

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

Arquimedes Cheffer

**Identificação de resíduos de treonina e tirosina importantes
na regulação da atividade do receptor P2X4 humano através
de mutagênese sítio-dirigida**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

**Data de depósito na S.P.G.
09/05/2013**

Arquimedes Cheffer

**Identificação de resíduos de treonina e tirosina importantes
na regulação da atividade do receptor P2X4 humano através
de mutagênese sítio-dirigida**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cheffer, Arquimedes
C515i Identificação de resíduos de treonina e tirosina importantes
na regulação da atividade do receptor P2X4 humano através de
mutagênese sítio-dirigida / Arquimedes Cheffer. -- São Paulo,
2013.
87p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Ulrich, Alexander Henning

1. Fosforilação de proteína : Bioquímica I. T. II. Ulrich,
Alexander Henning, orientador.

574.19245 CDD

*Os meus pais
e mestres.*

Agradecimentos

Ao professor Henning Ulrich, por ter me proporcionado mais uma vez a oportunidade de trabalhar com ele e fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação, tempo e paciência dedicados a mim.

Ao grupo do Laboratório de Neurociências, por esse tempo de convivência agradável e de bastante descontração. Gostaria de agradecer em especial à Micheli Mainardi Pillat e Sophia La Banca, porque trabalhar ao lado delas tem sido uma fonte de constante aprendizado e com elas tenho feito o que talvez seja a maior experiência dentro de um laboratório – experimentar o valor de uma verdadeira amizade.

Também agradeço à professora Telma Schwindt pelas nossas conversas e discussões; por estar sempre presente e disposta em todos os momentos; pela amizade que desenvolvemos.

À minha, meus pais e minhas irmãs. Mesmo distantes, sempre foram uma fonte inesgotável de ajuda, alegria, ânimo e inspiração.

A todos os amigos que fiz em São Paulo e tornaram minha permanência aqui uma experiência única.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que nominalmente não foram citados aqui, mas participaram de alguma forma na execução deste trabalho. Saibam que em algum lugar desse trabalho existe um tijolo que foi colocado por vocês.

Agradeço às agências que financiaram meu projeto, CNPq e FAPESP, sem as quais a realização desse trabalho seria praticamente impossível.

Veni, vidi, vici.

Júlio César – Imperador Romano

(Cheffer, A.) **Identificação de resíduos de treonina e tirosina importantes na regulação da atividade do receptor P2X4 humano através de mutagênese sítio-dirigida.** 2013. 87p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O receptor P2X4 (canal iônico controlado por adenosina-5'-trifosfato-ATP) está amplamente distribuído no sistema nervoso central e, após sua ativação, pode regular os níveis de cálcio intracelulares via permeação direta e por ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes. Tem sido proposto que a atividade do receptor pode ser importante na plasticidade sináptica. Tendo em vista a importância do receptor P2X4, sobretudo na fisiologia do sistema nervoso central, é útil caracterizá-lo farmacologicamente e entender os mecanismos moleculares que regulam sua atividade. Examinamos o papel que resíduos específicos N- e C-terminais desempenham na atividade do receptor P2X4 humano, combinando técnicas de biologia molecular, bioquímica e *patch-clamp* em células de rim de embrião humano (células HEK-293T). Células HEK-293T expressando o receptor P2X4 *wild-type* apresentaram correntes iônicas, cujas amplitudes dependeram da concentração de ATP, fornecendo um valor de EC₅₀ de $1,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$. Os receptores mutantes E14A e D16A exibiram respostas ao ATP equiparáveis àquelas do receptor selvagem, ao passo que os mutantes Y15A e T17A não foram funcionais, apesar de serem expressos na membrana plasmática das células. A inibição de tirosina fosfatases por pervanadato diminuiu fortemente correntes induzidas por ATP.

Subsequente análise de citometria de fluxo na presença de um anticorpo contra resíduos de fosfotirosina indicaram que, entre as células que expressam o receptor P2X4, a percentagem de células fosfo-tirosina-positivas é a mesma para os mutantes Y372A ($86 \pm 10\%$) e Y378A ($79 \pm 6.9\%$), mas substancialmente menor para os mutantes Y15A ($35 \pm 12\%$), Y367A ($48 \pm 6.4\%$) e Y372F ($31 \pm 1.7\%$), quando comparados com células que expressam o receptor *wild-type* ($76 \pm 5.6\%$). Resultados semelhantes foram obtidos quando quantificamos a expressão relativa de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina e expressamos através dos valores de intensidade de fluorescência média. Ensaios de *western-blot* revelaram que mesmo o mutante T17A é fosforilado em resíduos de treonina, sugerindo que o receptor P2X4 contém outros sítios de fosforilação. Entretanto, nenhum sinal de fosfotirosina foi detectado no receptor *wild-type* e nos mutantes, em que resíduos de tirosina foram substituídos por alanina ou fenilalanina. Não parece ser o resíduo Y¹⁵ o alvo de tal fosforilação, cabendo a ele um papel estrutural mais importante. Nossos dados também sugerem que a fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas intermediárias regula a atividade do receptor P2X4.

Palavras-chave: receptor P2X4, resíduos de treonina e tirosina, fosforilação.

(Cheffer, A.) **Identification of important threonine and tyrosine residues for the regulation of the human P2X4 receptor activity.**

2013. 87p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The human P2X4 receptor (ATP-gated ion channel) is widely distributed in the CNS and, after activation, participates in regulation of levels of intracellular calcium through direct permeation and activation of voltage-dependent calcium channels with well-defined functions including synaptic plasticity. Given the importance of the P2X4 receptor, especially in CNS physiology, we investigated the role that specific N- and C-termini residues play in human P2X4 receptor activity, by combining techniques of molecular biology, biochemistry and patch-clamp in human embryonic kidney cells (HEK-293T cells). HEK-293T cells expressing the wild-type P2X4 receptor showed ionic currents whose amplitudes depended on the ATP concentration, providing an EC_{50} value of $1.37 \pm 0.21 \mu\text{M}$. E14A and D16A receptor mutants exhibited responses to ATP comparable to those ones of wild-type receptor, whereas Y15A and T17A mutants were not functional, despite being expressed in the plasma membrane of cells. The inhibition of tyrosine phosphatases by pervanadate decreased strongly ATP-induced currents. Subsequent flow cytometry analysis in the presence of an antibody against phosphotyrosine residues indicated that, among the cells that express the P2X4 receptor, the percentage of phosphotyrosine-positive cells is the same for Y372A ($86 \pm 10\%$) and Y378A ($79 \pm 6.9\%$) mutants, however, substantially lesser for Y15A

($35 \pm 12\%$), Y367A ($48 \pm 6.4\%$) and Y372F ($31 \pm 1.7\%$) mutants when compared with cells expressing wild-type receptor ($76 \pm 5.6\%$). Similar results were obtained by quantifying the relative expression of phosphotyrosine proteins. Western blot assays revealed that even T17A mutant is phosphorylated at threonine residues, suggesting that the human P2X4 receptor also contains further phosphorylation sites. However, no phosphotyrosine signal was detected in the wild-type receptor and mutants in which tyrosine residues were replaced by alanine or phenylalanine. The residue Y15 is supposedly not the target of such phosphorylation, despite its important structural role. However, the present work indicates that tyrosine phosphorylation of intermediate signaling proteins regulates P2X4 receptor activity.

Keywords: P2X4 receptor, threonine and tyrosine residues, phosphorylation.

1	Introdução	12
1.1	A descoberta do ATP como um neurotransmissor.....	12
1.2	Receptores purinérgicos.....	14
1.2.1	O receptor P2X4.....	20
1.2.2	Regulação da atividade dos receptores P2X por quinases.....	22
2	Objetivos	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	Materiais e métodos	31
3.1	Cultura de células.....	31
3.2	Transfecção das células HEK-293T.....	31
3.3	Mutagênese sítio-dirigida.....	32
3.4	Preparação de bactérias eletrocompetentes.....	33
3.5	Transformação das bactérias com DNA plasmidial.....	34
3.6	Isolamento do plasmídeo das bactérias transformadas.....	35
3.7	Sequenciamento.....	35
3.8	<i>Western-blot</i>	36
3.9	Citometria de fluxo.....	37
3.10	Marcação da membrana plasmática e microscopia de fluorescência.....	38
3.11	<i>Whole-cell current recording</i>	38
3.12	Método de aplicação rápido de ligante.....	39
3.13	Microfluorimetria.....	39
3.14	Análise estatística.....	40
4	Resultados	43
4.1	Análise do plasmídeo pCMV-P2X4-GFP.....	43
4.2	Expressão e caracterização do receptor P2X4 humano.....	44
4.3	Mutagênese sítio-dirigida da extremidade N-terminal.....	45
4.4	Expressão e caracterização dos mutantes N-terminais.....	48
4.5	Estudos posteriores na posição Y ¹⁵	51
4.6	Mutagênese sítio-dirigida da extremidade C-terminal.....	53
4.7	Análise de citometria de fluxo.....	56
4.8	Imunoprecipitação, <i>western-blot</i> e microfluorimetria.....	59
4.9	Imunoprecipitação e <i>western-blot</i> para o mutante T17A.....	62

Sumário

5	Discussão	64
5.1	O resíduo Thr17 é fundamental para a atividade do receptor P2X4 humano, mas não é o único que deve ser fosforilado por PKC.....	64
5.2	A atividade do receptor P2X4 depende de determinados resíduos de tirosina, mas parece não estar relacionada a fosforilação direta do receptor por tirosina quinases.....	68
6	Conclusões	75
7	Referências	77

*Oh tell me Lord how could it be
That though our cells make ATP,
It's not all used for energy,
But sometimes is secreted free.
It puzzles you, it puzzles me,
While Geoffrey Burnstock smiles with glee
at the many roles of ATP.*
Samuel C. Silverstein.

1.1. A descoberta do ATP como um neurotransmissor

Em 1929, o pesquisador alemão Karl Lohman e os pesquisadores americanos Ciro Hartwell Fiske e Yellagaprada Subarrow, trabalhando independentemente, descobriram a molécula de adenosina-5'-trifosfato/ATP (Lohman, 1929; Fiske e Subarrow, 1929). Nesse mesmo ano, também surgiram os primeiros indícios de que o ATP, além de seu papel no metabolismo energético, também poderia exercer ações extracelulares. Drury e Szent-Györgyi verificaram, por exemplo, que a administração intravenosa de ATP promovia bradicardia, hipotensão arterial e inibia a contração da musculatura lisa do tubo digestório (Drury e Szent-Györgyi, 1929). Cerca de duas décadas mais tarde, constatou-se que o ATP também era capaz de potencializar a contração da musculatura esquelética desencadeada pela acetilcolina (Buchtahl e Folkow, 1948). Mas a evidência mais direta do papel do ATP como molécula sinalizadora surgiu apenas em 1959, ano em que Pamela Holton demonstrou que os nervos sensoriais de coelho liberavam ATP quando eram estimulados eletricamente, o que resultava em

Capítulo 1: Introdução

vasodilatação cutânea. A partir desses resultados, foi proposto que, assim como a noradrenalina, o ATP também poderia ser liberado pelas terminações nervosas para o espaço extracelular e atuar como uma molécula sinalizadora na transmissão do impulso nervoso (Holton, 1959).

Embora muitos trabalhos da primeira metade do século XX já descrevessem as ações extracelulares do ATP, foi apenas na década de 60 que Geoffrey Burnstock e seus colegas propuseram que o ATP poderia também atuar como um neurotransmissor. Essa hipótese partiu de observações de que a musculatura lisa do trato digestório de porquinhos-da-índia respondia ao estímulo nervoso mesmo quando antagonistas de receptores adrenérgicos e colinérgicos estavam presentes (Burnstock et al., 1963). Naquela época, ficou claro que a condução nervosa estava sendo feita por outro neurotransmissor que não fosse nem adrenalina, nem acetilcolina. No final da década de 60, vieram as primeiras evidências de que a molécula sinalizadora era realmente o ATP. Burnstock demonstrou que o ATP era capaz de induzir, na musculatura lisa do cólon e da vesícula de porquinhos-da-índia, uma resposta similar àquela observada com o estímulo nervoso, mesmo quando bloqueadores colinérgicos e adrenérgicos eram utilizados juntos (Burnstock et al., 1970). Ainda assim, a ideia de que o ATP fosse um neurotransmissor encontrou bastante resistência, em parte, por se tratar de uma molécula intracelular que atua como fonte de energia em todas as células. Considerava-se que, provavelmente, tal molécula ubíqua não agiria como um neurotransmissor, muito embora já se soubesse da existência de enzimas envolvidas no catabolismo extracelular do ATP.

Capítulo 1: Introdução

Originalmente, a hipótese proposta por Burnstock era de que o ATP fosse um neurotransmissor liberado por nervos distintos daqueles que liberam acetilcolina ou noradrenalina. Entretanto, confirmou-se posteriormente que o ATP era liberado junto com a noradrenalina, como um cotransmissor. Essa observação estava de acordo com o fato de que a musculatura lisa deixava de responder ao estímulo nervoso quando a liberação dos neurotransmissores era bloqueada com guanidina ou betrílio (Burnstock et al., 1970). Ademais, dois outros resultados corroboraram o papel do ATP como um cotransmissor: (i) o tratamento com α,β -metileno-ATP, um agente que dessensibiliza receptores P2, bloqueava a resposta da musculatura lisa dos ductos deferentes de porquinhos-da-índia; (ii) o tratamento com reserpina, um agente que leva à depleção de noradrenalina, mas não de ATP, não interferia com a resposta da musculatura lisa (Sneddon e Burnstock, 1984; Kirkpatrick e Burnstock, 1987). Cabe ressaltar que também surgiram evidências de que o ATP poderia ser liberado junto com acetilcolina (Schweitzer, 1987).

Apesar da resistência que a hipótese purinérgica sofreu inicialmente, hoje dispomos de evidências mais do que suficientes para o papel do ATP como um neurotransmissor e praticamente todas as sinapses investigadas até o momento, estejam elas no sistema nervoso central ou periférico, contam com a participação do ATP, mesmo que em níveis variáveis (Burnstock, 2004).

1.2. Receptores purinérgicos

Como toda molécula sinalizadora, esperava-se que o ATP também tivesse receptores específicos nas células alvo de seus efeitos. De fato, em 1976 definiram-se os receptores purinérgicos e, dois anos mais tarde, lançou-

Capítulo 1: Introdução

se a base para distingui-los entre receptores P1 e P2, os quais respondem a adenosina e ATP/ADP, respectivamente (Burnstock, 1978). A figura 1.1 apresenta um esquema de como os receptores purinérgicos estão classificados, seus agonistas fisiológicos e catabolismo do ATP.

Os receptores de adenosina (receptores P1) são todos acoplados à proteína G e, até o momento, foram clonados quatro diferentes subtipos: os receptores A₁ e A₃ (reduzem a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico/AMPC), e os receptores A_{2A} e A_{2B} que, através da ativação da adenilato ciclase, aumentam os níveis intracelulares de AMPC (Figura 1.1). A interação da adenosina com os receptores A₁ e A₃ também resulta na ativação da fosfoinositideo 3-quinase (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) e proteína quinase C (*protein kinase C*, PKC), ao passo que todos os receptores estimulam a via da proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (Stagg e Smyth, 2010). Em condições fisiológicas, a adenosina atua principalmente através dos receptores A₁ e A_{2A}, pelos quais ela tem maior afinidade. Entretanto, sob condições patológicas, quando concentrações maiores de adenosina são alcançadas, os receptores A_{2B} e A₃ também se tornam relevantes (Ohta et al., 2006).

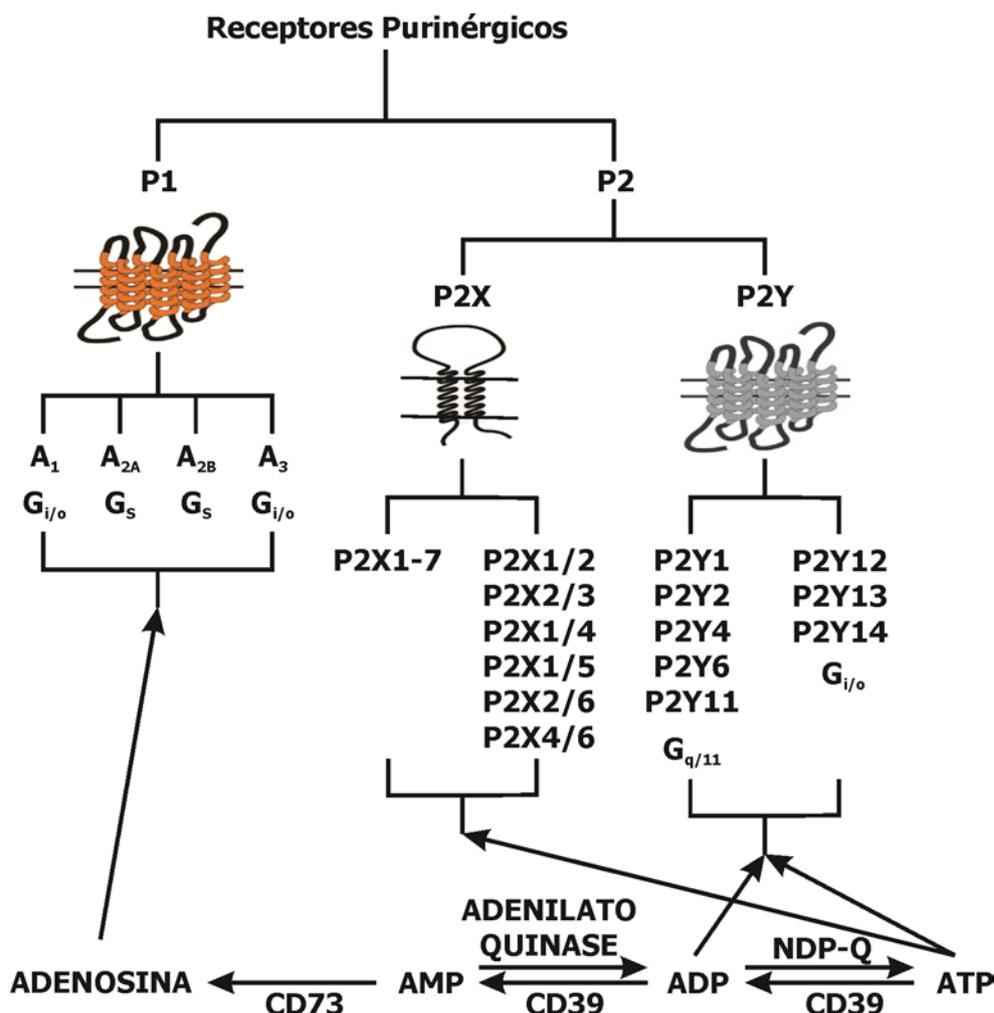


Figura 1.1. Sinalização purinérgica: receptores, agonistas fisiológicos, vias de sinalização e metabolismo do ATP. Os receptores purinérgicos são classificados em P1 e P2 de acordo com seus agonistas endógenos; enquanto os receptores P1 são ativados pelo nucleosídeo adenosina, os receptores P2 são ativados por nucleotídeos de adenina e uridina (alguns subtipos de receptores P2Y são ativados por UDP e UTP, como mencionado no texto, embora não mostrado aqui). Os receptores P2X, por sua vez, são divididos em P2X (canais iônicos) e P2Y (receptores acoplados à proteína G). Os receptores P2X podem ser homoméricos ou heteroméricos, de acordo com a composição de subunidades. NDP-Q = nucleosídeo difosfato quinase.

