

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo de proteínas candidatas ao poro associado ao receptor P2X7 em diferentes
tipos celulares

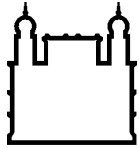
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Aluna: Carla Santos de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

RIO DE JANEIRO

Outubro 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLA SANTOS DE OLIVEIRA

Estudo de proteínas candidatas ao poro associado ao receptor P2X7 em diferentes tipos celulares

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

RIO DE JANEIRO

2016

Oliveira, Carla.

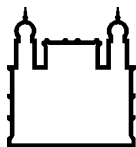
Estudo de proteínas candidatas ao poro associado ao receptor P2X7 em diferentes tipos celulares / Carla Oliveira. - Rio de janeiro, 2016.
148 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Orientador: Luiz Anastacio Alves.

Bibliografia: f. 103-123

1. Receptor P2X7. 2. Hipótese Multiporos. 3. Poro Associado ao P2X7R.
4. Proteínas Formadoras de Poro Proteínas Formadoras de Poro. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLA SANTOS DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE PROTEÍNAS CANDIDATAS AO PORO ASSOCIADO AO
RECEPTOR P2X7 EM DIFERENTES TIPOS CELULARES**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

Aprovada em: 14/10/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Andrea Henrique Pons (Presidente)

Prof. Dr. Robson Coutinho Silva (Membro Titular)

Prof. Dr. João Ricardo Lacerda de Menezes (Membro Titular)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Suplente)

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo (Suplente)

Rio de Janeiro, 14 de outubro de 2016

**Trabalho realizado no Laboratório de Comunicação Celular do
Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, sob orientação do Dr. Luiz Anastacio
Alves.**

Colaboradores:

**Dra. Mônica Santos de Freitas – Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de
Meis - UFRJ**

Dra. Juliana Reis Cortines – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ

**Dr. Pablo Pelegrín – Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria - Hospital
Virgen de la Arrixaca**

Agências Financiadoras:

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dedicatória

**Dedico este trabalho à minha família,
especialmente aos meus pais e à minha
vozinha (*in memoriam*).**

Agradecimentos

Nossa, como o tempo passa rápido! São mais de 10 anos nessa caminhada científica e tive o apoio de muita gente e tenho muito à agradecer...

Especialmente aos meus pais pelo incentivo, confiança, por me auxiliarem a caminhar e, principalmente, por não me deixarem desistir a cada tropeço. Amo vocês! Obrigada pelos puxões de orelha, a gente briga, discorda, mas no fim sei que é para o meu bem. Obrigada, obrigada, obrigada!

À minha vizinha, que os olhinhos brilhavam ao dizer “é minha neta”, que embora tenha partido nos últimos meses do Doutorado, acompanhou todas as minhas vitórias. Dona Santa, vó Maria, Santinha... Era dona de um abraço gordinho e carinhoso durante minha infância e juventude. Infelizmente com tempo o abraço gordinho foi diminuindo... emagrecendo... mas o carinho sempre igual. A dor da distância ainda é muito grande e ainda incomoda bastante, mas com certeza está melhor onde quer esteja. Obrigada pelo carinho e dedicação, vizinha.

Às minhas irmãs, por cada palavra de incentivo e orgulho e principalmente por me presentear com sobrinhas e afilhadas lindas e carinhosas que deixam o meu dia-a-dia mais leve e colorido, literalmente. Tia Carla ama demais, obrigada.

João, Letícia, Maria, Bruna, Natalia e Laís... Eles são muitos e fazem uma bagunça como ninguém, mas, sem dúvidas, fazem da Tia Carla/Carlota/Pateta uma pessoa muito feliz! Obrigada amores!

À Kellen, minha sobrinha/irmã, uma ligação difícil de explicar. Costumo dizer que é minha alma gêmea e que sem ela nada faria sentido. Simplesmente obrigada por existir.

Aos meus amigos, antigos e recentes, pela compreensão do sumiço em consequência do Doutorado e por fazerem de cada reencontro uma festa!

Às minhas amigas/maridas Anlui e Gi, por mais de 13 anos de companheirismo. Amigas de faculdade, viagens, fofocas, segredos... Obrigada Anlui por ser meu chaveirinho e obrigada Gi pelos abraços e acolhimento sempre que precisei.

Ao meu orientador Dr. Luiz Anastácio, por toda ajuda e paciência durante esses 10 anos científicos, graças a você consegui subir mais um degrau na vida, muito obrigada pela confiança. Obrigada pela compreensão nos últimos meses, não foi nada fácil, mesmo, mas com seu apoio deu tudo certo no final. Mais uma vez, muito obrigada.

Ao Dr. Anael, por toda ajuda, apoio e implicância também, obrigada por deixar o laboratório mais alegre.

À Dra. Cristina pela por todas as correções na dissertação, projetos, resumos, artigo e finalmente na tese também. Além do carinho e amizade que desenvolvemos ao longo dessa jornada!

À Liana, um presente do LCC. Uma pessoa especial, iluminada e de coração enorme. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar, desde fazer experimentos, passar células, imprimir a tese e até mesmo à diminuir a tensão e estresse do dia-a-dia com alguns chopes na Rua do Rio. Muito obrigada por tudo; pelos conselhos nos momentos difíceis e pelas risadas gostosas.

Aos amigos do LCC (Brasil) e do LAIB (Espanha), por toda ajuda, apoio e sugestões durante todo o desenvolvimento desta tese.

À amiga Dra. Fabiana, amiga de todas as horas, que apesar de não fazer mais parte do LCC está sempre presente na minha vida.

Às amigas que o Doutorado Sanduíche me proporcionou, Ana e Estela pessoas incríveis que amenizaram a saudade da família e dos amigos brasileiros.

Ao Dr. Pablo Pelegrin por me receber em seu laboratório e colocar à disposição tudo o que fosse necessário para o desenvolvimento dessa tese, desde reagentes aos treinamentos técnicos para utilização das diferentes técnicas e equipamentos.

À todos que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada, muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

Sumário

| | |
|---|-------------|
| Lista de Figuras..... | xiii |
| Lista de Tabelas..... | xvii |
| Lista de Quadros..... | xix |
| Abreviatura..... | xx |
| Resumo..... | xxiv |
| Abstract..... | xxv |
| I. Introdução..... | 1 |
| 1.1- Purinas e Pirimidinas..... | 2 |
| 1.2 - Hipótese da Inervação Purinérgica..... | 3 |
| 1.3 - Receptores P1 e P2..... | 3 |
| 1.3.1- Receptores P1..... | 3 |
| 1.3.2 - Receptores P2..... | 7 |
| 1.4 - Receptores P2Y..... | 7 |
| 1.5 - Receptores P2X..... | 11 |
| 1.6 - Receptor P2X7..... | 16 |
| 1.7 - Hipóteses para a Abertura do Poro Associado ao P2X7R..... | 20 |
| 1.8 - Proteínas Formadoras de Poro..... | 24 |
| 1.8.1- Hemicanais de Conexina-43 e Canais de Panexina-1..... | 26 |
| 1.8.2 - Canal Aniônico Dependente de Voltagem da Membrana Plasmática (VDACpl)..... | 28 |
| 1.8.3 - Receptores de Potencial Transiente (TRP)..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 1.8.4 - Canal Aniônico Regulado por Volume (VRAC)..... | 32 |
| 1.8.5 – Proteínas Transportadoras..... | 33 |
| II. Objetivos..... | 36 |
| III. Materiais e Métodos..... | 38 |
| 3.1 - Cultura de Células..... | 39 |
| 3.2 - Análise do padrão de expressão gênica das candidatas à poro associado ao P2X7R..... | 39 |
| 3.3 - Imunoprecipitação do P2X7R e proteínas candidatas..... | 41 |
| 3.4 - SDS-PAGE e Western Blot..... | 41 |
| 3.5 - Preparação da amostra para Espectrometria de Massas a partir do gel de SDS-PAGE..... | 42 |
| 3.6 - Preparação da amostra para Espectrometria de Massas a partir da amostra em solução..... | 43 |
| 3.7 - Espectrometria de Massas..... | 44 |
| 3.8 - Preparação da amostra para análise por Microscopia de Confocal... | 44 |
| 3.9 - Microscopia de Confocal..... | 45 |
| 3.10 - Ensaio da Funcionalidade do P2X7R – Captação de Corante..... | 46 |
| 3.11 - Captação de Corante por Microscopia de Fluorescência..... | 46 |
| 3.12 - Captação de Corante por Leitor de Placas..... | 47 |
| 3.13 - Análise Estatística..... | 47 |
| IV. Resultados..... | 48 |
| 4.1 – Avaliação das proteínas candidatas por RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction</i>)..... | 49 |
| 4.2 – Identificação de Proteínas por Imunoprecipitação e Western Blot..... | 53 |

| | |
|---|------------|
| 4.3 – Identificação de Proteínas Associadas por Imunoprecipitação e Western Blot..... | 56 |
| 4.4 - Identificação de Proteínas Associadas por Espectrometria de Massas a partir do gel de SDS-PAGE..... | 59 |
| 4.5 - Identificação de Proteínas Associadas por Espectrometria de Massas a partir da amostra em solução..... | 72 |
| 4.6 - Identificação de Proteínas Associadas por Microscopia de Confocal..... | 74 |
| 4.7 - Identificação de Proteínas Associadas por Ensaio de Captação de Corante..... | 77 |
| V. Discussão..... | 90 |
| VI. Conclusão..... | 101 |
| VII. Referências Bibliográficas..... | 103 |

Lista de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.1: Fórmula química do ATP..... | 2 |
| Figura 1.2: Topologia dos receptores P1..... | 4 |
| Figura 1.3: Esquema resumido da ativação dos receptores P1 por adenosina extracelular..... | 5 |
| Figura 1.4: Topologia dos P2YR..... | 8 |
| Figura 1.5: Topologia dos receptores P2X..... | 11 |
| Figura 1.6: Mecanismo de ativação dos receptores P2X..... | 12 |
| Figura 1.7: Representação esquemática de um canal homomultímero com 3 subunidades de receptor P2X visto de cima..... | 13 |
| Figura 1.8: Topologia dos P2X7Rs..... | 16 |
| Figura 1.9: Ativação do inflamassoma via P2X7R..... | 17 |
| Figura 1.10. Mecanismo de ativação dos P2X7Rs..... | 19 |
| Figura 1.11: Hipótese da dilatação do canal do P2X7R..... | 21 |
| Figura 1.12: Hipótese do complexo proteico P2X7R-Panexina-1..... | 22 |
| Figura 1.13: Hipótese da formação do poro por duas vias independentes.... | 22 |
| Figura 1.14. Hipótese dos multiporos..... | 24 |
| Figura 1.15: Formação de hemicanais de conexinas e canais de panexinas. | 27 |
| Figura 1.16: Topologia das Conexina-43 e Panexina-1..... | 28 |
| Figura 1.17: Modelo hipotético da interação entre VDAC, proteína precursora amiloide (APP) e β-amiloide ($A\beta$) de cérebros com doença de Alzheimer (AD)..... | 30 |
| Figura 1.18. Esquema representando a topologia dos subtipos TRPA1 e TRPV1..... | 31 |
| Figura 1.19: Estrutura do canal de TRP..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.20 Ativação do VRAC sob condições hipotônicas e o funcionamento do RVD..... | 33 |
| Figura 1.21: Proteínas transportadoras para drogas e substâncias endógenas..... | 34 |
| Figura 4.1: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula U373 por RT-PCR..... | 50 |
| Figura 4.2: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula U937 por RT-PCR..... | 51 |
| Figura 4.3: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula J774.G8 por RT-PCR... | 51 |
| Figura 4.4: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula HEK-293T por RT-PCR | 52 |
| Figura 4.5: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G (A) e Western Blot (B) sem adição de ATP..... | 54 |
| Figura 4.6: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G (A) e Western Blot (B) na presença de ATP por 30 minutos..... | 55 |
| Figura 4.7: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G na presença do ATP em diferentes condições..... | 56 |
| Figura 4.8: Western Blot para P2X7 de células U937 a partir de imunoprecipitados de diferentes proteínas..... | 57 |
| Figura 4.9: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G (A) e Western Blot (B) em células J774.G8..... | 58 |
| Figura 4.10: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G (A) e Western Blot para P2X7 (B) em células N2A..... | 59 |
| Figura 4.11: Mapa do gel cortado para análise no Q-TOF..... | 60 |
| Figura 4.12: Espectro gerado pelo Mascot Server para o controle positivo BSA..... | 63 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 4.13: Sequenciamento das séries b e y e o erro gerado (Controle Positivo - BSA) | 64 |
| Figura 4.14: Espectro gerado pelo Mascot Server para o controle negativo (VAZIO) | 66 |
| Figura 4.15: Sequenciamento das séries b e y e o erro gerado (Controle Negativo - VAZIO) | 67 |
| Figura 4.16: Mapa do gel cortado para análise no Q-TOF..... | 70 |
| Figura 4.17: Análise por microscopia de confocal de células N2A..... | 75 |
| Figura 4.18: Análise por microscopia de confocal de células J774.G8..... | 76 |
| Figura 4.19: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 sem ativação prévia por LPS..... | 79 |
| Figura 4.20: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 sem ativação prévia por LPS..... | 80 |
| Figura 4.21: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 primados por 4 hs com LPS 1 µg/mL..... | 82 |
| Figura 4.22: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 primados por 4 hs com LPS..... | 83 |
| Figura 4.23: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293..... | 84 |
| Figura 4.24: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293-hP2X7R..... | 85 |
| Figura 4.25: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293-hP2X7R..... | 86 |
| Figura 4.26: Análise da captação de YO-PRO em células J774.G8..... | 88 |
| Figura 4.27: Análise da captação de YO-PRO em células J774.G8..... | 89 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 5.1: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem J774.G8..... | 93 |
| Figura 5.2: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem U937..... | 94 |
| Figura 5.3: Figura 5.3: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem N2A..... | 94 |
| Figura 5.4: Proteínas associadas ao P2X7R ativado por ATP em células J774.G8..... | 97 |
| Figura 5.5: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células de BMDM de camundongos C57BL/6..... | 99 |
| Figura 5.6: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células de BMDM de camundongos C57BL/6 previamente ativadas com LPS..... | 99 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1.1: Características dos receptores de adenosina P1 | 6 |
| Tabela 1.2: Subtipos de receptores P2Y e seus ligantes..... | 9 |
| Tabela 1.3: Subtipos de receptores P2X e seus ligantes..... | 14 |
| Tabela 1.4: Quantidade de aminoácidos presente nos receptores P2X..... | 16 |
| Tabela 1.5: Proteínas formadoras de poro com características semelhantes ao poro do P2X7R e seus agonistas e antagonistas..... | 25 |
| Tabela 4.1: Expressão de proteínas candidatas ao poro do P2X7..... | 52 |
| Tabela 4.2: Proteínas encontradas na amostra analisada de BSA (Controle Positivo) | 61 |
| Tabela 4.3: Sequências dos peptídeos encontrados na amostra de BSA..... | 62 |
| Tabela 4.4: Proteína encontrada na amostra Controle Negativo..... | 65 |
| Tabela 4.5: Sequências dos peptídeos encontrados na amostra Controle Negativo..... | 65 |
| Tabela 4.6: Proteínas encontradas na célula J774.G8..... | 68 |
| Tabela 4.7: Proteínas encontradas na célula J774.G8 + ATP (apenas na cultura)..... | 68 |
| Tabela 4.8: Proteínas encontradas na célula J774.G8 + ATP (na cultura e no tampão RIPA) | 69 |
| Tabela 4.9: Proteínas encontradas na célula U937..... | 69 |
| Tabela 4.10: Proteínas encontradas em células J774.G8 imunoprecipitadas com Panexina-1..... | 71 |
| Tabela 4.11: Proteínas encontradas em células J774.G8, tratadas com ATP, imunoprecipitadas com Panexina-1..... | 71 |
| Tabela 4.12: Proteínas encontradas em células U937 imunoprecipitadas com P2X7R..... | 72 |

| | |
|--|-----------|
| Tabela 4.13: Proteínas encontradas em células U937 imunoprecipitadas com P2X7R ativadas por ATP 5mM. | 73 |
| Tabela 5.1: Lista das proteínas detectadas mais frequentemente..... | 95 |

Lista de Quadros

| | |
|--|-----------|
| Quadro 3.1: Primers desenhados no programa “Primer Premier 6.1” da Premier Biosoft..... | 40 |
| Quadro 3.2: Temperatura de anelamento e de amplicons gerados após PCR..... | 40 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

2CI-IB-MECA – 3,4-dihydroxy-5-[6-[(3-iodophenyl)methylamino]purin-9-yl]-N-methyloxolane-2-carboxamide

2MeSATP – 2 - metil-tio adenosina 5'trifosfato

α,β -meATP – Alfa beta metil adenosina 5'trifosfato

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

μL – Microlitro

μg – Micrograma

A43 ou A-438079 – 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il]metil]piridina hidrocloreto

A-740003 – N-(1-[[[(cianoimino)(5-quinolinilamino) metil] amino]-2,2-dimetilpropil]-2-(3,4- dimetoxifenil)acetamida)

ADP – Adenosina 5'difosfato

AMP – Adenosina 5' monofosfato

AMPC – AMP cíclico - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

APEC – 2-[(2-aminoethylamino)carbonylethyl-phenylethylamino]-5'-ethylcarboxamidoadenosine

ARC 67085MX – 2-propiltio- β,γ -diclorometileno-d-ATP

ARC 69931MX – Cangrelor Tetrasódio

ATP – Adenosina 5' trifosfato

ATP γ S – Adenosina 5'-O-(3-tio)trifosfato

AZ11645373 – 3-[1-[[[(3'-nitro[1,1'-bifenil]-4-yl)oxi]metil]-3-(4-piridinil)propil]-2,4-tiazolidinediona

BBG – Brilliant Blue G

BE – Brometo de etídeo

BSA – Albumina de soro bovino

BzATP – 3' -O-bis-[4-benzoil-benzoil]- adenosina 5' trifosfato

Ca^{++} – Cálcio

CCPA – 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine

cDNA – Ácido desoxirribonucléico

CGS21680 – 2-p-(2-carboxyethyl)-phenylamino-adenosine

CPA – N6-cyclopentyladenosine

CSC – 8-3-chlorostyryl-cafeine

CV 1808 – 2-phenylaminoadenosine
DAPI – 4',6- Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N = A,C,G ou T)
DPCPX – 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
DPMA – N6-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2(2-methylphenyl)-ethyl]adenosine
EDTA – Ácido etilenodioaminotetracético
ENX – 1,3-dipropyl-8[2-(5,6-epoxy)norbonyl]xanthine
FK 453 – (R)-1-[(E)-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-a]pyridin-3-yl)-acryloyl]-2-piperidine ethanol
GAPDH – Glicosil 3'fosfato desidrogenase
HC-O3OO31 – 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methylethyl)phenyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide;
HENECA – 2-hexynyl-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
HEK-293 – Células de linhagem de origem humana obtidas a partir de rim embrionário
HEK-293-hP2X7 - Células de linhagem de origem humana obtidas a partir de rim embrionário transfectadas com P2X7 humano
IB-MECA – 1-Deoxy-1-[6-(((3-Iodophenyl)methyl)amino)-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide
IG –Imunoglobulina
IL –Interleucina
INS 50589 – Regrelor disódio
IP – Iodeto de propídeo
IP3 – Inositol triphosphate
J774.G8 – Células de linhagem de origem murina obtidas a partir de sarcoma
K⁺ – Potássio
KDa – KiloDalton
KF17837 – 1,3-dipropyl-8-(3, 4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthine
KFM 19 – 8-(3-oxocyclopentyl)-1,3-dipropylxanthine
KN62 – 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazine
KW-3902 – 1,3-dipropyl-8-(3-noradamantyl) xanthine
LY – *Lucifer Yellow* ou amarelo de Lúcifer
MeSAMP – Sal hidratado 2-metiloadenosina 5'-monofosfate trietialamonia

mL – Mililitro
mg- Miligrama
MRS1754 – N-(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide
MRS 2159 – Ácido4-[(4-formil-5-hidroxi-6-metil-3-[(fosfonooxi)metil]-2-piridinil)azo]- benzoico
MRS 2578 – 1,4-di-(feniltiourea) butano
N0861 – N6-endo-norbornan-2-yl-9-methyladenine
N2A – Células de linhagem de origem murina obtidas a partir de neuroblastoma
NECA – 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
P2R – Receptor P2
P2XR – Receptor P2X (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7)
P2YR – Receptor P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14)
PBS – Tampão salina fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PPNDS – Piridoxal-5"-phosphate-6-(2"-naftilazo-6"-nitro-4",8"-disulfonato
RB2 – Reactive blue 2 ou azul reativo 2
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
R-PIA – R(-)-N(5-(2-phenylisopropyl)-adenosine
SCH 58261 – 2-(furan-2-yl)-7-phenethyl-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo
[1,5-c]pyrimidin-5-amine
SDS – Dodecyl sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
TEMED – N,N,N',N'-tetra metil etileno diamina
TGF-b – *Transforming growth factor beta* ou fator de transformação do crescimento
TNP-ATP – Sal 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato monolitio trisodio
Tris – Trishidroximetil aminometano
U373 – Células de linhagem de origem humana obtidas a partir de glioblastoma
U937 – Células de linhagem de origem humana obtidas a partir de linfoma
UDP – Uridina difosfato
UDPβS – Uridina 5'-O-thiodiphosphate

UTP – Uridina trifosfato

UTPyS – Uridina 5'-O-3-thiotriphosphate

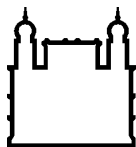
VM – Voltagem da Membrana

WRC-0470 – 2-cyclohexylmethylidene-hydrazinoadenosine

WRC-0571 – C8-N-methylisopropylamino-N6-5'-endohydroxy-N-0861

XAC – 8-(4-(2-aminoethyl)-aminocarboxymethyloxy)phenyl-1,3-dipropylxanthine

ZM241385 – 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl[1,2,4]-triazolo[2,3-a[1,3,5]triazin-5-yl-aminoethyl)phenol



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DE PROTEÍNAS CANDIDATAS AO PORO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X7 EM DIFERENTES TIPOS CELULARES

RESUMO

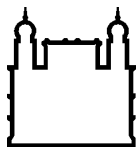
TESE DE DOUTORADO

Carla Santos de Oliveira

O receptor P2X7 (P2X7R) é um receptor purinérgico, que difere de outros subtipos, devido às suas características estruturais e farmacológicas. Quando exposto por um período prolongado ou à altas concentrações de seu agonista natural, promove um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, permitindo a passagem de moléculas de até 900 Da, em macrófagos. Há uma controvérsia entre vários autores, que deixa em dúvida se esse receptor necessita de uma segunda proteína, para a formação de poros, além da identidade desta proteína. Selecionamos cinco proteínas formadoras de poros: TRPV1, TRPA1, Conexinas-43 (Cx-43), Panexina-1 (Panx-1) e VDAC. Acreditamos que diferentes proteínas poderiam estar associadas ao P2X7R, dependendo do tipo celular e dos estímulos do microambiente. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho é identificar qual(is) proteína(s) poderia(m) estar associada(s) ao poro do P2X7R e se, essa associação, seria dependente do tipo de celular em que se encontram.

Fizemos a técnica de RT-PCR das linhagens celulares: J774.G8, N2A, U373, U937, células HEK-293 e células primárias de ratos Wistars e camundongos Swiss Webster, para identificarmos a expressão do RNAm das proteínas descritas acima. A etapa seguinte, foi verificar se as proteínas formadoras de poros; TRPV1, TRPA1, Cx-43, Panexina-1 poderiam estar fisicamente associadas com o P2X7R. As células foram tratadas com ou sem ATP 5 mM e em seguida a imunoprecipitação de P2X7R e das proteínas descritas foi realizada. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida e analisadas por espectrometria de massas ou western blot. Nesse ponto, a presença de P2X7R foi confirmada e em seguida observamos que diferentes proteínas estavam associadas ao P2X7R sob diferentes condições, principalmente quando expostas à ATP 5 mM. Células U937 e N2A, quando tratadas com ATP 5 mM, apresentaram uma diminuição na expressão de P2X7R associado ao TRPV1. Enquanto que a associação observada com as proteínas Panx-1 e Cx-43 permanecia igual (independente da presença do ATP). Em seguida, realizamos um ensaio de permeabilização por YO-PRO-1 em células J774.G8, HEK-293, hP2X7-HEK-293 e BMDM de camundongos C57BL/6, utilizando agonistas e antagonistas do P2X7R e das proteínas candidatas descritas acima. Células BMDM de camundongos C57BL/6 sem ativação prévia por LPS, tiveram um resultado interessante. Nessa condição, foi observado que vermelho de rutênio e HC300031, antagonistas de TRPs, poderiam diminuir significativamente a permeabilização de membrana evocada por 5 mM de ATP. Entretanto, quando tratadas com LPS durante 4 horas, esta associação de drogas foi tóxica para as células (n = 3). Além disso, carbenoxolone 10 µM, antagonista de conexinas, foi capaz de diminuir a absorção de corante induzida por ATP 5 mM em células J774.

Em virtude dos resultados obtidos, concluímos que o P2X7R ativado por ATP extracelular desencadeia o recrutamento de uma série de proteínas, sugerindo que Conexinas e TRPs poderiam estar participando da formação do poro associado ao P2X7R.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DE PROTEÍNAS CANDIDATAS AO PORO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X7 EM DIFERENTES TIPOS CELULARES

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Carla Santos de Oliveira

The P2X7 receptor (P2X7R) is a purinergic receptor, which differs from others subtypes due to its structural and pharmacological characteristics. When exposed for a prolonged time or to high concentrations of its natural agonist, promotes an increase in membrane permeability, allowing the passage of molecules up to 900 Da. There is a controversy among the authors, that leaves in doubt if this receptor needs a second protein for the pore formation and, which protein could be. Five target pore-forming proteins: TRPV1, TRPA1, Connexins-43 (Cx-43), Pannexin-1 (Panx-1) and VDAC were selected. We believe that different mechanisms and proteins could be associated with P2X7R, depending on the cell type and their microenvironment stimuli. In this context, the main goal of this work is identify which proteins could be associated with the P2X7R pore in different cells types and species.

We performed the RT-PCR technique of the cell lines: J774.G8, N2A, U373, U937, HEK-293 and primary cells from Wistar mouse and Swiss mice to identify the RNAm expression of those proteins described above. The further steps, was verified if those target proteins could be physically associated with the P2X7R. The cells were treated with or without ATP and then the immunoprecipitation of the P2X7R and the target proteins was performed. The samples were resolved in a polyacrylamide gel and analyzed by mass spectrometry and western blot. At this point, the presence of P2X7R was confirmed, and afterwards was possible to observe several others proteins associated to P2X7R at different cell conditions, mainly when exposed to ATP 5 mM. Although, when TRPV1 was immunoprecipitated from U937 cells treated with ATP 5 mM, the expression of P2X7, associated with TRPV, was diminished when compared to the sample without ATP. The next step was performing a YO-PRO-1 uptake assay in J774, Hek- 293, hP2X7-Hek-293 and C57BL/6 BMDM cells, using agonists and antagonists for the P2X7R and those candidates proteins described above. BMDM cells from C57BL/6 mice without previous LPS treatment had an interested result. At this condition, was observed that ruthenium red and HC300031, an antagonist for TRPs, could significantly diminished the membrane permeabilization evoked by ATP 5 mM, but when they were treated with LPS for 4 hours, the drug association was toxic (n=3) to those cells. carbenoxolone 10 uM, an antagonist for connexins, was capable to diminish the dye uptake triggered by ATP 5 mM in J774 cells.

Because of the results obtained, we conclude that the P2X7R activated by extracellular ATP triggers the recruitment of variety different proteins, suggesting that connexins and TRPs could be participating of the pore-forming.

I. Introdução

1.1 - Purinas e Pirimidinas

O papel das purinas como moléculas de sinalização extracelular foi descoberto experimentalmente por Alan Drury e Albert Szent-Györgyi. Esses observaram que extratos brutos de diferentes tecidos de boi e de ovelha (músculo cardíaco, cérebro, rim e baço) quando injetados intravenosamente, causavam efeitos fisiológicos no coração de porquinhos-da-índia, de coelhos, de gatos e de cães. Os autores identificaram o constituinte como ácido adenílico ou adenosina monofosfato, sendo este o responsável pelas modificações observadas no perfil de contração cardiovascular dos animais aceptores, causando diferentes tipos de arritmias cardíacas, como por exemplo, bradicardia e fibrilação atrial (Drury and Szent-Gyorgyi 1929).

Em seguida, trabalhos semelhantes começaram a esclarecer que a atividade de diversos extratos de tecidos estudados anteriormente era, de fato, devida à presença da adenosina (Bennett and Drury 1931, Gillespie 1934, Emmelin and Feldberg 1948). Além do efeito inotrópico, alguns anos mais tarde, surgiram alguns trabalhos identificando o ATP (Adenosina Trifosfato) (Figura 1.1) em terminações nervosas e em perfusões na artéria e no nervo auricular de coelho, demonstrando seu efeito vaso dilatador (Hilton and Holton 1954, Holton and Holton 1954, Holton 1959). Esses dados relataram, pela primeira vez, que o ATP poderia ser encontrado no meio extracelular e sua possível atividade sob diversos tecidos e órgãos.

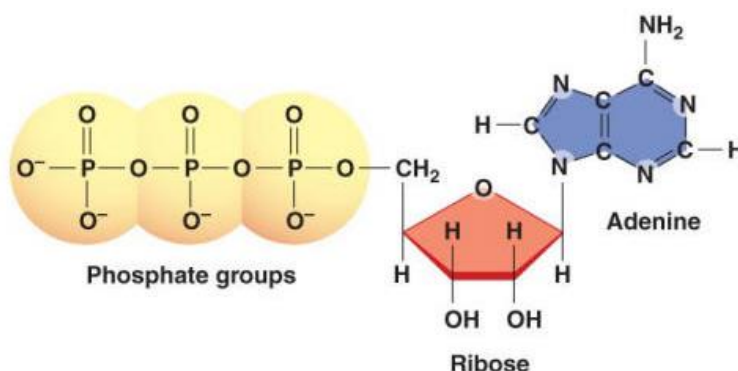


Figura 1.1: Fórmula química do ATP. O ATP consiste em três grupos de fosfato, ribose e adenina. (Adaptado de Pearson B. Cummings, 2008).

1.2 - Hipótese da Inervação Purinérgica

Na década de 60, Burnstock e colaboradores estudavam nervos do tecido muscular liso e observaram que a atividade nervosa existente não era apenas via neurotransmissores adrenérgicos nem colinérgicos, mas também por moléculas de ATP. Os autores desenvolveram experimentos onde se bloqueavam as conduções dos neurotransmissores clássicos, e, portanto, as sinalizações dos nervos para o músculo poderiam ser via moléculas de ATP (Burnstock and Campbell 1963, Burnstock and Holman 1963). No início da década de 70, com base nas evidências disponíveis na época e levando em consideração de que o ATP era sintetizado, estocado e liberado por nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos de músculo liso do intestino; Burnstock propôs a existência de nervos Purinérgicos em que a principal substância liberada era o nucleotídeo ATP (Burnstock, Campbell et al. 1970, Burnstock 1971, Burnstock 1972).

1.3 - Receptores P1 e P2

A partir dos relatos descritos anteriormente, começam as buscas pelas proteínas de membrana receptoras das moléculas de ATP, os chamados: receptores purinérgicos. Em 1978 surge uma proposta que divide os receptores purinérgicos em duas grandes famílias: receptores P1 para nucleosídeos e os receptores P2 para nucleotídeos e estes são subdivididos nas famílias P2Y e P2X.

1.3.1 - Receptores P1

No início da década de 80, o entendimento acerca dos receptores de adenosina era baseado na atividade específica dos agonistas e antagonistas, tal fato limitou a divisão dos receptores em A₁, que diminuía níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC) e A₂, que aumentava os níveis de AMPC no meio intracelular (van Calker, Muller et al. 1979, Londos, Cooper et al. 1980).

Com o uso das técnicas de clonagem molecular, aumentou-se o conhecimento sobre os receptores de adenosina e incluíram-se mais dois receptores: A_3 e A_{2B} , sendo o receptor descrito com A_{2A} referente ao antigo A_2 (Pierce, Furlong et al. 1992, Zhou, Li et al. 1992, Salvatore, Jacobson et al. 1993). O receptor A_{2B} tem estrutura similar ao A_{2A} e, assim como o receptor A_{2A} , aumenta os níveis intracelulares de AMPc quando ativado (Tabela 1.1). Nesse contexto, podemos então dividir esses receptores em dois grupos: os receptores A_1 e A_3 que têm uma ação inibitória sobre a adenil ciclase, tendo como consequência a diminuição dos níveis de AMPc na célula; e os receptores A_{2A} e A_{2B} que estimulam a enzima, levando ao aumento de AMPc na célula (van Calker, Muller et al. 1979, Pierce, Furlong et al. 1992, Zhou, Li et al. 1992).

Esses receptores foram agrupados e descritos como família dos receptores P1. As proteínas dessa família são transmembranares e metabotrópicas acopladas à proteína G que, como dito anteriormente, atuam inibindo ou ativando a adenil ciclase (Fields and Burnstock 2006). De maneira geral, esses receptores apresentam 7 domínios transmembranares, 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares. Apresentam também a cadeia amino-terminal no meio extracelular e a cadeia carboxi-terminal no meio intracelular (Figura 1.2). Além disso, as porções intracelulares apresentam papel fundamental para o funcionamento do receptor, pois a proteína G interage com sítios de ligações presentes na cadeia carboxi-terminal e na terceira alça intracelular (Olah, Ren et al. 1995).

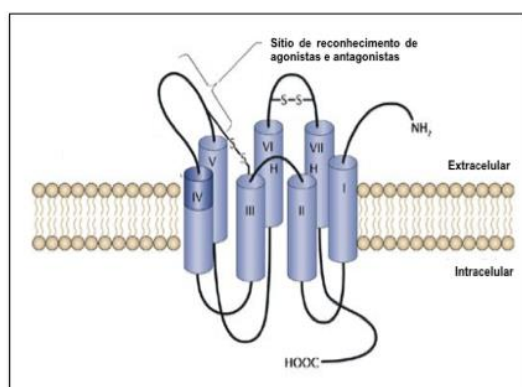


Figura 1.2: Topologia dos receptores P1. Os receptores P1 apresentam 7 domínios transmembranares (I – VII), 3 alças extracelulares (primeira à esquerda com sítios de ligação para agonistas e antagonistas), 3 alças intracelulares (terceira com sítios de interação com a proteína G), terminação carboxi- no meio intracelular (com sítios de interação com a proteína G) e terminação amina- no meio extracelular. (Adaptado de R. Douglas Fields e Geoffrey Burnstock, Nature. 2006).

Os receptores A_1 e A_3 podem se acoplar às proteínas G_i (inibitória), levando à redução da adenil ciclase e diminuindo os níveis de AMPc dentro da célula (Figura 1.3 e Tabela 1.1). No entanto, alguns trabalhos sugerem que os receptores A_1 podem desencadear outras vias de sinalização, como por exemplo a inibição de canais de cálcio do tipo N (Mogul, Adams et al. 1993, Brown and Dale 2000, Park, Jeong et al. 2001, Gerevich, Borvendeg et al. 2004) e a liberação da fosfolipase C ou A (Akbar, Okajima et al. 1994). Já os receptores A_{2A} e A_{2B} podem se acoplar com as proteínas G_s (estimulatória) (Olah and Stiles 1992, Olah 1997), estimulando a enzima adenil ciclase e consequentemente aumentando os níveis de AMPc intracelular (Figura 1.3 e Tabela 1.1).

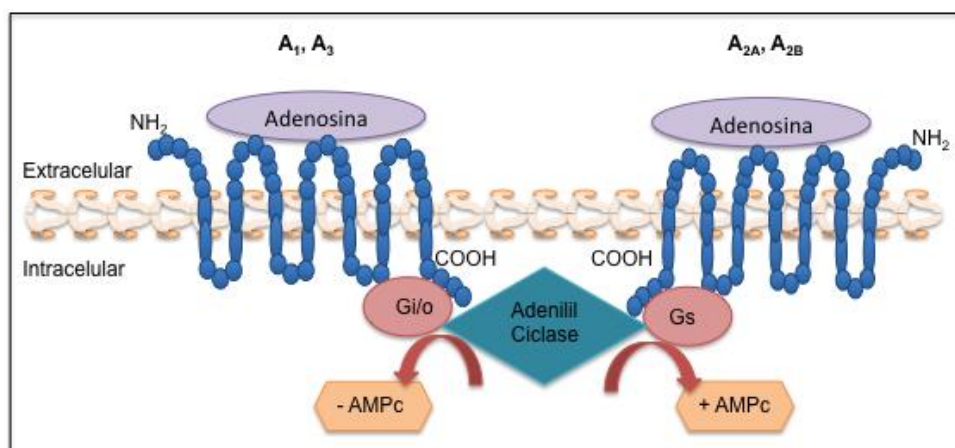


Figura 1.3: Esquema resumido da ativação dos receptores P1 por adenosina extracelular. Os receptores A_1 e A_3 se acoplam à proteína G_i (G_i/o), a partir dos sítios de interação presentes na terceira alça intracelular e na porção carboxi-terminal da proteína. Os receptores A_1 e A_3 levam à diminuição do AMPc nas células. O contrário acontece com os receptores A_{2A} e A_{2B} , estes após se ligarem à proteína G_s (G_s), estimulam a enzima adenilil ciclase que por consequência, aumenta os níveis de AMPc intracelular.

Tabela 1.1: Características dos receptores de adenosina P1. Adaptado de Burnstock, 2007 e Ravelic e Burnstock, 1998.

| Subtipo | A ₁ | A _{2A} | A _{2B} | A ₃ |
|----------------------|---|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Proteína efetora | G | G _s | G _s G _q | G _i G _q |
| Efeito | ↓AMPc ↑IP3 ↑K ⁺ ↓Ca ⁺⁺ | ↑AMPc | ↑AMPc ↑IP3 | ↓AMPc ↑IP3 |
| Agonista seletivo | CPA, CCPA, CHA, R-PIA | CGS21680, HE-NECA, APEC, CV 1808, DPMA, WRC-0470 | NECA | IB-MECA, 2CI-IB-MECA |
| Antagonista seletivo | DPCPX, XAC, 3902, KFM 19, 0861, 453, 0571 | KF17837, ZM241385, CSC, 58261 | MRS1751 | IB-MECA, 2CI-IB-MECA |

Lista de Abreviações Tabela 1.1:

2CI-IB-MECA – (2S,3S,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5-[6-[(3-iodophenyl)methylamino]purin-9-yl]-N-methylxolane-2-carboxamide

AMPc – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

APEC – 2-[(2-aminoethylamino)carbonylethyl-phenylethylamino]- 5'-ethylcarboxa midoadenosine

CCPA – 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine

CGS21680 – 2-p-(2-carboxyethyl)-phenylamino-adenosine

CPA – N6-cyclopentyladenosine

CSC – 8-3-chlorostyryl-cafeine

CV 1808 – 2-phenylaminoadenosine

DPCPX – 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

DPMA – N6-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2(2-methylphenyl)-ethyl]adenosine

ENX – 1,3-dipropyl-8[2-(5,6-epoxy)norbonyl]xanthine

FK 453 – (R)-1-[(E)-3-(2-phenylpyrazolo[1, 5-a]pyridin-3-yl)-acryloyl]-2-piperidine ethanol

HENECA – 2-hexynyl-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine

IB-MECA – 1-Deoxy-1-[6-[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide

IP3 – Inositol triphosphate

KF17837 – (E)-1,3-dipropyl-8-(3, 4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthine

KFM 19 – 8-(3-oxocyclopentyl)-1,3-dipropylxanthine

KW-3902 – 1,3-dipropyl-8-(3-noradamantyl) xanthine

MRS1751 – N-(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide

N0861 – N6-endo-norboman-2-yl-9-methyladenine

NECA – 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
R-PIA – R-(-)-N(5-(2-phenylisopropyl)-adenosine
SCH 58261 – 2-(furan-2-yl)-7-phenethyl-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine
WRC-0470 – 2-cyclohexylmethylidene-hydrazinoadenosine
WRC-0571 – C8-N-methylisopropylamino-N6-5'-endohydroxy-N-0861
XAC – 8-(4-(2-aminoethyl)-aminocarboxymethyloxy)phenyl-1,3-dipropylxanthine
ZM241385 – 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl[1,2,4]-triazolo[2,3-a[1,3,5]triazin-5-yl-aminoethyl)phenol

1.3.2 - Receptores P2

Os receptores P2 são classificados em P2X e P2Y (Burnstock and Kennedy 1985, Kennedy and Burnstock 1985) e têm como principais ligantes o ATP, ADP, UTP, UDP e seus análogos (Ralevic and Burnstock 1998). Os receptores P2Y, são metabotrópicos acoplados à proteína G, sendo subdivididos em P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 (Abbracchio and Burnstock 1994, Ralevic and Burnstock 1998, Lazarowski, Boucher et al. 2003). Já os receptores P2X são responsáveis pela abertura de canais iônicos na membrana plasmática (ionotrópicos). Existem sete subtipos de receptores P2X clonados até o momento, denominados P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7. Esses receptores são, preferencialmente, seletivos a cátions, exceto pelo subtipo P2X5 que é permeável à ions de cloreto (Burnstock 1999).

