tolerar más de 2 o 3 rampas de temperatura. Por ello y por la cantidad de corrientes observadas se decidió realizar los registros en configuración *inside-out* para caracterizar de forma más sencilla el fenómeno de potenciación observado en las mutantes que incorporan L-Anap.

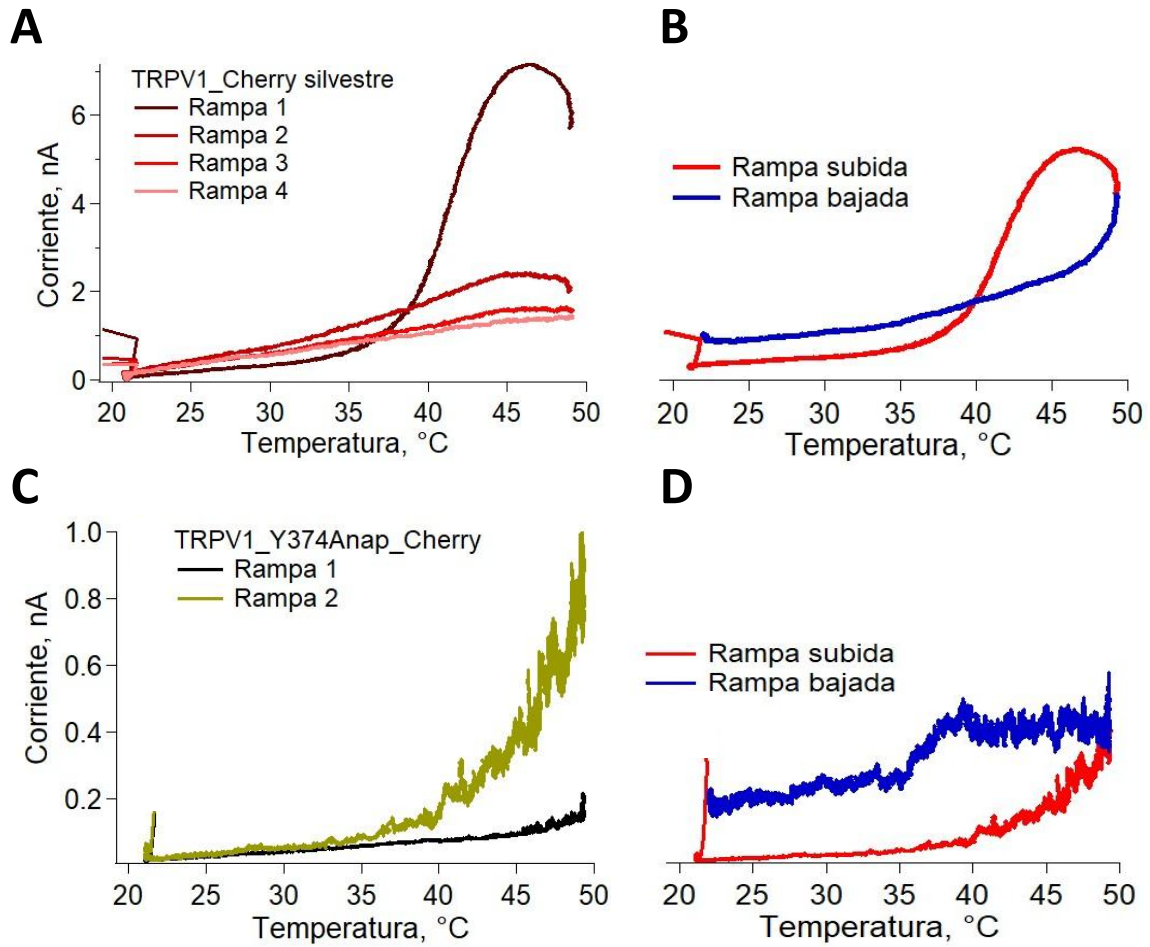


Figura 31. Activación por temperatura en configuración de célula completa. A. Rampas de activación de TRPV1_Cherry silvestre donde se observa el fenómeno de inactivación. B. Rampas de subida y bajada para el canal silvestre. C. Rampas de activación de TRPV1_Y374Anap_Cherry donde se observa el fenómeno de potenciación. D. Rampas de subida y bajada para el canal mutado. Temperatura de 49°C. nA: nanoamperios.

En las tres mutantes (Y374Anap, H410Anap y W426Anap) se observó el fenómeno de potenciación, como se ve en la Figura 32, obteniendo corrientes que alcanzan más de 1 nA. Para estos experimentos se emplearon temperaturas de 47 a 49°C, y se determinó que en el primer pulso de temperatura no hay respuestas del canal y que a partir de la segunda rampa se observa un aumento gradual de la corriente hasta la última rampa aplicada.

En la configuración *inside-out* los sellos toleraron de 4 a 7 rampas de temperatura. Las rampas se realizaron en intervalos de tiempo de 30 segundos.

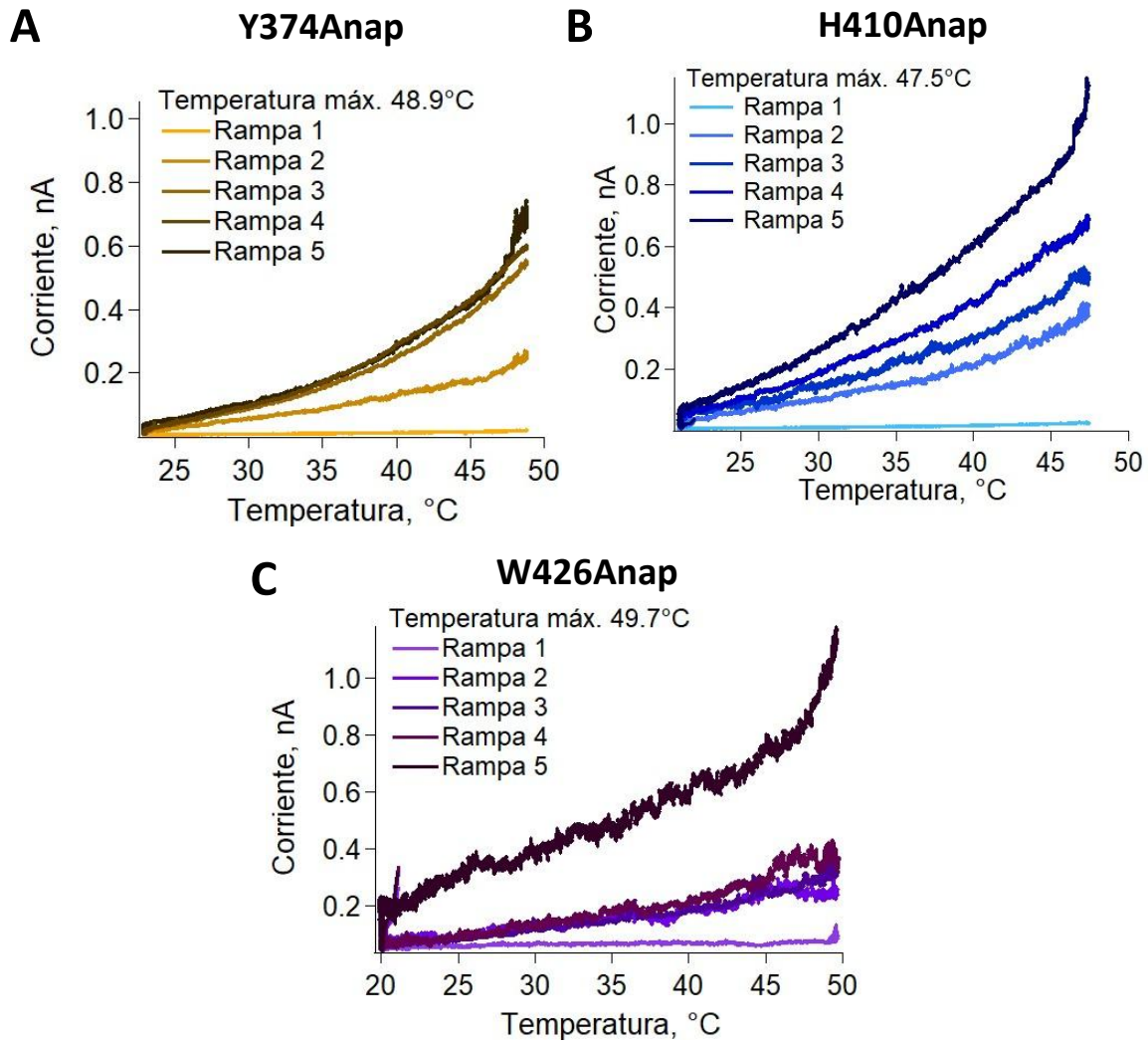


Figura 32. Activación de mutantes por temperatura, registro en configuración *inside-out*. A. Mutante TRPV1_Y374Anap_Cherry, 5 rampas en tono amarillo, siendo la última de mayor corriente. B. Mutante TRPV1_H410Anap_Cherry, 5 rampas en tono azul, siendo la última de mayor corriente. C. Mutante TRPV1_W426Anap_Cherry, 5 rampas en tono morado, siendo la última de mayor corriente. nA: nanoamperios.

Es importante recordar que los sitios: Y374, H410 y W426, fueron seleccionados mediante un estudio de simulación por dinámica molecular del canal TRPV1 dónde la variable empleada fue el cambio de la temperatura, siendo eso una primicia de que pueden estar ubicados en los dominios relacionados con los fenómenos de activación por temperatura.

Para los registros de temperatura presentados en las Figuras 31 y 32, se muestra un ejemplo característico de los 7 experimentos realizados para cada mutante.

DISCUSIÓN

Los estudios de proteínas de membrana fusionadas a proteínas fluorescentes son empleados para distintos objetivos como la obtención de distancias entre extremos amino o carboxilo de las proteínas e incluso para determinar la distancia de éstos a la membrana plasmática (De-la-Rosa, 2015). De igual forma, se utilizan como moldes para mutaciones con codón ámbar en dónde se busca seguir la incorporación de mutaciones mediante la traducción completa de la proteína (Zagotta *et al.*, 2016).

Para cada uno de esos estudios es importante evaluar que la función del modelo silvestre, en este caso un canal iónico, se mantenga sin modificación alguna por estar enlazado a una proteína fluorescente. Se ha demostrado que la fusión en los extremos amino y carboxilos del canal TRPV1 con diferentes proteínas fluorescentes no afecta la activación de este canal por ligandos específicos como la capsaicina y el ácido lisofosfatídico (De-la-Rosa, 2015). Para la finalidad de este trabajo y en futuros proyectos relacionados con el mismo, se enlazo el canal TRPV1 a la proteína mCherry, para obtener un molde fluorescente donde se evaluó la incorporación de un aminoácido no canónico, L-Anap.