Por outro lado, os receptores P2 foram, em 1985, com base em suas propriedades farmacológicas, divididos em duas subfamílias: os receptores P2X e P2Y. Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ATP, ao passo

Capítulo 1: Introdução

que os receptores P2Y pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína G (Ralevic e Burnstock, 1998). Até o momento, oito subtipos de receptores P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) foram clonados em mamíferos e funcionalmente caracterizados. Diferentemente dos receptores P2X, que são ativados apenas por ATP em condições fisiológicas, os receptores P2Y podem ser ativados por ADP (P2Y1, 12 e 13), UDP (P2Y6), UTP (P2Y4), ATP e UTP (P2Y2 e 11), e, até mesmo, por UDP-glicose (P2Y14) (Abbracchio et al., 2006; Abbracchio et al., 2008). Os receptores P2Y podem, por sua vez, ser divididos em dois subgrupos de acordo com a seletividade de acoplamento a subtipos da proteína G (Figura 1.1). Dessa forma, nós temos o subgrupo composto pelos receptores P2Y1, 2, 4, 6 e 11, que se ligam à proteína G_q/G_{11} , levando à ativação da fosfolipase $C\beta$ (PLC), consequente formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e mobilização de cálcio a partir de estoques intracelulares; e o subgrupo formado pelos receptores P2Y12, 13 e 14, que interagem com a proteína G_i/G_o , resultando em inibição da adenilato ciclase e consequente redução nos níveis intracelulares de AMPc (Abbracchio et al., 2006; Abbracchio et al., 2008). O receptor P2Y11 também pode interagir com a proteína G_s , o que leva à ativação da adenilato ciclase e aumento na concentração intracelular de AMPc. Curiosamente, enquanto o agonista ATP provoca o acoplamento do receptor P2Y11 às proteínas G_q e G_s , a interação com o agonista UTP parece resultar apenas na ativação da proteína G_q (White et al., 2003).

Com respeito aos receptores P2X, sete subunidades (P2X1 a 7) foram identificadas em espécies de mamíferos e nos mais diversos órgãos, podendo

Capítulo 1: Introdução

formar receptores homoméricos (P2X1 a 7) e heteroméricos (P2X1/2, P2X2/3, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/6 e P2X4/6) (Figura 1.1) (Burnstock, 2007). Também existem evidências de que as subunidades P2X4 e P2X7 podem se associar e formar receptores funcionais (Guo et al., 2007) Tais receptores estão envolvidos em uma ampla faixa de processos fisiológicos e patológicos, desde a percepção sensorial, diferenciação neuronal e controle da musculatura lisa à inflamação crônica e dor neuropática (Roberts et al., 2006; Burnstock, 2008).

Os receptores P2X são formados por três subunidades protéicas, cada uma das quais possuindo dois domínios transmembrânicos (TM1 e TM2), o primeiro relacionado com o processo de abertura do canal e o segundo revestindo internamente o poro iônico (Burnstock, 2006); extremidades amino- e carbóxi-terminais intracelulares e uma grande alça extracelular de cerca de 280 resíduos de aminoácidos; 93 desses resíduos estão conservados em, pelo menos, seis membros da família de receptores P2X e poderiam, portanto, estar envolvidos no sítio de ligação para o agonista ATP (Roberts et al., 2006; Vial et al., 2004). Essa alça extracelular é glicosilada e os dez resíduos de cisteína conservados formam ligações dissulfeto para conferir ao receptor sua estrutura secundária característica (Figura 1.2) (Vial et al., 2004). Todos os canais são permeáveis a sódio, potássio e cálcio (Egan et al., 2006).

Embora tais informações estruturais tenham sido inicialmente inferidas a partir do alinhamento das sequências das subunidades dos receptores P2X e de sua comparação com proteínas que ligam ATP, como as aminoacil-RNAt sintetases, tais dados vieram a ser confirmados em 2009, quando a estrutura

Capítulo 1: Introdução

tridimensional do receptor P2X4 foi determinada por cristalografia de raios X (Freist et al., 1998; Kawate et al., 2009).

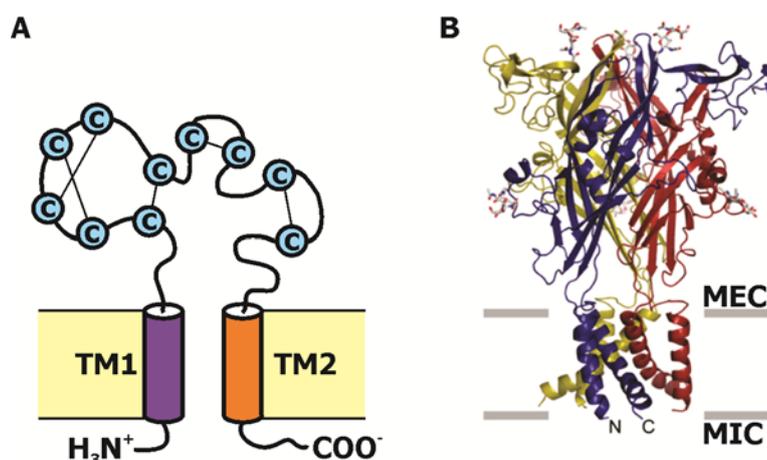


Figura 1.2. Estrutura dos receptores P2X. (A) Representação esquemática de uma subunidade P2X. Cada subunidade possui dois segmentos transmembrânicos (TM1 e TM2), extremidades N- e C-terminais intracelulares e uma grande alça extracelular, em que dez resíduos de cisteína conservados fazem ligações dissulfeto entre si. (B) Estrutura cristalográfica do receptor P2X. Cada receptor P2X é formado por três subunidades (aqui mostradas nas cores amarelo, azul e vermelho), que podem ser iguais (receptores homoméricos) ou diferentes (receptores heteroméricos). Há uma predominância de folhas β (alças extracelulares), mas o receptor possui também um total de seis α -hélices transmembrânicas (duas por subunidade) (modificado de Kawate et al., 2009). MEC = meio extracelular; MIC = meio intracelular.

O metabolismo do ATP aos seus metabólitos ADP, AMP e adenosina, e consequentemente, a regulação da sinalização purinérgica, é um processo altamente regulado por uma família de ecto-nucleotidases localizadas na superfície da célula, que inclui as nucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolases (NTPDases; oito foram identificadas em humanos) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73) (Zimmermann et al., 2012). O AMP é gerado pelo catabolismo do ATP via o intermediário ADP em duas reações catalisadas predominantemente por CD39 (NTPDase-1), com pequenas quantidades de ADP sendo liberadas, ao

Capítulo 1: Introdução

passo que CD73 catalisa a conversão do AMP a adenosina. Portanto, CD39 e CD73 atuam em conjunto para converter ATP a adenosina. Enquanto as reações catalisadas por CD39 são reversíveis pela ação das enzimas NDP quinase (nucleosídeo difosfato quinase) e adenilato quinase localizadas extracelularmente, a conversão de AMP a adenosina por CD73 é reversível apenas se a adenosina é recaptada pelas células, dentro das quais ela pode ser convertida a AMP pela adenosina quinase (Stewart e Smyth, 2011). Embora a atividade de CD73 possa ser compensada por fosfatases alcalinas em determinadas situações, sabe-se que CD73 é essencial para a conversão do AMP a adenosina em condições fisiológicas.

1.2.1. O receptor P2X4

O receptor P2X4 está amplamente distribuído no sistema nervoso central, ocorrendo tanto na medula quanto no cérebro, incluindo giro dentado, regiões CA1/CA3 do hipocampo e células de Purkinje do cerebelo (Séguéla et al., 1996; Soto et al., 1996; Rubio e Soto, 2001); está particularmente localizado em sinapses glutamatérgicas (Rubio e Soto, 2001). Após ativação, o receptor P2X4 pode regular os níveis de cálcio intracelulares via permeação direta e por ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes. Tem sido proposto, portanto, que a atividade do receptor deve ser importante na plasticidade sináptica (Pankratov et al., 2002; Wang et al., 2004). Cabe ainda ressaltar o papel que o receptor P2X4 desempenha em determinadas condições patológicas. Após injúria de algum nervo periférico, as células da microglia (células imunocompetentes do sistema nervoso central) na medula espinhal aumentam a expressão desse subtipo de receptor purinérgico.

Capítulo 1: Introdução

Descobertas recentes sugerem que a ativação desses receptores nas células da microglia leva à liberação de fatores neurotróficos que medeiam a hipersensibilidade à dor, o que torna o receptor P2X4 um alvo promissor no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dor neuropática (dor crônica decorrente de lesão em algum nervo periférico, podendo ser causada por doença, infecção ou injúria física) (Trang et al., 2006).

Além de ser o subtipo de receptor P2X predominante no cérebro, o receptor P2X4 apresenta uma ampla distribuição em outros tecidos, como vasos sanguíneos e leucócitos, sugerindo seu envolvimento em uma gama de respostas biológicas em diversos tecidos (Soto et al., 1996). Ademais, nosso grupo de pesquisa verificou que os receptores purinérgicos, incluindo o receptor P2X4, desempenham um papel importante nos processos de proliferação e diferenciação das células pluripotentes P19 (células de carcinoma embrionário murino) em neurônios (Resende et al., 2008; Resende et al., 2007).

O receptor P2X4 de rato é ativado por ATP, mas não por α,β -metileno-ATP. A característica mais útil das correntes iônicas induzidas por ATP nesse receptor é a sua potencialização pela ivermectina, o que não ocorre com os demais receptores homoméricos e heteroméricos (North, 2002). Suramina e PPADS (piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfonato), antagonistas mais conhecidos de receptores purinérgicos, têm pouco ou nenhum efeito sobre a atividade do receptor P2X4 de rato (North, 2002). O receptor P2X4 de origem humana se assemelha mais ao murino, no sentido de que é ativado por α,β -metileno-ATP e inibido por suramina e PPADS (Jones et al., 2000).

Capítulo 1: Introdução

Enquanto os receptores P2X1 e P2X3 são classificados como aqueles que apresentam dessensibilização rápida (decaimento de >90% da corrente iônica dentro de 1-2 segundos), os demais subtipos, incluindo o receptor P2X4, apresentam decaimento de corrente lento (Egan et al., 2006).

1.2.2. Regulação da atividade dos receptores P2X por quinases

Conforme mencionamos, os receptores P2X estão envolvidos em uma série de processos fisiológicos e patológicos, o que reflete o fato de que tais receptores são altamente expressos por uma variedade de células em nosso organismo. Conseqüentemente, são também de importância vias de sinalização intracelulares que regulam a atividade desses receptores. É descrito, por exemplo, que as correntes iônicas induzidas pelos receptores P2X3 e P2X2/3 são aumentadas pela substância P, bradicinina e pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide/CGRP*), um potente agente vasodilatador e pró-inflamatório (Paukert et al., 2001; Chen et al., 2005; Fabbretti et al., 2006). Embora não se conheçam exatamente os mecanismos por trás dessa regulação, um mecanismo óbvio seria a fosforilação mediada pela proteína quinase C (*protein kinase C/PKC*). O alinhamento das sequências das extremidades N-terminais dos receptores P2X revela a existência de um sítio de fosforilação por PKC (TXR/K) altamente conservado entre os membros dessa família de receptores (Figura 1.3).



Figura 1.3. Similaridade das extremidades N-terminais dos receptores P2X.

O alinhamento das sequências das extremidades amino-terminais dos receptores P2X foi feito utilizando o algoritmo T-COFFEE. Perceba que, além de um sítio de fosforilação por PKC (TXR/K), todos os receptores P2X possuem um resíduo de tirosina (*) altamente conservado em suas extremidades N-terminais.

Ensaio de mutagênese sítio-dirigida foram feitos para determinar o papel desse sítio na regulação da atividade dos subtipos de receptores P2X (Figura 1.3). Para o receptor P2X1, a substituição do resíduo de treonina por um resíduo de alanina resulta em menor resposta ao ATP, enquanto o receptor P2X3, com a mesma mutação, não é funcional (Brown e Yule, 2007; Ennion e Evans, 2002). Surpreendentemente, para o receptor P2X2, o sítio de fosforilação por PKC parece ser importante no controle da cinética de dessensibilização desse receptor. Em contraste com o receptor do tipo selvagem, que não se dessensibiliza no decorrer do tempo de aplicação do agonista ATP, o mutante treonina/alanina apresenta cinética rápida e se dessensibiliza completamente em menos de 5 segundos (Boué-Grabot et al., 2000). Trabalho prévio já havia mostrado que a inibição da calcineurina, uma proteína fosfatase, resultava em menor taxa de dessensibilização dos receptores P2X3 (King et al., 1997). Juntos, esses dados pareciam indicar que os receptores P2X são realmente alvos da fosforilação por PKC. De fato, Boué-

Capítulo 1: Introdução

Grabot e colaboradores constataram, empregando uma anticorpo monoclonal anti-fosfo-treonina, que o receptor P2X2 é fosforilado (Boué-Grabot et al., 2000). Existem também evidências de que o receptor P2X1, cuja resposta ao ATP é potencializada pelo ativador de PKC, PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), também seja fosforilado por PKC (Liu et al., 2006).

Entretanto, a fosforilação dos receptores P2X por PKC ainda é alvo de controvérsias. Em trabalho de 2007, Franklin e colaboradores demonstraram que, muito embora PMA seja capaz de aumentar as correntes iônicas induzidas pelo receptor P2X3, esse efeito parece não ser mediado diretamente pela fosforilação do receptor P2X3 por PKC. Resultados semelhantes foram obtidos com o receptor P2X2, exceto pelo fato de que esse receptor não tem sua resposta regulada por PMA (Franklin et al., 2007). Um grupo de pesquisa nos EUA chegou à mesma conclusão, trabalhando com o receptor P2X3 (Brown e Yule, 2007).

Esforços também têm sido dedicados para identificar resíduos ou mesmo motivos na extremidade C-terminal que sejam importantes no controle da atividade dos receptores P2X (veja a figura 1.4 para os motivos identificados até o momento).

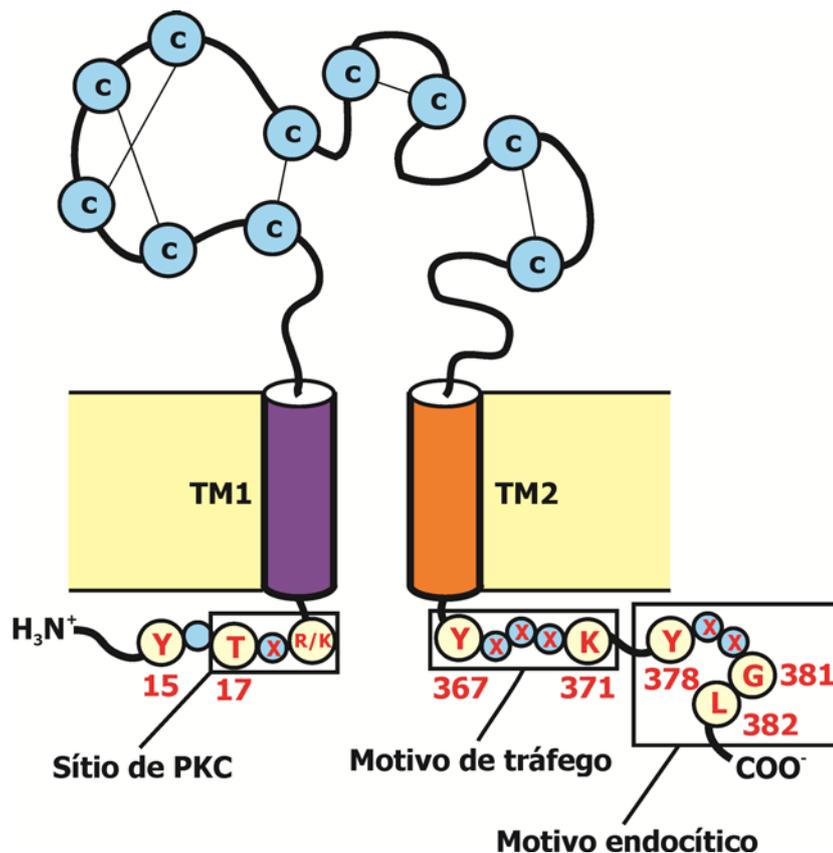


Figura 1.4. Motivos intracelulares conservados entre os receptores P2X. Conforme discutido no texto, todos os receptores P2X possuem um resíduo de tirosina (Y¹⁵; os números correspondem à sequência do receptor P2X4 humano) conservado na extremidade N-terminal. Também são conservados um sítio de fosforilação por PKC (Thr¹⁷-X-R/K) N-terminal e um motivo envolvido no transporte do receptor para a membrana, o motivo C-terminal Y³⁶⁷-X-X-X-K³⁷¹). O receptor P2X4 também possui um motivo endocítico C-terminal (Y³⁷⁸-X-X-G-L³⁸²).

Por exemplo, o motivo YXXXX presente na extremidade C-terminal de todos os subtipos de receptores P2X, é necessário para que os mesmos sejam expressos na membrana plasmática; mutações nesse motivo resultam em menor expressão devido à internalização mais rápida dos receptores. Esse motivo foi cunhado, por isso, de motivo de tráfego (*trafficking motif*) (Chaumont et al., 2004). Outro motivo foi identificado apenas no receptor P2X4 e também está envolvido no controle de sua expressão a nível de

Capítulo 1: Introdução

membrana plasmática – o motivo YXXGL. A substituição do resíduo de tirosina por um resíduo de alanina diminui significativamente a expressão citoplasmática do receptor, ao mesmo tempo em que aumenta sua expressão na membrana celular. Isso indica que o motivo C-terminal YXXGL é necessário para o processo de endocitose do receptor P2X4, embora pouco se sabe ainda sobre os mecanismos envolvidos (Royle et al., 2002). Mais uma vez, contudo, o mecanismo parece depender da atividade de proteínas quinases.