Os receptores P2 desencadeiam diversas funções celulares como: regulação de níveis de cálcio intracelular, indução de mudanças iônicas nas células, controle de produção de óxido nítrico, morte celular, além de apresentarem envolvimento em diferentes doenças inflamatórias e parasitárias (Di Virgilio, Borea et al. 2001, Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001, Coutinho-Silva, Stahl et al. 2003, Müller, Vieira et al. 2011, Garcia, Yan et al. 2014, Quintas, Pinho et al. 2014).

1.4 - Receptores P2Y

A família P2Y é composta por receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e, como tal, apresentam características estruturais semelhantes aos demais receptores com esta propriedade: 7 domínios transmembranares, 3 alças intracelulares e 3 extracelulares, porção amino-terminal no meio extracelular e a

porção carboxi-terminal voltada para dentro da célula (Figura 1.4). Os subtipos dessa família foram identificados a partir de ensaios de clonagem molecular e o primeiro receptor a ser clonado foi o subtipo P2Y1 em 1993 (Lustig, Shiau et al. 1993, Webb, Simon et al. 1993). Desde então, já foram clonados e caracterizados 8 subtipos no total: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 (Hollopeter, Jantzen et al. 2001, Abbracchio, Boeynaems et al. 2003). Os membros P2Y3, P2Y5 e P2Y7-10 foram retirados da família por não serem expressos em mamíferos ou por não responderem a nucleotídeos extracelulares (Abbracchio, Burnstock et al. 2006). Esses receptores têm ampla distribuição e foram identificados em diferentes sistemas e tipos celulares (Burnstock and Knight 2004) (Tabela 1.2).

Apesar de toda importância dos receptores purinérgicos e sua relação com doenças inflamatórias, o P2Y12 é o único que já possui medicamentos implementados na terapia clínica. O clopidogrel, por exemplo, é um antitrombótico que age inibindo a agregação plaquetária. Esse medicamento, quando metabolizado inibe irreversivelmente a ligação do ADP ao receptor P2Y12. Com o ADP disponível, o complexo glicoproteico GPIIb/IIIa é ativado e a agregação plaquetária é inibida (Mills, Puri et al. 1992). Existe uma nova droga, Ticagrelor, que age como inibidor irreversível do receptor P2Y12 e apresenta um rápido e mais acentuado efeito que o Clopidogrel, pois age diretamente no receptor, não precisando ser previamente metabolizado (Wallentin, Becker et al. 2009, Jacobson and Boeynaems 2010, Pelliccia, Rollini et al. 2015)

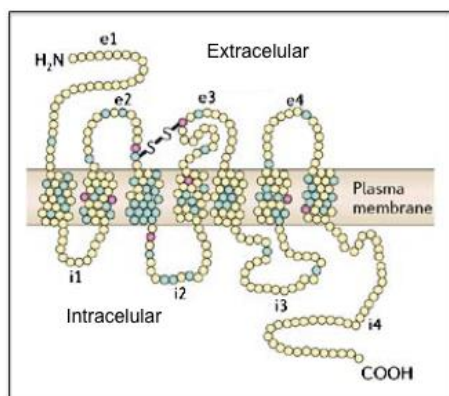


Figura 1.4: Topologia dos P2YR. Os P2YR apresentam 7 domínios transmembranares, 3 alças extracelulares, 3 alças intracelulares, a porção amino-terminal voltada para o meio extracelular e a carboxi-terminal para o meio intracelular. (Adaptado de R. Douglas Fields e Geoffrey Burnstock, Nature. 2006).

Tabela 1.2: Subtipos de receptores P2Y e seus ligantes

| Receptor | Distribuição Principal | Agonistas (endógeno em negrito, <i>pEC50</i>) | Antagonistas |
|--------------|--|--|--|
| P2Y1 | Cérebro, células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células do sistema imunológico, osteoclastos | MRS 2365 9.4 > 2-MeSADP 8.2 >> ADPβS 7.0 > ADP 5.1 > ATP | MRS 2500 9.0 > MRS 2279 7.3 > MRS 2179 6.5 |
| P2Y2 | Células do sistema imunológico, células epiteliais e endoteliais, túbulos renais, osteoblastos | UTP 8.1, MRS 2698 8.1 ≥ ATP 7.1, INS 365 7.0 > INS 37217 6.7, UTPγS 6.6 > Ap ₄ A 6.1 > MRS 2768 5.7 | ARC 126313 6 > Suramina 4.3 > RB2 >4 |
| P2Y4 | Células endoteliais, placenta | 2'-azido-dUTP 7.1 > UTPγS 5.8, UTP 5.6 ≥ ATP 5.7 (rato), > Ap ₄ A 5.5 > CTP 5.2, ITP 5.1 | ATP (humano) 4.4 > RB2 >4 > Suramina >4 |
| P2Y6 | Vias aéreas, células epiteliais intestinais, baço, placenta, células T, timo | MRS 2693 7.8 > UDPβS 7.3, PBS 0474 7.2 > INS 48823 6.9, Up ₃ U 6.6, UDP 6.5 > UTP >> ATP | MRS 2578 7.4 (não competitivo) > RB2, PPADS |
| P2Y11 | Baço, intestine e granulócitos | ATPγS 5.5 > ARC 67085MX 5.0 > BzATP 5.1 ≥ ATP 4.8 | NF 157 7.4 > Suramina 4.8 > RB2 >4 |
| P2Y12 | Plaquetas, cérebro (células da glia), células da microgliais | 2-MeSADP 7.9 ≥ ADP 7.2 | ARC 69931MX 8.4 > AZD 6140 7.9, INS 50589 7.8 > RB2 7.6 (r) > 2-MeSAMP 4.0 |
| P2Y13 | Baço, cérebro, nódulos linfáticos, medula óssea | ADP 7.9 = 2-MeSADP 7.9 > 2-MeSATP 7.1, ATP 6.6 | ARC 69931MX 8.4 > ARC 67085 6.7 > MRS 2211 6.0 |
| P2Y14 | Placenta, mastócitos, tecido adiposo, estômago, intestino, poucas regiões cerebrais | MRS 2690 7.3 > UDP 6.8, UDP- glicose 6.5 > UDP-galactose 6.2 | — |

(potência aos homólogos humanos mostrados como *pEC50*, salvo em indicação r = rato). Adaptado de Kenneth A. Jacobson - Tocris Bioscience Scientific Review Series.

Lista de Abreviações Tabela 1.2:

ATP – Adenosina 5' trifosfato

ADP – Adenosina 5'difosfato

ATP γ S – Adenosina 5'-O-(3-tio)trifosfato

2MeSATP – 2-metil-tio adenosina 5'trifosfato

UDP β S - Uridina 5'-O-thiodiphosphate

UTP γ S - Uridina 5'-O-3-thiotriphosphate

UDP – Uridina difosfato

UDP β S – Uridina 5'-O-thiodifosfato

MRS 2578 – 1,4-di-(feniltiourea) butano

ARC 67085MX – 2-propiltio- β,γ -diclorometileno-d-ATP

ARC 69931MX – Cangrelor Tetrasódio

RB2 – *Reactive blue 2* ou azul reativo 2

AZ11645373 – 3-[1-[[[3'-nitro[1,1'-bifenil]-4-yl)oxi]metil]-3-(4-piridinil)propil]-2,4-tiazolidinediona

MeSAMP – Sal hidratado 2-metiltioadenosina 5'-monofosfate trietialamonia

INS 50589 – Regrelor disódio

PPADS – Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato

1.5 - Receptores P2X

Os membros da família de receptores P2X (P2XR) são receptores ionotrópicos (formadores de canais iônicos), preferencialmente, seletivos a cátions e estão presentes em diversas espécies e tipos celulares (Tabela 1.3). Essa família de receptores apresenta 7 subtipos clonados até o momento: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7. O primeiro receptor foi clonado em 1994 e em pouco tempo toda família havia sido clonada e identificada (Brake, Wagenbach et al. 1994, Valera, Hussy et al. 1994, Buell, Collo et al. 1996). Esses por sua vez, apresentam 2 domínios transmembranares, 1 alça extracelular e as porções amino-terminal e carboxi-terminal voltadas para o interior das células, como pode ser observado na Figura 1.5 (Fields and Burnstock 2006).

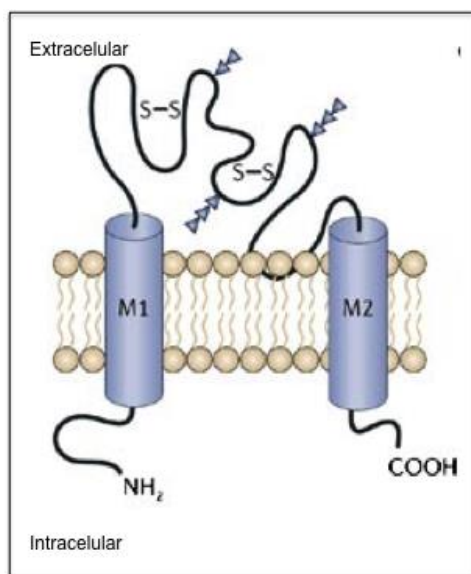


Figura 1.5: Topologia dos receptores P2X. Os receptores P2X apresentam dois domínios transmembranares, 1 alça extracelular e no meio intracelular as porções amino e carboxi-terminal. (Adaptado de R. Douglas Fields e Geoffrey Burnstock, Nature. 2006).

Esses canais iônicos, em resposta ao agonista ATP, permitem rápida passagem de preferencialmente cátions através da membrana plasmática, de acordo com o gradiente eletroquímico da célula (Figura 1.6). Todos os receptores P2X têm permeabilidade semelhante tanto para o Na^+ quanto para o K^+ e elevada permeabilidade ao Ca^{++} , com exceção do subtipo P2X5R que permite a passagem

de íons aniônicos (Cl^-) (Ruppelt, Ma et al. 2001), e de acordo com o gradiente de concentração. Essa família de receptores tem um papel muito importante na comunicação celular, como por exemplo, modulação da transmissão sináptica, contração do músculo liso e regulação de respostas imune (Solle, Labasi et al. 2001, Chessell, Hatcher et al. 2005, Coddou, Yan et al. 2011, Khakh and North 2012).

Alguns estudos sugerem que para haver a formação do canal, são necessárias três subunidades de receptores P2X (Nicke, Baumert et al. 1998, Stoop, Thomas et al. 1999, Jiang, Kim et al. 2003, Barrera, Ormond et al. 2005, Young, Fisher et al. 2008). A cristalização do P2X4R de *zebrafish* ratifica a ideia de que o canal é composto por três subunidades e sugere a existência de três sítios de ligação para ATP (Kawate, Michel et al. 2009).

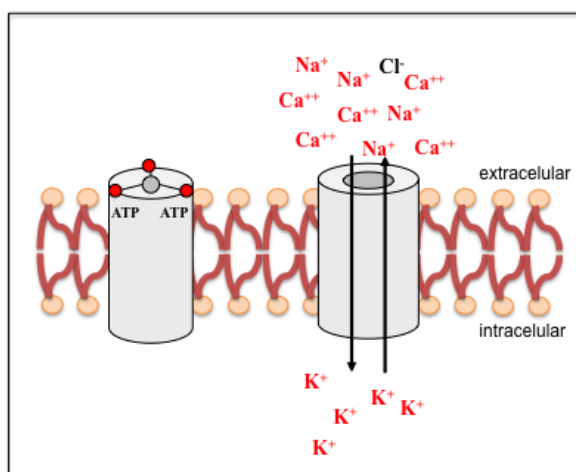


Figura 1.6: Mecanismo de ativação dos receptores P2X. Os receptores P2X quando ativados pelo agonista ATP, promovem a abertura de um canal seletivo a cátions na membrana plasmática. O subtipo P2X5 apresenta permeabilidade a íons de cloreto (representado em preto).

A formação do canal pode ocorrer a partir de três subunidades de receptores P2X iguais (homotrímeros) ou com duas diferentes (heterotrímeros) (Burnstock 2007) (Figura 1.7). No entanto, de todos os receptores P2X, o P2X6 é o único que não forma homotrímeros. Até o momento, existem oito combinações de heterotrímeros funcionais: P2X1/2 (Brown, Townsend-Nicholson et al. 2002, Aschrafi, Sadtler et al. 2004), P2X1/4 (Nicke, Kerschensteiner et al. 2005), P2X1/5 (Torres, Haines et al. 1998, Haines, Torres et al. 1999, Lê, Boué-Grabot et al. 1999), P2X2/3 (Lewis, Neidhart et al. 1995, Liu, King et al. 2001, Spelta, Jiang et al. 2002,

Jiang, Kim et al. 2003), P2X2/5 (Compan, Ulmann et al. 2012), P2X2/6 (King, Townsend-Nicholson et al. 2000, Barrera, Henderson et al. 2007) e P2X4/6 (Le, Babinski et al. 1998). Jiang e colaboradores observaram que o heterotrímero P2X2/3 apresenta apenas dois sítios de ligação funcional para o ATP, indicando que este receptor requer a ligação de apenas duas moléculas de ATP (Spelta, Jiang et al. 2002).

Até 2007, o P2X7R era conhecido por não formar heterotrímero. Apesar de ainda existir controvérsia a cerca desta hipótese, Chang Guo e colaboradores demonstraram em células HEK-293 transfectadas com P2X4 e P2X7, a coimunoprecipitação desses subtipos (Guo, Masin et al. 2007). Entretanto, nos anos seguintes, alguns grupos falharam ao tentar reproduzir tal informação (Nicke 2008, Boumechache, Masin et al. 2009).

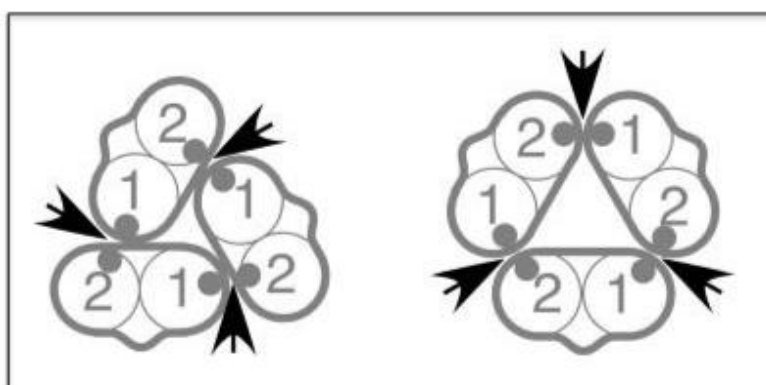


Figura 1.7: Representação esquemática de um canal homomultímero com 3 subunidades de receptor P2X visto de cima. Podemos observar um canal fechado (esquerda) e aberto (direita) com os domínios transmembranares (TM1 e TM2) representados em cada subunidade (1 e 2). As setas indicam a localização das pontes dissulfeto. (Adaptado de Jiang, L.H. et al, 2003).

Tabela 1.3: Subtipos de receptores P2X e seus ligantes

| Receptor | Distribuição Principal | Agonistas (endógeno em negrito, <i>pEC50</i>) | Antagonistas |
|-------------|---|---|--|
| P2X1 | Músculo liso, plaquetas, cerebelo, neurônios do corno dorsal da medula espinal | BzATP 8.7 > ATP 7.3, 2-MeSATP 7.3, α,β -MeATP 6.7 (rápida dessensibilização) >> CTP 4.4 | NF 449 9.5 > IP ₅ I 8.8 > TNP-ATP 8.2 > Ro 0437626 > NF 279 7.7 |
| P2X2 | Músculo liso, cérebro, pâncreas, retina, células cromafins, gânglios autônomo e sensoriais | ATP 5.9, 2-MeSATP 5.8 \geq 2-MeSATP 5.8 >> α,β -MeATP <4 | RB2 6.4 (r), PPADS 6.4 (r) > PPADS 5.4 (r) > Suramina 4.5 (r) |
| P2X3 | Neurônios sensoriais nociceptiva, alguns neurônios simpáticos | ATP 6.5, 2-MeSATP 6.5 \geq Ap ₄ A 6.3, α,β -MeATP 6.1 (rápida dessensibilização) | TNP-ATP 9.0, iso PPADS 7.1 > A317491 7.6 > NF 110 7.4 > PPADS 5.8 |
| P2X4 | Microglia, testículo, cólon, células endoteliais | ATP 6.3 >> α,β -MeATP 5.1 >> CTP 3.5, Ivermectina 6.6 | 5-BDBD >> TNP-ATP 4.8, PPADS 4.6 > BBG 3.9 (r) |
| P2X5 | Células em proliferação na pele, intestino, bexiga, timo, espinal medula, coração, medula adrenal | ATP γ S 6.2 (r), ATP 6.0 >> α,β -MeATP <5.2 | BBG 6.3 > PPADS 5.6, Suramina 5.4 |
| P2X6 | Cérebro, neurônios motores da medula espinal | (não forma homomultímero funcional) | – |
| P2X7 | Macrófagos, mastócitos, microglia, pâncreas, pele, órgãos endócrinos | BzATP 5.3 > ATP 4.0 \geq 2-MeSATP >4 >> α,β -MeATP >4 | KN 62 7.5, BBG 8.0 (r) AZD9056, AZ11645373, A-740003 e A-438079 |

(potência aos homólogos humanos mostrados como *pEC50*). Adaptado de Kenneth A. Jacobson - Tocris Bioscience Scientific Review Series.

Lista de Abreviações Tabela 1.3:

ATP – Adenosina 5' trifosfato

ATPγS – Adenosina 5'-O-(3-tio)trifosfato

2MeSATP – 2 - metil-tio adenosina 5'trifosfato

α,β-meATP – Alfa beta metil adenosina 5'trifosfato

BzATP – 2', 3' -O-bis-[4-benzoil-benzoil]- adenosina 5' trifosfato

TNP-ATP – Sal 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato monolitio trisodio

PPADS – Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato

KN62 – 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazine

BBG – Brilliant Blue G

PPNDS – Piridoxal-5"-phosphate-6-(2"-naftilazo-6"-nitro-4",8"-disulfonato

A-740003 – N-(1-[[{cianoimino}(5-quinolinilamino) metil] amino]-2,2-dimetilpropil)-2-(3,4-dimetoxifenil)acetamida)

A-438079 – 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il]metil]piridine hidroclicoridrico

1.6 - Receptor P2X7

O P2X7 é um receptor purinérgico membro da família P2X e se diferencia dos demais por apresentar características estruturais e farmacológicas únicas. Dentre as características estruturais podemos destacar o tamanho da cauda C-terminal, que é maior do que a dos demais subtipos de P2XRs, com 239 aminoácidos (Figura 1.8; Tabela 1.4). De maneira geral, unidades individuais do P2X7R apresentam topologia semelhante a dos demais membros, com dois domínios transmembranares, uma alça extracelular rica em cisteína e os domínios N e C-terminais voltados para o meio intracelular. No entanto, dentre os subtipos da família P2XR, o P2X7R possui 595 aminoácidos em sua estrutura linear e, como esclarecido anteriormente, possui a maior cauda carboxi-terminal quando comparado aos demais membros (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001).

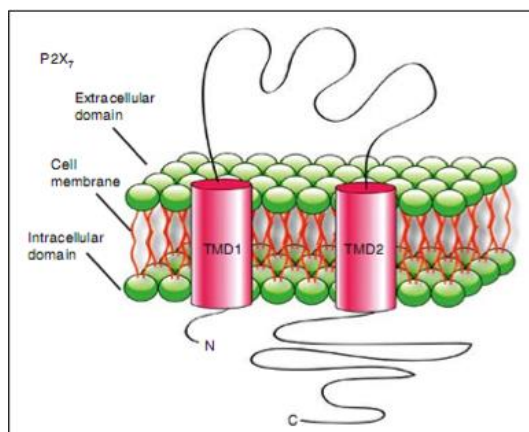


Figura 1.8: Topologia dos P2X7Rs. Muito semelhante aos demais membros, os P2X7Rs, apresentam 2 domínios transmembranares, 1 alça extracelular e as porções amino- e carboxi- intracelulares. Esse receptor se difere dos demais membros da família P2X por possuir uma cauda C-terminal com 239 aminoácidos, sendo a maior dentre todos os membros da família P2X. Adaptado de Hendra Gunosewoyo & Michael Kassiou, 2010.

Tabela 1.4: Quantidade de aminoácidos presente nos receptores P2X.

| Subtipo | P2X1 | P2X2* | P2X3 | P2X4 * | P2X5 | P2X6 | P2X7 |
|-----------------------|------|-----------|------|-----------|------|------|------|
| Número de aminoácidos | 399 | 472 / 401 | 397 | 388 / 329 | 455 | 379 | 595 |

Adaptado de Di Virgilio et al. 2001.

*Existem duas variantes de splicing para P2X2 e P2X4.

Com relação às características farmacológicas dos receptores purinérgicos, podemos destacar que o P2X7R apresenta dois estágios de ativação, onde são necessárias concentrações acima de 100 μM de ATP extracelular (EC_{50}), que acarreta na formação de um canal iônico. Esse canal leva ao influxo de Na^+ e Ca^{++} e efluxo de K^+ das células (através de um gradiente eletroquímico) (Figura 1.6), que é crucial para a formação do inflamassoma e liberação de interleucinas IL-1 β e IL-18 (Figura 1.9) (MacKenzie, Wilson et al. 2001, Ferrari, Pizzirani et al. 2006).

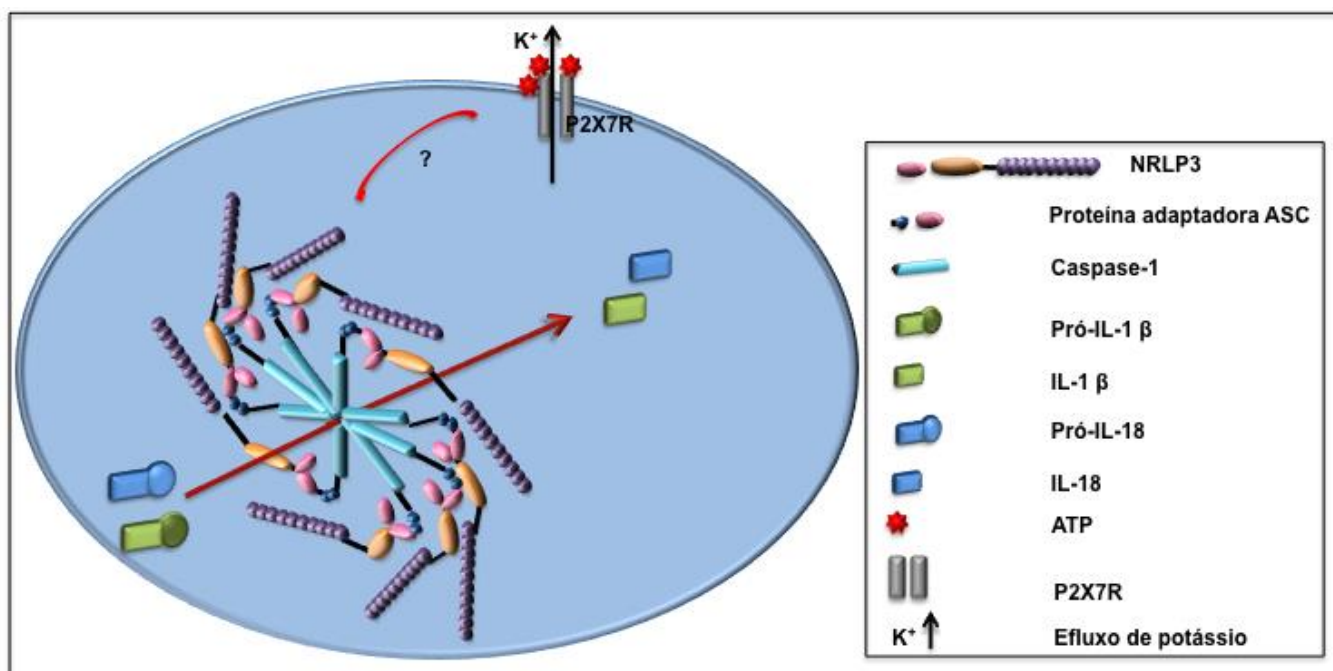


Figura 1.9: Ativação do inflamassoma via P2X7R. O efluxo de K^+ causado através da ativação do P2X7R por ATP extracelular, de alguma forma, induz as proteínas adaptadora ASC, a pró-caspase e ao NLRP3 a se oligomerizarem, levando a formação do inflamassoma. A partir desse inflamassoma, a caspase-1 ativada pode clivar a forma inativa pró-IL-1 β e pró-IL18 em IL-1 β e IL-18 funcionais, que serão liberadas no meio extracelular.

Esses receptores apresentam outra característica, além da formação de um canal iônico, comum aos demais membros da família P2X. A ativação prolongada ou o aumento da concentração do agonista ATP sob o P2X7R resulta na formação de um poro (ou canal de alta condutância) que permite a passagem de solutos hidrofílicos de até 900 Da, em macrófagos (Figura 1.10). Esse efeito pode ser observado com o uso de corantes fluorescentes (amarelo de lúifer, brometo de etídeo, iodeto de propídeo e YO-PRO-1 – cujos pesos moleculares são abaixo de

1000 Da) (Coutinho-Silva and Persechini 1997, Faria, de Farias et al. 2005). Para que a abertura do poro aconteça é necessário que o receptor seja exposto a concentrações superiores a 1 mM. Quando isto acontece, a condutância do canal unitário passa de 8 pS para 400 pS (Coutinho-Silva, Alves et al. 1996). No entanto, apenas dois grupos observaram esse efeito e novos estudos precisam ser realizados para se confirmação deste dado (Coutinho-Silva, Alves et al. 1996, Faria, de Farias et al. 2005, Alves, de Melo Reis et al. 2014).

Um fato interessante é que existem fortes evidências de que os últimos 177 aminoácidos, presentes na cauda carboxi-terminal, sejam responsáveis pela formação do poro. Surprenant, em 1996, demonstrou que mutações pontuais nessa região, eram capazes de inibir a formação do poro. Tal efeito pôde ser observado a partir da diminuição da entrada do corante YO-PRO-1 nas células, após ativação do P2X7 (Surprenant, Rassendren et al. 1996). Alguns anos mais tarde, em 2001, foi observado que o aminoácido ácido glutâmico na posição 496 (cauda carboxi-terminal) era necessário para o funcionamento perfeito do receptor (Gu, Zhang et al. 2001).

Além disso, nosso grupo demonstrou que o poro associado ao P2X7R necessita de um segundo mensageiro (cálcio e MAP quinases) para sua ativação. Esse dado forneceu uma nova perspectiva para a compreensão dos mecanismos de formação do poro associado ao P2X7R. Dados de diversos grupos apontam que para a formação desse poro, é necessária a participação de uma segunda proteína. Em 2006, Pelegrin e Surprenant mostraram que para ocorrer a formação do poro associado ao P2X7R, é necessária a participação de uma segunda proteína, a Panexina-1. Essa questão será discutida com mais detalhes no tópico seguinte.

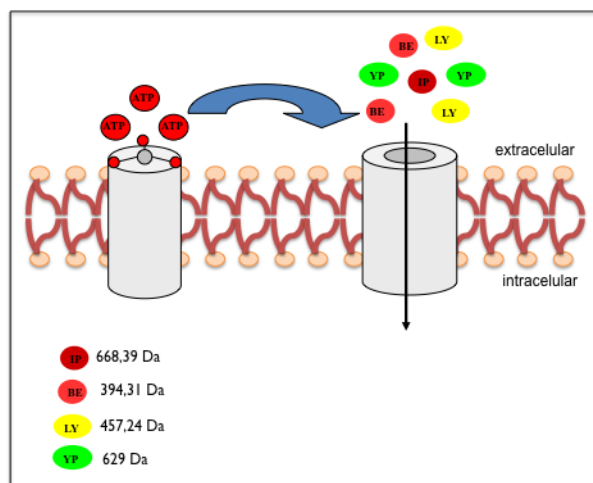


Figura 1.10. Mecanismo de ativação dos P2X7Rs. Altas concentrações de ATP no meio extracelular induzem a abertura de um poro na membrana plasmática, permeável a moléculas de até 900 Da, como por exemplo, corantes fluorescentes. IP (iodeto de propídeo), BE (brometo de etídeo), LY (*lucifer yellow*) e YP (YO-PRO-1). O peso molecular dos corantes está indicado na figura.

A expressão do P2X7R tem sido caracterizada em vários tipos celulares diferentes. Sua expressão e atividade em monócitos e em macrófagos são reguladas de forma significativa em respostas a estímulos inflamatórios, incluindo LPS (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001). Durante uma inflamação, a concentração local de ATP é aumentada, principalmente devido às consequências dos danos e lises celulares e em decorrência deste fato temos a ativação dos receptores purinérgicos (Myrtek, Müller et al. 2008). Macrófagos ativados por BzATP ou ATP extracelular induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez contribuem para a morte microbiana. Esse efeito pode ser potencializado em células previamente tratadas com LPS, demonstrando uma importante interação entre nucleotídeos extracelulares, produtos microbianos e geração de ROS (Pfeiffer, Guerra et al. 2007).

Alguns trabalhos mostram que o P2X7R desempenha um papel importante no desenvolvimento da inflamação, via produção de mediadores inflamatórios (Dell'Antonio, Quattrini et al. 2002, Dell'Antonio, Quattrini et al. 2002, Chessell, Hatcher et al. 2005). Além disso, estudos com camundongos P2X7^{-/-} (Honore, Donnelly-Roberts et al. 2006, Clark, Staniland et al. 2010) e com bloqueio do P2X7R (Dell'Antonio, Quattrini et al. 2002, McGaraughty, Chu et al. 2007, Broom, Matson et al. 2008) sugerem importante envolvimento do receptor com a sensibilidade à dor.

Nesse trabalho, os autores observaram que os camundongos que apresentavam a função do P2X7R bloqueada (bloqueadores) ou anulada (camundongos deficientes) mostravam redução da sensibilidade à dor. Outro trabalho, também com camundongos deficientes, observou que a formação óssea dos animais estava alterada e que havia uma diminuição na resposta inflamatória (Gartland, Buckley et al. 2003, Gartland, Buckley et al. 2003, Ke, Qi et al. 2003). A partir desse momento, o P2X7R tornou-se um forte atrativo para indústrias farmacêuticas como um novo alvo terapêutico e para a descoberta de novas drogas antiinflamatórias (Solle, Labasi et al. 2001, Ke, Qi et al. 2003).

Recentemente, compostos sintéticos foram testados e patenteados por indústrias farmacêuticas, como potenciais antagonistas para uso clínico (Gunosewoyo and Kassiou 2010). Por exemplo, existem três compostos que se encontram em fase clínica para o tratamento da artrite reumatóide, com ação sobre o P2X7R (Pfizer: CE-224535, AstraZeneca: AZD-9056 e Evotec: EVT-401).

Ainda em fase experimental, dados indicam que o uso de ATP, *in vitro*, aumenta a capacidade microbicida de macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Lammas, Stober et al. 1997, Kusner and Adams 2000, Ramachandra, Qu et al. 2010), sugerindo que ele poderia ser utilizado como coadjuvante ao tratamento convencional para Tuberculose.

Diante dessas observações, seria de extrema importância desvendar a identidade do poro associado ao P2X7R, pois ele poderia ser um possível alvo para novos fármacos, inibindo os efeitos mediados pelo P2X7R.

1.7 - Hipóteses para a Abertura do Poro Associado ao P2X7R

Após a ativação do P2X7R é possível observar dois fenômenos: 1) inicialmente ocorre a abertura de um canal catiônico que leva à despolarização da membrana e ao aumento da concentração de Ca^{++} no citoplasma; 2) o segundo fenômeno está relacionado com as concentrações elevadas dos agonistas (BzATP, ATP) ou com a exposição prolongada ao estímulo, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. Nesse segundo fenômeno, há então a abertura de um poro que pode induzir necrose ou apoptose celular. No entanto, ainda existem várias controvérsias

a respeito do mecanismo de formação desse poro. A grande questão envolvendo o P2X7R é quanto a esse segundo fenômeno. Dentro desse contexto, existem algumas hipóteses que são mais discutidas entre os diversos grupos de pesquisadores.

A primeira, afirma que os receptores quando estimulados por altas concentrações ou por longa exposição aos agonistas, dilatariam o canal iônico na membrana celular, aumentando consequentemente a luz do canal, formando um poro (Virginio, MacKenzie et al. 1999) (Figura 1.11).

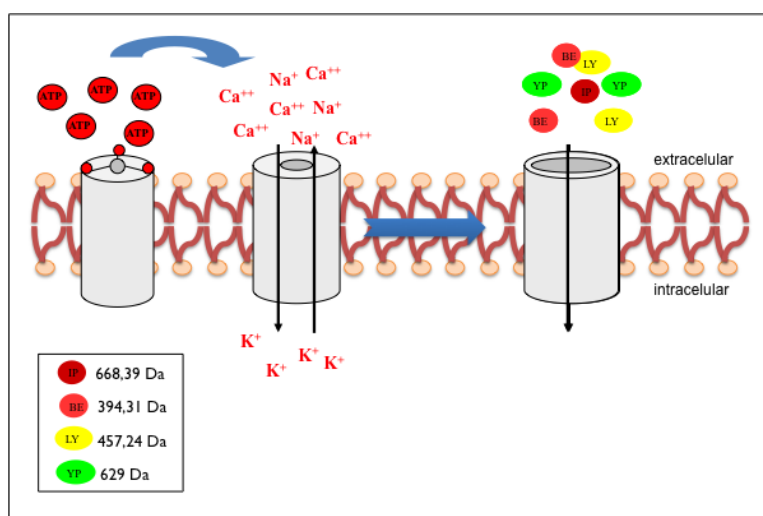


Figura 1.11: Hipótese da dilatação do canal do P2X7R. O receptor ao ser exposto a altas concentrações do agonista (Parvathenani, Tertyshnikova et al.), promove a dilatação do canal iônico. O aumento da luz do canal permite, então, a passagem de moléculas de até 900 Da, como por exemplo os fluoróforos apontados na figura.

Já a segunda hipótese defende a necessidade de outra proteína estar envolvida na abertura do poro. O P2X7 uma vez ativado por altas concentrações de ATP levaria à ativação de uma segunda proteína, capaz de formar poro na membrana plasmática via segundos mensageiros. Sendo a Panexina-1, a candidata mais cotada na literatura como responsável por formar um complexo proteico com o P2X7R (Pelegriin and Surprenant 2006). Essa hipótese tem sido considerada a mais aceita por diversos pesquisadores, e muitos já associam o P2X7R à panexina-1 como: o complexo P2X7R-Panexina-1 (Figura 1.12) (Kanjanamekanant, Luckprom et al. 2014, Mahi, Kumar et al. 2015, Pan, Chou et al. 2015). Numa rápida busca no

Pubmed podemos encontrar, até o momento, 84 resultados associando um ao outro (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

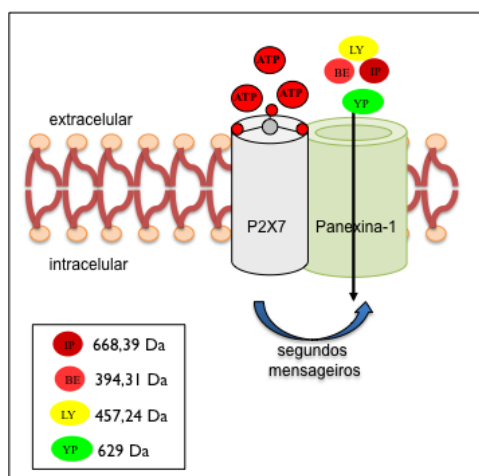


Figura 1.12: Hipótese do complexo proteico P2X7R-Panexina-1. O P2X7R estaria complexado à Panexina-1 e ela seria a responsável pela abertura do poro, permitindo a passagem de moléculas de até 900 Da.

Uma terceira hipótese defende a ideia de que existam dois poros com afinidades moleculares diferentes. Sendo um deles cátion seletivo e outro ânion seletivo (Schachter, Motta et al. 2008). O P2X7R quando exposto a altas concentrações de ATP, seria responsável pela formação do poro catiônico, provavelmente, a partir da dilatação do canal iônico, e de alguma forma sua ativação recrutaria outra proteína capaz de formar um poro aniônico (Figura 1.13).

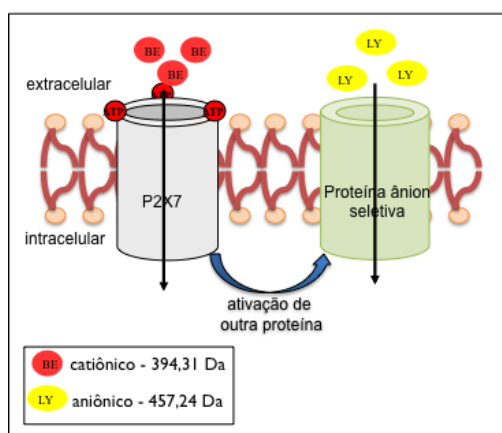


Figura 1.13: Hipótese da formação do poro por duas vias independentes. O P2X7R ativado forma um poro catiônico, recrutaria outra proteína formadora de poro aniônico.

Há ainda uma quarta hipótese, a dos “multiporos”, onde diferentes proteínas poderiam estar participando da formação do poro associado ao P2X7R dependendo do estímulo oferecido e do tipo celular em que se encontram (Pelegrin 2011, Alves, de Melo Reis et al. 2014). O P2X7R poderia estar direta ou indiretamente associado a proteínas capazes de formar poro na membrana plasmática e esta seria responsável pela abertura do poro de 900 Da, levando em consideração a expressão destas em diferentes tipos celulares. Portanto, não seria apenas uma única proteína responsável. Esse fenômeno seria “maleável” e dependeria de qual proteína estaria sendo expressa em determinado tipo celular ou em determinada situação, como por exemplo, à diferentes estímulos. Além da possibilidade de estarem fisicamente associados, há ainda a alternativa de estarem separados e a partir da ativação do P2X7R (por altas concentrações ou exposição prolongada), este recrutaria a participação de outra proteína neste fenômeno, via segundos mensageiros (Figura 1.14). A formação do poro por essa proteína (via ativação do P2X7R por ATP extracelular), permite a liberação de ATP por ela, que por sua vez, atuaria no P2X7R, gerando uma retroalimentação positiva (Figura 1.14).

Atualmente, algumas proteínas de membranas podem ser sugeridas como possíveis poros associadas ao P2X7R. Dentre elas destacamos os canais de panexinas, hemicanais de conexinas, o maxianion, o canal aniônico dependente de voltagem da membrana plasmática (VDACpl), o receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) e o receptor de potencial transitório da anquirina do tipo 1 (TRPA1) (Figura 1.14). A ideia de que essas proteínas formadoras de canais possam ser as responsáveis pela abertura do poro associado ao P2X7R, deve-se ao fato de que o *cutoff* de seus canais se assemelha ao do P2X7R, cerca de 900 Da em macrófagos, como já mencionado anteriormente.

Até o momento, nenhum dado concreto foi demonstrado elucidando essa questão, e apesar de alguns grupos terem sugerido que a Panexina-1 seria responsável pelo poro, ainda há muitos resultados divergentes entre os diferentes grupos de pesquisa (Rigato, Swinnen et al. 2012, Alberto, Faria et al. 2013).