La incorporación de aminoácidos no canónicos requiere de una mutación ámbar, en la que se cambia un codón de lectura para un aminoácido canónico por el codón de paro ámbar (UAG), en la secuencia polipeptídica. Se requiere un sistema de aminoacil-ARNt sintetasa y ARN de transferencia ortogonales, para permitir la traducción e incorporar al aaNC. El molde fluorescente indica, sí hay señal fluorescente que el aminoácido L-Anap se incorporó a la secuencia de TRPV1_Cherry terminando la traducción de manera exitosa, en caso de no incorporarse, la proteína estaría incompleta al truncarse la traducción por el reconocimiento del codón de paro, enviándola a degradación y con ello la ausencia de la señal fluorescente (Wang y Schultz, 2005).

Para la construcción de TRPV1 fusionado a mCherry (TRPV1_Cherry) en el extremo carboxilo se comprobó que no afecta la función del canal, como se puede

observar en la Figura 21, la respuesta frente a capsaicina fue similar al canal silvestre resultando en canales funcionales activados de manera dosis dependiente con una concentración efectiva media (CE_{50}) de 186 ± 19.5 nM de capsaicina, mientras que el canal silvestre presentó una CE_{50} de 145 ± 14 nM de capsaicina. Los valores son cercanos indicando que no hay un cambio en la sensibilidad al ligando. Aplicando una ecuación de Hill se obtuvo el número de Hill, que representa la unión de un ligando a su sitio de interacción presentando valores similares de 1.3 ± 0.14 y 1.2 ± 0.13 para el canal silvestre y la fusión, respectivamente. Estos datos demuestran que es un fondo donde se puede trabajar para incorporar los aminoácidos no canónicos.

En el caso de la estimulación por temperatura ambos canales mostraron activación a partir de $\sim 42^\circ\text{C}$ (Figura 21B), como está reportado para el canal TRPV1 se observó el fenómeno de inactivación reportado por Sánchez-Moreno *et al.*, en 2018, indicando también que la respuesta a temperatura es similar al canal silvestre (Figura 31A).

En los apartados C y D de la Figura 21 se observó la respuesta de la fusión TRPV1_Cherry frente a voltaje, corroborando el comportamiento rectificador saliente intrínseco del canal sin afectación alguna por la presencia de una proteína fluorescente en el extremo carboxilo del canal TRPV1.

Una vez comprobado que el molde TRPV1_Cherry puede ser útil para la generación de mutantes con codón ámbar en la secuencia, la selección de estos sitios se basó inicialmente en un estudio de dinámica molecular realizado en el laboratorio del Dr. León Islas, donde se observaron los residuos que presentaron mayor movilidad por la variación de temperaturas de 290 a 350 K (Ladrón-de-Guevara, en proceso), obteniendo cinco residuos. Dichos residuos se encuentran en diferentes dominios de la estructura, uno de ellos Y246 forma parte del dominio de repeticiones de anquirina, otros tres Y374, H410 y W426 se encuentran en un dominio próximo a la membrana, para ser específicos Y374 en un asa de la hélice enlazadora, H410 y W426 en el inicio y final de la hélice Pre-S1, y finalmente el W696 en un dominio conservado conocido como caja TRP.

En investigaciones previas sobre termoTRPs se ha discutido si la activación por temperatura se debe a un residuo, un dominio o un conjunto de dominios en el canal, proponiéndose éstos como los que le permiten la sensibilidad a ciertas temperaturas. Las regiones relacionadas a este estímulo en el canal TRPV1 son: el dominio próximo a membrana, compuesto por dos hélices (enlazadora y Pre-S1) anteriores al primer segmento transmembranal S1, la torreta del poro y el dominio C-terminal, donde se encuentra la caja TRP (Yao, Liu y Qin, 2011; Liu y Qin, 2017; Yang *et al.*, 2010; Brauchi *et al.*, 2006).

Estas investigaciones previas complementan el resultado obtenido en la dinámica molecular mostrando que residuos en las repeticiones de anquirina, en el dominio próximo a membrana y en la región C-terminal sufren cambios o movimientos que pueden estar relacionados a variaciones en la temperatura. Teniendo esto como base se realizó la mutagénesis para cambiar el codón de estos sitios por el codón ámbar y con ello la incorporación del L-Anap.

La incorporación de aminoácidos no canónicos a secuencias de proteínas es una herramienta novedosa que ha sido empleada para marcar proteínas e identificar localización, interacciones con otras proteínas y distancias entre ellas, al ser una sonda de tamaño pequeño evita causar una gran perturbación en la estructura a diferencia de una proteína fluorescente (>20 kDa) (Chatterjee *et al.*, 2013).

En el estudio de distancias y cambios conformacionales mediante la utilización de proteínas fluorescentes fusionadas al canal TRPV1, los cambios observados utilizando diferentes agonistas fueron tan sutiles que no pudieron ser percibidos por estructuras tan grandes como éstas (De-la-Rosa *et al.*, 2013). Por ende, para este proyecto el interés de incorporar L-Anap a la secuencia de TRPV1 serviría de sonda para identificar cambios conformacionales sutiles, ya que las características fluorescentes de L-Anap permiten saber si hubo un cambio de polaridad y solvatación en el ambiente local de este aminoácido (Chatterjee *et al.*, 2013).

Como parte de la estandarización de las metodologías para comprobar y caracterizar la incorporación de L-Anap se recurrió a técnicas ópticas de

microscopía confocal y epifluorescencia. Estas técnicas se complementan al poder identificar en ambas las señales de emisión de los fluoróforos de interés. Sin embargo, en microscopía confocal se obtienen cortes en el plano Z (profundidad) identificando la distribución de fluorescencia en el campo expuesto, mientras que en la microscopía de epifluorescencia se observa la fluorescencia total del campo pudiendo obtener espectros característicos de los fluoróforos (López-Macay *et al.*, 2016).

Para la incorporación del aaNC se buscó emplear el mejor acarreador de ADN para el sistema heterólogo empleado. Para esta transfección se requiere un primer plásmido con la secuencia con codón ámbar que codificaría para nuestro canal y un segundo plásmido que contiene el par ortogonal de la aaRS y el ARNt para incorporar al L-Anap. Se obtuvo que jetPEI fue el agente con mejores características al no dañar las células y presentar una mejor eficiencia de transfección como se presenta en la Tabla 1 (resumen de las Figuras suplementarias 1 y 2, en Anexo A).

De igual forma, durante la estandarización se obtuvieron las concentraciones de plásmidos a utilizar para mejorar la eficiencia de transfección y la viabilidad del sistema, comprobando que es necesario que estén presentes ambos plásmidos y el L-Anap para que el rescate de la proteína ocurra. Sí alguno de los elementos de transfección falta no se da el rescate y no se presenta la señal fluorescente, como se observa en la Figura suplementaria 3 del Anexo B.

La incorporación de L-Anap en los sitios seleccionados, únicamente fue exitosa para tres de las cinco mutantes con codón ámbar diseñadas. Como se observa en la Figura 23, las que no incorporan al L-Anap presentaron señal únicamente en el filtro para L-Anap, ya que aunque no esté incorporado a una secuencia, este aaNC puede emitir fluorescencia estando de forma libre. Por otra parte, sí este se incorpora se observan las señales de mCherry fusionado a TRPV1 y de L-Anap.

Para cada uno de los sitios se realizó un control negativo transfectando únicamente los dos plásmidos sin el L-Anap para identificar incorporación

inespecífica de fondo, pero en ningún caso se presentó de forma notable dicho fondo, esto puede observarse en las Figuras suplementarias 4-8 del Anexo C.

Los sitios que no incorporaron L-Anap fueron Y246 y W696, localizados en el dominio de repeticiones de anquirina y la caja TRP respectivamente.

Existe un estudio donde se ha incorporado L-Anap en tres sitios del dominio de anquirina de TRPV1 de forma exitosa (Q169, K240 y S404) (Zagotta *et al.*, 2016). Sin embargo, para nuestro sitio en Y246, la incorporación no fue exitosa. Como se ha descrito, el dominio de anquirinas es importante para la modulación del canal e involucra interacciones entre subunidades adyacentes. Aunque no se conocen todos los factores que pueden afectar a esto se reconoce como un dominio sensible a cambios estructurales. Un cambio en una de estas interacciones evitaría que se pliegue de forma correcta la proteína enviándola a degradación (Liao *et al.*, 2013).

De igual forma se detalla que el residuo W696 presente en el dominio caja TRP interacciona con el residuo F558 de la hélice S4-S5 brindando estabilidad estructural (Liao *et al.*, 2013), siendo esta interacción importante, es posible que sea un sitio sensible a mutaciones y a cambios como la incorporación del aaNC.

Al analizar la estructura por criomicroscopía electrónica, se ha descrito que las repeticiones de anquirina, así como las hélices S4-S5 y la caja TRP forman parte de los dominios que le confieren estabilidad y modulación a la estructura general del canal TRPV1, siendo estos las regiones que interaccionan con otros residuos de una subunidad y entre monómeros para dar paso a la arquitectura de tetrámero (Liao *et al.*, 2013).

Para los tres sitios restantes (Y374, H410 y W426) la incorporación fue exitosa como se presenta en las Figuras suplementarias 5-7 del Anexo C. Se observan ambas señales fluorescentes para mCherry fusionado a TRPV1 y de L-Anap, colocalizando. La fluorescencia se observa en la zona periférica o citoplasmática de las células, pero no es posible concluir que los canales que incorporan L-Anap se encuentran en la membrana plasmática.

Como se resume en la Tabla 2, la eficiencia de rescate o incorporación es de ~10 a 15% con respecto al total de células por campo, siendo ésta baja. Sin embargo, en estudios de incorporación de L-Anap, en TRPV1 se ha demostrado se pueden obtener canales funcionales con eficiencias de incorporación bajas (Zagotta *et al.*, 2016).

Dando seguimiento a la comprobación de incorporación de L-Anap a las tres mutantes donde fue exitosa, mediante microscopía de epifluorescencia, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia como un criterio de comprobación para una correcta identificación de células que expresan canales mutados que incorporan L-Anap. Se obtuvo que para mCherry fusionado a TRPV1 la longitud máxima de emisión fue de 610 nm y para L-Anap fue de 490 nm (Figura 24), como ha sido reportado para ambos fluoróforos (Shaner *et al.*, 2004; AsisChem Inc. Catalog: ASIS-0146).

La intensidad de los espectros fue mayor para mCherry rebasando las 1000 U. A., y para L-Anap en las tres mutantes varió entre 300 a 800 U.A. La fluorescencia de mCherry corresponde a canales que tienen fusionada la proteína e incorporaron al aaNC, mientras que la intensidad de L-Anap corresponde a aaNC incorporado y libre dentro de la célula. En general, para ambos fluoróforos, la intensidad de fluorescencia fue mayor para las mutantes Y374 y H410, siendo menor en W426, lo que concuerda con el porcentaje de eficiencia mencionado, donde en W426 el rescate fue de 10%, mientras que para las otras fue de 15%.