Sabe-se que, quanto maior a concentração intracelular de AMPc, maiores são as correntes induzidas pela ativação do receptor P2X4 (Brown et al., 2004). Isso levantou a possibilidade de que a proteína quinase A (*protein kinase A*/PKA), um dos efetores ativados por AMPc, também pudesse estar envolvida na regulação da atividade do receptor P2X4. É claro que, se esse for o caso, não envolve fosforilação direta do receptor, visto que o mesmo não possui nenhum sítio de fosforilação por PKA na extremidade C-terminal. De fato, trabalho recente tem mostrado que a inibição de PKA impede o aumento das correntes conduzidas pelo receptor P2X4, com concentrações crescentes de AMPc. Esse dado claramente demonstra que a ativação de PKA é necessária para o efeito observado com níveis crescentes de AMPc. Interessantemente, foi constatado, através de mutagênese sítio-dirigida, que o efeito de PKA depende da integridade do motivo endocítico YXXGL. Quando esse motivo é mutado para AXXAA, não se observa mais o efeito desencadeado por forskolina que, ao ativar a adenilato ciclase, aumenta a concentração intracelular de AMPc. Assim, propôs-se um modelo, de acordo com o qual, PKA poderia fosforilar e inibir proteínas acessórias envolvidas na

Capítulo 1: Introdução

endocitose do receptor P2X₄, aumentando sua expressão na membrana plasmática (o que foi, de fato, observado no trabalho mencionado anteriormente). Isso explicaria o aumento que a ativação de PKA provoca nas correntes induzidas pelo receptor P2X₄ (Brown e Yule, 2010).

Embora a fosforilação do receptor P2X₁ na sua extremidade N-terminal tenha sido demonstrada por *western-blot*, a análise por espectrometria de massa de fragmentos do receptor obtidos a partir da digestão com tripsina revelou que o mesmo é basalmente fosforilado nos resíduos S387, S388 e T389, mas não no resíduo T18 (os números correspondem à sequência do receptor humano, usado nesse trabalho) (Liu et al., 2006; Roberts et al., 2012). Nesse mesmo trabalho, os autores também investigaram a contribuição da fosforilação para as propriedades do receptor P2X₁ através da construção dos mutantes T389A, S387A-S388A e S387A-S388A-T389A. Enquanto o mutante T389A mostrou amplitudes de corrente e taxa de dessensibilização equiparáveis àquelas do receptor do tipo selvagem, os demais mutantes apresentaram amplitudes de corrente e taxas de dessensibilização maiores quando comparados com o receptor não-mutado (Roberts et al., 2012). Uma vez que esses resíduos não fazem parte de nenhuma sequência consenso para fosforilação, ainda não sabemos quais são as quinases envolvidas.

Não somente a regulação da atividade dos receptores P2X por serina/treonina quinases (PKA e PKC), mas também sua possível regulação por tirosina quinases tem também chamado a atenção. É digno de nota que todos os receptores P2X possuem um resíduo de tirosina altamente conservado nas suas extremidades N-terminais (Figura 1.3) e que tanto o

Capítulo 1: Introdução

motivo envolvido na estabilização do receptor na membrana (YXXXX) quanto o motivo endocítico (YXXGL) baseiam-se, em parte, em resíduos de tirosina. Ademais, dados mostram que esses resíduos de tirosina são fundamentais para o correto funcionamento do receptor. Por exemplo, os mutantes Y16F (extremidade N-terminal) e Y363F (motivo YXXXX) do receptor P2X1 retêm apenas 2,2% e 26% da atividade do receptor do tipo selvagem, enquanto os mutantes Y362F e Y370F não são funcionais apesar de serem expressos na membrana citoplasmática (Toth-Zsomboki et al., 2002). No caso do receptor P2X4, verificou-se que os mutantes Y367A (motivo YXXXX) e Y372A não são funcionais, muito embora também atinjam a membrana citoplasmática (Fountain e North, 2006). Apesar dos resultados mencionados acima, pelo menos, para o receptor P2X1, nenhuma fosforilação de resíduos de tirosina foi detectada em imunoprecipitados (Toth-Zsomboki et al., 2002). Para o receptor P2X4, isso carece de maiores investigações.

Conhecemos apenas dois trabalhos, mostrando que receptores P2X são fosforilados em resíduos de tirosina. O primeiro foi feito com o receptor P2X3 de rato. Nesse trabalho, os autores, através do alinhamento de sequências, verificaram a similaridade entre as extremidades C-terminais do receptor P2X3 e Src. Src é uma tirosina quinase, cuja própria atividade é regulada por fosforilação de um resíduo de tirosina localizado em seu domínio C-terminal. Tal fosforilação é catalisada por *C-terminal Src kinase* (Csk). Assim, talvez também fosse possível que o receptor P2X3 fosse fosforilado por Csk. Os autores comprovaram, através de ensaio enzimático, que, de fato, Csk fosforila o receptor P2X3 no resíduo Y393 e inibe fortemente as correntes

Capítulo 1: Introdução

induzidas pelo receptor. Tal resultado foi ainda confirmado pela observação de que o mutante Y393A é insensível à ação de Csk (D'Arco et al., 2009). É importante ressaltar que o resíduo de tirosina em questão não faz parte de nenhum dos motivos mencionados anteriormente. O segundo trabalho diz respeito ao receptor P2X7, para o qual o resíduo Y³⁴³ foi identificado como um sítio de fosforilação (Kim et AL., 2001).

Dada a importância do receptor P2X4 na fisiologia do sistema nervoso central e o fato de que pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de regulação da atividade do receptor, nós propomos investigar os efeitos que determinadas mutações têm sobre o funcionamento do mesmo. Nossos principais alvos são resíduos de treonina e tirosina, pois, como vimos, fazem parte de sítios que estão envolvidos na modulação dos receptores P2X. Ademais, boa parte dos dados que mencionamos anteriormente ainda não estão disponíveis para o receptor PX4. Visto que os receptores P2X são diversos no que diz respeito às suas propriedades farmacológicas e cinéticas, é provável que o receptor P2X4 também seja diferentemente modulado.

*It is not possible to run a course aright
when the goal itself has not been rightly placed.*
Francis Bacon.

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo geral identificar resíduos de aminoácidos que estão envolvidos na regulação da atividade do receptor P2X4 humano. Também investigamos se o receptor é regulado via fosforilação de resíduos de treonina e tirosina.

2.2. Objetivos específicos

- Expressar recombinantemente o receptor P2X4 humano em células de mamífero e caracterizá-lo funcionalmente;
- Construir, sequenciar, expressar e caracterizar mutantes do receptor P2X4 nas extremidades N- e C-terminais a fim de identificar resíduos de aminoácidos importantes na regulação e correto funcionamento do receptor P2X4 humano;
- Investigar se o receptor P2X4 humano é fosforilado por PKC e em resíduos de tirosina.

The ends justify the means.
Niccolò Machiavelli.

3.1. Cultura de células

As células HEK-293T (*human embryonic kidney cells*) do tipo selvagem e transfectadas com o vetor contendo a sequência que codifica para o receptor P2X4 humano (selvagem e mutantes), foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), na presença de estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 UI/mL) a 37 °C em uma atmosfera saturada com água contendo 5% de CO₂. As células foram subcultivadas semanalmente, semeadas a 5 x 10⁵ células/cultura em frascos de 25 cm². O meio de cultura era trocado a cada dois dias (Yan et AL., 2006).

3.2. Transfecção das células HEK-293T

Para transfecção transitória, as células cresceram em placas de 35 mm numa densidade de 0,2 × 10⁶ células. A transfecção foi realizada 24h após plaquear as células, empregando 2,5 µg de DNA e 12,5 µl de lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) em 2 ml de Opti-MEM (*Invitrogen*). Após 12 horas de incubação, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultura normal e as células foram cultivadas por um período adicional de 24-48h. As células foram então mecanicamente dispersas e replaqueadas em placas de 35 mm por 2-10h antes dos registros de corrente iônica.

3.3. Mutagênese sítio-dirigida

O vetor pCMV6-AC-GFP (*OriGene Technologies*), com a sequência que codifica para o receptor P2X4 humano (aqui o chamamos de pCMV-P2X4-GFP), foi utilizado como molde para a produção de plasmídeos contendo mutações pontuais específicas no cDNA que codifica para o receptor P2X4 humano, empregando o kit *QuickChange XL site-directed mutagenesis* (*Stratagene*), segundo instruções do fabricante. Em resumo, o procedimento consiste em uma *PCR* (*polymerase chain reaction*; reação em cadeia da polimerase) que emprega um par de *primers* ou iniciadores contendo a mutação desejada. Cada *primer* se anela à mesma região do plasmídeo, porém em fitas diferentes; todo o plasmídeo é amplificado. O produto obtido é então digerido com a enzima *DpnI* (10U). Essa enzima reconhece uma sequência de nucleotídeos GATC metilada na adenina. Dessa forma, apenas o plasmídeo molde que está na forma metilada será digerido pela enzima. Já os produtos de *PCR* obtidos *in vitro* contendo a mutação desejada não estão metilados e nada sofrerão pela ação da *DpnI*, permanecendo, conseqüentemente, na mistura reacional.

As sequências dos *primers* utilizados para introduzir as mutações são dadas na tabela 3.1.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

Tabela 3.1: Primers empregados nos ensaios de mutagênese sítio-dirigida. As mutações introduzidas são mostradas em negrito.

Mutantes	Primers
E14A	5'-GCCTTCCTGTT C GCGTACGACACGCCG-3' 5'-CGGCGTGTCGTAC G CGAACAGGAAGGC-3'
Y15A	5'-CCTTCCTGTT C GAG G CGACACGCCGCGCATC-3' 5'-GATGCGCGGCGTGT C G G CCTCGAACAGGAAGG-3'
Y15F	5'-CCTTCCTGTT C GAG T CGACACGCCGCGCATC-3' 5'-GATGCGCGGCGTGT C G A A CTCGAACAGGAAGG-3'
D16A	5'-CTGTT C GAGTAC G CCACGCCGCGCATC-3' 5'-GATGCGCGGCGT G G G CTACTCGAACAG-3'
T17A	5'-GTT C GAGTACGAC G CGCCGCGCATCGTG-3' 5'-CACGATGCGCG G C GCGTCTACTCGAAC-3'
Y367A	5'-GCATGAAGAAAAGACTCTAC G CTCGGGAGAAG-3' 5'-CTTCTCCCG A GCGTAGAGTCTTTTCTTCATGC-3'
Y372A	5'-CGGGAGAAGAAA G CTAAATATGTGGAAGATTACGAGCAGGG-3' 5'-CCCTGCTCGTAATCTTCCACATATTT A GC T TTTCTTCTCCCG-3'
Y372F	5'-CGGGAGAAGAAA T TAAATATGTGGAAGATTACGAGCAGGG-3' 5'-CCCTGCTCGTAATCTTCCACATATTT A A A TTTCTTCTCCCG-3'
Y378A	5'-GTGGAAGAT G CCGAGCAGGGTCTTGCTAG-3' 5'-CTAGCAAGACCCTGCT C G GCATCTTCCAC-3'

3.4. Preparação de bactérias eletrocompetentes

A bactéria *Escherichia coli* XLB1, estocada à -80 °C, foi crescida em ágar Luria Bertani (LB) (triptona 1 %; extrato de levedura 1 %; cloreto de sódio 0,5 %; pH 7,5; ágar bacteriológico 1,5 %) a 37 °C durante 16 horas. Uma colônia bem isolada foi inoculada em 5 ml de meio LB e incubada a 37 °C, sob agitação de 200-250 rpm, por cerca de 16 horas. Após esse período, 4 ml desse pré-inóculo foram inoculados em 400 ml de meio LB e incubados sob as mesmas condições, sendo que a densidade óptica (OD) a 600 nm era monitorada em intervalos de 1 hora até que se atingisse o valor de 0,8. Após alcançado esse valor, o inóculo foi transferido para o gelo, onde foi mantido até o final do processo. O inóculo foi transferido para tubos de centrífuga

Capítulo 3: Materiais e Métodos

mantidos no gelo e centrifugado por 15 min a 4.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 ml de água milli-Q gelada. Foi feita novamente a centrifugação sob as mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem foi realizado duas vezes. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com glicerol 10% gelado, nas mesmas condições das lavagens anteriores. Depois dessas etapas de lavagem, um pequeno volume de glicerol 10% estéril e gelado foi usado para ressuspender as células, de modo que a OD a 600 nm estivesse entre 100 e 200, sendo que uma densidade de 10 unidades corresponde a cerca de $4-8 \times 10^9$ bactérias por ml (Sambrook et al, 1989). As bactérias foram aliqüotadas (50 µl) em tubos de microcentrífuga gelados e depois congeladas a -80 °C.

3.5. Transformações das bactérias com DNA plasmidial

As bactérias competentes foram transformadas através do processo de eletroporação. O plasmídeo contendo a sequência que codifica para o receptor P2X4 humano selvagem e mutantes (1 a 50 ng) foi adicionado a uma aliqüota de 50 µL de bactérias eletrocompetentes (*Escherichia coli* XLB1), as quais foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (*gap* entre eletrodos de 2 mm). O eletroporador foi ajustado conforme o manual do aparelho para 2.800 V, aplicando-se o pulso e, logo depois, adicionando 1 mL de meio LB. As bactérias foram incubadas à 37 °C, sob agitação de 200-250 rpm, por 1 hora. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar 1,5% com ampicilina (75 µg/mL). As placas foram incubadas à 37 °C até o dia seguinte (cerca de 16 horas).

3.6. Isolamento do plasmídeo das bactérias transformadas

Para isolamento dos plasmídeos das bactérias transformadas por eletroporação, colônias isoladas do item anterior foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (75 µg/mL) e incubadas a 37 °C, sob agitação de 200-250 rpm, por cerca de 16 horas. Após esse período, nós obtivemos o DNA plasmidial das bactérias selecionadas, utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. A quantificação e verificação da pureza do DNA plasmidial foram realizadas através da leitura em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm, e eletroforese em gel de agarose 1%. O material foi visualizado utilizando a marcação com brometo de etídeo 0,5%.

3.7. Sequenciamento

Após termos adquirido o plasmídeo pCMV-AC-P2X4-GFP e realizado as reações para inserir as mutações desejadas, seguimos ao sequenciamento para confirmar a identidade do inserto no DNA selvagem e verificar a inserção das mutações e a não ocorrência de mutações indesejadas. As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando 100 a 200 ng de DNA, 1 pmol de iniciador (a tabela 3.2 fornece as sequências dos *primers* empregados), 2 µl de *BigDye* (*Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems), 3 µl de tampão de sequenciamento e água em quantidade suficiente para 15 µl. As condições de ciclagem foram: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos e 60 °C por 4 minutos. Para precipitação, adicionamos à reação 25 µl de coquetel de precipitação (93% de etanol gelado, acetato de sódio 0,1 M pH 5,2 e 370

Capítulo 3: Materiais e Métodos

µg/ml de glicogênio), incubamos por 15 minutos em gelo e centrifugamos a 4000 g por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 50 µl de etanol 70% nas mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente. O excesso de etanol 70% foi eliminado do precipitado por aquecimento a 95 °C por 1 minuto. As amostras foram então enviadas para o Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica – IQUSP. O equipamento utilizado foi o sequenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

Tabela 3.2. Primers empregados no sequenciamento do cDNA que codifica para os receptores P2X4 humano selvagem e mutantes.

<i>Primer</i>	Sequência
Seq1	5'-GTGGGAGGTCTATATAAGCAG-3'
Seq2	5'-CGGATTATGTGATACCAGCTC-3'
Seq3	5'-GATGCTAAAACAGATCCCTTC-3'
Seq4	5'-GAAGAAAAGACTCTACTATCG-3'

3.8. *Western-blot*

Células HEK-293T selvagem e expressando o receptor P2X4 humano *wild-type* (*WT*) ou mutantes foram tratadas com pervanadato, um inibidor de tirosina-fosfatases (Charpentier et al., 2005), em uma concentração padrão de 50 µM em meio de cultura, durante 20 minutos antes da lise. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20%, Igepal 0,5%, ortovanadato de sódio 2 mM) mais mistura de inibidores de protease (Conjunto de reagentes para inibição de proteases, Fermentas). Após centrifugação a 5.000 rpm, por 20 min, a 4 °C, o sobrenadantes foi coletado e a concentração de proteínas totais, obtida pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para estudos de fosforilação, as células foram pré-tratadas com ortovanadato 50 µM por 20 minutos. Após lise das células, o receptor P2X4 humano selvagem e mutantes foram imunoprecipitados com anticorpo

Capítulo 3: Materiais e Métodos

anti-P2X4 (Santa Cruz Biotechnology), utilizando um kit de imunoprecipitação (*Immunoprecipitation kit – Dynabeads Protein G*; Invitrogen), segundo as informações do fabricante. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e processadas por *western-blot*, usando os seguintes anticorpos: *rabbit* anti-P2X4 (1:400, Santa Cruz Biotechnology), *goat anti-rabbit* conjugado à peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP); *mouse* anti-fosfo-tirosina e *rabbit* anti-fosfo-treonina conjugado a Alexa Fluor 488 (1:750, Invitrogen). Os sinais de *western-blot* foram detectados por ECL (*enhanced chemiluminescence light*; Santa Cruz Biotechnology) e através de emissão de fluorescência com *Typhoon laser scanner* (*GE Life Sciences*).

3.9. Citometria de fluxo

Células HEK-293T selvagem e expressando o receptor P2X4 humano *wild-type* ou mutantes (GFP-positivas) foram lavadas com PBS 1X e fixadas por 20 minutos em para-formaldeído 1% em PBS. Após lavagem com PBS suplementado com soro fetal bovino 2%, as células foram permeabilizadas com Triton 0,05% durante incubação por 2h com anticorpo anti-fosfotirosina na diluição de 1:500. A seguir, as células foram analisadas em um citômetro de fluxo (Beckman Coulter, Fc500). Um laser de argônio foi usado para excitação (FL1 525 nm e FL2 575 nm). Trinta mil eventos foram adquiridos por amostra com a fluorescência em escala logarítmica. *FS* e *FL gates* foram utilizados para excluir células mortas e debris. O ruído de fluorescência foi medido usando células não marcadas (células HEK-293T não transfectadas) e a compensação das fluorescências foi realizada empregando células HEK-293T selvagem marcadas apenas com o anticorpo anti-fosfotirosina (FL2 positivas)

Capítulo 3: Materiais e Métodos

e células HEK-293T transfectadas (FL1 positivas) (Martins et al., 2008). Os dados foram analisados através do programa *FlowJo* versão 10.0.6.

