

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Dinarte Neto Moreira Ferreira*

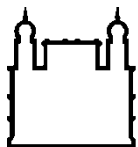
**Estudo Estrutural de Parte do Domínio M2 do Receptor P2X7 Humano**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Anastácio Alves

**RIO DE JANEIRO**

2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***Dinarte Neto Moreira Ferreira***

**Estudo Estrutural de Parte do Domínio M2 do Receptor P2X7 Humano**

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Anastácio Alves

**Aprovada em: 02 / 08 / 2013**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Prof. Dr. Fabio Ceneviva Lacerda Almeida

Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena

**Revisor:**

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior

Rio de Janeiro, 02 de Agosto de 2013

Ferreira, Dinarte Neto Moreira.

Estudo Estrutural de Parte do Domínio M2 do Receptor P2X7 humano /  
Dinarte Neto Moreira Ferreira. - Rio de Janeiro, 2013.  
82 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2013.

Orientador: Luiz Anastácio Alves.

Bibliografia: f. 68-82

1. Canais Iônicos. 2. Domínio Transmembrana. 3. P2X7. 4. RMN. 5.  
Dinâmica Molecular. I. Título.

## **Lista de abreviações**

**5-HT** – Serotonina

**5-HTR** – Receptor de Serotonina

**Ach**- Acetilcolina

**AMPA** – Ácido 2-amino-3-(3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-yl) propanoico

**AMPAR** – receptor de Ácido 2-amino-3-(3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-yl) propanoico

**Asp** – Aspartato

**ATP** - Trifosfato de adenosina

**Bz- ATP** - 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine--5'-trifosfato

**CALHM1** - modulador da homeostase de cálcio

**COX-2** – Ciclo oxigenasse 2

**Cys**- Cisteína

**DMSO** – Dimetil sulfóxido

**DPC**- Dodecilfosfo colina

**GABA** – Ácido gama amino butírico

**GABAR** – Receptor de Ácido gama-aminobutírico

**GDP** – Difosfato de guanosina

**Glu** –Glutamato

**GluR** –Receptor de Glutamato

**Gly**– Glicina

**GlyR** – Receptor de Glicina

**GTP**- Trifosfato de guanosina

**hP2X7** –Receptor P2X7 humano

**IL-13** - Interleucina 13

**IL-18** – Interleucina 18

**IL-1 $\alpha$**  –Interleucina 1  $\alpha$

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1  $\beta$

**IL-2**- Interleucina 2

**IL-4**- Interleucina 4

**IL-6** – Interleucina 6

**iNOS** – Oxido nítrico sintetase induzida

**JNK** – Janus quinase

**LGIC** –Ligand gated ion channels

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MAPK**- Proteína quinase ativada por mitose

**MTSEA** - 2-Aminoetil -Hydrobromida Metano-Tiosulfonada

**nAChR** – Receptor de Acetilcolina nicotínico

**NFAT**- Fator nuclear de células T ativadas.

**NF- $\kappa\beta$**  – Fator Nuclear  $\kappa\beta$

**NMDA** - N-metil D-Aspartato

**NMDAR** – Receptor de N-metil D-Aspartato

**NOESY** – Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser

**PX7R** – Receptor P2X7

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**TFE** – Ácido trifluoracético

**TM** – Transmembrana

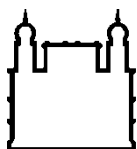
**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TOCSY** – Espectroscopia de correlação total

**TRPV1** - receptor vaniloide de potencial transiente

**zfP2X4** – Receptor P2X4 de peixe zebra



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Estudo Estrutural de Parte do Domínio M2 do Receptor P2X7 Humano

### RESUMO

O receptor P2X7 é um canal iônico trimérico ativado por ligante. Quando ativado pelo ATP, seu agonista natural, abre um canal cátion seletivo, entretanto, quando ativado por altas concentrações de ATP a célula se torna permeável a corantes de alto peso molecular por um poro não seletivo de identidade desconhecida. Há duas hipóteses para a abertura deste poro, a primeira consiste na dilatação do próprio canal iônico e a segunda consiste na necessidade de recrutar novas subunidades para a formação do poro, contudo estas hipóteses permanecem controversas na literatura. Não há modelos estruturais derivados de estudos de ressonância magnética nuclear ou cristalografia de raios-x na literatura que venham a auxiliar nesta questão. O entendimento dos mecanismos de ativação do P2X7R poderia ajudar no desenho de novos antagonistas de potencial clínico, visto que a ativação do P2X7R está envolvido com dor neuropática, doenças inflamatórias como a artrite reumatoide e leucemia linfocítica. Dados na literatura sugerem que o P2X7R possui dois domínios transmembrana por subunidade e que o domínio transmembrana 2 forma a luz do canal iônico. Entretanto, algoritmos especializados na predição de hélices transmembrana não entram em acordo sobre quais resíduos formariam a região transmembrana 2 do P2X7R. Todas as predições se focam em uma região de 47 resíduos altamente hidrofóbica, mas variam em relação a quais resíduos estariam atravessando a membrana. Além disso, esta região hidrofóbica contém resíduos consenso entre todos os subtipos P2X. Desta maneira, fomos estudar parte deste segmento hidrofóbico que foi denominado peptídeo ADSEG (FGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVY). Dados publicados pelo nosso grupo mostram que, assim como os domínios transmembrana do receptor de ACh e de glicina, este peptídeo era capaz de formar canais iônicos cátions seletivos em membranas artificiais. Estas informações sugerem que este segmento tem um papel importante na seletividade iônica do P2X7R e pode estar localizado na membrana ou na região adjacente, podendo adentrar a membrana durante o mecanismo de ativação, possivelmente durante a abertura do poro não seletivo. Neste trabalho determinamos a estrutura do peptídeo ADSEG por RMN utilizando o DMSO como mimético de membrana e verificamos a estabilidade da estrutura de menor energia obtida por dinâmica molecular, como uma maneira de refinar a estrutura. O peptídeo se apresentou estruturado em parte em  $\alpha$ -hélice e parte em folha- $\beta$ , em acordo com os resultados na literatura por FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Este dobramento poderia explicar o fato dos programas de predição de hélices transmembrana não entrarem em acordo se esta região, que é altamente hidrofóbica, poder estar ou não atravessando a membrana. Novos experimentos são necessários para sustentar se este segmento está ou não localizado na região transmembrana 2 do P2X7 e se ele estaria participando a atividade de canal iônico ou na de poro não seletivo.

## **Structural study of consensus segment adjacent to the second transmembrane domain of hP2X7 receptor**

### **ABSTRACT**

P2X7 receptor is a trimeric ligand-gated ion channel. When activated by the naturally occurring agonist ATP it opens a cation selective channel, however, when activated by high ATP concentrations, it allows the cells to become permeable to large weight dyes through a unidentified non selective pore. There are two hypotheses for this phenomena: the first one consists in a dilatation of the ion channel itself and the second highlights the need of another subunit to assemble the pore, however, this issue remains controversial in the literature. There are no structural models available from nuclear magnetic resonance or x-ray crystallography studies that help one to solve this issue. The understanding of the P2X7R activation underlying mechanisms may help to design new antagonists, that can be used in clinic, once P2X7R activation is related to diseases such as neuropathic pain, inflammatory diseases and lymphocytic leukemia. Available data in literature suggests two transmembrane domains per subunit and the second transmembrane domain forms the ion conducting pathway. However, algorithms specialized in predict membrane spanning segments do not agree in which residues spans the membrane. The predictions keep in a high hydrophobicity 47 residues segment but varies in which residues would be in contact with the membrane. In this context, we begin to study part of this hydrophobic segment, and called it ADSEG peptide. Data published by our group shows that, as seen for AChR and GlyR transmembrane segments, this peptide can form cation selective channels in artificial bilayers. This data suggests that this segment might play an important role in P2X7R ion selectivity and may be localized in the membrane or adjacent to it and play a role in the non selective pore formation indeed. In this work, we solve the structure of the ADSEG peptide in DMSO as a membrane mimetic environment and inspect its stability of the less energy structure by molecular dynamics simulations as a manner to refine the structure. The peptide shows structured part in  $\alpha$ -helix and part in  $\beta$ -sheet, in agreement with previous data in literature by FTIR spectroscopy. This fold pattern may explain the fact that the  $\alpha$ -helix membrane spanning predictions algorithms cannot agree in which of the hydrophobic segment residues are buried in the membrane environment. New experiments are needed to support whether this segment is or is not localized in the P2X7R second transmembrane domain and if it plays a role in ion channel or non-selective pore formation mechanism.



***“Não é sinal de saúde estar bem adaptado a uma sociedade profundamente doente.”***

Jiddu Krishnamurti (1895-1986)

Abreviaturas	i
Resumo	iv
Abstract	v

## Capítulos:

<b>1-Introdução</b> .....	1
1.1 Canais iônicos ativados por ligante.....	1
1.1.1. LGIC Pentaméricos (Receptores “Cys-Loop”).....	2
1.1.2 LGIC Tetraméricos.(Receptores de Glutamato).....	6
1.1.3- LGIC Triméricos (Receptores P2X).....	7
1.1.3.1 Subtipo P2X7.....	14
1.1.3.1.1 – Características estruturais e funcionais.....	13
1.1.3.1.2 Potencial Terapêutico do P2X7R.....	23
1.2 Abordagem de Dividir e Conquistar.....	25
<b>2- Objetivos</b> .....	29
2.1 Objetivos Gerais.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>3- Materiais e Métodos</b> .....	30
3.1 Síntese do peptídeo.....	30
3.2 Preparação da amostra.....	30
3.3 Experimentos de RMN.....	30
3.3.1 Espectro de NOESY .....	31
3.3.2 Espectro de TOCSY.....	31
3.3.3 Assinalamento do Espectro.....	33

3.4 Dinâmica Molecular.....	34
<b>4- Resultados.....</b>	<b>38</b>
4.1 Experimentos de RMN.....	35
4.1.1 Espectro 1D.....	35
4.1.2 Predição da estrutura secundária.....	35
4.1.3 Curva de <i>build up</i> .....	37
4.1.4 Assinalamento do Espectro.....	41
4.2 Dinâmica Molecular.....	44
5- Discussão.....	56
6- Conclusões.....	67
7- Perspectivas.....	67
8- Referências.....	68

**Figuras e Tabelas:**

Figura 1.1.....	5
Figura 1.2.....	6
Figura 1.3.....	9
Figura 1.4.....	10
Tabela 1.5.....	13
Figura 1.6.....	14
Figura 1.7.....	26
Figura 3.1.....	32
Figura 3.2.....	36
Figura 4.1.....	39
Figura 4.2.....	41

Figura 4.3.....	42
Figura 4.4.....	42
Figura 4.5.....	43
Figura 4.6.....	43
Figura 4.7.....	45
Tabela 4.8.....	46
Figura 4.9.....	46
Tabela 4.1.....	47
Figura 4.10.....	48
Figura 4.11.....	48
Figura 4.12.....	50
Figura 4.13.....	51
Figura 4.14.....	52
Figura 4.15.....	53
Figura 4.16.....	54
Figura 4.17.....	54
Figura 4.18.....	55
Figura 5.1.....	56
Figura 5.2.....	58
Tabela5.1.....	59
Figura 5.3.....	62
Figura 5.4.....	65
Figura 5.5.....	66

## 1- **Introdução**

### 1.1 **Canais iônicos ativados por ligantes**

Há cerca de 70 anos houve um grande avanço no entendimento sobre a condução nervosa, principalmente através dos estudos com os axônios gigantes de lula. Esses trabalhos descreviam certas alterações elétricas nos neurônios, o que foi prontamente associado ao movimento de íons pela membrana, uma vez que se observavam também mudanças nas concentrações de determinados íons acompanhando tais fenômenos eletrofisiológicos. Entretanto, não se sabia como estes íons atravessavam a membrana. Os próprios cientistas na época imaginavam que alguma entidade molecular promovia tal passagem (1). Foi só há 43 anos atrás que foi purificado o primeiro canal iônico, o receptor de acetilcolina nicotínico do peixe *Torpedo*, o qual podemos encontrar em grandes quantidade no órgão elétrico deste peixe e purificá-lo com relativa facilidade (2). Desde então, outros canais iônicos foram descobertos e classificados de acordo com o critério de permissividade a íons, mecanismos de ativação/abertura e características estruturais, dentre eles podemos destacar os canais iônicos que ficam a maior parte do tempo abertos, os que se abrem em resposta a uma mudança de potencial na membrana e os que se abrem mediante a ligação de um ligante específico (3).

Os canais iônicos ativados por ligantes (LGIC – *ligand-gated ion channels*) permitem que mensageiros extracelulares controlem a passagem de determinados íons pela membrana de acordo com o gradiente eletroquímico. Até a presente data, podemos classificar os LGIC em famílias estruturalmente distintas: a família dos pentaméricos (também conhecida como família *Cys-Loop*), os tetraméricos (receptores de glutamato) e os triméricos (receptores P2X).

A ativação dos LGIC pode ser dividida em 3 estágios distintos: 1) ligação do agonista 2) propagação do sinal e 3) abertura do canal iônico. No primeiro estágio há a interação do agonista com o seu sítio de ligação, o que leva a modificações alostéricas que se propagam pelo receptor até ele se estabilizar, e esta nova estrutura estável resulta na abertura do canal seletivo na região transmembrana, promovendo a passagem dos íons antes impermeáveis à

membrana. Após este processo, o receptor tende a entrar em um estado dessensibilizado, no qual ele mantém a afinidade pelo agonista, mas não promove a abertura do canal (3).

### **1.1.1 LGIC pentaméricos (Receptores “Cys-Loop”)**

A família de receptores ativada por ligantes pentaméricos é certamente o subgrupo de LGIC mais bem estudado. Essa família também é conhecida como *Cys-loop*, devido à presença de um loop extracelular característico que é mantido por pontes dissulfeto (embora hoje conheçamos homólogos de bactérias que não possuam esta característica) (4). Todos os receptores desta família apresentam o N- terminal voltado para a face extracelular, o qual contém o sítio de ligação ao agonista, 4 domínios transmembrana (TM) conectados por duas alças intracelulares (TM1-TM2 e TM3 e TM4), uma alça extracelular (TM2-TM3), e o domínio C-terminal também voltado para o meio extracelular. O TM2 forma a luz do canal e é cercado pelos outros TMs, que o fazem com que ele não tenha contato direto com a membrana (2, 4).

Os principais receptores desta família são: receptor de serotonina (5-HT<sub>1R</sub>), receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs), receptores de GABA (GABA<sub>A</sub>Rs) e o receptores de glicina (GlyRs) (2). Os dois primeiros são receptores excitatórios, ou seja, promovem a despolarização da membrana mediante a ligação do agonista enquanto os dois últimos são inibitórios, promovendo a hiperpolarização da membrana (salvo os casos do receptor GABA no desenvolvimento pós-natal, que em virtude do gradiente de Cl<sup>-</sup> têm o efeito excitatório (5)). Dentre os quatro tipos de LGIC pentaméricos aqui descritos, temos uma grande variedade de subtipos que compreendem a combinação de subunidades diferentes e *splicing* variantes, resultando em, por exemplo, 19 subtipos de receptores GABA e mais de 10 subtipos de receptores de acetilcolina nicotínicos (2).

O maior avanço em relação a estrutura dos LGIC pentaméricos são as estruturas dos receptores de acetilcolina de dois peixes (*Torpedo* e *Electrophorus*) (2, 6, 7). Dentre estas duas estruturas, a do *Torpedo* apresenta uma maior similaridade com a sequência do receptor de acetilcolina humano (6). Esses estudos sobre a estrutura deste subtipo de receptor nicotínico

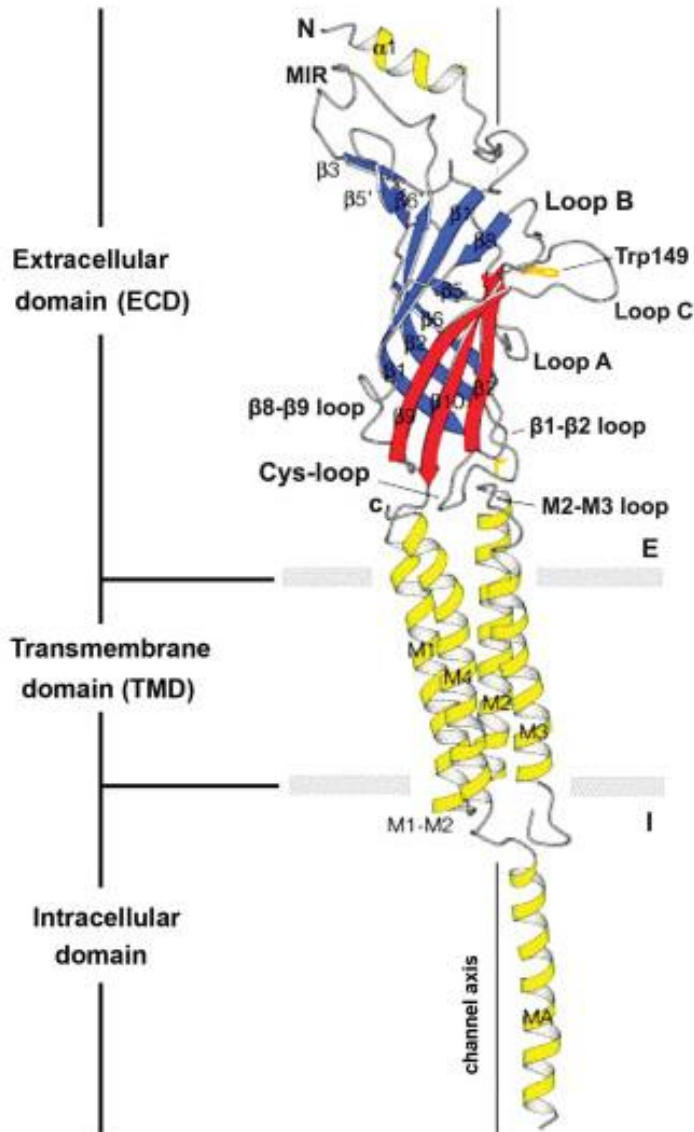
revelaram que este apresentava os domínios transmembrana configurados em  $\alpha$ -hélice, a região extracelular rica em folhas- $\beta$  (Figura 1.1) com o sítio de ligação do agonista no encontro de duas subunidades diferentes (7).

Os domínios transmembrana se organizam de maneira a formar um vestíbulo que permite a passagem dos íons pelo receptor, sendo que o domínio TM2 forma a luz do canal propriamente dito (Figura 1). Neste vestíbulo podemos observar uma distribuição de resíduos carregados negativamente, o que promove a seletividade a cátions. É importante ressaltar que o vestíbulo é estreito o suficiente para permitir que estes resíduos promovam um efeito de carga sobre os íons que o atravessam (8). Os domínios são alinhados verticalmente (em relação ao plano da membrana), desta maneira o vestíbulo é formado de anéis concêntricos, com resíduos na maioria das vezes, iguais. Levando isso em consideração, B. Hille, propôs a nomenclatura no qual os resíduos que formam estes anéis sejam numerados de acordo com sua posição, contanto a partir do meio extracelular para o meio intracelular (0', 1', 2', 3', etc...) (3). O anéis próximos à região extracelular são formados por resíduos carregados enquanto os anéis na parte central do vestíbulo são formados, de uma maneira geral, resíduos não carregados. Logo, podemos inferir que os íons são atraídos para o vestíbulo pelas cargas negativas dos primeiros anéis, passam pela parte central do vestíbulo e saem do outro lado da membrana (3). Esses estudos sobre estas estruturas do receptor de acetilcolina nicotínico sustentam estudos de mutagênese que mostraram os efeitos na substituição destes resíduos carregados nas características eletrofisiológicas deste receptor. Nos receptores de acetilcolina e de serotonina, temos uma predominância de resíduos carregados negativamente no limite extracelular do canal (nos primeiros anéis), enquanto no GABAR e no GlyR temos uma predominância de resíduos carregados positivamente. Logo, ao promovermos mutações nestes resíduos, podemos inverter (substituindo por resíduos de carga oposta) ou anular (substituindo por resíduos não carregados) estas cargas e fazer com que o receptor mude seus parâmetros de condutância e/ou de seletividade (9-14). Por exemplo, em um importante estudo com o receptor de serotonina de ratos, o autor alinhou o TM2 de 4 tipos diferentes de receptores da família de LGIC pentaméricos e verificou que

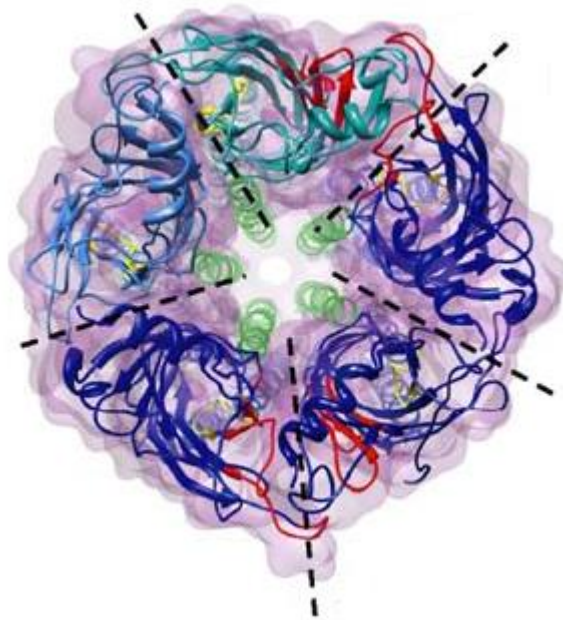
## Introdução |

certos resíduos eram bastante conservados tanto entre os canais cátion seletivos quanto nos ânion seletivos, todavia, o autor queria descobrir quais seriam os resíduos determinantes entre o canal ser cátion- ou ânion seletivo. Após diversos testes foi concluído que 3 mutações eram capazes de inverter a seletividade do receptor. Neste caso, foi substituída a valina 291 por uma treonina, o glutamato 179 por uma alanina e a inserção de uma prolina altamente conservada entre os canais ânion seletivos entre os resíduos 276 e 277 (14). Desta maneira, vemos a importância da localização destes resíduos em relação à seletividade. Interessantemente, o segundo domínio TM do receptor de acetilcolina consegue, por si só, formar canais iônicos cátion seletivos em bicamadas lipídicas planares. Além disso, a estrutura deste peptídeo foi determinada por ressonância magnética nuclear em uma bicamada lipídica, mostrando que o mesmo se configura, assim como o esperado, como uma hélice, permitindo assim a construção de um modelo de organização do canal. Juntamente com dados de mutagenese e ensaios de acessibilidade à cisteína, foi possível determinar quais resíduos formariam a luz do canal (15).





**Figura 1.1 Vista lateral de uma subunidade do receptor de acetilcolina do peixe *Torpedo*.** A subunidade do receptor de acetilcolina é mostrada na representação *cartoon*. As linhas cinzas representam a região relativa a membrana, separando os espaços intra e extra-celular. Cada subunidade é composta por 4 domínios transmembrana em  $\alpha$ -hélice e a região extracelular é rica em folhas- $\beta$ . (Adaptado de Zouridakis, M. *et al* 2009 (4))



**Figura 1.2 Estrutura do receptor de acetilcolina do peixe *Torpedo* visto da fenda sináptica.** Nesta figura são mostradas as estruturas secundárias com as nuvens eletrônicas em roxo. Os limites entre as subunidades diferentes estão representados pela linha pontilhada. Cinco subunidades formam o receptor, com o TM2 em verde (formando a luz do canal), o domínio de interação com o agonista e vermelho (observe que este se encontra entre duas subunidades adjacentes) e o domínio *Cys-loop* em amarelo. Note que os TM2 se alinham como um anel formando um vestíbulo aquoso por onde passam os íons. (Adaptado de Miller e Smart, 2009 (7))

### **1.1.2 – LGIC tetraméricos. (Receptores de glutamato)**

A superfamília dos LGIC tetraméricos é formada pelos receptores de glutamato. São receptores excitatórios do sistema nervoso central cátion seletivos e são classificados de ponto de vista farmacológico pelo nome dos seus agonistas preferenciais: AMPA (Ácido 2-amino-3-(3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-yl) propanoico), NMDA (N-metil D-Aspartato) e kainato (16).

Os receptores de NMDA são formados por combinações necessariamente heteroméricas das subunidades GluN1, GluN2A, GluN2D, GluN3A e GluN3B (17, 18), formando canais que permitem a passagem de

$\text{Ca}^{++}$  e podem ser bloqueados por  $\text{Mg}^{++}$  (19) e  $\text{Z}^{++}$  (20). Em contraste, os chamados receptores não NMDA, como os receptores de AMPA (AMPA) (21), são formados por combinações tanto heteroméricas quanto homoméricas de subunidades GluA1-4 e são insensíveis a  $\text{Mg}^{++}$ . Já os receptores de kainato são formados pela combinação das subunidades tanto homo quanto heteroméricas das subunidades GluK1-5(22). Os AMPAR e os NMDAR participam da comunicação sináptica, enquanto o receptor de kainato tem o papel associado à plasticidade neural(16).

O maior avanço no estudo dos receptores de glutamato foram as estruturas do homotetrâmero AMPAR formado pela subunidades GluA2 nos estados aberto, fechado e dessensibilizado (23). Como predito, o receptor possui quatro domínios TM: o domínio TM3 forma a luz do canal juntamente com um motivo denominado *pore-like helix*, que constitui uma pequena hélice com uma volta contendo a sequência H5, uma sequência altamente conservada nos canais de  $\text{K}^{+}$  (24) que tem o papel associado com a seletividade iônica. Os domínios TM1 e TM4 ficam posicionados de maneira periférica à luz do canal, interagindo com a bicamada lipídica.