Para estudios futuros de fluorescencia en los que sean requeridas estas mutantes que incorporan L-Anap, es importante caracterizar el comportamiento y calidad de los fluoróforos. Por ello se realizó la medición de fotoblanqueo por exposición al láser, resultados observados en la Figura 25, obteniendo que durante una exposición acumulada de 36 segundos de láser hay un fotoblanqueo de 0.5%, siendo esta una disminución mínima de la fluorescencia, demostrando que son fluoróforos estables.

Los cambios de fluorescencia de L-Anap al variar el microambiente al que este aminoácido se expone han sido descritos anteriormente (Chatterjee *et al.*, 2013). Pero para entender y caracterizar más a fondo estos cambios se expuso al L-Anap a gradientes porcentuales de disolventes con diferente polaridad como agua, metanol, isopropanol y 1-decanol, corroborando un desplazamiento de la emisión de fluorescencia a 460 nm sí se encuentra expuesto a ambientes no polares y a 490 nm en polares.

En la Figura 26, se presenta como el desplazamiento de la longitud máxima de emisión organizó a los disolventes de menor a mayor polaridad, posicionando en 458 nm a 1-decanol, compuesto de baja polaridad (índice de polaridad (P) <0.04) al tener una cadena de diez carbonos y un hidroxilo en el extremo C-1; seguido de isopropanol (P=3.9), compuesto de tres carbonos y un hidroxilo en el C-2 con una longitud máxima de emisión de 462 nm. A estos les siguió el metanol, compuesto polar (P=5.1) con un carbono y un grupo hidroxilo, con una longitud de emisión de 482 nm y finalmente el agua, compuesto polar (P=10.2) con una longitud máxima de emisión de 485 nm para L-Anap (Klein, 2013).

Aunque se han encontrado criterios para afirmar que la incorporación de L-Anap ha sido exitosa en tres mutaciones con codón ámbar como: la obtención de fluorescencia de mCherry fusionada a TRPV1 y L-Anap, y los espectros correspondientes, es importante asegurar que dicha señal fluorescente se encuentra en la membrana plasmática. Por ello, se empleó una metodología novedosa que consiste en la obtención de fragmentos de membrana adheridos a vidrio mediante la hinchazón y lisado de células, empleando para ello soluciones hipotónicas seguidas de un pulso ultrasónico. Se han reportado diferentes metodologías variando las soluciones y tiempos de incubación, logrando con éxito la obtención de estos fragmentos de membrana (Heuser, 2000; Gordon *et al.*, 2016). En este trabajo se tomaron y modificaron ambas con la finalidad de estandarizar la técnica.

Cómo se muestra en la Figura 27, se logró la obtención de estos fragmentos, lo cual sirvió como herramienta para comprobar que la señal fluorescente de mCherry fusionado a TRPV1 y L-Anap se encontraba en la membrana plasmática.

Al realizarse las mediciones en una zona localizada de la membrana y no en la célula completa, como en los experimentos de epifluorescencia, las intensidades de fluorescencia fueron menores. En este experimento se descartó el efecto de L-Anap libre, únicamente se observó la señal fluorescente del L-Anap incorporado en la secuencia de TRPV1_Cherry. Los espectros correspondieron a las longitudes de onda máximas ya mencionadas para cada fluoróforo.

La caracterización de la función de los canales que incorporan L-Anap, se realizó mediante la fijación de voltaje en microárea de membrana o *Patch-Clamp*. Para estudiar la activación del canal por capsaicina, se empleó la configuración *inside-out*, pero se observó en la Figura 28 que las corrientes para la primera mutante Y374Anap fueron bajas, de aproximadamente 60 pA, empleando una concentración saturante de 4 μ M. Por esto, se decidió realizar registro de corriente en células completas para tener una mayor área y, por ende, un mayor número de canales pudiendo así obtener corrientes de mayor magnitud, como las que se presentan en las Figuras 29 y 30.

En el caso de las mutantes, se observó activación por capsaicina 4 μ M obteniendo corrientes entre 100 a 300 pA y se corroboró el comportamiento rectificante saliente propio del canal silvestre. Sin embargo, para Y374Anap, se observaron corrientes más grandes a potenciales negativos que los observados en el canal silvestre. Para los canales H410Anap y W426Anap, éste fue similar al del canal silvestre.

Para caracterizar la activación por temperatura, se realizaron sellos en configuración de célula completa esperando que las corrientes fueran bajas como lo fue para capsaicina. Sin embargo, para este estímulo las corrientes alcanzaron los nanoamperios.

Estudios previos del canal TRPV1 silvestre demuestran que éste presenta una activación característica frente a calor, a partir de un primer pulso de temperatura elevada $\sim 49^{\circ}\text{C}$, se observa una transición a un estado inactivado del canal, disminuyendo la corriente al estimularlo por segunda vez y así sucesivamente (Sánchez-Moreno *et al.*, 2018), como se observa en la Figura 31A.

Por otra parte, la mutante Y374Anap presentó un fenómeno diferente de respuesta a temperatura. Al aplicar un segundo pulso de temperatura la corriente aumentó a más del doble que la corriente en el primer pulso (Figura 31C), identificando así un fenómeno de potenciación de corriente. Como se observa en el trazo de corriente con respecto al tiempo del canal silvestre (Figura 31B), después de alcanzar el máximo de temperatura ésta disminuye, mientras que en el trazo de corriente de la mutante Y374Anap (Figura 31D) una vez alcanzado el máximo de temperatura, ésta se mantiene ya que los canales permanecen abiertos y tardan más en cerrarse.

Los registros en célula completa para la mutante Y374Anap dificultaron el registro de más de 2 rampas de temperatura, por lo que se decidió caracterizar este fenómeno en sellos *inside-out*, pudiendo así obtener registros con más de 4 rampas de temperatura. Esto permitió identificar que las tres mutantes Y374Anap, H410Anap y W426Anap, presentaron activación por temperatura y el fenómeno de potenciación, al aumentar las corrientes conforme se aplicaban rampas sucesivas de temperatura entre $47\text{-}49^{\circ}\text{C}$, como se observa en la Figura 32.

Estas mutantes se encuentran en sitios dentro de la región conocida como dominio próximo a membrana, y como se ha mencionado, existen estudios que infieren que este dominio está relacionado con la activación de TRPV1 por temperatura (Yao, Liu y Qin, 2011; Liu y Qin, 2017). Al estudiar la estructura obtenida por criomicroscopía electrónica (*PDB 3J5P*), existe una interacción entre subunidades adyacentes en los extremos N, que se ha descrito como un acoplamiento importante en el plegamiento tetramérico del canal (Liao *et al.*, 2013).

Como parte de los resultados obtenidos en este proyecto, identificamos que el residuo Y374 de una subunidad es capaz de interactuar con aminoácidos aromáticos (F235), probablemente formando enlaces pi, y con aminoácidos cargados (E210), mediante la formación de puentes de hidrógeno, presentes en una cavidad de la subunidad adyacente (Figura 33). Por ello este residuo podría ser uno de los responsables de las interacciones, modulación y plegamiento estructural del canal.

Como parte de lo antes mencionado, la mutación con L-Anap parece estar modificando el plegamiento de tal forma que le confiere un cambio en su respuesta por temperatura. Así mismo, este cambio conformacional puede provocar un diferencia en la activación por capsaicina del canal permitiéndole responder a potenciales negativos.

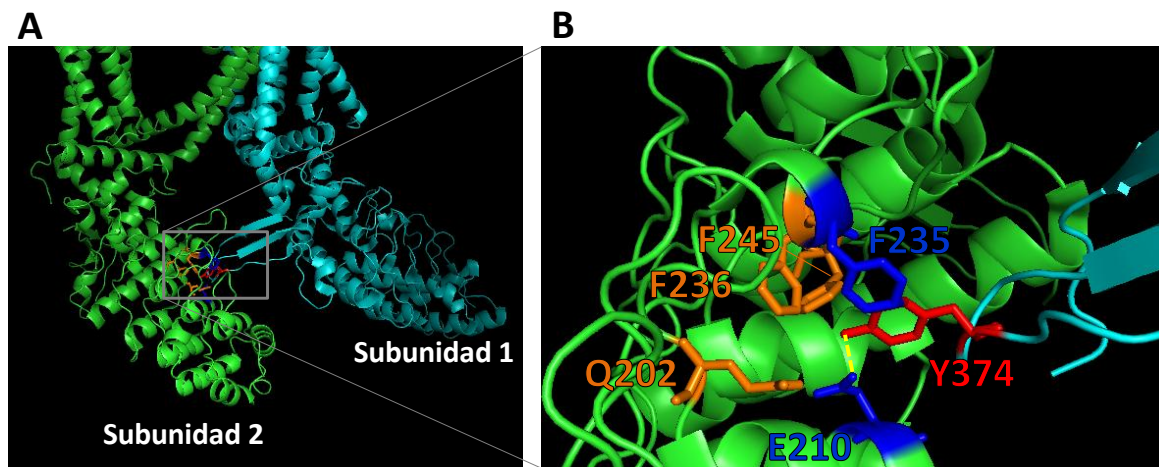


Figura 33. Sitio de mutación Y374. A. Imagen de interacción entre subunidades mediante Y374 (presentado en rojo). B. Ampliación del sitio Y374 (presentado en rojo) y sus interacciones directas con residuos de la subunidad adyacente por electrones “pi” con F235 (presentado en azul) y puente de hidrógeno con E210 (presentado en azul) e indirectas con otros residuos de la subunidad adyacente como Q202, F236 y F245 (presentados en naranja). Imagen obtenida de PDB 3J5P, por el programa PyMOL®.

Por otra parte, el sitio H410 se encuentra en el inicio de la hélice Pre-S1 muy cerca de un asa (404-407) que ha sido blanco de interés para investigaciones donde se realizaron cambios de aminoácidos entre TRPV1 y TRPV3, donde se probó que la presencia del residuo S404 en TRPV1, ausente en TRPV3, le confiere su respuesta a temperatura no dependiente del uso (Liu y Qin, 2017).

Por ello como se muestra en la Figura 34, la cercanía de estos residuos podría indicar un segundo sitio de interés para la activación por temperatura, ya que al incorporar L-Anap en éste podría cambiar su respuesta a este estímulo. De igual forma se observan cerca otros residuos que forman parte de la caja TRP, dominio importante en la modulación y plegamiento de la estructura del canal, con los que pudiese estar interaccionando y esto podría modificar la respuesta frente a temperatura.