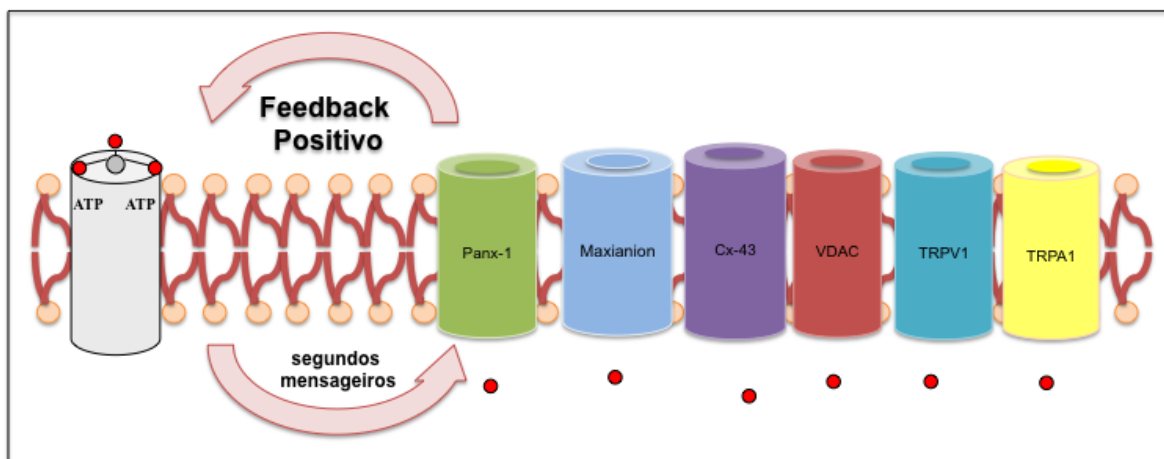


Figura 1.14. Hipótese dos multiporos. Diferentes proteínas formadoras de canais poderiam ser as responsáveis pela formação do poro associado ao P2X7R. A identidade da proteína poderia variar dependendo do tipo celular e do estímulo no microambiente em que a célula se encontra. A abertura desses canais poderia levar à liberação de ATP, gerando uma retroalimentação positiva.

1.8 - Proteínas Formadoras de Poro

Pouco se sabe sobre a possibilidade de outras proteínas, capazes de formar poros na membrana plasmática estarem envolvidas com o P2X7R. No presente trabalho estudamos a hipótese de multiporos, com a participação de várias proteínas, dependendo do tipo celular e do estímulo que tenham recebido. As proteínas selecionadas para esta tese se enquadram em algumas condições: estão presentes na membrana plasmática, são capazes de formar poros após estímulos específicos e apresentam limite de permeabilidade similar ao do P2X7R, permitindo que moléculas em torno de 900 Da permeiem a membrana (Tabela 1.5). Destacamos seis proteínas com essas características: canais de Panexina-1, hemicanais de Conexina-43, VDACP1, VRAC, TRPV1 e o TRPA1.

Tabela 1.5: Proteínas formadoras de poro com características semelhantes ao poro do P2X7R e seus agonistas e antagonistas.

| Proteínas formadoras de poro | Condutância Unitária (pS) | Agonistas | Antagonistas | Cut off |
|-------------------------------------|----------------------------------|--|--|--------------------|
| Hemicanal | ~90 (Cx32); ~220 (Cx43) | Baixa [Ca ⁺⁺] _i e V _m positivos; Aumento [Ca ⁺⁺] _i na Cx32 | Alta [Ca ⁺⁺] _i , V _m negativos, carbenoxelone, heptanol, octanol | ~1000 Da |
| Panexina-1 | ~500 | Varição na V _m | Carbenoxelone, ácido 18β- glicerretínico | ~1000 Da |
| VDAC | ~400 pS | Varição na V _m | Oligonucleotídeos de Fosforotioato | >1000 Da |
| TRPV1 | ~100pS | Capsaicina, Resiniferatoxina, Temperatura > 42°C; pH < 4.0 | Capsazepina, Vermelho de Rutênio | ~1000 Da |
| TRPA1 | ~100pS | Alil isotiocianato | HC-030031, Amiloride, Vermelho de Rutênio | ~1000 Da |
| Poro P2X₇R | ~400 | ATP, BzATP | ATP oxidado, KN-62, BBG, A-438079 | ~900 Da |

Adaptado de Alves, LA et al. 2014.

Lista de Abreviações Tabela 1.5:

VM – Voltagem da Membrana

KN-62 – 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazine

HC-O30031 – 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methylethyl)phenyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide;

Ca⁺ – Cálcio

BzATP – 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosine 5'-triphosphate

BBG – Brilliant Blue G

ATP – Adenosina 5' trifosfato

1.8.1 - Hemicanais de Conexina-43 e Canais de Panexina-1

As conexinas compõem junções comunicantes tipo gap e conhecidas por formarem canais intercelulares permeáveis a íons e a pequenas moléculas (até 1 kDa). Além de conectarem o citoplasma de células adjacentes (Paul 1995, Bruzzone, White et al. 1996). As junções possibilitam o intercâmbio de íons e de várias substâncias orgânicas como aminoácidos, nucleotídeos, cAMP e inositol (Saez, Connor et al. 1989, Saez, Gregory et al. 1989, Sáez, Brañes et al. 2000, Evans and Martin 2002). Essas estão presentes em quase todos os animais, tanto em vertebrados quanto em invertebrados e também em quase todos os tipos celulares (Kumar and Gilula 1996). Nos vertebrados são chamadas de conexinas e nos invertebrados de inexas. Nos vertebrados, a formação do canal tipo gap necessita que células adjacentes apresentem seis subunidades da proteína transmembrana Conexina, formando uma estrutura proteica hexamérica chamada conexons ou hemicanal (Figura 1.15). Esses se encontram inseridos na membrana plasmática, porém, para haver a formação do canal propriamente dito, é necessário que haja interação entre os conexons das células adjacentes.

Existem até o momento 21 isoformas de conexinas e estas são nomeadas dependendo das massas moleculares de cada conexina (por exemplo a conexina 43, representa a proteína conexina de 43 kDa e a isoforma 26 representa a conexina de 26 kDa) (Eiberger, Degen et al. 2001, Tanmahasamut and Sidell 2005). conexina 43 é a isoforma mais expressa (Yamasaki and Naus 1996) e tem sido alvo de intensa investigação, pois a diminuição ou o aumento de sua expressão está frequentemente associada a diversas condições patológicas, incluindo câncer (Hirschi, Xu et al. 1996, Maqbool, Rashid et al. 2015, Ming, Zhou et al. 2015, Qiu, Cheng et al. 2015)

Existe ainda outra família que apresenta homologia com conexinas (vertebrados) e inexas (invertebrados), como o nome já sugere; as panexinas (radical grego; pan = todos, tudo) estão presentes tanto nos invertebrados quanto nos vertebrados (Bruzzone, White et al. 1996, Panchin, Kelmanson et al. 2000, Bruzzone, Hormuzdi et al. 2003) e apresentam 3 subtipos descritos até o momento (Panx1-3). Entretanto, apesar de terem homologia com as junções tipo gap, as Panexinas não formam canais juncionais, ou seja, não conectam citoplasmas de

células adjacentes. Essas fazem a comunicação do meio intra e extracelular (função inicialmente conhecida como hemicanal), desencadeiam uma série de cascatas intracelulares, incluindo propagação de ondas de cálcio, e estão envolvidas na liberação de ATP para o meio extracelular (Bao, Locovei et al. 2004, Barbe, Monyer et al. 2006, Locovei, Bao et al. 2006, Dahl and Keane 2012). A modulação desse canal é feita através do controle dos níveis de cálcio e do pH do meio extracelular (Figura 1. 15) (Bruzzone, Hormuzdi et al. 2003, Bao, Locovei et al. 2004).

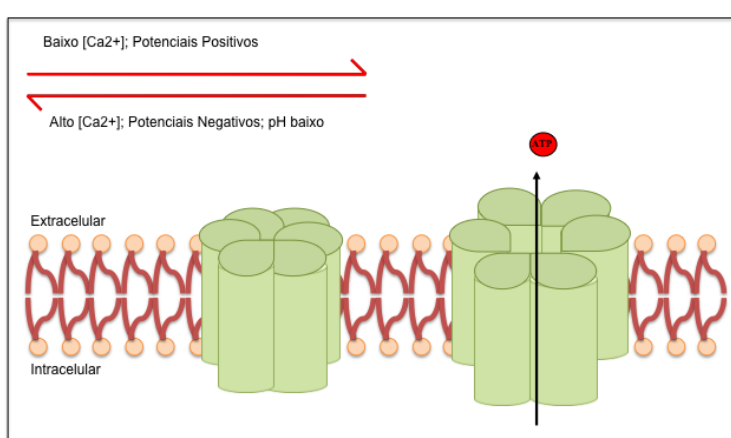


Figura 1.15: Formação de hemicanais de conexinas e canais de panexinas. São necessárias seis subunidades de conexinas ou de panexinas para formação do canal. Esses canais são dependentes de níveis de cálcio e do pH para que possam abrir ou fechar.

As conexinas e panexinas apresentam topologia semelhante entre si, com pequenas diferenças quanto ao tamanho das regiões (quantidade de aminoácidos). Tanto conexinas quanto panexinas apresentam 4 domínios transmembranares, 1 alça intracelular, 2 alças extracelulares e as porções carboxi-terminal e amino-terminal voltadas para o meio intracelular (Figura 1.16).

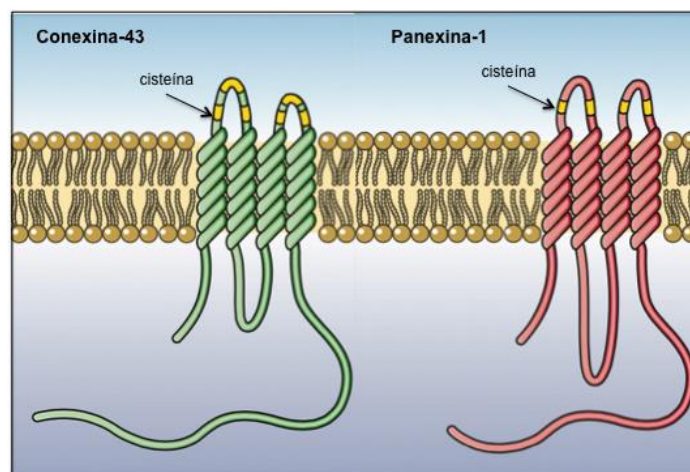


Figura 1.16: Topologia das Conexina-43 e Panexina-1. Elas apresentam topologia semelhante, com: 4 domínios transmembranares, 2 alças extracelulares com resíduos de 2 cisteína em cada, 1 alça intracelular e os terminais carboxi- e amino- no meio intracelular. No entanto nas alças extracelulares, a Conexina-43, tem 3 resíduos de cisteína, enquanto que a Panexina-1 tem 2. Além disso, pode-se notar que a alça intracelular da Panexina-1 é um pouco maior do que a da Conexina-43. Adaptado de Barbe, MT. et al 2006.

1.8.2 - Canal Aniônico Dependente de Voltagem da Membrana Plasmática (VDACpl)

Os canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC) são proteínas formadoras de poro, tradicionalmente conhecidas por estarem presentes na membrana externa da mitocôndria (Yu and Forte 1996, Hodge and Colombini 1997). Apesar de ainda controverso, alguns estudos a partir de registros eletrofisiológicos, apontaram sua existência na membrana plasmática, sendo inicialmente chamado de VDAC-like. Esses estudos detectaram a presença do VDAC em diferentes tipos celulares, como por exemplo: células de ovário de *hamster* Chinês (Mangel, Raymond et al. 1993), células HeLa (Schwarzer, Becker et al. 2000) e astrócitos bovinos (Dermietzel, Hwang et al. 1994, Guibert, Dermietzel et al. 1998).

Na membrana externa das mitocôndrias, esses canais são responsáveis por transportar diversos nucleotídeos, incluindo ATP e ADP (Rostovtseva and Colombini 1996). No entanto, a real função do VDAC-like, atualmente chamado de VDAC-pl, ainda não foi totalmente elucidada. Alguns estudos sugerem que sua principal função esteja relacionada com o transporte de ATP, pela membrana plasmática.

Em 2004, Okada e colaboradores observaram que células de camundongos deficientes para VDAC-pl apresentavam redução nos níveis de ATP liberados pela célula. Confirmando sua presença na membrana e sugerindo sua participação no controle de ATP que atravessa a membrana plasmática para ser liberado no meio extracelular (Okada, O'Neal et al. 2004). Outro estudo, que também se baseou nas características eletrofisiológicas do VDAC-pl, aponta a participação desses canais no processo de apoptose em células HT22; o bloqueio desse canal foi capaz de inibir o processo apoptótico (Elinder, Akanda et al. 2005, Akanda and Elinder 2006).

Recentemente, foi demonstrado que os VDACS são abundantemente encontrados em *lipid rafts* de neurônios, onde estão associados a complexos proteicos de sinalização que engatilha uma resposta neuroprotetora. A perda da integridade dos *lipid rafts* leva à ruptura da associação complexo proteico-VDAC, podendo levar a ativação do VDAC (Thinnes 2015, Thinnes 2015). Fernandez-Echevarria e colaboradores demonstraram que essa perda de integridade pode levar à interação entre VDAC e a proteína precursora amiloide (APP) nos *lipid rafts* das membranas dos neurônios, sugerindo sua participação na doença de Alzheimer (AD). Além disso, observaram que o acúmulo de A β leva à desfosforilação do VDAC e consequente morte da célula, sob essas circunstâncias, a desfosforilação do VDAC e a modificação nas propriedades do canal, podem provocar dissipação de íons, exaustão metabólica e morte do neurônio, contribuindo para neuropatologia da AD (Figura 1.17) (Fernandez-Echevarria, Diaz et al. 2014).

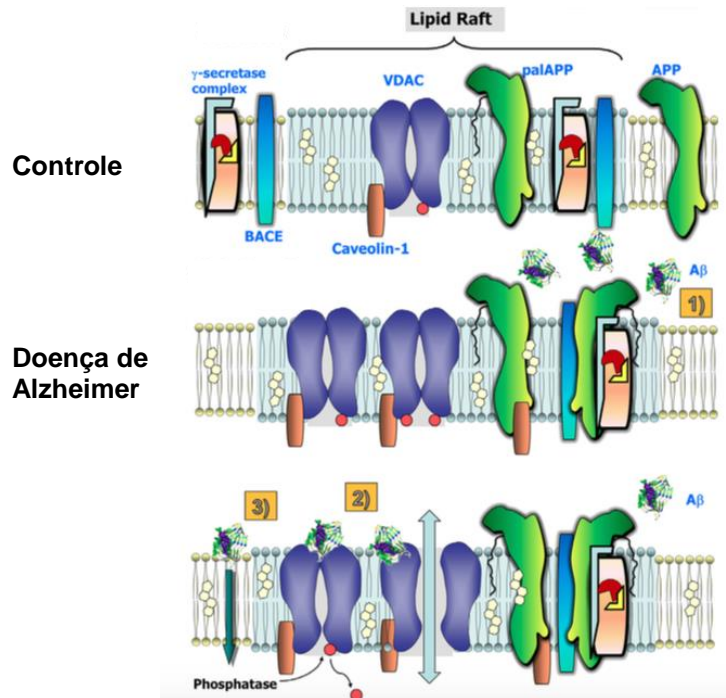


Figura 1.17: Modelo hipotético da interação entre VDAC, proteína precursora amiloide (APP) e β -amiloide ($A\beta$) de cérebros com doença de Alzheimer (AD). Em cérebros normais (controle), o canal VDAC da membrana plasmática é constitutivamente fosforilado (círculos vermelhos) e localizados nos *lipid rafts*, onde estão parcialmente associados à caveolina-1 e com uma fração da APP palmitoilada (palAPP), adição de palmitato (C16) à resíduos de cisteína. Tanto a β -secretase (BACE) quanto o complexo γ -secretase são, parcialmente, encontrados em frações de *lipid rafts*, que favorecem a interação de BACE com APP, a liberação e acúmulo $A\beta$, após clivagem pela γ -secretase (evento 1). Em cérebros com AD, o desarranjo dos *lipid rafts* aumenta a disponibilidade de interação entre VDAC e APP. Concomitante com a formação β , dois eventos paralelos são acionados: de um lado, os agregados de $A\beta$ vão interagir com VDAC (caso 2), formando um multicomplexo tóxico nos *lipids rafts*. Por outro lado, $A\beta$ pode induzir a desfosforilação do canal VDAC (caso 3). Nestas circunstâncias, a perda da tirosina ativa o VDAC e induz sua abertura na membrana, provocando dissipação de íons, exaustão metabólica e morte do neurônio, contribuindo para a neuropatologia da AD.

1.8.3 - Receptores de Potencial Transiente (TRP)

Os receptores de potencial transiente são canais catiônicos não seletivos. Essa família é dividida em sete subfamílias: TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA, TRPP e TRPML. Cada subfamília é dividida em diversos subtipos, mas nesta tese focaremos nos subtipos TRPA1 (anquirina) e TRPV1 (vanilóide). A família apresenta uma característica comum a todos os membros: possuem papel importante na resposta a estímulos externos, sendo um receptor polimodal, ou seja, é capaz de ser

ativado por diversos estímulos (Somogyi, Matta et al. 2015). Quando se trata do microambiente celular, esses canais concedem às células a capacidade de perceberem mudanças no meio externo, como por exemplo, alterações na osmolaridade (Venkatachalam and Montell 2007).

A topologia dessas proteínas consiste em seis domínios transmembranares, 3 alças extracelulares e 2 intracelulares e as porções terminais carboxi- e amino-voltadas para o interior da célula (Figura 18). Tanto o TRPV1 quanto o TRPA1 apresentam na cauda amino-terminal domínios repetidos de anquirina (proteína responsável pela ligação do citoesqueleto à membrana plasmática), sendo que o subtipo TRPA1 apresenta maior número de anquirinas (Figura 1.18) (Bessac and Jordt 2008).

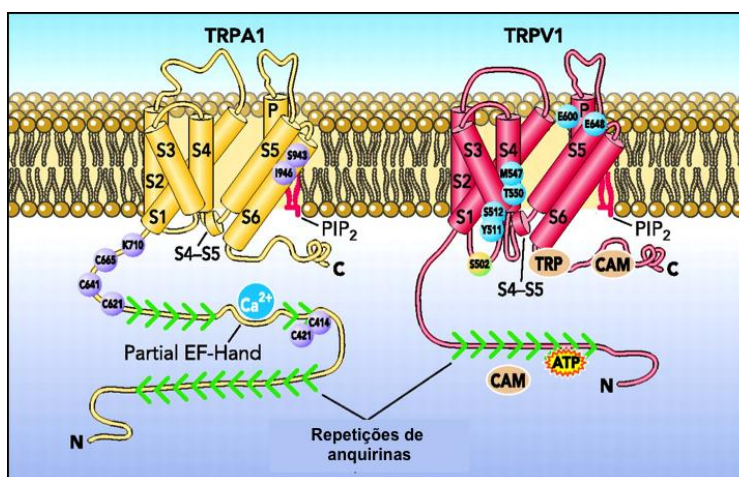


Figura 1.18. Esquema representando a topologia dos subtipos TRPA1 e TRPV1. Com topologia semelhantes, os subtipos apresentam 6 domínios transmembranares e as caudas amino e carboxi-terminal intracelulares. A cauda amino-terminal de ambos é rica em anquirinas. No entanto, no TRPV1, essa cauda apresenta sítio de interação para o ATP. Adaptado de Bessac, BF e Jordt, SE. 2008.

O canal desses receptores é formado a partir de quatro subunidades da proteína, formando um tetrâmero que pode ser de subunidades iguais (homotetrâmeros) ou diferentes (heterotetrâmeros) (Figura 1.19) (Firth, Remillard et al. 2007).

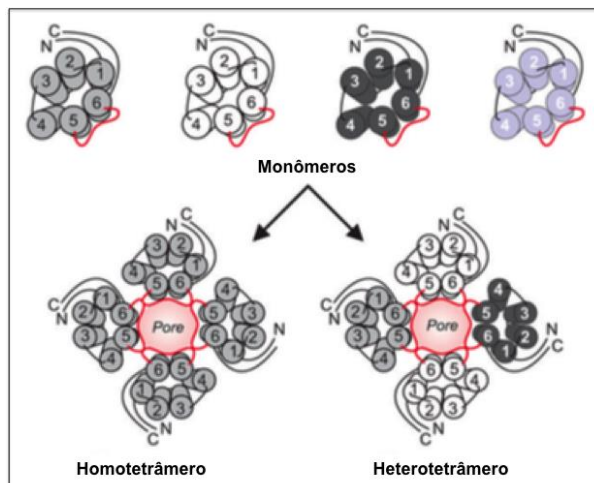


Figura 1.19: Estrutura do canal de TRP. As quatro subunidades juntas formam canal (a luz do canal está destacada em vermelho - poro), que pode ser homotetrâmero (iguais) ou heterotetrâmero (diferentes). Adaptado de Firth, LA; et al. 2007.

1.8.4 - Canal Aniônico Regulado por Volume (VRAC)

Esses canais são também conhecidos como VSOAC (canal aniônico sensível a osmólitos orgânicos) ou VSOR (canal aniônico sensível ao volume de retificação externa) e são responsáveis pelo efluxo de osmólitos orgânicos carregados negativamente quando induzido pela hipotonicidade do meio externo (Okada 1997). Nessas condições, ocorre a ativação do VRAC, que reduz a osmolaridade intracelular e constitui a principal via para a regulação da diminuição de volume (RVD) (Figura 1.20). Alguns pesquisadores sugerem que esse canal seja heteromérico ou que possuam uma subunidade reguladora. Recentemente, foi identificado a partir de um screening de RNA de interferência (RNAi), a proteína LRRC8 ou SWELL 1 (Figura 1.20). SWELL 1 é uma proteína transmembranar e sua expressão foi vista em diversos tecidos e células de mamíferos, principalmente em linfócitos B e T (Qiu, Dubin et al. 2014, Voss, Ullrich et al. 2014). Entretanto, ainda não está claro quantas subunidades são necessárias ou se existe a participação de outras proteínas para a formação do VRAC (Qiu, Dubin et al. 2014, Pedersen, Klausen et al. 2015).

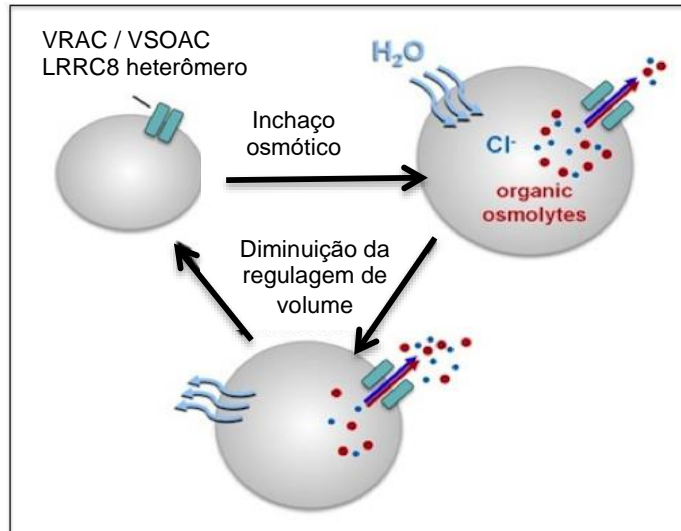


Figura 1.20 Ativação do VRAC sob condições hipotônicas e o funcionamento do RVD: As células em meio hipotônico levam a ativação do VRAC e consequente liberação de osmólitos orgânicos negativos e entrada de água na célula, ocasionando o inchaço osmótico. Após o equilíbrio osmótico acontece a diminuição do volume celular e a célula volta à sua conformação normal. (Adaptado de Voss FK 2014).

Além da regulação do volume celular em respostas às modificações hipotônicas, ocorrem diversos outros processos que poderiam estar relacionados com o VRAC, incluindo regulação do potencial de membrana, secreção de sais, fluidos e aminoácidos não essenciais, liberação de ATP, proliferação celular e apoptose (Roman, Feranchak et al. 1999, Maeno, Ishizaki et al. 2000, Okada, Maeno et al. 2001, Okada, O'Neal et al. 2004, Maeno, Takahashi et al. 2006, Okada, Sato et al. 2009).

1.8.5 – Proteínas Transportadoras

Existe outra classe de proteínas muito importante, principalmente, quando se trata de absorção de fármacos, sendo conhecida como carreadores de membranas. Proteínas transportadoras são determinantes no desenvolvimento de novos fármacos, pois o seu conhecimento facilita o direcionamento do fármaco ao seu objetivo ideal com o mínimo de efeito adverso. Existem transportadores de efluxo e influxo e são esses que garantem a seletividade ou resistência a um determinado

fármaco, pois serão responsáveis por permeá-los com maior afinidade para dentro ou fora da célula.

A glicoproteína-P (P-gp, MDR ou ABCB1), por exemplo, é uma proteína transportadora de efluxo e auxilia na remoção de substâncias nocivas nas células do cérebro, dos rins, do fígado, do intestino e da placenta, por exemplo. O aumento da expressão dessa proteína pode conferir resistência a um determinado fármaco, visto que ela é responsável por remover o fármaco absorvido. Tanto os transportadores de efluxo quanto de influxo podem ser modulados (inibidos ou estimulados), por diferentes fármacos ou sob condições patológicas (Trauner and Boyer 2003, Davit-Spraul, Gonzales et al. 2009).

Em 2010, foi fundado o Consórcio Internacional de Transportadores, por cientistas de indústrias farmacêuticas e acadêmicos especializados em transporte de fármacos. Nesse Consórcio ficou definido que as superfamílias ABC (*ATP binding cassette*) e SLC (*Solute Carrier*) apresentam transportadores que alteram os parâmetros de absorção e de distribuição dos fármacos no organismo (International Transporter, Giacomini et al. 2010). Sendo os transportadores OATP1, OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2, OATP2B1, OATP3 (OATP = *Organic Anion Transporter Polypeptides*), OCT1, OCT2 (OCT = *Organic Cation Transporters*), MDR1 (MDR = *Multidrug resistance*), PEPT1, PEPT2 (*Oligopeptide Transporters*), MATE1, MATE2 (MATE = *Multi-Antimicrobial Extrusion Protein*) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) os que mais alteram os parâmetros farmacocinéticos dos fármacos (International Transporter, Giacomini et al. 2010) (Figura 1.21).

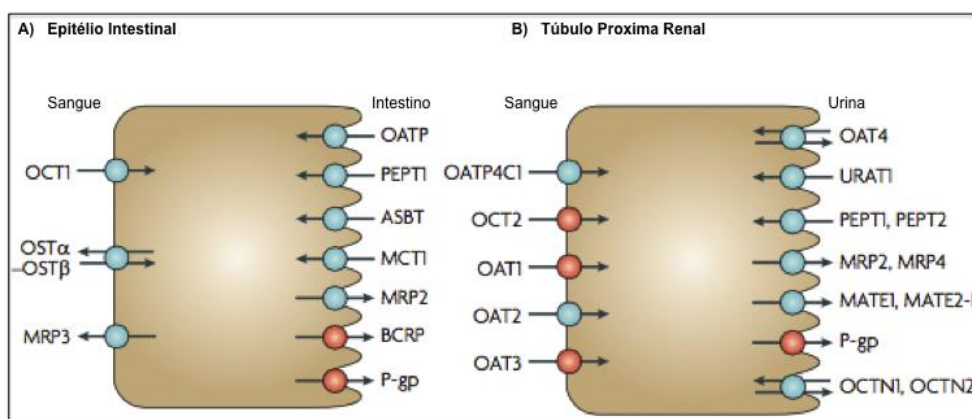


Figura 1.21: Proteínas transportadoras para drogas e substâncias endógenas. A) O epitélio intestinal contém diversos transportadores na membrana plasmática, incluindo as famílias OATP, PEPT1, ASBT, MRP, OCT1, MDR (P-gp) e MCT1. B) O túbulo proximal renal estão as seguintes famílias de

membrana: OAT4, PEPT, MATE, , OCT2, MDR, URATI, MRP e OATP. As setas indicam a função de influxo (para dentro) ou efluxo (para fora). (Adaptado de International Transporter, Giacomini et al. 2010).

Os relatos apresentados e as controvérsias entre os diversos grupos de pesquisa, deixam em dúvida qual ou quais seriam as proteínas associadas ao poro. Além disso, há também evidências de que o próprio canal poderia se dilatar, permitindo assim a passagem dessas moléculas não permeáveis à membrana plasmática. Em virtude desse cenário faz-se necessário a realização de novos estudos para a elucidação dessa questão. Nesse sentido, presente trabalho testa a hipótese de que diferentes mecanismos e diferentes proteínas formadoras de poro podem estar associados ao P2X7R, dependendo do tipo celular e dos estímulos em seu microambiente, o que poderia explicar os diversos dados divergentes até o momento.

II. Objetivos

Objetivo Geral

Identificar proteínas associadas ao poro do P2X7R, além de caracterizá-las funcionalmente em diferentes tipos celulares e testar a hipótese de multiporos associados ao P2X7R.

Objetivos específicos

1 – Identificar em diferentes tipos celulares possíveis proteínas candidatas ao poro (canal de alta condutância) associado ao P2X7R;

2 – Investigar a possível associação física entre o P2X7R e as proteínas candidatas a formação do poro;

3 – Avaliar a funcionalidade das proteínas candidatas ao poro associado ao P2X7R e

III. Materiais e Métodos

3.1 - Cultura de Células

Além das células primárias (obtidas tanto da cavidade peritoneal de camundongos suíços quanto de medula óssea de camundongos C57BL/6) utilizamos as seguintes células de linhagem: J774.G8, N2A, U937, U373, HEK-293 transfectada ou não com o P2X7R humano.

As linhagens J774.G8 e N2A são obtidas de camundongo (*mus musculus*), sendo a J774.G8 derivada de um sarcoma e a N2A de um neuroblastoma. Com relação às linhagens U937, U373 e HEK-293, são células humanas provenientes de linfoblastoma, de glioblastoma e de rim embrionário, respectivamente.

Para o cultivo dessas células, utilizamos o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alta glicose ou DMEM/F12 (células HEK-293) mais 10% de soro fetal bovino, ambos obtidos da GIBCO (Gaithersburg MD). As células primárias foram primadas, ou não, com 1 µg/mL de LPS (cepa 055:B5 de *E.coli*). As células foram acondicionadas em garrafas plásticas para cultura celular em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

3.2 - Análise do padrão de expressão gênica das candidatas à poro associado ao P2X7R

Para detectarmos a presença do RNA mensageiro das proteínas: P2X7R, VDAC, TRPV1, TRPA1, Panx-1 e Cx-43, nos diferentes tipos celulares, realizamos uma caracterização molecular, a partir da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O RNA total dessas células foi isolado utilizando TRIZOL (GIBCO BRL, Gaithersburg MD, USA). A partir da suspensão obtida, o conteúdo proteico foi purificado com uma solução de fenol/clorofórmio 1:1 e a fase aquosa contendo 60% do RNA total foi extraída. Utilizamos para a reação da transcriptase reversa o kit "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Scientific).

O cDNA obtido foi amplificado utilizando *primers* desenhados no programa "Primer Premier 6.1" da Premier Biosoft (Quadro 3.1), a partir da sequência do P2X7R disponível no GeneBank e sintetizados pela Invitrogen (BRL, SP).

Para o PCR utilizamos a ciclagem de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento específica por 1 min (Quadro 3.2) e extensão a 72°C por 2 min. Após os 35 ciclos, fizemos uma extensão final a 72°C por 5 min e 4°C infinito. Para esse estudo, utilizamos 0,2 mM de *primers*, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U Taq Polimerase e 100 ng de cDNA.

Quadro 3.1: Primers desenhados no programa “Primer Premier 6.1” da Premier Biosoft.

| | Camundongo | Rato | Humano |
|------------------|---|--|--|
| P2X ₇ | Sense-CCTCAGTGTCCATCTTCC AntiSense-CTCATCCGTGTTCTTGTC | Sense-AAGCCATCGCATCTAACC AntiSense-TCTACCAAGCCACATCCA | Sense-CCTCAGTGTCCATCTTCC AntiSense-CTCATCCGTGTTCTTGTC |
| VDAC* | Sense-TGTGTTTCATTCTTCTCGTGC AntiSense-CCAGTGTTCGGCGAGAATGAC | | |
| TRPV1 | Sense-TTGTGGAGGTGGCAGATA AntiSense-AAGCAGTAGACGAAGAAGTT | Sense-ATGCTGGTGTCTGTGGTA AntiSense-GCCGATGGTGAACCTTGAA | Sense-TGGTGACGCTGATTGAAG AntiSense-AGGAGGATGTAGGTGAGAAT |
| TRP A1 | Sense-TAAGGCAGAACACAACACTACA AntiSense-TAAGCAGCAGCAACAACACT | Sense-GCCTCTCCATTATGCTTGT AntiSense-TGTGTCGCTGATGTCTTG | Sense-ACGATATGGACACCTTCTTC AntiSense-GACCTTCATCACCTCATTATTC |
| Panx-1 | Sense - AGCCTCATTACCTCATTGT AntiSense - CATTGTAGCCTTCAGACTTG | Sense - CTTGAAGACGAAGAAGAACTC AntiSense - CGACTTGATGCTACACAGA | Sense - TGGATTCTTCTTGCTGATGA AntiSense - GGCTACTGCTCTTGACTAAT |
| Cx-43** | Sense - TACCACGCCACCACTGGC Anti-SenseAATCTCCAGGTCATCAGG | | |

Quadro 3.2: Temperatura de anelamento e de amplicons gerados após PCR

| Primer | Temperatura de Anelamento | Amplicon Esperado (pb) |
|-----------------------|---------------------------|------------------------|
| P2X7 camundongo | 55 °C | 186 pb |
| P2X7 rato | 56 °C | 465 pb |
| P2X7 humano | 55 °C | 186 pb |
| VDAC | 60 °C | 350 pb |
| TRPV1 camundongo | 52 °C | 457 pb |
| TRPV1 rato | 54 °C | 363 pb |
| TRPV1 humano | 54 °C | 241 pb |
| TRPA1 camundongo | 52 °C | 339 pb |
| TRPA1 rato | 55 °C | 172 pb |
| TRPA1 humano | 54 °C | 269 pb |
| Panexina 1 camundongo | 60 °C | 221 pb |
| Panexina 1 rato | 53 °C | 154 pb |
| Panexina 1 humano | 56 °C | 314 pb |
| Conexina 43 | 55 °C | 407 pb |

*Sequência retirada da literatura: Buettner, R. et al. 2000.

** Sequência retirada da literatura: Fonseca, P.C. et al. 2005.

3.3 - Imunoprecipitação do P2X7R e proteínas candidatas

Nesse ensaio utilizamos kit “Protein A/G Plus-Agarose Immunoprecipitation Reagent” (Santa Cruz Biotechnology) para precipitarmos todas as proteínas candidatas, separadamente: P2X7R, Panexina-1, Cx-43, TRPV1 ou TRPA1 dos diferentes tipos celulares estudados. Com objetivo de observar maior expressão do receptor sob estímulo de seu agonista ATP, promovemos ensaios utilizando de $2,5 \times 10^7$ células por amostra (com e sem ATP). O grupo de células tratadas com agonista, recebeu 5 mM de ATP por 30 min a 37°C. Em seguida, as células dos dois grupos (tratadas ou não com ATP), foram lisadas com 1 mL de tampão do lise celular RIPA (50 mM de Tris pH 7,5; 1% de Triton-X; 0,25% de deoxiglicolato de sódio; 0,1% de SDS; 1 mM de fluoreto de sódio; 1mM de ortovanadato de sódio; 5 mM de EDTA e inibidores de protease 1x) e incubadas por 10 min à 4°C. Após esse procedimento, foram submetidas a repetidas aspirações em seringas de 21G e transferidas para um novo tubo. O lisado foi centrifugado por 10 min à 4°C a 10.000 xG e o sobrenadante foi recolhido e transferido para novo tubo. Acrescentamos 2 µg de anticorpo primário de cada proteína, separadamente, de maneira que cada precipitação continha apenas 1 anticorpo, e incubamos por 1 h à 4°C, sob agitação no orbital. Posteriormente, 20 µl de proteína A/G foram adicionados e então incubados *overnight* a 4°C sob agitação no orbital. Passado o período de incubação, os tubos passaram por 4 etapas de lavagens com 1 mL de PBS 1X, a partir de centrifugações à 1000 xG por 5 min a 4°C. Depois da última lavagem, o *pellet* foi ressuspensado em 40 µl de tampão de amostra e fervido por 10 min.

3.4 - SDS-PAGE e Western Blot

Após a imunoprecipitação, fizemos eletroforese a 15 mA de corrente constante, por aproximadamente 2 h em géis desnaturantes de Bis/Acrilamida (*staining* = 4% e *running* = 12,5%), utilizando um tampão de corrida composto por 2,5 mM de Tris pH 6,8, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS. Um gel foi corado com Comassie-BlueG (gel “espelho”) e um segundo gel foi destinado para o Western Blot. Utilizamos o Fastblot Semi-Dry Transfer (Biometra), para transferirmos as proteínas do gel para a

membrana de PVDF, previamente hidratada com Metanol P.A. Posteriormente, o sanduíche foi montado (papel de filtro, membrana, gel e papel de filtro), hidratado com tampão de transferência (tampão de corrida e 20% de metanol) e submetido a 140 mA, corrente constante, por 30 min. Após a transferência, bloqueamos a membrana e bloqueada com “Odyssey Blocking Buffer” (LICOR) por 1 hora em temperatura ambiente e incubamos a membrana com o anticorpo primário (1:5000 de “Odyssey Blocking Buffer” + 0,1% de Tween-20) *overnight*, sob agitação no orbital a 4°C. Após essa incubação, lavamos a membrana 4 vezes com PBS + 0,1% de Tween-20 por 5 min sob agitação. Utilizamos o anticorpo secundário “IRDye secondary antibodies” (LICOR) (1:5000 de “Odyssey Blocking Buffer” + 0,1% de Tween-20) para a segunda incubação por 1 h sob agitação. Para retirar o excesso de anticorpo e diminuir o *background*, foram feitas quatro lavagens com PBS + 0,1% de Tween-20 por 5 min sob agitação. Para finalizar, a membrana foi lavada com PBS 1X e escaneada no equipamento “LICOR Odyssey Scanning Platform”.

3.5 - Preparação da amostra para Espectrometria de Massas a partir do gel de SDS-PAGE

A extração dos peptídeos do gel para análise por espectrometria de massas envolve muito manuseio e por isso é feita sempre uma análise de um pedaço do gel sem amostra e sem o corante Comassie-BlueG (chamamos de Vazio). A partir desse pedaço de gel chamado de Vazio podemos verificar, se a quantidade de queratina que as amostras apresentaram se trata de uma expressão endógena da célula analisada ou se ocorreu uma contaminação por manuseio durante as etapas da extração da proteína. Além desse controle negativo (Vazio), foi feito um controle positivo com uma amostra conhecida (BSA).

As bandas visualizadas no gel de Bis/Acrilamida corado por Comassie-BlueG foram cortadas (aproximadamente 1mm²) sob negatoscópio, previamente limpo com álcool 70%. Além disso, cortamos uma parte do gel, onde não havia banda ou corante, para servir de controle negativo. Os cortes de gel foram completamente descorados com uma solução de acetonitrila 50% e de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Em seguida, essa solução foi removida no speed-vac por 30 min até que

os géis fossem totalmente desidratados. Posteriormente, as pontes de dissulfeto foram reduzidas a partir da adição do ditioneitol (DTT) 10 mM em bicarbonato de amônio 25 mM por 1 h, a 56°C. Removemos o DTT lavando os géis com bicarbonato de amônio 25 mM. A próxima etapa foi alquilar os resíduos de cisteína com iodocetamida (IAA) 50 mM em bicarbonato de amônio 25 mM por 30 min, em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Os géis foram lavados com bicarbonato de amônio a 25 mM, vortexados e em seguida, desidratados no speed-vac por 30 min. Adicionamos tripsina (Promega, sequencing grade) 0,01 µg/µL em bicarbonato de amônio 25 mM, quantidade suficiente para cobrir os géis, aguardamos que todo o gel absorvesse a tripsina e em seguida os géis foram reidratados *overnight* a 37°C com bicarbonato de amônio 25 mM.

A solução foi transferida para um novo tubo e os géis foram sonicados duas vezes por 30 min na presença de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila 50%. Essa solução foi adicionada àquela previamente separada e em seguida, as amostras foram desidratadas no *speed vac* por 1 h e ressuspensas em ácido fórmico 0,1% no dia em que foram analisadas pelo Q-TOF (melhor explicado no tópico 3.7).