### **1.1.3- LGIC triméricos (Receptores P2X)**

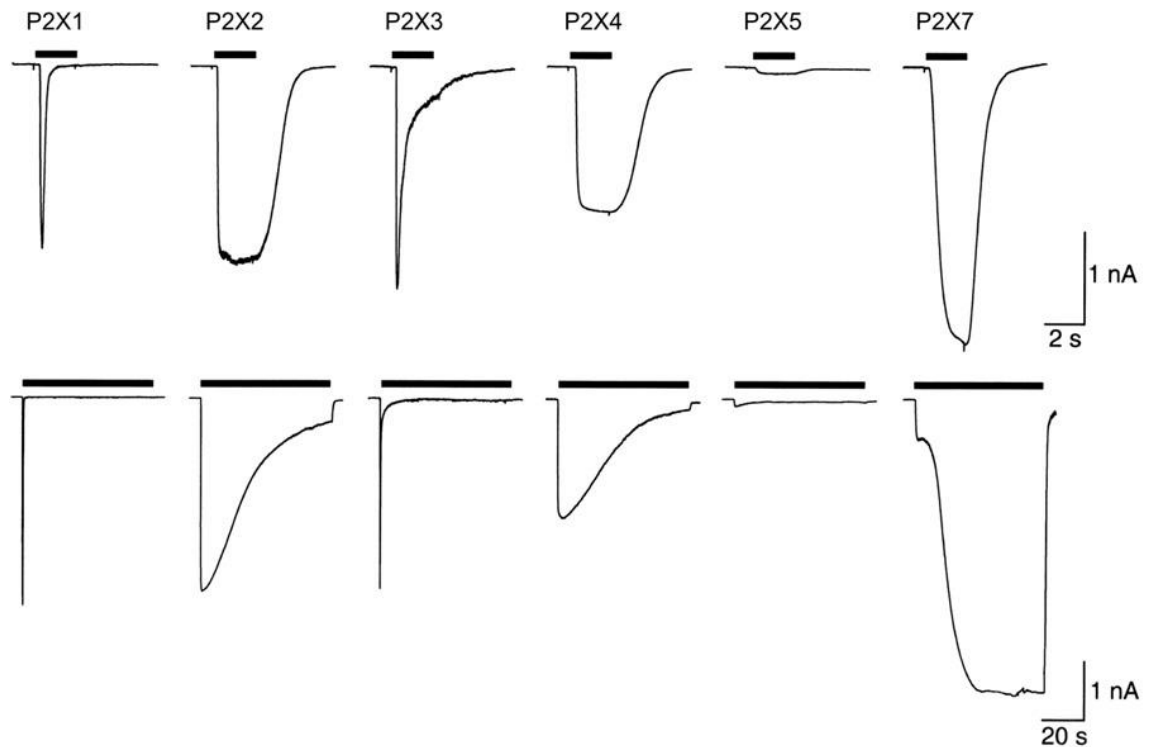
Os LGIC triméricos são também conhecidos como família P2X. Os receptores desta família são ativados por seus agonistas fisiológicos ATP e ADP, além de agonistas sintéticos como Bz-ATP e  $\alpha\beta$ -metil-ATP, os quais apresentam diferentes sensibilidades a tais ligantes(25). Os receptores P2X são encontrados em diversos tecidos, como por exemplo, tecido epitelial, células do sistema imune e sistema nervoso central e periférico (26, 27). Os subtipos de receptores P2X são codificados por 7 genes (P2X1-P2X7 – numeração relativa a ordem a qual os genes foram clonados), os quais vão gerar subunidades que se oligomerizam como os homotrimeros P2X1, P2X2,P2X3, P2X4,P2X5,P2X7 (a subunidade P2X6 não é capaz de formar homomeros (28)) ou como os heterotrimeros P2X1/P2X4 (29), P2X1/P2X5 (30), P2X2/P2X3 (31), P2X2/P2X6 (32) P2X4/P2X6 (33) e P2X4/P2X7 (34).

Todos os 7 genes codificam subunidades com a mesma topologia básica: os domínios N- e C-terminal voltados para o citoplasma, uma grande

alça extracelular entre dois domínios transmembrana. O número de resíduos em cada subunidade varia de 379 (P2X6) a 595 (P2X7) (35). Esse padrão estrutural comparado às outras superfamílias de LGIC se revelou bastante simples e se assemelha bastante aos canais iônicos sensíveis a ácido (36, 37), embora haja pouca similaridade na sequência de aminoácidos.

Os receptores P2X ao serem ativados pelos seus agonistas abrem um canal cátion-seletivo (com exceção do receptor P2X5, que é ânion seletivo) (25, 35, 38), sendo que cada receptor apresenta diferentes cinéticas de ativação e abertura, onde cada padrão de corrente representa uma identidade do receptor (Figura 1.3). Entretanto, o subtipo P2X7 apresenta um comportamento peculiar no qual ao ser ativado prolongadamente ou com altas concentrações de ATP (na faixa de mM), abre um canal de alta condutância (400pS) que permite a passagem de moléculas de alto peso molecular (39-41). Ainda não se sabe o mecanismo de formação desse poro não seletivo e as hipóteses serão discutidas adiante.

O grande avanço no entendimento sobre a estrutura dos receptores P2X foram os modelos estruturais obtidos a partir dos estudos de cristalografia de raios-x do homotrímero P2X4 de peixe zebra (zfP2X4R) no estado fechado (42) e no estado aberto (43), ligado ao ATP. É importante salientar que o processo de cristalização só foi possível retirando os segmentos intracelulares do receptor (tanto o domínio N- quanto o C-terminal), entretanto, a caracterização eletrofisiológica do receptor revelou que o canal iônico era funcional. O modelo estrutural do zfP2X4 também revelou que, de maneira semelhante à superfamília de receptores pentaméricos, o sítio de ligação ao agonista no receptor zfP2X4 se encontra no limite entre duas subunidades (43).



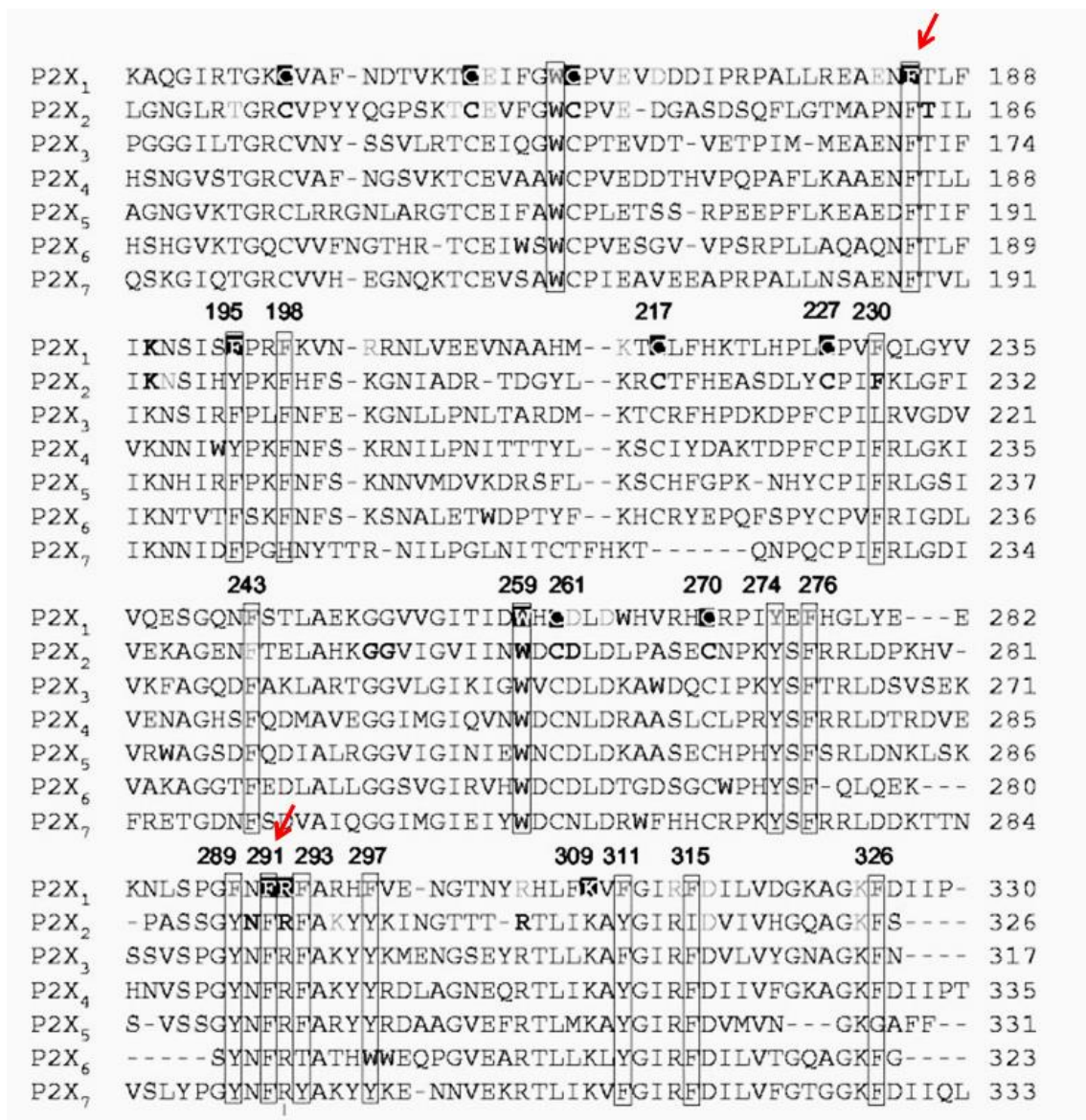
**Figura 1.3: Cinética de abertura e dessensibilização dos diferentes homotrímeros de receptores P2X.** Registro de corrente de todos os canais unitários presente na membrana de células HEK293 transfectadas com o subtipo P2X indicado na parte de cima do registro pela técnica de *patch-clamp* modalidade *whole cell*. A barra preta representa o tempo de aplicação do ATP. Note a diferença da escala de tempo entre as correntes da parte superior e inferior da figura. A ausência do P2X6R acontece pela sua incapacidade de formar homotrímeros (Adaptado de Khakh, 2012) (25).

Este padrão de sítio de ligação ao agonista já era esperado para o subtipo P2X1R, como foi demonstrado com a abordagem utilizando *cross-linkers* (44)). Estudos de mutagênese sítio dirigida sugerem que, assim como em outras proteínas de interação com o ATP (45), o sítio de ligação ao ATP nos P2XRs possa ser formado por resíduos carregados positivamente, os quais podem interagir com os grupamentos fosfato carregados negativamente, e por resíduos aromáticos, que poderiam interagir com a adenina (46). Por exemplo, quando feitas mutações nos resíduos Phe185 ou Phe291 do P2X1R, o  $EC_{50}$  do ATP foi aumentado de 0.87  $\mu$ M (no tipo selvagem) para 8,66  $\mu$ M (F185) e 140,93  $\mu$ M (F291). Quando feito o alinhamento múltiplo entre os subtipos P2X vemos que essas fenilalaninas são altamente conservadas entre todos os



## Introdução

subtipos (Figura 1.4), o que sugere uma função em comum (neste caso a capacidade de se ligar ao ATP) (47). Algumas lisinas conservadas também parecem estar envolvidas com o sítio de interação com o ATP. Mutações nestas lisinas também afetam o  $EC_{50}$  do ATP, como mostrado na tabela 1. Corroborando com estes dados, estas lisina estão presentes no sítio de interação com o ATP no zfP2X4R (43).



**Figura 1.4 Alinhamento múltiplo entre as subunidades P2X (aqui mostrado somente do resíduo 188 ao 333). Os resíduos nas caixas são altamente conservados entre todos os subtipos. As setas vermelhas indicam as fenilalaninas conservadas entre os diferentes subtipos as quais estão**

provavelmente envolvidas com a interação com o ATP (Adaptado de Roberts e Evans ; 2004 (47)).

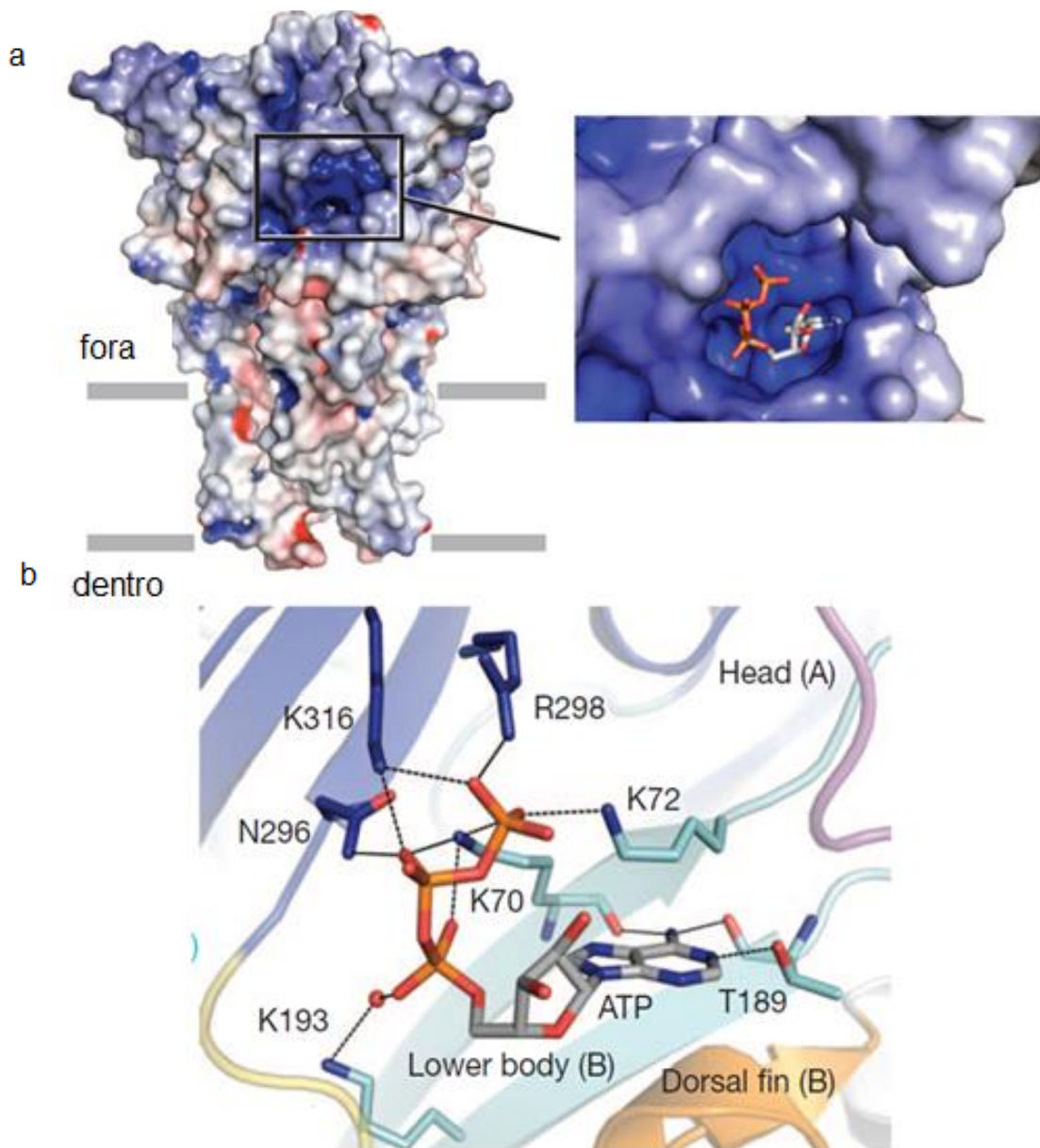
Outra característica marcante dos receptores P2X é a presença de 10 cisteínas altamente conservadas na grande alça extracelular. Estas cisteínas parecem formar pontes dissulfeto intra-subunidade, uma vez que as subunidades podem ser dissociadas em um gel de eletroforese em condições não redutoras (29). No entanto, estas cisteínas parecem não estar relacionadas com a ligação do agonista, visto que mutações pontuais nestes resíduos não foram capazes de alterar a resposta ao ATP, porém, o tráfego e/ou a estabilidade do receptor foram alterados, uma vez que tais mutações, quando feitas no receptor P2X1, diminuíram a expressão do receptor na membrana (48).

A grande alça extracelular, rica em folhas- $\beta$ , conecta o sítio de ligação ao agonista aos domínios transmembrana configurados em  $\alpha$ -hélice, onde há um rearranjo que permite a passagem dos íons (43). Corroborando com estudos de acessibilidade à cisteína(49-53), o domínio TM2 forma a luz do canal no modelo estrutural do zfP2X4, com o TM1 se posicionado de maneira periférica (42, 43, 54). Esse perfil parece se repetir para os outros subtipos, como sugere estudos de mutagênese supracitados. Ferramentas de bioinformática predizem que os domínios TM dos receptores P2X se configuram em  $\alpha$ -hélice, com exceção do TM2 do subtipo P2X7, nos quais os algoritmos não entram em consenso de qual segmento estaria atravessando a membrana nem como seria a sua conformação secundária (55).

Resíduos correspondentes nos P2X1R/PX2R/P2X4R	P2X1	P2X2	P2X4
Tipo selvagem	~1 $\mu$ M(37, 38)	~10 $\mu$ M(39)	~3 $\mu$ M(41)
K70A/K71A/K69A	~4 $\mu$ M(37)	>1000 $\mu$ M(39)	n.d.
K190A/K188A/K190A	~4,3 $\mu$ M(37)	>1000 $\mu$ M(39)	>5000 $\mu$ M(40)

**Tabela 1: EC<sub>50</sub> dos receptores P2X1, P2X2 e P2X4 do tipo selvagem ou quando feitas as mutações nas lisinas nas posições indicadas, as quais provavelmente estão envolvidas com a interação com o agonista.** A carga positiva derivada das lisinas foi neutralizada por mutações as substituindo por alanina. Estes resultados sugerem que estas cargas positivas nestas posições são importantes para a ligação do ATP. “n.d.” indica não definido (Adaptado de Marquez-Klaka, B; 2007(44)).



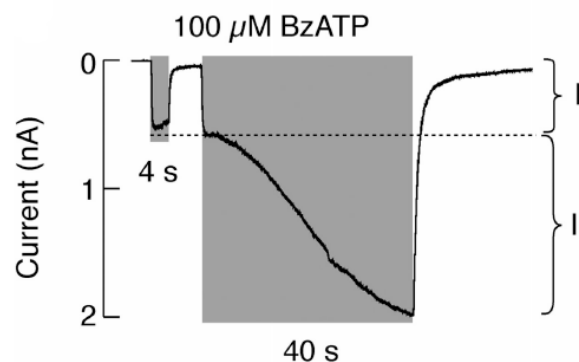


**Figura 1.5 Sítio de interação com o ATP na estrutura do zfP2X4R.** Na figura (a) vemos a representação do trímero P2X4 mostrando os raios de van der Waals dos átomos. A região da membrana está delimitada pelas linhas cinzas, separando os espaços intra- e extracelular. O inserto aumentado na figura (a) mostra a região que interage com o ATP. A molécula de ATP está representada na forma de bastão. Na figura (b), esse mesmo inserto é representado na forma de *cartoon* (enquanto o ATP mantém a representação de bastão) destacando os resíduos importantes para a ligação do ATP. (Adaptado de Hattori *et al*; 2012(43)).

## 1.1.3.1 Subtipo P2X7

### 1.3.1.1.1 – Características estruturais e funcionais

Do ponto de vista funcional, o subtipo P2X7 tem certamente o comportamento mais intrigante, visto que ele apresenta dois estágios de ativação: um canal iônico cátion seletivo de baixa condutância e um poro não seletivo de alta condutância (40, 56, 57). No primeiro estágio, a ativação do receptor leva ao influxo de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Na}^+$  e o efluxo de  $\text{K}^+$ , além disso, o  $\text{Mg}^{++}$  é capaz de inibir a corrente (58). No segundo estágio, há um aumento da condutância acompanhada da entrada de corantes de alto peso molecular (até 900 Da) por um poro não-seletivo de identidade ainda desconhecida (59, 60). Na figura 1.6 podemos ver um registro eletrofisiológico com a técnica de *patch-clamp* na modalidade *whole-cell* que evidencia este fenômeno. Essa modalidade permite a detecção da corrente total de todos canais unitários na membrana ao mesmo tempo. Devido a presença de dois tipos de correntes, de acordo com o tempo de exposição ao agonista, este fenômeno é descrito na literatura como corrente bifásica (Figura 1.6). Após a aplicação inicial do agonista é aberto o canal iônico e se a ativação com o agonista for prolongada é observado o segundo estágio da corrente, neste mesmo momento a célula passa a captar corantes hidrofílicos de alto peso molecular (41, 60, 61). As hipóteses sobre o mecanismo subjacente ao segundo estágio de ativação serão discutidas adiante.



**Figura 1.6. Os dois estágios de ativação do P2X7R.** Neste registro de *patch-clamp* modalidade *whole-cell* obtido de células HEK 293 expressando heterologamente o receptor P2X7 podemos ver que a aplicação inicial do agonista BzATP (representado pela região sombreada) promove a abertura dos

canais iônicos na membrana (“I”). Logo, ao ser exposto durante um tempo prolongado ao agonista, podemos ver o segundo estágio da corrente (“II”), com a cinética de abertura mais lenta porém com a condutância maior que no primeiro estágio. Esta segunda fase é atribuída à abertura do poro não seletivo, que coincide com a passagem de corantes de alto peso molecular (adaptado de Yan *et al*, 2008 (60)).

A topologia básica do subtipo P2X7 é mesma dos outros subtipos, com os N- e C-terminais voltados para o citoplasma, uma grande alça extracelular e dois domínios transmembrana, se organizando predominantemente na forma de homotrímero (62).

Assim como nos outros subtipos P2X, o sítio de ligação ao ATP também é encontrado na alça extracelular, entretanto, poucos trabalhos na literatura abordaram essa questão. Foi observado que, em concordância com os dados obtidos para os receptores P2X1, P2X2 e P2X4 (Tabela 1), as lisinas conservadas na alça extracelular parecem ser importantes para a interação com o ATP, visto que mutações nestes resíduos alteravam a sensibilidade do receptor ao ATP (63). Além disso, foi demonstrado que uma variação na Leu191 causa perda de função no P2X7R (64). Esta leucina, na posição equivalente no receptor P2X2, também se demonstrou importante para interação com o ATP e seu papel foi atribuído com a interação hidrofóbica com a adenina (65), assim como a Leu217 no zfP2X4R (43). Entretanto, neste caso não observamos a Leu217 (numeração do zfP2X4) em posição correspondente no P2X7R (66), o que poderia prejudicar a interação com o ATP e este fato poderia explicar porque o P2X7R tem menor afinidade com o ATP e maior afinidade ao Bz-ATP em comparação ao zfP2X4 (25).

Os domínios transmembrana do receptor P2X7 também apresentam uma característica intrigante. Análises da hidrofobicidade dos resíduos da subunidade P2X7R mostram duas regiões hidrofóbicas (prováveis domínios M1 e M2). Em relação à primeira região hidrofóbica, diferentes algoritmos de predição de  $\alpha$ -hélices transmembrana preveem este padrão estrutural para esta região. Em relação à segunda região hidrofóbica, muito maior (cerca de 55 resíduos), estes mesmos algoritmos preveem a  $\alpha$ -hélices transmembrana em

regiões diferentes (ou nem conseguem prever este domínio) (55). Estes dados levantam dúvidas em relação a qual região estaria inserida na membrana na segunda região hidrofóbica M2 e se esta mesma estaria configurada em  $\alpha$ -hélice. Esse domínio será abordado com detalhes na discussão deste trabalho. Como citado anteriormente, dados na literatura sugerem que o segundo domínio TM do P2XRs forma a luz do canal iônico (49-53) nos receptores P2X, o que é sustentado nos dois estudos de cristalografia de raios-x no receptor P2X4 (43). Assim como em outros canais, os resíduos nos domínios TM e nas regiões adjacentes são responsáveis pela seletividade iônica. Parte do segundo domínio hidrofóbico (M2) do P2X7R (denominado aqui neste trabalho de peptídeo ADSEG – resíduos 313-336 – **FGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVY** - numeração P2X7 humano) consegue, por si só formar canais iônicos em bicamada lipídica artificial e em *patch-clamp* com características de seletividade e condutância próximas ao receptor P2X7 íntegro (67). Ainda dentro da região hidrofóbica M2, foram descobertos resíduos que influenciam na seletividade iônica do receptor P2X7. Em um recente trabalho, Browne *et al* demonstrou que a substituição do Asp352 e da Thr348 por Lys, ambos no segundo domínio hidrofóbico do P2X7R, alterava tanto o potencial de reversão do receptor, quanto a permeabilidade a ânions, quando comparado ao tipo selvagem, sugerindo então que esta região faz parte do caminho de onde passam os íons e essa passagem é estreita o suficiente para que haja um efeito de carga das cadeias laterais destes resíduos sobre os íons que atravessam o receptor (61). O mesmo trabalho também averiguou a acessibilidade destes resíduos a reagentes sulfonados. Nesta abordagem substituímos os resíduos que provavelmente formam a passagem dos íons por cisteína e, ao fazer o registro eletrofisiológico do receptor, aplicamos os reagentes sulfonados antes da aplicação do agonista (acessibilidade ao canal fechado) ou depois (acessibilidade no canal aberto), tais reagentes são capazes de formar uma ligação covalente com a cisteína (se a posição da cisteína for acessível ao reagente) e bloquear a corrente pelo canal. Utilizando desta abordagem o autor viu que os mesmos resíduos que influenciavam na seletividade iônica mais o resíduo Gly345, também eram acessíveis aos reagentes sulfonados, mas somente quando aplicados depois do agonista, ou

seja, aqueles resíduos estavam expostos ao meio aquoso quando o canal está aberto e o diâmetro deste canal é superior as dimensões do reagente sulfonado, nesse caso o MTSEA ligado a biotina (0,75 x 0,80 x 1,85 nm). Além disso, a glicina 345 era acessível um reagente sulfonado não carregado e de volume molecular maior ainda, o MTSEA ligado à rodamina. Há ainda um outro trabalho que aborda a participação do domínio transmembrana 2 na formação do poro não seletivo(68), entretanto, estes dois trabalhos verificam que certos resíduos quando mutados no TM2 afetam a passagem de corantes de alto peso molecular pelo poro não seletivo mas a expressão destes receptores mutados na membrana também estava diminuída, e os autores não levaram em consideração este fato. Portanto, ao contrário do que os artigos concluem, não podemos determinar que o próprio receptor dilatou e permitiu a passagem dos corantes diretamente.