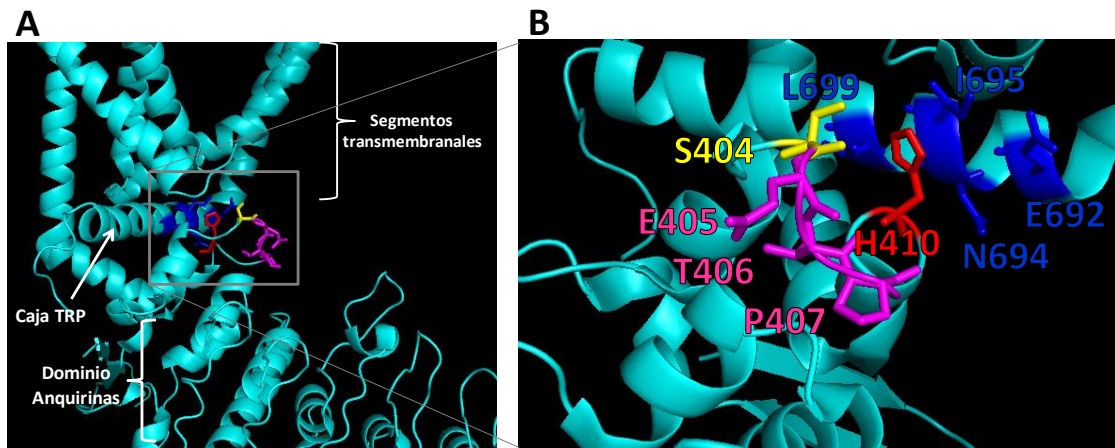


Figura 34. Sitio de mutación H410. A. Imagen de la localización de residuo H410 (presentado en rojo), en proporción con los dominios cercanos. B. Ampliación de sitio H410 (presentado en rojo) y las interacciones con residuos cercanos en el asa: S404 (presentado en amarillo), E405, T406 y P407 (presentados en rosado), y residuos de la caja TRP: E692, N694, I695, L699 (presentados en azul). Imagen obtenida de PDB 3J5P, por el programa PyMOL®.

El residuo W426, se encuentra al final de la hélice Pre-S1, exactamente en el giro hacia la hélice transmembranal S1, siendo esta una región que pudiera jugar un papel importante en los cambios conformacionales por la activación del canal.

En la Figura 35 se observa la cercanía de este sitio con residuos de la hélice S1 y S4 así como de la caja TRP, con los que el L-Anap puede interactuar o verse afectado estéricamente provocando una dificultad para plegarse, ya que la expresión de esta mutante fue menor que las otras.

La activación por capsaicina para esta mutante presentó un comportamiento similar al canal silvestre, observando la rectificación de la corriente. Sin embargo, la respuesta a temperatura demuestra un efecto de potenciación como en las mutantes anteriores, en el caso de este sitio es posible que las interacciones con

los residuos cercanos eviten que se produzca el cambio conformacional por el estímulo de calor, hasta que éste acumule suficiente energía por estimularlo con un segundo pulso de temperatura.

Uno de los residuos cercanos R701, de la Caja TRP, es el sitio de unión al lípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), es un modulador de la actividad del canal TRPV1 (Brauchi *et al.*, 2007; Diaz-Franulic *et al.*, 2016). Si la cavidad se ve impedida estéricamente por el tamaño del L-Anap en este sitio, resultaría en un retardo o bloqueo de la activación por calor a un primer pulso de temperatura, pudiendo ser ésta la causa de la respuesta diferente a este estímulo.

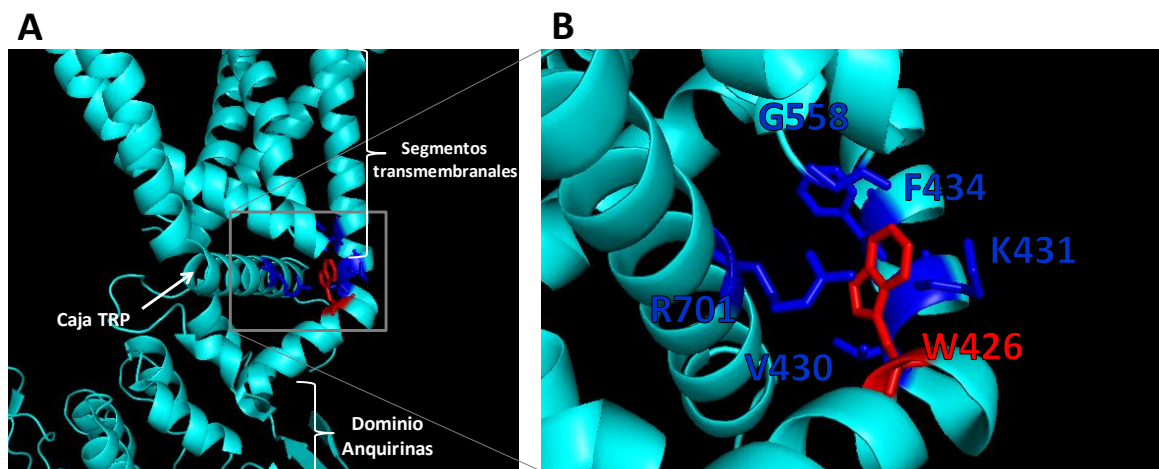


Figura 35. Sitio de mutación W426. A. Imagen de la localización de residuo W426 (presentado en rojo), en proporción con los dominios cercanos. B. Ampliación de sitio W426 (presentado en rojo) y las interacciones con residuos cercanos la caja TRP: R701, en la hélice S4: G558, en la hélice S1: V430, K431 y F434 (presentados en azul). Imagen obtenida de PDB 3J5P, por el programa PyMOL®.

CONCLUSIONES

- La construcción de TRPV1 fusionada a la proteína mCherry responde a capsaicina, temperatura y voltaje de forma similar que el canal TRPV1 silvestre.
- Las mutaciones en los residuos Y246 y W696 no presentaron expresión ni función.
- Se estandarizó y caracterizó la identificación de una correcta incorporación de L-Anap a una secuencia que contiene codón ámbar.
- Se logró la incorporación del aminoácido fluorescente no canónico, L-Anap, en tres sitios con codón ámbar: Y374, H410 y W426.
- Se caracterizó la activación por capsaicina para las tres mutantes que incorporaron L-Anap, identificando el comportamiento rectificando saliente similar al canal silvestre.
- Se caracterizó la activación por temperatura para las tres mutantes que incorporaron L-Anap, observando una potenciación a pulsos sucesivos de temperatura.

PERSPECTIVAS

La caracterización de estos sitios que incorporan un aminoácido fluorescente no canónico como L-Anap, sienta las bases de futuros estudios que permitirán determinar cambios conformacionales finos en dominios del canal iónico.

Empleando agentes apagadores de fluorescencia que modifican la señal de emisión de los fluoróforos, se permitirá la medición de distancias entre el residuo y la membrana o algún cambio conformacional que oculte o exponga al residuo (Miller, 2016; Gordon *et al.*, 2016). Es necesario buscar otros sitios que incorporen L-Anap para tener un panorama completo de estos cambios conformacionales finos.

La respuesta a temperatura de los sitios mutados en este trabajo sugiere que estos son importantes para la modulación de temperatura del canal TRPV1 y podrán ser empleados en proyectos futuros para caracterizar más a fondo la respuesta a este estímulo físico.

ANEXOS

A. Selección del mejor agente de transfección

En las Figuras suplementarias 1 y 2, se presentan los resultados obtenidos de imágenes del confocal para los tres agentes de transfección: Lipofectamina 3000, Mirus y jetPEI, para la transfección de la proteína mCherry silvestre y para el rescate de la mutación ámbar de la proteína mCherry que incorpora L-Anap.

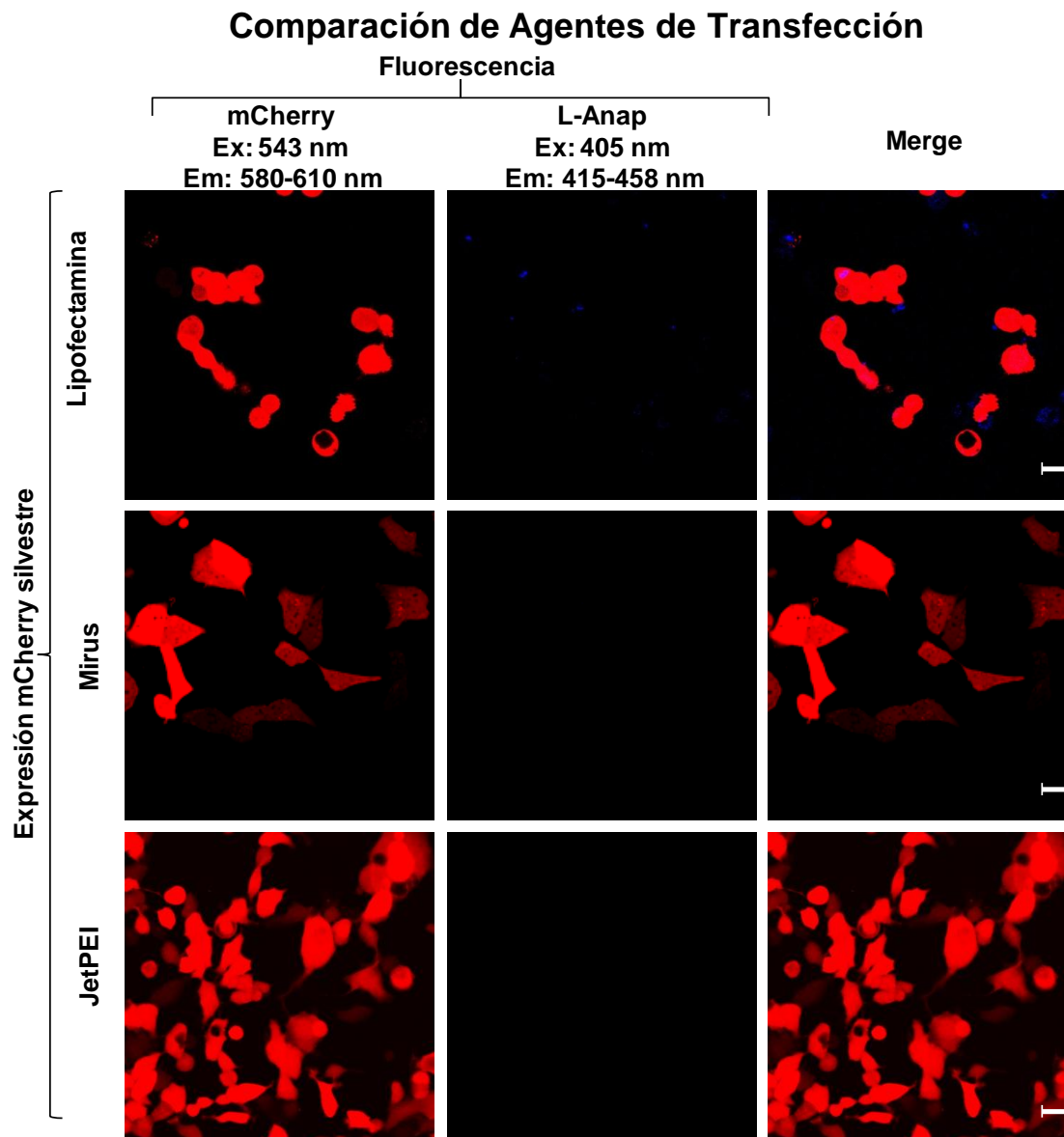


Figura suplementaria 1. Transfección de mCherry silvestre. Se observa la comparación de los tres agentes al transfectar proteína mCherry silvestre. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, se presentan en orden de izquierda a derecha la fluorescencia de proteína Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y la colocación de fluorescencia (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 µm. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