3.10. Marcação da membrana plasmática e microscopia de fluorescência.

Células HEK-293T transfectadas com os receptores P2X4 humano *WT* e mutantes foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com 5 µM do corante de membrana DiI (Invitrogen) em Opti-MEM (Invitrogen), seguido por um período adicional de incubação de 15 minutos a 4 °C. As células foram visualizadas num aumento de 20x, utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss), e fotomicrografias foram geradas através de uma câmera digital acoplada ao microscópio.

3.11. *Whole-cell current recording*

Para os experimentos de *whole-cell recording*, 2×10^4 células foram plaqueadas em placas de cultura de células de 35 mm. Pipetas feitas de borossilicato (*World Precision Instruments Inc.*), utilizando um *puller* de dois estágios (*Sutter Instruments*), foram polidas (*Narishige*) até atingirem uma resistência de 4-6 MΩ. O tampão extracelular continha NaCl 145 mM, KCl 5,3 mM, CaCl₂.2H₂O 1,8 mM, MgCl₂ 1,2 mM, D-glicose 10 mM e HEPES 10 mM; o pH foi ajustado para 7,4 com NaOH. A solução intracelular continha KCl 140 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1mM e HEPES 1mM; o pH foi ajustado para 7,4 com KOH. Os registros de corrente foram feitos utilizando um amplificador Axopatch 200A (*Axon Instruments*). Os sinais foram obtidos através do *software pClamp* (*Axon Instruments*) e os dados, analisados, usando o programa *Microcal Origin*. Todos os registros de corrente iônica

Capítulo 3: Materiais e Métodos

foram realizados em pH 7,4 e temperatura ambiente numa voltagem transmembrânica de -60 mV (Trujillo et AL., 2006). Para os experimentos de pré-incubação, as células HEK-293T foram incubadas com pervanadato, um inibidor de tirosina fosfatase, na concentração de 50 μ M, diluído em DMEM. Foi usado um período de incubação de 1 hora.

3.12. Método de aplicação rápida de ligante

O método de *cell-flow* para rápida aplicação de ligante já foi descrito (Krishtal e Pidoplichko, 1980; Udgaonkar e Hess, 1987). Resumidamente, uma célula (diâmetro de 30 a 50 μ m) é colocada numa distância de cerca de 100 μ m do orifício (diâmetro de 100 μ m, aproximadamente) de um tubo em U (Krishtal e Pidoplichko, 1980). A taxa de fluxo das soluções, que emergem do dispositivo de fluxo, contendo o neurotransmissor (agonista ATP) é tipicamente de \sim 1cm/s. As medidas foram realizadas em intervalos de 5 minutos, tempo suficiente para garantir completa ressensibilização dos receptores. Tal método possui como vantagem o tempo de resolução, que é de 5 a 10 ms, o que permite fazer medidas antes da maior dessensibilização dos receptores e determinar as propriedades que são relevantes para abertura e fechamento dos mesmos (Udgaonkar e Hess, 1987; Ulrich e Gameiro, 2001).

3.13. Microfluorimetria

Para monitoramento da mudança na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) por microfluorimetria usando FlexStation 3 (*Molecular Device*), as células HEK-293T transfectadas com o DNA codificante para o receptor P2X4 selvagem ou mutante Y15F foram semeadas em placas de parede preta e fundo transparente (*Costar*) 24 horas antes do experimento, a uma densidade

Capítulo 3: Materiais e Métodos

de 3×10^4 células por poço. Uma hora antes das medidas, as células foram incubadas a 37°C com o *Flex Calcium Kit* e 2,5 mM de probenicida em um volume final de 200 µl por poço seguindo as instruções do fabricante (*Molecular Device*). A seguir, as células foram pré-incubadas por 5 minutos com *cibacron blue*, um inibidor de receptores P2Y, na concentração de 10 µg/ml (Resende et al., 2007). A fluorescência das amostras foi excitada a 485 nm e a emissão da fluorescência foi detectada a 525 nm. As amostras foram monitoradas a intervalos de 1,52 s por 120 s com um total de 79 leituras por poço. Após 20 s de monitoramento da intensidade de fluorescência basal para os níveis $[Ca^{2+}]_i$, as drogas foram injetadas e os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram monitorados por mais 100 s. As respostas ao agonista ATP foram calculadas como a fluorescência máxima obtida após a adição da droga menos a intensidade da fluorescência basal (unidade relativa de fluorescência- RFU- *Relative Fluorescence Units*) usando o software SoftMax[®] Pro (*Molecular Device*).

3.14. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o *software GraphPad Prism* versão 4 e empregando-se o teste *t* de Student (não-pareado), em que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de *p* foram menores que 0,05. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão.

A seguir, na figura 3.1, nós fornecemos um fluxograma de como os experimentos foram conduzidos na realização do presente trabalho.

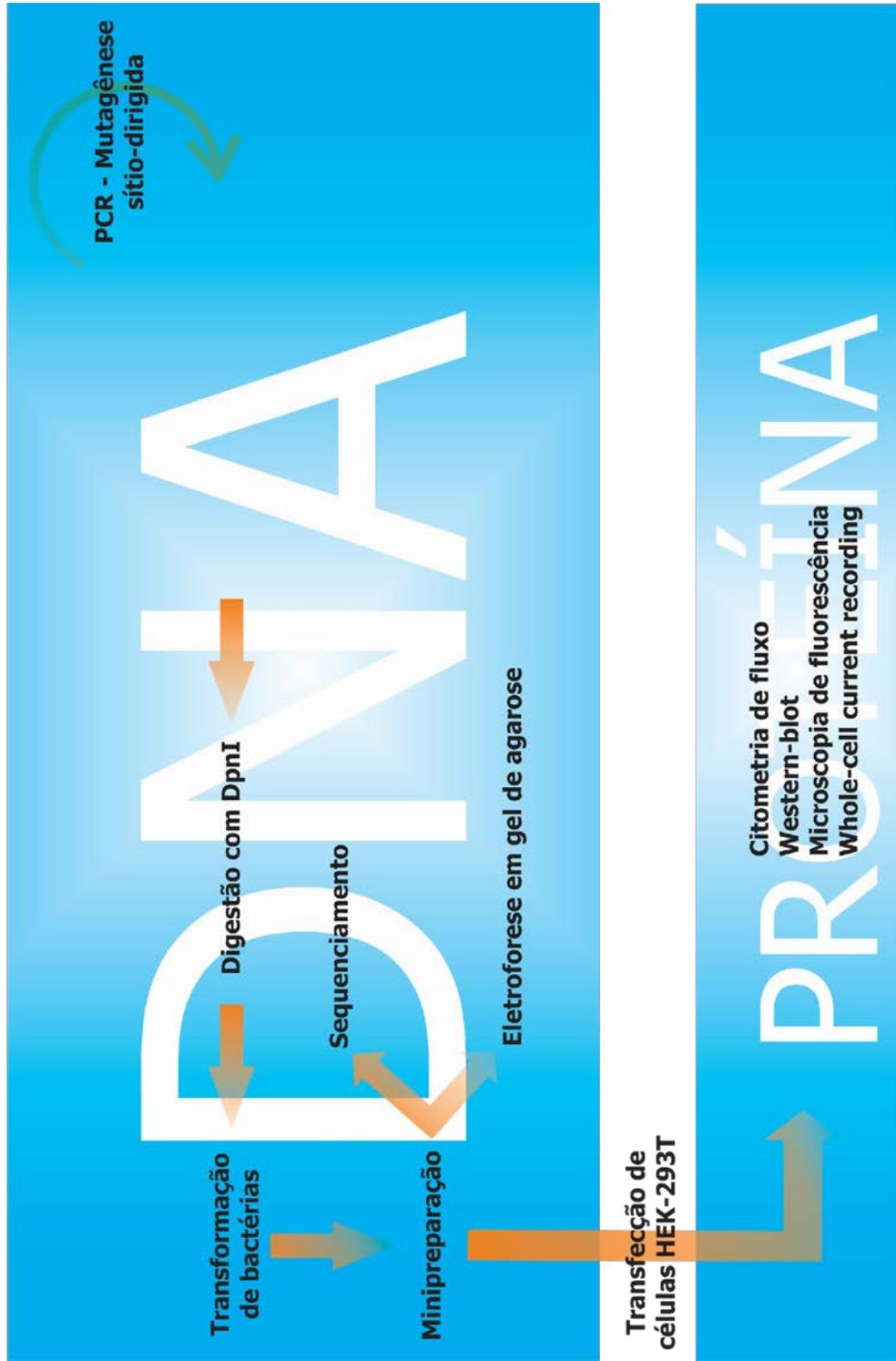


Figura 3.1. Representação esquemática do procedimento experimental desenvolvido.

*Insanity:
Doing the same thing
over and over again,
and expecting different results.*
Albert Einstein.

4.1 Análise do plasmídeo pCMV-P2X4-GFP

Para estudar os efeitos que mutações sítio-dirigidas têm sobre a atividade do receptor P2X4 humano, nós optamos por usar uma construção em que a sequência que codifica para o receptor P2X4 humano está clonada, tendo a jusante a sequência que codifica para GFP (*Green Fluorescent Protein*). Assim, o receptor é expresso fusionado a GFP através de sua extremidade C-terminal. Tal construção, mostrada na figura 4.1A, foi adquirida da *OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)* e examinada através de análise de restrição (Figura 4.1C) e sequenciamento (Figura 4.5). Para isso, transformamos bactérias eletrocompetentes e selecionamos cinco colônias por sua resistência à ampicilina. Os produtos de suas minipreparações foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, indicando que provavelmente todas as colônias carregam o plasmídeo pCMV-P2X4-GFP com o inserto que codifica para o receptor P2X4 humano (Figura 4.1B). A análise de restrição do plasmídeo recombinante revelou que ele possui apenas sítios de restrição únicos para as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Assim, o plasmídeo foi incubado com as duas enzimas, a 37 °C, durante 60 min. Os produtos de tal digestão foram analisados através de eletroforese em

Capítulo 4: Resultados

gel de agarose 1% e revelaram duas bandas de tamanhos esperados (Figura 4.1C).

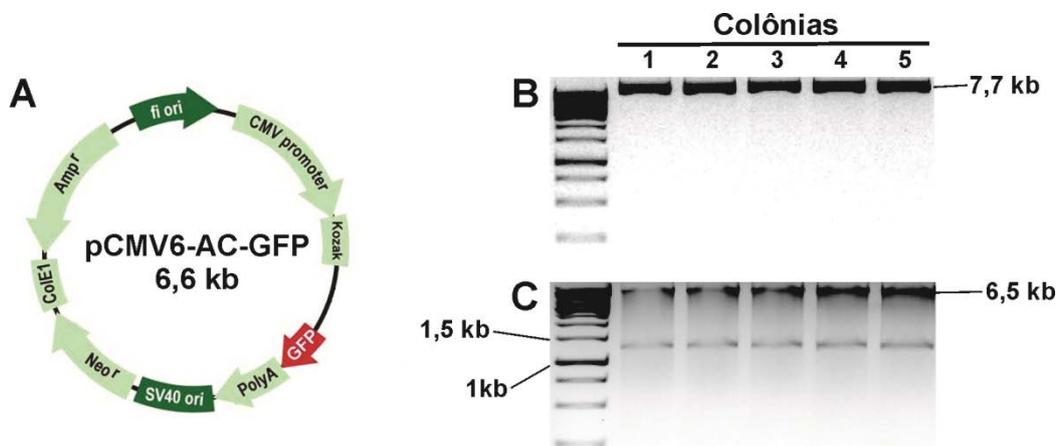


Figura 4.1. Análise do plasmídeo pCMV-AC-P2X4-GFP. (A) Mapa do vetor pCMV-AC-GFP. São mostrados os principais elementos. O fragmento que codifica para o receptor P2X4 humano foi clonado entre o fragmento de Kozak e a sequência codificante para GFP. O uso de um forte promotor (*CMV promoter*) e do fragmento de Kozak permitem a super-expressão do receptor em células de mamíferos. O vetor também contém genes que conferem resistência à ampicilina (*Amp^r*) e à geneticina (*Neo^r*), o que possibilita a seleção de bactérias transformadas e a transfecção permanente de células de mamíferos, respectivamente. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% das minipreparações de cinco colônias transformadas com o vetor. Para as amostras de 1 a 5, aparece uma banda correspondente a um fragmento com cerca de 8000 pb, o que esperamos quando o inserto do cDNA do receptor P2X4 (~1,1 kb) é ligado ao vetor plasmidial pCMV-AC-GFP (~6,6 kb). (C) Digestão com EcoRI e XhoI. Amostras dos plasmídeos obtidos das colônias foram digeridas com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI e apresentaram duas bandas (de 1,2 kb e 6,5 kb, aproximadamente), conforme esperávamos.

Para confirmarmos esses resultados, seguimos ao seqüenciamento de DNA, empregando os *primers* que chamamos de *seq1-4* e que são mostrados na tabela 3.2. A análise de seqüenciamento revelou que a sequência obtida corresponde àquela depositada no *site* da empresa, da qual compramos a construção, e àquela depositada em bancos de dados.

Capítulo 4: Resultados

4.2. Expressão e caracterização do receptor P2X4 humano

O receptor P2X4 foi transitoriamente expresso em células HEK-293T. Embora essa linhagem celular não expresse endogenamente receptores P2X e apresenta como vantagem alta eficiência de transfecção quando empregamos lipofectamina (Schachter et al., 1997). Como já colocado, expressamos uma proteína de fusão entre o receptor P2X4 e GFP e apenas células verdes fluorescentes (Figura 4.2A) foram empregadas nos experimentos a seguir.

O receptor P2X4 se diferencia dos demais subtipos por possuir como modulador alostérico positivo o antiparasitário ivermectina (North, 2002) Fizemos registros de corrente na presença de ATP 10 μM com e sem ivermectina 5 μM . De fato, observamos aumento na intensidade das correntes quando ATP era co-aplicado com ivermectina, como mostrado pelos traços representativos de corrente na figura 4.2B.

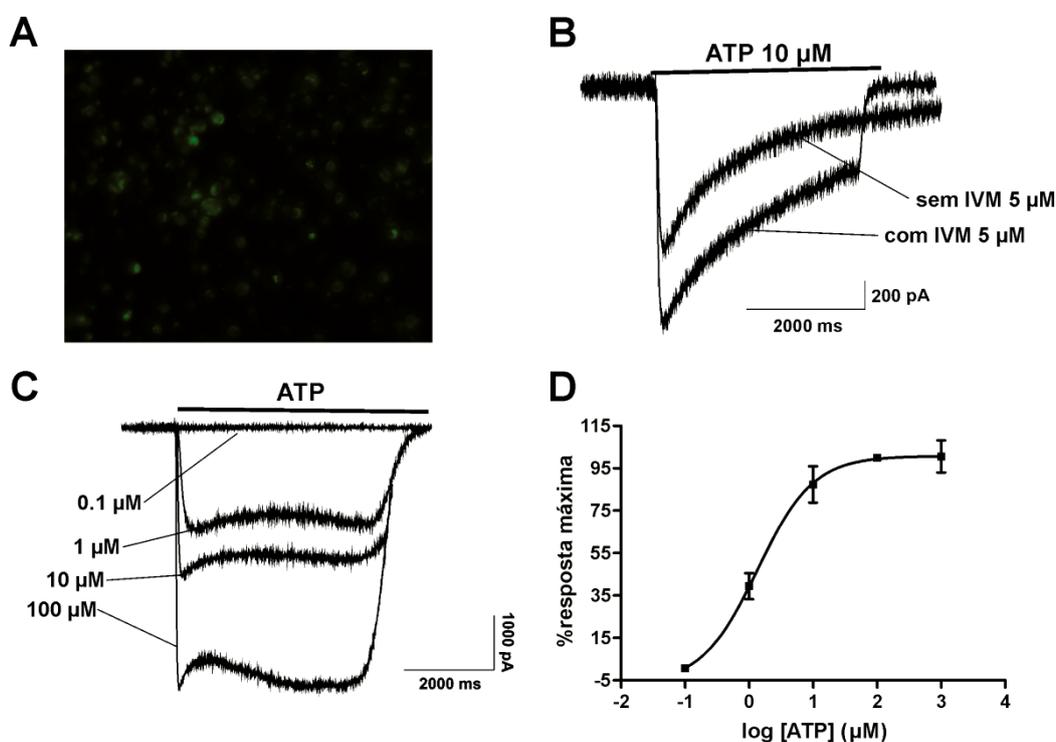


Figura 4.2. Expressão e caracterização do receptor P2X4 humano transitoriamente expresso em células HEK-293T. (A) Foto das células HEK-

Capítulo 4: Resultados

293T transfectadas com o receptor P2X4. As células são mostradas no aumento de 10×. O receptor P2X4 é expresso fusionado a GFP. (B) Medidas representativas da resposta a ATP 10 μM na ausência e na presença de ivermectina (IVM) 5 μM . A ivermectina potencializa a resposta ao ATP. Os registros de corrente foram feitos em temperatura ambiente, pH 7,4 e potencial de membrana de -60 mV, utilizando o método de *cell-flow* e uma velocidade de fluxo de solução de $\sim 1\text{cm/s}$ para rápido equilíbrio dos receptores com o ligante. (C) Concentração de canais abertos em função da concentração de ATP. Os registros de corrente foram feitos nas mesmas condições mencionadas em (B). Ao passo que a concentração de ATP aumenta, ocorrem incrementos nos valores de corrente detectados. (D) Curva dose-resposta para ATP obtida a partir de medidas de corrente. As medidas foram normalizadas para aquela obtida com ATP 100 μM . Foram feitas de 2-3 medidas em cada concentração de ATP a partir de 5 células. O valor de EC_{50} determinado foi de $1,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,99$).

O tratamento das células HEK-293T expressando o receptor P2X4 com solução externa contendo o agonista ATP resultou em correntes iônicas, cujas amplitudes dependiam da concentração de ATP (Figura 4.2C). As correntes iônicas foram medidas, normalizadas (para ajustes em diferenças nos níveis de expressão do receptor e variações nas amplitudes da resposta) para a resposta obtida com ATP 100 μM e plotadas contra a concentração de ATP para fornecer a curva dose-resposta da figura 4.2D. O valor de EC_{50} fornecido pelo gráfico é $1,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$.

4.3. Mutagênese sítio-dirigida da extremidade N-terminal

O objetivo principal do presente projeto é identificar resíduos de aminoácidos ou mesmo domínios envolvidos no controle da atividade do receptor P2X4. Uma vez que as extremidades N-terminais são mais conservadas entre os diversos subtipos de receptores P2X (Figura 4.3) e que, até o momento, a maior parte dos trabalhos tem se pautado em investigações

Capítulo 4: Resultados

na extremidade C-terminal (Brown e Yule, 2010; Chaumont et al., 2004; Fountain e North, 2006), resolvemos começar nossos estudos com a extremidade amino-terminal do receptor P2X4.