Uma das características mais marcantes do receptor P2X7 é o domínio C-terminal. Esta região é bem maior neste subtipo do que nos demais da família P2X e apresenta motivos importantes. Em um importante trabalho sobre a caracterização do domínio C-terminal do P2X7R, Denlinger *et al* (69), encontraram regiões com similaridades com o domínio SH3, um motivo encontrado em diferentes proteínas intracelulares, como receptores tirosina-quinases e proteínas reguladas por GDP/GTP. Este motivo sugere que o receptor P2X7 possa interagir com outras proteínas através do seu C-terminal. Além disso, também é encontrada no C-terminal do P2X7R uma região com semelhança com o domínio de morte TNFR1 (resíduos 436-451), outro domínio conhecido por sua capacidade de se ligar a outras proteínas intracelulares e desencadear eventos *downstream*. Não há ainda informações sobre a estrutura 3D deste domínio, o que poderia confirmar se a semelhança com os domínios acima citados se estende até a estrutura 3D ou se limita à estrutura primária. O C-terminal do receptor P2X7 está envolvido com a formação do poro não seletivo associado à sua ativação, visto que mutações neste domínio são capazes de diminuir a captação de corantes e/ou íons de alto peso molecular, mas não afetam a corrente do canal iônico(60, 70). Outra característica importante a respeito do domínio C-terminal do receptor P2X7 é a região de interação com LPS. A presença deste domínio poderia estar relacionada com a

modulação da atividade do P2X7R por LPS(71) . Sendo assim, este domínio representa um alvo terapêutico potencial nos processos imunes mediados pelo P2X7R. Outra maneira de se entender o domínio C-terminal do P2X7R seria a análise de mutações naturais. Dentro deste contexto podemos destacar a mutação em que há a troca de um ácido glutâmico por uma alanina (E496A), que é frequentemente encontrado em pacientes com leucemia linfocítica (72). Esse polimorfismo, na forma homozigótica, faz com que o P2X7R perca a capacidade formar o poro não seletivo associado a sua ativação e tenha a apoptose induzida pelo receptor P2X7 prejudicada (73). Além disso, este polimorfismo parece estar envolvido coma susceptibilidade à tuberculose (74, 75) e ao câncer de tireoide (76). Os polimorfismos I568N (77) e T357S (78) também são descrito em linfócitos e macrófagos, respectivamente, e também estão associados à perda de função e diminuição da expressão do P2X7R na membrana. A partir destes dados, podemos inferir que este domínio é fundamental para a abertura do poro não seletivo, levando em consideração que o grande domínio C-terminal e a capacidade de abrir o poro não seletivo são característica exclusivas do homotrímero P2X7.

Atualmente, a característica biofísica mais estudada do P2X7R é a sua capacidade de levar à formação de um poro não seletivo na membrana. Embora haja muitos grupos no mundo estudando este fenômeno, ainda não se sabe por qual mecanismo é aberto este poro, entretanto, duas hipóteses principais surgiram de acordo com as evidências obtidas.

A primeira hipótese sugere que o próprio canal iônico dilate e forme o poro. Neste contexto, Yan *et al* desenvolveram um modelo matemático baseado nas características farmacológicas do P2X7R que propõe que a ligação de duas moléculas de ATP no receptor abriria o canal iônico cátion-seletivo. Logo, estas duas moléculas de ATP iriam cooperar negativamente para ligação da terceira molécula de ATP, ou seja, iriam dificultar a ligação da terceira molécula de ATP no receptor. Entretanto, quando a concentração fosse alta o suficiente para permitir a ligação da terceira molécula de ATP, o receptor iria sofrer mudanças conformacionais de maneira que ele se dilataria e abriria o poro não seletivo (57). Teixeira *et al*, também propuseram um modelo no qual o



segmento adjacente ao domínio TM do P2X7R, que parece ser estruturado em folha- $\beta$ , poderia ser inserido na membrana e se organizar de maneira que permitisse a abertura do poro não seletivo (55). Recentemente, foi demonstrado na literatura que mutações no segundo domínio TM do receptor P2X7 altera as propriedades deste poro não seletivo. Browne *et al*, demonstrou que a inserção de resíduos carregados positivamente no domínio TM2 diminuía a captação de corantes de alto peso molecular de carga positiva brometo de etídio, enquanto aumentava a captação de FITC, um fluoróforo de carga negativa (61). No entanto, é importante ressaltar que não houve um refinamento estatístico adequado nesta análise, uma vez que o autor utilizou somente análise variância e as curvas de captação de corante/tempo são bastante similares, levantando dúvidas sobre a relevância deste dado. Sun *et al*, também demonstrou que a substituição de certos resíduos no TM2 do P2X7R por resíduos homólogos dos P2X1 e P2X4R também diminuía a captação de alguns corantes de alto peso molecular. Além disso, foram criadas quimeras com o TM2 do receptor P2X7 sendo substituído pelo TM2 do P2X4R ou do P2X1R completamente ou parcialmente, e isso também diminuía a captação de corantes de diferentes pesos moleculares (68). Todavia, esta questão deve ser mais bem explorada, pois, como citado anteriormente, as mutações em ambos os trabalhos diminuía a quantidade do P2X7R expresso na membrana, o que poderia contribuir para a menor captação dos corantes pelo poro não seletivo. Esse modelo poderia explicar o efeito duplo da ativação do P2X7R no ciclo celular, no qual a abertura do canal iônico cátion seletivo mediante a ligação de duas moléculas de ATP, iria induzir a proliferação enquanto a ligação de três moléculas iria induzir a morte celular, mediante a abertura do poro não seletivo (40).

A segunda hipótese baseia-se na necessidade de uma proteína acessória para a formação do poro não seletivo. Cankurtaran-Sayar *et al* sugeriam que a captação de corantes de alto peso molecular de cargas diferentes, via ativação do receptor P2X7, poderia acontecer por vias diferentes (79). Em células HEK-293 transfectadas com o vetor contendo o cDNA do receptor P2X7 corantes catiônicos como YO-PRO-1 e TO-TO1 eram captados por um mecanismo independente do aumento da concentração do  $Ca^{++}$

intracelular enquanto corantes aniônicos como o *lucifer yellow* e a calceína eram captados por um mecanismo dependente do aumento da concentração de cálcio intracelular. Já em células RAW 264.7, que expressam naturalmente o P2X7 foi observado que as culturas de células captavam ambos os corantes, mas um exame mais minucioso revelou que algumas subpopulações na mesma cultura captavam apenas brometo de etídio (corante catiônico) e algumas captavam apenas *lucifer yellow* (corante catiônico). Em um outro estudo, Schachter *et al* demonstraram em células HEK 293 transfectadas com o vetor contendo o cDNA do receptor P2X7 e macrófagos, que expressam naturalmente o receptor P2X7 que a capação de corantes aniônicos era independente da temperatura e dependendo do potencial elétrico poderia cruzar a membrana nos dois sentidos enquanto a captação de corantes catiônicos era dependente da temperatura e o fluxo era exclusivamente unidirecional (80). Além disso, Jiang *et al* demonstrou que células HEK expressando heterologicamente o receptor P2X7 que a captação do cátion de alto peso molecular NMDG<sup>+</sup> era dependente da concentração de Na<sup>+</sup> extracelular enquanto a captação do corante YO-PRO acontecia de maneira independente da concentração de Na<sup>+</sup> extracelular. Embora estes trabalhos não sejam conclusivos, eles sugerem que hajam mecanismos diferentes de captação de moléculas de alto peso molecular associado a ativação do receptor P2X7 (81). Algumas proteínas capazes de formar poro podem estar associadas a formação do poro não seletivo do receptor P2X7. Foi demonstrado que a captação de corantes de alto peso molecular era dependente da panexina (82, 83), entretanto Alberto *et al* demonstraram que não há essa dependência (84). Esta controvérsia fato abre a possibilidade de em tipos celulares diferentes a captação de moléculas de alto peso molecular via ativação do receptor P2X7 poderia ocorrer por mecanismos diferentes, recrutando proteínas diferentes em tipos celulares diferentes.

Em mamíferos, algumas proteínas formadoras de poro são candidatas a serem associadas ao P2X7R como as conexinas (85), canais maxi-anion (86), poro associado a maitoxina, TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transiente) (87) e CALHM1 (modulador da homeostase de cálcio) (88). Todas estas proteínas apresentam características biofísicas compatíveis com o poro não



seletivo associado a ativação do P2X7R (59). Independente da hipótese adotada é demonstrado que segundos mensageiros, como MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) e o aumento do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular são necessários para a formação do poro não seletivo (41).

Os dados na literatura ainda são muito controversos em relação às duas hipóteses e ainda não existe uma ideia concreta de como poderia estar ocorrendo este fenômeno. O entendimento dos mecanismos por trás da abertura do poro associado ao receptor P2X7R é fundamental para o desenho de novas estratégias terapêuticas baseadas no P2X7R, uma vez que muitos eventos decorrentes da ativação do receptor dependem desse segundo estágio de ativação.

O ATP é o único ligante fisiológico conhecido do P2X7R. Contudo, o ATP fisiológico extracelular é encontrado normalmente em concentrações baixas. Logo, nestas condições, esta concentração de ATP não é suficiente para ativar o P2X7R que, como citado anteriormente, necessita de altas concentrações de ATP para ser ativado. Já a concentração de ATP intracelular é bastante alta e diferentes tipos celulares são capazes de liberar este ATP (89) e aumentar a concentração extracelular por 3 mecanismos conhecidos até o momento, os quais são importantes no entendimento do contexto fisiológico e patológico que envolve o P2X7R. O primeiro consiste na liberação de vesículas, como é demonstrado que o ATP pode ser liberado na fenda sináptica (90, 91), onde a concentração nas vesículas pode chegar a 5 mM. A liberação de ATP também pode acontecer em células não neuronais, como células  $\beta$  pancreáticas(92) e plaquetas (93). A liberação de ATP também pode ocorrer por via de transportadores de membrana, como canais de alta condutância ou transportadores ABC. Em relação aos canais de alta condutância podemos destacar as panexinas (94), o regulador transmembrana da fibrose cística (95), canais regulados por volume (96) ou o próprio poro associado a ativação do P2X7R, o qual, como citado anteriormente, ainda tem a identidade desconhecida. Além dos mecanismos descritos, é importante notar que células necróticas liberam todo o seu conteúdo no meio extracelular, incluindo o ATP.

Uma vez ativado, o P2X7R leva à ativação de diferentes cascatas intracelulares. O influxo de  $\text{Ca}^{++}$  leva a desfosforilação (neste caso representa a ativação) do NFAT (*nuclear fator of activated T cells*) (97). Além disso, a ativação do P2X7R pode desencadear como eventos downstream a ativação das fosfolipases A2 e D e MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) (41) além da JNK (*janus kinase*) (98). Esses eventos vão resultar na ativação de diferentes fatores de transcrição que vão levar à produção de proteínas de caráter pró-inflamatório como iNOS (*inducible nitric oxide sintetase*) (99) e COX-2 (ciclo-oxigenase 2) (100). Além disso, o efluxo de  $\text{K}^+$  decorrente da ativação do P2X7R leva a clivagem da pró-IL-1 $\beta$  para a forma madura (101), que desta maneira pode ser secretada e exercer seu papel pró-inflamatório (90). Esses fenômenos celulares estão por trás do papel do P2X7R na resposta inflamatória, que será discutido mais a frente.

Os eventos acima citados a respeito da ativação do P2X7R vão levar a diferentes fenômenos celulares. O ponto mais interessante entre estas funções seria a de regulação do ciclo celular, pois o P2X7R pode tanto levar a morte celular quanto a divisão celular, dependendo do contexto de ativação e/ou do tipo celular em questão. Por exemplo, a ativação do receptor P2X7 com baixas concentrações de ATP (1-100  $\mu\text{M}$ ) induzem a morte de neurônios motores isolados de rato (102).. Em células de glioma, o bloqueio do P2X7R leva a proliferação celular por um mecanismo dependente do cálcio intracelular (103).

O sistema mais bem estudado em relação à ativação do P2X7R é a sua participação no sistema imune. Basicamente, o papel conhecido do P2X7R no sistema imune decorre de situações quando há uma alta concentração de ATP extracelular, pelos meios que já foram descritos, e essa ativação vai levar eosinófilos, monócitos ou macrófagos a secretar IL-1 $\beta$ , considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a liberação de outras citocinas de caráter pró inflamatório também vem sendo associadas a ativação do P2X7R, como IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL4, IL6, IL-13, IL-18, TNF- $\alpha$  (104).

### **1.3.1.1.2- Potencial terapêutico do P2X7R**

Devido ao grande número de fenômenos que são mediados, diretamente ou indiretamente, pelo receptor P2X7 não é surpresa que ele a modulação de sua atividade possa ser útil como estratégia terapêutica. Além disso, alguma disfunção no receptor P2X7 pode gerar uma situação patológica. Assim hoje, o receptor P2X7 é encarado como um novo alvo em potencial para algumas doenças, e o conhecimento acerca de sua estrutura é fundamental para o desenho de novos ligantes que possam ter aplicação terapêutica.

Os receptores purinérgicos de uma maneira geral vêm sendo associados aos processos de sinalização da dor do SNP ao SNC. Tanto as vias sensoriais quanto células da glia liberam ATP no meio extracelular que ativa o receptor P2X7 em células de caráter pró-inflamatório e contribuir na manutenção da dor associada à inflamação. Dentro desse contexto, Labasi *et al* caracterizaram macrófagos *knockout* para o receptor P2X7 e verificaram que havia uma produção diminuída de IL-1 $\beta$  induzida pelo tratamento com ATP e LPS quando comparado aos animais controle (tipo selvagem) (105). Além disso, os autores verificaram o efeito da deleção do gene do receptor P2X7 em um modelo animal de artrite e concluíram que diversos sinais clínicos associados a este modelo, como lesões nas articulações e degradação do colágeno, estavam diminuídos nos animais *knockout* em relação ao controle. Em outro importante trabalho no contexto clínico do receptor P2X7, Chessell *et al* também utilizaram animais *knockout* para o receptor P2X7 para produzir inflamação crônica, agora em um outro modelo, o induzido por adjuvante, e verificaram que os animais não apresentavam hipersensibilidade a dor por estímulos mecânicos e por temperatura, ao contrário dos animais tipo selvagem (106). Além disso, estes resultados se repetiam em um modelo de dor neuropática. Corroborando com a literatura, o autor ainda verificou que havia uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e IL-10, o que pode explicar (pelo menos parcialmente) a relação entre a atividade do receptor P2X7 e os processos inflamatórios.

Tendo em vista estes resultados, é de se esperar que o bloqueio farmacológico do receptor P2X7 possa produzir efeitos anti-inflamatórios que possam ser utilizados como estratégias clínicas. Por exemplo, o ATP-oxidado,

um inibidor irreversível do receptor P2X7, é capaz de diminuir a nocicepção em ratos com modelo de inflamação induzida por adjuvante. Entretanto, embora este estudo reforce o potencial clínico do bloqueio do receptor P2X7, o uso do ATP oxidado também pode inibir outros receptores, como o P2X1 e P2X2 (107), podendo gerar efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, é demonstrado que o ATP oxidado leva a diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B e da liberação de IL-8 independente do efeito sobre o receptor P2X7 (108). Portanto, é de se esperar que haja um esforço para a obtenção de novos antagonistas que sejam cada vez mais específicos para o receptor P2X7, como objetivo de evitar efeitos colaterais. Devido à falta de modelos estruturais que revelem características sobre o sítio de ligação do agonista ou domínios importantes para a abertura do canal iônico, ainda é precoce a ideia de se procurar desenhar racionalmente novos agonistas por meio de simulações de *docking* molecular. Portanto, o atual esforço na busca de novo antagonistas do receptor P2X7 se concentra em *screenings* farmacológicos de produtos naturais e de novos antagonistas sintéticos (109). Por exemplo, é demonstrado que diferentes extratos da planta *Rheedia longifolia* são capazes de inibir a formação do poro associado ao receptor P2X7 (110), todavia a aplicabilidade clínica dos extratos ou dos prováveis princípios ativos ainda precisam ser elucidados.

A indústria farmacêutica vem patenteando novos produtos sintéticos capazes de inibir o receptor P2X7. Por exemplo, os antagonistas A-740003 (111), A-438079 (112) e A-839977 (113) são capazes de produzir efeitos antinociceptivos em modelos animais de maneira dose dependente, e representam futuros candidatos a testes clínicos de novos analgésicos. Dentre os antagonistas em testes clínicos temos o GSK1482160 (114) para a dor inflamatória e o AZD9056 (115) e CE-224535 (116) para artrite reumatoide. Embora os resultados em modelos animais se mostrarem promissores, o antagonista AZD9056 não apresentou efeito maior que o tratamento padrão nos testes clínicos, isto exemplifica o quanto devemos aprender ainda sobre os mecanismos de ativação bem como a participação do P2X7R em situações fisiológicas e patológicas e o caminho é longo para que possamos transformá-lo em um novo alvo terapêutico, o que poderia trazer alívio para pacientes que

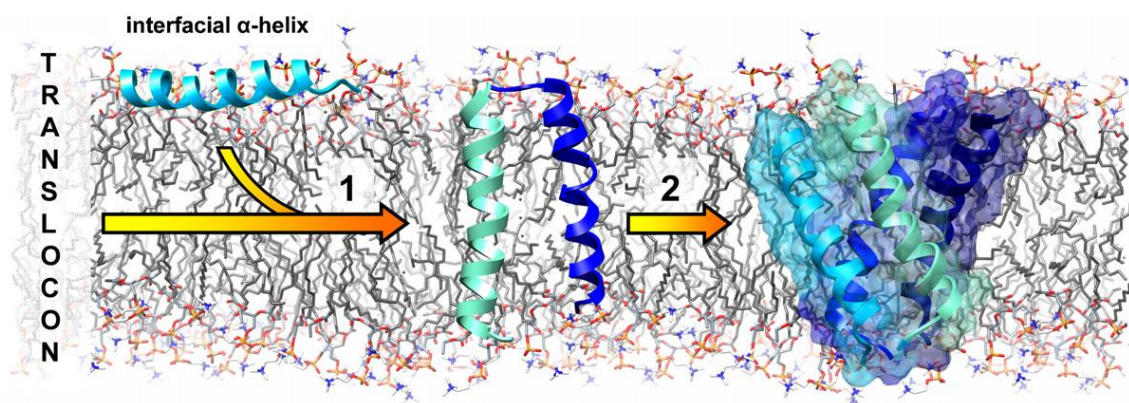
sofrem de diferentes doenças, principalmente as que envolvem inflamação crônica. Dentre os pontos que precisam ser explorados temos o conhecimento da estrutura, o qual pode permitir, por meio de ensaios de *docking* molecular, o desenho de novas drogas de maneira racional que sejam mais específicas e potentes, com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais e maximizar a eficácia da droga.

### **1.2- A abordagem de dividir e conquistar**

A grande dificuldade no estudo de proteínas de membrana requer o uso de estratégias alternativas. Uma das abordagens mais usadas é a de dividir e conquistar. O termo dividir e conquistar (*divide et impera*) é usado em estratégia militar desde a antiguidade, seu primeiro registro escrito é geralmente atribuído ao general romano Caio Júlio César no século 1 AC. De uma maneira geral este termo se refere ao processo de dividir o alvo em partes menores, de maneira que facilite o estudo e a posterior conquista do mesmo. Logo o alvo vai sendo dominado aos poucos até que o todo seja conquistado. Em relação à aplicação desta abordagem ao estudo de proteínas de membrana, podemos dividir a proteína em segmentos menores, que podem ser manipulados e estudados de maneira mais simples (117).

As proteínas de membrana possuem partes hidrofílicas, referentes aos domínios intra- e extracelulares, e segmentos hidrofóbicos, que são as partes da proteínas que ficam enterradas na bicamada lipídica. Logo, podemos inferir que o dobramento natural de cada região depende da interação com o seu ambiente, ou seja, as partes hidrofílicas necessitam da solvatação da água para adotar sua conformação 3D e as partes hidrofóbicas necessitam do ambiente hidrofóbico proporcionado pelas cadeias apolares da bicamada lipídica para se dobrar corretamente. Desta maneira, podemos estudar segmentos hidrofóbicos da proteína separadamente em um ambiente mimético de membrana, ou seja, um ambiente que reproduza pelo menos parte das propriedades físico-químicas da bicamada lipídica. Dentre os miméticos de membrana mais usados temos os solventes DMSO (dimetilsulfóxido) (118) e o TFE (trifluoroetanol) (119) e o uso de micelas (120), como por exemplo de SDS (sódio dodecil sulfato) e DPC (docecilfosfolina).

Esta abordagem é fundamentada na hipótese de dois estágios (121), no qual diz que os segmentos transmembrana de uma proteína assume sua conformação 3D em dois estágios energeticamente distintos. Em um primeiro momento, os domínios que ficam enterrados na membrana se dobram sob influência das características físico-químicas da membrana e de interações de curto alcance. Em um segundo estágio, estas estruturas formadas e estáveis formam domínios capazes de interagir com regiões mais distantes da proteínas, como por exemplo outros domínios TM, resultando no dobramento nativo da proteína (Figura 1.7).



**Figura 1.7 Modelo de dois estágios.** O modelo de dois estágios para o dobramento de proteínas de membrana coloca que as  $\alpha$ -hélices transmembranas se dobram logo ao serem inseridas na membrana, sem a necessidade do contato com partes mais distantes da proteína (1). Em um segundo estágio, energeticamente distinto, as hélices formadas possuem motivos capazes de interagir com regiões mais distantes da subunidade (como outros domínios transmembrana) (2). Finalmente a subunidades se oligomerizam formando a estrutura tridimensional nativa da proteína. (Adaptado de Bordag e Keller, 2011 (117)).

Os trabalhos com a rodopsina bacteriana sustentam esta hipótese. As estruturas dos peptídeos correspondentes aos domínios transmembrana (122) se assemelharam bastante as regiões correspondentes na proteína inteira, a qual a estrutura foi determinada a partir de estudos de cristalografia de raios X (123). Além disso, inclusive os *loops* que conectam os domínios TM também se



assemelharam bastante na proteína inteira (124). Outro receptor associado à proteína G, o receptor de adenosina A2A também teve as estruturas dos domínios TM determinadas (125) separadamente e estas se assemelharam a estrutura na proteína inteira, a qual teve a estrutura posteriormente determinada por cristalografia de raios-X (126).

Levando isso tudo em consideração, esta abordagem representa uma importante ferramenta para adquirir informações sobre a relação estrutura-função dos domínios TM na ausência da estrutura da proteína inteira determinada. Esta abordagem vem sendo usada para diferentes tipos de proteínas de membrana como receptores associados a proteína G, canais iônicos e proteínas virais.

Uma outra vertente desta abordagem, neste caso específica para o estudo de canais iônicos seria a de inserir peptídeos tanto relativos as regiões transmembrana como de regiões adjacentes em membranas artificiais e verificar a capacidade dos mesmos em formar canais iônicos por si só. No caso do AcHR, o segundo domínio transmembrana, o qual forma a luz do canal iônico, é capaz de formar canais com características de seletividade próximas ao do canal na proteína íntegra (15). Além disso, o segmento H5, responsável pela seletividade iônica nos canais *shaker* de  $K^+$  (127) também é capaz de formar canais iônicos seletivos a  $K^+$  em membranas artificiais (128). Neste contexto, Souza *et al* demonstraram que o segmento adjacente ao domínio TM2 do P2X7R, que como mencionado anteriormente tem identidade com o segmento H5 dos canais de  $K^+$ , é capaz de formar canais iônicos com propriedades de seletividade e condutância próximas as registradas para o P2X7 íntegro, tanto em membranas artificiais quanto em membranas naturais, neste segundo caso verificado pela técnica de patch-clamp (67). Com essa abordagem, podemos adquirir informações sobre a relação entre a estrutura-função dos canais iônicos enquanto eles ainda não tem suas estruturas determinadas.

Estas abordagens, embora bastante reducionistas, se mostram importantes devido ao lento avanço na determinação da estrutura de proteínas de membrana. Até Junho de 2013, foram depositadas 76.573 estruturas de

proteínas solúveis no *Protein Data Bank*, enquanto isso, somente 615 estruturas de proteínas de membrana foram depositadas. Este déficit fica mais claro quando observamos que as proteínas de membrana formam 1/3 do nosso genoma (129) e mais da metade dos alvos dos fármacos atuais(130).