Comparación de Agentes de Transfección

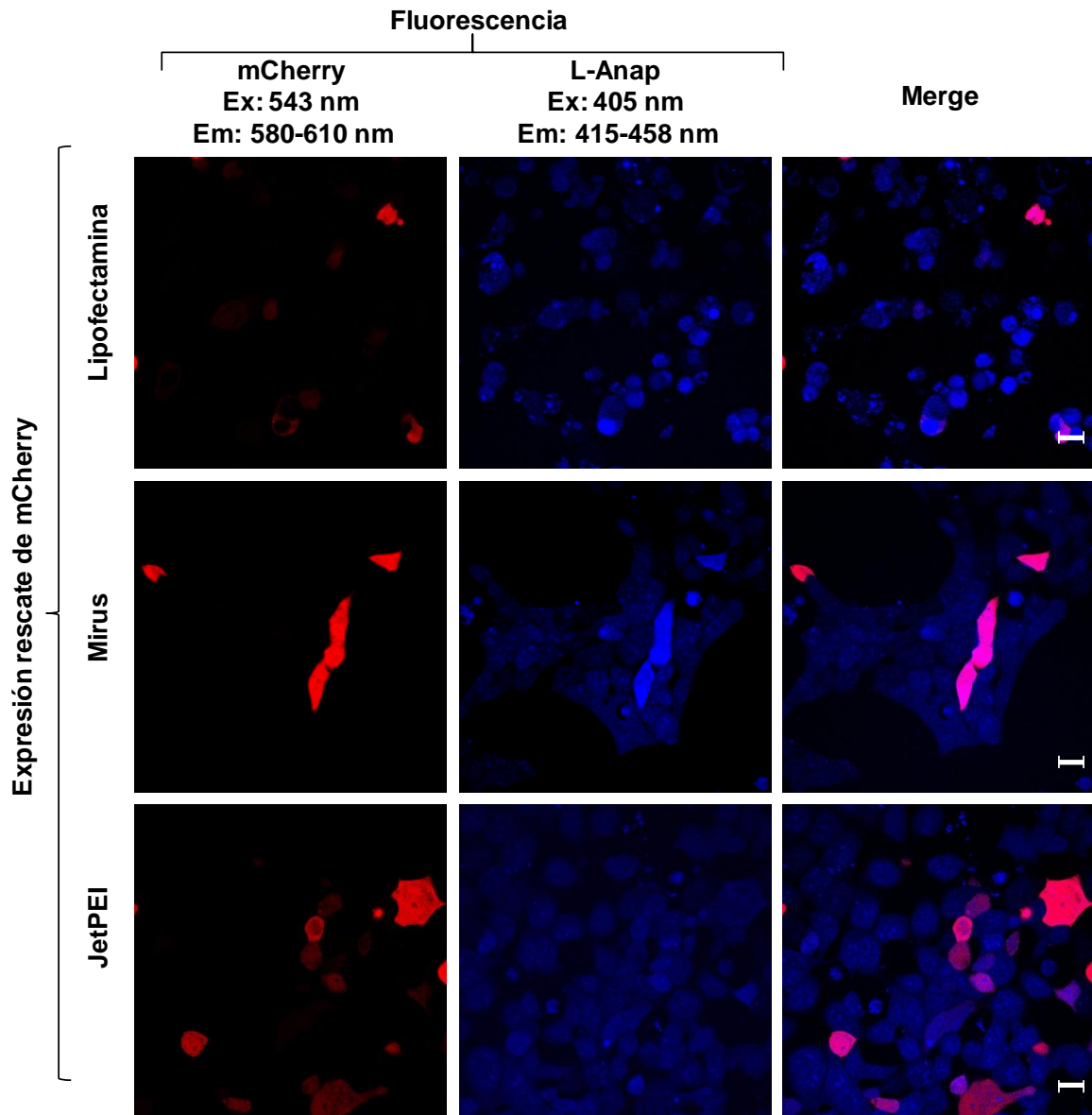


Figura suplementaria 2. Rescate de mCherry. Se observa la comparación de los tres agentes al transfectar la mutante ámbar de mCherry, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, se presentan en orden de izquierda a derecha la fluorescencia de proteína Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y la colocación de fluorescencia (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 μm . Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

B. Estandarización de la incorporación de L-Anap en proteína mCherry

En la Figura suplementaria 3, se presentan los resultados y controles de la estandarización del rescate de la proteína mCherry al incorporar L-Anap. Se observan ambas fluorescencias cuando se tienen todos los elementos del sistema

de transfección: ADN con mutación TAG, plásmido con aaRS y ARNt ortogonales (pAnap) y el aminoácido no canónico.

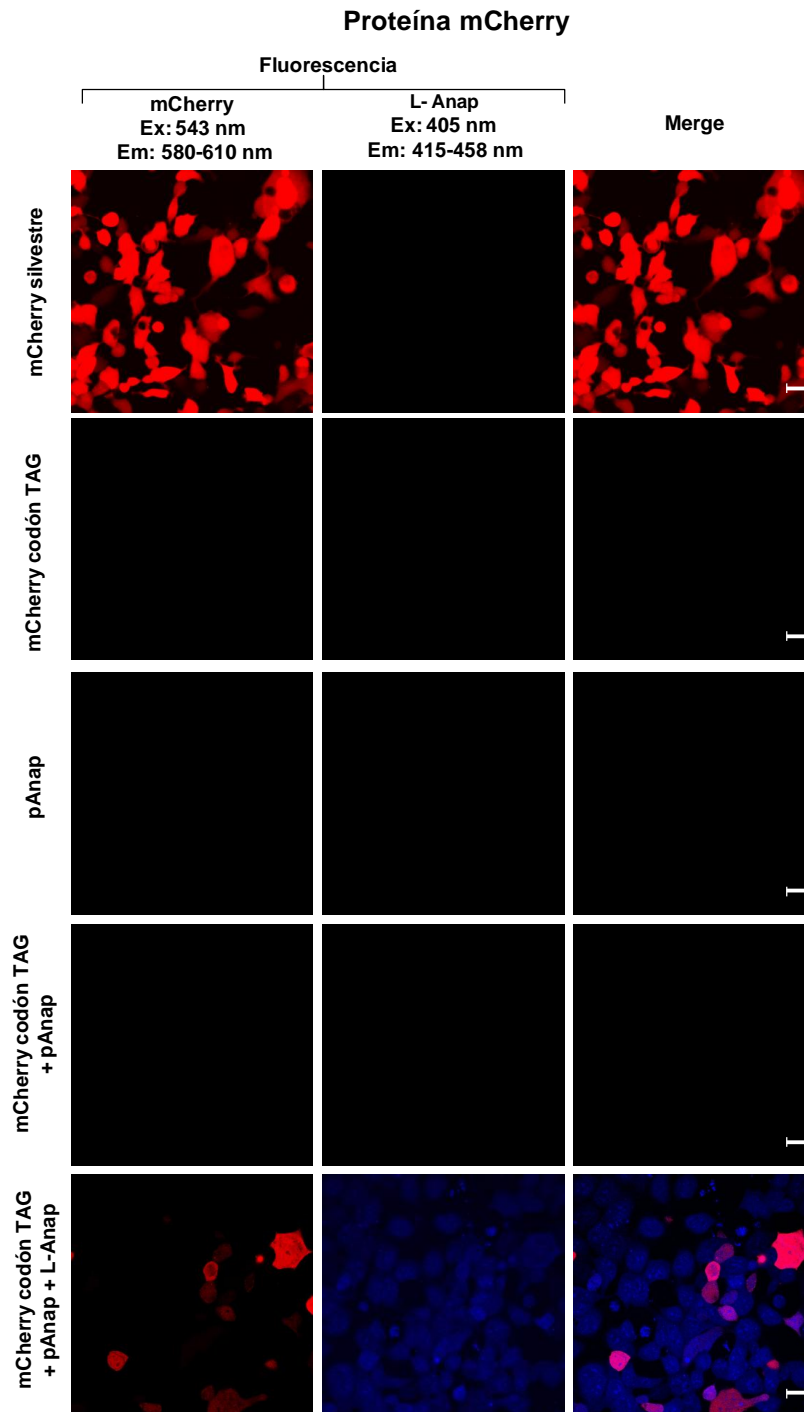


Figura suplementaria 3. Estandarización de la incorporación del L-Anap en proteína fluorescente Cherry. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de proteína mCherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 μ m. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

C. Confocal

En las Figuras suplementarias 4 a 8 se presentan las fotos obtenidas de confocal para el rescate del canal TRPV1_Cherry en las mutantes ámbar, presentando el control positivo de transfección TRPV1_Cherry silvestre, el control negativo de incorporación que contiene los plásmidos pAnap y mutante ámbar sin L-Anap, y el experimento con todas las condiciones para cada mutante.