Conforme já mencionamos na Introdução, os receptores P2X possuem um sítio de fosforilação por PKC e um resíduo de tirosina altamente conservados (-Y-X-T-X-R/K-) na região N-terminal. Não conhecemos nenhum trabalho publicado sobre o papel desse motivo na funcionalidade do receptor P2X4 humano, apenas trabalhos sobre o envolvimento do sítio de fosforilação por PKC na atividade dos receptores P2X1, P2X2 e P2X3 (Boué-Grabot et al., 2000; Brown e Yule, 2007; Ennion e Evans, 2002; King et al., 1997). Destaca-se ainda uma aparente conservação de resíduos de aminoácidos negativamente carregados (Asp ou Glu) antes do motivo mencionado acima e entre os resíduos de tirosina e treonina. Assim, propomo-nos a investigar o papel desses resíduos na atividade do receptor P2X4, substituindo-os por resíduos de alanina, por ser este neutro e possuir uma pequena cadeia lateral, o que diminui a probabilidade de alterações muito drásticas no dobramento da proteína, permitindo ensaiá-la *in vitro*.

```

P2X1 MARR-----FQEELAAFLFEYDTPRMVLVRNK-----
P2X2 MAAAQPKYPAGATARRLARGCWSALWDYETPKVIVVRNR-----
P2X3 MN-----CISDFFTYETTKSVVVKSWTIG-----
P2X4 MAGC-----C-AALAAFLFEYDTPRIVLIRSR-----
P2X5 MGQ-----AGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNK-----
P2X6 MCPQLAG--AGSMGSPGAT-TGWLLLDYKTEKYVMTRNWR-----
P2X7 MPAC-----C---SCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHV

```

Figura 4.3. Alinhamento das extremidades N-terminais dos receptores P2X humanos. Em destaque estão os resíduos que foram mutados. Todos os subtipos de receptores P2X humanos possuem um sítio de fosforilação por PKC (-T-X-R/K-) e um resíduo de tirosina a montante, o que fornece o motivo -Y¹⁵-X-T-X-R/K-. É digno de

Capítulo 4: Resultados

nota também que antes desse motivo e entre os resíduos de tirosina e treonina existe um certo padrão de conservação. Entre a maioria dos subtipos, resíduos de aminoácidos negativamente carregados (aspartato/D ou glutamato/E), indicados com *, são preferidos nessas posições.

Construímos os mutantes E14A, Y15A, D16A e T17A, segundo descrito em Materiais e Métodos. Os produtos das PCRs mutagênicas foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, como mostrado na figura 4.4A. Os fragmentos observados correspondem àqueles esperados.

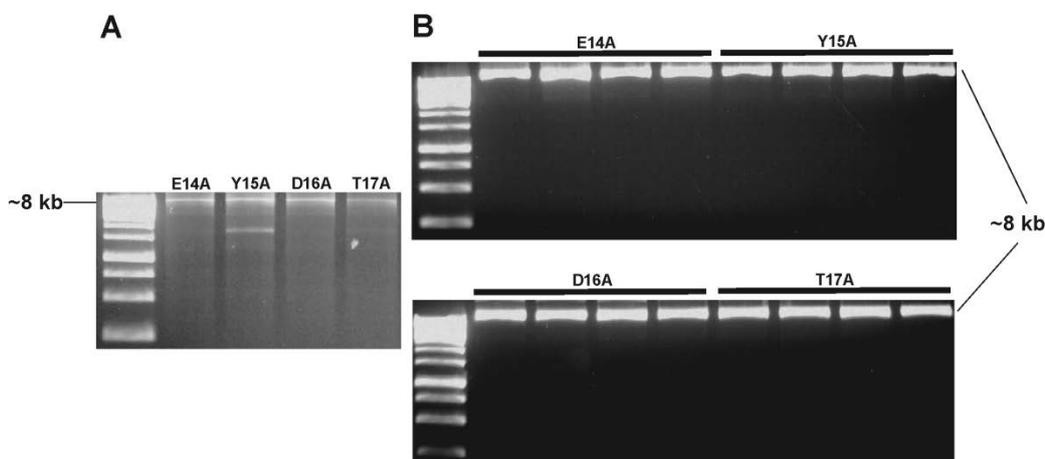


Figura 4.4. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR para mutagênese sítio-dirigida e das minipreparações das colônias bacterianas obtidas. (A) Mutagênese sítio-dirigida. Observamos uma banda de cerca de 8 kb correspondente à amplificação de todo o vetor. **(B) Minipreparações das colônias bacterianas obtidas com os produtos de (A).** Para cada mutante, selecionamos quatro colônias. Em todos os casos, também encontramos um fragmento de cerca de 8 kb, provavelmente correspondente ao vetor pCMV-P2X4-GFP.

Com esses produtos de PCR, nós transformamos bactérias eletrocompetentes e, para cada mutante, selecionamos quatro colônias para minipreparação. A eletroforese em gel de agarose 1% das minipreparações revelou que todas as colônias possuíam o vetor (Figura 4.4B). Para confirmação dos mutantes, submetemos os 16 clones à análise de seqüenciamento (Figura 4.5).

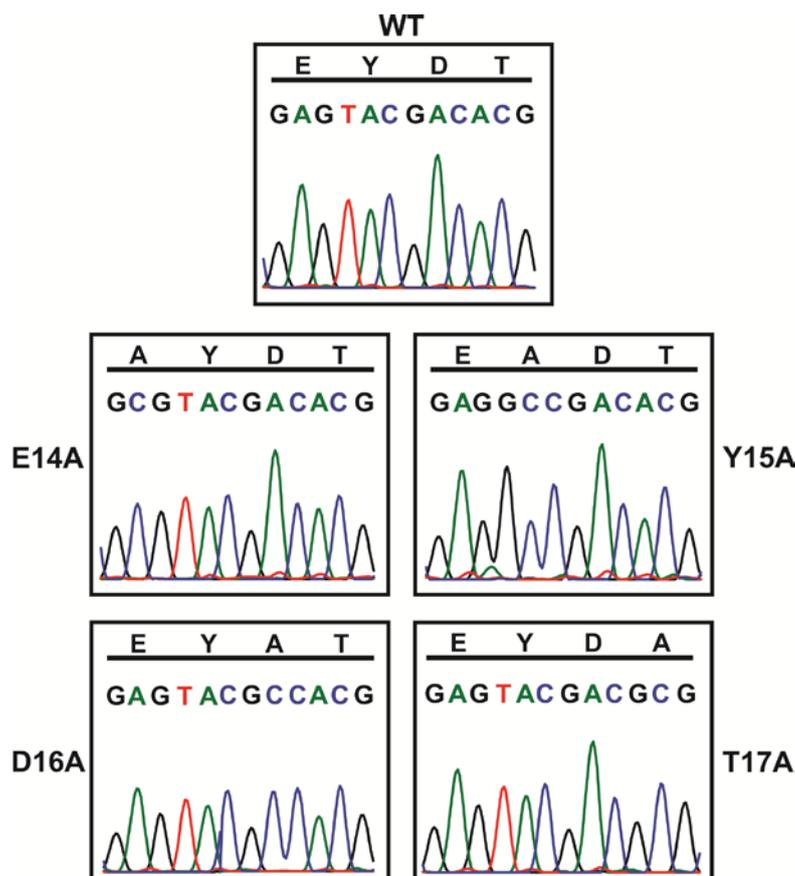


Figura 4.5. Sequenciamento dos mutantes E14A, Y15A, D16A e T17A. Aqui são mostradas as seqüências correspondentes ao receptor P2X4 *WT* e aos mutantes. Atente para as substituições feitas.

Embora na figura 4.5 seja mostrado o sequenciamento apenas da região mutada, os mutantes foram sequenciados em toda a sua extensão, usando os *primers* da tabela 3.2.

4.4. Expressão e caracterização dos mutantes N-terminais

Os receptores P2X4 mutantes E14A, Y15A, D16A e T17A fusionados a GFP foram expressos em células HEK-293T e ensaiados através de experimentos de *whole-cell current recording*. Os receptores contendo resíduos de alanina nas posições E¹⁴ e D¹⁶ exibiram correntes em resposta ao ATP, cujas amplitudes foram equiparáveis àquelas obtidas com o receptor não-mutado. A substituição dos resíduos de Y¹⁵ e T¹⁷ resultou em receptores

Capítulo 4: Resultados

não-funcionais (Figura 4.6A, painel superior). Todos os receptores mutantes, incluindo os não-funcionais, atingiram a membrana plasmática, quando as imagens de microscopia de fluorescência dos receptores *WT* e dos mutantes foram comparadas (Figura 4.6A, segundo ao quarto painel). Como podemos observar, há co-localização entre o corante de membrana Dil e o receptor fusionado a GFP. Ao passo que os receptores mutantes Y15A e T17A não foram funcionais, os mutantes E14A e D16A exibiram propriedades funcionais semelhantes àquelas do receptor *WT*, como indicado por suas respostas a ATP na concentração de 100 μ M (Figura 4.6B). Juntos, esses resultados indicam que os resíduos Y¹⁵ e T¹⁷ são fundamentais na atividade do receptor P2X4 humano, enquanto que os resíduos E¹⁴ e D¹⁶ não o são, apesar da aparente conservação de carga nessas posições.

Capítulo 4: Resultados

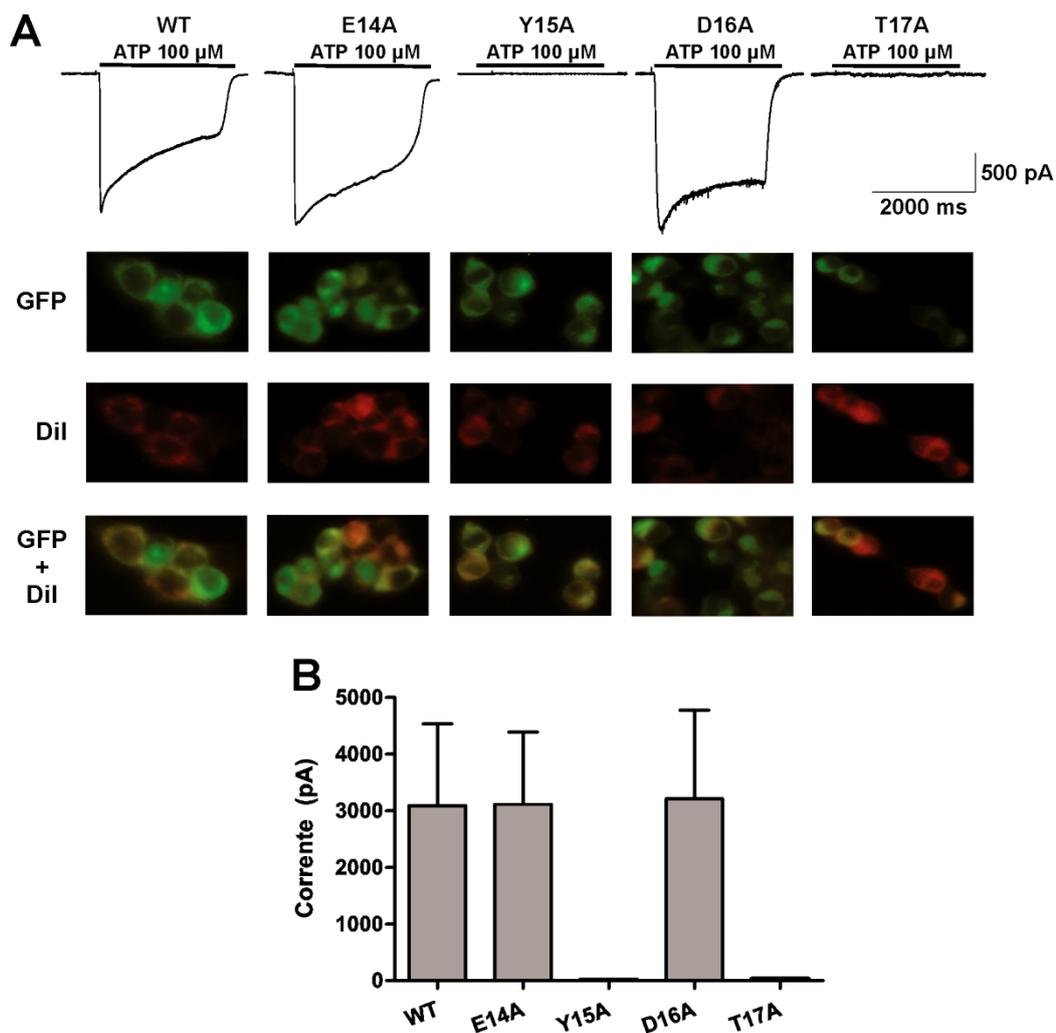


Figura 4.6. Padrão de expressão e responsividade dos receptores P2X4 e mutantes. (A) Registros de correntes induzidas por ATP 100 μ M e padrão de expressão. Painel superior: ao passo que os mutantes Y15A e T17A não foram funcionais, os mutantes E14A e D16A exibiram respostas equiparáveis àquela do receptor *WT*. Demais painéis: As imagens foram feitas no aumento de 20 \times e posteriormente submetidas a aumento digital. Todos os mutantes são expressos na membrana plasmática das células HEK-293T, como evidenciado pela co-marcação das mesmas com Dil, um corante de membrana, e com GFP. (B) Histograma com as respostas médias dos receptores P2X4 WT e mutantes a ATP 100 μ M. Quando os receptores P2X4 mutantes Y15A e T17A foram submetidos à aplicação de ATP, nenhuma corrente iônica foi detectada. Em contrapartida, para os demais mutantes, foram detectadas correntes, cujas amplitudes foram as mesmas que aquelas obtidas com o receptor *WT*, considerando o erro experimental. Para o receptor P2X4 e para cada mutante, foram feitos, pelo menos, três registros de corrente/célula, para um total de cinco células/construção.

4.5. Estudos posteriores na posição Y¹⁵

O fato de que os receptores P2X4 Y15A não são funcionais nos levou a perguntar se o resíduo Y¹⁵ poderia estar envolvido em alguma interação entre a cauda N-terminal do receptor P2X4 e proteínas intracelulares específicas. Para responder essa questão, inicialmente, pesquisamos se a extremidade N-terminal do receptor P2X4 (M¹ a K²⁷) possui motivos já descritos na literatura. Usando o programa *Scansite* (Obenauer et al., 2003), demonstrou-se que a sequência YD presente na extremidade N-terminal do receptor P2X4 faz parte de um motivo ao qual as proteínas adaptadoras Nck1 e Nck2 se ligam (Figura 4.7). Essas proteínas possuem um sítio SH2 (*Scr homology*), através do qual reconhecem e se ligam a motivos contendo resíduos de tirosina fosforilados (Frese et al., 2006). Isso levantou a possibilidade que a atividade do receptor P2X4 possa ser regulada por fosforilação em resíduos de tirosina, como já foi demonstrado para receptores nicotínicos e glutamatérgicos do tipo NMDA, por exemplo (Wiesner e Fuhrer, 2006; Salter e Kalia, 2004). Ademais, conforme já mencionado na Introdução, estudo recente indicou que, pelo menos, para o receptor P2X3 de rato, a fosforilação de um resíduo específico de tirosina na extremidade C-terminal controla sua resposta ao agonista ATP (D'Arco et al., 2009).

Capítulo 4: Resultados

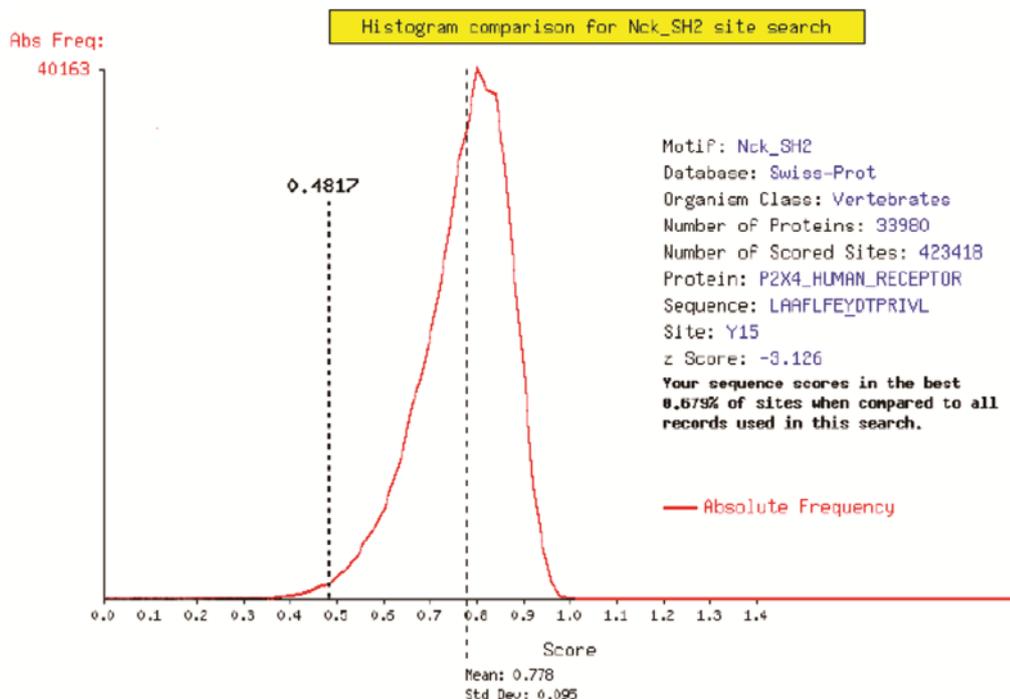


Figura 4.7. Histograma de comparação entre as sequências da extremidade N-terminal do receptor P2X4 humano e do sítio de ligação de proteínas adaptadoras Nck. O histograma mostra que a sequência LAAFLFEYDTPRIVL presente na extremidade N-terminal do receptor P2X4 humano possui homologia com o sítio ao qual se ligam as proteínas Nck1 e Nck2, através de seus domínios SH2. O escore Z diferente de zero (-3,126) indica que a similaridade encontrada é maior que a média de permutações aleatórias da sequência e não surgiu por acaso.

Tendo em mente o resultado anterior, nós nos perguntamos se a atividade do receptor P2X4 poderia ser influenciada por compostos que inibem ou ativam tirosina quinases ou fosfatases. Para isso, células HEK-293T expressando o receptor P2X4 *WT* foram pré-tratadas com 50 μM do inibidor de tirosina fosfatase pervanadato durante uma hora e, após, submetidas à aplicação de ATP 100 μM . A inibição de tirosina fosfatases através do pré-tratamento com pervanadato reduziu significativamente a amplitude das correntes induzidas por ATP, como podemos observar claramente na figura 4.8.