Como citado anteriormente, nosso grupo vem trabalhando com parte do domínio M2 do P2X7R (peptídeo ADSEG), que demonstrou ser importante na sua seletividade iônica (67). Todavia, sua estrutura só foi estudada por dinâmica molecular. As simulações de dinâmica molecular mostraram que sua estrutura ficaria estável configurada com uma folha- $\beta$  nos solventes miméticos de membrana TFE e DMSO. No entanto, quando feitas simulações partindo de uma estrutura em  $\alpha$ -hélice, esta se manteve estável em TFE mas não em DMSO (55). Uma vez que só temos dados de sua estrutura *in silico*, e esta região parece ser importante para a atividade do P2X7R fica evidente a necessidade de determinar sua estrutura *in vitro*. Neste contexto este trabalho tem como objetivo determinar a estrutura do segmento adjacente ao P2X7R no solvente mimético de membrana DMSO, com o objetivo de se entender melhor sua capacidade de formar canais iônicos por si só e associar estas informações à atividade do P2X7R, contribuindo assim para entendermos melhor as características de seletividade deste receptor.



# Objetivos

## **2-Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o conteúdo estrutural de parte do domínio M2 do receptor P2X7 humano

### **2.2 – Objetivos específicos**

**2.2.1** Determinar a estrutura do peptídeo correspondente à parte do domínio M2 do P2X7 humano em DMSO por ressonância magnética nuclear de solução.

**2.2.2** Realizar simulações de dinâmica molecular em uma caixa contendo DMSO e utilizando a estrutura de menor energia obtida nos experimentos de RMN.

### **3- Materiais e Métodos**

#### **3.1 - Síntese do peptídeo**

O peptídeo ADSEG (FGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVY) foi sintetizado pela empresa Genemed Synthesis (Texas, EUA) com a pureza de >98% confirmada por espectrometria de massa.

#### **3.2- Preparação da amostra**

O peptídeo ADSEG foi diluído em DMSO perdeuterado (Cambridge Isotopes Laboratories, Massachusetts, EUA) em uma concentração de 2 mM. A solução obtida estava translúcida indicando que não houve agregação da amostra.

#### **3.3- Experimentos de RMN**

Os núcleos de alguns átomos possuem uma propriedade chamada de momento magnético e conseqüentemente apresentam spins nucleares. Os spins  $\frac{1}{2}$  podem assumir dois estados de energia quando dentro de um campo magnético, entretanto, na ausência desse campo, eles estão degenerados, ou seja, os níveis de energia dos spins são iguais, logo eles não são capazes de gerar algum sinal detectável (INVERTER). Todavia, quando esses spins estão em um campo magnético externo ( $B_0$ ) eles tendem a se alinhar em relação ao campo e se dividem em dois níveis energéticos, como citado anteriormente: um de baixa energia ( $\alpha$  - alinhado na direção do campo externo  $B_0$ ) e um de alta energia ( $\beta$  - alinhado na direção contrária ao campo externo  $B_0$ ), essa condição é conhecida como estado de equilíbrio. A população desses estados é muito similar, com um pequeno excesso no estado  $\alpha$ , que vai efetivamente gerar o sinal adquirido durante os experimentos. Todos esses spins precessam em uma frequência específica, denominada frequência de Larmor. Logo, quando aplicamos um pulso de radiofrequência na amostra, a distribuição dos estados energéticos dos spins muda, contudo, esse estado é instável o que resulta, após um determinado tempo, no retorno ao estado de equilíbrio. A volta do spin ao estado de equilíbrio é conhecida como relaxação. Assim, podemos usar essa situação para obter informações sobre a disposição espacial dos diferentes spins nucleares em uma proteína de interesse, durante

o retorno ao estado de equilíbrio. Para tal, foram utilizados experimentos de TOCSY (informações intra-residuais), para fazer o assinalamento sequencial do peptídeo ADESG, e experimentos de NOESY (informações intra- e inter-residuais), para obter as distâncias entre os núcleos próximos até 5 Å. Ambos os espectros utilizando o hidrogênio (H), o qual possui o spin  $\frac{1}{2}$ .

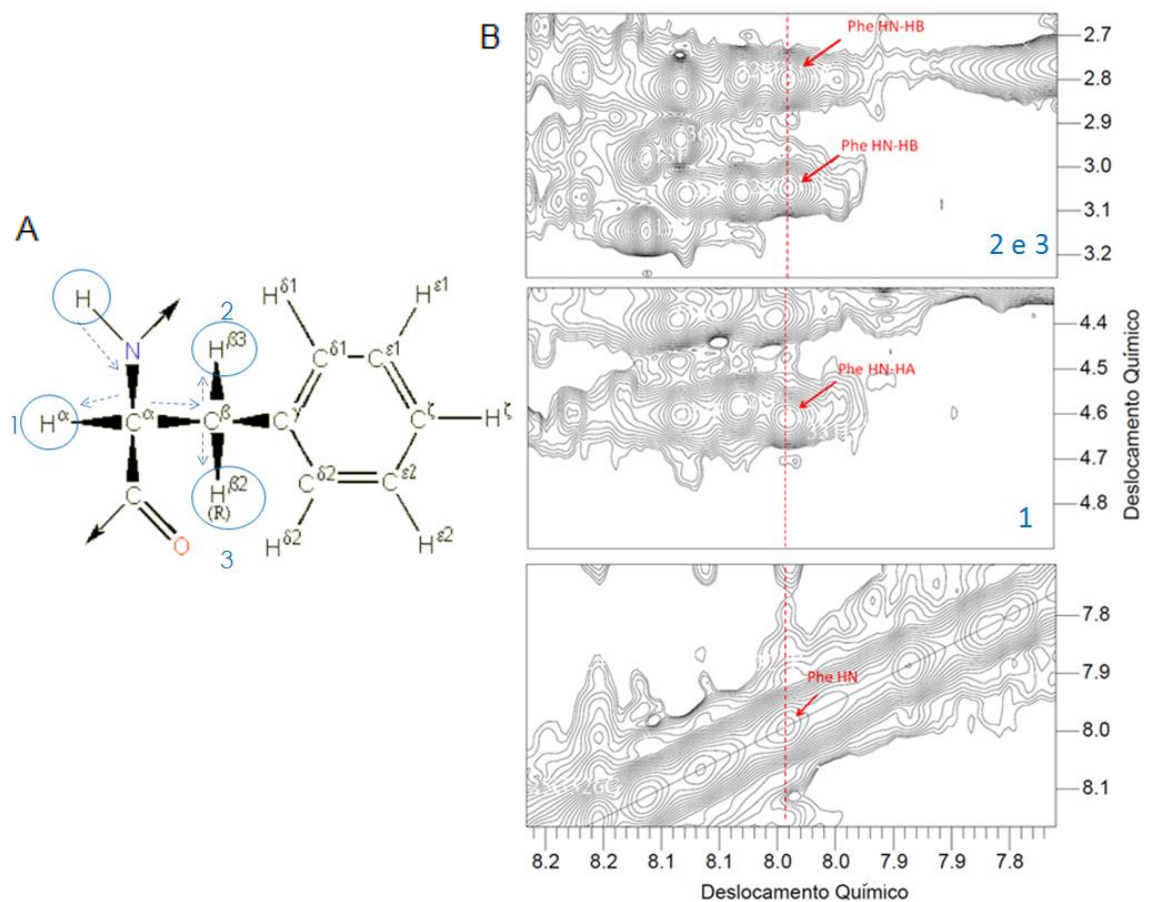
### **3.3.1 – Espectro de NOESY (Espectroscopia de efeito Overhauser nuclear)**

Nos experimentos de NOESY, podemos estimar a distância entre dois núcleos diferentes separados por uma distância de até 5 Å. Após colocarmos nossa amostra no campo  $B_0$  os spins vão assumir os estados de energia  $\alpha$  e  $\beta$  com um pequeno excesso de spins no estado  $\alpha$ , como citado anteriormente. Logo, aplicamos um pulso de radiofrequência, na frequência de Larmour de um determinado núcleo e, dessa maneira, a população de núcleos com essa a frequência, e no estado de baixa energia  $\alpha$ , vai absorver a energia do pulso por ressonância e passar para o estado de alta energia  $\beta$ . Dessa maneira, igualamos as populações de spins (estados  $\alpha$  e  $\beta$ ) e não podemos mais observar o sinal, uma vez agora eles se cancelam chegando a uma condição chamada de saturação. Os spins nucleares afetados pelo pulso de RF são chamados spins fonte (*source spins*). Em seguida, os spins fonte relaxam para o estado de equilíbrio, polarizando de forma cruzada outros núcleos próximos ao núcleo fonte, os quais passam para o estado de alta energia  $\beta$ , que resultam no aumento da população polarizada. Como resultado, observa-se um ganho de sinal. Esse processo de relaxação cruzada é conhecido como NOE (*nuclear Overhauser effect*). A magnitude desse aumento é inversamente proporcional à distância entre os núcleos com acoplamento dipolar, logo podemos obter informações sobre a distância entre esses spins. Todavia, o espectro de NOESY não é adequado para identificar os sistemas de spin de cada resíduo. Essas informações são obtidas no espectro de TOCSY

### **3.3.2 – Espectro de TOCSY (Espectroscopia de correlação total)**

Nos experimentos de TOCSY, utilizamos o mesmo princípio que o NOESY, entretanto inserimos pulsos adicionais na sequência para que o acoplamento entre diferentes spins nucleares não ocorra pelo espaço, mas

entre ligações químicas. Dessa maneira, após o pulso de RF, os spins tendem a voltar para o equilíbrio e a magnetização afeta somente spins separados por até 3 ligações químicas. Embora essa técnica não nos permita obter informações sobre a distância entre os átomos, podemos fazer o assinalamento sequencial, identificando os sistemas de spins acoplados através de ligações químicas. Logo, essas informações são utilizadas junto com o conhecimento da estrutura primária do peptídeo para determinar quais spins nucleares produziram os picos observados no espectro de NOESY. Dessa maneira, utilizamos os NOEs (presentes no espectro de NOESY), que foram devidamente identificados com o auxílio do espectro de TOCSY, para obter informações entre as distâncias entre cada núcleo. Nesse sentido, essas informações vão ser utilizadas no cálculo da estrutura.



**Figura 3.1- Sistema de spin da fenilalanina no espectro de TOCSY.**

Na figura (A) é mostrado como acontece a transferência de magnetização (setas azuis) a partir do próton amídico dentro do resíduo de fenilalanina. A transferência é passada para o próton  $\alpha$  (1) e os dois prótons  $\beta$  (2 e 3) gerando

picos que podem ser observados no espectro. A linha vermelha representa o valor de deslocamento químico do próton amídico e os picos indicados pelas setas vermelhas indicam os picos relativos as conectividades estabelecidas, as quais são compatíveis com os valores de deslocamento químico esperados para cada prótons (no eixo y). Os valores de deslocamento químico esperados para os prótons dos diferentes resíduos podem ser encontrados no banco de dados *Biological Magnetic Resonance Data Bank*. A B

### 3.3.3 - Assinalamento do espectro

O assinalamento do espectro foi feito com o auxílio do programa *CcpNmr (131)* para a visualização. Todos os sistemas de *spin* puderam ser assinalados com o tempo de mistura utilizado (400 ms). Os sistemas de *spin* foram identificados no TOCSY e o assinalamento sequencial foi feito pelo NOESY. No TOCSY a transferência de magnetização é feita via ligações químicas (com exceção das ligações que envolvem O e N) enquanto no NOESY temos picos relativos a prótons próximos sem a necessidade de estarem separados por uma ligação química. Portanto, temos os mesmos picos encontrados no TOCSY mais os picos relativos a *spins* acoplados espacialmente.

A figura 3.2 mostra o exemplo dois sistemas de spin (Phe 328 e Asp 329). O quadro acima na figura 3.1 mostra os picos encontrados em valores característicos dos prótons  $\beta$  destes resíduos (em azul) no eixo “y”. Logo, sabemos que os picos encontrados nesta linha vertical, se referem ao sistema de spin destes resíduos. A faixa de valores no eixo “x” indica que estes sistemas de spin são referentes a conectividade com o próton amídico (HN), como podemos observar no banco de dados de valores de deslocamento químicos. Portanto, neste caso os picos da parte de cima da figura 3.2 representam conectividades HN-H $\beta$  dos respectivos resíduos. A parte de baixo da figura 3.2 mostra uma conectividade inter-residual, entre os prótons amídicos do Asp 329 e a Phe 328, feita entre os prótons amídicos destes resíduos. Esta conectividade, assim como todas as outras inter-residuais, está presente somente no espectro de NOESY. Desta maneira, identificamos os sistemas de *spin* dos resíduos no espectro de TOCSY e fazemos o

assinalamento sequencial no espectro de NOESY (pelo assinalamento das conectividades HN-HN de resíduos vizinhos). Uma vez identificados os sistemas de spin, é feito o processo de assinalamento das outras conectividades inter-residuais, encontrando picos que representam átomos próximos e a intensidade do pico pode ser transformada na distância entre eles, permitindo o cálculo da estrutura. As linhas horizontais na figura 3.2 representam como podemos encontrar as conectividades inter-residuais. Neste caso vemos picos (em vermelho) que só aparecem no NOESY sobre a linha referente ao sistema de *spin* do próton amídico. Esses picos vão aparecer alinhados (horizontalmente) com o pico referente ao próton o qual ele está fazendo uma conectividade. A intensidade dos picos no NOESY é inversamente proporcional a distância entre eles (na relação  $1/r^6$ , onde  $r$  é a distância entre os prótons). Na figura 3.2 ainda podemos observar conectividades entre o próton amídico da Phe 328 e um dos prótons  $\beta$  do Asp 329 assim como entre o próton amídico do Asp 329 e um dos prótons  $\beta$  da Phe 328. Foram encontradas conectividades de diferentes distâncias, tanto as sequenciais (entre resíduos vizinhos), de média distância (até 5 resíduos) e de longo alcance ( $> 6$  resíduos). Os volumes de cada pico foram usados para o cálculo da estrutura utilizando o programa ARIA (132).

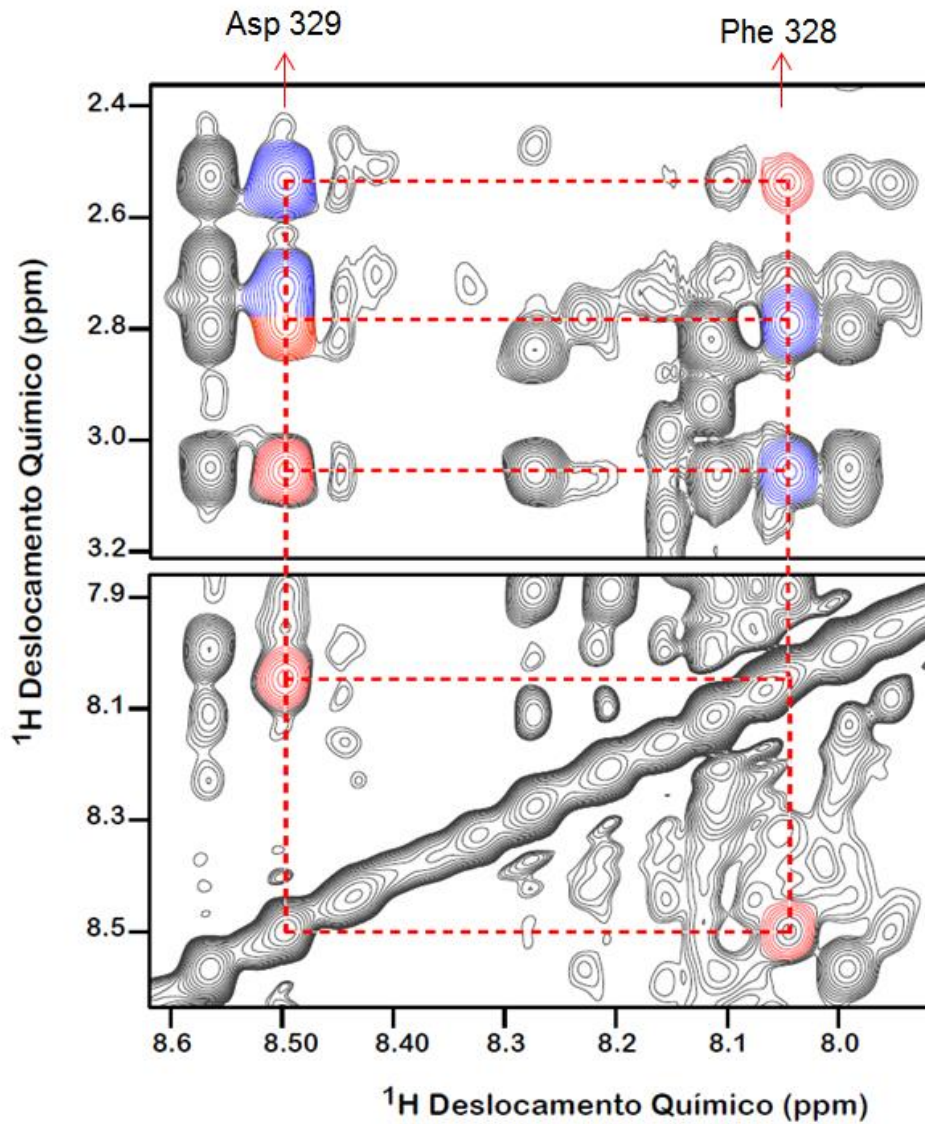
### **3.4 – Dinâmica Molecular**

Como uma forma de refinar a estrutura de menor energia obtida por RMN, procedemos para simulações de dinâmica molecular. Na dinâmica molecular foi possível criar uma caixa virtual na qual preenchemos com as moléculas de nosso interesse para reproduzir este determinado ambiente. Logo, os algoritmos que regem os programas se propõem a reproduzir todas as características físico químicas das moléculas na caixa, desta maneira observamos com detalhes o comportamento das moléculas da caixa e esperamos que ela reproduza da melhor maneira possível aquele ambiente em questão. Desta maneira utilizamos a dinâmica molecular para verificar como a estrutura de menor energia se comportaria em uma caixa virtual como mesmo ambiente em que o peptídeo ASEG estava durante os experimentos de RMN. Uma vez que a estrutura obtida por RMN esteja bem próxima de uma estrutura

que representem bem a população de estruturas na amostra, a estrutura deve se manter predominantemente semelhante.

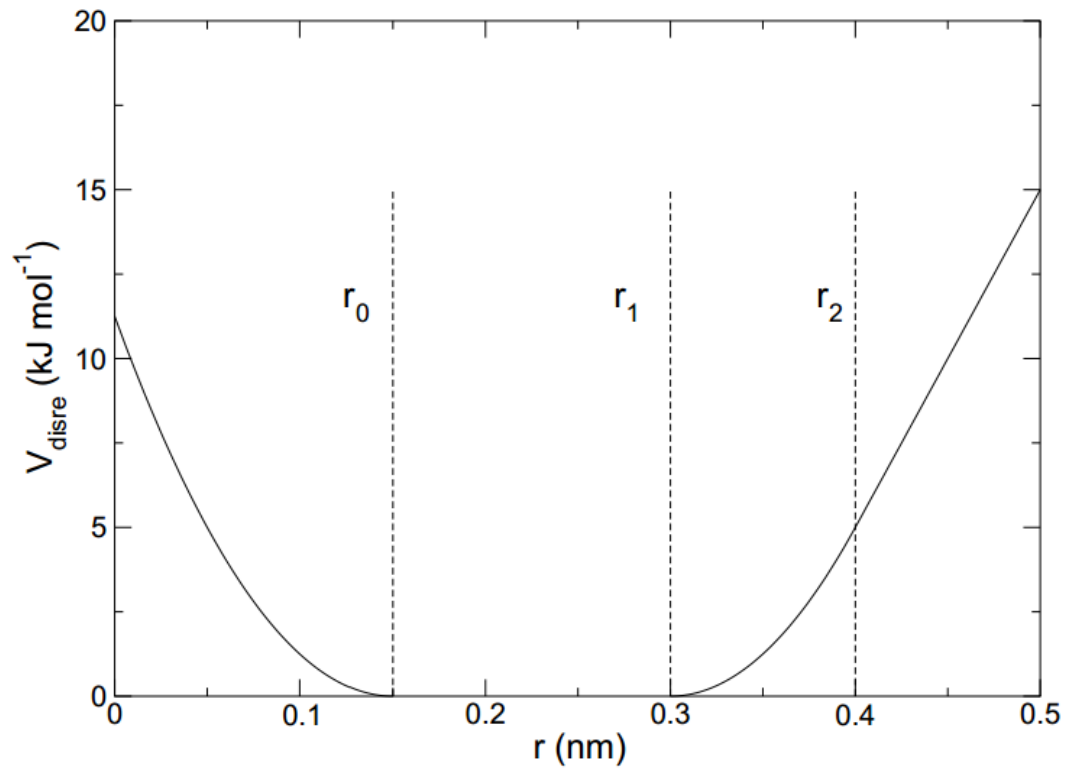
Os estudos de dinâmica molecular foram feitos utilizando o programa GROMACS (4.6.4). A estrutura de menor energia obtida pelos experimentos de ressonância foi inserida e centralizada em uma caixa cúbica e realizada uma solvatação explícita para dimetilsulfóxido (DMSO). O campo de força usado foi o ffG53a6 do pacote GROMACS (84). As simulações foram realizadas com condições periódicas de contorno, em agrupamento Gibbs (NPT), a temperatura de 298,15 K com termostato v-reescale e pressão atmosférica (1 atm) com o barostato de Berendsen. Foi aplicado o método de *Particle Mesh Ewald* (PME, distância Fourier de 0,14 nm, 6<sup>o</sup> ordem e tolerância 10<sup>-5</sup>) e potenciais de Leonard-Jones para considerar as interações de Coulomb e de van der Waals, com raio de 1,2nm e 1,4 nm respectivamente. O algoritmo LINCS foi aplicado sobre as ligações covalentes. A energia inicial do sistema foi minimizada e o sistema foi equilibrado através de uma curta dinâmica de 2ns com a proteína em condições de restrição de posição. Além disso foram estabelecidas restrições de distância obtidas através dos NOEs, uma vez que estes representam evidências experimentais de relações de distâncias entre diferentes núcleos. Desta maneira, podemos observar a dinâmica do peptídeo *in silico* respeitando as informações obtidas através do assinalamento do espectro de 2D-1H-1H- NOESY. As restrições de distância foram estabelecidas dando uma penalidade de custo energético quando os núcleos em questão se afastarem ou se aproximarem mais do que os limites estabelecidos para restrição, como esta mostrado na figura 3.3. Os limites superiores e inferiores foram estabelecidos com base nas informações de saída do cálculo da estrutura. Além disso foram usadas as ferramentas do Gromacs: g\_cluster, g\_helix e dssp para extrair informações adicionais da dinâmica molecular. As representações gráficas a respeito da estrutura foram geradas pelo programa Pymol (133).





**Figura 3.2 Assinalamento do espectro de NOESY do peptídeo ADSEG em DMSO.** A figura acima duas regiões do espectro de NOESY (HN-HN e HN-H $\beta$ ). A figura mostra os sistemas de spin do Asp 329 e da Phe 328. As conectividades intra-residuais estão em azul e os relativos as conectividades inter-residuais estão em vermelho. As linhas indicam que estes picos representam conectividades de átomos dentro de um mesmo sistema de spin.





**Figura 3.3:** Potencial de energia estabelecido para a dinâmica com restrições de distância.  $r_0$  e  $r_2$  representam os limites superiores e inferiores de distância, onde há uma penalidade de custo energético para que a posição se mantenha dentro dos limites.

## **4- Resultados**

### **4.1- Experimentos de RMN**

#### **4.1.1 – Espectro 1D**

Com o objetivo de determinar a estrutura do peptídeo ADSEG em solução optamos pela técnica de ressonância magnética nuclear. Primeiramente obtivemos um espectro 1D da amostra para verificar, através da dispersão dos picos, se amostra estaria estruturada dentro das nossas condições experimentais. O espectro 1D (Figura 4.1) mostrou picos bem definidos, com linhas bem finas, indicando que a amostra estava estruturada. O espectro 1D mostra a intensidade (eixo y) em que cada valor de deslocamento químico (eixo x) aparece. Quando a proteína esta estruturada, diferentes resíduos sofrem a influência de diferentes ambientes químicos, pois os átomos terão vizinhos distintos resultando em uma boa dispersão dos picos. Se o peptídeo assumir uma conformação randômica, os diferentes resíduos irão sofrer a influência de ambientes químicos muito parecidos (influenciado muito mais pelo solvente do que pelo dobramento), tendo uma dispersão ruim do espectro.