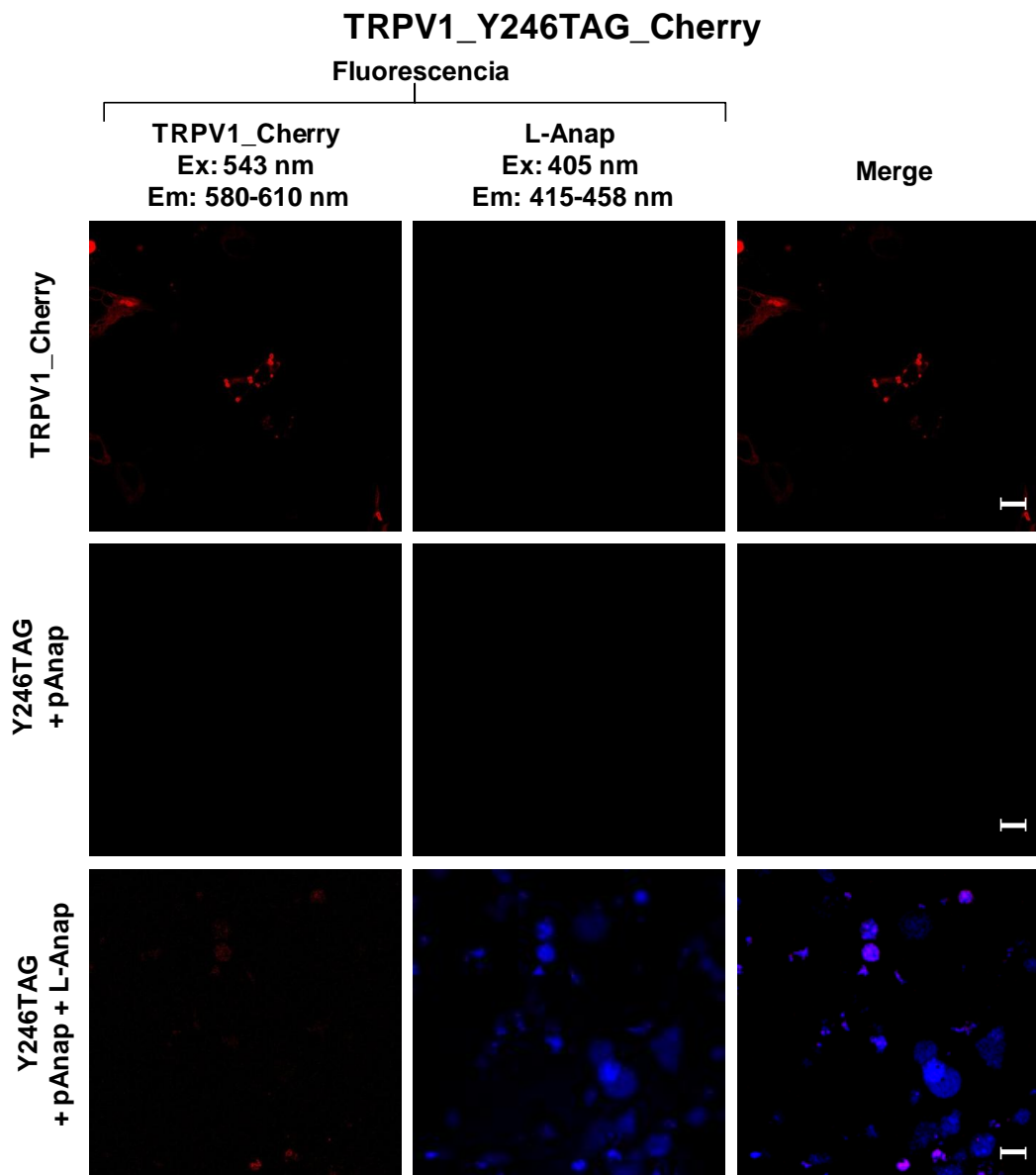


Figura suplementaria 4. Incorporación de L-Anap y rescate de TRPV1_Cherry en mutante Y246TAG. Fila superior: Canal TRPV1_Cherry silvestre. Fila media: mutante Y246TAG y pAnap. Fila inferior: mutante Y246TAG, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 µm. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

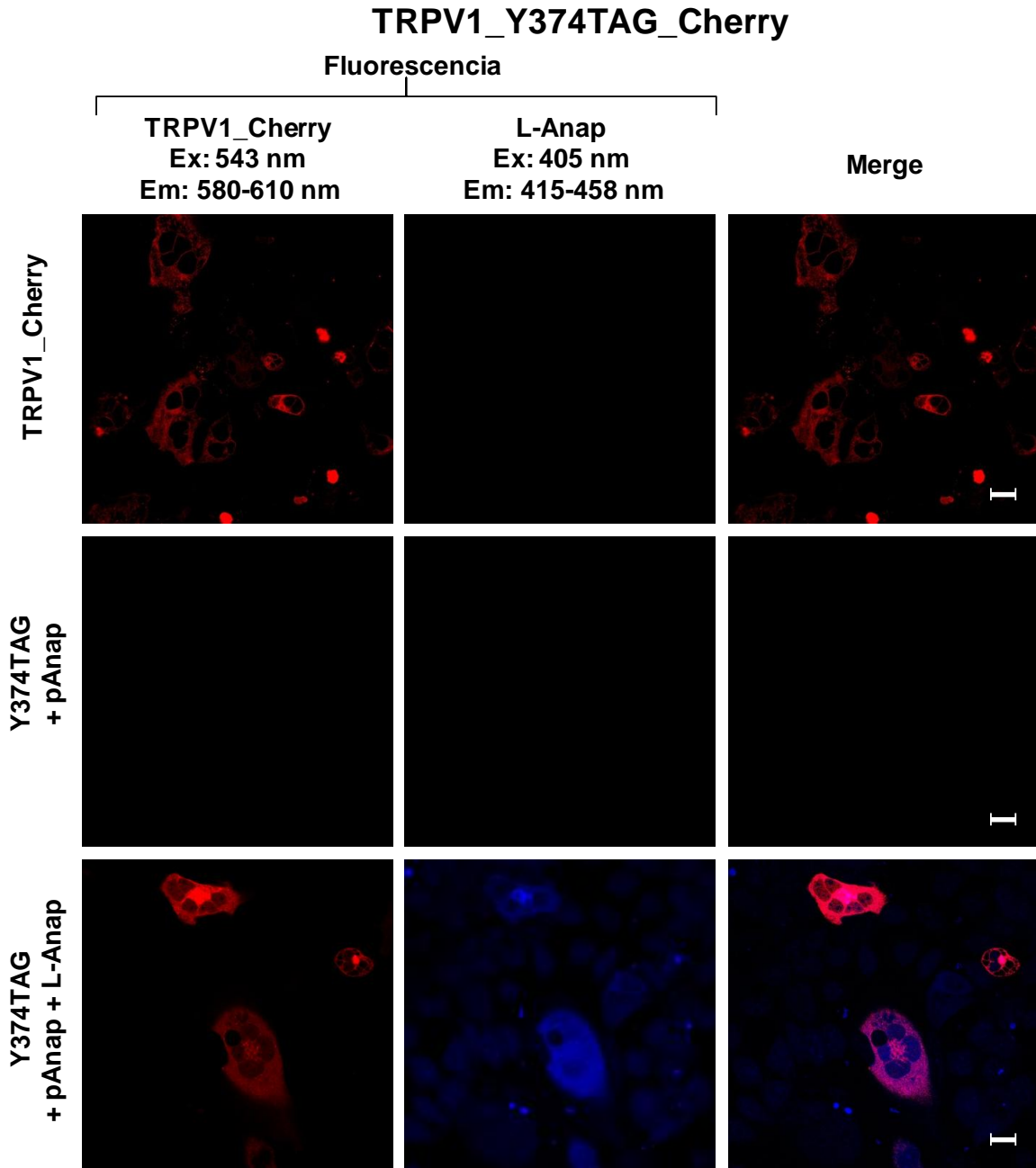


Figura suplementaria 5. Incorporación de L-Anap y rescate de TRPV1_Cherry en mutante Y374TAG. Fila superior: Canal TRPV1_Cherry silvestre. Fila media: mutante Y374TAG y pAnap. Fila inferior: mutante Y374TAG, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 μ m. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

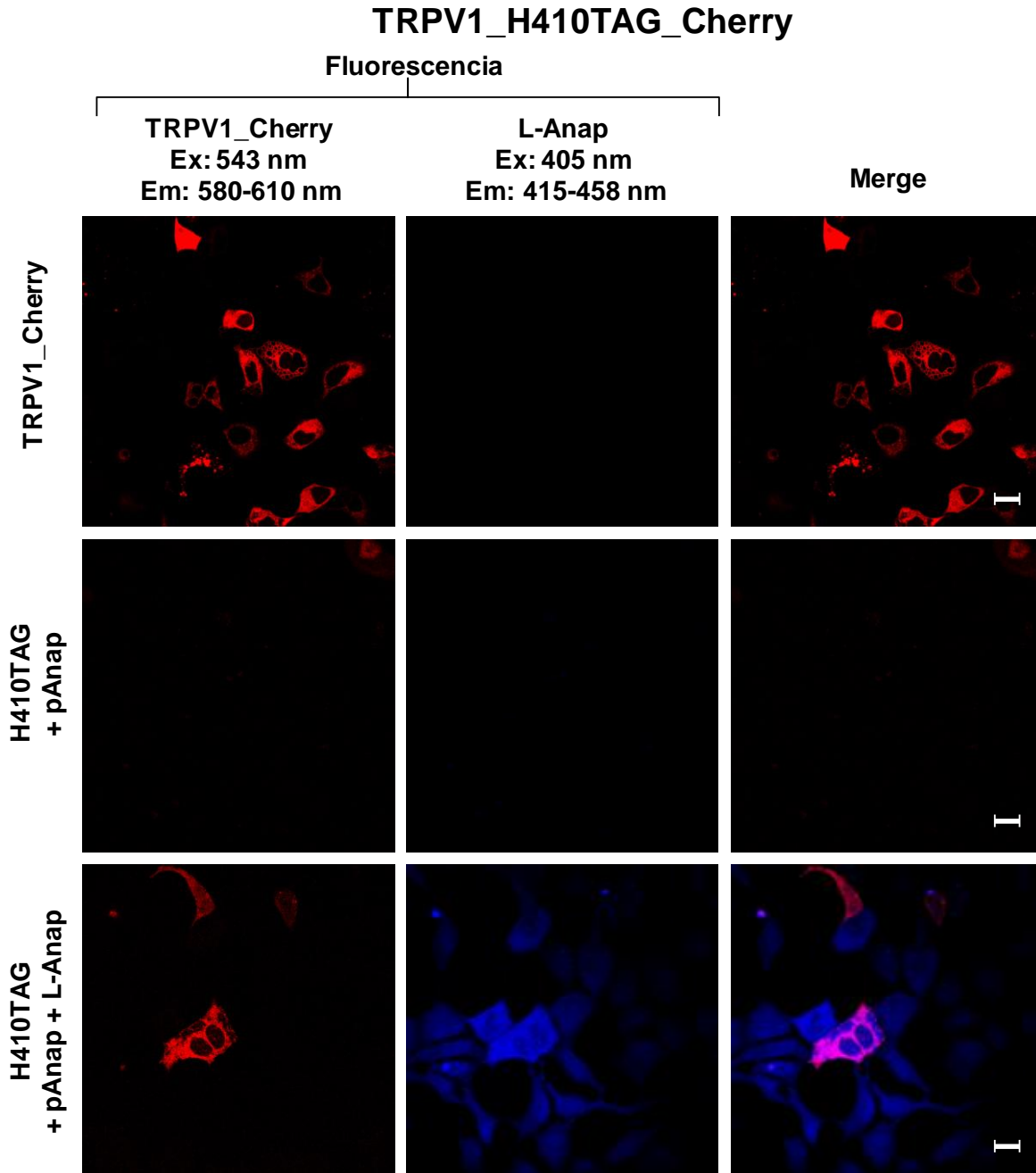


Figura suplementaria 6. Incorporación de L-Anap y rescate de TRPV1_Cherry en mutante H410TAG. Fila superior: Canal TRPV1_Cherry silvestre. Fila media: mutante H410TAG y pAnap. Fila inferior: mutante H410TAG, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 μ m. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