3.6 - Preparação da amostra para Espectrometria de Massas a partir da amostra em solução

As amostras precipitadas foram reconstituídas em 100 µL de uréia 6 M, Tris-HCl 50 mM em pH 8.0. Em seguida, incubamos por 1 h em 200 mM DTT/ 50 mM Tris-HCl, pH 8. Após esse período, incubamos com 200 mM de iodocetamida/ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 por 1 h em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Para eliminar qualquer iodocetamida que não tivesse reagido com a amostra, adicionamos, novamente 200 mM de DTT/ 50 mM Tris-HCl e incubamos por 1 h, ainda sob proteção da luz. Reduzimos a uréia à uma concentração final de aproximadamente 0,6 M com 1 mM de CaCl₂ em 50 mM Tris-HCl. Por fim, a amostra foi tripsinizada em uma proporção final de 1:5 (volume: volume; tripsina:proteína), vortexada e incubada *overnight* à 37°C. Após essa incubação final, as amostras foram desidratadas no *speed vac* e em seguida ressuspensas em 0,1% de ácido fórmico.

3.7 - Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta capaz de caracterizar as moléculas a partir da relação massa/carga dos íons gerados a partir dos peptídeos que serão analisados. A espectrometria de massas é muito utilizada na identificação de compostos desconhecidos e na quantificação de compostos conhecidos.

O método mais clássico de identificação de proteínas por espectrometria de massas é denominado PMF: *peptide mass fingerprinting*. Essa metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo peptídeos. Nesta tese utilizamos o Q-TOF (Waters Corp., Manchester, UK) acoplado ao sistema de cromatografia Waters nanoACQUITY UPLC 1D (Waters Corp., Manchester, UK), que apresenta uma alta resolução e exatidão na determinação da massa.

Os resultados gerados pelo Q-TOF foram analisados no programa online *Mascot Server* (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), seguindo as recomendações do tutorial do software. Esse software permite comparar o PMF das proteínas que queremos identificar com os peptídeos teóricos gerados para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados.

Vale ressaltar que para essa análise ser feita, o software *Mascot Server* indica que peptídeos com o score acima de 42 apresentam identidade em relação à proteína sugerida e o score acima de 21, indica homologia. Para esse estudo consideramos as proteínas que tivessem score acima de 42. No entanto, além do score, analisamos o erro gerado a cada sequenciamento feito, observando se as series b e y se confirmavam.

3.8 - Preparação da amostra para análise por Microscopia de Confocal

As células N2A e J774.G8 foram plaqueadas por 24 horas em câmara Labtek de plástico com 8 divisões. Após esse período de cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X pH=7.4 e em seguida fixadas em paraformolaldeído (Hill, Model et al.) 4% em PBS 1X pH=7.4 por 30 minutos a 4°C. Após a retirada do PFA, seguida de três lavagens com PBS 1X, incubamos por 30 minutos a 4°C com

tampão de bloqueio e permeabilização (BSA 3% e TRITON-X 0,01% em PBS 1X pH=7.4), visto que os anticorpos primários utilizados eram específicos para região intracelular das proteínas analisadas. Posteriormente, os anticorpos primários foram incubados por duas horas a temperatura ambiente. As diluições desses anticorpos foram feitas no tampão de bloqueio e permeabilização, descrito anteriormente, da seguinte maneira: normal goat IgG (Santa Cruz Biotechnology): 1:200; anti-P2X7 (Santa Cruz Biotechnology): 1:100; anti-Panexina-1 (Santa Cruz Biotechnology): 1:100; anti-TRPA1 (Santa Cruz Biotechnology): 1:100; anti-Conexina-43 (Invitrogen): 1:800. Após lavagem das células com PBS 1X pH=8.0, os anticorpos secundários (anti-IgG de cabra conjugado com Alexa 488 e anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 - Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Tais anticorpos também foram diluídos no tampão de bloqueio e permeabilização numa concentração de 1:200. Em seguida, realizamos três lavagens e incubamos com 1 µg/mL do marcador de núcleo DAPI (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente e lavamos cinco vezes com PBS 1X pH=8.0. Etapas de marcações finalizadas, retiramos as câmaras da Labtek e utilizamos cerca de 3 µL por “poço” do meio de montagem Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, Dinamarca, Glostrup) para fecharmos com lamínulas de 0.17mm.

3.9 - Microscopia de Confocal

As imagens foram obtidas através do microscópio confocal de escaneamento laser Olympus FluoView F1000 (Tóquio, Japão) com uma objetiva planapocromática de imersão à óleo (60X/1.40). A captura da imagem foi realizada a partir do software Fluoview Viewer, versão 4.1.1.5.

3.10 - Ensaio da Funcionalidade do P2X7R – Captação de Corante

Macrófagos primários foram previamente primados, ou não, com LPS 1 µg/mL por 4 h e em seguida, tratados com diferentes agonistas e antagonistas das proteínas estudadas. Em paralelo, as células de linhagem não passaram por qualquer tipo de tratamento prévio com LPS. Para determinar a funcionalidade do P2X7R e das proteínas selecionadas, após o tratamento com os agonistas e antagonistas, as amostras foram submetidas à presença do corante fluorescente YO-PRO-1 (2µM) no meio extracelular. Esse corante é intercalante de ácidos nucleicos e por não ser lipofílica, não é capaz de permear a membrana plasmática das células sem que haja abertura de poros nas mesmas.

O ensaio seguiu por dois tipos de análises diferentes: 1- Microscopia de Confocal e 2- Leitor de placa, como detalhado a seguir.

3.11 - Captação de Corante por Microscopia de Fluorescência

As imagens foram adquiridas com o microscópio Nikon Eclipse Ti, utilizando uma objetiva 20X S Plan Fluor (abertura numérica de 0.45) e uma câmara digital Sight DS-QiMc (Nikon) com um espaçamento Z óptico de 0.2 µm e conjuntos de filtros (Semrock) de 387-nm/447-nm, 472-nm/520-nm, 543-nm/593-nm e 650-nm/668-nm. As células foram cultivadas em lamínulas por 24 h (1×10^5 células por lamínula). Após esse período, foram lavadas duas vezes com salina extracelular e em seguida, o tratamento com antagonistas foi administrado por 10 min. Na etapa seguinte, as lamínulas foram acondicionadas na câmara do microscópio, onde a temperatura foi mantida a 37°C durante todo o experimento. Nesta mesma câmara foram adicionados os agonistas das proteínas estudadas. As imagens foram obtidas em *timelapse* a cada 30 seg durante os 30 min de estímulo dos agonistas. As imagens foram arquivadas com software NIS-Elements AR (Nikon) e em seguida a máxima fluorescência das células foi processada a partir do *software* Fiji (ImageJ). No *software* Fiji, desenhamos regiões de interesse (ROI – *region of interest*) em

células aleatórias (30 a 50 células por foto) e ajustamos o programa para que fizesse a medição da fluorescência frame a frame, de maneira que todo o vídeo fosse analisado (cerca de 61 fotos por ensaio). Essa metodologia, nos permite confeccionar uma curva de captação de corante ao longo do tempo de exposição aos diferentes estímulos.

3.12 - Captação de Corante por Leitor de Placas

A captação de corante também foi analisada no leitor de placas Synergy Mx (BioTek), seguindo o mesmo protocolo de tratamento com agonistas e antagonistas utilizados no tópico 3.11. O programa do equipamento foi ajustado para fazer uma leitura de normalização basal antes da aplicação automática dos agonistas, cerca de 3 minutos. Após essa leitura, o equipamento aplica o agonista nos poços previamente selecionados e efetua a leitura da fluorescência a cada 10 segundo durante 30 minutos. Obtivemos a máxima fluorescência das células a partir da permeabilização com Triton-X 0,1%.

O YO-PRO-1 (Life Technologies) foi mensurado sob uma excitação de 485 nm e emissão de 515 nm e o resultado expresso unidade de fluorescência relativa (RFU – relative fluorescence units).

3.13 - Análise Estatística

O resultado de cada experimento é mostrado como média \pm SD para ensaios de permeabilização. Os resultados representam a media de pelo menos três experimentos independentes em triplicatas. A análise estatística e gráfica foi realizada a partir do software GraphPad Prism versão 6 para Mac (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Utilizamos o teste paramétrico ANOVA, seguido de *pos hoc* com método de múltiplas comparações Sidak-Bonferroni, considerando significativo quando $p < 0.05$.

IV. Resultados

4.1 – Avaliação das proteínas candidatas por RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*)

Com intuito de fazer um levantamento das possíveis proteínas formadoras de poro, iniciamos nosso estudo a partir da técnica da *transcrição reversa* seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para identificarmos quais os mRNAs estariam sendo expressos e em quais tipos celulares isto estaria ocorrendo.

A fim de prosseguirmos na análise, realizamos o ensaio de RT-PCR utilizando *primers* específicos para cada mRNA alvo, descritos anteriormente no tópico Materiais e Métodos (Tabela 3.1). A partir desses *primers* e dos mRNAs extraídos verificamos a expressão dos mRNAs das proteínas selecionadas neste estudo, que poderiam estar associadas ao P2X7R, que são: VDAC, TRPA1, TRPV1, hemicanal de conexina-43 e canal de panexina-1 em células primárias de macrófagos peritoneais de camundongo suíço, além de cinco células de linhagem diferentes (J774-G8, N2A, U937, U373 e HEK-293T).

Nessa análise, utilizamos como controle positivo da reação da *transcriptase reversa* (RT) um mRNA e *primers* específicos de GAPDH (sequências não relatadas pelo fabricante), provenientes do kit de RT-PCR utilizado. Além desse controle positivo, fizemos dois controles negativos: 1- que chamamos de “mock” (dado não mostrado), onde fazíamos a primeira etapa da reação de RT sem a enzima *transcriptase reversa* e em seguida a reação de PCR era realizada. Caso essa amostra amplificasse algum produto de PCR, a extração de RNA era considerada contaminada por DNA e nova extração era realizada. 2- que chamamos de controle negativo, no qual não era adicionado cDNA na etapa da PCR, afim de verificarmos qualquer tipo de contaminação nos reagente dessa etapa. No entanto, além de utilizarmos os *primers* e RNA de GAPDH do kit, fizemos também o uso de *primers* desenhado por nós durante o trabalho, afim de confirmarmos o funcionamento da reação de PCR e por isso, nossos géis apresentam duas bandas diferentes relativas à amplificação do mRNA de GAPDH

Nossos resultados indicam que a célula da linhagem U373 apresenta apenas uma das proteínas que selecionamos, a conexina-43 presente em todas as células analisadas exceto a HEK-293T (Figura 4.1 e Tabela 4.1). O TRPV1 está presente

apenas nas células N2A e U937 (Figura 4.2) enquanto que o TRPA1 está presente em macrófagos murinos, pois observamos sua expressão em macrófagos peritoneais de camundongo, além da linhagem celular J774.G8 (Figura 4.3).

Além da conexina-43, o P2X7R foi outra proteína que encontramos em todos os tipos celulares, com exceção das células da linhagem HEK-293T e da U373, que apresentou apenas a expressão da conexina-43. A Panexina-1 também foi uma proteína formadora de poros encontrada em quase todos os tipos celulares estudados, com exceção da linhagem U373 e de macrófagos peritoneais de camundongo. Ao contrário das demais proteínas formadoras de poro, o VDAC foi observado apenas em apenas duas das sete linhagens celulares; macrófago peritoneal de camundongo suíço e J774.G8 (Figura 4.3). Na Tabela 4.1 podemos observar um resumo dos resultados descritos acima.

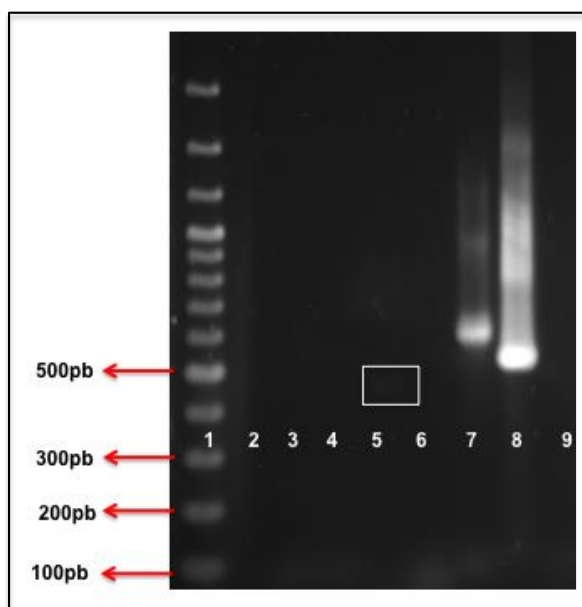


Figura 4.1: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula U373 por RT-PCR. Lane 1: padrão de peso molecular; 2: Ausência de mRNA de TRPV1; 3: Ausência de mRNA de P2X7R; 4: Ausência de mRNA de TRPA1; 5: Presença de mRNA de Conexina-43; 6: Ausência de mRNA de Panexina-1; 7: mRNA de GAPDH do kit (Controle da RT); 8: mRNA de GAPDH da célula (Controle endógeno), 9: Ausência de VDAC. Foto representativa de 3 experimentos independentes.

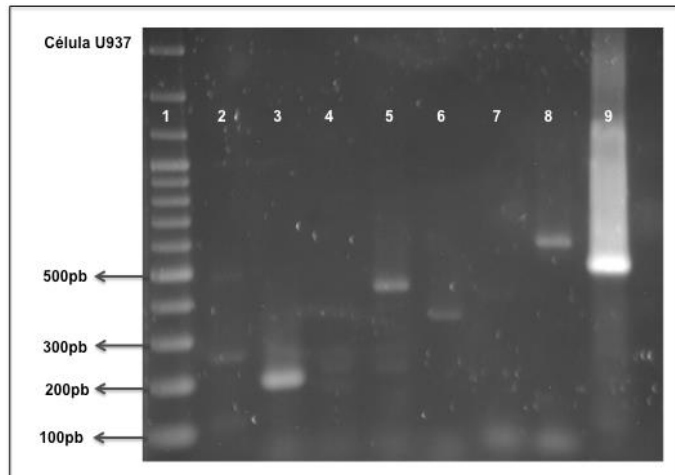


Figura 4.2: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula U937 por RT-PCR. *Lane* 1: padrão de peso molecular; 2: Presença de mRNA de TRPV1; 3: Presença de mRNA de P2X7R; 4: Ausência de mRNA de TRPA1; 5: Presença de mRNA de Conexina-43; 6: Presença de mRNA de Panexina-1; 7: Ausência de mRNA de VDAC; mRNA de GAPDH do kit (Controle da RT); 8: mRNA de GAPDH da célula (Controle endógeno). Foto representativa de 3 experimentos independentes.

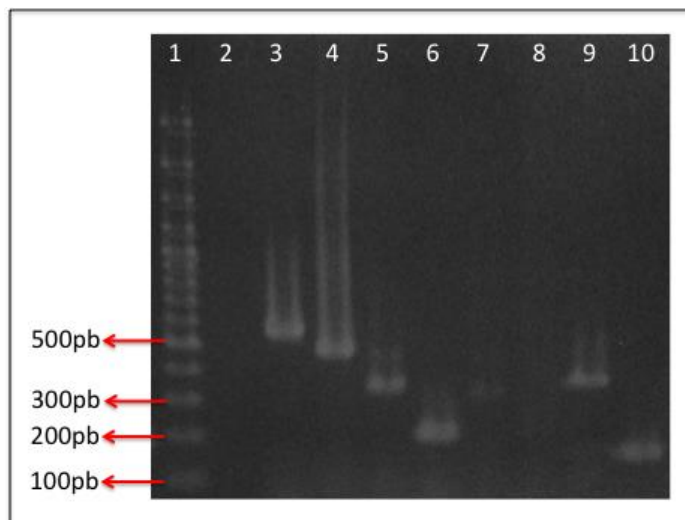


Figura 4.3: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula J774.G8 por RT-PCR. *Lane* 1: padrão de peso molecular; 2: Controle negativo; 3: mRNA de GAPDH do kit (Controle da RT); 4: mRNA de GAPDH da célula (Controle endógeno); 5: Presença de mRNA de VDAC; 6- Presença de mRNA de Panexina-1, 7- Presença de mRNA de TRPA1; 8: Ausência de mRNA de TRPV1; 9: Presença de mRNA de Conexina-43 e 10: Presença de mRNA de P2X7. Foto representativa de 5 experimentos independentes.

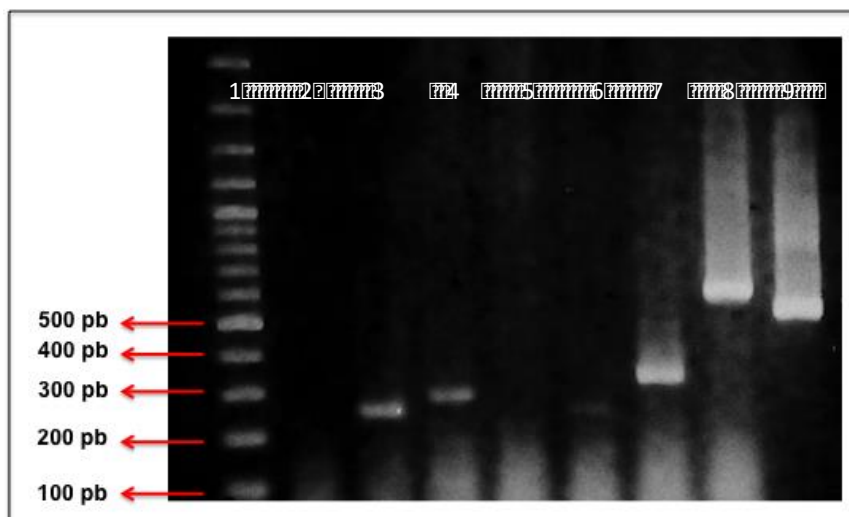


Figura 4.4: Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da amplificação do cDNA de proteínas formadoras de poro na célula HEK-293T por RT-PCR. Lane 1: padrão de peso molecular; 2: Ausência de mRNA de P2X7. 3: Presença de mRNA de TRPV1, 4: Presença de mRNA de TRPA1; 5: Ausência de mRNA de Conexina-43; 6: Ausência de mRNA de VDAC; 7: mRNA de GAPDH do kit (Controle da RT); 8: mRNA de GAPDH da célula (Controle endógeno). Foto representativa de 2 experimentos independentes.

Tabela 4.1: Expressão de proteínas candidatas ao poro do P2X7.

| Proteínas Células | P2X7 | VDAC | TRPV1 | TRPA1 | Hemicanal de Cx. 43 | Hemicanal de Panx.1 | GAPDH |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|------------------------|------------------------|----------|
| Mac. peritoneal - Swiss | PRESENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE |
| J774.G8 | PRESENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE | PRESENTE | PRESENTE |
| N2A | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE | PRESENTE |
| U937 | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE | PRESENTE |
| U373 | AUSENTE | AUSENTE | AUSENTE | AUSENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE |
| HEK-293 | AUSENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE | AUSENTE | PRESENTE | PRESENTE |

$n=5$ experimentos independentes para J774.G8 (todas as proteínas) e $n=3$ experimentos independentes para as demais análises.

4.2 – Identificação de Proteínas por Imunoprecipitação e Western Blot

Com o objetivo de confirmarmos se os mRNAs observados na etapa de RT-PCR estavam sendo traduzidos em proteína e se essas proteínas estariam associadas fisicamente ao P2X7R, realizamos experimentos de imunoprecipitação seguidos de Western Blot. Como descrito na metodologia do kit *Protein A/G Plus-Agarose*, utilizamos $2,5 \times 10^7$ células por experimento e estas foram lisadas com tampão RIPA na presença, ou não, de 5 mM de ATP.

Após a imunoprecipitação, utilizando apenas anti-P2X7R e na ausência de ATP, as amostras foram aplicadas em dois géis de bis/acrilamida (*stacking* = 4% e *running* = 12,5%). Um gel espelho foi corado por Comassie-Blue G enquanto que o outro gel foi transferido para uma membrana de PVDF e em seguida o ensaio de Western Blot foi realizado. Nesse momento, a membrana foi revelada com um anticorpo primário anti-P2X7R (procedimento inicial de padronização da técnica).

No SDS-PAGE da Figura 4.5A, o P2X7R imunoprecipitado a partir de células J774.G8 não mostra claramente as bandas do gel, provavelmente devido sensibilidade da coloração. Por outro lado, na Figura 4.5B podemos confirmar a presença do P2X7R nas células J774.G8 e em macrófagos peritoneais de camundongo (Figura 4.5B). A banda referente ao P2X7R está em torno de 75 kDa, como apontado na figura (seta vermelha) e a primeira *lane* é referente ao padrão de peso molecular (Figura 4.5A e 4.5B). Ainda na Figura 4.5B, observamos que a banda referente ao P2XR de macrófagos peritoneais de camundongo estava mais fina, o que pode ser explicado pelo número de células usadas. Neste evento partimos de $2,0 \times 10^7$ células.

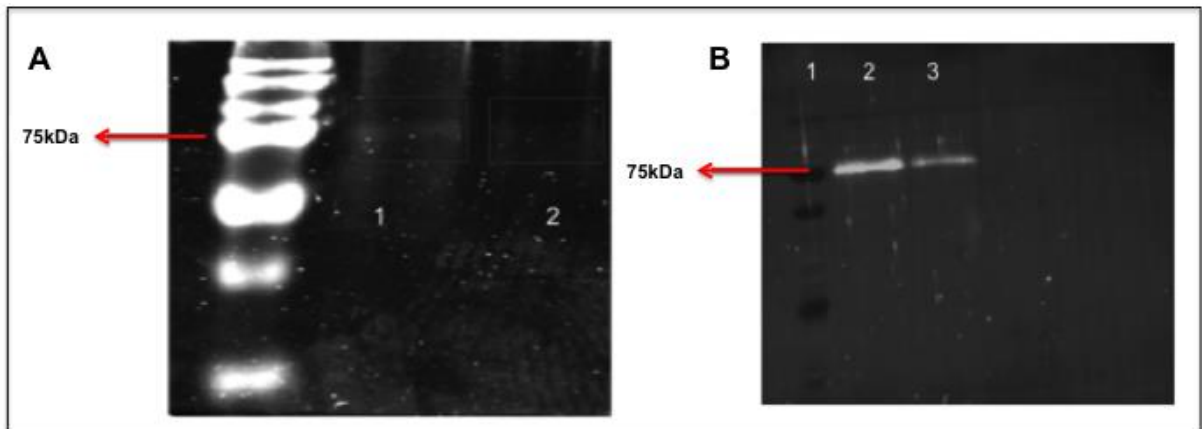


Figura 4.5: SDS-PAGE corado por Coomassie-Blue G (A) e Western Blot (B) sem adição de ATP. A) Lane 1: padrão, 2: imunoprecipitados de J774.G8 e 3: imunoprecipitados de macrófagos peritoneais de camundongo. B) Lane 1: padrão, 2: P2X7 de J774.G8 e 3: P2X7 de macrófagos peritoneais de camundongo. Gel de bis/acrilamida 12,5% (A) e membrana de PVDF (B) escaneados no equipamento “Odyssey Scanning Platform” da LICOR. n=3 experimentos independentes para J774.G8 e n=2 experimentos independentes para macrófagos peritoneais de camundongo.

Devido à ativação do P2X7R ser mediada por ATP extracelular, nos questionamos se o perfil proteico apresentado no gel de Coomassie-BlueG seria diferente se tratássemos as células com 5 mM de ATP por 30 min (adicionado no meio de cultura e incubado a 37°C na estufa). Mais uma vez fizemos uma imunoprecipitação com o anticorpo anti-P2X7R e o Western Blot foi novamente revelado com anti-P2X7R. No entanto, foi observado que o perfil no Coomassie-BlueG apresentava pouca diferença com relação ao não tratado com ATP 5 mM, apresentando poucas bandas de peso molecular abaixo de 75kDa (Figura 4.6A e 4.6A) e uma marcação uniforme para o P2X7R no Western Blot referente as linhagens J774.G8 e U937 (Figura 4.6B).

Durante o processo de imunoprecipitação utilizamos o tampão RIPA para lisar as células e preservar a integridade das proteínas. No entanto, é sabido que a adição de ATP ao tampão de lise ajuda a diminuir ligações proteicas fracas, pois reduz cerca de 100 vezes a ligação miosina-actina e facilita na solubilização dos componentes do citoesqueleto, diminuindo o background não-específico (Peltz, Gallis et al. 1987). Portanto, a estratégia foi modificada, mantivemos o ATP durante todo o processo de imunoprecipitação com anticorpo anti-P2X7. Para isso, o ATP foi adicionado tanto ao meio de cultura da célula (por 30 min), quanto ao tampão RIPA

(Figura 4.7). O tampão RIPA, como descrito anteriormente, é retirado apenas no final, após obtenção do imunoprecipitado, seguido de sucessivas lavagens com PBS 1X.

No gel de Comassie-Blue G da Figura 4.7 podemos observar que de fato o ATP desencadeia o recrutamento de diversas proteínas diferentes quando comparado às amostras sem tratamento com ATP (Figura 4.7 lanes 2, 3 e 5).

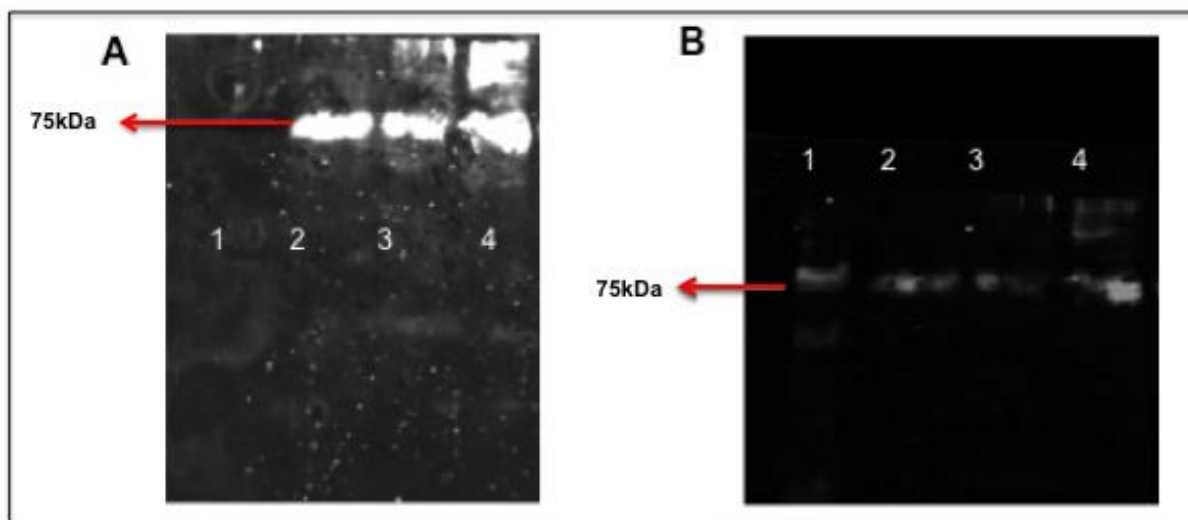


Figura 4.6: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G (A) e Western Blot (B) na presença de ATP por 30 minutos. A) Lane 1: padrão, 2: imunoprecipitados de J774.G8, 3: J774.G8 + ATP e 4: U937. B) Lane 1: padrão; 2: P2X7 de J774.G8, 3: P2X7 de J774.G8 + ATP, 4: P2X7 de U937. Gel de bis/acrilamida 12,5% (A) e membrana de PVDF (B) escaneados no equipamento "Odyssey Scanning Platform" da LICOR. n=3 experimentos independentes.

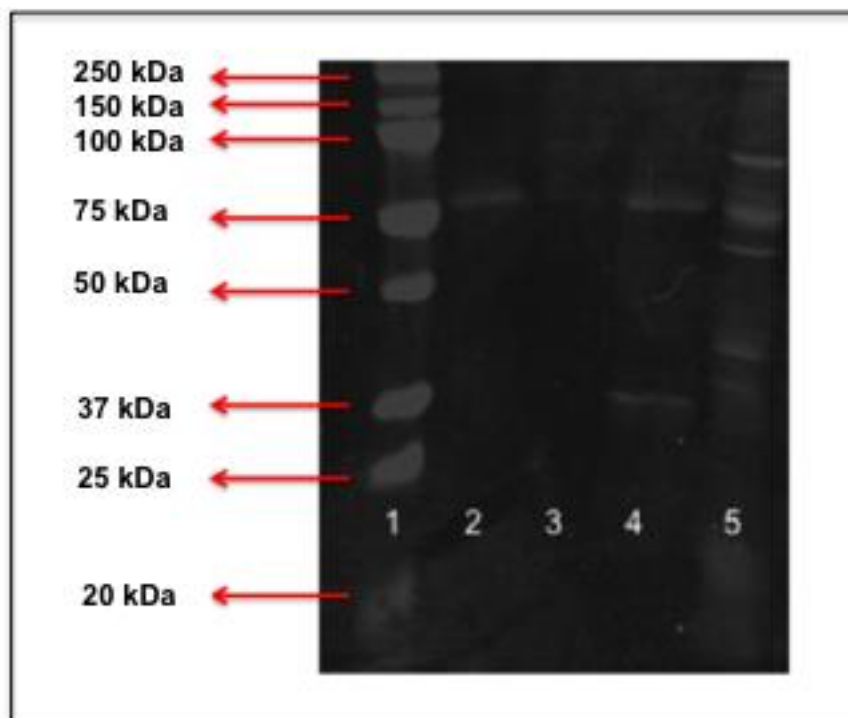


Figura 4.7: SDS-PAGE corado por Comassie-Blue G na presença do ATP em diferentes condições. *Lane 1*: padrão, 2: imunoprecipitados de J774.G8 + ATP (apenas na cultura), 3: J774.G8, 4: U937 e 5: J774.G8 + ATP (na cultura e no RIPA). Gel de bis/acrilamida 12,5% escaneado no equipamento “Odyssey Scanning Platform” da LICOR. n=3 experimentos independentes.

4.3 – Identificação de Proteínas Associadas por imunoprecipitação e Western Blot

Após essa etapa inicial de padronização do ensaio, verificamos se as proteínas candidatas poderiam estar interagindo de forma molecularmente direta com o P2X7R e para isso realizamos experimentos de imunoprecipitação dentre os diferentes tipos celulares selecionados. As proteínas foram imunoprecipitadas uma de cada vez na presença dos seguintes anticorpos: anti-TRPV1, anti-Cx-43, anti-panexina-1, anti-TRPA1 ou anti-P2X7. Cada uma das amostras foi incubada com ou sem ATP (5mM) durante todo o processo, como padronizado na Figura 4.7 e os anticorpos para a imunoprecipitação de cada proteína foi adicionado, separadamente. As etapas da imunoprecipitação com ou sem ATP para cada proteína (separadamente) foi realizada nas linhagens celulares J774.G8, N2A, U937 e HEK-293T.

No ensaio realizado com a linhagem U937 observamos que houve fraca marcação para o P2X7R após a imunoprecipitação com anti-P2X7R. Entretanto a banda referente ao P2X7R foi mais forte na presença de ATP 5mM (Figura 4.8). Além disso, observamos que não há associação da Panexina-1 com o P2X7R nessas células, independente do tratamento prévio com ATP 5 mM. Enquanto que a expressão e a associação do P2X7R com o TRPV1 parece ser modulada negativamente quando há presença de ATP, visto que houve uma diminuição na banda referente à expressão dos P2X7Rs, nas células U937 previamente tratadas (Figura 4.8). Observamos, também na U937, uma banda mais forte que as demais referente ao P2X7R imunoprecipitado com conexina-43 (Figura 4.8).

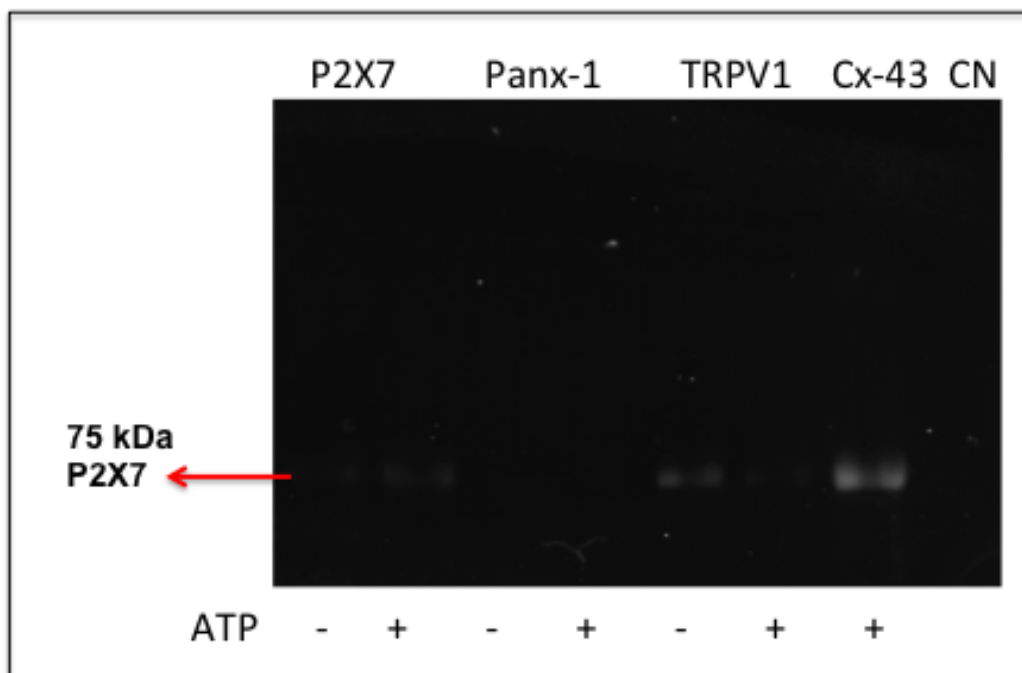


Figura 4.8: Western Blot para P2X7 de células U937 a partir de imunoprecipitados de diferentes proteínas. Lane 1: imunoprecipitados de P2X7, 2: P2X7 + ATP, 3: Panx1, 4: Panx-1 + ATP, 5: TRPV1, 6: TRPV1 + ATP, 7: Cx43 + ATP e 8: Controle Negativo. n=3 experimentos independentes.

Em células J774.G8 podemos observar que o tratamento prévio com ATP 5mM induz o aumento da expressão de P2X7Rs bem como sua associação com a proteína de membrana Panexina-1 (Figura 4.9). Nesse ensaio, utilizamos anticorpo para Panexina-1 na etapa de imunoprecipitação e o anticorpo para P2X7R, na etapa

da incubação com o anticorpo primário no Western Blot (da mesma forma que os anteriores), revelando assim uma possível associação física entre essas proteínas.

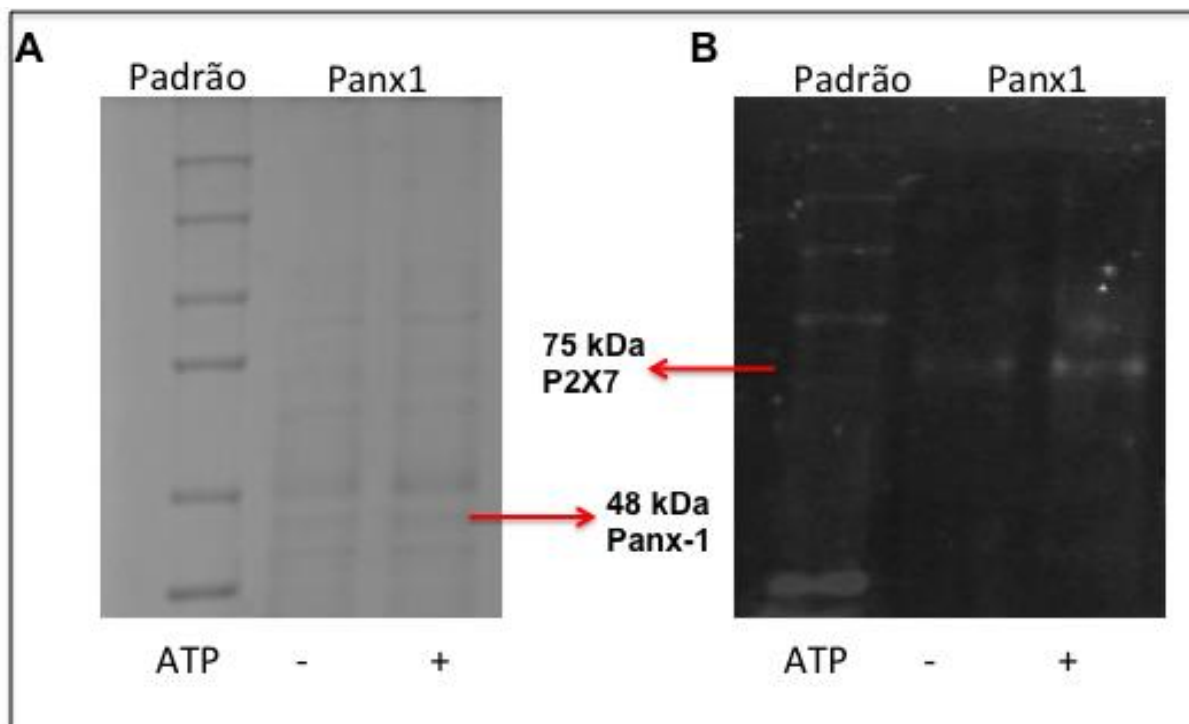


Figura 4.9: SDS-PAGE corado por Coomassie-Blue G (A) e Western Blot (B) em células J774.G8. A) Lane 1: padrão, 2: imunoprecipitados de Panexina-1 de células J774.G8, 3: imunoprecipitados de Panexina-1 + ATP de células J774.G8. (B) Western blot para P2X7 a partir do imunoprecipitado de Panx-1: Lane 1: Padrão, 2: Panexina-1, 3 Panexina-1 ATP. Gel de bis/acrilamida 4-12,5% (A) e membrana de PVDF (B) escaneados no equipamento “Odyssey Scanning Platform” da LICOR. n=3 experimentos independentes.

O mesmo efeito identificado para o TRPV1 na presença de ATP na linhagem U937 foi observado nas células da linhagem N2A. Na Figura 4.10 podemos observar que a adição de ATP diminuiu a expressão e associação do P2X7 ao TRPV1 (Figura 4.10). Ademais, identificamos que nessa linhagem também há associação entre Panexina-1 e P2X7, mas sem modificação quanto a expressão após a ativação com ATP 5 mM. Nesse ensaio, utilizamos o imunoprecipitado com anti-TRPA1 para controle negativo do experimento, visto que as células N2A não apresentavam mRNA de TRPA1 na etapa da RT-PCR.