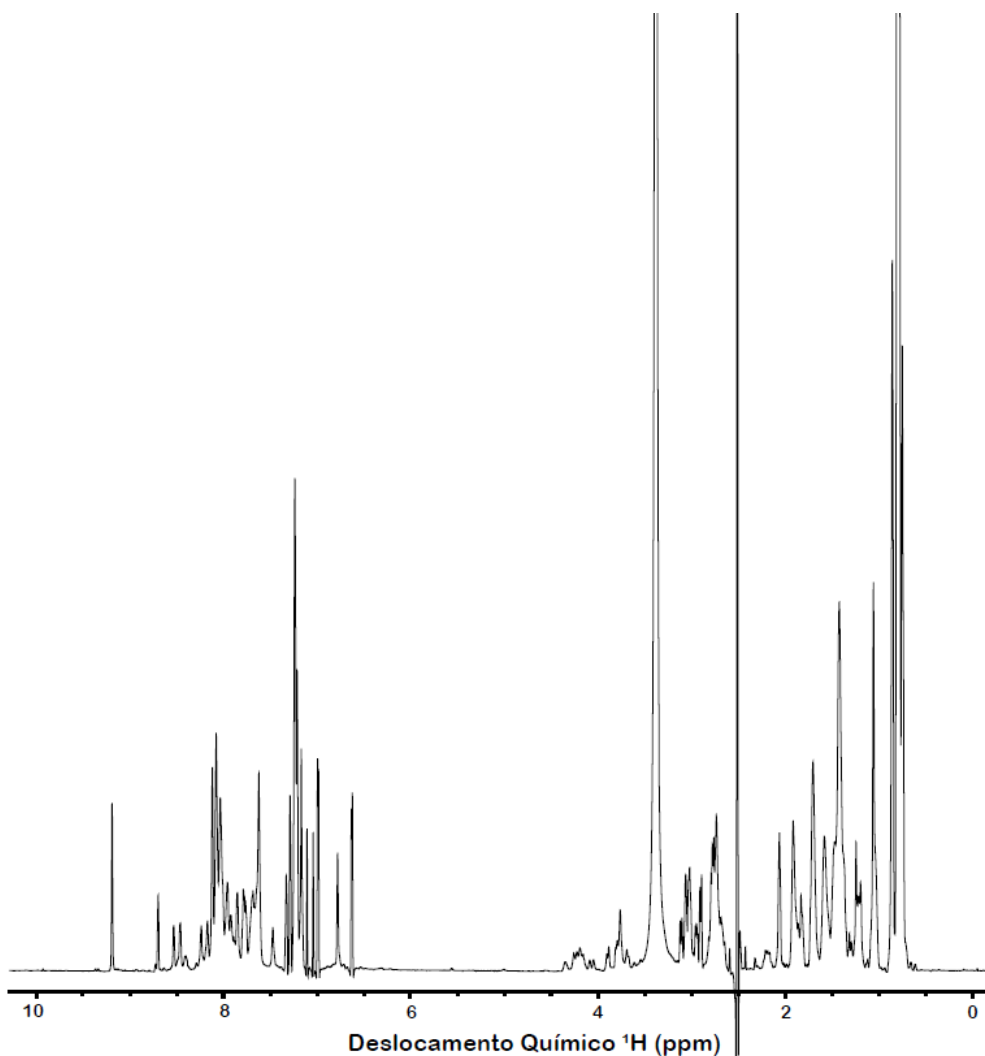
#### **4.1.2- Predição da estrutura secundária**

A partir do CSI (*Chemical Shift Index*) podemos ter uma predição do conteúdo de estrutura secundária. Logo, utilizamos um valor de referência para os valores de deslocamento químico dos prótons  $\alpha$  (assumindo um peptídeo com a conformação randômica) e subtraímos pelos valores obtidos para cada resíduo do peptídeo em análise. Valores positivos indicam propensão à folha- $\beta$  enquanto valores negativos indicam propensão a hélice. A figura 4.2 mostra a predição de estrutura secundária obtida para o peptídeo ADSEG, o qual se mostrou parte estruturado em folha- $\beta$  e parte em  $\alpha$ -hélice. Os valores de deslocamento químico estão na tabela 4.1.

Além disso, utilizamos um outro método para a predição da estrutura secundária com o objetivo de reforçar a predição do CSI (Figura 4.3). O SSP (*Secondary Structure Propensity*) (134) utiliza um algoritmo que usa como base os valores de deslocamento químico de diferentes núcleos (neste caso o H $\alpha$  e

## Resultados

o HN) e cria um *score* que indica a propensão daquela região a assumir uma determinada estrutura secundária. Quando a região é estruturada em  $\alpha$ -hélice ou folha- $\beta$  o *score* tende a assumir valores próximos a 1 e -1, respectivamente. Corroborando com a predição do CSI, o SSP predisse a presença de uma hélice entre os resíduos 324 e 329. Entretanto, o SSP não indicou uma folha- $\beta$  bem formada entre os resíduos 319-321 e 330-336, como foi predito pelo CSI.

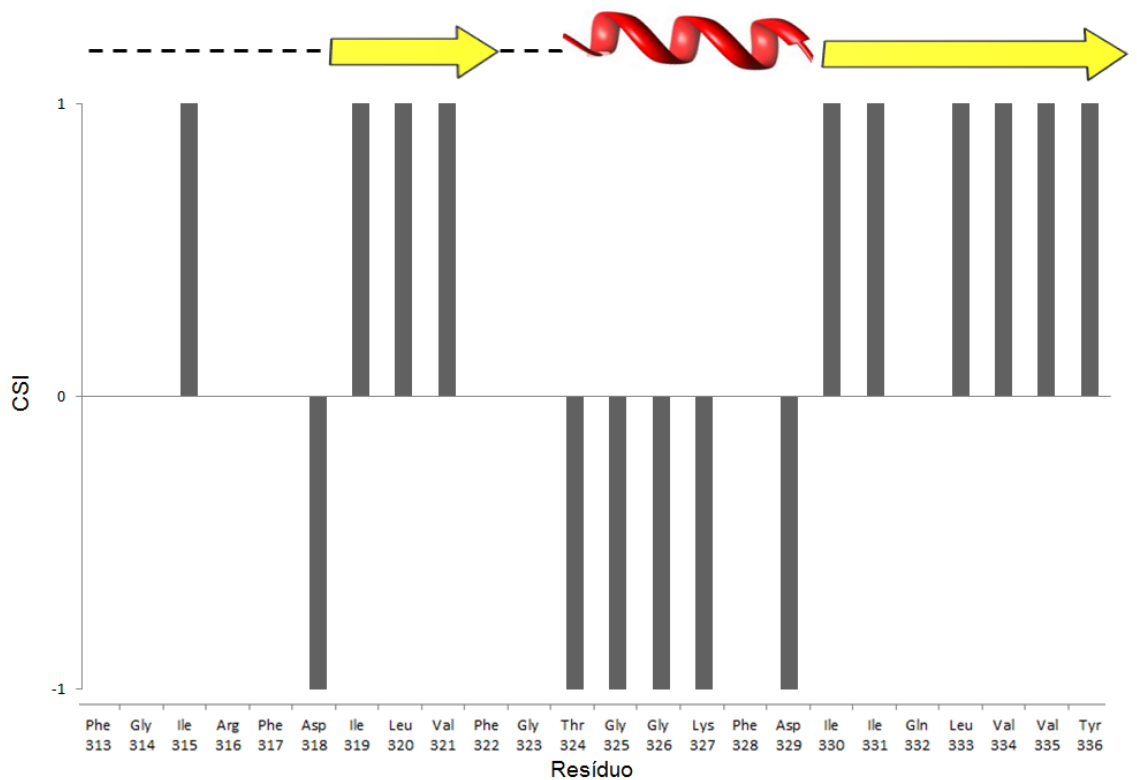


**Figura 4.1** Espectro 1D do peptídeo ADSEG em DMSO. O eixo “x” representa os valores de deslocamento químico e o eixo “y” representa a intensidade no qual estes valores foram obtidos.

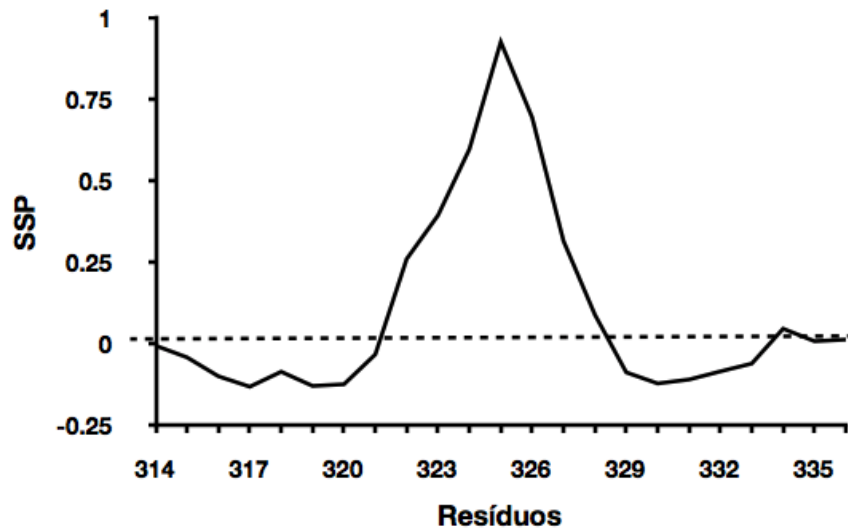
### **4.1.3- Curva de “build-up”**

Em algumas circunstâncias, a magnetização não é transferida entre prótons diretamente pelo espaço entre eles, mas pode ocorrer indiretamente por meio de um próton em um espaço intermediário. Neste exemplo, ao invés da magnetização passar do próton hipotético A para o C, ela é transferida para o próton B e em seguida para o C. Desta maneira, a intensidade do pico não terá a relação esperada da distância entre os prótons A e C, este fenômeno é conhecido como difusão de spin (Figura 4.5). Logo, devemos usar um tempo de mistura no qual conseguimos a intensidade máxima de sinal sem que haja difusão de spin. Para superar este artefato, podemos verificar a intensidade de um pico em diferentes tempos de mistura, observar o padrão da curva, e escolher um ponto (um determinado tempo de mistura) adequado. Foram escolhidos 3 picos de maneira aleatória (dentro dos picos “reais”, ou seja, que não eram ruído) e plotados contra tempo de mistura (Figura 4.6)

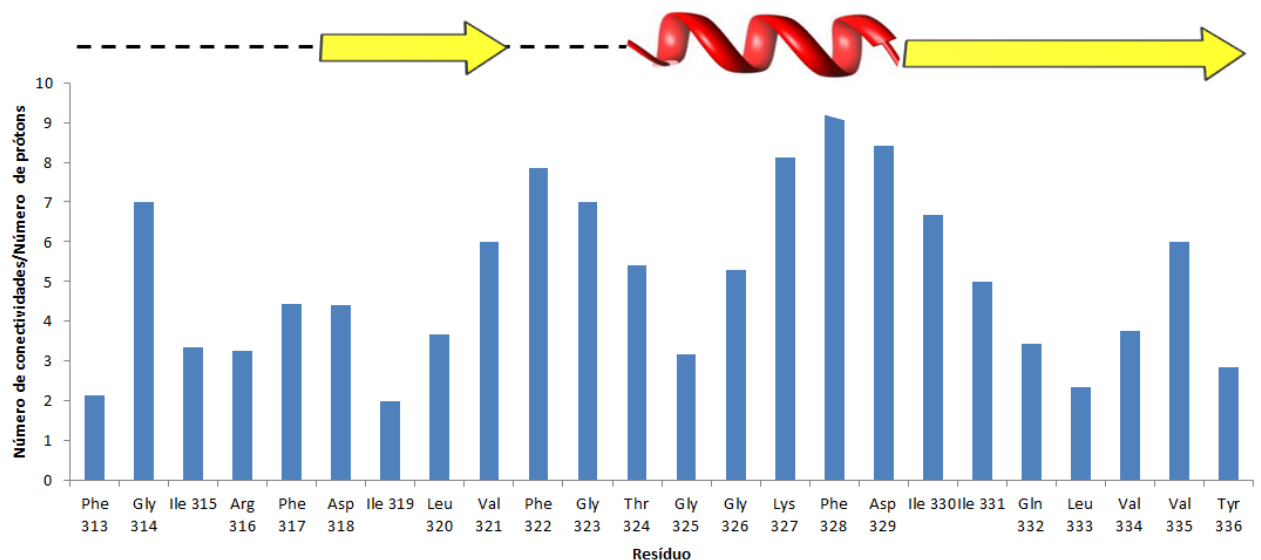
Levando isso em consideração, escolhemos o tempo de mistura de 400 ms, uma vez que podemos observar na figura 4.6 que neste tempo a intensidade do pico não começou a cair e portanto temos a intensidade máxima do sinal, logo não houve difusão de spin neste tempo de mistura.



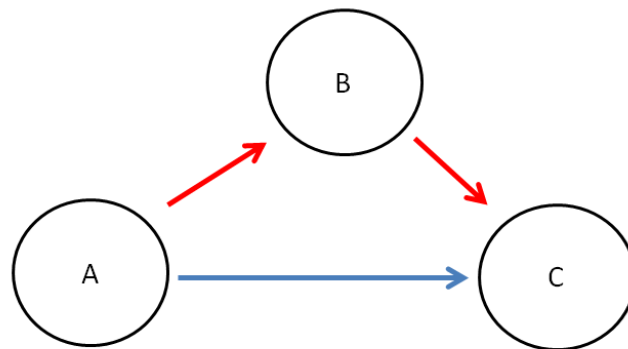
**Figura 4.2 Chemical Shift Index (CSI)** Predição da estrutura secundária do peptídeo ADSEG em DMSO através da variação dos valores de deslocamento químico obtidos em relação aos valores de referência (peptídeo com estrutura randômica). Valores positivos indicam propensão a  $\alpha$ -hélice e negativos indicam propensão a folha- $\beta$ . O desenho esquemático acima representa a predição da estrutura secundária pelo CSI: folha- $\beta$  (em amarelo),  $\alpha$ -hélice e *loop* (linha tracejada).



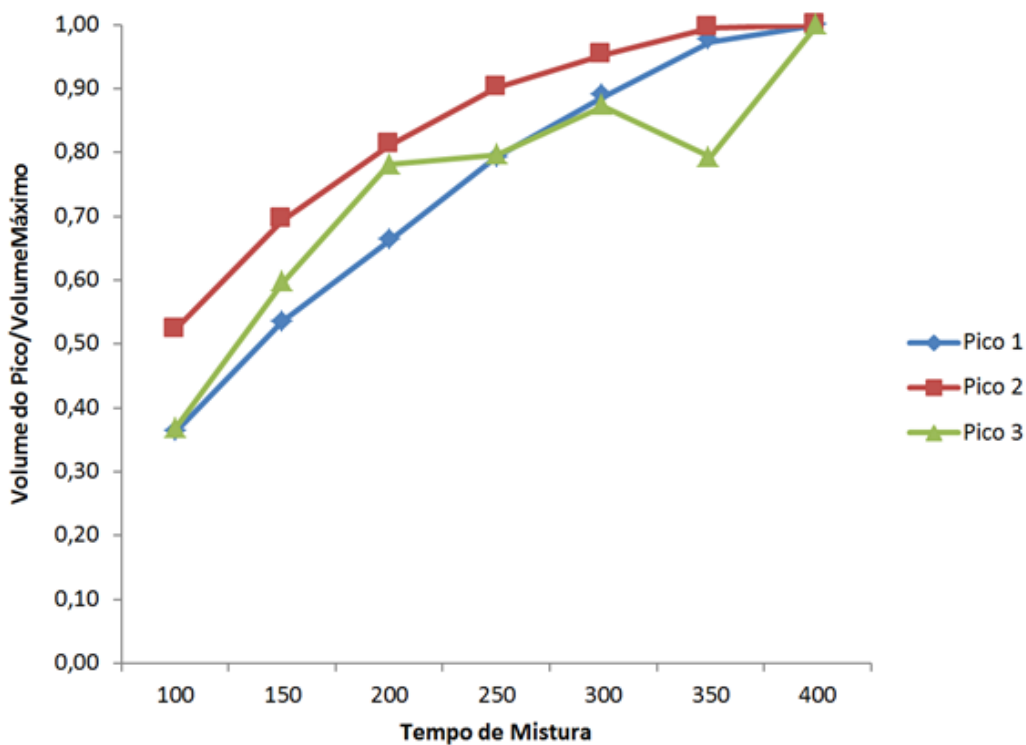
**Figura 4.3 Secondary Structure Propensity (SSP).** A figura mostra o score SSP para cada região do peptídeo ADSEG. Valores próximos a 1 indicam a presença de  $\alpha$ -hélice e valores próximo a -1 indicam a presença de folha- $\beta$ .



**Figura 4.4 Número de assinalamentos por resíduo encontrados no espectro de NOESY.** O desenho esquemático acima representa a predição da estrutura secundária pelo CSI: folha- $\beta$ ,  $\alpha$ -hélice e *loop* (linha tracejada).



**Figura 4.5 Fenômeno de difusão de spin.** Em um experimento hipotético de NOESY a transferência de magnetização entre os átomos A e C pode ocorrer diretamente (linha azul), o que daria uma relação correta entre o volume do pico gerado pela transferência de magnetização entre eles. Todavia, a magnetização transferida de A para B pode ser passada para C se o tempo de mistura for muito longo (linhas vermelhas), fazendo que haja uma relação errada entre o volume do pico gerado e a distância. Logo o tempo de mistura de espectro de NOESY deve permitir a intensidade máxima, sem que haja o fenômeno de difusão de spin.



**Figura 4.6 Curva de *build up*.** Foram escolhidos três picos aleatórios (que não eram ruído) e o seu volume foi verificada em cada tempo de mistura. Cada

linha representa um pico distinto e cada triângulo representa o volume medido normalizado pelo valor máximo observado para cada pico.

### **4.1.4 Assinalamento do espectro**

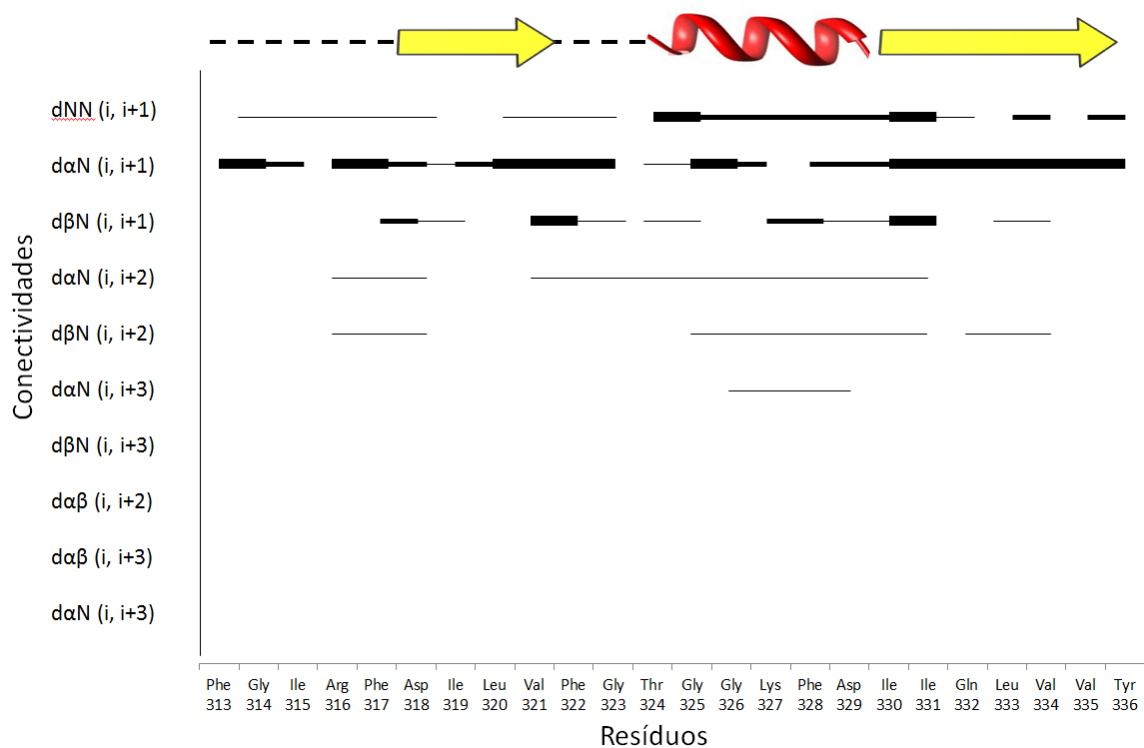
O assinalamento do espectro foi feito com o auxílio do programa Ccpn Analysis para a visualização dos espectros 2D NOESY e TOCSY usando a abundância natural do próton. O procedimento de assinalamento está descrito em materiais e métodos. Como observado na figura 4.1, o espectro apresentou satisfatória dispersão. Todos os sistemas de spin foram encontrados no tempo de mistura usado (400 ms). O volume de cada pico assinalado foi usado como entrada para o cálculo da estrutura. Os valores de deslocamento químico encontrados estão na tabela 4.1 e o padrão de conectividades encontrado está representado na figura 4.7. A figura 4.8 mostra as 20 estruturas de menor energia geradas pelo experimentos de RMN. O RMSD do backbone das estruturas foi de  $3,15 \pm 0,7$  Å. O RMSD (*root mean square deviation*) é a média quadrática das variação das posições dos átomos em diferentes estruturas, e representa uma medida de variância quando comparamos mais de uma estrutura. Outra maneira de validar a estrutura seria através do gráfico de Ramachandran, o qual estabelece os ângulos *Phi* e *Psi* da cadeia principal permitidos quando está participando de uma hélice ou folha- $\beta$  (com exceção da glicina, que tem liberdade para assumir diferentes ângulos, devido à sua pequena cadeia lateral).

Basicamente, as estruturas obtidas se assemelham a um grampo com uma conformação predominantemente estendida com uma região em hélice entre os resíduos 327 e 331. O gráfico de Ramachandram mostra que os resíduos estão em regiões favoráveis, reforçando as características estruturais que podemos observar. É importante ressaltar que o refinamento da estrutura foi feito levando em consideração o ambiente de DMSO o qual esta inserido o peptídeo. Este fato se mostrou importante, uma vez que quando calculada a estrutura sem levar em consideração este parâmetro, podemos observar a hélice em outra posição (entre os resíduos 324 e 329, dados não mostrados). Logo, a presença da hélice entre os resíduos 327 e 331, observadas nas estruturas com refinamento em DMSO, é mais coerente com os resíduos que a

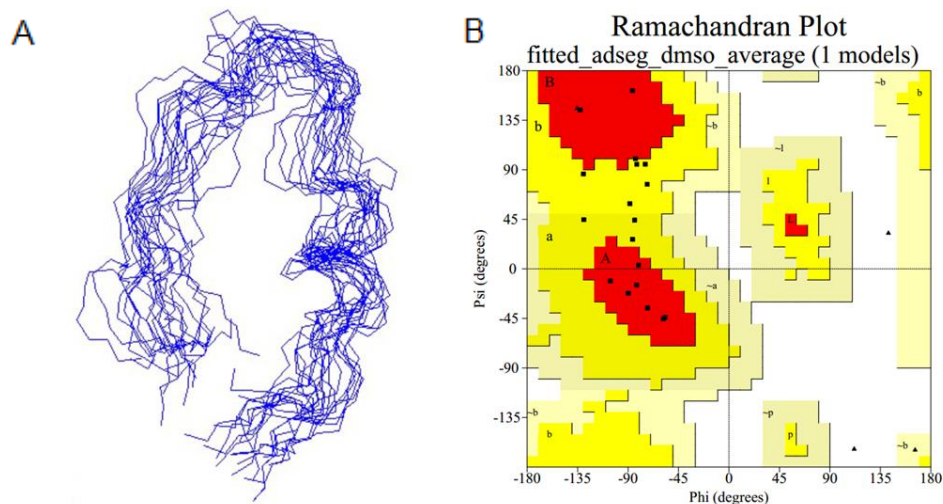


## Resultados

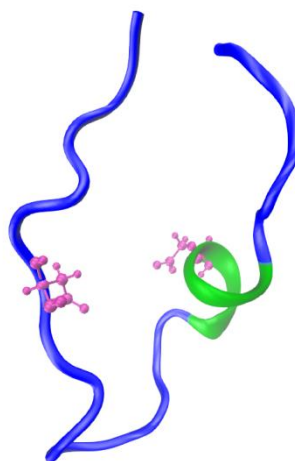
compõe. Uma vez que a hélice entre os resíduos 324 e 329 inclui uma região rica em glicina (GTGG) seria muito flexível para suportar tal estrutura secundária. Regiões com tal flexibilidade são encontradas normalmente em voltas, como aparece nas estruturas da figura 4.8. A tendência helicoidal observada nas estruturas geradas com o refinamento em DMSO (figuras 4.8 e 4.9) é corroborada pelas previsões do CSI e do SSP (figuras 4.2 e 4.3, respectivamente). A figura 4.9 mostra a posição dos resíduos carregados negativamente na estrutura de menor energia gerada pelos experimentos de RMN. Podemos ver que os dois resíduos de aspartato se encontram diametralmente opostos, o que sugere que esta disposição seja fundamental para as características de seletividade iônica apresentadas pelo peptídeo ADSEG.



**Figura 4.7 Padrão de conectividades encontradas no assinalamento do peptídeo ADSEG.** As linhas na figura representam as conectividade entre os resíduos (mostrados no eixo “x”). A espessura das linhas representa a intensidade do pico: fortes ( $d > 2,8 \text{ \AA}$ ), médio ( $3,4 \text{ \AA} > d > 2,8 \text{ \AA}$ ) e fracos ( $d > 3,4 \text{ \AA}$ ).



**Figura 4.8 Sobreposição das 20 estruturas de menor energia derivadas do cálculo da estrutura do peptídeo ADSEG e gráfico de Ramachandran da estrutura média.** Na figura (A) está representado o *backbone* das estruturas geradas pelos experimentos de RMN. Não houve nenhuma violação. O gráfico de Ramachandran (figura B) foi gerado pela plataforma online de validação de estruturas PROCHECK-NMR. A estrutura média apresentou 10 resíduos em regiões favoráveis, 8 resíduos em regiões adicionalmente favoráveis, e quatro resíduos de glicina (a qual tem liberdade para assumir diversos ângulos). O primeiro e o último resíduo não participam da análise.



**Figura 4.9** Estrutura de menor energia gerada pelo programa ARIA após o assinalamento do espectro destacando, em rosa, os

resíduos de aspartato diametralmente opostos, carregados negativamente, que podem estar envolvidos com a formação de um canal cátion seletivo do peptídeo ADSEG.