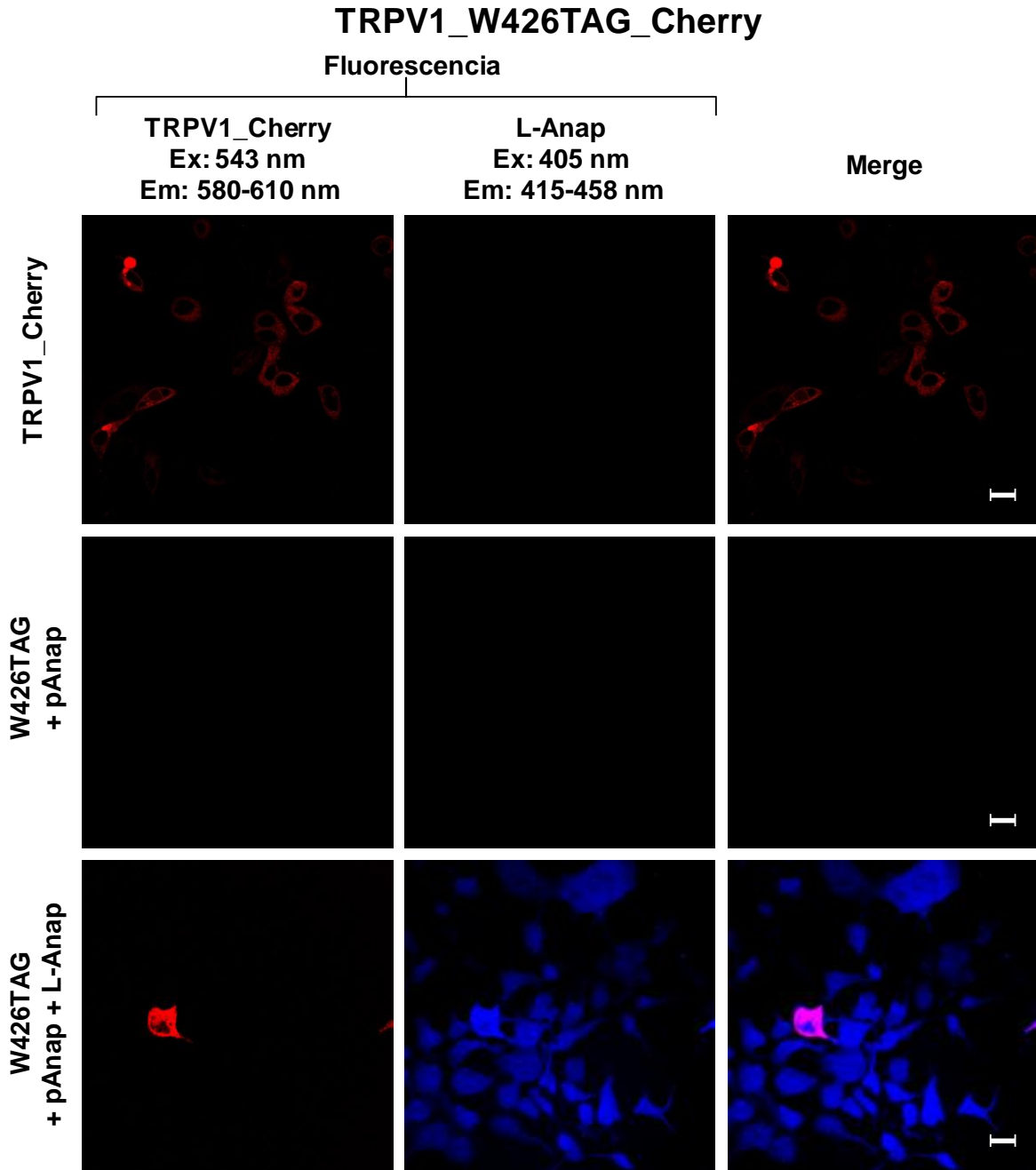


Figura suplementaria 7. Incorporación de L-Anap y rescate de TRPV1_Cherry en mutante W426TAG. Fila superior: Canal TRPV1_Cherry silvestre. Fila media: mutante W426TAG y pAnap. Fila inferior: mutante W426TAG, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 μ m. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

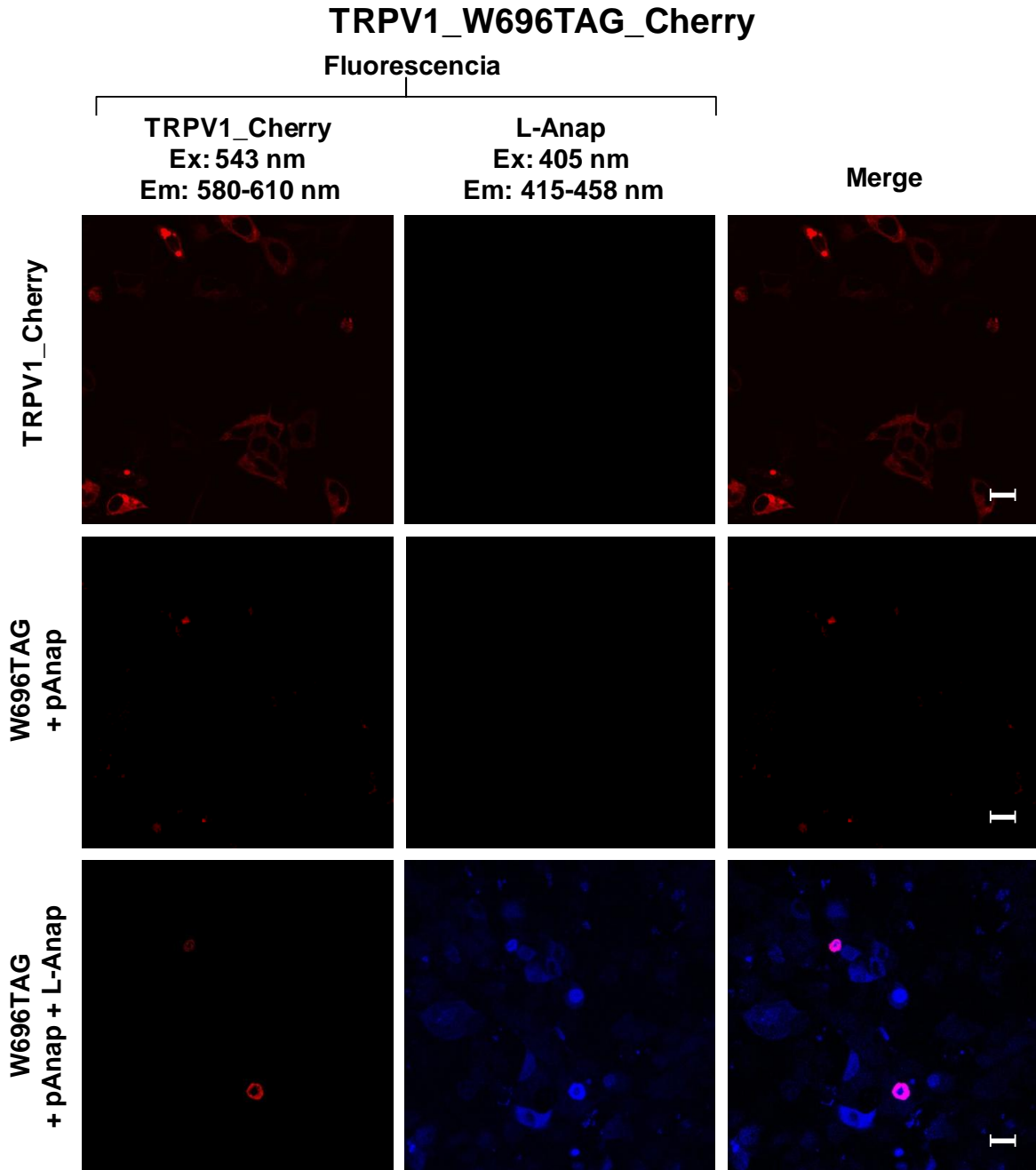


Figura suplementaria 8. Incorporación de L-Anap y rescate de TRPV1_Cherry en mutante W696TAG. Fila superior: Canal TRPV1_Cherry silvestre. Fila media: mutante W696TAG y pAnap. Fila inferior: mutante W696TAG, pAnap y L-Anap. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio confocal Leica® TCS SP5, objetivo 63x, fluorescencia de TRPV1_Cherry (rojo), fluorescencia de L-Anap (azul) y colocalización de fluorescencias (rosa). La barra al final de la serie es equivalente a 20 µm. Ex: longitud de excitación, Em: longitud de emisión, nm: nanómetros.

D. Cambios en la fluorescencia de L-Anap

Se realizaron mediciones de fluorescencia de L-Anap en disolventes de diferente polaridad, con diferentes porcentajes de solubilidad con agua, en las Figuras suplementarias 9-11 se muestran los resultados empleando metanol, isopropanol y 1-decanol, respectivamente.

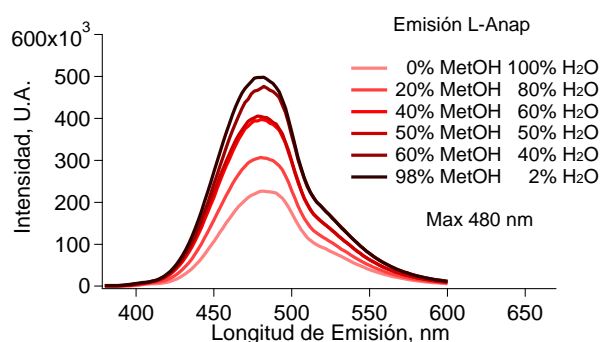


Figura suplementaria 9. Cambios de fluorescencia de L-Anap al exponerse a diferentes porcentajes de metanol. Se presentan de menor porcentaje de metanol (tonos en rojo claro) a mayor porcentaje de metanol (tonos de rojo oscuro). U.A.: unidades arbitrarias, nm: nanómetros.

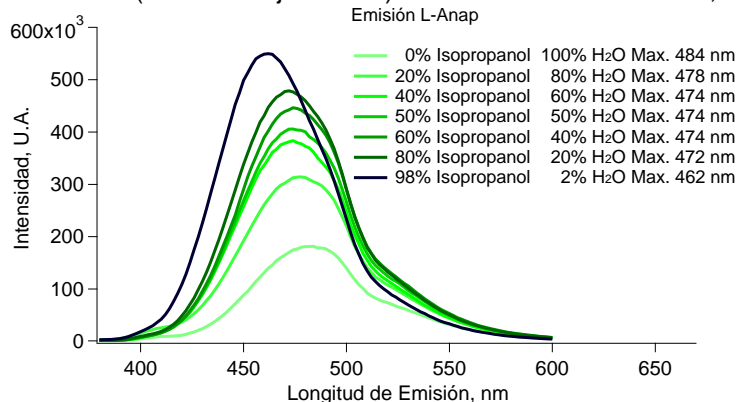


Figura suplementaria 10. Cambios de fluorescencia de L-Anap al exponerse a diferentes porcentajes de isopropanol. Se presentan de menor porcentaje de isopropanol (tonos en verde claro) a mayor porcentaje de isopropanol (tonos de verde oscuro). U.A.: unidades arbitrarias, nm: nanómetros.