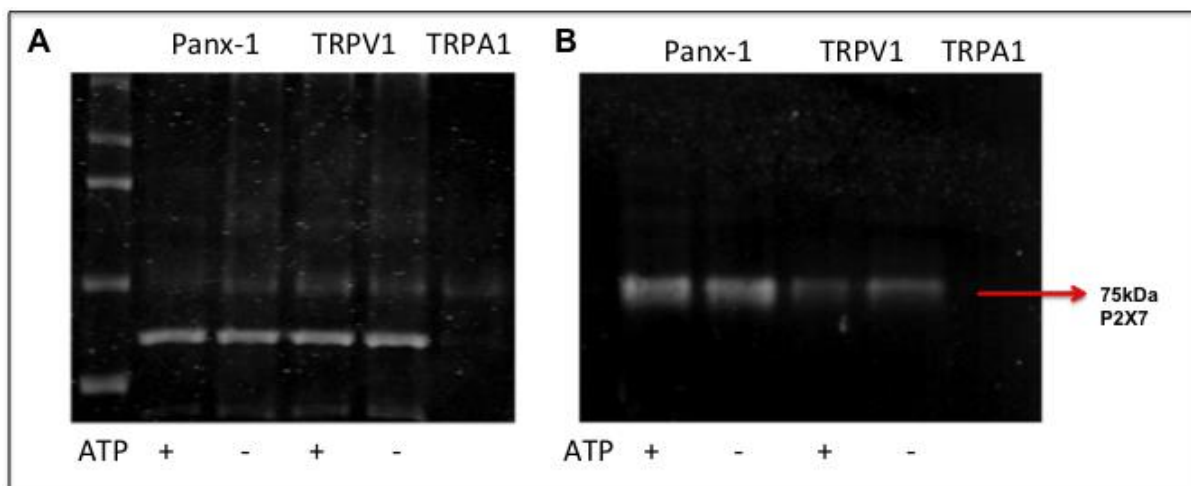
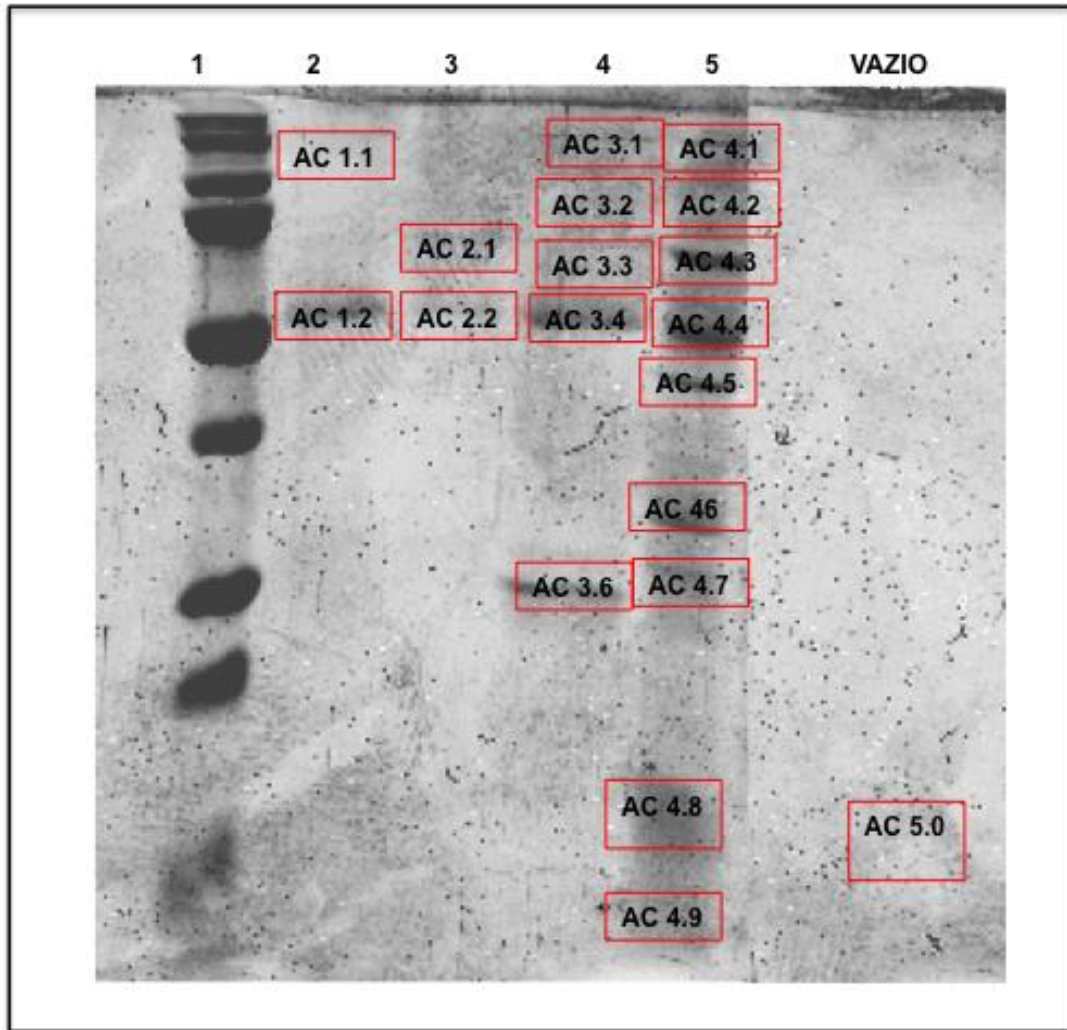


Figura 4.10: SDS-PAGE corado por Coomassie-Blue G (A) e Western Blot para P2X7 (B) em células N2A. (A) *Lane* 1: padrão, 2: imunoprecipitados de Panexina-1 + ATP, 3: de Panexina-1, 4: de TRPV1 + ATP, 5: de TRPV1, 6: de TRPA1. (B) 1: de Panexina-1 + ATP, 2: de Panexina-1, 3: de TRPV1 + ATP, 4: de TRPV1, 5: de TRPA1. Gel de bis/acrilamida 4-12,5% (A) e membrana de PVDF (B) escaneados no equipamento “Odyssey Scanning Platform” da LICOR. n=2 experimentos independentes.

4.4 - Identificação de Proteínas Associadas por Espectrometria de Massas a partir do gel de SDS-PAGE

A fim de identificar as proteínas presentes nos géis de SDS-PAGE, realizamos análises por espectrometria de massas Q-TOF. As bandas indicadas na Figura 4.11 foram cortadas e as proteínas contidas nelas foram purificadas do gel e submetidas à análise, como descrito na metodologia. Nessa tese, demonstraremos apenas os espectros dos peptídeos de maior *score* dos controles negativos e dos positivos para exemplificar como a identificação foi obtida, sendo o *score* calculado com base na probabilidade da identificação observada entre o dado experimental e o banco de dados num evento aleatório. Quanto as demais amostras apresentaremos apenas as tabelas com as proteínas identificadas e aprovadas pelos critérios determinados e descritos no tópico Material e Métodos.

Figura 4.1: Mapa do gel cortado para análise no Q-TOF. Lane 1: padrão, 2:



imunoprecipitados de J774.G8 + ATP (apenas na cultura), 3: J774.G8, 4: U937, 5: J774.G8 + ATP (na cultura e no RIPA) e Vazio representa um pedaço do gel (sem carregamento de amostra) que foi cortado para controle negativo de contaminação, principalmente por queratina. Gel de bis/acrilamida 12,5% escaneados no equipamento “Odyssey Scanning Platform” da LICOR. n=1 experimento independente. A legenda “AC” foi apenas uma identificação para os fragmentos de gel, não apresentando nenhuma informação relevante.

Nas Tabelas seguintes ressaltamos os resultados gerados com as proteínas encontradas nas amostras, sendo a destacada em vermelho a proteína selecionada para exemplificarmos as análises dos peptídeos e espectros gerados. Logo abaixo, temos em destaque um peptídeo único com maior score e partir deste fizemos as análises do espectro (Figura 4.12), a confirmação das séries b e y e o erro gerado nesta confirmação (Figura 4.13).

Na amostra do controle negativo, somente observamos a presença de Tripsina, indicando que não houve contaminação por queratina como podemos observar nas tabelas abaixo geradas pelo *Mascot Server* (Tabelas 4.2 e 4.3). O peptídeo destacado em vermelho representa o de maior *score* e a partir dele o programa analisa o espectro (Figura 4.14), a confirmação das séries *b* e *y* e o erro gerado nesta etapa (Figura 4.15).

Utilizamos amostras de BSA como controle positivo da espectrometria de massas, por já conhecermos a sequência peptídica e a amostra VAZIO (Figura 4.11) para controle negativo de contaminação por queratina. Demonstraremos os resultados gerados pelo Mascot, com a finalidade de exemplificarmos os critérios utilizados para a seleção de cada peptídeo e proteína sugerida pelo banco de dados (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Proteínas encontradas na amostra analisada de BSA (Controle Positivo)

MSDataFile: 20140730-GIOVANI_BSA-padrao1pmol-1ul_01_CID.pkl
 Database: NCBI nr201403231380326893sequences;13525028931residues)

| Protein Hits | Score | Protein Name |
|--------------|-------|--|
| 1351907 | 100 | ALB protein Bos taurus] |
| 74267962 | 99.99 | albumin |
| 229552 | 99.98 | albumin Felis catus] |
| 30962111 | 99.97 | PREDICTED: Serum albumin isoform 1 Orcinus orca] |
| 466076792 | 99.96 | PREDICTED: Serum albumin Callithrix jacchus] |
| 296196349 | 99.95 | albumin Canis lupus familiaris] |
| 3319897 | 99.94 | PREDICTED: Serum albumin Octodon degus] |
| 507705564 | 99.93 | Serum albumin Myotis bairdii] |
| 432092344 | 99.92 | PREDICTED: Serum albumin isoform 1 Mustela putorius uro] |
| 511893385 | 99.91 | |

n=1 experimento.

Logo abaixo temos um peptídeo único com maior *score* destacado em vermelho. A partir desse peptídeo fizemos as análises do espectro (Figura 4.12), a confirmação das séries *b* e *y* e o erro gerado a partir desta confirmação (Figura 4.13). Tais dados, mostrados apenas como exemplo, foram omitidos dos demais resultados e optamos por apresentar apenas em formato de Tabelas as proteínas encontradas em cada amostra.

Tabela 4.3: Sequências dos peptídeos encontrados na amostra de BSA

gi|1351907|Mass:1244|Score:1707|Matches:38(12)|Sequences:29(11)
 RecName:Full=SerumAlbumin;AltName:Full=BSA;AltName:Allergen=BosD6;Flags:Precursor

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Unique | Peptide |
|-------|------------|------------|------------|--------|------|-------|----------|------|--------|---------------------------------|
| 11 | 4.617.477 | 9.214.808 | 9.214.807 | 0.0001 | 0 | 42 | 14 | 1 | | K.AEFVVEVTK.L |
| 12 | 4.642.527 | 9.264.908 | 9.264.861 | 0.0047 | 0 | 24 | 7.4e+02 | 9 | | K.YLYEIAR.R |
| 19 | 5.078.137 | 10.136.128 | 10.136.121 | 0.0008 | 0 | 44 | 8.5 | 1 | | K.QTALVELLK.H |
| 24 | 5.697.550 | 11.374.954 | 11.374.907 | 0.0048 | 0 | 47 | 3.7 | 1 | | K.CCTESLVNR.R |
| 25 | 5.718.655 | 11.417.164 | 11.417.070 | 0.0094 | 1 | 29 | 2.2e+02 | 1 | | K.KQTLVELLK.H |
| 27 | 5.823.212 | 11.626.278 | 11.626.234 | 0.0045 | 0 | 53 | 0.87 | 1 | | K.LVNELTEFAK.T |
| 31 | 4.172.123 | 12.486.151 | 12.486.139 | 0.0012 | 1 | 19 | 2,00E+03 | 2 | | R.FKDLGEEHFK.G |
| 35 | 6.423.635 | 12.827.124 | 12.827.034 | 0.0091 | 0 | 48 | 2.5 | 1 | | R.HPEYAVSVLLR.L |
| 36 | 4.359.084 | 13.047.034 | 13.047.088 | 0.0055 | 0 | 27 | 3.7e+02 | 1 | | K.HLVDEPQNLIK.Q |
| 42 | 7.003.560 | 13.986.974 | 13.986.853 | 0.0121 | 0 | 68 | 0.029 | 1 | | K.TVMENFVAFVDK.C |
| 44 | 7.103.588 | 14.187.030 | 14.186.864 | 0.0166 | 0 | 35 | 56 | 1 | | K.SLHTLFGDELCK.V |
| 46 | 7.223.151 | 14.426.156 | 14.426.347 | 0.0191 | 0 | 78 | 0.0026 | 1 | | K.YICDNQDTISSK.L |
| 47 | 7.223.156 | 14.426.166 | 14.426.347 | 0.0181 | 0 | -29 | 1.8e+02 | 2 | | K.YICDNQDTISSK.L |
| 50 | 7.397.704 | 14.775.262 | 14.775.160 | 0.0103 | 0 | 43 | 6 | 1 | | R.ETYGDMADCCEK.Q |
| 51 | 7.404.050 | 14.787.954 | 14.787.881 | 0.0073 | 0 | 110 | 1.7e-06 | 1 | U | K.LGEYGFQNALIVR.Y |
| 55 | 7.518.160 | 15.016.174 | 15.016.065 | 0.0110 | 0 | 34 | 62 | 1 | | K.EYEATLEECAK.D |
| 56 | 7.564.310 | 15.108.474 | 15.108.355 | 0.0119 | 0 | 95 | 5,00E-05 | 1 | | K.VPQVSTPTLVEVSR.S |
| 59 | 5.115.947 | 15.317.623 | 15.317.738 | 0.0115 | 1 | 58 | 0.23 | 1 | | K.LKECCDKPLLEK.S |
| 61 | 5.188.852 | 15.536.338 | 15.536.457 | 0.0119 | 0 | -39 | 17 | 1 | | K.DDPHACYSTVFDK.L |
| 62 | 7.778.381 | 15.536.616 | 15.536.457 | 0.0160 | 0 | 66 | 0.033 | 1 | | K.DDPHACYSTVFDK.L |
| 63 | 7.888.943 | 15.757.740 | 15.757.603 | 0.0138 | 0 | 87 | 0.00032 | 1 | | K.LKPDPNTLCDEFK.A |
| 64 | 5.262.736 | 15.757.990 | 15.757.603 | 0.0387 | 0 | -54 | 0.55 | 1 | | K.LKPDPNTLCDEFK.A |
| 68 | 5.473.148 | 16.389.226 | 16.389.305 | 0.0079 | 1 | -58 | 0.22 | 1 | | R.KVPQVSTPTLVEVSR.S |
| 69 | 5.473.152 | 16.389.238 | 16.389.305 | 0.0067 | 1 | -59 | 0.19 | 2 | | R.KVPQVSTPTLVEVSR.S |
| 70 | 8.204.827 | 16.389.508 | 16.389.305 | 0.0204 | 1 | 86 | 0.00034 | 1 | | R.KVPQVSTPTLVEVSR.S |
| 72 | 8.629.251 | 17.238.356 | 17.238.273 | 0.0083 | 0 | -66 | 0.037 | 1 | | R.MPCTEDYLSLILNR.L |
| 74 | 8.709.298 | 17.398.450 | 17.398.222 | 0.0228 | 0 | 91 | 0.0001 | 1 | | R.MPCTEDYLSLILNR.L Oxidation(M) |
| 75 | 8.743.669 | 17.467.192 | 17.466.978 | 0.0215 | 0 | 48 | 2.1 | 1 | | K.YNGVFQECQAEDK.G |
| 76 | 5.838.890 | 17.486.452 | 17.486.553 | 0.0101 | 0 | 49 | 1.3 | 1 | | K.ECCHGDLLECADDR.A |
| 81 | 6.276.455 | 18.799.147 | 18.799.138 | 0.0008 | 0 | -23 | 6.6e+02 | 1 | | R.RPCFSALTPDETYVPK.A |
| 82 | 9.409.757 | 18.799.368 | 18.799.138 | 0.0230 | 0 | 26 | 3.6e+02 | 1 | | R.RPCFSALTPDETYVPK.A |
| 83 | 6.303.130 | 18.879.172 | 18.879.195 | 0.0024 | 0 | -46 | 3.1 | 1 | | R.HPYFYAPPELLYYANK.Y |
| 84 | 9.449.816 | 18.879.486 | 18.879.195 | 0.0291 | 0 | 47 | 2.5 | 1 | | R.HPYFYAPPELLYYANK.Y |
| 86 | 6.346.261 | 19.008.565 | 19.008.625 | 0.0060 | 1 | 99 | 1.6e-05 | 1 | | R.NECFLSHKDDSPDLPK.L |
| 89 | 6.432.696 | 19.267.870 | 19.267.910 | 0.0040 | 1 | 103 | 5.3e-06 | 1 | | K.CCAADDKEACFAVEGPK.L |
| 91 | 9.784.974 | 19.549.802 | 19.549.524 | 0.0279 | 0 | 50 | 1.3 | 1 | | K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D |
| 94 | 8.200.655 | 24.571.747 | 24.571.733 | 0.0013 | 1 | 106 | 2.5e-06 | 1 | | K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N |
| 95 | 12.296.090 | 24.572.034 | 24.571.733 | 0.0301 | 1 | -33 | 50 | 1 | | K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N |

n=1 experimento

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LGEYGFQNALIVR**

Found in **gil1351907** in **NCBIInr**, RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor

Match to Query 51: 1478.795448 from(740.405000,2+) intensity(2905.2000) index(49)

Data file 20140730-GIOVANI_BSA-padrao 1pmol-1ul_01_CID.pkl

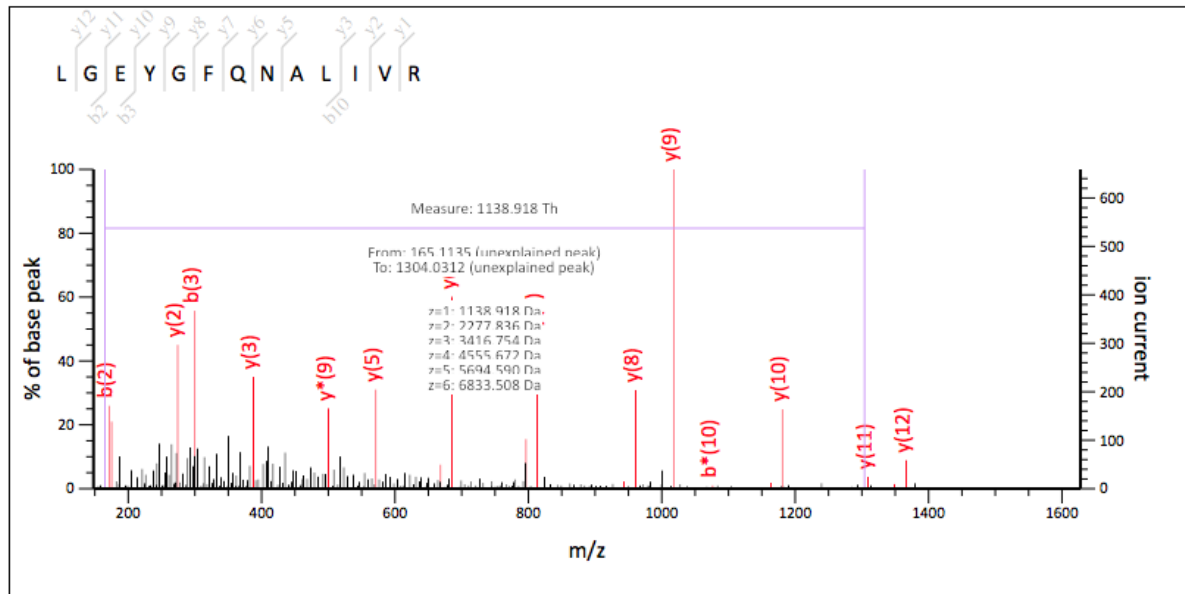


Figura 4.12: Espectro gerado pelo Mascot Server para o controle positivo BSA. O peptídeo selecionado para gerar esse espectro apresentou score acima de 42 (score=110) e conseqüentemente $p < 0,005$. A seqüência peptídica selecionada, está destacada em vermelho: LGEYGFNALIVR. n=1 experimento.

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1478.7881
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)
Ions Score: 110 **Expect:** 1.7e-06
Matches : 22/108 fragment ions using 28 most intense peaks ([help](#))

| # | b | b ⁺⁺ | b* | b ⁺⁺⁺ | b ⁰ | b ⁰⁺⁺ | Seq. | y | y ⁺⁺ | y* | y ⁺⁺⁺ | y ⁰ | y ⁰⁺⁺ | # |
|----|-----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|
| 1 | 114.0913 | 57.5493 | | | | | L | | | | | | | 13 |
| 2 | 171.1128 | 86.0600 | | | | | G | 1366.7114 | 683.8593 | 1349.6848 | 675.3461 | 1348.7008 | 674.8540 | 12 |
| 3 | 300.1554 | 150.5813 | | | 282.1448 | 141.5761 | E | 1309.6899 | 655.3486 | 1292.6634 | 646.8353 | 1291.6793 | 646.3433 | 11 |
| 4 | 463.2187 | 232.1130 | | | 445.2082 | 223.1077 | Y | 1180.6473 | 590.8273 | 1163.6208 | 582.3140 | | | 10 |
| 5 | 520.2402 | 260.6237 | | | 502.2296 | 251.6185 | G | 1017.5840 | 509.2956 | 1000.5574 | 500.7824 | | | 9 |
| 6 | 667.3086 | 334.1579 | | | 649.2980 | 325.1527 | F | 960.5625 | 480.7849 | 943.5360 | 472.2716 | | | 8 |
| 7 | 795.3672 | 398.1872 | 778.3406 | 389.6740 | 777.3566 | 389.1819 | Q | 813.4941 | 407.2507 | 796.4676 | 398.7374 | | | 7 |
| 8 | 909.4101 | 455.2087 | 892.3836 | 446.6954 | 891.3995 | 446.2034 | N | 685.4355 | 343.2214 | 668.4090 | 334.7081 | | | 6 |
| 9 | 980.4472 | 490.7272 | 963.4207 | 482.2140 | 962.4367 | 481.7220 | A | 571.3926 | 286.1999 | 554.3661 | 277.6867 | | | 5 |
| 10 | 1093.5313 | 547.2693 | 1076.5047 | 538.7560 | 1075.5207 | 538.2640 | L | 500.3555 | 250.6814 | 483.3289 | 242.1681 | | | 4 |
| 11 | 1206.6154 | 603.8113 | 1189.5888 | 595.2980 | 1188.6048 | 594.8060 | I | 387.2714 | 194.1394 | 370.2449 | 185.6261 | | | 3 |
| 12 | 1305.6838 | 653.3455 | 1288.6572 | 644.8322 | 1287.6732 | 644.3402 | V | 274.1874 | 137.5973 | 257.1608 | 129.0840 | | | 2 |
| 13 | | | | | | | R | 175.1190 | 88.0631 | 158.0924 | 79.5498 | | | 1 |

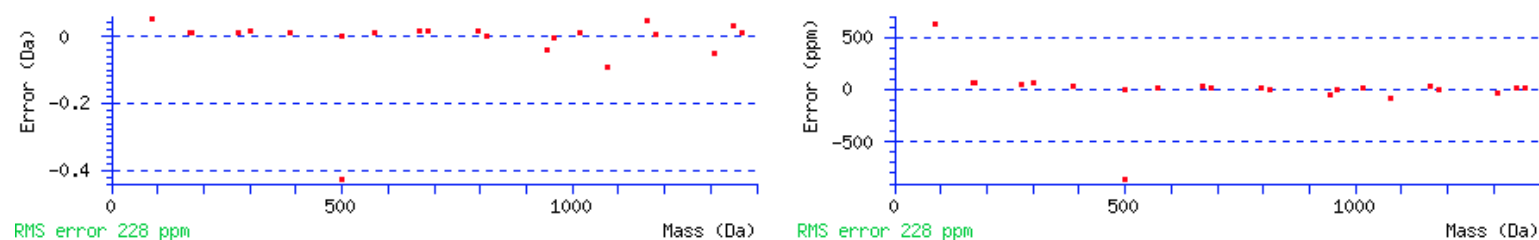


Figura 4.13: Sequenciamento das séries b e y e o erro gerado (Controle Positivo - BSA). Demonstração dos íons utilizados para gerar o espectro. Os íons gerados e confirmados estão destacados em vermelho, demonstrando que a comparação entre os valores de m/z dos fragmentos preditos e dos experimentais estão de acordo. n=1 experimento.

Na amostra do controle negativo somente observamos a presença de Tripsina, indicando que não houve contaminação por queratina (Tabelas 4.4 e 4.5).

Tabela 4.4: Proteína encontrada na amostra Controle Negativo

```
MSDataFile: 20140731_Ana_ac-7-0_CID.pkl
Database: NCBI nr20140323 (38032689 sequences; 1352502893 residues)
ProteinHits: gi|136429 RecName:Full=Trypsin;Flags:Precursor
```

n=1 experimento.

Tabela 4.5: Sequências dos peptídeos encontrados na amostra Controle Negativo

```
gi|136429 Mass:25078 Score:98 Matches:2(0) Sequences:2(0)
RecName:Full=Trypsin;Flags:Precursor
```

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Unique | Peptide |
|-------|-----------|------------|------------|--------|------|-------|--------|------|--------|----------------|
| 2 | 4.217.595 | 8.415.044 | 8.415.022 | 0.0023 | 0 | 48 | 3 | 1 | U | R.VATVSLPR.S |
| 9 | 5.232.892 | 10.445.638 | 10.445.564 | 0.0075 | 0 | 50 | 2.3 | 1 | U | K.LSSPATLNSR.V |

n=1 experimento.

O peptídeo destacado em vermelho, representa o de maior *score* e a partir dele, analisamos o espectro gerado (Figura 4.10), a confirmação das séries b e y e o erro gerado nesta confirmação (Figura 4.11).

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LSSPATLNSR**

Found in **gil136429** in **NCBIInr**, RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

Match to Query 9: 1044.563848 from(523.289200,2+) intensity(1214.0000) index(1)

Data file 20140731_Ana_ac-7-0_CID.pkl

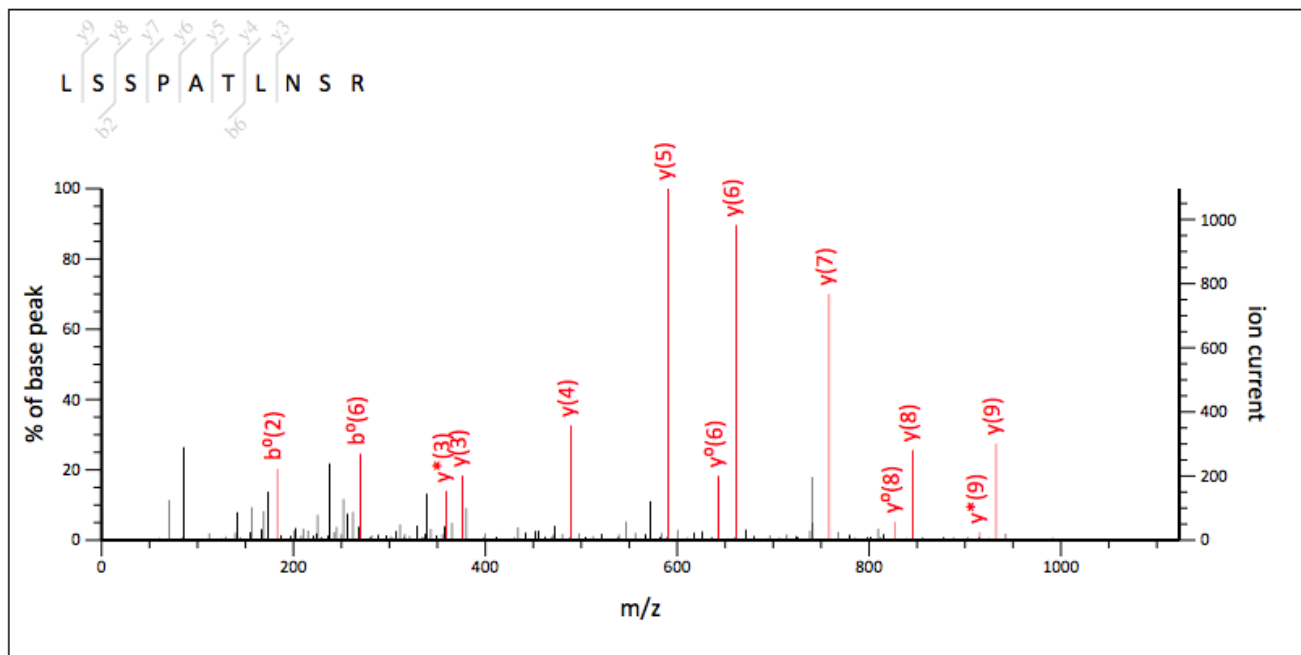


Figura 4.14: Espectro gerado pelo Mascot Server para o controle negativo (VAZIO). Somente foi identificado a presença da tripsina. O peptídeo selecionado para gerar esse espectro apresentou score acima de 42 (score=50) e consequentemente $p < 0,005$. A sequência peptídica selecionada, está destacada em vermelho: LSSPATLNSR. n=1 experimento.

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1044.5564
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)
Ions Score: 50 **Expect:** 2.3
Matches : 15/90 fragment ions using 20 most intense peaks ([help](#))

| # | b | b ⁺⁺ | b* | b ⁺⁺⁺ | b ⁰ | b ⁰⁺⁺ | Seq. | y | y ⁺⁺ | y* | y ⁺⁺⁺ | y ⁰ | y ⁰⁺⁺ | # |
|----|----------|-----------------|----------|------------------|----------------|------------------|------|----------|-----------------|----------|------------------|----------------|------------------|----|
| 1 | 114.0913 | 57.5493 | | | | | L | | | | | | | 10 |
| 2 | 201.1234 | 101.0653 | | | 183.1128 | 92.0600 | S | 932.4796 | 466.7434 | 915.4530 | 458.2302 | 914.4690 | 457.7381 | 9 |
| 3 | 288.1554 | 144.5813 | | | 270.1448 | 135.5761 | S | 845.4476 | 423.2274 | 828.4210 | 414.7141 | 827.4370 | 414.2221 | 8 |
| 4 | 385.2082 | 193.1077 | | | 367.1976 | 184.1024 | P | 758.4155 | 379.7114 | 741.3890 | 371.1981 | 740.4050 | 370.7061 | 7 |
| 5 | 456.2453 | 228.6263 | | | 438.2347 | 219.6210 | A | 661.3628 | 331.1850 | 644.3362 | 322.6717 | 643.3522 | 322.1797 | 6 |
| 6 | 557.2930 | 279.1501 | | | 539.2824 | 270.1448 | T | 590.3257 | 295.6665 | 573.2991 | 287.1532 | 572.3151 | 286.6612 | 5 |
| 7 | 670.3770 | 335.6921 | | | 652.3665 | 326.6869 | L | 489.2780 | 245.1426 | 472.2514 | 236.6293 | 471.2674 | 236.1373 | 4 |
| 8 | 784.4199 | 392.7136 | 767.3934 | 384.2003 | 766.4094 | 383.7083 | N | 376.1939 | 188.6006 | 359.1674 | 180.0873 | 358.1833 | 179.5953 | 3 |
| 9 | 871.4520 | 436.2296 | 854.4254 | 427.7163 | 853.4414 | 427.2243 | S | 262.1510 | 131.5791 | 245.1244 | 123.0659 | 244.1404 | 122.5738 | 2 |
| 10 | | | | | | | R | 175.1190 | 88.0631 | 158.0924 | 79.5498 | | | 1 |

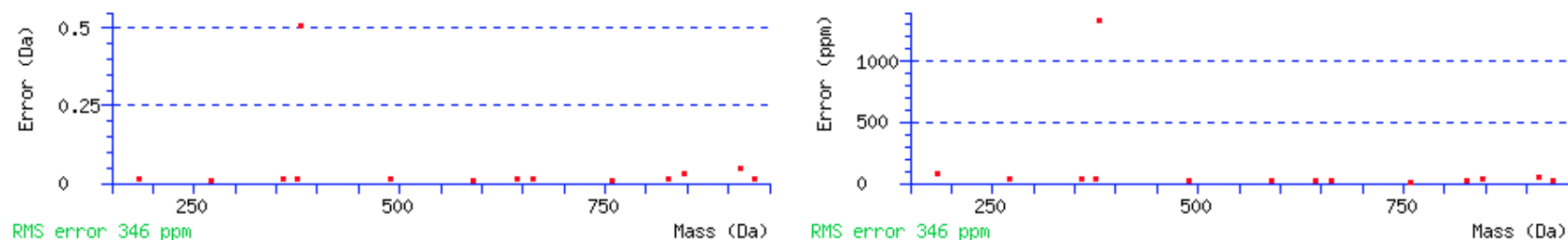


Figura 4.15: Sequenciamento das séries b e y e o erro gerado (Controle Negativo - VAZIO). Demonstração dos íons utilizados para gerar o espectro. Os íons gerados e confirmados estão destacados em vermelho, demonstrando que a comparação entre os valores de m/z dos fragmentos preditos e dos experimentais estão de acordo. n=1 experimento.

Como relatado anteriormente, nos resultados seguintes, demonstraremos apenas as tabelas contendo as proteínas encontradas em cada amostra. Portanto, não mostraremos os espectros gerados por cada peptídeo analisado pelo *Mascot*. Podemos observar nas Tabelas abaixo, que de fato a falta do ATP 5 mM diminui a quantidade de proteínas não formadoras de poro associadas fisicamente ao P2X7R (Tabela 4.5 e Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Proteínas encontradas na célula J774.G8.

| Protein Hits | Accession | Description |
|--------------|--|--|
| 403296723 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC101046470 [Saimiri boliviensis boliviensis] |
| 537228400 | Intermediate filament protein containing protein | [Cricetulus griseus] |
| 395532556 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC100921792 [Sarcophilus harrisii] |
| 395835409 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC100949889 [Otolemur garnettii] |
| 472382549 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC101365636 [Odobenus rosmarus divergens] |
| 89242507 | Immunoglobulin gamma1 constant region, partial | [Oryctolagus cuniculus] |

n=1 experimento.

Tabela 4.7: Proteínas encontradas na célula J774.G8 + ATP (apenas na cultura).

| Protein Hits | Accession | Description |
|--------------|--|--|
| 537228400 | Intermediate filament protein containing protein | [Cricetulus griseus] |
| 472382549 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC101365636 [Odobenus rosmarus divergens] |
| 395835409 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC100949889 [Otolemur garnettii] |
| 395532556 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC100921792 [Sarcophilus harrisii] |
| 403296723 | PREDICTED: Uncharacterized protein | LOC101046470 [Saimiri boliviensis boliviensis] |
| 2136983 | Ig gamma heavy chain constant region | [Rabbit] (fragment) |
| 109278 | Ig heavy chain V-A1 region | [RVH122] [Rabbit] (fragment) |
| 109280 | Ig heavy chain V-A1 region | [RVH137] [Rabbit] (fragment) |
| 27373451 | Antibody variable domain | [Oryctolagus cuniculus] |

n=1 experimento.

No entanto, a presença do ATP 5 mM foi capaz de aumentar a associação entre o P2X7R e outras proteínas não formadoras de poro. Podemos observar esse efeito na amostra de J774.G8 imunoprecipitada com anti-P2X7 e tratada com ATP 5 mM, durante todo o processo (no meio de cultura e no tampão RIPA) (Tabela 4.7).

Tabela 4.8: Proteínas encontradas na célula J774.G8 + ATP (na cultura e no tampão RIPA)

| | | |
|-------------|-----------|--|
| ProteinHits | 551295 | PyruvateKinase[MusMusculus] |
| | 55291 | UnnamedProteinProduct[MusMusculus] |
| | 7106439 | TubulinBeta-5Chain[MusMusculus] |
| | 6678469 | TubulinAlpha-1Chain[MusMusculus] |
| | 2623222 | ATPSynthaseBeta-subunit[MusMusculus] |
| | 124430500 | TubulinBeta-1Chain[MusMusculus] |
| | 3212348 | ChainH,DielsAlderCatalyticAntibodyGermlinePrecursor |
| | 309319 | HeatShockProtein70Cognate[MusMusculus] |
| | 1304157 | 78kDaGlucose-regulatedProtein[MusMusculus] |
| | 40556608 | HeatShockProteinHSP90-beta[MusMusculus] |
| | 13385998 | HeatShockProtein75kDa,MitochondrialPrecursor[MusMusculus] |
| | 26324736 | UnnamedProteinProduct[MusMusculus] |
| | 148694358 | MyosinVa,IsoformCRA_a[MusMusculus] |
| | 12852157 | UnnamedProteinProduct[MusMusculus] |
| | 49868 | Put.Beta-actin[aa27-375][MusMusculus] |
| | 49864 | Alpha-actin[aa40-375][MusMusculus] |
| | 30425250 | Beta-actin-likeProtein2[MusMusculus] |
| | 809561 | Gamma-actin[MusMusculus] |
| | 74178273 | UnnamedProteinProduct[MusMusculus] |
| | 387090 | Alpha-cardiacActin,partial[MusMusculus] |
| | 34391479 | GagProtein[MusMusculus] |
| | 695638 | M-TAXREB107[MusMusculus] |
| | 387422 | MalateDehydrogenase[MusMusculus] |
| | 387404 | LactateDehydrogenase,partial[MusMusculus] |
| | 125138 | RecName:Full=Igkappa-b4ChainCRegion |
| | 513137422 | ChainL,CrystalStructureOfBovineAntibodyB1v1h12WithUltralongCdrH3 |
| | 556310 | Spermatid-specific,partial[MusMusculusDomesticus] |
| | 3097244 | RibosomalProteinS14[MusMusculus] |
| | 51301 | UnnamedProteinProduct[MusMusculus] |
| | 4504301 | HistoneH4[HomoSapiens] |

n=1 experimento.

Tabela 4.9: Proteínas encontradas na célula U937

| | | |
|-------------|----------|--|
| ProteinHits | 348239 | UnnamedProteinProduct[HomoSapiens] |
| | 10334541 | ImmunoglobulinHeavyChain[HomoSapiens] |
| | 37492 | Alpha-tubulin[HomoSapiens] |
| | 28590 | UnnamedProteinProduct[HomoSapiens] |
| | 23712 | MyoblastAntigen24.1D5[HomoSapiens] |
| | 29446 | UnnamedProteinProduct[HomoSapiens] |
| | 182424 | Alpha-fibrinogenPrecursor[HomoSapiens] |
| | 494066 | ChainA,Three-DimensionalStructureOfClassPIIGlutathioneS-Transferase FromHumanPlacentaInComplexWithS-HexylglutathioneAt2.8AngstromsResolution |
| | 5822569 | ChainA,CrystalStructureOfHgstp1-1[v104]ComplexedWithTheSshConjugateOf(+)-Anti-Bpde |
| | 28590 | UnnamedProteinProduct[HomoSapiens] |

n=1 experimento.

Com o objetivo de identificar as proteínas que também poderiam estar interagindo com a Panexina-1 e se essa interação era dependente de ATP, realizamos ensaios de imunoprecipitação com anticorpo anti-panexina-1 e após confecção e coloração do gel de SDS-PAGE com Comassie-BlueG, cortamos as bandas do gel (indicadas na Figura 4.16) e submetemos à análise por espectrometria de massas.

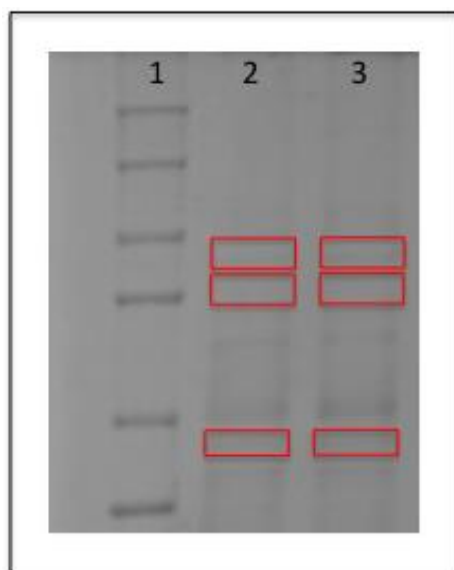


Figura 4.16: Mapa do gel cortado para análise no Q-TOF. Lane 1: padrão, 2: imunoprecipitados de Panexina-1, 3: imunoprecipitados de Panexina-1 + ATP 5 mM. Gel de bis/acrilamida 4-12,5%. n=1 experimento.

Da mesma forma que o ocorrido com as amostras imunoprecipitadas com anti-P2X7 e tratadas com ATP, as células J774.G8 tratadas com ATP 5mM e imunoprecipitadas com anti-panexina-1 também apresentaram uma quantidade maior de proteínas não formadoras de poro associadas à panexina-1 quando comparado com as células não tratadas com ATP (Tabela 4.9 e 4.10).

Tabela 4.10: Proteínas encontradas em células J774.G8 imunoprecipitadas com Panexina-1.

| prot_acc | prot_desc |
|--------------|--|
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 7915 | EF-1-alpha [Drosophila melanogaster] |
| gi 7915 | EF-1-alpha [Drosophila melanogaster] |
| gi 1706590 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha; AltName: Full=Sporophyte-specific EF-1-alpha [Porphyra purpurea] |
| gi 1706590 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha; AltName: Full=Sporophyte-specific EF-1-alpha [Porphyra purpurea] |
| gi 223998706 | predicted protein [Thalassiosira pseudonana [CCMP1335]] |
| gi 223998706 | predicted protein [Thalassiosira pseudonana [CCMP1335]] |
| gi 3122069 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha-1 [Moneuplotes crassus] |
| gi 3122069 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha-1 [Moneuplotes crassus] |

n=1 experimento.