**Tabela 4.1 Valores de deslocamento químico assinalados no espectro obtido do peptídeo ADSEG em DMSO.**

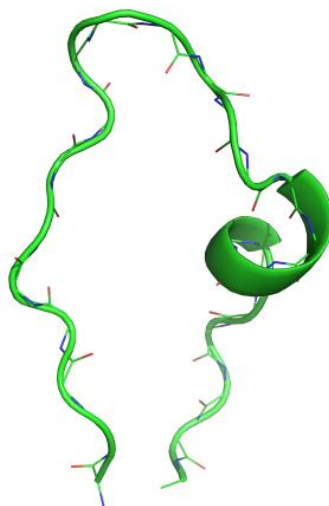
	NH	$\alpha$ H	$\beta$ H	Outros
Phe 313	8,15	4,12	2,98 e 3,15	HD: 7,21 HE: 7,14 HZ: 7,08
Gly 314	8,73	3,84 e 3,93		
Ile 315	8,06	4,28	1,72	HG: 0,80
Arg 316	8,11	4,3	1,63	HG: 1,47 HE: 7,51
Phe 317	7,99	4,61	2,8 e 3,05	HD: 7,25 HE: 7,15 HZ: 7,08
Asp 318	8,56	4,63	2,53 e 2,7	
Ile 319	8	4,24	1,73	HG1A: 1,09 HG1B: 1,24
Leu 320	8	4,39	1,45 e 1,61	HG: 1,46
Val 321	7,69	4,18	1,92	HGA: 0,78
Phe 322	8,11	4,6	2,82 e 3,06	HD: 7,26
Gly 323	8,27	3,8 e 3,93		
Thr 324	7,89	4,08	4,08	HG1: 5,05 HG2: 1,09
Gly 325	8,21	3,8		
Gly 326	8,1	3,72 e 3,79		
Lys 327	7,89	4,26	1,48 e 1,61	HGA: 1,09 HGB: 1,25
Phe 328	8,05	4,59	2,79 e 3,06	HD: 7,27
Asp 329	8,5	4,65	2,54 e 2,72	
Ile 330	7,72	4,28	1,74	HG1A: 1,07 HGB: 1,44
Ile 331	7,95	4,28	1,74	HG1A: 1,10 HG1B: 1,44 HG2: 0,83 HD: 0,74
Gln 332	8,07	4,29	1,75	HGA: 2,10 HE: 6,28
Leu 333	8,07	4,37	1,62	HG: 1,46
Val 334	7,8	4,23	1,95	HG: 0,83
Val 335	7,82	4,2	1,95	HG: 0,83
Tyr 336	8,12	4,39	2,81 e 2,94	HD: 6,82 HE: 6,67

## 4.2 – Dinâmica molecular

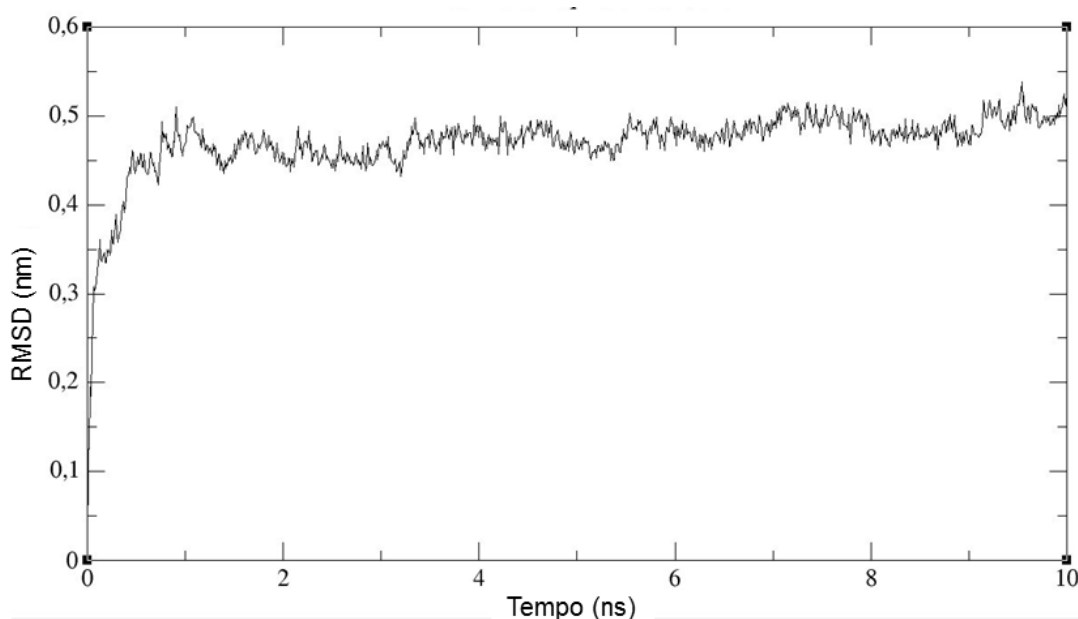
Utilizamos a estrutura de menor energia obtida nos experimentos RMN como a estrutura inicial do peptídeo nas simulações (Figura 4.10). Além disso fixamos restrições de distância obtidas no assinalamento não ambíguos do espectro de RMN, uma vez que temos uma evidência experimental destas distâncias, e utilizamos um campo de força para refinamento de estruturas

## Resultados

obtidas por RMN (*gmx2ff*) no pacote do Gromacs. O tempo total de simulação foi de 10 ns, este tempo se mostrou suficiente, uma vez que o peptídeo se estabilizou como é mostrado pela estabilização do RMSD nos primeiros nanosegundos de simulação (Figura 4.11).



**Figura 4.10.** Estrutura de menor energia do peptídeo ADSEG (apenas o *backbone*) obtida utilizando as restrições derivadas dos NOEs assinalados no espectro de NOESY. Esta estrutura foi utilizada como ponto de partida na dinâmica molecular.



**Figura 4.11** RMSD durante os 10ns de simulação do peptídeo ADSEG em DMSO. Neste gráfico está representada a variação de RMSD de toda a estrutura no

## Resultados

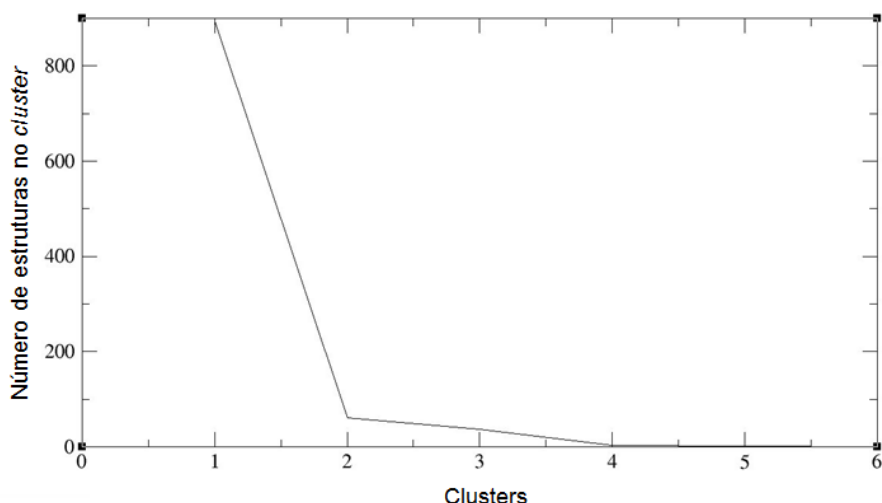
decorrer dos 10 ns de dinâmica molecular. Podemos ver que rapidamente (por volta de 2 ns) a estrutura se estabilizou e o RMSD se manteve predominantemente constante.

Utilizamos a ferramenta do pacote do Gromacs *g\_cluster* para avaliar o comportamento da estrutura durante a simulação. Esta ferramenta reúne diferentes *frames* observados na simulação com estruturas semelhantes (variação de até 0,2 nm de RMSD) em grupos (denominado *clusters*). No total da simulação, o *g\_cluster* pode separar todos os *frames* em 5 *clusters*, numerados em ordem decrescente de número estruturas agrupadas em cada *cluster*. O número de estruturas por *cluster* está representado na figura 4.12 e as estrutura médias de cada cluster estão representados na figura 4.13. Com o *g\_cluster* podemos ainda observar quais foram os *clusters* que predominaram durante a dinâmica. Na figura 4.14 podemos ver em que momento da dinâmica encontramos cada *cluster*. A dinâmica começa com uma estrutura que foi agrupada no *cluster* #5, o qual podemos ver na figura 4.13 que é o que mais se assemelha a estrutura inicial da dinâmica (figura 4.10). Entretanto o peptídeo rapidamente muda o seu padrão estrutura de maneira que agora as estruturas subsequentes são agrupadas em diferentes clusters (especificamente o #1 e o #4, figura 4.13). Neste momento podemos ver que há uma variação no RMSD da estrutura (Figura 4.11), corroborando com estas observação. Deste momento em diante, a estrutura parece se estabilizar, mostrada pela predominância do cluster #1 durante todo o decorrer da dinâmica. Logo podemos dizer que a estrutura média do cluster #1 (figura 4.14) representa como se estabilizou o peptídeo durante a maior parte da dinâmica.

O fato mais marcante na dinâmica molecular foi que a região em hélice perdeu a definição nos primeiros nano segundos de dinâmica, como é mostrado pelo *dssp* (Figura 4.15). O *dssp* é uma ferramenta que identifica padrões de estrutura secundária encontrados no peptídeo no decorrer do tempo de simulação da dinamica. Assim podemos ver na figura 4.15 que a região em hélice (representada pela cor azul) é identificada somente nos momentos iniciais da dinâmica. Ao observarmos a dinâmica vemos claramente que a pequena região de hélice vai abrindo, até um momento que se estabiliza.

## Resultados

Esta abertura pode ser observada pelo aumento do diâmetro da hélice no decorrer da dinâmica (Figura 4.16)



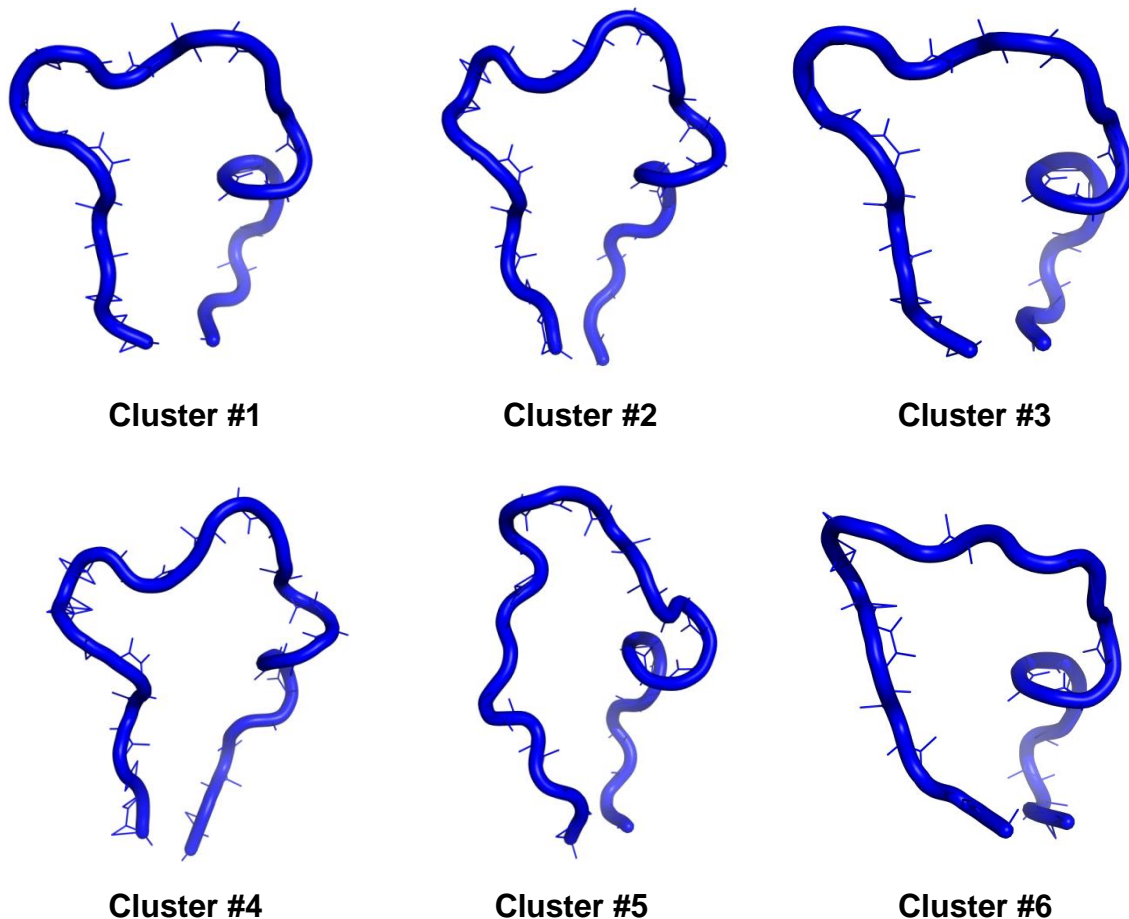
**Figura 4.12 Número e variação de clusters durante a simulação.** O *ponto de corte* para a agrupar estruturas no *cluster* foi uma RMSD 0,2 nm, ou seja, estruturas com diferenças representadas por um RMSD menor que 0,2 nm são agrupadas em um mesmo grupo (*cluster*).

. Podemos ver na figura 4.17, que mostra a estrutura ao final da dinâmica que a representação gráfica gerada pelo programa *Pymol* não identifica mais a região de hélice (diferentemente da estrutura usada como ponto inicial da dinâmica, figura 4.10), mas podemos ver que esta região não assumiu uma conformação estendida, preservando parte do padrão que se assemelha a uma hélice. Essas informações em conjunto sugerem que esta região tem uma tendência a assumir uma conformação helicoidal (o que é corroborado pelos dados de predição de estrutura secundária, figuras 4.2 e 4.3), contudo, ela não é estável, já que no início da dinâmica ela perde a definição. É provável que nas diferentes estruturas encontradas na amostra algumas apresentem a hélice bem definida nesta região e outras com a hélice não tão bem definida. Ao observamos algumas outras estruturas derivadas dos experimentos de RMN, podemos ver que algumas das estruturas geradas apresentam hélices não tão bem definidas (dados não mostrados). Um fato que poderia explicar esta observação é que esta região poderia ser o início da região de hélice transmembrana no receptor P2X7 íntegro, assim como é a

## Resultados

região homóloga no *zfp2X4R* (vide discussão, figura 5.4), assim não teríamos os resíduos seguintes para estabilizar as outras voltas da hélice, portanto esta região poderia se dobrar de tal maneira, mas faltariam fatores que a estabilizassem.

A flexibilidade da estrutura pode ser representada pela ferramenta *b-factor* do programa Pymol. Neste tipo de visualização podemos ver as regiões mais flexíveis do peptídeo (Figura 4.18). Como era de se esperar, as extremidades do peptídeo ficaram mais flexíveis. Além disso, podemos observar uma grande flexibilidade na região rica em glicina (GTGG). Na região da hélice, vemos uma flexibilidade moderada, uma vez que não houve a perda de definição total da hélice.

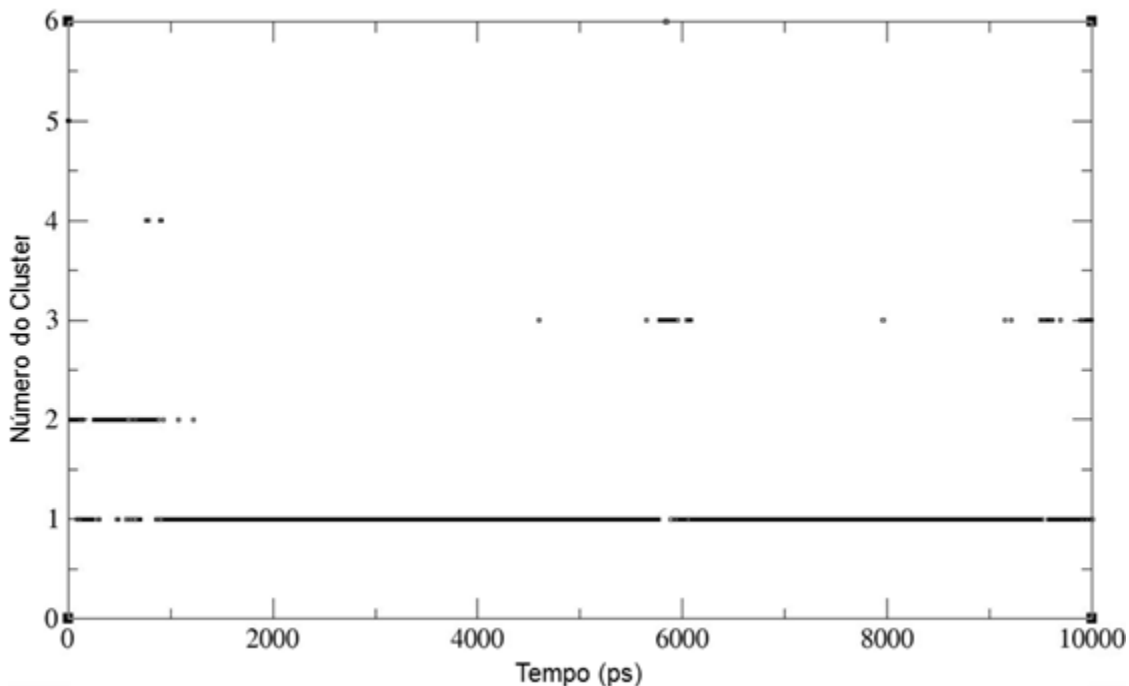


**Figura 4.13.** Estrutura média de cada *cluster* obtido com a ferramenta *g\_cluster*. Nesta figura é mostrado somente o *backbone* do peptídeo. Os clusters são numerados (de #1 a #6) dependendo do número de estruturas



## Resultados

agrupados (em ordem decrescente). Desta maneira as estruturas que compõem o cluster #1 predominam na maior parte da dinâmica.



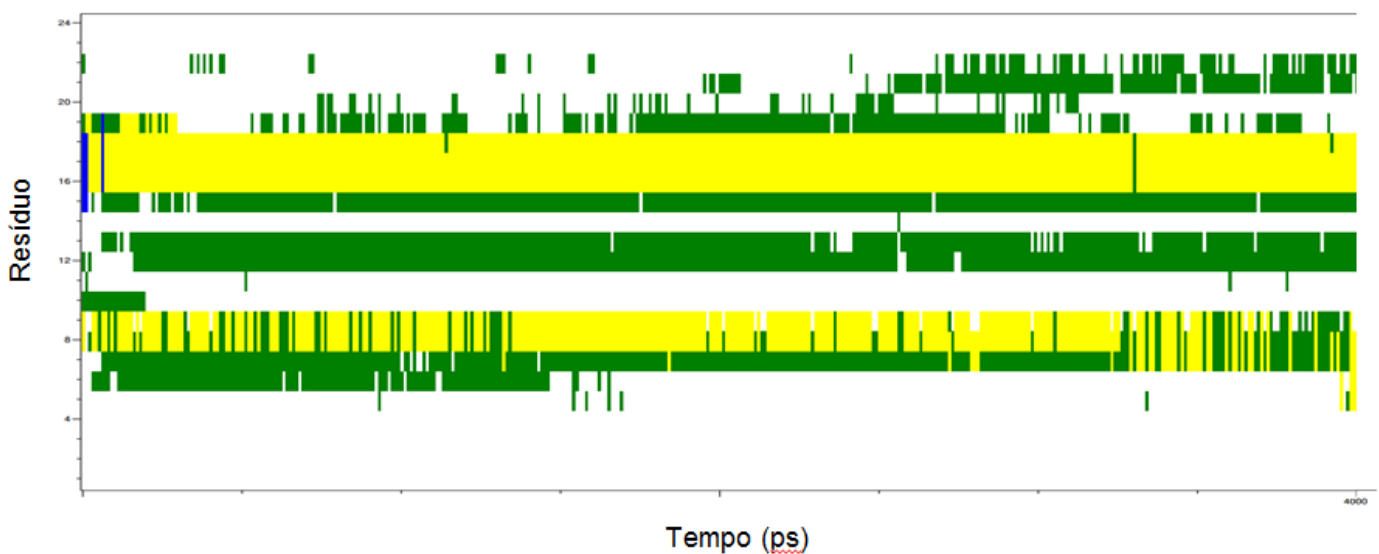
**Figura 4.14 Quantidade de diferentes frames por *cluster*.** Nesta figura podemos ver a quantidade de estruturas no primeiro *cluster* é bem maior que nos demais, além disso a quantidade de estruturas nos clusters seguintes tendem a decrescer, mostrando que a estrutura vai se estabilizando com o tempo.

Os dados mostrados sugerem que a estrutura determinada por RMN está próxima do ideal, ou seja, representa bem as estruturas que o peptídeo pode adotar no ambiente de DMSO. Devemos ressaltar também a flexibilidade que a estrutura parece apresentar em decorrência da diferença entre as estruturas de menor energia geradas pelos experimentos de RMN. Logo, a estrutura pode ser melhorada através de novos cálculos. É importante ressaltar que a abordagem de dividir para conquistar (vide introdução) é usada para segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice. Não há ainda estudos utilizando esta abordagem em estruturas de diferentes padrões. Logo, ainda não sabemos se

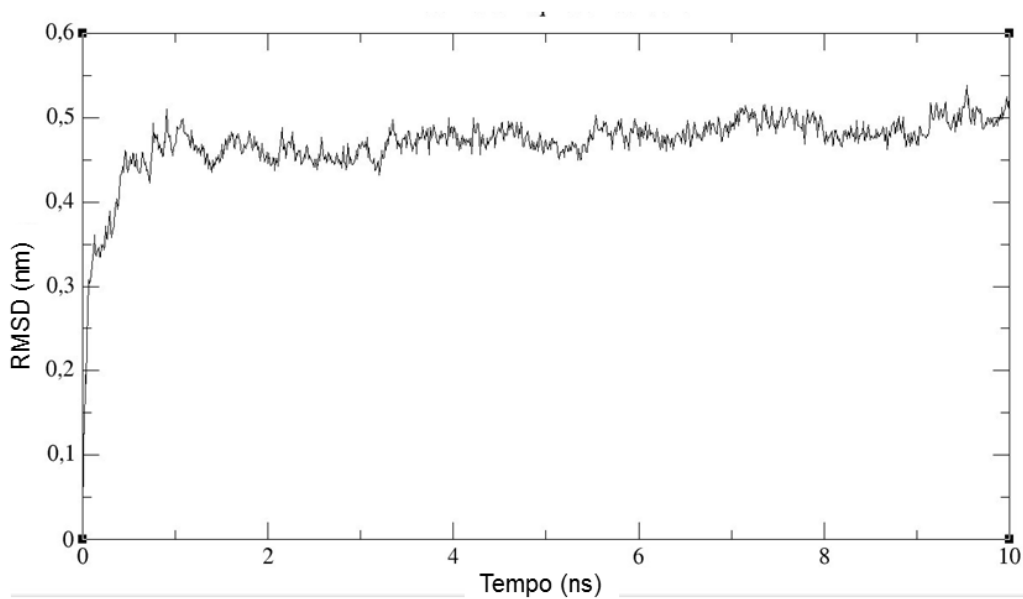


## Resultados

estruturas configuradas em um padrão diferente de hélice são estáveis sob estas condições experimentais tão reducionistas, ou seja, pela determinação da estrutura de apenas um segmento de uma proteína menor e utilizando um solvente mimético de membrana. Como citado na introdução, não temos certeza se este segmento (peptídeo ADSEG) possa estar inserido na membrana no receptor P2X7 íntegro, mas sabemos que ele tem capacidade de oligomerizar e se manter estável em uma membrana, visto pela sua capacidade de formar canais iônicos cátion seletivos em membranas naturais e artificiais (61), logo esperamos que o DMSO tenha reproduzido algumas das características da membrana e contribuído para que o peptídeo assuma uma conformação próxima a encontrada em uma bicamada lipídica.

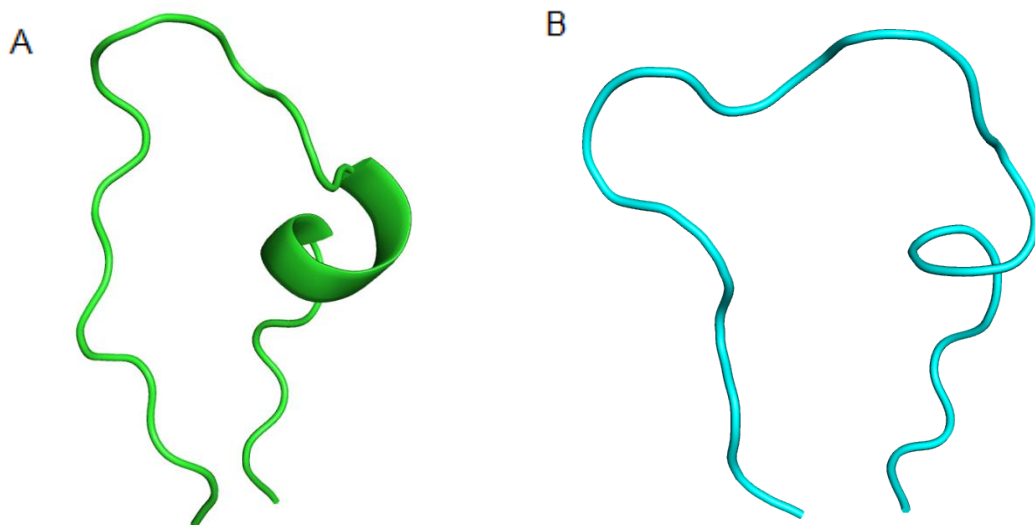


**Figura 4.15. Figura DSSP.** O gráfico acima representa por cores diferentes a estrutura secundária que cada resíduo (eixo y) participa durante os 4 primeiros ns da dinâmica molecular (eixo x). Azul:  $\alpha$ -hélice, verde: dobra (*bend*), amarelo: volta (*turn*). Podemos observar que a região em hélice permanece definida somente nos primeiros picosegundos de simulação.