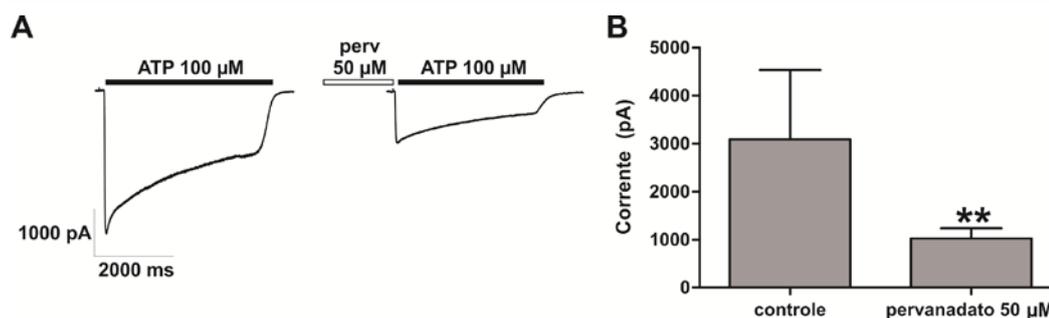
Capítulo 4: Resultados

Figura 4.8. Pervanadato diminui correntes evocadas por ATP nas células HEK-293T expressando receptores P2X4 wild-type. (A) Correntes induzidas por ATP 100 µM em voltagem transmembrânica de -60 mV sem (esquerda) e após a pré-incubação de uma hora com pervanadato 50 µM (perv, direita). Os traços representativos de registros de corrente mostram que o tratamento com pervanadato reduz significativamente correntes induzidas por ATP. (B) Histograma mostrando o efeito médio do pervanadato (50 µM) sobre correntes induzidas por ATP. Foram analisadas um total de 10 células (5 para o controle e 5 para o tratamento com pervanadato). A incubação com pervanadato reduziu em 67% as respostas induzidas por ATP 100 µM (médias das correntes: 1023 pA contra 3085 pA, respectivamente; $**p < 0,01$).

4.6. Mutagênese sítio-dirigida da extremidade C-terminal

Os resultados anteriores sugeriram que a atividade do receptor P2X4 humano depende, em parte, de um resíduo de tirosina N-terminal altamente conservado entre os receptores P2X e apontaram para um provável envolvimento com vias de sinalização dependentes de tirosina quinases e fosfatases. Voltamos então a nossa atenção para a extremidade C-terminal. Conforme já discorremos na Introdução, Chamount e colaboradores, por exemplo, identificaram o motivo YXXXX e perceberam que, quando o resíduo de tirosina é mutado para alanina, há uma diminuição de cerca de 65% na expressão do receptor P2X4 na membrana (Chaumont et al., 2004). Cabe ressaltar que esse motivo envolvido no processo de transporte do receptor para a membrana ocorre em outros subtipos de receptor P2X. Royle e

Capítulo 4: Resultados

colaboradores demonstram que o motivo YEQGL, presente apenas na extremidade C-terminal do receptor P2X₄, regula o processo de endocitose do receptor. Quando o resíduo de tirosina desse motivo é mutado para alanina, diminui-se a internalização do receptor com consequente aumento na expressão a nível de membrana (Royle et al., 2002). Posteriormente, verificou-se que a integridade desse motivo é crucial para que haja um aumento na amplitude de correntes induzidas por ATP, quando a proteína quinase A (PKA) é ativada. Tal mecanismo de controle, contudo, não envolve a fosforilação direta do receptor P2X₄ por PKA, uma vez que o mesmo não possui sítios de fosforilação para essa quinase. Isso sugere que o alvo da PKA seja alguma proteína acessória (Brown e Yule, 2010).

O que os motivos YXXXK e YEQGL possuem em comum? Ambos se baseiam em um resíduo de tirosina (Y³⁶⁷ e Y³⁷⁸). Levando em consideração nossos resultados anteriores e que pouco se sabe sobre os mecanismos através dos quais esses motivos controlam a atividade do receptor P2X₄, resolvemos criar os mutantes Y367A e Y378A, para investigar se esses resíduos são fosforilados. Adicionalmente, foram criados os mutantes Y15F, Y372A e Y372F.

O mutante Y15F foi criado para analisar o possível papel estrutural desse resíduo de tirosina, uma vez que o mutante Y15A não é funcional. Nos experimentos de citometria de fluxo ainda utilizamos o mutante Y15A, pois ainda não dispúnhamos da sequência completa do mutante Y15F e nosso objetivo era analisar os níveis de fosfotirosina. Visto que tanto resíduos de

Capítulo 4: Resultados

alanina quanto de fenilalanina não são fosforilados, o efeito para ambos os mutantes seria o mesmo.

Os produtos da PCR mutagênica foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, como mostrado na figura 4.9A. Os fragmentos observados correspondem àqueles esperados.

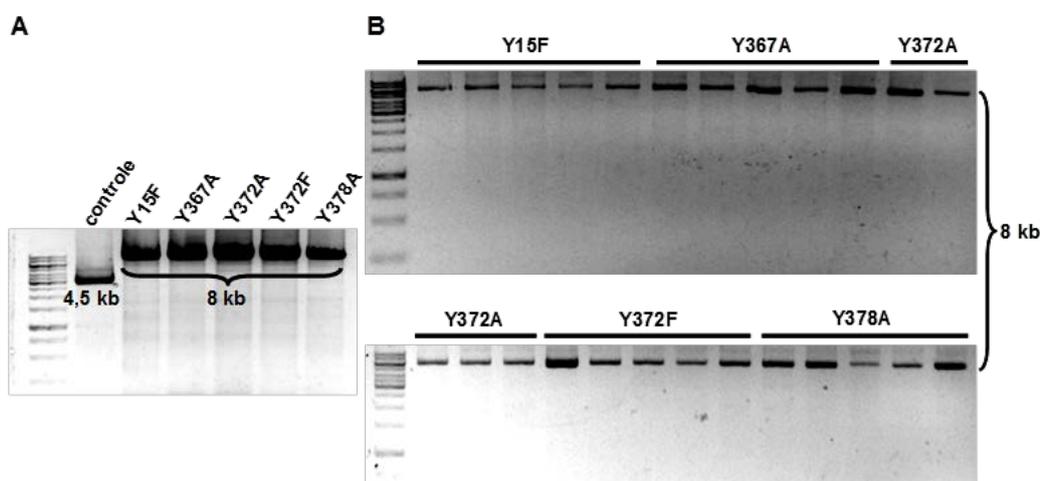


Figura 4.9. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR para mutagênese sítio-dirigida na extremidade C-terminal do receptor P2X4 humano e das minipreparações das colônias bacterianas obtidas. (A) Mutagênese sítio-dirigida. Observamos uma banda de cerca de 8 kb correspondente à amplificação de todo o vetor. Como controle da PCR, foi utilizado um plasmídeo de cerca de 4,5 kb. (B) Minipreparações das colônias bacterianas obtidas com os produtos de (A). Para cada mutante, selecionamos cinco colônias. Em todos os casos, também encontramos um fragmento de cerca de 8 kb, provavelmente correspondente ao vetor pCMV-P2X4-GFP.

Assim como nos experimentos anteriores de mutagênese sítio-dirigida, bactérias eletrocompetentes foram transformadas com os produtos de PCR e selecionamos cinco colônias para cada mutante. A eletroforese em gel de agarose 1% das minipreparações revelou que todas as colônias foram eficientemente transformadas (Figura 4.9B). Para confirmação dos mutantes, os 25 clones foram sequenciados (Figura 4.10).



Figura 4.10. Sequenciamento dos mutantes Y15F, Y367A, Y372A, Y372F e Y378A. Aqui são mostradas as seqüências correspondentes ao receptor P2X4 *WT* e aos mutantes. As substituições e mutações feitas estão destacadas em negrito e com barras.

Embora na figura 4.10 sejam mostrados apenas os fragmentos contendo as mutações, os mutantes foram sequenciados em toda a sua extensão.

4.7. Análise de citometria de fluxo

Os receptores P2X4 mutantes Y15A, Y367A, Y372A, Y372F e Y378A fusionados a GFP foram expressos em células HEK-293T e células com diferentes níveis de proteínas fosforiladas foram analisadas através de citometria de fluxo, empregando um anticorpo anti-fosfotirosina conjugado ao fluoróforo tetrametil-rodamina succinil éster (TAMRA) (Figura 4.11).

Capítulo 4: Resultados

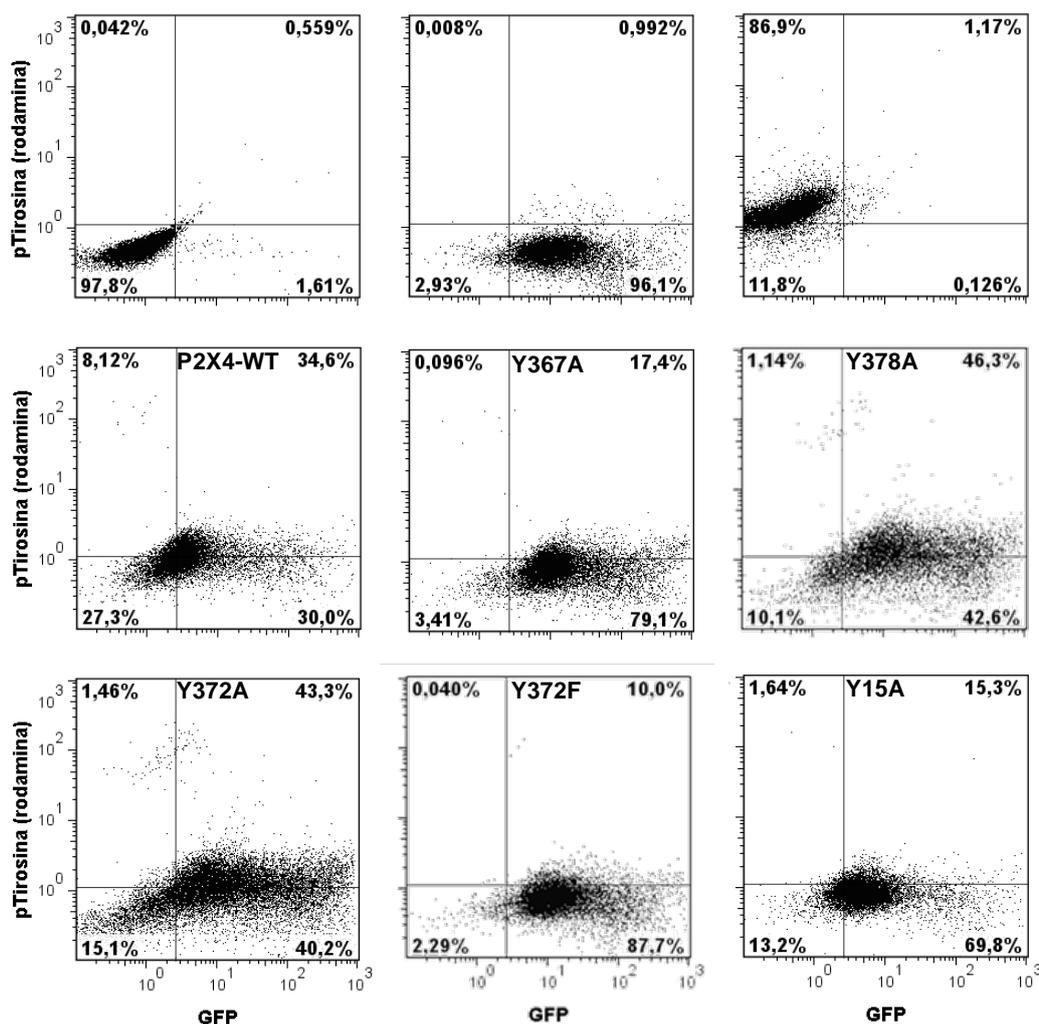


Figura 4.11. Análise de citometria de fluxo. Os três *dot-plots* superiores correspondem aos controles que foram utilizados para ajuste e compensação do citômetro de fluxo, os quais sejam (da esquerda para a direita), células HEK-293T *wild-type* (não transfectadas com o receptor P2X4), células HEK-293T transfectadas com o DNA codificante para o receptor P2X4 (que são também GFP positivas) e células HEK-293T *wild-type* marcadas com anticorpo anti-fosfotirosina conjugado a rodamina. Os demais *dot-plots* indicam que a população de células duplamente marcadas é menor apenas para os mutantes Y15A, Y367A e Y372F quando comparada com o receptor P2X4 *wild-type*.

A percentagem de células fosfotirosina-positivas foi a mesma para os mutantes Y372A ($86 \pm 10\%$) e Y378A ($79 \pm 6.9\%$), mas substancialmente menores para os mutantes Y15F ($35 \pm 12\%$), Y367A ($48 \pm 6.4\%$) e Y372F ($31 \pm 1.7\%$), quando comparada com células que expressam o receptor *wild-*

Capítulo 4: Resultados

type ($76 \pm 5.6\%$). Essa análise foi feita, levando em consideração apenas células GFP-positivas, ou seja, aquelas que, de fato, expressam o receptor P2X4 (Figuras 4.11 e 4.12).

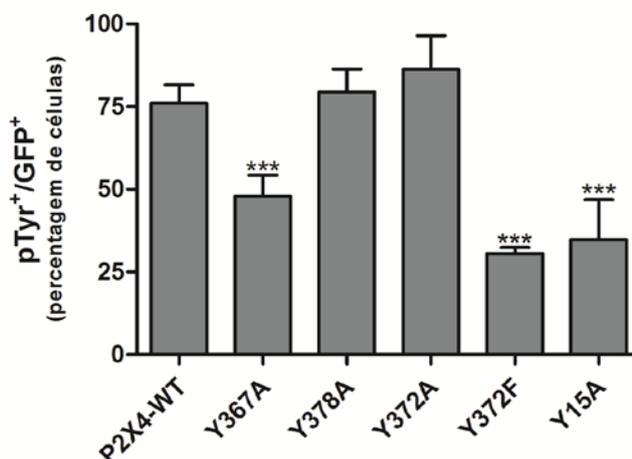


Figura 4.12. Quantificação de células fosfotirosina-positivas (pTyr⁺)/GFP-positivas (GFP⁺). Conforme pode ser observado, a população de células duplamente marcadas é significativamente menor ($n = 4$, $*** p < 0,001$) para os mutantes Y15A, Y367A e Y372F, quando comparadas com células que expressam o receptor P2X4 selvagem. Nenhuma diferença estatística foi observada para os demais mutantes.

Para medirmos os níveis de expressão de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina dos mutantes e compararmos com o receptor *wild-type*, nós lançamos mão dos valores de intensidade de fluorescência média (*mean fluorescence intensity*; MFI). O que nós observamos foi um deslocamento para a esquerda na intensidade de fluorescência para TAMRA para os mutantes Y15A ($1,34 \pm 0,04$), Y367A ($1,43 \pm 0,07$) e Y372F ($1,37 \pm 0,02$), em relação às células transfectadas com o receptor P2X4 *wild-type* ($1,66 \pm 0,11$), indicando um decréscimo na expressão relativa de proteínas com resíduos de fosfotirosina (Figura 4.12). Nenhuma diferença foi detectada entre os demais mutantes e o receptor selvagem (Figura 4.13).

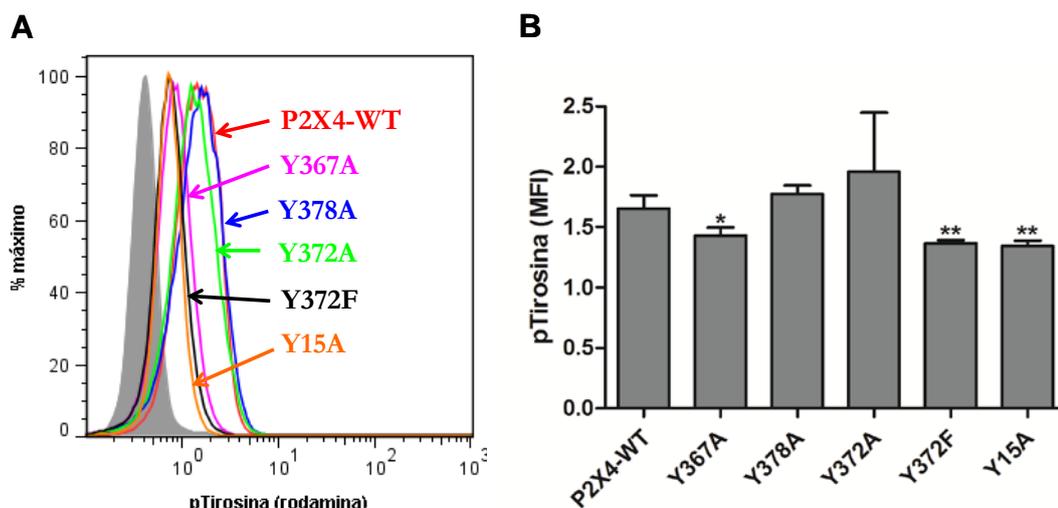


Figura 4.13. Análise dos níveis de expressão de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina entre células transfectadas com o receptor P2X4 selvagem e os mutantes. (A) Histogramas representativos comparando a expressão de fosfotirosina em células controle (P2X4-WT) e transfectadas com os mutantes Y15A, Y367A, Y372A, Y372F e Y378A. Em cinza está representado o “branco”. (B) Quantificação dos histogramas mostrando que a expressão relativa de proteínas com resíduos de fosfotirosina é estatisticamente menor para populações de células expressando os mutantes Y15A ($p < 0,01$), Y367A ($p < 0,05$) e Y372F ($p < 0,01$), em relação ao controle (P2X4-WT), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para os demais mutantes.

4.8. Imunoprecipitação, *western-blot* e microfluorimetria

Para investigarmos se o receptor P2X4 é fosforilado em resíduos de tirosina e em quais resíduos ele poderia ser fosforilado, lançamos mão da técnica de *western-blot*, usando dois anticorpos - um contra o receptor P2X4 e outro contra fosfotirosina. Uma vez que o uso do extrato total de proteínas poderia levar a um resultado falso-positivo, caso tenhamos uma proteína do mesmo tamanho do receptor P2X4 e que seja fosforilada, o mais recomendado é trabalhar com um imunoprecipitado do receptor P2X4. Assim, seguimos à imunoprecipitação, como descrito em Materiais e Métodos.

Capítulo 4: Resultados

Células HEK-293T expressando o receptor P2X4 *wild-type* ou um dos mutantes (Y15F, Y367A, Y372A, Y372F ou Y378A) foram tratadas por 20 minutos com o inibidor de tirosina-fosfatases pervanadato (Charpentier et al., 2005), antes de serem lisá-las para imunoprecipitação do receptor. Apesar desse tratamento, não detectamos nenhum sinal de fosfo-tirosina nos receptores selvagem e mutantes, como pode ser constatado através da figura 4.14.