Tabela 4.11: Proteínas encontradas em células J774.G8, tratadas com ATP, imunoprecipitadas com Panexina-1.

| prot_acc | prot_desc |
|--------------|--|
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 999627 | Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure of Porcine Epsilon-Trypsin |
| gi 223998706 | predicted protein [Thalassiosira pseudonana [CCMP1335]] |
| gi 223998706 | predicted protein [Thalassiosira pseudonana [CCMP1335]] |
| gi 223998706 | predicted protein [Thalassiosira pseudonana [CCMP1335]] |
| gi 508737304 | elongation factor 1 alpha, partial [Detonula confervacea] |
| gi 508737304 | elongation factor 1 alpha, partial [Detonula confervacea] |
| gi 508737304 | elongation factor 1 alpha, partial [Detonula confervacea] |
| gi 672558565 | CorA family Mg2+ transporter protein, partial [Toxoplasma gondii [VAND]] |
| gi 672558565 | CorA family Mg2+ transporter protein, partial [Toxoplasma gondii [VAND]] |
| gi 1706590 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha; AltName: Full=Sporophyte-specific EF-1-alpha [Porphyra purpurea] |
| gi 1706590 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha; AltName: Full=Sporophyte-specific EF-1-alpha [Porphyra purpurea] |
| gi 3122069 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha-1 [Moneuplotes crassus] |
| gi 3122069 | RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha-1 [Moneuplotes crassus] |

n=1 experimento.

4.5 - Identificação de Proteínas Associadas por Espectrometria de Massas a partir da amostra em solução

Como mencionado na metodologia, algumas amostras foram preparadas para espectrometria de massas a partir da solução, a fim de analisarmos o máximo possível de proteínas contidas na amostra, sem que houvesse o risco de eventuais perdas por conta da manipulação do gel. Na Tabela abaixo observamos que as células U937 imunoprecipitadas com anti-P2X7R apresentavam diversas proteínas não formadoras de poro, associadas ao P2X7R, mesmo quando não ativadas por ATP 5 mM (Tabela 4.11 e 4.12).

Tabela 4.12: Proteínas encontradas em células U937 imunoprecipitadas com P2X7R.

| |
|---|
| Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 |
| Immunoglobulin G-binding protein G OS=Streptococcus sp. group G GN=spg PE=1 SV=1 |
| Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 |
| Histone H2B 1.2 OS=Xenopus laevis PE=1 SV=2 |
| 60S ribosomal protein L18 OS=Bos taurus GN=RPL18 PE=2 SV=3 |
| Nucleophosmin OS=Bos taurus GN=NPM1 PE=2 SV=1 |
| 60S ribosomal protein L7 OS=Bos taurus GN=RPL7 PE=2 SV=1 |
| 78 kDa glucose-regulated protein OS=Bos taurus GN=HSPA5 PE=2 SV=1 |
| Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 |
| 60S ribosomal protein L27a OS=Bos taurus GN=RPL27A PE=2 SV=3 |
| Chaperone protein DnaK OS=Pelodictyon luteolum (strain DSM 273) GN=dnaK PE=3 SV=1 |
| Stress-70 protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=HSPA9 PE=2 SV=1 |
| Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 |
| Hemoglobin subunit zeta OS=Homo sapiens GN=HBZ PE=1 SV=2 |
| Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 |
| Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 |
| 60S ribosomal protein L23a OS=Bos taurus GN=RPL23A PE=2 SV=1 |
| 60S ribosomal protein L17 OS=Bos taurus GN=RPL17 PE=2 SV=3 |
| Hemoglobin subunit epsilon OS=Alouatta belzebul GN=HBE1 PE=2 SV=2 |
| 40S ribosomal protein S6 OS=Bos taurus GN=RPS6 PE=2 SV=1 |
| Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L6 OS=Chinchilla lanigera GN=RPL6 PE=2 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L13 OS=Gallus gallus GN=RPL13 PE=2 SV=2 |
| Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 |
| 40S ribosomal protein S14a OS=Anopheles gambiae GN=RpS14a PE=3 SV=2 |
| 40S ribosomal protein S7 OS=Bos taurus GN=RPS7 PE=2 SV=1 |

n=1 experimento.

Tabela 4.13: Proteínas encontradas em células U937 imunoprecipitadas com P2X7R ativadas por ATP 5mM.

| |
|--|
| Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 |
| Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 |
| Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 |
| Immunoglobulin G-binding protein G OS=Streptococcus sp. group G GN=spg PE=1 SV=1 |
| Histone H2B 1.2 OS=Xenopus laevis PE=1 SV=2 |
| Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 |
| Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 |
| Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 |
| 60S ribosomal protein L18 OS=Bos taurus GN=RPL18 PE=2 SV=3 |
| Histone H1.2 OS=Bos taurus GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 |
| Luminal-binding protein OS=Spinacia oleracea GN=HSC70 PE=2 SV=1 |
| Heat shock cognate 70 kDa protein 1 OS=Dictyostelium discoideum GN=hspB PE=1 SV=2 |
| 40S ribosomal protein S8 OS=Bos taurus GN=RPS8 PE=2 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L14 OS=Bos taurus GN=RPL14 PE=2 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L13 OS=Gallus gallus GN=RPL13 PE=2 SV=2 |
| Nucleophosmin OS=Bos taurus GN=NPM1 PE=2 SV=1 |
| Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 |
| 60S ribosomal protein L17 OS=Bos taurus GN=RPL17 PE=2 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L12-A OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=RPL12A PE=1 SV=1 |
| Putative 60S ribosomal protein L13a protein RPL13AP3 OS=Homo sapiens GN=RPL13AP3 PE=5 SV=1 |
| Hemoglobin subunit zeta OS=Homo sapiens GN=HBZ PE=1 SV=2 |
| 60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 |
| 60S ribosomal protein L19 OS=Bos taurus GN=RPL19 PE=2 SV=1 |

n=1 experimento.

4.6 - Identificação de Proteínas Associadas por Microscopia de Fluorescência

Nossos resultados de proteômica (Western Blot e MS/MS), indicam que algumas proteínas formadoras de poro podem estar fisicamente associadas ao P2X7R e que essa associação é dependente do tipo celular em que essas proteínas se encontram. Em virtude desse dado, analisamos também se essa interação poderia ser observada através de ensaios de imunocitoquímica por microscopia de confocal.

Iniciamos o ensaio em células N2A, utilizando anticorpos primários para P2X7R, Panexina-1 ou Conexina-43. Como descrito na metodologia, as células fixadas foram incubadas na presença de anticorpos anti-P2X7R e Panexina-1 juntos ou Conexina-43 ou IgG de cabra (controle negativo) separados. Na Figura 4.17A, podemos observar a presença de Conexina-43 de forma mais intensa nas regiões de contato célula-célula, enquanto que o P2X7R e a Panexina-1 estão distribuídos mais uniformemente na célula (Figura 4.17B e C). Ao contrário do esperado, visto que observamos co-precipitação dessas proteínas no Western Blot, obtivemos pouca sobreposição entre P2X7R e Panexina-1 (Figura 4.17D). Observamos apenas cerca de 2 pontos de sobreposição por campo, num total de 5 campos diferentes. Na Figura 4.17E, incubamos uma IgG de cabra (inespecífica) junto com o anticorpo secundário (Doyle, Morais et al.) afim de demonstrarmos que os anticorpos utilizados apresentavam pouca inespecificidade nos garantindo uma alta confiabilidade no dado obtido (Figura 4.17E).

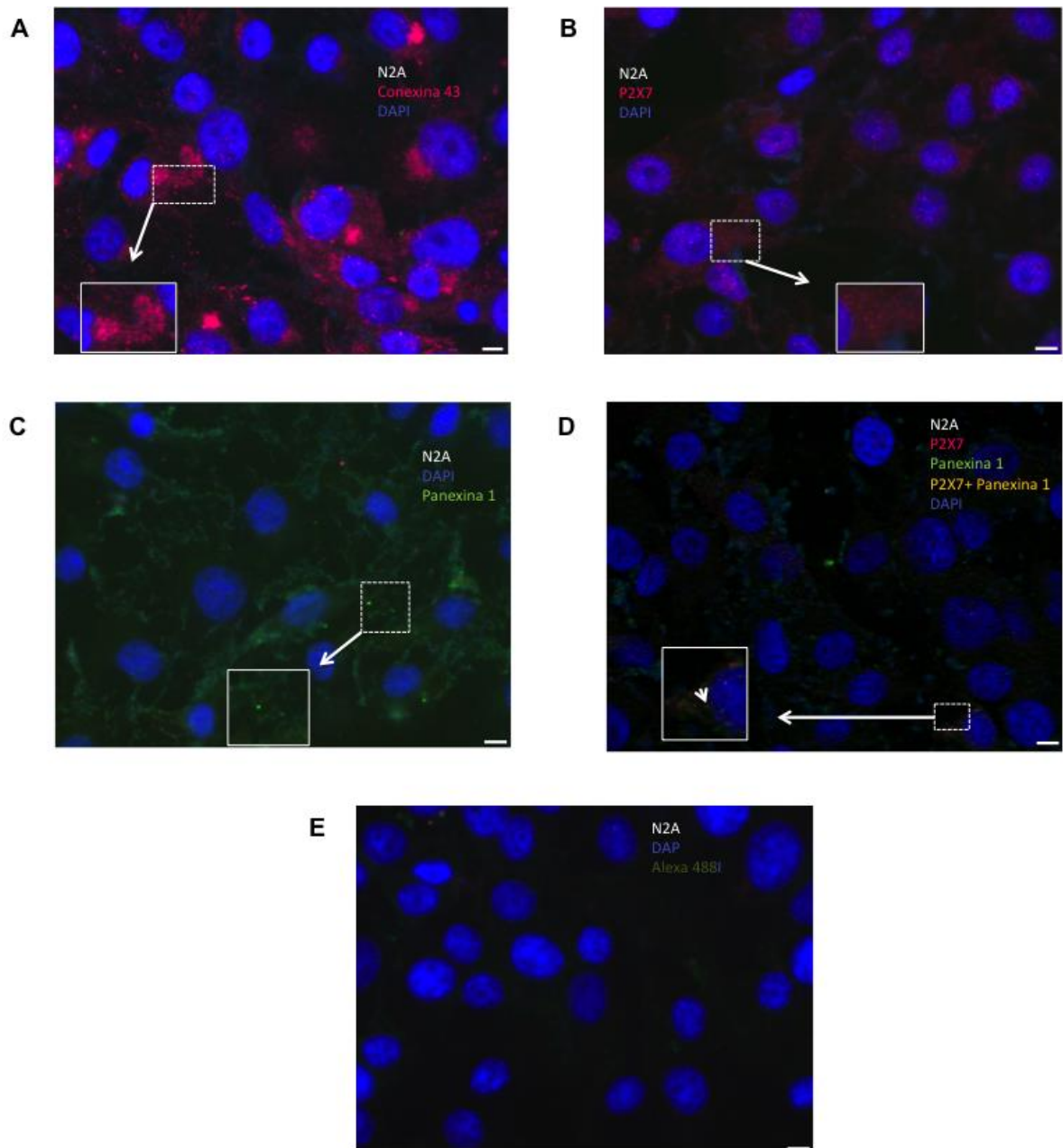


Figura 4.17: Análise por microscopia de confocal de células N2A. (A) anti-Conexina-43 sozinho; (B) anti-P2X7 sozinho; (C) anti-Panexina sozinho; (D) anti-P2X7 e anti-Panexina-1 juntos; (E) controle negativo. Anticorpos primários foram utilizados na concentração 1:100 (P2X7 e Panexina-1); 1:800 (Conexina-43); 1:200 IgG de cabra enquanto que os secundários foram utilizados a 1:200. DAPI = 1µg/mL. n= 2 experimentos independentes em duplicata, onde 5 campos de cada duplicata foram fotografados. Barra de escala corresponde a 5 µm.

Em seguida, nos indagamos se o mesmo perfil seria observado nas células J774.G8, já que esta também apresentava co-precipitação com Panexina-1. Contudo, o ensaio de confocal nos revelou que de fato há pouca associação física entre Panexina-1 e P2X7R por campo (Figura 4.18B), como observado nas células N2A. No entanto, quando se tratava de uma possível associação entre P2X7 e TRPA1, não observamos, no confocal, nenhuma associação nos campos analisados (Figura 4.18C). Da mesma forma que na célula N2A, a Conexina-43 mostrou-se mais presente nas regiões de contato célula-célula (Figura 4.18A).

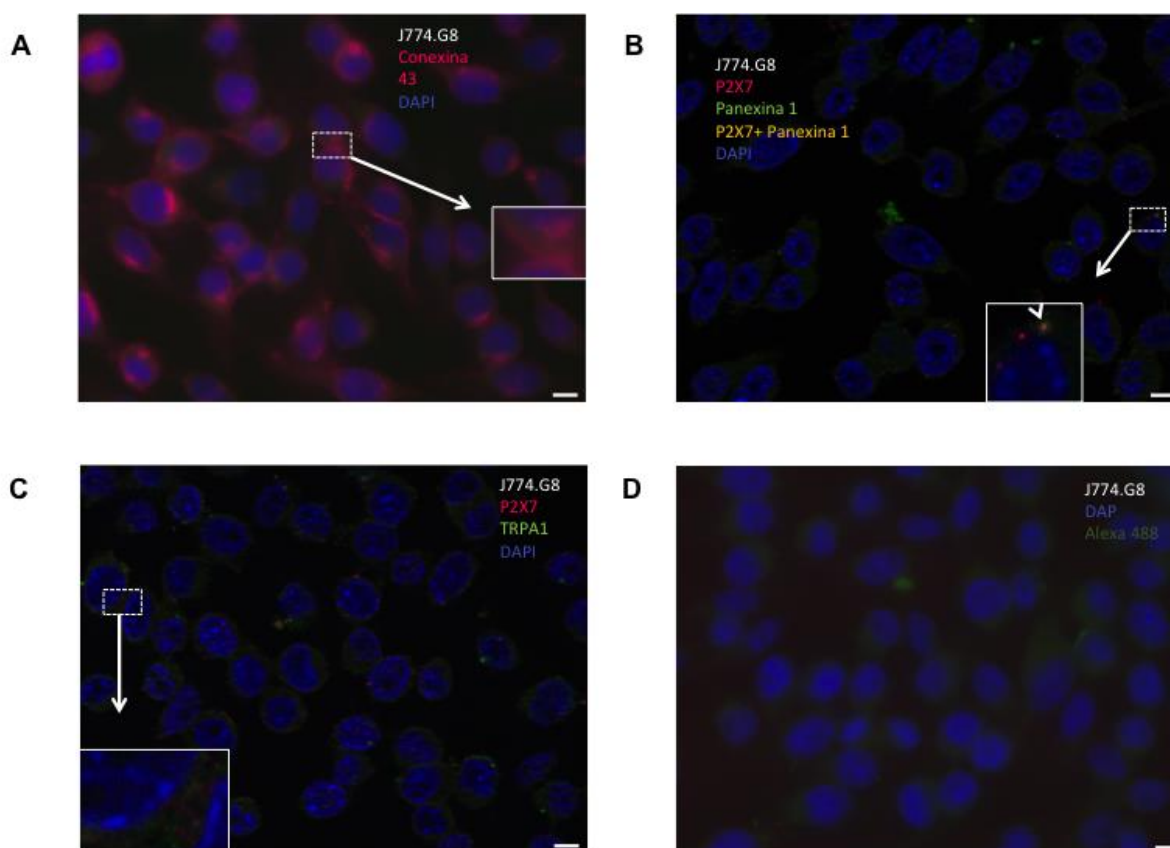


Figura 4.18: Análise por microscopia de confocal de células J774.G8. (A) anti-Conexina-43 sozinho; (B) anti-P2X7 e anti-Panexina-1 juntos; (C) anti-P2X7 e anti-TRPA1 juntos; (D) controle negativo. Anticorpos primários foram utilizados na concentração 1:100 (P2X7 e TRPA1); 1:800 (Conexina-43); 1:200 IgG de cabra enquanto que os secundários foram utilizados a 1:200. DAPI = 1µg/mL. n= 2 experimentos independentes em duplicata, onde 5 campos de cada duplicata foram fotografados. Barra de escala corresponde a 5 µm.

4.7 - Identificação de Proteínas Associadas por Ensaio de Captação de Corante

Conduzimos ensaios farmacológicos para demonstrar uma possível interação funcional entre o P2X7R e as proteínas identificadas até o momento (TRPV1, CX-43 e TRPA1). Desenvolvemos ensaios de captação do corante *YO-PRO-1* nas células BMDM de C57BL/6, J774.G8, HEK-293T e HEK-293-hP2X7R, após tratamentos com agonistas e antagonistas das proteínas destacadas. Esse ensaio nos permite verificar a funcionalidade do P2X7R e das proteínas, através da permeabilização a corantes de baixo peso molecular, corantes estes que inicialmente não seriam capazes de passar pela membrana plasmática, a não ser que houvesse abertura de poros. Neste estudo utilizamos a sonda fluorescente *YO-PRO-1* (peso molecular de 629 Da), a qual é muito pouco permeável à membrana plasmática, como marcador de abertura de poro. Uma vez que o poro ativado por ATP é formado, a sonda é capaz de entrar na célula, se ligar ao DNA e emitir fluorescência.

Utilizamos duas metodologias diferentes para evidenciar esse fenômeno: análise por microscopia de fluorescência e por leitor de placa. A partir da microscopia de fluorescência obtivemos imagens a cada 30 segundos durante os 30 minutos totais de registro, gerando vídeos que mostram o comportamento das células ao longo do tempo de exposição aos diferentes agonistas e antagonistas das proteínas selecionadas e do P2X7R.

A partir dos nossos resultados anteriores, focamos nossos experimentos de captação de corante nas seguintes proteínas: TRPV1, TRPA1, panexina-1, conexinas, além do próprio P2X7R. Com intuito de observar uma associação, não necessariamente física, dessas proteínas com P2X7, utilizamos os principais inibidores já descritos para cada proteína juntamente com o ATP, agonista principal do P2X7R. O vermelho de rutênio ou ruthenium red (RR), descrito nas figuras a seguir, é conhecido por inibir tanto TRPV1 quanto TRPA1, além deste utilizamos também o inibidor seletivo para TRPA1, o HC300031. Enquanto que para as conexinas e panexina-1, utilizamos o inibidor carbenoxolone na concentração de 10 μ M e 100 μ M, respectivamente.

Como descrito anteriormente, realizamos os ensaios de captação de corante a partir de duas técnicas, vídeos por microscopia de fluorescência e por leitor de placas para confirmarmos os dados obtidos. Após as análises das placas no leitor obtivemos, também, fotos das células por microscopia de fluorescência. As análises obtidas por microscopia esta referenciada como ROI (região de interesse) enquanto que as obtidas pelo leitor de placas está descrita como RFU (unidade de fluorescência relativa). Na Figura 4.19 (microscopia de fluorescência) e 4.20 (leitor de placa) podemos observar como a captação de corante induzida pelos agonistas ATP (P2X7R) ou capsaicina (TRPV1) ocorreu ao longo do tempo, além de mostrar como foi a ação dos antagonistas na formação do poro. Ainda nessas figuras, temos um resultado interessante. Macrófagos de medula óssea de camundongos C57BL/6, sem tratamento prévio por LPS têm a captação de corante mediada por ATP diminuída na presença de vermelho de rutênio 10 μ M (RR), quando comparado às células tratadas apenas com o ATP 5 mM. No entanto, apesar de termos visto uma diminuição na fluorescência mediada pelo ATP com a utilização do vermelho de rutênio (TRPV1 e TRPA1), não observamos nenhuma influencia do inibidor de P2X7R, o A43 50 μ M, sobre o agonista de TRPV1 1 μ M, a capsaicina, ou sobre o agonista de TRPA1, o AITC 100 μ M.

Apesar do antagonista de TRPV1 e TRPA1 (RR) ter conseguido inibir a fluorescência evocada pelo ATP 5 mM, o antagonista específico de TRPA1, o HC300031 não apresentou relevância estatística no bloqueio da formação do poro (Figura 4.20). Esses dados foram gerados por microscopia de fluorescência, onde os vídeos foram analisados frame por frame, possibilitando a confecção de uma curva temporal do efeito dos agonistas e antagonistas (juntos ou separados) sobre o poro do P2X7R.

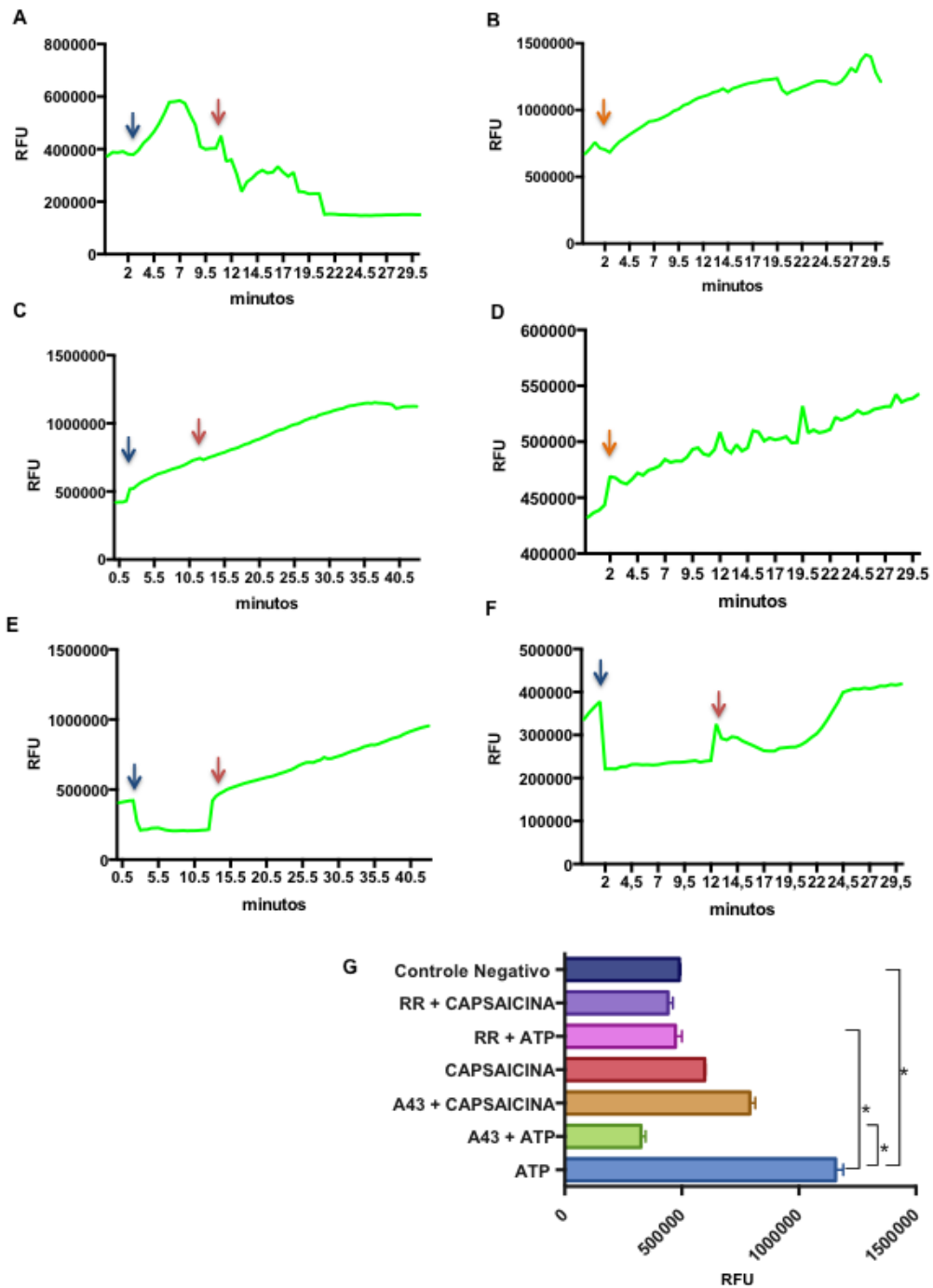


Figura 4.19: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 sem ativação prévia por LPS. As curvas representam o comportamento das células ao longo do tempo em respostas à diferentes estímulos extracelulares. Setas azuis indicam a aplicação dos antagonistas em 2 min e passados 10 min, os agonistas foram aplicados (setas vermelhas). Setas laranjas indicam os agonistas quando aplicados sozinhos após 2 min de vídeo. (A) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (B) tratamento apenas com ATP 5 mM; (C) tratamento com A43 50 μ M e Capsaicina 1 μ M; (D) tratamento apenas com Capsaicina 1 μ M; (E) tratamento com Ruthenium Red 10 μ M (RR) e ATP 5 mM; (F) tratamento com RR 10 μ M e Capsaicina 1 μ M e (G) Quantificação das curvas anteriores (A – F). n=3 experimentos independentes. * p <0,05 comparado ao grupo ATP. RFU = Unidade de fluorescência relativa.

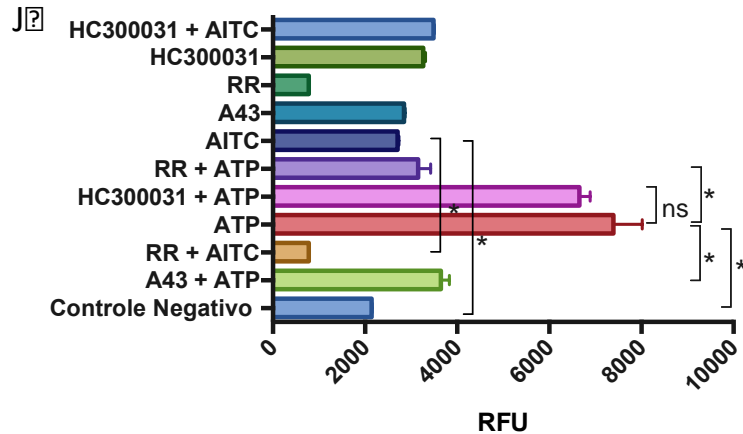
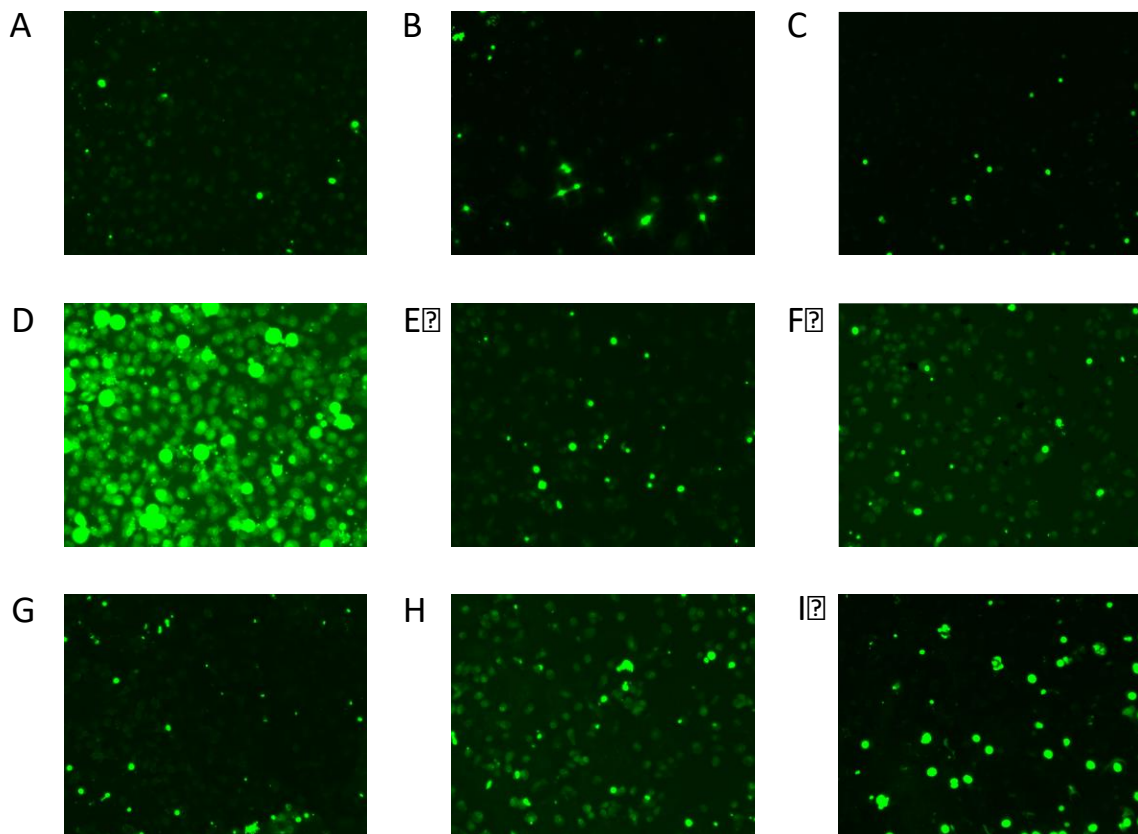


Figura 4.20: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 sem ativação prévia por LPS. (A) controle negativo; (B) tratamento apenas com A43 50 μ M; (C) tratamento com Ruthenium Red 10 μ M (RR); (D) tratamento apenas com ATP 5 mM; (E) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5mM; (F) tratamento com RR 10 μ M e ATP 5 mM; (G) tratamento apenas com Capsaicina 1 μ M; (H) tratamento com A43 50 μ M e Capsaicina 1 μ M; (I) tratamento com RR 10 μ M e Capsaicina 1 μ M Alil isotiocianato 100 μ M (AITC) e HC30031 100 μ M. n=2 experimentos independentes para experimentos utilizando AITC e HC30031 e n=3 experimentos independentes para os demais parâmetros. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. RFU = Unidade de fluorescência relativa. Aumento óptico de 20X.

Ao contrário do observado anteriormente, em células de macrófagos da medula óssea não primadas por LPS, as células que receberam 1 µg/mL de LPS, tiveram a captação de corante YO-PRO-1 aumentada, na presença dos antagonistas. Tal efeito pode ser indicativo de uma possível ação tóxica da adição simultânea dos agonistas e antagonistas de TRPs e P2X7R nessas células (Figura 4.21 e 4.22). No gráfico de barras da Figura 4.21 conseguimos visualizar melhor essa afirmação, onde a barra referente ao tratamento com RR 10 µM e ATP 5mM não houve diminuição estatisticamente significativa quando comparada ao tratamento apenas com o ATP 5mM. Além da visualização gráfica, a microscopia de fluorescência também nos mostra que as células primadas com LPS não respondem da mesma maneira que as não primadas. Na Figura 4.22F, células tratadas com RR e ATP, observa-se muitas células captando o corante YO-PRO-1 disponível no meio extracelular. Além disso, a capsaicina parece não induzir uma alta captação de corante, no entanto essa captação foi significativamente reduzida com a adição de RR 10 µM (Figura 4.21D e F e Figura 4.22G e I) .

Em seguida, utilizamos os modelos celulares HEK-293 e HEK-293-hP2X7R para controle negativo e positivo, respectivamente, da expressão de P2X7R. Já é sabido que as células HEK-293 não expressão o P2X7R e nossos dados vão de encontro com essa afirmação. Na Figura 4.23 demonstramos que as células HEK-293 não foram capazes de captar o corante YO-PRO-1 mesmo na presença de ATP 5mM (Figura 4.23C e F), não apresentando nenhuma significância estatística tanto quando comparamos o ATP ao controle negativo quanto ao tratamento A43 e ATP comparado ao ATP sozinho (Figura 4.23F). O Triton-X foi utilizado como controle positivo de permeabilização celular para determinarmos a máxima fluorescência do ensaio.

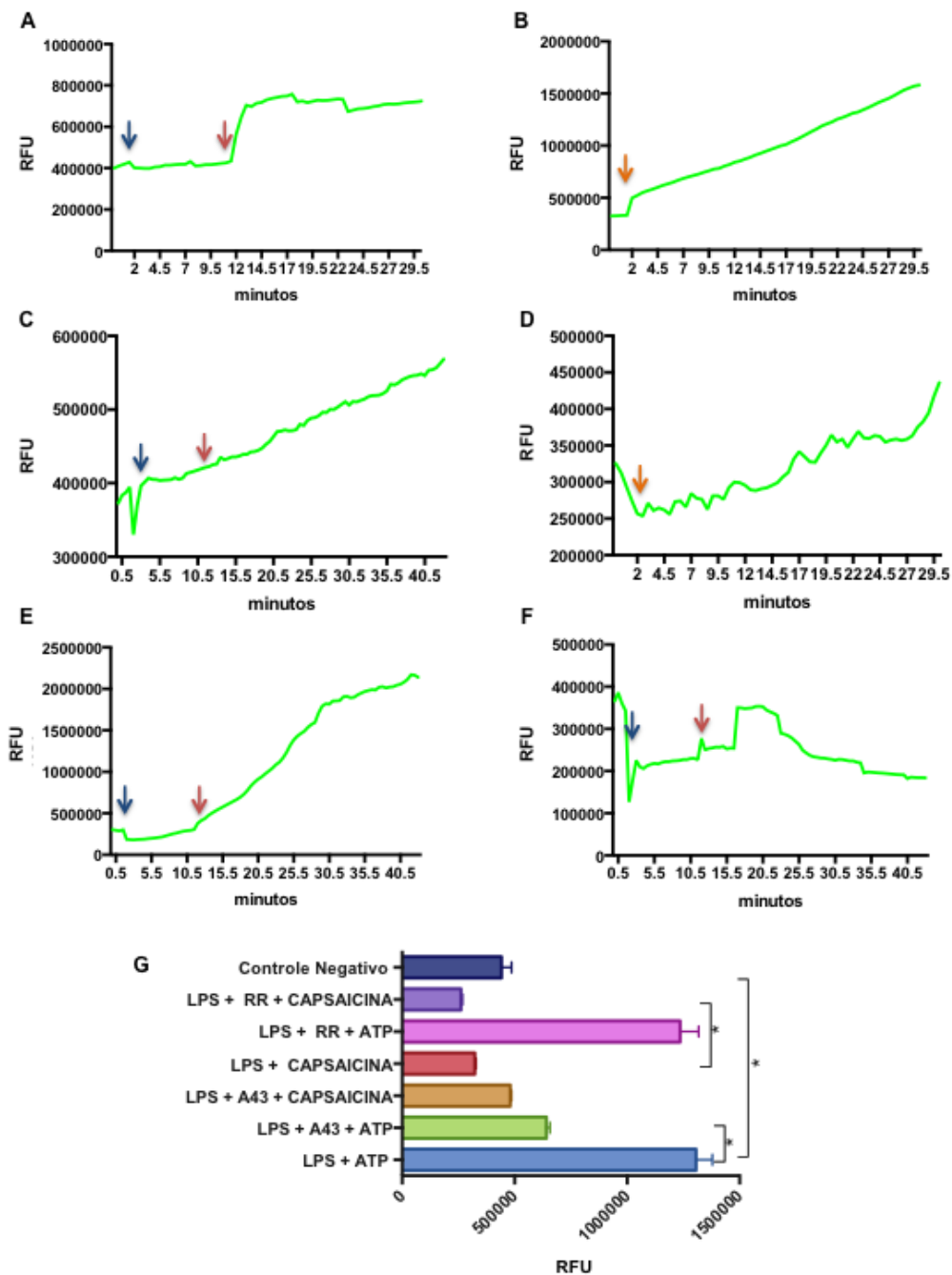


Figura 4.21: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 primados por 4 hs com LPS 1 μ g/mL. As curvas representam o comportamento das células ao longo do tempo em respostas à diferentes estímulos extracelulares. Setas azuis indicam a aplicação dos antagonistas em 2 min e passados 10 min, os agonistas foram aplicados (setas vermelhas). Setas laranjas indicam os agonistas quando aplicados sozinhos após 2 min de vídeo. (A) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (B) tratamento apenas com ATP 5 mM; (C) tratamento com A43 50 μ M e Capsaicina 1 μ M; (D) tratamento apenas com Capsaicina 1 μ M; (E) tratamento com Ruthenium Red 10 μ M (RR) e ATP 5 mM; (F) tratamento com RR 10 μ M e Capsaicina 1 μ M e (G) Quantificação das curvas anteriores (A – F). n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. RFU = Unidade de fluorescência relativa

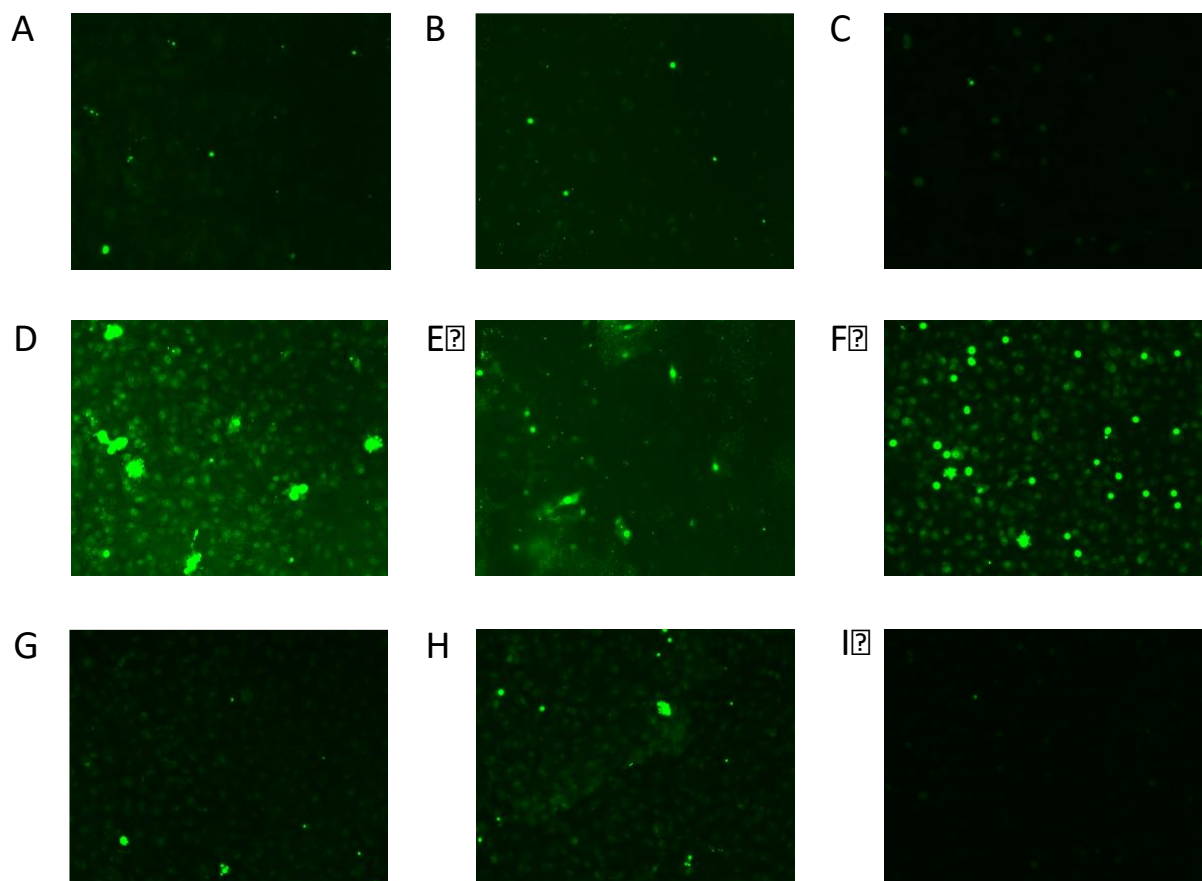


Figura 4.22: Análise da captação de YO-PRO-1 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6 primados por 4 hs com LPS. (A) controle negativo; (B) tratamento apenas com A43 50 μ M; (C) tratamento apenas com Ruthenium Red 10 μ M (RR); (D) tratamento apenas com ATP 5 mM; (E) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (F) tratamento com RR 10 μ M e ATP 5 mM; (G) tratamento apenas com Capsaicina 1 μ M; (H) tratamento com A43 50 μ M e Capsaicina 1 μ M; (I) tratamento com RR 10 μ M e Capsaicina 1 μ M. n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. Aumento óptico de 20X.