**Figura 4.16. Variação no raio da hélice no decorrer da dinâmica.**

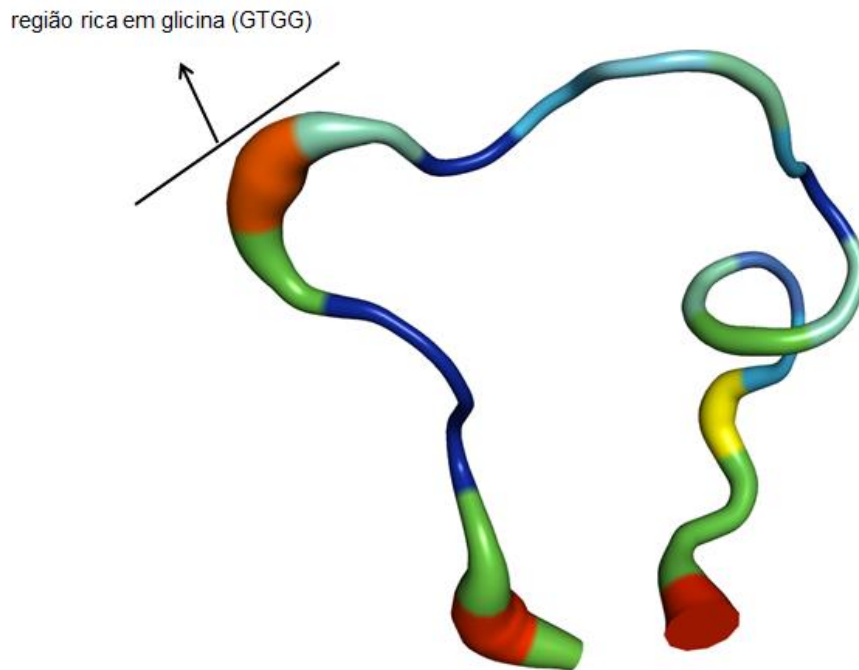
Podemos ver que o raio da hélice aumenta logo no início da dinâmica molecular. Esta variação acompanha a perda de definição da mesma e com a subsequente estabilização da estrutura.



**Figura 4.17 Comparação entre as estruturas no início (em verde, figura A) e no final da simulação de dinâmica molecular (em azul, figura B).** Observando as duas estruturas, podemos ver que de uma maneira geral

## Resultados

ela se abriu e a região de hélice perdeu parte da definição, indicando uma falta de estabilidade promovida pelas interações nesta região, é importante ressaltar que as restrições de distância derivadas do assinalamento do espectro de NOESY foram mantidas durante a dinâmica.

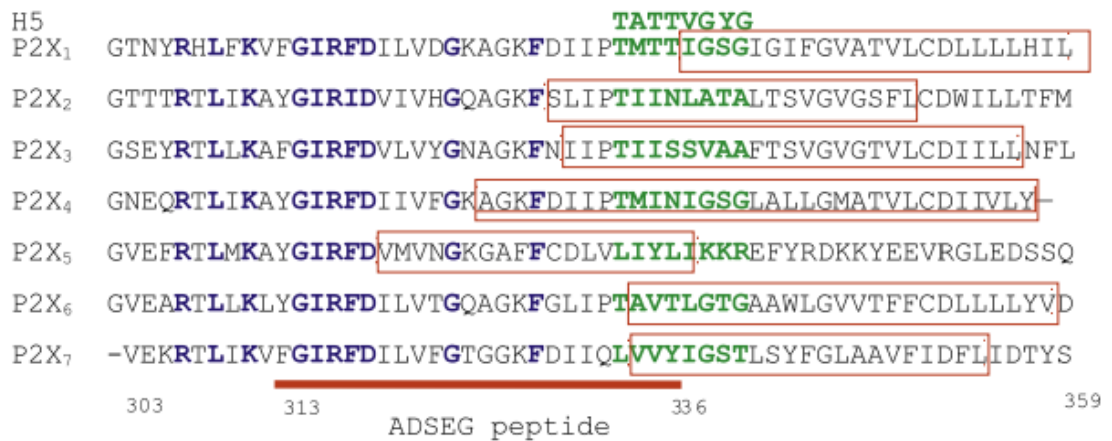


**Figura 4.18 Representação gráfica da flexibilidade da estrutura.**

Neste tipo de representação é mostrado o *backbone* da estrutura do peptídeo ao final da simulação de dinâmica molecular. A espessura da região representada é diretamente proporcional à maior flutuação entre as posições dos átomos durante a simulação. Além disso a flexibilidade também é representada em cores (vermelho: muito flexível e azul: pouco flexível). Ao observar a figura podemos destacar grande flexibilidade nas extremidades do peptídeo e na região rica em glicina.

**5- Discussão**

Com o objetivo de compreender melhor as características estruturais fundamentais para a atividade do P2X7R, nosso grupo se propôs a estudar as suas regiões transmembrana, uma vez que estes domínios formam o caminho para a passagem dos íons nos canais iônicos. Como citado anteriormente, diversos dados na literatura sustentam que o domínio TM2 forma o canal propriamente dito dos P2XRs. Logo, ao fazer o alinhamento múltiplo entre os diferentes subtipos P2X, podemos ver que não há muita semelhança na sequência de aminoácidos destes domínios. Entretanto, na região adjacente ao domínio TM2 podemos ver diversos resíduos conservados, como pode ser observado na figura 5.1. Levando em consideração que uma característica estrutural em comum possa estar associada a uma função comum (no caso dos P2XRs a cátion seletividade, observadas em todos os subtipos com exceção do P2X5R), este segmento poderia estar relacionado com a seletividade iônica dos P2XRs.



**Figura 5.1. Alinhamento múltiplo entre as diferentes subunidades P2X.** Os segmentos mostrados na figura consiste nos domínios transmembrana 2 previstos por algoritmos especializados (caixa vermelha) e a região adjacente, onde podemos ver diversos resíduos consenso (em azul) O segmento em verde acima consiste na assinatura H5 dos canais de K<sup>+</sup>, a qual esta relacionada com a seletividade iônica e apresenta similaridade com um segmento (em verde) do P2X1R (o segmento homólogo nas outras

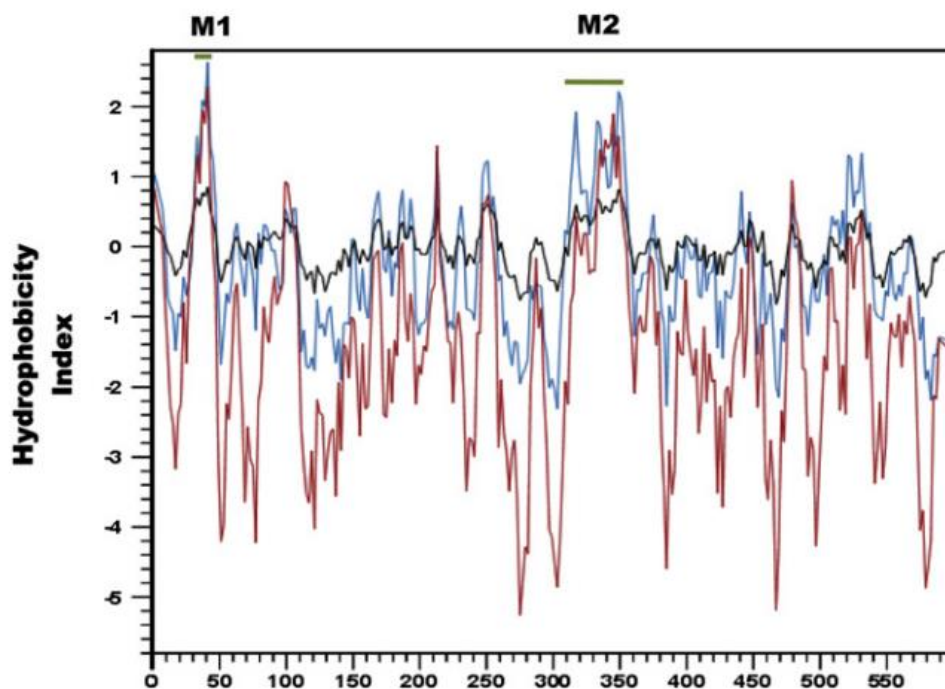
subunidades também esta em verde. A sequência sobre a linha vermelha consiste no peptídeo ADSEG (Adaptado de Teixeira *et al*, 2009(61)).

Ao buscar regiões homólogas com esta região dos P2XRs, verificamos que o subtipo P2X1 possui similaridade com o segmento H5, um segmento encontrado em diversos canais de  $K^+$ (127), mesmo que evolutivamente distantes e este segmento está relacionado com a seletividade iônica destes canais. A partir destas observações, resolvemos estudar o segmento adjacente ao domínio TM2 do receptor P2X7, o qual compreende alguns dos resíduos consenso e parte do segmento homólogo a região do P2X1R que havia semelhança com o segmento H5 dos canais de  $K^+$ . Denominamos este segmento de peptídeo ADSEG.

Teixeira *et al* utilizaram diferentes algoritmos para prever as regiões transmembrana do P2X7R verificaram que não houve consenso entre eles (Tabela 5.1). Estes algoritmos focam na busca por hélices transmembrana, uma vez que as regiões TM de praticamente todas as proteínas de mamíferos de estrutura conhecida são configurados em  $\alpha$ -hélice. O programa HMMTOP2 predisse três hélices transmembrana para o P2X7R, uma entre os resíduos 25-47, que seria o TM1 e duas outras (TM2 e TM3) entre os resíduos 309-327 (a qual inclui os resíduos consenso) e 334-356, respectivamente. Os programas MEMSAT e TMPRED preveem duas regiões TM, sendo que a primeira estava de acordo com os predito pelo HMMTOP e a segunda estaria entre os resíduos 333-355, a qual não compreende a região consenso. Já o programa TMAP predisse, de maneira similar ao MEMSAT e TMPRED, duas regiões TM, sendo que a região do TM1 estava de acordo com a predição dos outros programas. Entretanto, esta ferramenta predisse o TM2 entre os resíduos 316-344, o qual compreende os resíduos consenso (55).

Ao tentarmos compreender esta falta de acordo entre os diferentes programas de predição de hélice transmembrana, pudemos fazer algumas observações interessantes. Ao analisar a hidrofobicidade da sequência da subunidade P2X7 por três escalas diferentes, podemos observar o mesmo padrão (Figura 5.2): uma pequena região altamente hidrofóbica, que denominamos de M1 e uma grande região hidrofóbica que denominamos M2. A

região M1 esta de acordo com as previsões dos programas para uma hélice transmembrana nesta região. No entanto, a segunda região hidrofóbica contém todos os segmentos previstos para o provável segundo (e terceiro, no caso da predição do HMMTOP2) domínio transmembrana, independente da falta de acordo dos programas. Estas observações levantaram algumas perguntas como: qual seria o segundo domínio TM2 do P2X7R? Este domínio conteria os resíduos consenso? Se não, a região consenso, por ser altamente hidrofóbica poderia entrar na membrana durante o mecanismo de abertura do P2X7R (tanto o canal iônico quanto o poro não seletivo)? Uma vez que estes programas são especializados em predizerem hélices transmembrana, poderia este domínio estar configurado de outra maneira?



**Figura 5.2. Análise da hidrofobicidade da subunidade hP2X7.** Aqui são mostradas três escalas diferentes plotadas contra a sequência primária do hP2X7R: Eisenberg (preto), Kyte e Doolittle (azul) e Engelman (vermelho). Todas as escalas mostram duas regiões altamente hidrofóbicas M1 e M2, sendo a região M2 (região onde houve o desacordo em respeito à predição de regiões TM e onde há os resíduos consenso entre as subunidades P2XR) bem maior em relação a M1 (Adaptado de Teixeira *et al*, 2009 (55) ).

É importante afirmar que o peptídeo ADSEG (que está na grande região hidrofóbica M2 e contém alguns dos resíduos consenso) é capaz de formar canais iônicos em bicamadas lipídicas artificiais e naturais (ou seja, presente em uma célula viva) com características de seletividade próximas ao P2X7R (67). Este tipo de abordagem foi utilizada para os domínios transmembrana do receptor de glicina (135) e de acetilcolina (15), os quais peptídeos relativos aos domínios transmembrana, também previstas por ferramentas de bioinformática, também eram capazes de formar canais iônicos por si só, mantendo diversos parâmetros de seletividade. O segmento H5 dos canais de K<sup>+</sup>, também é capaz de formar canais iônicos em bicamadas artificiais (128), também mantendo as características de seletividade iônica observadas na proteínas inteiras que contém este segmento. Além disso, o segmento H5 se posiciona de maneira adjacente à hélice transmembrana, formando um *loop* reentrante na membrana. A contribuição de cada um destes loops reentrantes na membrana forma o filtro de seletividade deste canais tetraméricos. A partir desta observações podemos sugerir que o peptídeo ADSEG pode estar relacionado com a seletividade iônica do P2X7R, o que é uma característica em comum das regiões transmembrana e regiões adjacentes de diversos canais iônicos.

Método	TM1	TM2	TM3	% acurácia
TMHMM2	25-47	-	-	93,1
HMMTOP2	25-47	309-327	334-356	94,4
MEMSAT2	31-47	333-355	-	91,6
TMAP	29-55	316-344	-	92,9
ALOM2	31-47	-	-	80,1
TMPRED	29-55	333-351	-	93,1

**Tabela 5.1 Predição dos prováveis domínios TM do receptor P2X7.**

Diferentes ferramentas foram empregadas para predizer a localização dos prováveis domínios TM do receptor P2X7. Podemos ver que as predições entram em acordo no que diz respeito ao domínio TM1, entretanto, há

resultados substancialmente diferentes para o domínio TM2 entre as ferramentas (Adaptado de Teixeira, *et al*, 2009(55)).

Dado as questões levantadas a respeito desta região do P2X7R ficou clara a necessidade de determinar a estrutura da região M2. Podemos separar esta região em duas: a que contém os resíduos conservados (peptídeo ADSEG), o qual não sabemos se esta inserida ou em algum momento poder provavelmente estar inserido na membrana, e a região que não contém os resíduos consenso, a qual deve mesmo estar inserida na membrana e formar (pelo menos parte do) caminho dos íons pela membrana, como foi sustentado de maneira experimental recentemente (72), a qual vamos chamar de TM2. A determinação do conteúdo estrutural do peptídeo relativo ao TM2 não foi possível devido ao fato deste peptídeo não ser solúvel em miméticos de membrana TFE/H<sub>2</sub>O e DMSO nem se adequar ao protocolo de inserção em micelas descrito na literatura (136). Será necessário explorar variações no protocolo descrito para inserção em micelas para promover a inserção deste peptídeo nas mesmas, o que permitiria que ele atingisse um dobramento (pelo menos próximo do) natural.

O peptídeo ADSEG não apresentou solubilidade em diferentes proporções de TFE/H<sub>2</sub>O (30, 50 e 100%), mas apresentou boa solubilidade em DMSO, o que permitiu que fossem feitos os experimentos de RMN de solução, esperando que o DMSO reproduza pelo menos parte do ambiente necessário para o dobramento correto do peptídeo (118). É importante citar que o DMSO foi usado para determinar a estrutura de peptídeos relativos aos domínios TM(122) e as alças(124) (que conectam os domínios TM) da rodopsina bacteriana. Por outro lado, o DMSO é um sistema mimético de membrana que carece em diversas propriedades exercidas pela membrana (117).

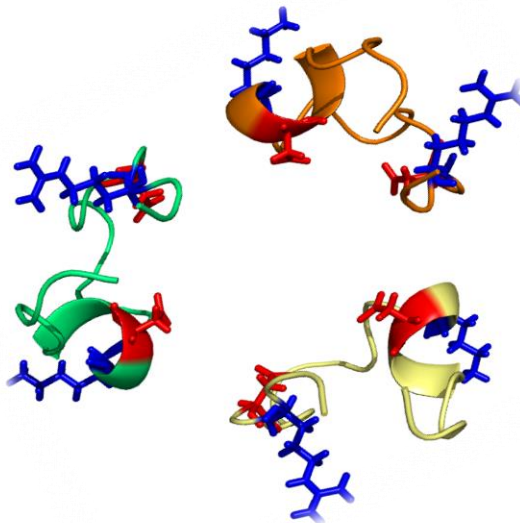
Em relação ao peptídeo ADSEG, foi sugerido por dados de FTIR que ele estava estruturado quando diluído em DMSO, parte em  $\alpha$ -hélice parte em folha- $\beta$  (55). A estrutura gerada a partir dos cálculos de distância consiste em duas regiões estendidas separadas por uma volta, sendo que um destes segmentos estendidos possui uma região em hélice, consistente com as previsões obtidas pelo CSI e pelo SSP (neste caso a predição indicou uma folha- $\beta$  não muito



bem formada) . Assumindo que esta estrutura se mantenha no receptor P2X7R inteiro, podemos inferir que a presença de uma estrutura predominantemente estendida no grande domínio hidrofóbico M2 poderia ter comprometido a análise pelos algoritmos de predição de região TM, uma vez que estes levam em consideração tanto a hidrofobicidade (que em todo o domínio M2 é grande o suficiente para que esta seja TM) quanto a capacidade de formar uma hélice. A partir somente da estrutura não podemos inferir diretamente se este segmento poderia ou não estar (ou ter a capacidade de ser) inserido na membrana, embora haja algumas cadeias laterais hidrofóbicas expostas ao solvente. A interação com outras regiões da proteína (inclusive interações com outras subunidades) podem estabilizar estes resíduos por interações hidrofóbicas mesmo se localizado fora da membrana. A estrutura predominantemente estendida também está de acordo com dados de dinâmica molecular publicados pelo nosso grupo, que mostrou que o peptídeo ADSEG se mantinha estável nesta configuração em DMSO. Ao contrário de quando começamos a simulação em hélice, onde o peptídeo se desestrutura. Quando estas simulações foram feitas com a combinação TFE/H<sub>2</sub>O a estrutura se manteve estável tanto quando era iniciada a partir de uma  $\alpha$ -hélice quanto quando era iniciada a partir de uma folha-  $\beta$  (55). Assim, podemos inferir baseado nesses dados, que a estrutura seria mais estável em folha- $\beta$  (ou uma conformação predominantemente estendida) quando diluído em DMSO.

Em relação à seletividade iônica, podemos inferir que alguns resíduos carregados na região transmembrana (ou próxima dela) tenham um papel fundamental na atração de íons de carga oposta e na repulsão dos de mesma carga. Observando a sequência do peptídeo ADSEG podemos encontrar dois resíduos carregados negativamente (Asp 318 e Asp 329, figura 4.9), que podem estar relacionados à seletividade a cátions tanto do P2X7R quanto do peptídeo ADSEG. O resíduo Asp 318 é um dos resíduos consenso entre os subtipos P2X, e o último de uma sequência de cinco resíduos consensos consecutivos (314-318). Interessantemente, o outro aspartato fica diametralmente oposto na estrutura obtida do peptídeo, ou seja, pode haver um efeito de carga concentrado em uma região do peptídeo ao se oligomerizar (figura 5.3). Imaginando que este peptídeo se oligomerize ao formar o canal

iônico, estas cargas podem se posicionar de maneira a formar um anel que funcionaria com um filtro. Anéis como este são observados tanto no receptor de acetilcolina quanto no de serotonina. Logo esses resíduos podem ser alvos promissores em estudos de mutagênese, que podem revelar tanto o efeito que estas cargas tem na corrente que passa pelo canal quanto a sua acessibilidade a reagentes sulfonados em ensaio de acessibilidade à cisteína. Browne *et al* demonstrou que a mutação em alguns resíduos na região M2 poderia aumentar a permeabilidade do P2X7R a ânions, entretanto, estes resíduos se localizavam no provável domínio TM2 (região do M2 que não contém os resíduos consenso). A figura 5.3 mostra uma possível organização trimérica do peptídeo ADSEG utilizando como modelo a estrutura de menor energia derivada dos estudos de RMN. Desta maneira, os resíduos carregados negativamente poderiam ser alinhados de maneira a formar um efeito de carga



na provável luz do canal iônico que o peptídeo ADSEG é capaz de formar.

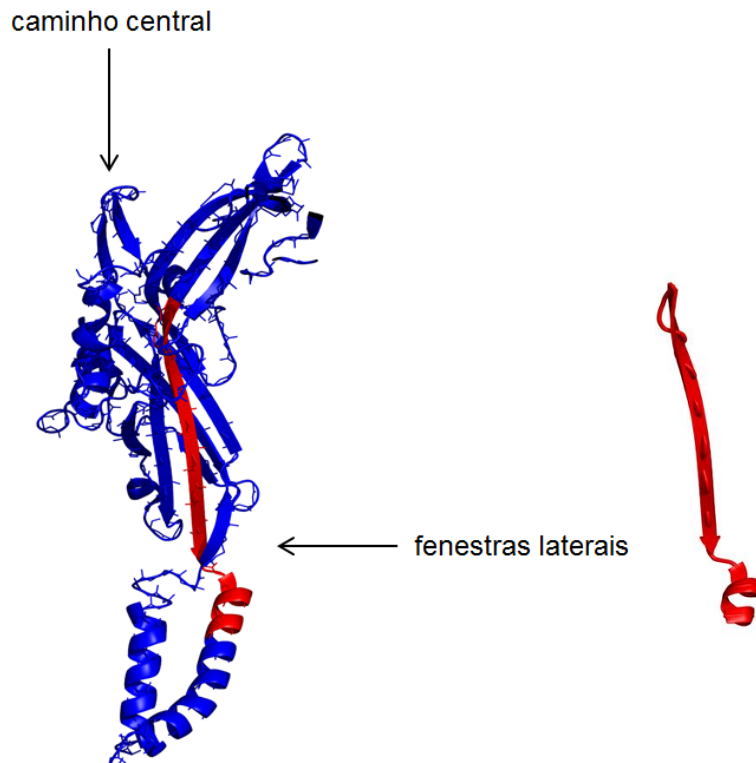
**Figura 5.3 Possível organização trimérica do peptídeo ADSEG ao formar um canal iônico cátion seletivo.** Nesta imagem estão representadas as 3 cópias da estrutura de menor energia derivada dos experimentos de RMN. Os resíduos em vermelho são carregados positivamente e estariam voltados para a luz do canal enquanto os resíduos em azul, carregados positivamente,

estariam voltados para a direção contrária à luz do canal, não interferindo no potencial eletrostático negativo no interior do canal.