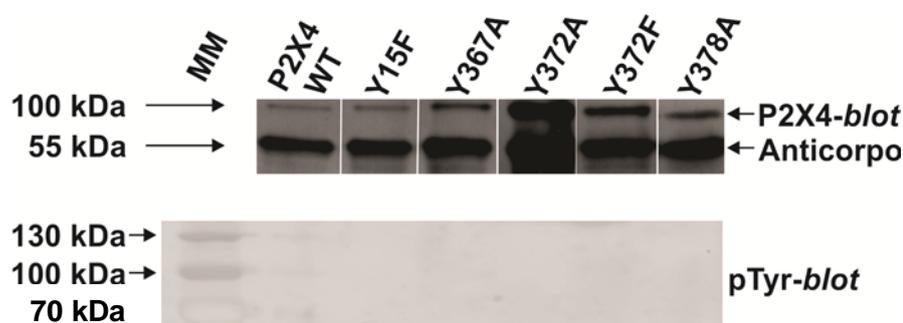


Figura 4.14. Análise da expressão e fosforilação em resíduos de tirosina do receptor P2X4 *wild-type* e mutantes por *western-blot*. Padrão de bandas obtido após *SDS-PAGE* e *western-blot*. As células foram tratadas com pervanadato e, em seguida, lisadas. O receptor P2X4 aparece como uma banda de cerca de 100 kDa, muito embora a proteína de fusão com GFP tenha cerca de 70 kDa. Isso se deve ao fato de que o receptor é glicosilado na sua alça extra-celular em resíduos de arparagina, o que retarda sua migração no gel de eletroforese. A banda de 55 kDa corresponde à cadeia pesada do anticorpo. Nenhuma banda foi observada com o *Immunoblotting* empregando anticorpo anti-fosfo-tirosina (*pTyr-blot*). MM = marcador de massa molecular. Como controle positivo para o anticorpo anti-fosfo-tirosina, foi utilizada uma amostra de extrato total de proteína, tendo sido observadas várias bandas (não mostrado).

Capítulo 4: Resultados

Visto que a mutação de um resíduo de fenilalanina para um de alanina representa uma grande mudança do ponto de vista estrutural, o que poderia comprometer o correto dobramento da extremidade N-terminal do receptor P2X4, resolvemos criar o mutante Y15F e ensaiá-lo através da técnica de microfluorimetria (para os demais mutantes já existem trabalhos publicados; ver Introdução). Avaliamos as variações na concentração intracelular de cálcio induzidas por duas diferentes concentrações de ATP (2,5 μ M e 25 μ M) em células HEK-293T transfectadas com o receptor P2X4 *WT* e o mutante Y15F. Cabe lembrar que as células HEK-293T expressam receptores P2Y (Schachter et al., 1997). Portanto, as mesmas tiveram que ser pré-tratadas por 5 minutos com *cibacron blue* (10 μ g/ml), um inibidor de receptores P2Y, antes da co-aplicação de ATP e *cibacron blue*. Nenhuma diferença estatística foi observada entre as respostas induzidas pelo receptor selvagem e o mutante (Figura 4.15).

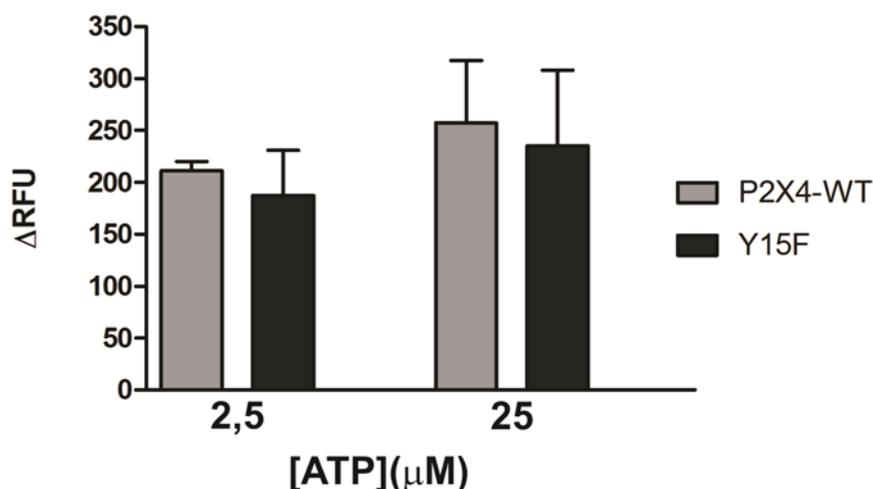
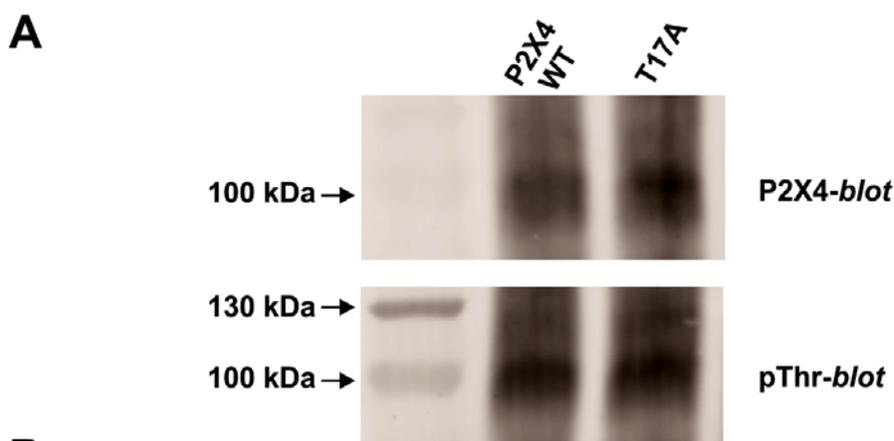


Figura 4.15. Variações na concentração intracelular de cálcio induzidas pelo receptor P2X4 *WT* e pelo mutante Y15F em células HEK-293T. O influxo de cálcio e, conseqüentemente, a variação na sua concentração intracelular induzidos por diferentes concentrações do agonista ATP foram monitorados por microfluorimetria usando *Flexstation*. Os dados apresentados no gráfico representam a média dos valores \pm erro-padrão de três experimentos independentes. RFU: unidade relativa de fluorescência. Como pode ser verificado, as respostas induzidas pelos receptores selvagem e mutante não foram estatisticamente diferentes, em ambas as concentrações de ATP.

Capítulo 4: Resultados

4.9. Imunoprecipitação e *western-blot* para o mutante T17A

Uma questão que ainda carecia de resposta é se o receptor P2X4 seria fosforilado por PKC. Para isso foi construído o mutante T17A. Experimentos iniciais com esse mutante revelou que ele não é funcional (Figura 4.6). Para investigarmos se o receptor P2X4 é fosforilado por PKC, células HEK-293T foram transfectadas com o receptor selvagem e com o mutante T17A. Após lise e imunoprecipitação do receptor, nós realizamos um ensaio de *western-blot* empregando os anticorpos anti-P2X4 e anti-fosfo-treonina. Surpreendentemente, nós detectamos sinal de fosforilação de resíduos de treonina tanto no receptor P2X4 *WT* quanto no mutante T17A (Figura 4.16A). Isso levantou a possibilidade de que o receptor pudesse ser fosforilado em outros sítios. De fato, um olhar mais atento para a estrutura primária do receptor revela que ele possui outros sítios potenciais de fosforilação por PKC (Figura 4.16B).



B

```

MAGCCAALAAFLFEYDTPRIVLIRSRK[VGLMNRVOLLILAYVIGWVFW]WEKGYQETDSV
VSSV[TTK]VKGVAVTN[TSK]LGFRIWDVADYVI PAQEENSLFVMTNVILT MNQTQGLCPEIP
DATTVCKSDASCTAGSAGTHSNGVS[TR]CVAFNGSVKTC EVAAWCPVEDDTHVPQPAFLK
AAENFTLLVKNNI WYPKFNFSKRNI LPNITTTYLKSCIYDAKTD PFCPI FRLGKIVENAG
HSFQDMAVEGGIMGIQVNWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDVEHNVSPGYNFRFAKYY
RDLAGNEQRTLKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIF[PTMINIGSGLALLGMATVLCDIIVLYC]
MKKRLYYREKKYKYVEDYEQGLASELDQ

```

Figura 4.16. Análise da fosforilação do receptor P2X4 em resíduos de treonina. (A) O receptor foi imunoprecipitado a partir de extrato total de proteínas

Capítulo 4: Resultados

provenientes de células HEK-293T transitoriamente transfectadas com o receptor selvagem ou com o mutante T17A. *Immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-treonina (pThr-*blot*) revelou que tanto o receptor selvagem quanto o mutante T17A são fosforilados em resíduos de treonina. P2X4-*blot* representa um controle da expressão dos receptores selvagem e mutante em ambas as amostras. (B) Estrutura primária do receptor P2X4. Além do sítio mutado (TPR), o receptor P2X4 possui três outros sítios (-TTK-; -TSK- e -TGR-) em que poderia ser fosforilado por PKC em resíduos de treonina. Em vermelho, as regiões transmembrânicas do receptor.

Em resumo, nós demonstramos que a atividade do receptor P2X4 depende de resíduos de treonina e tirosina localizados tanto na extremidade N-terminal quanto na C-terminal. Nossos dados também sugerem que o receptor é modulado por treonina quinases (muito provavelmente PKC). Entretanto, a modulação por tirosina fosfatases não envolve a fosforilação direta de resíduos de tirosina do receptor. Finalmente, temos indícios que vias de sinalização intracelulares induzidas pelo receptor P2X4 envolvem a participação de tirosina quinases.

*Our heads are round
so our thoughts can change direction.*
Francis Picabia.

5.1. O resíduo Thr¹⁷ é fundamental para a atividade do receptor P2X4 humano, mas não é o único que deve ser fosforilado por PKC

Através do presente trabalho, nós investigamos os efeitos que mutações pontuais tem sobre a atividade do receptor P2X4 humano recombinantemente expresso em células HEK-293T. Nós lançamos mão de técnicas de biologia molecular, bioquímica e *whole-cell current recording* para avaliar a expressão e atividade de uma forma do receptor fusionada a GFP. Aqui vale a pena mencionar que a fusão do receptor a GFP não altera suas propriedades farmacológicas. Quando células HEK-293T expressando o receptor P2X4 *wild-type* foram submetidas à aplicação de ATP em diferentes concentrações, apresentaram correntes iônicas, cujas amplitudes dependiam da concentração do mesmo, fornecendo um valor de EC₅₀ de $1,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$ (Figura 4.2C e D). Esse valor não é estatisticamente diferente daquele encontrado com o receptor não-fusionado a GFP. Por exemplo, Jones e colaboradores obtiveram um valor de $1,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$, utilizando a mesma linhagem celular, *whole-cell current recording* e método semelhante de aplicação de agonista (Jones et AL., 2000). Também como ocorre com o receptor não-fusionado, a ivermectina atuou como um modular alostérico positivo sobre a forma fusionada, potencializando a resposta do agonista ATP

Capítulo 5: Discussão

(Figura 4.2B; North, 2002). Esses resultados permitiram que continuássemos nossas investigações com o receptor P2X4 fusionado a GFP.

Nossos estudos começaram pela extremidade N-terminal do receptor P2X4 por esta conter um sítio de fosforilação por PKC conservado entre todos os membros da família. Conforme mencionamos na Introdução, existem muitas evidências de que a atividade dos receptores P2X é controlada por PKC. Por exemplo, a remoção de cálcio extracelular abole a dessensibilização de receptores P2X3, quando ensaiados através da técnica de *whole-cell current recording*. Similarmente, o tratamento com calcineurina, uma serina/treonina fosfatase dependente de cálcio, diminui a taxa de dessensibilização do receptor. Esses resultados sugerem um envolvimento da sinalização por cálcio e, conseqüentemente, por PKC (King et al., 1997). Evidência mais direta do envolvimento de PKC veio com um trabalho sobre o receptor P2X1, mostrando que o resposta ao ATP é potencializada pelo ativador de PKC, PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Liu et al., 2006). A mutação do sítio de fosforilação por PKC, por exemplo, substituindo-se o dependendo do subtipo de receptor. Para os receptores P2X1 e P3X3 tal mutação resulta em menor resposta ao ATP e perda de atividade, respectivamente (Ennion e Evans, 2002; Brown e Yule, 2007). Em contrapartida, para o receptor P2X2, há uma mudança no seu perfil de dessensibilização. O mutante P2X2 T18A se dessensibiliza rápida e completamente em comparação com o receptor selvagem (Boué-Grabot et al., 2000).

Capítulo 5: Discussão

O nosso trabalho é o primeiro a mostrar o papel que esse sítio de fosforilação por PKC desempenha na atividade do receptor P2X4. Semelhante ao receptor P2X3, o resíduo Thr¹⁷ (a numeração corresponde àquela para a sequência do receptor P2X4) é fundamental para a atividade do receptor P2X4, uma vez que sua substituição por um resíduo de alanina faz com que o receptor perca totalmente sua atividade (Figura 4.6). Isso levantou duas hipóteses: a de que esse resíduo tenha um papel estrutural e seja importante para o correto dobramento da extremidade N-terminal do receptor, e/ou de que a fosforilação por PKC seja importante para manter a atividade do receptor. Para testar a segunda hipótese, nós criamos o mutante T17A e o ensaiamos através de *western-blot* com um anticorpo anti-fosfotreonina para comparar com o receptor selvagem. Curiosamente, nós verificamos fosforilação de resíduos de tirosina tanto para o receptor selvagem quanto para o mutante (Figura 4.16A). Já foi observado que o receptor P2X1 também é fosforilado nesse mesmo resíduo (Liu et al., 2006), o que parece não ocorrer com o receptor P2X3, muito embora sua resposta a ATP seja potencializada pelo ativador de PKC, PMA (Brown e Yule, 2007). Os dados obtidos com o receptor P2X2 são, todavia, controversos. Enquanto um grupo tenha detectado fosforilação do receptor, outro não obteve a mesma evidência (Boué-Grabot et al., 2000; Franklin et al., 2007). O fato é que nossos dados não descartam a possibilidade de que o receptor P2X4 seja fosforilado por PKC no seu sítio N-terminal. Eles indicam também que o receptor pode se fosforilado em outros sítios. Quando olhamos para a estrutura primária do receptor P2X4, constatamos que ele realmente contém outros resíduos de

Capítulo 5: Discussão

treonina que fazem parte de sítios de fosforilação por PKC. Esses três outros sítios ocorrem entre as regiões transmembrânicas do receptor, ou seja, na sua alça extracelular (Figura 4.16B). A possibilidade de que PKC possa fosforilar outros sítios também foi levantada para o receptor P2X3 humano em trabalho publicado por Wirkner e colaboradores. Os autores observaram que o nucleotídeo GTP é capaz de aumentar a resposta do receptor P2X3 ao agonista α,β -metileno-ATP de uma forma dependente da ativação de PKC. Tal aumento é bloqueado por vários inibidores de PKC. E o mais interessante é que o GTP perde essa propriedade quando o resíduo de treonina 134 é substituído por um resíduo de alanina (Wirkner et al., 2005). É digno de nota que esse resíduo corresponde ao resíduo Thr¹⁴⁶ do receptor P2X4 e faz parte do sítio -T¹⁴⁶GR- de reconhecimento por PKC (Figura 4.16B).

Nós acreditamos que uma baixa expressão do receptor associada à baixa eficiência dos métodos de imunoprecipitação tenham dificultado a detecção de fosfo-treonina em alguns trabalhos (Brown e Yule, 2007; Franklin et al., 2007; Wirkner et al., 2005). Mesmo no trabalho mencionado no parágrafo anterior, os autores argumentam que a expressão do receptor P2X3 em células HEK-293 não foi alta o suficiente para permitir que a incorporação de fosfato radioativamente marcado fosse medida e, conseqüentemente, que a fosforilação do receptor fosse observada (Wirkner et al., 2005). Com respeito ao trabalho publicado por Boué-Grabot e colaboradores, devemos mencionar que eles não obtiveram indícios de fosforilação em outros sítios do receptor P2X2 muito provavelmente por utilizar um anticorpo anti-fosfo-treonina especificamente desenvolvido contra o sítio N-terminal e por terem

Capítulo 5: Discussão

eliminados os demais sítios, introduzindo mutações no receptor (Boué-Grabot et al., 2000).

De acordo com os resultados que obtivemos, não podemos descartar que o resíduo Thr¹⁷ seja fosforilado. Para isso, teremos que eliminar todos os outros sítios e investigar se ainda assim o receptor continua sendo fosforilado. Acreditamos, entretanto, que esse resíduo tem um papel estrutural muito importante e/ou é o principal sítio de fosforilação por PKC. Na nossa hipótese, a regulação da atividade do receptor por PKC não deve depender de um único sítio, ou seja, é provável que a PKC possa fosforilar outros sítios e a atividade final do receptor reflita um balanço dessas fosforilações.

5.2. A atividade do receptor P2X4 depende de determinados resíduos de tirosina, mas parece não estar relacionada à fosforilação direta do receptor por tirosina quinases

Além do sítio de fosforilação por PKC, todos os receptores P2X também possuem um resíduo de tirosina na sua extremidade N-terminal, que no receptor P2X corresponde ao resíduo Y¹⁵ (Figura 1.3). Resolvemos também investigar a importância desse resíduo para a atividade do receptor P2X4. A primeira coisa que fizemos foi construir o mutante Y15A e testar sua atividade através da técnica de *whole-cell current recording*. Quando células HEK-293T foram submetidas à aplicação de ATP na concentração de 100 µM, nenhum sinal de corrente iônica foi detectado, muito embora o receptor seja expresso na membrana plasmática das células (Figura 4.6). Através de análise de bioinformática, esse resíduo foi identificado como um candidato para a ligação das proteínas adaptadoras Nck1 e Nck2, que interagem com resíduos de

Capítulo 5: Discussão

tirosina fosforilados (Figura 4.7; Frese et al., 2006). O fato de que as correntes iônicas induzidas por ATP são minimizadas pelo pré-tratamento com o inibidor de tirosina fosfatase pervanadato nos fez supor que o receptor pudesse ter sua atividade regulada por tirosina quinases e fosfatases via modificação direta dos resíduos (Figura 4.8). Nossa hipótese inicial era de que o tratamento das células com pervanadato aumentaria a fosforilação do receptor e, conseqüentemente, diminuiria sua atividade. Levando em conta nosso raciocínio, era de se esperar então que o mutante Y15A, por não estar sujeito a tal regulação, tivesse atividade maior ou igual à do receptor selvagem. Entretanto, como verificamos, esse mutante não é funcional, indicando que o resíduo Y¹⁵ deva ter um papel estrutural muito importante e/ou outros resíduos de tirosina estão envolvidos na regulação da atividade do receptor P2X4. Uma vez que a substituição de um resíduo de tirosina para um de alanina representa uma mudança estrutural significativa, nós resolvemos criar o mutante Y15F e testar sua atividade. Através de medidas na variação da concentração de cálcio intracelular como resposta ao ATP, nós verificamos que o mutante Y15F possui atividade equiparável àquela do receptor P2X4 *WT* (Figura 4.15). Embora nossos resultados sugiram que esse resíduo de tirosina tenha um papel predominantemente estrutural e que o receptor requer a presença de um resíduo de aminoácido aromático nessa posição, devemos destacar que esses são dados preliminares e carecem de maior investigação.