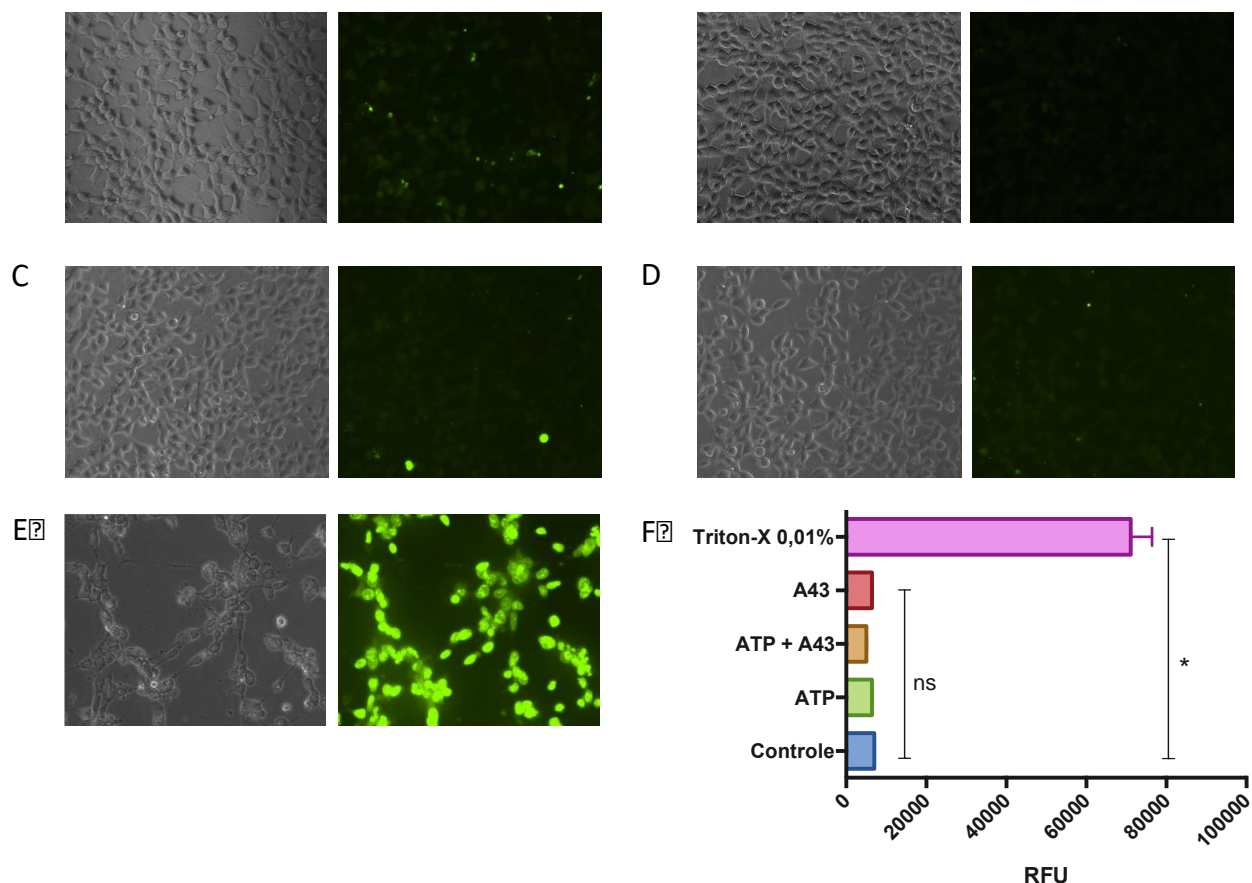


Figura 4.23: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293. (A) controle negativo; (B) tratamento apenas com A43 50 μ M; (C) tratamento apenas com ATP 5 mM; (D) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (E) tratamento com 0.01% de Triton-X e (F) Quantificação dos resultados (A – E). n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. RFU = Unidade de fluorescência relativa. Aumento óptico de 20X.

No entanto o efeito negativo descrito anteriormente é revertido, quando utilizamos células transfectadas com o vetor de P2X7R humano (hP2X7R). Tais células foram permeáveis ao corante YO-PRO-1 após a adição de ATP 5 mM (Figura 7.7.6C) e essa ativação/captação de corante foi significativamente reduzida com a adição do antagonista A43 (Figura 4.25D), quando comparado às células tratadas com ATP sozinho (Figura 4.25C). Assim como nos ensaios anteriores, esse foi analisado por microscopia de fluorescência (Figura 4.24) quanto por leitor de placas (Figura 4.25).

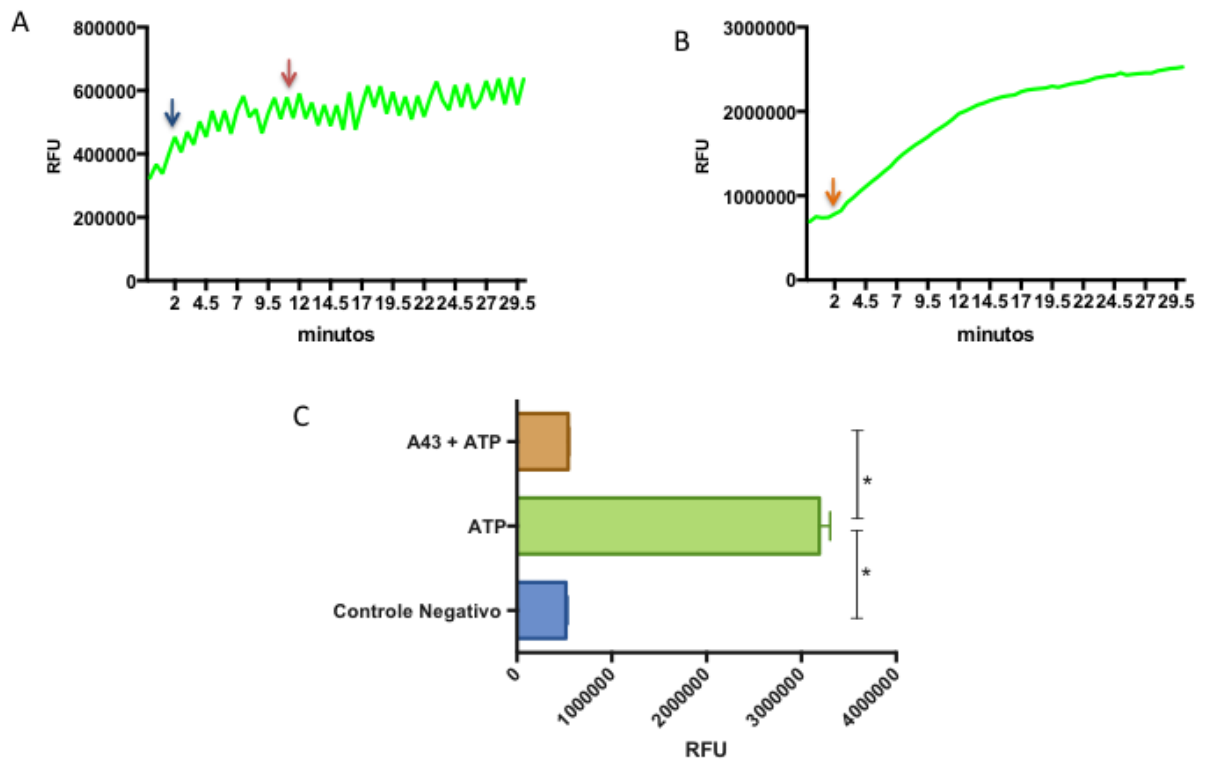


Figura 4.24: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293-hP2X7R. As curvas representam o comportamento das células ao longo do tempo em respostas a diferentes estímulos extracelulares. Setas azuis indicam a aplicação do antagonistas em 2 min e passados 10 min, os agonistas foram aplicados (setas vermelhas). Seta laranja indica o agonista quando aplicado sozinho após 2 min de vídeo. (A) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (B) tratamento apenas com ATP 5 mM; (C) Quantificação das curvas anteriores (A e B). n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. RFU = Unidade de fluorescência relativa.

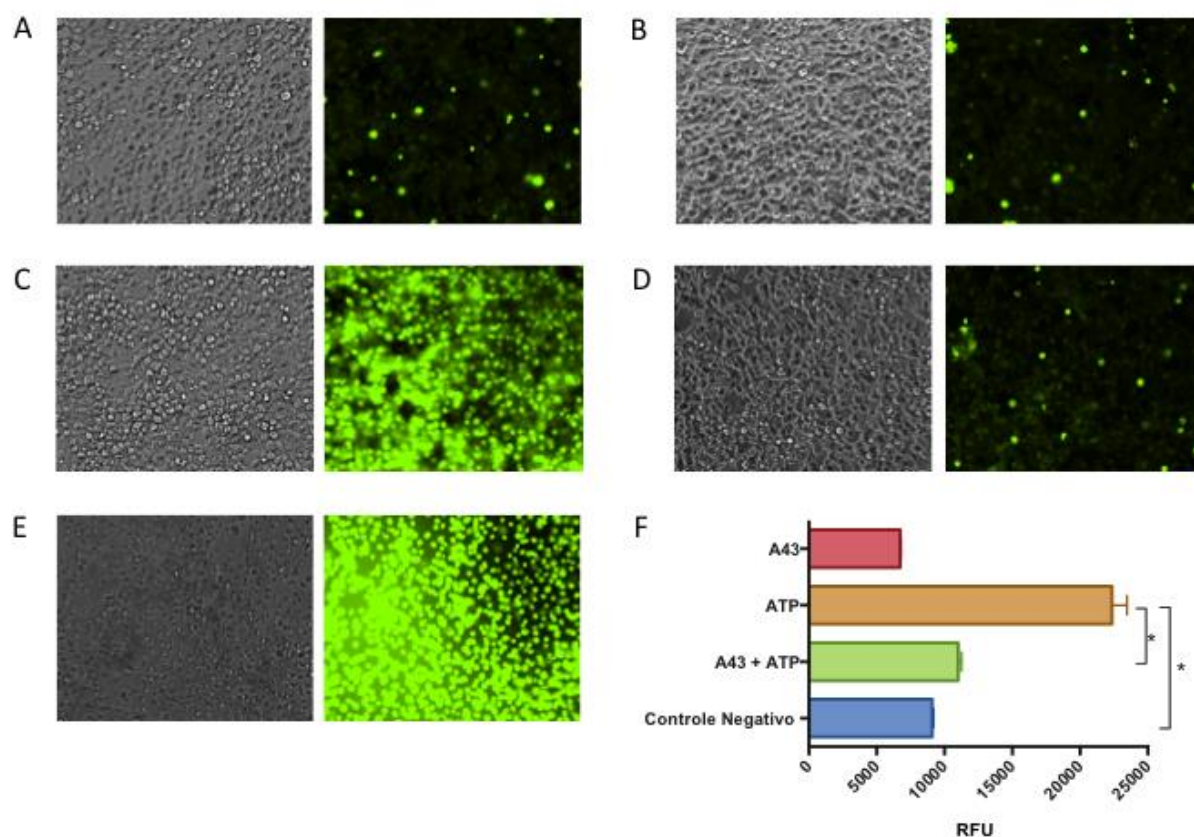


Figura 4.25: Análise da captação de YO-PRO-1 em células HEK-293-hP2X7R. (A) controle negativo; (B) tratamento apenas com A43 50 μM; (C) tratamento apenas com ATP 5 mM; (D) tratamento com A43 50 μM e ATP 5 mM; (E) tratamento com 0.01% de Triton-X e (F) Quantificação dos resultados (A – E). n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. ROI = Região de interesse.

No que se refere as células da linhagem J774.G8, uma linhagem conhecida por ser modelo de expressão do receptor e, conseqüente, modelo de captação de corante mediada por ATP, conduzimos experimentos com antagonistas e agonistas das proteínas TRPV1, TRPA1, conexinas e panexina-1.

Na Figura 4.26, observamos que, tanto o inibidor de TRPs, RR 10 μM quanto o inibidor carbenoloxone 10 μM de conexinas carbenoloxone 10 μM foram capazes de diminuir a captação de corante YO-PRO-1 mediada pela ativação do P2X7R pelo ATP 5 mM (Figura 4.26F e 4.26H, respectivamente). Nossas imagens obtidas por microscopia de fluorescência também indicam uma possível toxicidade para o carbenoloxone 100 μM quando administrado juntamente com o ATP 5mM (Figura 4.26J).

Para confirmação desses dados conduzimos também ensaios que foram analisados por leitor de placa. No gráfico de barras (Figura 4.27) temos a quantificação dos resultados obtidos que nos confirma os resultados relatados na Figura 4.26, onde observamos uma inibição significativa mediada por carbenoxolone 10 μM e vermelho de rutênio (RR) 10 μM . Além dessas informações, nessa célula observa-se que o antagonista do P2X7R, o A43 50 μM , foi capaz de reduzir a captação de corante, dessa vez mediada, pelo agonista de TRPA1, o AITC 100 μM . Ademais, os dados referentes ao tratamento com carbenoxolone 100 μM e Triton-X 0,1% foram omitidos do gráfico afim de facilitar a visualização das outras barras (Figura 4.27).

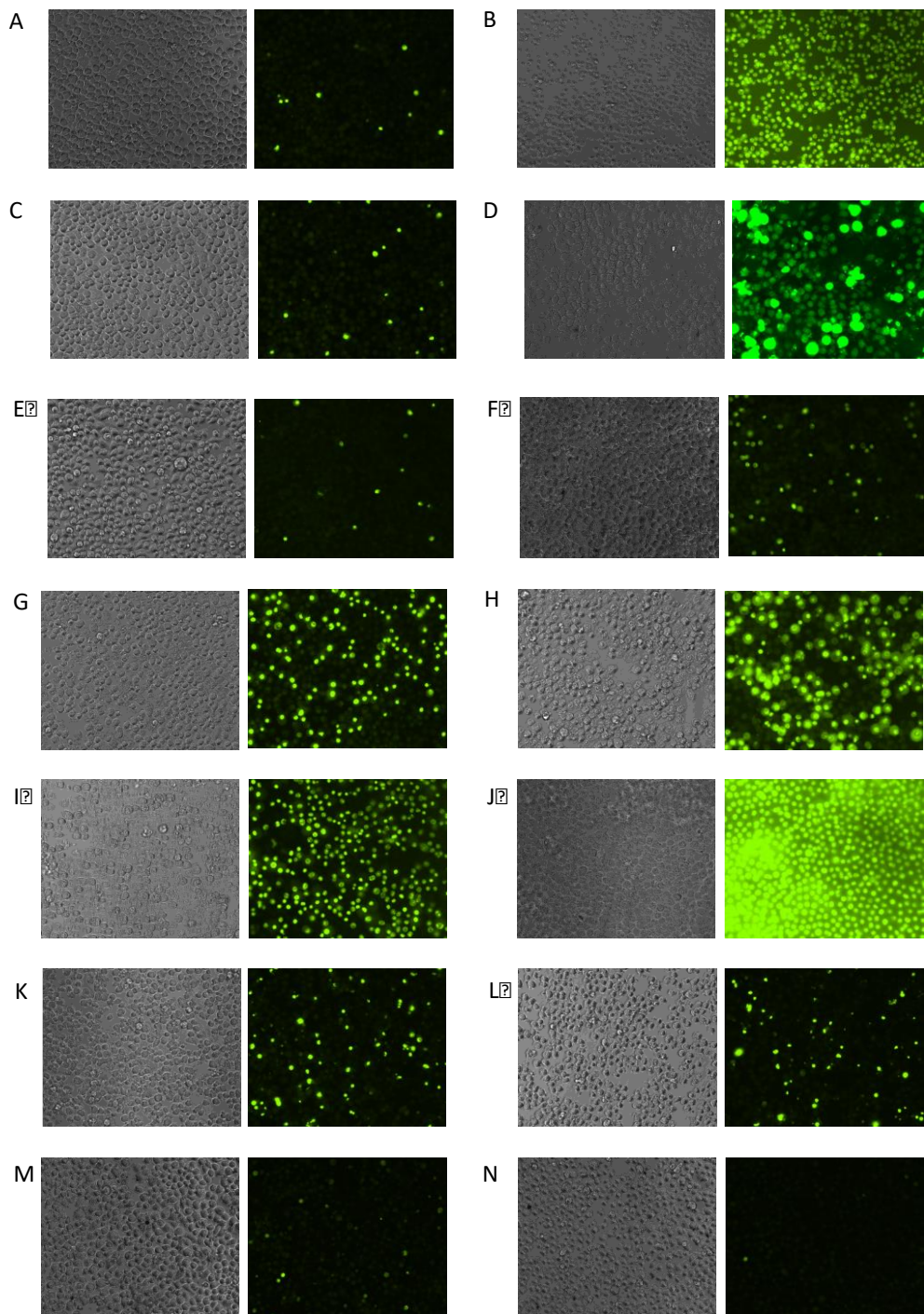


Figura 4.26: Análise da captação de YO-PRO em células J774.G8. (A) controle negativo; (B) tratamento com Triton-X 0,01%; (C) tratamento com A43 50 μ M; (D) tratamento com ATP 5 mM; (E) tratamento com A43 50 μ M e ATP 5 mM; (F) tratamento com RR 10 μ M e ATP 5 mM; (G) tratamento apenas com Cbx (Carbenoxolone) 10 μ M; (H) tratamento com Cbx 10 μ M e ATP 5 mM; (I) tratamento apenas com Cbx 100 μ M; (J) tratamento com Cbx 100 μ M e ATP 5 mM; (K) tratamento apenas com AITC 100 μ M; (L) tratamento com A43 50 μ M e AITC 100 μ M ATP e (M) tratamento apenas com RR 10 μ M. n= 3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes dos agonistas, fotografia após 30 min de aplicação do agonista. Imagens obtidas a partir da objetiva de 20x de aumento.

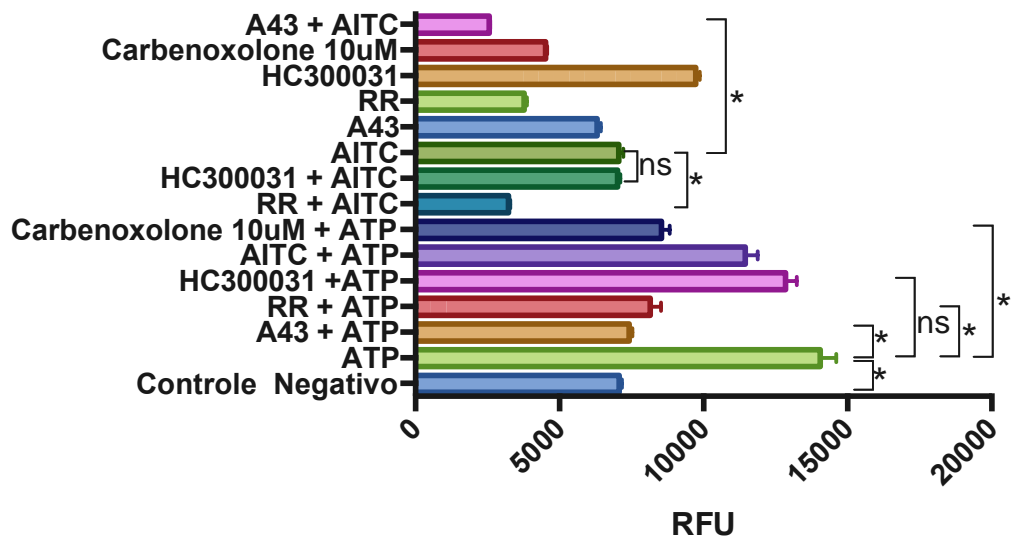


Figura 4.27: Análise da captação de YO-PRO em células J774.G8. Gráfico de barras referente a quantificação dos tratamentos das células com: apenas YO-PRO-1 (controle negativo); ATP 5 mM; A43 50 μ M; RR 10 μ M e ATP 5 mM; HC300031 100 μ M e ATP 5 mM; AITC 100 μ M e ATP 5 mM; Carbenoxolone 10 μ M e ATP 5 mM; RR 10 μ M e AITC 100 μ M; HC300031 100 μ M e AITC 100 μ M; AITC 100 μ M; A43 50 μ M; RR 10 μ M; HC300031 100 μ M; Carbenoxolone 10 μ M; A43 50 μ M e AITC 100 μ M. Quantificação dos resultados gerados por leitura de placa. n=3 experimentos independentes. Antagonistas aplicados 10 min antes e agonistas aplicados por 30 min. RFU = unidade de fluorescência relativa.

V. Discussão

O receptor P2X7 é um canal iônico (Surprenant, Schneider et al. 2000) com ampla distribuição nas células humanas, incluindo nas células do sistema imunitário, principalmente em macrófagos e sistema hematopoiético (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001, North 2002, Khakh and North 2006). Como mencionado anteriormente, existe uma certa controvérsia entre os diferentes autores acerca do mecanismo de formação do canal de alta condutância (ou poro). Inicialmente os pesquisadores consideravam que o próprio canal do P2X7R dilatava, aumentando a luz do canal, chegando a conformação do poro e permitindo a passagem de moléculas de até 900Da, em macrófagos. Atualmente novas teorias surgiram e diferentes grupos propuseram novas hipóteses. Alguns grupos sugerem que a Panexina-1 seja o poro associado ao P2X7R, visto que células HEK-293 transfectadas com P2X7R tinham captação de corante bloqueada quando tratadas com RNAi e peptídeos bloqueadores de Panexina-1 (Pelegriin and Surprenant 2006). Enquanto que outros grupos sugerem a existência de duas vias independentes, experimentos também realizados em HEK-293 transfectadas com P2X7 mostraram captação diferenciada à corantes catiônicos e aniônicos (Schachter, Motta et al. 2008).

Na tentativa de elucidar essas controvérsias, nosso grupo iniciou uma busca por quais proteínas seriam possíveis candidatas ao poro associado do P2X7R. Primeiramente selecionamos proteínas com características similares ao P2X7R, principalmente quanto a capacidade de abrir um poro na membrana plasmática capaz de permitir a passagem de moléculas em torno de 900Da (Tabela 1.5).

Estudos recentes sugerem que canais iônicos não são definidos apenas pela subunidade formadora de poros mas que, provavelmente haja uma importante participação do microambiente em que se encontra. Possivelmente, a formação de um complexo macromolecular aconteceria, dependendo do estímulo oferecido, a partir de um conjunto de proteínas parceiras (Schulte, Muller et al. 2011, Lee, Fakler et al. 2014).

Nesta tese, sugerimos que algumas proteínas podem funcionar como parceira do poro associado ao P2X7R. Ademais, com intuito de responder a essa hipótese, selecionamos algumas proteínas conhecidas por formarem poro na membrana plasmática. Poro esse, com capacidade de permitir a passagem de moléculas de até 1000 Da em decorrência da ativação por diferentes estímulos extracelulares. Essas proteínas (Panexina-1, VDAC, Maxianion, Conexinas e TRPs) são conhecidas,

também, por permitirem a liberação do ATP intracelular para o meio extracelular. Contudo, esse ATP, agora no meio extracelular, poderia ser responsável por ativar o receptor P2X7. O P2X7R, por sua vez, recrutaria outra(s) proteína(s) formadoras de poro via segundos mensageiros ou a partir da associação física entre eles, gerando um *Feedback Positivo* e levando à abertura do poro (Figura 1.14).

Inicialmente, fizemos um levantamento dos mRNAs das proteínas expressas nos diferentes tipos celulares estudados. Esse resultado, por sua vez, não nos garante nenhum tipo de conclusão direta em relação à hipótese do trabalho, mas direciona e diminui as diversas possibilidades de associações. Portanto, podemos excluir a participação dos mRNAs ausentes, na tentativa de afunilar as possíveis interações entre as diferentes proteínas formadoras de poro e o P2X7R dependendo do tipo celular analisado (Tabela 4.1). Por exemplo, podemos excluir a participação da proteína VDAC de quase todas as linhagens estudadas, exceto macrófagos peritoneais de camundongo e J774.G8 que apresentam o mRNA desta proteína.

Entretanto estudos apontam que há uma controvérsia acerca da existência do VDAC-pl (presente na membrana plasmática). Alguns trabalhos sugerem que o VDAC e o maxianion sejam a mesma entidade proteica, no entanto algumas atividades distintas do canal descartaram essa hipótese após manipulações genéticas (Suzuki and Mizuno 2004, Sabirov, Sheiko et al. 2006, Suzuki 2006, Sabirov and Merzlyak 2012). Diante de toda essa controversa acerca dessas duas proteínas (maxianion e VDAC), ambas foram descartadas do presente estudo. Além do VDAC, a conexina-43 e Panexina-1 também foram consideradas a mesma entidade do maxianion, no entanto também foi refutado após estudos biofísicos e farmacológicos, mostrando que as três entidades apresentam caminhos diferentes de liberação de ATP (Islam, Uramoto et al. 2012). No entanto, apesar do canal maxianion não apresentar forma molecular definida, até o momento, Islam e colaboradores observaram que as células de fibrossarcoma L929 de murinos têm o maxianion como via predominante de liberação de ATP enquanto que os canais de panexina-1 participariam como uma rota menor (Islam, Uramoto et al. 2012). Em contraste, células epiteliais traqueais de murinos apresentam um padrão inverso. Nestas, os canais de panexina-1 são responsáveis pela maioria da liberação de ATP em resposta ao estresse hipotônico.

A partir dos dados de RT-PCR, conseguimos direcionar e desenvolver experimentos relacionados à identificação e associação das proteínas candidatas

com o P2X7R, como por exemplo, os ensaios de Western Blot e Espectrometria de Massas. Nossos dados de Western Blot sugerem que algumas proteínas poderiam estar interagindo com o P2X7R. Nas linhagens celulares J774.G8 e N2A, podemos observar a participação da Panexina-1, devido sua imunoprecipitação com o P2X7R. No entanto, não houve relação entre o aumento da expressão da Panexina-1 após a exposição ao agonista ATP (Figuras 4.9 e 4.10, respectivamente).

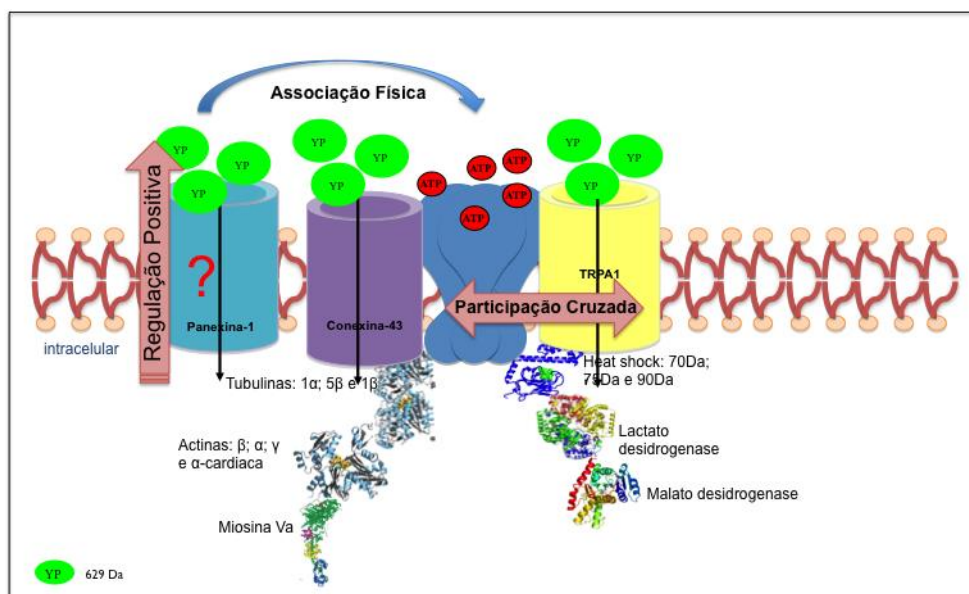


Figura 5.1: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem J774.G8. Nesse tipo celular observamos que na presença de ATP extracelular acontecia uma diminuição na associação entre P2X7R e TRPV1, enquanto que com relação à Conexina-43 havia uma associação maior com o P2X7R, independente da presença do ATP.

Com relação ao TRPV1, identificamos uma possível associação ao P2X7 nas linhagens U937 e N2A (Figuras 4.8 e 4.10, respectivamente). Entretanto, curiosamente, quando as células (U937 e N2A) eram tratadas com ATP 5 mM, a expressão de P2X7R associada ao TRPV1 era diminuída (Figura 5.2 e Figura 5.3, respectivamente). Além disso, a linhagem U937 apresentou uma forte associação à proteína Conexina-43, dado sugerido devido a grande banda no gel de Western Blot referente ao P2X7R associado à Conexina-43, independente da ativação com o agonista ATP (Figura 4.8 e Figura 5.2). Ainda com relação às células U937, a Panexina-1 não apresentou qualquer associação com o receptor, indo contra a

hipótese do complexo proteico P2X7R-Panexina-1 (Kanjamekanant, Luckprom et al. 2014, Mahi, Kumar et al. 2015, Pan, Chou et al. 2015). No entanto, em células da linhagem N2A foi possível observar tal associação (P2X7R/Panexina-1) e essa associação física era independente da presença de ATP extracelular (Figura 5.3).

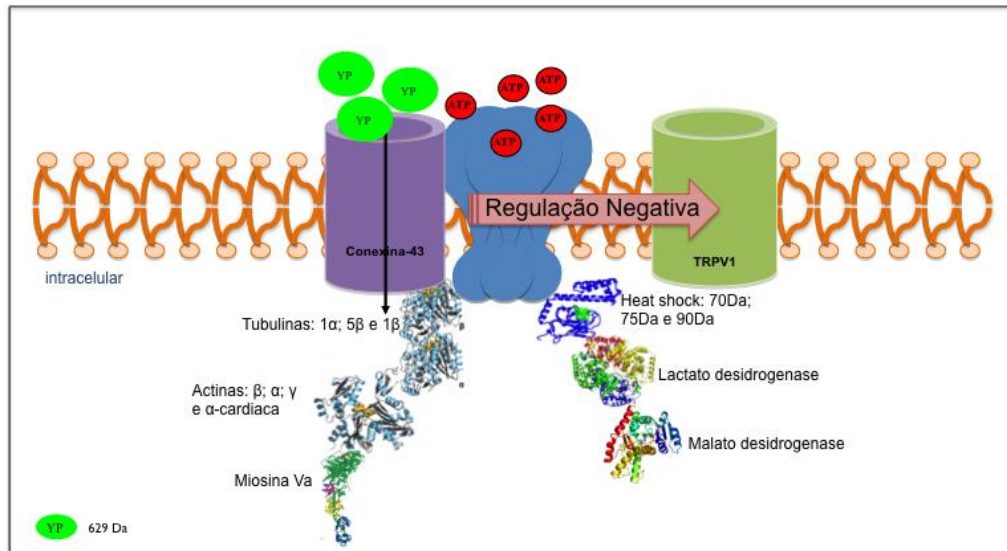


Figura 5.2: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem U937. Nesse tipo celular observamos que na presença de ATP extracelular acontecia uma diminuição na associação entre P2X7R e TRPV1, enquanto que com relação à Conexina-43 havia uma associação maior com o P2X7R, independente da presença do ATP.

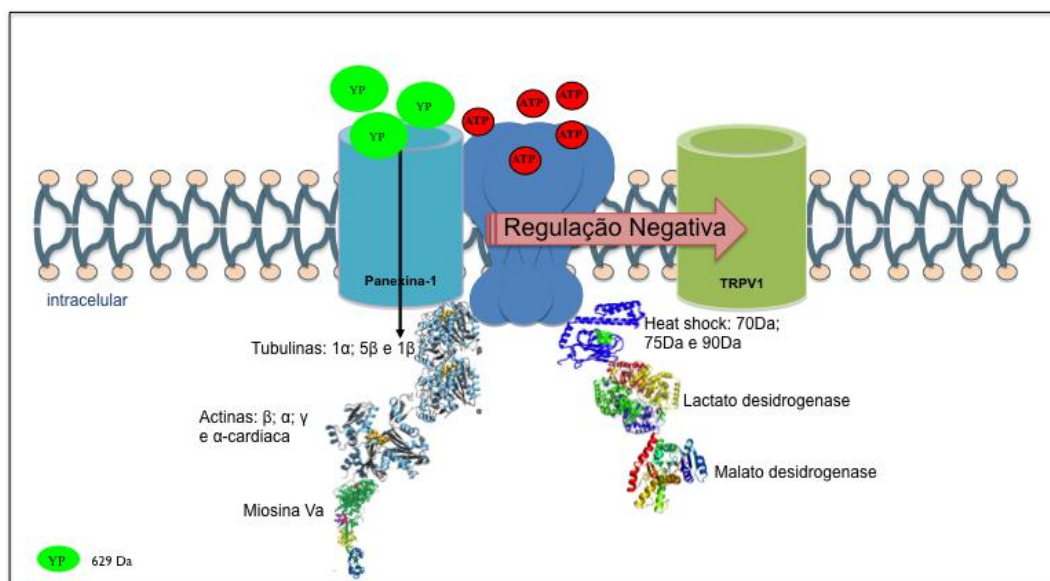


Figura 5.3: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células da linhagem N2A. Nesse tipo celular observamos que na presença de ATP extracelular acontecia uma diminuição na associação entre P2X7R e TRPV1, enquanto que com relação à Panexina-1 havia uma associação maior com o P2X7R, independente da presença do ATP.

A partir dos dados de Western Blot decidimos aprimorar as análises proteômicas e, então, elegemos a técnica de espectrometria de massas, visto que este método oferece um fluxo de trabalho muito eficiente, combinando alta resolução e acurácia dos peptídeos identificados em uma determinada amostra. No entanto, ela não é capaz de eliminar polipeptídeos que representam um background de contaminantes, como por exemplo peptídeos que têm afinidade aos reagentes utilizados nas etapas de purificação ou aos epítomos de *tags* utilizados, como FLAGs ou GFPs (Mellacheruvu, Wright et al. 2013). Na Tabela 5.1, podemos verificar diversas proteínas consideradas contaminantes de um resultado de espectrometria de massas. Dentre elas, Heat shocks, queratinas, tubulinas, actinas, fatores de alongamento, histonas, ribonúcleo – proteína e proteínas ribossomais (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Lista das proteínas detectadas mais frequentemente

| Família das Proteínas | Representação Gênica |
|------------------------|---------------------------|
| Proteínas Heat shock | HSPA1A, HSPA8, HSPA2 |
| Queratinas | KRT1, KRT10, KRT2 |
| Tubulinas | TUBA1B, TUBA3C, TUBB |
| Actinas | ACTB, ACTA2, ACTBL2 |
| Fatores de Alongamento | EEF1A, EEF1A2 |
| Histonas | HIST1H1C, H2AFX, HIST2H2B |
| Ribonucleo - Proteins | HNRNPK, HNRNPU, HNRNPH1 |
| Proteínas Ribossomais | RPS3, RPS18, RPL23 |

Tabela modificada de Mellacheruvu, Wright et al. 2013.

Dattatreya Mellacheruvu e colaboradores, em 2013, identificaram mais de 7 mil proteínas como contaminantes. Dessas, 14 proteínas estavam presentes em mais de 90% dos experimentos, 89 proteínas em mais de 50% dos experimentos e a maior parte estava presente apenas em menos de 10% dos experimentos realizados. A tabela completa está disponível em <http://www.crapome.org>.

O presente trabalho reúne como resultado, gerado por espectrometria de massas, todas as proteínas descritas acima, além de outras não consideradas “contaminantes abundantes” (lactato e malato desidrogenase e glutathione S-transferase). No entanto, um estudo anterior também encontrou essas proteínas e sugeriram interações importantes com o P2X7R (Kim, Jiang et al. 2001). Os dados de proteômica desse grupo mostram que 11 proteínas diferentes são recrutadas pelo P2X7R em células HEK-293 transfectadas. Dessas 11 proteínas eles encontraram 3 proteínas de membrana: alfa-laminina, beta-integrina e o receptor de tirosina fosfatase beta (RPTPb) além de 8 proteínas intracelulares: alfa-actina, beta-actina, supervilina, 3 heat shock (Hsp90, Hsp71 e Hsp70), PI4K e MAGuK (Kim, Jiang et al. 2001). Entretanto o grupo não utilizou células previamente tratadas com ATP para verificar o perfil proteico recrutado após ativação, como fizemos nesse trabalho. A ativação das células J774.G8, recrutou um total de 25 proteínas diferentes (Tabela 4.7) além de 5 não identificadas no banco de dados.

Um estudo recente demonstrou que a proteína acessória reguladora HSP90 interage com regiões da porção C-terminal do P2X7R, sugerindo que as drogas que modulem a ligação da HSP90 à essa região, seriam importante para terapias diversas, desde medicamentos à inibição da apoptose induzida pela ativação do receptor P2X7 (Migita, Ozaki et al. 2016).

Contudo, podemos especular que essas proteínas estejam sendo recrutadas ou associadas ao P2X7R no meio intracelular após ativação, visto a ausência dessas proteínas nos nossos controles negativos e nas amostras de J774.G8 sem adição de ATP (Figura 5.4). Esse controle no garante que as diversas proteínas encontradas por essa técnica não se tratam apenas de proteínas contaminantes e sim de proteínas fisicamente associadas ao P2X7R, pelo menos no modelo J774.G8.

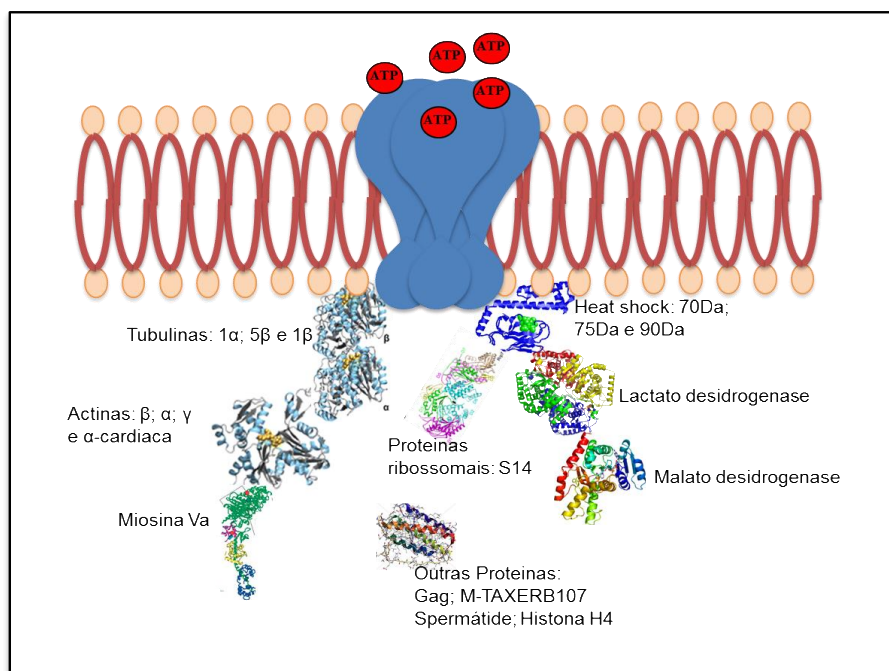


Figura 5.4: Proteínas associadas ao P2X7R ativado por ATP em células J774.G8. Interação entre o receptor P2X7 e as proteínas encontradas a partir da proteômica realizada nesse trabalho. As proteínas foram imunoprecipitadas de células J774.G8 juntamente com o P2X7R ativado por ATP extracelular. Principais proteínas encontradas nessas condições foram: Tubulinas 1 α , 5 β e 1 β ; Actinas β , γ , α e α -cardíaca; Miosina Va; Heat shock 70, 75 e 90; Proteínas ribossomais S14; Lactato desidrogenase e Malato desidrogenase.

Na Tabela 4.11, observamos que as células U937 imunoprecipitadas com anti-P2X7R apresentavam diversas proteínas associadas ao P2X7R, mesmo quando não ativadas por ATP 5 mM. Tal fenômeno pode nos indicar que pelo menos nessa linhagem celular o PX7R se associa à diferentes proteínas independente da ativação do poro, sugerindo que essas associações podem ser flexíveis dependendo da célula em que ele está inserido. Essa observação vai de encontro às hipóteses sugeridas na literatura de que canais iônicos são na verdade complexos macromoleculares, como destacado anteriormente.

Apesar das associações observadas nos resultados de proteômica, nas análises por microscopia de confocal não identificamos as proteínas TRPA1 e panexina-1 associadas ao P2X7R. No entanto, nos questionamos se tais proteínas (associadas na proteômica) poderiam alterar a funcionalidade do receptor. Para isso, realizamos ensaios de captação de corante, utilizando antagonistas das proteínas candidatas TRPs, Conexinas e Panexina-1, além de agonistas e antagonistas do P2X7R. Na seção 4.7 dos Resultados, podemos perceber que de fato há uma

variabilidade das proteínas participantes na formação do poro do P2X7R mediado por ATP e isso é dependente do microambiente em que se insere.

De maneira especulativa, podemos sugerir que na ausência de sinais de perigo existiria uma maior influência do TRPV1 sobre o P2X7R. Essa hipótese, poderia explicar a diminuição de P2X7R associado ao TRPV1 na presença de ATP 5 mM, observado no Western Blot de células U937 e N2A (Figuras 4.8 e 4.9, respectivamente). Além de explicar o efeito que o antagonista vermelho de rutênio teve sobre a formação do poro do P2X7R via ATP 5 mM em BMDM. Elucidaria também o efeito tóxico da combinação dessas drogas (RR + ATP) em células previamente tratadas com LPS.