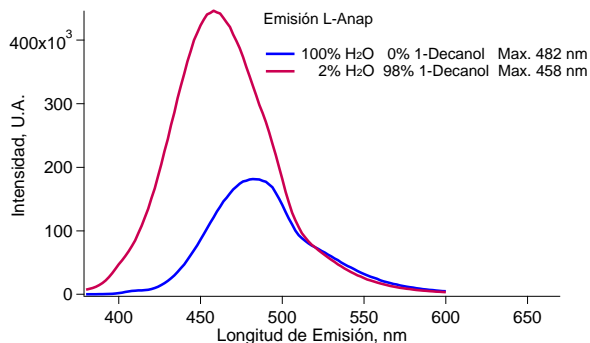


Figura suplementaria 11. Cambios de fluorescencia de L-Anap al exponerse a diferentes porcentajes de 1-decanol. Debido a la dificultad de efectuar mezclas de 1-decanol con agua, solo se pudo emplear 0% de 1-decanol (trazo azul) y 98% de 1-decanol (trazo rosa). U.A.: unidades arbitrarias, nm: nanómetros.

REFERENCIAS

- AsisChem Inc. *L-ANAP methyl ester*. Catalog: ASIS-0146. Disponible en: <https://asischem.com/asis-0146.html> (consultado en noviembre 2016).
- Baez, D.; Raddatz, N.; Ferreira, G.; Gonzalez, C.; Latorre, R. (2014). Gating of thermally activated channels. *Curr Top Membr.* 74: 51-87.
- Brauchi, S.; Orta, G.; Mascayano, C.; Salazar, M.; Raddatz, N.; Urbina, H.; Rosenmann, E.; Gonzalez-Nilo, F.; Latorre, R. (2007). Dissection of the components for PIP₂ activation and thermosensation in TRP channels. *PNAS.* 104(24): 10246-10251.
- Brauchi, S.; Orta, G.; Salazar, M.; Rosenmann, E.; Latorre, R. (2006). A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. *J. Neurosci.* 26(18): 4835-4840.
- Caterina, M.; Schumacher, M.; Tominaga, M.; Rosen, T.; Levine, J.; Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816-824.
- Chatterjee, A.; Guo, J.; Lee, H.; Schultz, P. (2013). A genetically encoded fluorescent probe in mammalian cells. *J Am Chem Soc.* 135(34):12540-12543.
- Chin, J.; Cropp, T.; Anderson, C.; Mukherji, M.; Zhang, Z.; Schultz, P. (2003). An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science.* 301: 964-966.
- Cohen, M. R.; Moiseenkova-Bell, V. Y. (2014). Structure of thermally activated TRP channels. *Curr Top Membr,* 74: 181-211.
- Dahl, S. G.; Sylte, I.; Ravn, A. W. (2004). Structures and models of transporter proteins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 309, 853-860.
- De-la-Rosa, V. (2015). Estudio funcional y estructural de canales TRP (Tesis de doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Ciudad de México, México.
- De-la-Rosa, V.; Rangel-Yescas, G.; Ladrón-de-Guevara, E.; Rosenbaum, T.; Islas, L. (2013). Coarse Architecture of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Ion Channel Determined by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* 288: 29506-29517.
- Dhaka, A.; Uzzell, V.; Dubin, A.; Mathur, J.; Petrus, M.; Bandell, M.; Patapoutian, A. (2009). TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci.* 29: 153-158.
- Diaz-Franulic, I.; Poblete, H.; Miño-Galaz, G.; González, C.; Latorre, R. (2016). Allostereism and Structure in Thermally Activated Transient Receptor Potential Channels. *Annu. Rev. Biophys.* 45: 371-398.

- Falsig, S.; Owsianik, G.; Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. Elsevier, Cell Calcium. 38: 233-252.
- Fernandes, E.; Fernandes, M.; Keeble, J. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. British Journal of Pharmacology. 166: 510-521.
- Funjul, M. L.; Hiriart, M. (2009). Biología funcional de los animales. Siglo XXI editores. 2ª ed., pp. 467.
- Gahl, R.; Tekle, E.; Zhu, G.; Taraska, J.; Tjandra, N. (2015). Acquiring snapshots of the orientation of trans-membrane protein domains using a hybrid FRET pair. FEBS Letters 586: 885-889.
- Gordon, S.; Senning, E.; Aman, T.; Zagotta, W. (2016). Transition metal ion FRET to measure short-range distances at the intracellular surface of the plasma membrane. J. Gen. Physiol. 147: 189-200.
- Heuser, J. (2000). The Production of "Cell Cortices" for Light and Electron Microscopy. Traffic. 1: 545-552.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. J. Physiol. 40:iv-vii.
- Hille, B., (2001). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates.
- Inoue, K.; Koizumi, S.; Fuziwara, S.; Denda, S.; Inoue, K.; Denda, M. (2002). Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun. 291: 124-129.
- Islas, L. D.; De-la-Rosa, V.; Rodríguez-Cortés, B.; Rangel-Yescas, G. E.; Elias-Viñas, D. (2015). A simple method for fast temperature changes and its application to thermal activation of TRPV1 ion channels. J Neurosci Methods. 243: 120-125.
- Jara-Oseguera, A.; Bae, C.; Swartz, K. (2016). An external sodium ion binding site controls allosteric gating in TRPV1 channels. eLife. 5: 1-33.
- Jara-Oseguera, A.; Islas, L. (2013) The role of allosteric coupling on thermal activation of thermo-TRP channels. Biophys J. 104: 2160-2169.
- Klein, D. (2013). Química Orgánica. Editorial Médica Panamericana. 4ª ed. 157-158.
- Latorre, R.; Zaelzer, C.; Brauchi, S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. Q Rev Biophys. 42: 201-246.
- Lee, H.; Guo, L.; Lemke, E.; Dimla, R.; Schultz, P. (2009). Genetic incorporation of a small, environmentally sensitive, fluorescent probe into proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. J Am Chem Soc. 131(36): 12921-12923.

- Liao, M.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 504:107-125.
- Liu, B.; Qin, F. (2017). Single-residue molecular switch for high-temperature dependence of vanilloid receptor TRPV3. *PNAS*. 114 (7): 1589-1594.
- López-Macay, A.; Fernández-Torres, J.; Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. *Investigación en discapacidad*. 5 (3): 156-164.
- Miller, E. (2016). Small molecule fluorescent voltage indicators for studying membrane potential. *Curr Opin Chem Biol*. 33: 74-80.
- Morales-Lázaro, S.; Llorente, I.; Sierra-Ramírez, F.; López-Romero, A.; Ortiz-Rentería, M.; Serrano-Flores, B.; Simon, S.; Islas, L.; Rosenbaum, T. (2016). Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. *Nature*. 1-12.
- Morales-Lázaro, S.; Simon, S.; Rosenbaum, T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J. Physiol*. 591(13): 3109-3121.
- Moran, M.; Xu, H.; Clapham, D. (2004). TRP ion channels in the nervous system. Elsevier, *Current Opinion in Neurobiology*. 14: 362-369.
- Nilius, B.; Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*. 12: 218-229.
- Patapoutian, A.; Peier, A. M.; Story, G. M.; Viswanath, V. (2003). Thermotrp channels and beyond: mechanisms of temperatura sensation. *Nat Rev Neurosci*. 4: 529-539.
- Sakata, S.; Jinno, Y.; Kawanabe, A.; Okamura, Y. (2016). Voltage-dependent motion of the catalytic región of voltaje-sensing phosphatase monitored by a fluorescent amino acid. *PNAS*. 113: 7521-7526.
- Salazar, H.; Llorente, I.; Jara-Oseguera, A.; García-Villegas, R.; Munari, M.; Gordon, S.; Islas, L.; Rosenbaum, T. (2008). A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature*. 11: 255-261.
- Sánchez-Moreno, A. (2018). Caracterización de la inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Ciudad de México, México.
- Sánchez-Moreno, A.; Guevara-Hernández, E.; Contreras-Cervera, R.; Rangel-Yescas, G.; Ladrón-de-Guevara, E.; Rosenbaum, T.; Islas, L. (2018). Irreversible temperature gating in trpv1 sheds light on channel activation. *eLife*. 7:e36372.

- Schmied, W.; Elässer, S.; Uttamapinant, C.; Chin, J. (2014). Efficient Multisite Unnatural Amino Acid Incorporation in Mammalian Cells via Optimized Pyrrolysyl tRNA Synthetase/tRNA Expression and Engineered eRF1. *J. Am. Chem. Soc.* *136*: 15577-15583.
- Shaner, N. C. *et al.* (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* Red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* *22*: 1567-1572.
- Szallasi, A.; Blumberg, P. (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience.* *30*: 515-520.
- Venkatachalam, K.; Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* *76*:387-417.
- Wals, K.; Ovaa, H. (2014). Unnatural amino acid incorporation in *E. coli*: current and future applications in the design of therapeutic proteins. *Front. Chem.* *2*(15): 1-12.
- Wang, L.; Schultz, P. (2005). Expanding the Genetic Code. *Angew. Chem. Int. Ed.* *44*: 34-66.
- Wang, Q.; Wang, L. (2008). New Methods Enabling Efficient Incorporation of Unnatural Amino Acids in Yeast. *J Am Chem Soc.* *130*: 6066-6067.
- Winter, Z.; Buhala, A.; Ötvös, F.; Jósvay, K.; Vizler, C.; Dombi, G.; Szakoyi, G.; Oláh, Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel – an overview of the current mutational data. *Molecular Pain.* *9*:1-30.
- Yang, F.; Cui, Y.; Wang, K.; Zheng, J. (2010). Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *PNAS.* *107*(15): 7083-7088.
- Yang, F.; Xiao, X.; Cheng, W.; Yang, W.; Yu., P.; Song, Z., *et al.* (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat. Chem. Biol.* *11*: 518-524.
- Yao, J.; Liu, B.; Qin, F. (2010). Pore turret of termal TRP channels is not essential for temperatura sensing. *PNAS.* *107*(32): E125.
- Yao, J.; Liu, B.; Qin, F. (2011). Modular termal sensors in temperatura-gated transient receptor potential (TRP) channels. *PNAS.* *108* (27): 11109-11114.
- Zagotta, W.; Gordon, M.; Senning, E.; Munari, M.; Gordon, S. (2016). Measuring distances between TRPV1 and the plasma membrane using a noncanonical amino acid and transition metal ion FRET. *J. Gen. Physiol.* *147*: 201-216.
- Zhang, X. (2015). Molecular sensors and modulators of thermoreception. *Channels*, *9* (2): 73-81
- Zheng, J. (2013). Molecular Mechanism of TRP Channels. *Compr Physiol.* *3*: 221-242.