Como já mencionado, nossos dados também sugeriram que outros resíduos de tirosina poderiam estar envolvidos no controle da atividade do receptor. Foi então que voltamos a nossa atenção para a extremidade C-

Capítulo 5: Discussão

terminal do receptor P2X4. O receptor P2X4 possui dois importantes motivos C-terminais que se baseiam, em parte, em resíduos de tirosina: os motivos -Y³⁶⁷XXXK- e -Y³⁷⁸EQGL-. O primeiro motivo é importante para a estabilização do receptor na membrana plasmática e as mutações Y367A e Y367F possuem os mesmos efeitos, quais sejam, menor expressão do receptor e perda de atividade (Chaumont et al., 2004). O motivo -YEQGL- assegura o controle da atividade do receptor P2X4 pela PKA e está envolvido na endocitose do receptor (Brown et al., 2010). Outro resíduo de tirosina fundamental para a atividade do receptor é o resíduo Y³⁷², cuja substituição por um resíduo de alanina resulta em receptores não-funcionais (Fountain e North, 2006). Dada a relevância desses resíduos, nos resolvemos investigá-los como possíveis alvos de fosforilação.

Subsequente análise de citometria de fluxo na presença de um anticorpo contra resíduos de fosfo-tirosina indicaram que, entre as células que expressam o receptor P2X4, a percentagem de células fosfo-tirosina-positivas é a mesma para os mutantes Y372A (86 ± 10%) e Y378A (79 ± 6.9%), mas substancialmente menor para os mutantes Y15A (35 ± 12%), Y367A (48 ± 6.4%) e Y372F (31 ± 1.7%), quando comparados com células que expressam o receptor *wild-type* (76 ± 5.6%) (Figuras 4.11 e 4.12). Resultados semelhantes foram obtidos quando quantificamos a expressão relativa de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina e expressamos através dos valores de intensidade de fluorescência média (Figura 4.13). Destaca-se aqui que, através da análise de citometria de fluxo, estamos olhando para células inteiras. A marcação de fosfo-tirosina, portanto, não reflete apenas a provável

Capítulo 5: Discussão

fosforilação do receptor P2X₄, mas sim de todas as proteínas que eventualmente sejam fosforiladas em resíduos de tirosina. Recorremos então ao ensaio de *western-blot* utilizando anticorpos específicos contra o receptor P2X₄ e contra fosfo-tirosina. Embora nossos dados tenham sugerido inicialmente que o receptor P2X₄ é regulado via fosforilação de resíduos de tirosina, nossa hipótese mostrou-se não ser verdadeira, uma vez que nenhum sinal de fosfo-tirosina foi detectado através de imunoprecipitação do receptor selvagem e mutantes, seguida de *SDS-PAGE* e *western-blot* (Figura 4.14). Resultados semelhantes foram obtidos com o receptor P2X₁, mesmo quando uma técnica tão sensível quanto espectrometria de massas foi utilizada (Roberts et al., 2012). De fato, conhecemos apenas um trabalho reportando a fosforilação de receptores P2X em resíduos de tirosina. Esse diz respeito ao receptor P2X₃, alvo de fosforilação por *C-terminal Src kinase* (Csk) (D'Arco et al., 2009). O segundo trabalho foi feito com o receptor P2X₇, para o qual o resíduo Y³⁴³ foi identificado como um sítio de fosforilação (Kim et AL., 2001).

Se o receptor P2X₄ não é fosforilado em resíduos de tirosina, como explicar então os resultados obtidos com o tratamento com pervanadato e com citometria de fluxo? É muito provável que a regulação do receptor P2X₄ por tirosina fosfatases e quinases não envolva a fosforilação ou desfosforilação direta do receptor, mas sim de alguma proteína acessória. Essa proteína, por sua vez, deve interagir ou não com o receptor, dependendo de seu estado de fosforilação. Como fica claro no nosso trabalho, há um grande corpo de evidências de que a atividade dos receptores P2X seja modulada por quinases. Para o receptor P2X₄, por exemplo, é bem estabelecido que sua atividade é

Capítulo 5: Discussão

regulada por PKA. Entretanto, o receptor não possui nenhum sítio de fosforilação para PKA. É de se concluir, portanto, que o alvo direto da PKA seja outra proteína. Nesse caso específico, a literatura tem sugerido que os alvos sejam proteínas do complexo AP2, que participam do processo de endocitose do receptor P2X4 (Brown e Yule, 2010). Outro estudo que reforça a noção de que proteínas acessórias desempenham um papel importante tanto na regulação quanto na modulação de receptores P2X foi feito com o receptor P2X7. Foi observado que uma proteína de choque térmico (*heat shock protein, HSP*), HSP90, interage com o receptor P2X7 e modula a atividade do mesmo quando fosforilada (Adinolfi et al., 2003).

Com respeito aos dados de citometria de fluxo, a hipótese mais plausível é de que o receptor P2X4 induz vias de sinalização que resultam na ativação de tirosina quinases e, por conseguinte, na fosforilação de seus alvos. Para alguns mutantes (Y15A, Y367 e Y372F), a perda de função deve ser tamanha que impede a ativação de tirosina quinases e a consequente fosforilação de seus alvos. Isso explicaria os resultados que obtivemos com citometria de fluxo. Isso faz sentido, por exemplo, se considerarmos o mutante Y378A. É descrito na literatura que tal mutação impede a interação entre o receptor e proteínas adaptadoras, que medeiam o processo de endocitose do receptor P2X4. O resultado final é uma maior expressão do receptor na membrana plasmática e, conseqüentemente, uma maior amplitude nas correntes induzidas por ATP (Royle et al., 2005). Portanto, esse mutante ainda é capaz de induzir vias de sinalização que resultam na ativação de tirosina quinases, assim como o receptor selvagem.

Capítulo 5: Discussão

Embora pouco se saiba sobre como a ativação de receptores P2X está ligada a vias de sinalização intracelulares, é de consenso geral que as respostas desencadeadas pelos receptores se devem, de início, a um aumento da permeabilidade celular ao íon cálcio. Já foi demonstrado que a ativação do receptor P2X2 em células de feocromocitoma de rato (células PC12) induz a fosforilação de resíduos de tirosina de Pyk2, uma quinase que regula a atividade de MAP quinases (Swanson et al., 1998). Da mesma forma, um estudo indicou que a ativação da via PI3K/Akt pelo receptor P2X7 depende de tirosina quinases (Jacques-Silva et AL., 2004). É plausível, portanto, supor que o receptor P2X4 também possa induzir, através de aumento na concentração intracelular de cálcio, a atividade de tirosina quinases.

Vale ainda resultar que vários polimorfismos já foram observados dentro dos genes que codificam os receptores P2X, estando muitos deles relacionados com condições patológicas. Isso torna ainda mais necessário entender os efeitos que determinadas mutações têm sobre a atividade desses receptores. Por exemplo, o polimorfismo Y315C do receptor P2X4 é dois vezes mais frequente entre pacientes com doença macular degenerativa do que entre indivíduos sadios (Gu et al., 2013). Também já foram identificados poliformismos para o receptor P2X7, muitos dos quais estão associados com distúrbios psiquiátricos, como transtorno bipolar (Barden et al., 2006). Talvez tais polimorfismos possam, no futuro próximo, explicar a relação entre os receptores P2X e outras doenças, como por exemplo, a relação entre o receptor P2X4 e o autismo (Wyatt et al., 2013).

Capítulo 5: Discussão

Em resumo, nossos dados sugerem que o receptor P2X4 é regulado por tirosina fosfatases e quinases sem que ele seja diretamente fosforilado. Também observamos que o resíduo de tirosina localizado na extremidade N-terminal do receptor P2X4 desempenha um papel estrutural importante, sendo fundamental no correto dobramento da extremidade amino-terminal do receptor e, conseqüentemente, na sua atividade. É provável que a própria ativação do receptor P2X4 leva ao aumento de atividade de tirosina quinases e estas, por sua vez, via proteínas acessórias, modulam o receptor, constituindo-se num mecanismo de regulação por *feed-back*.

*I am the wisest man alive,
for I know one thing,
and that is that I know nothing.*
Socrates.

- O receptor P2X4 humano foi expresso em células HEK-293T, na forma de uma proteína fusionada a GFP através de sua extremidade N-terminal. Experimentos de *whole-cell current recording* revelaram que a proteína de fusão possui propriedades equiparáveis às das do receptor não fusionado.
- O resíduo T¹⁷ é fundamental para o correto funcionamento do receptor P2X4, sendo que sua substituição por um resíduo de alanina resulta em receptores não-funcionais.
- O mutante T17A também é fosforilado em resíduos de treonina, o que indica que o receptor P2X4 possui outros sítios de fosforilação para, muito provavelmente, treonina quinases. Dados da literatura apontam PKC como principal candidato.
- A atividade do receptor P2X4 é modulada por tirosina fosfatases, sendo que o mecanismo não envolve desfosforilação direta do receptor, uma vez que não detectamos fosforilação do receptor em resíduos de tirosina, através da técnica de *western-blot*.
- O substituição do resíduo Y¹⁵ por um de alanina resulta em perda de atividade do receptor, contudo a substituição para um resíduo de

Capítulo 6: Conclusões

fenilalanina parece não ter efeito algum sobre a atividade do receptor P2X4. Isso sugere que tal resíduo tem um papel estrutural importante, sendo crucial para o receptor que haja um resíduo de aminoácido aromático nessa posição.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight G, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson K, Weisman GA. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy *Pharmacol Rev.* 58:281–341.

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. (2008) Purinergic signaling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences.* 32:19-29.

Adinolfi E, Kim M, Young MT, Di Virgilio F, Surprenant A. (2003) Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 278:37344-51.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 71: 248-54.

Boué-Grabot E, Archambault V, Séguéla P. (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J. Biol Chem.* 275:10190-5.

Brown DA, Bruce JI, Straub SV, Yule DI. (2004) cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *J Biol Chem.* 279:39485-94.

Capítulo 7: Referências

Brown DA, Yule DI. (2007) Protein kinase C regulation of P2X3 receptors is unlikely to involve direct receptor phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1773:166-175.

Brown DA, Yule DI. (2010) Protein kinase A regulation of P2X(4) receptors: requirement for a specific motif in the C-terminus. *Biochim Biophys Acta*. 1803:275-87.

Buchthal F, Folkow B. (1948) Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand*. 15:150-60.

Barden N, Harvey M, Gagné B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, Labbé M, Villeneuve A, Rochette D, Bordeleau L, Stadler H, Holsboer F, Müller-Myhsok B. (2006) Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 141B:374-82.

Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach. ed. Straub, R.W. & Bolis, L. pp. 107–118. New York: Raven Press.

Burnstock, G. (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. 4:47–52.

Burnstock G. (2006) Purinerg signaling. *Br J Pharmacol*. 147:172-181.

Capítulo 7: Referências

Burnstock G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 64:471-83.

Burnstock G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 7:575-90.

Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME. (1963) Inhibition of the smooth muscle on the taenia coli. *Nature.* 200:581-2.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 40:668-88.

Charpantier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, Fuhrer C. (2005) Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci.* 25:9836-49.

Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F. (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem.* 279:29628-38.

Chen Y, Li GW, Wang C, Gu Y, Huang LY. (2005) Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. *Pain.* 119:38-48.

D'Arco M, Giniatullin R, Leone V, Carloni P, Birsa N, Nair A, Nistri A, Fabbretti E. (2009) The C-terminal Src inhibitory kinase (Csk)-mediated tyrosine

Capítulo 7: Referências

phosphorylation is a novel molecular mechanism to limit P2X3 receptor function in mouse sensory neurons. *J Biol Chem.* 284:21393-401.

Drury A.N. and Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol.* 68: 213–237.

Egan TM, Samways DS, Li Z. (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452:501-12.

Ennion SJ, Evans RJ. (2002) P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:611-6.

Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, Simonetti M, Nistri A, Giniatullin R. (2006) Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide. *J Neurosci.* 26:6163–6171.

Fiske C.H., SubbaRow Y. (1929) Phosphorous compounds of muscle and liver. *Science.* 70:381–382.

Fountain SJ, North RA. (2006) A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *J Biol Chem.* 281:15044-9.

Franklin C, Braam U, Eisele T, Schmalzing G, Hausmann R. (2007) Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X(2) and P2X (3) receptors by protein kinase C. *Purinergic Signal.* 3:377-88.

Capítulo 7: Referências

Freist W, Verhey JF, Stühmer W, Gauss DH. (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 434:61-5.

Frese S, Schubert WD, Findeis AC, Marquardt T, Roske YS, Stradal TE, Heinz DW. (2006) The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains. *J Biol Chem.* 281:18236-45.

Gu BJ, Baird PN, Vessey KA, Skarratt KK, Fletcher EL, Fuller SJ, Richardson AJ, Guymer RH, Wiley JS. (2013) A rare functional haplotype of the P2RX4 and P2RX7 genes leads to loss of innate phagocytosis and confers increased risk of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 27:1479-87.

Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 72:1447-56.

Holton P. (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 145: 494–504.

Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT. (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol.* 141:1106-17.

Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PP. (2000) Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol.* 129:388-94.

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* 460:592-8.

Capítulo 7: Referências

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* 20:6347-58.

King B, Chen CC, Akopian AN, Burnstock G, Wood JN. (1997) A role for calcineurin in the desensitization of the P2X3 receptor. *Neuroreport.* 8:1099-102.

Kirkpatrick K, Burnstock G. (1987) Sympathetic nerve-mediated release of ATP from the guinea-pig vas deferens is unaffected by reserpine. *Eur J Pharmacol.* 138:207-14.

Krishtal OA, Pidoplichko VI. (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience.* 5:2325-2327.

Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR. (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci.* 108:12-6.

Lohmann K. (1929) Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwiss.* 17: 624-625.

Martins AH, Alves JM, Trujillo CA, Schwindt TT, Barnabé GF, Motta FL, Guimaraes AO, Casarini DE, Mello LE, Pesquero JB, Ulrich H. (2008) Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry A.* 73:361-8.

North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-67.

Capítulo 7: Referências

Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.*31:3635-41.

Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:13132–13137.

Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA. (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci.* 22:8363-9.

Paukert M, Osteroth R, Geisler HS, Brandle U, Glowatzki E, Ruppertsberg JP, Gründer S. (2001) Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X3 subunit. *J Biol Chem.* 276:21077–21082.

Ralevic V, Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50:413–492.

Resende RR, Britto LR, Ulrich H. (2008) Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Neurosci.* 26:763-77.

Resende RR, Majumder P, Gomes KN, Britto LR, Ulrich H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience.* 146:1169-81.

Capítulo 7: Referências

Roberts JA, Bottrill AR, Mistry S, Evans RJ. (2012) Mass spectrometry analysis of human P2X1 receptors; insight into phosphorylation, modelling and conformational changes. *J Neurochem.* 123:725-35.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452:486-500.

Royle SJ, Bobanović LK, Murrell-Lagnado RD. (2002) Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem.* 277:35378-85.

Royle SJ, Qureshi OS, Bobanović LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD. (2005) Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci.* 118:3073-80.

Rubio ME, Soto F. (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci.* 21:641-53.

Salter MW, Kalia LV. (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci.* 5:317-28.

Schachter JB, Sromek SM, Nicholas RA, Harden TK. (1997) HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors. *Neuropharmacology.* 36:1181-7.

Schweitzer E. (1987) Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists. *J Neurosci.* 7:2948-56.

Capítulo 7: Referências

Séguéla P, Haghghi A, Soghomonian JJ, Cooper E. (1996) A novel neuronal P2X ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci.* 16:448-55.

Sneddon P, Burnstock G. (1984) Inhibition of excitatory junction potentials in guinea-pig vas deferens by alpha, beta-methylene-ATP: further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur J Pharmacol.* 100:85-90.

Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stühmer W. (1996) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 223:456-60.

Stagg J, Smyth MJ. (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 29:5346–5358.

Stewart TJ, Smyth MJ. (2011) Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev.* 30:125–140.

Swanson KD, Reigh C, Landreth GE. (1998) ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J Biol Chem.* 273:19965-71.

Toth-Zsomboki E, Oury C, Watanabe H, Nilius B, Vermylen J, Hoylaerts MF. (2002) The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function. *FEBS Lett.* 524:15-9.

Trang T, Beggs S, Salter MW. (2006) Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch.* 452:645-52.

Capítulo 7: Referências

Trujillo CA, Nery AA, Martins AH, Majumder P, Gonzalez FA, Ulrich, H. (2006) Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry*. 45:224-233.

Udgaonkar JB, Hess GP. (1987) Chemical kinetic measurements of a mammalian acetylcholine receptor by a fast-reaction technique. *Proc Natl Acad USA*. 84:8758-8762.

Ulrich H, Gameiro AM. (2001) Aptamers as tools to study dysfunction in the neuronal system. *Curr Med Chem*. 1:125-132.

Vial C, Roberts JA, Evans RJ. (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 25:487-93.

Wang Y, Haughey NJ, Mattson MP, Furukawa K. (2004) Dual effects of ATP on rat hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport*. 15:633-6.

White PJ, Webb TE, Boarder MR. (2003) Characterization of a Ca⁺² response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol*. 63:1356-1363.

Wiesner A, Fuhrer C. (2006) Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cell Mol Life Sci*. 63:2818-28.

Wirkner K, Stanchev D, Köles L, Klebingat M, Dihazi H, Flehmig G, Vial C, Evans RJ, Fürst S, Mager PP, Eschrich K, Illes P. (2005) Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C. *J Neurosci*. 25:7734-42.

Capítulo 7: Referências

Wyatt LR, Godar SC, Khoja S, Jakowec MW, Alkana RL, Bortolato M, Davies DL. (2013) Socio-communicative and sensorimotor impairments in male P2X4-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038/npp.2013.98.

[Epub ahead of print]

Yan Z, Liang Z, Obsil T, Stojilkovic SS. (2006) Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem*. 281:32649-59.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 8:437–502.