Foi demonstrado que a ativação por caspase-11 pelo complexo Panexina-1/P2X7R é fundamental e letal após desafios com LPS, de modo que camundongos P2X7R deficientes apresentam proteção contra essa letalidade após desafio com LPS (Yang, He et al. 2015). Nesse estudo, os autores sugerem que inibidores de Panexina-1 e P2X7R possam beneficiar pacientes em quadro de sepse por bactérias gram negativas. Por limitação da técnica e pela alta toxicidade do inibidor de Panexina-1 utilizado nesse trabalho, o carbenoxolone, apresentou alta toxicidade na dose usual para bloquear Panexina-1, dessa forma não podemos aferir nenhuma conclusão acerca dessa proteína. Contudo, na concentração ideal para bloquear conexinas observamos que houve diminuição na formação de poros do P2X7R induzido por ATP, sugerindo uma participação cruzada das conexinas com o P2X7R (Figura 5.1).

No que tange a proteína formadora TRPV1 em macrófagos de medula óssea de camundongo C57BL/6, observamos o mesmo fenômeno relatado pelos autores. A presença de vermelho de rutênio foi capaz de diminuir captação mediada por ATP em células sem ativação prévia (Figura 5.5) ou previamente ativadas com LPS (Figura 5.6). No entanto no que se diz respeito à proteína TRPA1, a presença de seu inibidor específico HC3000031 mostrou efeito contrário e não foi capaz de inibir a captação de YO-PRO mediada por ATP, sem ativação com LPS. Nosso dado nos sugere que numa condição inflamatória há uma associação entre essas proteínas afim de tentar controlar a infecção mediada por LPS (Figura 5.6).

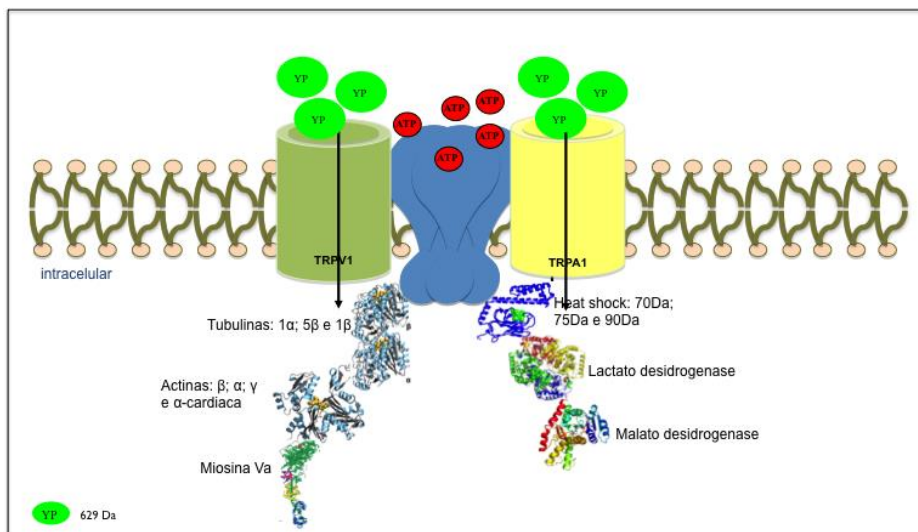


Figura 5.5: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células de BMDM de camundongos C57BL/6. Nesse tipo celular observamos que na presença de ATP extracelular e na ausência de LPS, o vermelho de rutênio foi capaz de diminuir a morte celular enquanto que o HC300031 não. Dessa forma descartando a associação entre P2X7 e TRPA1 e indicamos uma associação entre P2X7 e TRPV1.

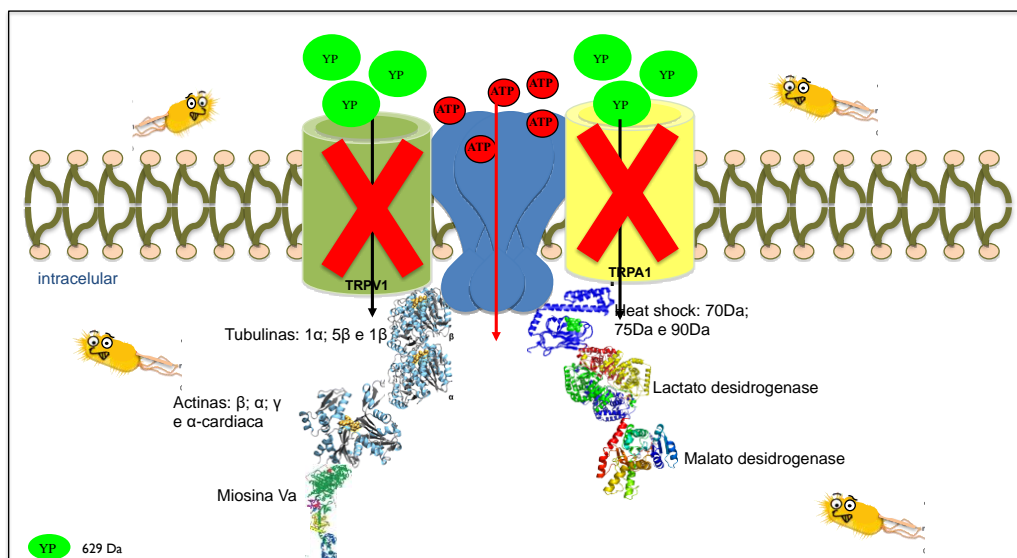


Figura 5.6: Esquema resumido do mecanismo de ativação do receptor P2X7 em células de BMDM de camundongos C57BL/6 previamente ativadas com LPS. Nesse tipo celular e na presença de ATP extracelular e LPS, observamos que o vermelho de rutênio, inibidor de TRPs, induzia o aumento de morte celular induzido descartando a associação entre P2X7 e TRPs nessa condição.

O receptor P2X7 (P2X7R) é um receptor purinérgico membro da família P2X (ionotrópicos) e se diferencia dos demais devido às suas características estruturais e farmacológicas. Esse receptor, quando exposto ao ATP extracelular por tempo prolongado e/ou altas concentrações, promove um aumento da permeabilidade da membrana, levando à abertura de um canal de alta condutância (ou poro associado), que permite a passagem de moléculas de até 900 Da, em macrófagos. Dados de diversos grupos apontam que para a formação desse poro, é necessária a participação de uma segunda proteína. Entretanto, as controvérsias entre os diversos grupos de pesquisa deixam em dúvida qual ou quais seriam as proteínas associadas ao poro. Além disso, há evidências de que o próprio canal poderia se dilatar, permitindo assim a passagem dessas moléculas não permeáveis à membrana plasmática.

Nesse contexto, é necessário que novos estudos sejam desenvolvidos para a elucidação dessa questão. O presente trabalho testou a hipótese de que diferentes mecanismos e diferentes proteínas formadoras de poro podem estar associados ao P2X7R, dependendo do tipo celular e dos estímulos em seu microambiente, o que poderia explicar os diversos dados controversos da literatura. Nossos dados em conjunto, nos indicam que o poro do P2X7R pode sim se tratar de um complexo macromolecular e que este parece recrutar diferentes proteínas formadoras de poro dependendo do tipo celular e dos estímulos induzidos no microambiente celular em que o P2X7R está inserido.

VII. Conclusões

1. Nossa análise por proteômica indicou a associação de diversas proteínas ao P2X7R, proteínas não associadas primariamente à formação do poro. Estes dados estão de acordo com a literatura e sugerem uma complexidade ainda maior para a unidade funcional do poro do P2X7R.
2. Nossos resultados nos permite especular que a participação de proteínas formadoras de poro depende do tipo celular;
3. Macrófagos murinos (J774.G8 e macrófagos peritoneais - suíço) não apresentam a proteína TRPV1, o que nos indica que esta não poderia participar como parceira do P2X7R na formação de poro nestas células;
4. A imunoprecipitação, seguida de Western Blot, conseguiu afunilar um pouco mais nossas conclusões. Identificamos interações diretas do P2X7 com conexina-43, TRPA1 ou Panexina-1, em J774.G8. Além disso, observamos que em células N2A e U937 parece acontecer uma regulação negativa da expressão do P2X7R associado ao TRPV1 quando na presença de ATP 5 mM. Identificamos uma possível associação de conexina-43 ao P2X7 em células U937. Enquanto que em células N2A pudemos associar a panexina-1 ao receptor;
5. Não conseguimos concluir sobre a participação da panexina-1 na formação do poro do P2X7 porque o seu inibidor foi altamente tóxico sobre as células J774.G8 e observamos poucas proteínas colocalizadas nos ensaios analisados por microscopia de confocal;
6. Em macrófagos de medula óssea não estimulados por LPS, observamos a participação de TRPA1 e TRPV1 associados à formação do poro do P2X7, associação não necessariamente física e

VIII Referência Bibliográfica

Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, M. T. Miras-Portugal, B. F. King, C. Gachet, K. A. Jacobson, G. A. Weisman and G. Burnstock (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." Trends Pharmacol.Sci. **24**(2): 52-55.

Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" Pharmacol Ther **64**(3): 445-475.

Abbracchio, M. P., G. Burnstock, J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. A. Jacobson and G. A. Weisman (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**(3): 281-341.

Akanda, N. and F. Elinder (2006). "Biophysical properties of the apoptosis-inducing plasma membrane voltage-dependent anion channel." Biophys J **90**(12): 4405-4417.

Akbar, M., F. Okajima, H. Tomura, S. Shimegi and Y. Kondo (1994). "A single species of A₁ adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release." Mol Pharmacol **45**(5): 1036-1042.

Alberto, A. V., R. X. Faria, C. G. Couto, L. G. Ferreira, C. A. Souza, P. C. Teixeira, M. M. Froes and L. A. Alves (2013). "Is pannexin the pore associated with the P2X₇ receptor?" Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **386**(9): 775-787.

Alves, L. A., R. A. de Melo Reis, C. A. de Souza, M. S. de Freitas, P. C. Teixeira, D. Neto Moreira Ferreira and R. F. Xavier (2014). "The P2X₇ receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon?" Biochim Biophys Acta **1838**(10): 2578-2587.

Aschrafi, A., S. Sadtler, C. Niculescu, J. Rettinger and G. Schmalzing (2004). "Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes." J Mol Biol **342**(1): 333-343.

Bao, L., S. Locovei and G. Dahl (2004). "Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP." FEBS Lett. **572**(1-3): 65-68.

Barbe, M. T., H. Monyer and R. Bruzzone (2006). "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels." Physiology (Bethesda, Md.) **21**: 103-114.

Barrera, N. P., R. M. Henderson, R. D. Murrell-Lagnado and J. M. Edwardson (2007). "The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels." Biophys J **93**(2): 505-512.

Barrera, N. P., S. J. Ormond, R. M. Henderson, R. D. Murrell-Lagnado and J. M. Edwardson (2005). "Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize." J Biol Chem **280**(11): 10759-10765.

Bennett, D. W. and A. N. Drury (1931). "Further observations relating to the physiological activity of adenosine compounds." J Physiol **72**: 288-320.

Bessac, B. F. and S. E. Jordt (2008). "Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control." Physiology (Bethesda) **23**: 360-370.

Boumechache, M., M. Masin, J. M. Edwardson, D. C. Gorecki and R. Murrell-Lagnado (2009). "Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells." J Biol Chem **284**(20): 13446-13454.

Brake, A. J., M. J. Wagenbach and D. Julius (1994). "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." Nature **371**(6497): 519-523.

Brasil, N. (1968). "Ciências humanas e suas tecnologias." Ariadne(C): 28-40.

Broom, D. C., D. J. Matson, E. Bradshaw, M. E. Buck, R. Meade, S. Coombs, M. Matchett, K. K. Ford, W. Yu, J. Yuan, S. H. Sun, R. Ochoa, J. E. Krause, D. J. Wustrow and D. N. Cortright (2008). "Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation." J Pharmacol Exp Ther **327**(3): 620-633.

Brown, P. and N. Dale (2000). "Adenosine A1 receptors modulate high voltage-activated Ca²⁺ currents and motor pattern generation in the xenopus embryo." J Physiol **525 Pt 3**: 655-667.

Brown, S. G., A. Townsend-Nicholson, K. A. Jacobson, G. Burnstock and B. F. King (2002). "Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 673-680.

Bruzzone, R., S. G. Hormuzdi, M. T. Barbe, A. Herb and H. Monyer (2003). "Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13644-13649.

Bruzzone, R., T. W. White and D. A. Goodenough (1996). "The cellular Internet: on-line with connexins." Bioessays **18**(9): 709-718.

Bruzzone, R., T. W. White and D. L. Paul (1996). "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling." Eur J Biochem **238**(1): 1-27.

Buell, G., G. Collo and F. Rassendren (1996). "P2X receptors: an emerging channel family." Eur.J Neurosci. **8**(10): 2221-2228.

Burnstock, G. (1971). "Neural nomenclature." Nature **229**(5282): 282-283.

Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacol.Rev. **24**(3): 509-581.

Burnstock, G. (1999). "Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiological roles." Proc West Pharmacol Soc **42**: 119-121.

Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." Cellular and molecular life sciences : CMLS **64**(12): 1471-1483.

Burnstock, G. and G. Campbell (1963). "Comparative Physiology of the Vertebrate Autonomic Nervous System. II. Innervation of the Urinary Bladder of the Ringtail Possum (*Pseudocheirus Peregrinus*)." J Exp Biol **40**: 421-436.

Burnstock, G., G. Campbell, D. Satchell and A. Smythe (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**(4): 668-688.

Burnstock, G. and M. E. Holman (1963). "Smooth muscle: autonomic nerve transmission." Annu Rev Physiol **25**: 61-90.

Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" Gen.Pharmacol. **16**(5): 433-440.

Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." Int.Rev Cytol. **240**: 31-304.

Chessell, I. P., J. P. Hatcher, C. Bountra, A. D. Michel, J. P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W. L. Peck, C. B. Grahames, M. A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand and G. N. Buell (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." Pain **114**(3): 386-396.

Clark, A. K., A. A. Staniland, F. Marchand, T. K. Kaan, S. B. McMahon and M. Malcangio (2010). "P2X7-dependent release of interleukin-1beta and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide." J Neurosci **30**(2): 573-582.

Coddou, C., Z. Yan, T. Obsil, J. P. Huidobro-Toro and S. S. Stojilkovic (2011). "Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels." Pharmacol Rev **63**(3): 641-683.

Compan, V., L. Ulmann, O. Stelmashenko, J. Chemin, S. Chaumont and F. Rassendren (2012). "P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties." J Neurosci **32**(12): 4284-4296.

Coutinho-Silva, R., L. A. Alves, A. C. de Carvalho, W. Savino and P. M. Persechini (1996). "Characterization of P2Z purinergic receptors on phagocytic cells of the thymic reticulum in culture." Biochim Biophys Acta **1280**(2): 217-222.

Coutinho-Silva, R. and P. M. Persechini (1997). "P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): C1793-C1800.

Coutinho-Silva, R., L. Stahl, M. N. Raymond, T. Jungas, P. Verbeke, G. Burnstock, T. Darville and D. M. Ojcius (2003). "Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation." Immunity. **19**(3): 403-412.

Dahl, G. and R. W. Keane (2012). "Pannexin: from discovery to bedside in 11+/-4 years?" Brain Res **1487**: 150-159.

Davit-Spraul, A., E. Gonzales, C. Baussan and E. Jacquemin (2009). "Progressive familial intrahepatic cholestasis." Orphanet J Rare Dis **4**: 1.

Dell'Antonio, G., A. Quattrini, E. D. Cin, A. Fulgenzi and M. E. Ferrero (2002). "Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP." Arthritis Rheum. **46**(12): 3378-3385.

Dell'Antonio, G., A. Quattrini, E. Dal Cin, A. Fulgenzi and M. E. Ferrero (2002). "Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats." Neuroscience letters **327**(2): 87-90.

Dermietzel, R., T. K. Hwang, R. Buettner, A. Hofer, E. Dotzler, M. Kremer, R. Deutzmann, F. P. Thinning, G. I. Fishman, D. C. Spray and et al. (1994). "Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 499-503.

Di Virgilio, F., P. A. Borea and P. Illes (2001). "P2 receptors meet the immune system." Trends Pharmacol Sci. **22**(1): 5-7.

Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J. M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi and O. R. Baricordi (2001). "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." Blood **97**(3): 587-600.

Doyle, D. A., C. J. Morais, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." J Physiol **68**(3): 213-237.

Eiberger, J., J. Degen, A. Romualdi, U. Deutsch, K. Willecke and G. Sohl (2001). "Connexin genes in the mouse and human genome." Cell Commun Adhes **8**(4-6): 163-165.

Elinder, F., N. Akanda, R. Tofighi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, S. Orrenius and S. Ceccatelli (2005). "Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli." Cell Death Differ **12**(8): 1134-1140.

Emmelin, N. and W. Feldberg (1948). "Systemic effects of adenosine triphosphate." Br J Pharmacol Chemother **3**(4): 273-284.

Evans, W. H. and P. E. Martin (2002). "Gap junctions: structure and function (Review)." Mol Membr Biol **19**(2): 121-136.

Faria, R. X., F. P. de Farias and L. A. Alves (2005). "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?" Am J Physiol Cell Physiol **288**(2): C260-C271.

Fernandez-Echevarria, C., M. Diaz, I. Ferrer, A. Canerina-Amaro and R. Marin (2014). "Abeta promotes VDAC1 channel dephosphorylation in neuronal lipid rafts. Relevance to the mechanisms of neurotoxicity in Alzheimer's disease." Neuroscience **278**: 354-366.

Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther and V. F. Di (2006). "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." J Immunol **176**(7): 3877-3883.

Fields, R. D. and G. Burnstock (2006). "Purinergic signalling in neuron-glia interactions." Nat Rev Neurosci **7**(6): 423-436.

Firth, A. L., C. V. Remillard and J. X. Yuan (2007). "TRP channels in hypertension." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 895-906.

Garcia, R. A., M. Yan, D. Search, R. Zhang, N. L. Carson, C. S. Ryan, C. Smith-Monroy, J. Zheng, J. Chen, Y. Kong, H. Tang, S. E. Hellings, J. Wardwell-Swanson, J. E. Dinchuk, G. C. Psaltis, D. A. Gordon, P. W. Glunz and P. S. Gargalovic (2014).

"P2Y6 receptor potentiates pro-inflammatory responses in macrophages and exhibits differential roles in atherosclerotic lesion development." PLoS One **9**(10): e111385.

Gartland, A., K. A. Buckley, W. B. Bowler and J. A. Gallagher (2003). "Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts in vitro." Calcif.Tissue Int. **73**(4): 361-369.

Gartland, A., K. A. Buckley, R. A. Hipskind, W. B. Bowler and J. A. Gallagher (2003). "P2 receptors in bone--modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **13**(2-4): 237-242.

Gerevich, Z., S. J. Borvendeg, W. Schroder, H. Franke, K. Wirkner, W. Norenberg, S. Furst, C. Gillen and P. Illes (2004). "Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia." J Neurosci **24**(4): 797-807.

Gillespie, J. H. (1934). "The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid." J Physiol **80**(4): 345-359.

Gu, B. J., W. Zhang, R. A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J. A. Barden and J. S. Wiley (2001). "A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor." J Biol Chem **276**(14): 11135-11142.

Guibert, B., R. Dermietzel and D. Siemen (1998). "Large conductance channel in plasma membranes of astrocytic cells is functionally related to mitochondrial VDAC-channels." Int J Biochem Cell Biol **30**(3): 379-391.

Gunosewoyo, H. and M. Kassiou (2010). "P2X purinergic receptor ligands: recently patented compounds." Expert opinion on therapeutic patents **20**(5): 625-646.

Guo, C., M. Masin, O. S. Qureshi and R. D. Murrell-Lagnado (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." Mol.Pharmacol. **72**(6): 1447-1456.

Haines, W. R., G. E. Torres, M. M. Voigt and T. M. Egan (1999). "Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms." Mol Pharmacol **56**(4): 720-727.

Hill, K., K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner and N. Pfanner (1998). "Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]." Nature **395**(6701): 516-521.

Hilton, S. M. and P. Holton (1954). "Antidromic vasodilatation and blood flow in the rabbit's ear." J Physiol **125**(1): 138-147.

Hirschi, K. K., C. E. Xu, T. Tsukamoto and R. Sager (1996). "Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential." Cell Growth Differ **7**(7): 861-870.

Hodge, T. and M. Colombini (1997). "Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels." J Membr Biol **157**(3): 271-279.

Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius and P. B. Conley (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." Nature **409**(6817): 202-207.

Holton, F. A. and P. Holton (1954). "The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings." J Physiol **126**(1): 124-140.

Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." J Physiol **145**(3): 494-504.

Honore, P., D. Donnelly-Roberts, M. T. Namovic, G. Hsieh, C. Z. Zhu, J. P. Mikusa, G. Hernandez, C. Zhong, D. M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A. P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J. P. Sullivan, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2006). "A-740003 [N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat." J Pharmacol.Exp.Ther. **319**(3): 1376-1385.

International Transporter, C., K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y.

Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-
Gliszczyński and L. Zhang (2010). "Membrane transporters in drug development."
Nat Rev Drug Discov **9**(3): 215-236.

Islam, M. R., H. Uramoto, T. Okada, R. Z. Sabirov and Y. Okada (2012). "Maxi-anion
channel and pannexin 1 hemichannel constitute separate pathways for swelling-
induced ATP release in murine L929 fibrosarcoma cells." Am J Physiol Cell Physiol
303(9): C924-935.

Jacobson, K. A. and J. M. Boeynaems (2010). "P2Y nucleotide receptors: promise of
therapeutic applications." Drug Discov Today **15**(13-14): 570-578.

Jiang, L. H., M. Kim, V. Spelta, X. Bo, A. Surprenant and R. A. North (2003). "Subunit
arrangement in P2X receptors." J Neurosci. **23**(26): 8903-8910.

Kanjanamekanant, K., P. Luckprom and P. Pavasant (2014). "P2X7 receptor-
Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in
human periodontal ligament cells." J Periodontal Res **49**(5): 595-602.

Kawate, T., J. C. Michel, W. T. Birdsong and E. Gouaux (2009). "Crystal structure of
the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-598.

Ke, H. Z., H. Qi, a. F. Weidema, Q. Zhang, N. Panupinthu, D. T. Crawford, W. a.
Grasser, V. M. Paralkar, M. Li, L. P. Audoly, C. a. Gabel, W. S. S. Jee, S. J. Dixon, S.
M. Sims and D. D. Thompson (2003). "Deletion of the P2X7 nucleotide receptor
reveals its regulatory roles in bone formation and resorption." Molecular
endocrinology (Baltimore, Md.) **17**(7): 1356-1367.

Kennedy, C. and G. Burnstock (1985). "Evidence for two types of P2-purinoceptor in
longitudinal muscle of the rabbit portal vein." Eur.J Pharmacol **111**(1): 49-56.

Khakh, B. S. and R. A. North (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in
health and disease." Nature **442**(7102): 527-532.

Khakh, B. S. and R. A. North (2012). "Neuromodulation by extracellular ATP and P2X
receptors in the CNS." Neuron **76**(1): 51-69.

Kim, M., L. H. Jiang, H. L. Wilson, R. A. North and A. Surprenant (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." EMBO J **20**(22): 6347-6358.

King, B. F., A. Townsend-Nicholson, S. S. Wildman, T. Thomas, K. M. Spyer and G. Burnstock (2000). "Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in Xenopus oocytes." J Neurosci **20**(13): 4871-4877.

Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1996). "The gap junction communication channel." Cell **84**(3): 381-388.

Kusner, D. J. and J. Adams (2000). "ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D." J Immunol **164**(1): 379-388.

Lammas, D. A., C. Stober, C. J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam and D. S. Kumararatne (1997). "ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors." Immunity. **7**(3): 433-444.

Lazarowski, E. R., R. C. Boucher and T. K. Harden (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Molecular pharmacology **64**(4): 785-795.

Le, K. T., K. Babinski and P. Seguela (1998). "Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor." J Neurosci. **18**(18): 7152-7159.

Lê, K. T., E. Boué-Grabot, V. Archambault and P. Séguéla (1999). "Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits." The Journal of Biological Chemistry **274**(22): 15415-15419.

Lee, A., B. Fakler, L. K. Kaczmarek and L. L. Isom (2014). "More than a pore: ion channel signaling complexes." J Neurosci **34**(46): 15159-15169.

Lewis, C., S. Neidhart, C. Holy, R. A. North, G. Buell and A. Surprenant (1995). "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature **377**(6548): 432-435.

Liu, M., B. F. King, P. M. Dunn, W. Rong, A. Townsend-Nicholson and G. Burnstock (2001). "Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons." J Pharmacol Exp Ther **296**(3): 1043-1050.

Locovei, S., L. Bao and G. Dahl (2006). "Pannexin 1 in erythrocytes : Function without a gap." Sciences-New York **103**(20): 7655-7659.

Londos, C., D. M. Cooper and J. Wolff (1980). "Subclasses of external adenosine receptors." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **77**(5): 2551-2554.

Lustig, K. D., A. K. Shiau, A. J. Brake and D. Julius (1993). "Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **90**(11): 5113-5117.

MacKenzie, A., H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North and A. Surprenant (2001). "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding." Immunity. **15**(5): 825-835.

Maeno, E., Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama and Y. Okada (2000). "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9487-9492.

Maeno, E., N. Takahashi and Y. Okada (2006). "Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis." FEBS Lett **580**(27): 6513-6517.

Mahi, N., A. Kumar, A. S. Jaggi, N. Singh and R. Dhawan (2015). "Possible role of pannexin 1/P2x7 purinoceptor in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice." J Surg Res **196**(1): 190-199.

Mangel, A. W., J. R. Raymond and J. G. Fitz (1993). "Regulation of high-conductance anion channels by G proteins and 5-HT1A receptors in CHO cells." Am J Physiol **264**(3 Pt 2): F490-495.

Maqbool, R., R. Rashid, R. Ismail, S. Niaz, N. A. Chowdri and M. U. Hussain (2015). "The carboxy-terminal domain of connexin 43 (CT-Cx43) modulates the expression

of p53 by altering miR-125b expression in low-grade human breast cancers." Cell Oncol (Dordr).

McGaraughty, S., K. L. Chu, M. T. Namovic, D. L. Donnelly-Roberts, R. R. Harris, X. F. Zhang, C. C. Shieh, C. T. Wismer, C. Z. Zhu, D. M. Gauvin, A. C. Fabiyi, P. Honore, R. J. Gregg, M. E. Kort, D. W. Nelson, W. A. Carroll, K. Marsh, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2007). "P2X7-related modulation of pathological nociception in rats." Neuroscience **146**(4): 1817-1828.

Mellacheruvu, D., Z. Wright, A. L. Couzens, J. P. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V. Miteva, S. Hauri, M. E. Sardi, T. Y. Low, V. A. Halim, R. D. Bagshaw, N. C. Hubner, A. Al-Hakim, A. Bouchard, D. Faubert, D. Fermin, W. H. Dunham, M. Goudreault, Z. Y. Lin, B. G. Badillo, T. Pawson, D. Durocher, B. Coulombe, R. Aebersold, G. Superti-Furga, J. Colinge, A. J. Heck, H. Choi, M. Gstaiger, S. Mohammed, I. M. Cristea, K. L. Bennett, M. P. Washburn, B. Raught, R. M. Ewing, A. C. Gingras and A. I. Nesvizhskii (2013). "The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data." Nat Methods **10**(8): 730-736.

Migita, K., T. Ozaki, S. Shimoyama, J. Yamada, Y. Nikaido, T. Furukawa, Y. Shiba, T. M. Egan and S. Ueno (2016). "HSP90 Regulation of P2X7 Receptor Function Requires an Intact Cytoplasmic C-Terminus." Mol Pharmacol **90**(2): 116-126.

Mills, D. C., R. Puri, C. J. Hu, C. Minniti, G. Grana, M. D. Freedman, R. F. Colman and R. W. Colman (1992). "Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase." Arterioscler Thromb **12**(4): 430-436.

Ming, J., Y. Zhou, J. Du, S. Fan, B. Pan, Y. Wang, L. Fan and J. Jun (2015). "Identification of miR-200a as a novel suppressor of connexin-43 in breast cancer cells." Biosci Rep.

Mogul, D. J., M. E. Adams and A. P. Fox (1993). "Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca²⁺ current in hippocampal CA3 neurons." Neuron **10**(2): 327-334.

Müller, T., R. P. Vieira, M. Grimm, T. Dürk, S. Cicko, R. Zeiser, T. Jakob, S. F. Martin, B. Blumenthal, S. Sorichter, D. Ferrari, F. Di Virgillio and M. Idzko (2011). "A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans." American journal of respiratory cell and molecular biology **44**(4): 456-464.

Myrtek, D., T. Müller, V. Geyer, N. Derr, D. Ferrari, G. Zissel, T. Dürk, S. Sorichter, W. Luttmann, M. Kuepper, J. Norgauer, F. Di Virgilio, J. C. Virchow and M. Idzko (2008). "Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion 1." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **181**(3): 2181-2188.

Nicke, A. (2008). "Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits." Biochem Biophys Res Commun **377**(3): 803-808.

Nicke, A., H. G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler and G. Schmalzing (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." EMBO J. **17**(11): 3016-3028.

Nicke, A., D. Kerschensteiner and F. Soto (2005). "Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits." J Neurochem **92**(4): 925-933.

North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-1067.

Okada, S. F., W. K. O'Neal, P. Huang, R. A. Nicholas, L. E. Ostrowski, W. J. Craigen, E. R. Lazarowski and R. C. Boucher (2004). "Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells." J Gen Physiol **124**(5): 513-526.

Okada, Y. (1997). "Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor." Am J Physiol **273**(3 Pt 1): C755-789.

Okada, Y., E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki, J. Wang and S. Morishima (2001). "Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)." J Physiol **532**(Pt 1): 3-16.

Okada, Y., K. Sato and T. Numata (2009). "Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel." J Physiol **587**(Pt 10): 2141-2149.

Olah, M. E. (1997). "Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors." J Biol Chem **272**(1): 337-344.

Olah, M. E., H. Ren and G. L. Stiles (1995). "Adenosine receptors: protein and gene structure." Arch Int Pharmacodyn Ther **329**(1): 135-150.

Olah, M. E. and G. L. Stiles (1992). "Adenosine receptors." Annu Rev Physiol **54**: 211-225.

Pan, H. C., Y. C. Chou and S. H. Sun (2015). "P2X7 R-mediated Ca(2+) - independent d-serine release via pannexin-1 of the P2X7 R-pannexin-1 complex in astrocytes." Glia **63**(5): 877-893.

Panchin, Y., I. Kelmanson, M. Matz, K. Lukyanov, N. Usman and S. Lukyanov (2000). "A ubiquitous family of putative gap junction molecules." Curr Biol **10**(13): R473-474.

Park, K. S., S. W. Jeong, S. K. Cha, B. S. Lee, I. D. Kong, S. R. Ikeda and J. W. Lee (2001). "Modulation of N-type Ca²⁺ currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons." J Pharmacol Exp Ther **299**(2): 501-508.

Parvathenani, L. K., S. Tertyshnikova, C. R. Greco, S. B. Roberts, B. Robertson, R. Posmantur and B. Atp (2003). "P2X 7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer ' s Disease *." Biochemistry **278**(15): 13309-13317.

Paul, D. L. (1995). "New functions for gap junctions." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 665-672.

Pedersen, S. F., T. K. Klausen and B. Nilius (2015). "The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey." Acta Physiol (Oxf) **213**(4): 868-881.

Pelegrin, P. (2011). "Many ways to dilate the P2X7 receptor pore." Br J Pharmacol **163**(5): 908-911.

Pelegrin, P. and A. Surprenant (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor." EMBO J **25**(21): 5071-5082.

Pelliccia, F., F. Rollini, G. Marazzi, C. Greco, C. Gaudio and D. J. Angiolillo (2015). "Drug-drug interactions between clopidogrel and novel cardiovascular drugs." Eur J Pharmacol **765**: 332-336.

Peltz, G. A., B. Gallis and B. M. Peterlin (1987). "Monoclonal antibody immunoprecipitation of cell membrane glycoproteins." Anal Biochem **167**(2): 239-244.

Pfeiffer, Z. A., A. N. Guerra, L. M. Hill, M. L. Gavala, U. Prabhu, M. Aga, D. J. Hall and P. J. Bertics (2007). "Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation." Free Radic.Biol Med. **42**(10): 1506-1516.

Pierce, K. D., T. J. Furlong, L. A. Selbie and J. Shine (1992). "Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain." Biochem Biophys Res Commun **187**(1): 86-93.

Qiu, X., J. C. Cheng, J. Zhao, H. M. Chang and P. C. Leung (2015). "Transforming growth factor-beta stimulates human ovarian cancer cell migration by up-regulating connexin43 expression via Smad2/3 signaling." Cell Signal **27**(10): 1956-1962.

Qiu, Z., A. E. Dubin, J. Mathur, B. Tu, K. Reddy, L. J. Miraglia, J. Reinhardt, A. P. Orth and A. Patapoutian (2014). "SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel." Cell **157**(2): 447-458.

Quintas, C., D. Pinho, C. Pereira, L. Saraiva, J. Goncalves and G. Queiroz (2014). "Microglia P2Y(6) receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis." J Neuroinflammation **11**: 141.

Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.

Ramachandra, L., Y. Qu, Y. Wang, C. J. Lewis, B. A. Cobb, K. Takatsu, W. H. Boom, G. R. Dubyak and C. V. Harding (2010). "Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation." Infect Immun **78**(12): 5116-5125.

Rigato, C., N. Swinnen, R. Buckinx, I. Couillin, J. M. Mangin, J. M. Rigo, P. Legendre and H. Le Corronc (2012). "Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion." J Neurosci **32**(34): 11559-11573.

Roman, R. M., A. P. Feranchak, K. D. Salter, Y. Wang and J. G. Fitz (1999). "Endogenous ATP release regulates Cl⁻ secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells." Am J Physiol **276**(6 Pt 1): G1391-1400.

Rostovtseva, T. and M. Colombini (1996). "ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **271**(45): 28006-28008.

Ruppelt, A., W. Ma, K. Borchardt, S. D. Silberberg and F. Soto (2001). "Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor." J Neurochem **77**(5): 1256-1265.

Sabirov, R. Z. and P. G. Merzlyak (2012). "Plasmalemmal VDAC controversies and maxi-anion channel puzzle." Biochim Biophys Acta **1818**(6): 1570-1580.

Sabirov, R. Z., T. Sheiko, H. Liu, D. Deng, Y. Okada and W. J. Craigen (2006). "Genetic demonstration that the plasma membrane maxianion channel and voltage-dependent anion channels are unrelated proteins." J Biol Chem **281**(4): 1897-1904.

Sáez, J. C., M. C. Brañes, L. a. Corvalán, E. a. Eugeniín, H. González, a. D. Martínez and F. Palisson (2000). "Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles." Brazilian journal of medical and biological

research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.] 33(4): 447-455.

Saez, J. C., J. A. Connor, D. C. Spray and M. V. Bennett (1989). "Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2708-2712.

Saez, J. C., W. A. Gregory, T. Watanabe, R. Dermietzel, E. L. Hertzberg, L. Reid, M. V. Bennett and D. C. Spray (1989). "cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture." Am J Physiol **257**(1 Pt 1): C1-11.

Salvatore, C. A., M. A. Jacobson, H. E. Taylor, J. Linden and R. G. Johnson (1993). "Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10365-10369.

Schachter, J., A. P. Motta, Z. A. de Souza, H. A. da Silva-Souza, M. Z. Guimaraes and P. M. Persechini (2008). "ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages." J Cell Sci. **121**(Pt 19): 3261-3270.

Schulte, U., C. S. Muller and B. Fakler (2011). "Ion channels and their molecular environments--glimpses and insights from functional proteomics." Semin Cell Dev Biol **22**(2): 132-144.

Schwarzer, C., S. Becker, L. A. Awni, T. Cole, R. Merker, S. Barnikol-Watanabe, F. P. Thinner and N. Hilschmann (2000). "Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes." Int J Biochem Cell Biol **32**(10): 1075-1084.

Solle, M., J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths and C. A. Gabel (2001). "Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors." J Biol Chem **276**(1): 125-132.

Somogyi, C. S., C. Matta, Z. Foldvari, T. Juhasz, E. Katona, A. R. Takacs, T. Hajdu, N. Dobrosi, P. Gergely and R. Zakany (2015). "Polymodal Transient Receptor

Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells." Int J Mol Sci **16**(8): 18412-18438.

Spelta, V., L. H. Jiang, A. Surprenant and R. A. North (2002). "Kinetics of antagonist actions at rat P2X_{2/3} heteromeric receptors." Br J Pharmacol **135**(6): 1524-1530.

Stoop, R., S. Thomas, F. Rassendren, E. Kawashima, G. Buell, A. Surprenant and R. A. North (1999). "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C." Mol Pharmacol **56**(5): 973-981.

Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North and G. Buell (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇)." Science. **272**(5262): 735-738.

Surprenant, A., D. A. Schneider, H. L. Wilson, J. J. Galligan and R. A. North (2000). "Functional properties of heteromeric P2X_{1/5} receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles." J Auton Nerv. Syst **81**(1-3): 249-263.

Suzuki, M. (2006). "The Drosophila tweety family: molecular candidates for large-conductance Ca²⁺-activated Cl⁻ channels." Exp Physiol **91**(1): 141-147.

Suzuki, M. and A. Mizuno (2004). "A novel human Cl⁻ channel family related to Drosophila flightless locus." J Biol Chem **279**(21): 22461-22468.

Tanmahasamut, P. and N. Sidell (2005). "Up-regulation of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression by retinoic acid in human endometrial stromal cells." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4151-4156.

Thinnes, F. P. (2015). "After all, plasmalemmal expression of type-1 VDAC can be understood. Phosphorylation, nitrosylation, and channel modulators work together in vertebrate cell volume regulation and either apoptotic pathway." Front Physiol **6**: 126.

Thinnes, F. P. (2015). "Phosphorylation, nitrosation and plasminogen K3 modulation make VDAC-1 lucid as part of the extrinsic apoptotic pathway-Resulting thesis:

Native VDAC-1 indispensable for finalisation of its 3D structure." Biochim Biophys Acta **1848**(6): 1410-1416.

Torres, G. E., W. R. Haines, T. M. Egan and M. M. Voigt (1998). "Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel." Mol Pharmacol **54**(6): 989-993.

Trauner, M. and J. L. Boyer (2003). "Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation." Physiol Rev **83**(2): 633-671.

Valera, S., N. Hussy, R. J. Evans, N. Adami, R. A. North, A. Surprenant and G. Buell (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP." Nature **371**(6497): 516-519.

van Calker, D., M. Muller and B. Hamprecht (1979). "Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells." J Neurochem. **33**(5): 999-1005.

Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.

Virginio, C., A. MacKenzie, F. A. Rassendren, R. A. North and A. Surprenant (1999). "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." Nat.Neurosci. **2**(4): 315-321.

Voss, F. K., F. Ullrich, J. Munch, K. Lazarow, D. Lutter, N. Mah, M. A. Andrade-Navarro, J. P. von Kries, T. Stauber and T. J. Jentsch (2014). "Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC." Science **344**(6184): 634-638.

Wallentin, L., R. C. Becker, A. Budaj, C. P. Cannon, H. Emanuelsson, C. Held, J. Morrow, S. Husted, S. James, H. Katus, K. W. Mahaffey, B. M. Scirica, A. Skene, P. G. Steg, R. F. Storey, R. A. Harrington, P. Investigators, A. Freij and M. Thorsen (2009). "Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes." N Engl J Med **361**(11): 1045-1057.

Webb, T. E., J. Simon, B. J. Krishek, A. N. Bateson, T. G. Smart, B. F. King, G. Burnstock and E. A. Barnard (1993). "Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor." FEBS Lett. **324**(2): 219-225.

Yamasaki, H. and C. C. Naus (1996). "Role of connexin genes in growth control." Carcinogenesis **17**(6): 1199-1213.

Yang, D., Y. He, R. Munoz-Planillo, Q. Liu and G. Nunez (2015). "Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock." Immunity **43**(5): 923-932.

Young, M. T., J. A. Fisher, S. J. Fountain, R. C. Ford, R. A. North and B. S. Khakh (2008). "Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy." J Biol Chem **283**(38): 26241-26251.

Yu, W. H. and M. Forte (1996). "Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria?" J Bioenerg Biomembr **28**(2): 93-100.

Zhou, Q. Y., C. Li, M. E. Olah, R. A. Johnson, G. L. Stiles and O. Civelli (1992). "Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7432-7436.