Ao analisarmos a região homóloga na estrutura do receptor zfP2X4 disponível no *Protein Data Bank*, podemos observar que esta região assume uma conformação estendida, fazendo parte de uma folha- $\beta$  presente adjacente a membrana (Figura 5.4). Dada a conservação da sequência primária desta região podemos estimar que esta região mantenha essa configuração no receptor P2X7 inteiro. Além disso, esta região pode estar envolvida no caminho de passagem dos íons independente da rota utilizada. Observando a estrutura do receptor P2X4 podemos ver duas prováveis vias de acesso aos íons (Figura 5.4). A primeira seria pelo vestíbulo superior, na qual os íons entrariam pela região extracelular mais afastada da membrana, percorreria todo o receptor para finalmente atravessar a membrana pelos domínios TM. A segunda provável via seria por meio das janelas laterais presentes adjacentes à membrana. Samways *et al* utilizaram um modelo por homologia do receptor P2X4 humano baseado na estrutura do zfP2X4 para identificar potenciais resíduos envolvidos nas duas prováveis vias, e testar, por meio da técnica de acessibilidade à cisteína qual seria a via preferencial de passagem dos íons (137). Mutações por cisteína na provável via pelo vestíbulo superior não causavam alterações na corrente induzida pelo ATP quando aplicado reagentes metanosulfonados (ou seja, tais reagentes não eram acessíveis aquela região e/ou esta de fato não formava o caminho de passagem dos íons). Entretanto, quando as mutações por cisteína eram feitas nos resíduos localizados no caminho pelas janelas laterais a corrente era diminuída quando reagentes metanosulfonados de carga positiva ou aumentada, quando utilizados tais reagentes carregados negativamente. Kawate *et al* também utilizaram esta abordagem, combinando o uso de um modelo por homologia do receptor P2X2 de rato baseado na estrutura do receptor zfP2X4 com estudos de acessibilidade a cisteína e também concluíram que os íons entravam no receptor por meio das janelas laterais (138). Além disso, esse mesmo trabalho mostrou que o caminho pelas janelas laterais é energeticamente mais favorável à passagem dos íons do que o caminho pelo vestíbulo superior. Esses trabalhos, publicados antes mesmo da estrutura do receptor zfP2X4

ligado ao ATP (43), sugerem fortemente que as janelas laterais servem de passagem aos íons quando o receptor é ativado pelo ATP. Independente do caminho adotado, podemos ver que a região homóloga ao peptídeo ADSEG na estrutura do receptor zfP2X4 teria contato com os íons, e os resíduos carregados negativamente (D318 e D329 para o caminho central e somente o resíduo D329 para as janelas laterais) destacados neste trabalho poderiam contribuir com o potencial eletrostático favorável à passagem dos cátions pelo receptor. Estudos de mutagenese no receptor P2X7 são necessários para sustentar esta hipótese. É interessante notar que a hélice transmembrana do receptor zfP2X4 encontra bastante próximo da região com tendência a hélice no peptídeo ADSEG quando fazemos o alinhamento de ambas as sequências (Figura 5.4). Levando este fato em consideração, podemos sugerir que a região com tendência a formar uma hélice no peptídeo ADSEG seria a região onde começaria a hélice transmembrana no receptor P2X7 humano. Além disso, podemos ver que esta região seria precedida por uma região bastante flexível (GTGG), o que poderia estar envolvido com modificações estruturais relacionadas à abertura do poro não seletivo associado à ativação do receptor P2X7, uma vez que um aumento no grau de inclinação desta região poderia aumentar a amplitude da abertura do canal transmembrana, assim como no canal mecanossensível de *E. Coli* (139), no qual um canal de 2 Å se expande para um de 20 Å devido a uma mudança no grau de inclinação dos domínios transmembrana em relação ao plano da mesma. Entretanto, estudos envolvendo mutações que alterem a flexibilidade desta região são necessários para sustentar esta ideia. Outra hipótese poderia ser que o segmento que forma o peptídeo ADSEG poderia formar um loop reentrante na membrana assim como o segmento H5 dos canais de H<sup>+</sup>, uma vez que a estrutura do peptídeo ADSEG se assemelha a tal domínio. Esta hipótese foi anteriormente sugerida por Valera *et al* para o receptor P2X2 (140), entretanto esta ideia atualmente é desacreditada, por este padrão estrutural não estar presente na estrutura resolvida do zfP2X4. Nesse sentido, embora o peptídeo ADSEG possa não representar a conformação 3D desta região no receptor P2X7, entretanto, este peptídeo pode servir como um modelo simples de formação de canais iônicos, devido ao seu pequeno tamanho e capacidade de formar um

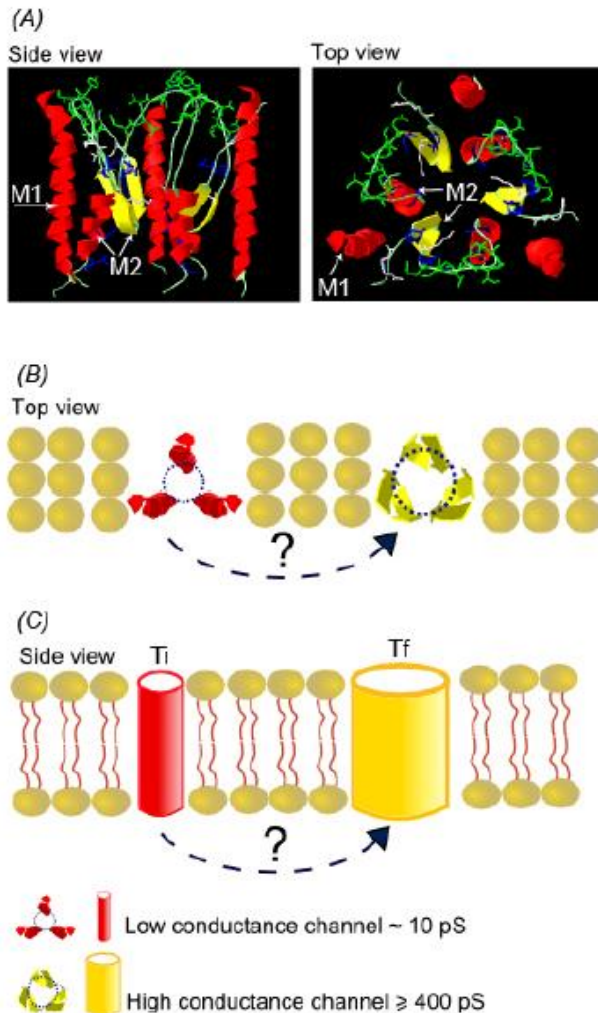
canal com seletividade e auxiliar na compreensão do conceito de seletividade iônica e formação de canais em membranas biológicas.



**Figura 5.4.** Estrutura da subunidade zfP2X4 determinada por cristalografia de raios X em azul destacando em vermelho a região homóloga ao peptídeo ADSEG. A mesma região se encontra separada na imagem à direita. Nesta figura também são indicados as duas possíveis passagens de íons pelo receptor ao ser ativado. Diversos dados da literatura apontam as fenestras laterais como caminho mais provável.

A capacidade do P2X7R em formar um poro não seletivo de identidade desconhecida também pode estar relacionada com a capacidade deste segmento se inserir na membrana. Neste sentido, Teixeira *et al* propôs um modelo no qual a região relativa ao peptídeo ADSEG se organizariam na membrana de maneira similar a uma estrutura em  $\beta$ -barril transmembrana, que é um padrão comum em bactérias, e formar o poro não seletivo sem a necessidade de novas subunidades (55). Esta explicação seria coerente com a estrutura obtida por RMN de solução e é sustentada pelo fato desta região ser

altamente hidrofóbica e desta maneira, se tornar estável na membrana, depois do receptor sofrer as modificações estruturais decorrentes da sua ativação. Entretanto, é importante ressaltar que este modelo é meramente especulativo, não há outros dados que sustentem esta hipótese. Este fenômeno seria um padrão novo encontrado em proteínas de mamíferos. Todavia, outros estudos, são necessários para sustentar esta hipótese.



**Figura 5.5 Esquema proposto por Teixeira *et al* para a possível dilatação do poro do receptor P2X7.** Em A temos a visão lateral e visão superior da possível organização dos domínios transmembrana. Em B é mostrado que as folhas adjacentes a membrana poderiam entrar na mesma e formar a parede do poro não seletivo. (Adaptado de Teixeira et al, 2009 (55) – suplementar)

### **6- Conclusões**

- 1- O peptídeo ADSEG, que consiste em parte do domínio M2 do P2X7R assume uma conformação predominantemente estendida, com duas regiões separadas por uma volta;
- 2- Há uma região na estrutura com tendência a formar uma hélice, entretanto ela não se manteve definida durante as simulações de dinâmica molecular;
- 3- A presença de duas cargas negativas alinhadas na estrutura obtida após as simulações de dinâmica molecular sugerem que o peptídeo ADSEG ao se oligomerizar na membrana poderia formar um anel de cargas negativas que poderia explicar as suas propriedades cáton seletivas quando é formado o canal iônico em membranas naturais e artificiais.

### **7- Perspectivas**

- 1- Fazer mutações nos resíduos carregados e verificar se há diferença na atividade de canal iônico do peptídeo ADSEG em comparação com o tipo selvagem;
- 2- Verificar a capacidade de oligomerização do peptídeo ADSEG utilizando croos linkers ou Blue-PAGE;
- 3- Verificar se esta região está inserida na membrana por supressão do triptofano por acrilamida;
- 4- Analisar a estrutura como oligômero e compará-la com a estrutura do monômero.



## Referências

1. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*. 1952;117(4):500-44.
2. Kozuska JL, Paulsen IM. The Cys-loop pentameric ligand-gated ion channel receptors: 50 years on. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(6):771-82. Epub 2012/04/13.
3. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3 ed: Sinauer Associates Inc; 2001.
4. Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life*. 2009;61(4):407-23. Epub 2009/03/26.
5. Martinez-Delgado G, Estrada-Mondragon A, Miledi R, Martinez-Torres A. An Update on GABA $\rho$  Receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8(4):422-33. Epub 2011/06/02.
6. Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J*. 2007;274(15):3799-845. Epub 2007/07/27.
7. Miller PS, Smart TG. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 2010;31(4):161-74. Epub 2010/01/26.
8. Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2004;86(2):161-204. Epub 2004/08/04.
9. Keramidas A, Moorhouse AJ, Pierce KD, Schofield PR, Barry PH. Cation-selective mutations in the M2 domain of the inhibitory glycine receptor channel reveal determinants of ion-charge selectivity. *The Journal of general physiology*. 2002;119(5):393-410. Epub 2002/05/01.
10. Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, et al. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*. 1988;335(6191):645-8. Epub 1988/10/13.



11. Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *The EMBO journal*. 1994;13(6):1493. Epub 1994/03/15.
12. Wang CT, Zhang HG, Rocheleau TA, French-Constant RH, Jackson MB. Cation permeability and cation-anion interactions in a mutant GABA-gated chloride channel from *Drosophila*. *Biophysical journal*. 1999;77(2):691-700. Epub 1999/07/29.
13. Galzi JL, Devillers-Thiery A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature*. 1992;359(6395):500-5. Epub 1992/10/08.
14. Gunthorpe MJ, Lummis SC. Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(24):10977-83. Epub 2001/07/07.
15. Opella SJ, Marassi FM, Gesell JJ, Valente AP, Kim Y, Oblatt-Montal M, et al. Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nature structural biology*. 1999;6(4):374-9. Epub 1999/04/14.
16. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. 2010;62(3):405-96.
17. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(6):383-400. Epub 2013/05/21.
18. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(1):39-47. Epub 2006/11/08.
19. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. 1984;309(5965):261-3. Epub 1984/05/17.

20. Peters S, Koh J, Choi DW. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*. 1987;236(4801):589-93. Epub 1987/05/01.
21. Gan Q, Salussolia CL, Wollmuth LP. Assembly of AMPA receptors: mechanisms and regulation. *The Journal of physiology*. 2014. Epub 2014/07/13.
22. Lerma J, Marques JM. Kainate receptors in health and disease. *Neuron*. 2013;80(2):292-311. Epub 2013/10/22.
23. Durr KL, Chen L, Stein RA, De Zorzi R, Folea IM, Walz T, et al. Structure and Dynamics of AMPA Receptor GluA2 in Resting, Pre-Open, and Desensitized States. *Cell*. 2014;158(4):778-92. Epub 2014/08/12.
24. Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science*. 1992;258(5085):1152-5. Epub 1992/11/13.
25. Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. 2012;76(1):51-69. Epub 2012/10/09.
26. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(12):1471-83. Epub 2007/03/22.
27. Burnstock G, Kennedy C. P2X receptors in health and disease. *Advances in pharmacology*. 2011;61:333-72.
28. Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X<sub>2</sub> receptors are trimers but that P2X<sub>6</sub> receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10759-65. Epub 2005/01/20.
29. Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>4</sub> subunits. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(4):925-33. Epub 2005/02/03.
30. Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM. Co-expression of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Molecular pharmacology*. 1998;54(6):989-93. Epub 1998/12/18.
31. Cheung KK, Burnstock G. Localization of P2X<sub>3</sub> receptors and coexpression with P2X<sub>2</sub> receptors during rat embryonic neurogenesis. *The Journal of comparative neurology*. 2002;443(4):368-82. Epub 2002/01/25.

32. King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(13):4871-7. Epub 2000/06/24.
33. Le KT, Babinski K, Seguela P. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(18):7152-9. Epub 1998/09/16.
34. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular pharmacology*. 2007;72(6):1447-56. Epub 2007/09/06.
35. Egan TM, Samways DS, Li Z. Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2006;452(5):501-12. Epub 2006/05/19.
36. Kellenberger S, Grutter T. Architectural and Functional Similarities between Trimeric ATP-Gated P2X Receptors and Acid-Sensing Ion Channels. *Journal of molecular biology*. 2014. Epub 2014/06/18.
37. Bacongus I, Hattori M, Gouaux E. Unanticipated parallels in architecture and mechanism between ATP-gated P2X receptors and acid sensing ion channels. *Current opinion in structural biology*. 2013;23(2):277-84. Epub 2013/05/01.
38. Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*. 2009;460(7255):599-604. Epub 2009/07/31.
39. Coutinho-Silva R, Persechini PM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 1):C1793-800. Epub 1998/01/22.
40. Volonte C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G. P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2012;11(6):705-21. Epub 2012/09/12.
41. Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;288(2):C260-71. Epub 2004/10/08.

42. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*. 2009;460(7255):592-8. Epub 2009/07/31.
43. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*. 2012;485(7397):207-12. Epub 2012/04/27.
44. Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A. Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(6):1456-66. Epub 2007/02/09.
45. Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M, Linder P. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular cell*. 2003;11(1):127-38. Epub 2003/01/22.
46. Ennion S, Hagan S, Evans RJ. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(45):35656. Epub 2000/11/07.
47. Roberts JA, Evans RJ. ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(10):9043-55. Epub 2003/12/31.
48. Ennion SJ, Evans RJ. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Molecular pharmacology*. 2002;61(2):303-11. Epub 2002/01/26.
49. Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, et al. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2008;456(5):939-50.
50. Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *The EMBO journal*. 1997;16(12):3446-54. Epub 1997/06/01.

51. Egan TM, Haines WR, Voigt MM. A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(7):2350-9. Epub 1998/04/16.
52. Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nature neuroscience*. 2008;11(8):883-7. Epub 2008/07/01.
53. Kracun S, Chaptal V, Abramson J, Khakh BS. Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(13):10110-21. Epub 2010/01/23.
54. Samways DS, Li Z, Egan TM. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:6. Epub 2014/02/20.
55. Teixeira PC, de Souza CA, de Freitas MS, Foguel D, Caffarena ER, Alves LA. Predictions suggesting a participation of beta-sheet configuration in the M2 domain of the P2X(7) receptor: a novel conformation? *Biophysical journal*. 2009;96(3):951-63. Epub 2009/02/03.
56. Khadra A, Tomic M, Yan Z, Zemkova H, Sherman A, Stojilkovic SS. Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. *Biophysical journal*. 2013;104(12):2612-21. Epub 2013/06/26.
57. Yan Z, Khadra A, Li S, Tomic M, Sherman A, Stojilkovic SS. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(42):14213-24. Epub 2010/10/22.
58. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1285-94. Epub 1997/11/19.
59. Alves LA, de Melo Reis RA, de Souza CA, de Freitas MS, Teixeira PC, Neto Moreira Ferreira D, et al. The P2X7 receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon? *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(10):2578-87. Epub 2014/05/27.
60. Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, Stojilkovic SS. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *The Journal of general physiology*. 2008;132(5):563-73. Epub 2008/10/15.

61. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA. P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(8):3557-66. Epub 2013/02/22.
62. Nicke A. Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;377(3):803-8. Epub 2008/10/22.
63. Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petrou S, Wiley JS, et al. Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS letters*. 2002;512(1-3):43-6. Epub 2002/02/20.
64. Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA, et al. Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *Journal of psychiatric research*. 2010;44(6):347-55. Epub 2009/11/26.
65. Jiang R, Lemoine D, Martz A, Taly A, Gonin S, Prado de Carvalho L, et al. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(22):9066-71. Epub 2011/05/18.
66. Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Frontiers in pharmacology*. 2013;4:55. Epub 2013/05/16.
67. de Souza CA, Teixeira PC, Faria RX, Krylova O, Pohl P, Alves LA. A consensus segment in the M2 domain of the hP2X(7) receptor shows ion channel activity in planar lipid bilayers and in biological membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1818(1):64-71. Epub 2011/10/01.
68. Sun C, Heid ME, Keyel PA, Salter RD. The Second Transmembrane Domain of P2X7 Contributes to Dilated Pore Formation. *PloS one*. 2013;8(4):e61886. Epub 2013/04/25.
69. Denlinger LC, Fiset PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, et al. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein-

- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2001;167(4):1871-6. Epub 2001/08/08.
70. Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010;24(9):3393-404. Epub 2010/05/11.
71. Leiva-Salcedo E, Coddou C, Rodriguez FE, Penna A, Lopez X, Neira T, et al. Lipopolysaccharide inhibits the channel activity of the P2X7 receptor. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:152625. Epub 2011/09/24.
72. Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, et al. A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet.* 2002;359(9312):1114-9. Epub 2002/04/12.
73. Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, et al. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(14):11135-42. Epub 2001/01/21.
74. Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, et al. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2007;175(4):360-6. Epub 2006/11/11.
75. Nino-Moreno P, Portales-Perez D, Hernandez-Castro B, Portales-Cervantes L, Flores-Meraz V, Baranda L, et al. P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical and experimental immunology.* 2007;148(3):469-77. Epub 2007/05/12.
76. Dardano A, Falzoni S, Caraccio N, Polini A, Tognini S, Solini A, et al. 1513A>C polymorphism in the P2X7 receptor gene in patients with papillary thyroid cancer: correlation with histological variants and clinical parameters. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2009;94(2):695-8. Epub 2008/11/20.
77. Wiley JS, Dao-Ung LP, Li C, Shemon AN, Gu BJ, Smart ML, et al. An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(19):17108-13.



78. Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, et al. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):2079-86. Epub 2005/11/03.
79. Cankurtaran-Sayar S, Sayar K, Ugur M. P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Molecular pharmacology*. 2009;76(6):1323-32. Epub 2009/09/15.
80. Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano A, da Silva-Souza HA, Guimaraes MZ, Persechini PM. ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 19):3261-70. Epub 2008/09/11.
81. Jiang LH, Rassendren F, Mackenzie A, Zhang YH, Surprenant A, North RA. N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;289(5):C1295-302. Epub 2005/08/12.
82. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*. 2006;25(21):5071-82. Epub 2006/10/13.
83. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, et al. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;295(3):C752-60. Epub 2008/07/04.
84. Alberto AV, Faria RX, Couto CG, Ferreira LG, Souza CA, Teixeira PC, et al. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2013;386(9):775-87. Epub 2013/05/10.
85. Thompson RJ, Zhou N, MacVicar BA. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*. 2006;312(5775):924-7. Epub 2006/05/13.
86. Sabirov RZ, Okada Y. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *The journal of physiological sciences : JPS*. 2009;59(1):3-21. Epub 2009/04/03.
87. Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva, II, Tobe BJ, Wensel TG. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings*



- of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(21):7451-5. Epub 2008/05/21.
88. Siebert AP, Ma Z, Grevet JD, Demuro A, Parker I, Foskett JK. Structural and Functional Similarities of Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Ion Channel With Connexins, Pannexins and Innexins. *The Journal of biological chemistry*. 2013. Epub 2013/01/10.
89. Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci*. 2003;18:12-7. Epub 2003/01/18.
90. Silinsky EM, Redman RS. Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *The Journal of physiology*. 1996;492 ( Pt 3):815-22. Epub 1996/05/01.
91. Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP. Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *The Biochemical journal*. 1974;140(1):1-12. Epub 1974/04/01.
92. Richards-Williams C, Contreras JL, Berecek KH, Schwiebert EM. Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. *Purinergic signalling*. 2008;4(4):393-405. Epub 2008/10/24.
93. von Papen M, Gambaryan S, Schutz C, Geiger J. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(2):109-16. Epub 2013/05/09.
94. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS letters*. 2004;572(1-3):65-8. Epub 2004/08/12.
95. Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(32):20584-91. Epub 1994/08/12.
96. Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *The Journal of general physiology*. 2002;119(6):511-20. Epub 2002/05/30.

97. Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K. Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *Journal of neurochemistry*. 2009;108(1):115-25. Epub 2008/11/19.
98. Chotjumlong P, Bolscher JG, Nazmi K, Reutrakul V, Supanchart C, Buranaphatthana W, et al. Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *J Innate Immun*. 2013;5(1):72-83. Epub 2012/10/26.
99. Hu Y, Fiset PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, et al. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(42):27170-5. Epub 1998/10/09.
100. Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J, et al. Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J Leukoc Biol*. 2002;72(1):222-32. Epub 2002/07/09.
101. Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;286(5):C1100-8. Epub 2004/04/13.
102. Gandelman M, Levy M, Cassina P, Barbeito L, Beckman JS. P2X7 receptor-induced death of motor neurons by a peroxynitrite/FAS-dependent pathway. *Journal of neurochemistry*. 2013. Epub 2013/05/08.
103. Fang J, Chen X, Zhang L, Chen J, Liang Y, Li X, et al. P2X7R suppression promotes glioma growth through epidermal growth factor receptor signal pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(6):1109-20. Epub 2013/03/26.
104. Chen L, Brosnan CF. Regulation of immune response by P2X7 receptor. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(6):499-513. Epub 2007/03/08.
105. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*. 2002;168(12):6436-45. Epub 2002/06/11.

106. Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2005;114(3):386-96. Epub 2005/03/22.
107. Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LG, da Silva Frutuoso V. Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules*. 2013;18(9):10953-72. Epub 2013/09/10.
108. Idzko M, Panther E, Bremer HC, Sorichter S, Luttmann W, Virchow CJ, Jr., et al. Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *British journal of pharmacology*. 2003;138(7):1244-50. Epub 2003/04/25.
109. Namovic MT, Jarvis MF, Donnelly-Roberts D. High throughput functional assays for P2X receptors. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;Chapter 9:Unit 9 15. Epub 2012/06/12.
110. Santos JA, Fidalgo-Neto AA, Faria RX, Simoes A, Calheiros AS, Berenger AL, et al. Effect of *Rheedia longifolia* leaf extract and fractions on the P2X(7) receptor in vitro: novel antagonists? *J Med Food*. 2011;14(9):920-9. Epub 2011/05/11.
111. Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, et al. 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;319(3):1376-85. Epub 2006/09/20.
112. Marcellino D, Suarez-Boomgaard D, Sanchez-Reina MD, Aguirre JA, Yoshitake T, Yoshitake S, et al. On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J Neural Transm*. 2010;117(6):681-7. Epub 2010/04/14.
113. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, Vaidyanathan SX, Perez-Medrano A, Wang Y, et al. [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):223-9.

114. Ali Z, Laurijssens B, Ostenfeld T, McHugh S, Stylianou A, Scott-Stevens P, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of a P2X7 receptor allosteric modulator GSK1482160 in healthy human subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(1):197-207. Epub 2012/05/10.
115. Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(10):1630-5. Epub 2012/09/12.
116. Stock TC, Bloom BJ, Wei N, Ishaq S, Park W, Wang X, et al. Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(4):720-7. Epub 2012/03/03.
117. Bordag N, Keller S. Alpha-helical transmembrane peptides: a "divide and conquer" approach to membrane proteins. *Chemistry and physics of lipids*. 2010;163(1):1-26. Epub 2009/08/18.
118. Duarte AM, van Mierlo CP, Hemminga MA. Molecular dynamics study of the solvation of an alpha-helical transmembrane peptide by DMSO. *The journal of physical chemistry B*. 2008;112(29):8664-71. Epub 2008/06/28.
119. Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(19):12179-84. Epub 2002/08/28.
120. Renthall R, Brancalion L, Pena I, Silva F, Chen LY. Interaction of a two-transmembrane-helix peptide with lipid bilayers and dodecyl sulfate micelles. *Biophys Chem*. 2011;159(2-3):321-7. Epub 2011/09/20.
121. Popot JL, Engelman DM. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*. 1990;29(17):4031-7. Epub 1990/05/01.
122. Katragadda M, Alderfer JL, Yeagle PL. Assembly of a polytopic membrane protein structure from the solution structures of overlapping peptide fragments of bacteriorhodopsin. *Biophysical journal*. 2001;81(2):1029-36. Epub 2001/07/21.

123. Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailler JP, Lanyi JK. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 1999;291(4):899-911. Epub 1999/08/24.
124. Katragadda M, Alderfer JL, Yeagle PL. Solution structure of the loops of bacteriorhodopsin closely resembles the crystal structure. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1466(1-2):1-6. Epub 2000/05/29.
125. Lazarova T, Brewin KA, Stoeber K, Robinson CR. Characterization of peptides corresponding to the seven transmembrane domains of human adenosine A2a receptor. *Biochemistry*. 2004;43(40):12945-54. Epub 2004/10/06.
126. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, et al. The 2.6 Å crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008;322(5905):1211-7. Epub 2008/10/04.
127. Shindo K, Takahashi H, Shinozaki K, Kami K, Anzai K, Lee S, et al. Solution structure of micelle-bound H5 peptide (427-452): a primary structure corresponding to the pore forming region of the voltage dependent potassium channel. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1545(1-2):153-9. Epub 2001/05/09.
128. Shinozaki K, Anzai K, Kirino Y, Lee S, Aoyagi H. Ion channel activity of a synthetic peptide with a primary structure corresponding to the presumed pore-forming region of the voltage dependent potassium channel. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;198(2):445-50. Epub 1994/01/28.
129. Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1998;7(4):1029-38. Epub 1998/05/06.
130. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(12):993-6. Epub 2006/12/02.
131. Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins*. 2005;59(4):687-96. Epub 2005/04/09.
132. Rieping W, Habeck M, Bardiaux B, Bernard A, Malliavin TE, Nilges M. ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics*. 2007;23(3):381-2. Epub 2006/11/24.

133. Schrodinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.
134. Marsh JA, Singh VK, Jia Z, Forman-Kay JD. Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: implications for fibrillation. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2006;15(12):2795-804. Epub 2006/11/08.
135. Bednarczyk P, Szewczyk A, Dolowy K. Transmembrane segment M2 of glycine receptor as a model system for the pore-forming structure of ion channels. *Acta biochimica Polonica*. 2002;49(4):869-75. Epub 2003/01/25.
136. Killian JA, Trouard TP, Greathouse DV, Chupin V, Lindblom G. A general method for the preparation of mixed micelles of hydrophobic peptides and sodium dodecyl sulphate. *FEBS letters*. 1994;348(2):161-5. Epub 1994/07/11.
137. Samways DS, Khakh BS, Dutertre S, Egan TM. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(33):13800-5. Epub 2011/08/03.
138. Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD, Swartz KJ. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *The Journal of general physiology*. 2011;137(6):579-90.
139. Doyle DA. Molecular insights into ion channel function (Review). *Mol Membr Biol*. 2004;21(4):221-5. Epub 2004/09/17.
140. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. 1994;371(6497):516-9. Epub 1994/10/06.