

Pesquisador: Anael Viana Pinto Alberto
Posição: Pós Doc nota 10 FAPERJ
Lab de Comunicação Celular
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
Av. Brasil 4365, pavilhão 108 sala 28B
aanael@gmail.com

Título: Estudo do receptor P2X7: da estrutura a potenciais ligantes com efeito terapêutico

Palavras chaves: P2X7, Virtual Screening, Produtos Naturais

Introdução

O receptor P2X₇ (P2X₇R) é um dos membros da família de receptores ionotrópicos P2X (P2XR). Embora, sua estrutura seja basicamente semelhante aos outros subtipos da família P2X, possuindo dois domínios transmembranas (TM1 e TM2) e uma grande alça extracelular, o P2X₇R apresenta características biofísicas e estruturais únicas. Possui 595 aminoácidos em sua estrutura linear e seu domínio C-terminal é o maior em comprimento (239 aminoácidos) quando comparado com os outros subtipos (de 27 a 129). Como mencionado anteriormente, quando ativado o P2X₇R abre um canal de alta condutância iônica (acima de 100pS) que permite a passagem de moléculas de alto peso molecular como os corantes fluorescentes: Amarelo de Lúifer, Brometo de Etídio, Iodeto de Propídeo e YO-PRO 1 (Coutinho-Silva *et al.*, 1996a; Coutinho-Silva *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2014).

A abertura desse canal de alta condutância ocorre quando o receptor é exposto a concentrações superiores 100 μ M de ATP. Nesse caso, observamos a abertura de um canal de alta condutância não seletivo de 400pS, além do canal unitário de 8 pS (Coutinho-Silva *et al.*, 1996b).

Atualmente, existem duas estruturas do P2X7 resolvidas por cristalografia, a do panda gigante (pP2X7) (Karasawa & Kawate, 2016) e o de galinha (cP2X7) (Kasuya *et al.*, 2017), porém ambas as estruturas foram cristalizadas sem o domínio C-terminal, que é descrita como fundamental para a formação do poro de alta condutância. Assim sendo, propomos resolver a estrutura do receptor P2X7 em partes, uma tática muito usada na área de RMN de proteínas e chamada de “dividir para conquistar”. Nesse modelo de estudo a proteína é separada em peptídeos menores, e cada peptídeo é estudado por RMN esperando que esses adquiram uma conformação muito próxima da que teria considerando a proteína toda (Bordag *et al.*, 2010).

Cabe ressaltar que há diversos ensaios clínicos envolvendo o receptor P2X7 para tratamento de dor crônica, por exemplo. Nesse contexto a Astra-Zeneca possui diversas moléculas (serie AZ) sendo sintetizadas como possíveis antagonistas do receptor. Nessa busca por moléculas específicas também estão a Pfizer, a Evotec, a Affectis Pharm, a Roche, a Abbott, a Jansen e a GlaxoSmithKline (Arulkumaran *et al.*, 2011; Park & Kim, 2016). Somente no período de 2010 a 2015 foram feitos mais de 70 pedidos de patente de antagonistas do P2X7 demonstrando como o receptor é um importante alvo em diversas patologias.

Com relação ao receptor P2X7 em estados patológicos é descrita também sua participação em doenças neurodegenerativas, provocando a desmielinização de neurônios, em doenças reumáticas e cânceres, que parecem ter níveis elevados do receptor expresso na membrana sendo um importante alvo de indução de morte celular ou ainda, alternativamente, alvo para diagnósticos (Takenouchi *et al.*, 2010). Uma alternativa a síntese de novas moléculas ou da modificação de moléculas já conhecidas para aumentar a sua especificidade e/ou seletividade para o receptor

P2X7 é o teste de compostos *in silico* utilizando bancos de dados virtuais que possuem milhares de estruturas que podem ser testadas através do docking molecular. Dessa forma, as moléculas que possuírem os maiores índices de afinidade serão sintetizados e avaliados *in vitro* em células que sabidamente expressam o receptor P2X7, como macrófagos da linhagem J774G8 e em células HEK-293 transfectadas com o receptor. Um fato pertinente ao projeto é a experiência que o grupo possui com relação a estudos do receptor P2X7, uma vez que possuímos um artigo de metodologia de estudo *in vitro* da atividade do receptor P2X7 (Soares-Bezerra *et al.*, 2015) entre outras publicações na área e uma patente concedida com moléculas da flora brasileira sendo potenciais antagonistas do P2X7 (BEZERRA, 2014). Além disso, já possuímos um cluster para a realização do docking molecular tema da tese de mestrado de um dos nossos colaboradores (Soares, 2015).

Devido aos fatos expostos anteriormente, nesse projeto esperamos elucidar a estrutura 3D do receptor P2X7 humano com a calda C terminal. E com os ensaios de *screening* virtual de alto desempenho achar uma molécula com alta afinidade pelo receptor P2X7 e confirmar seu efeito *in vitro*. Dessa forma, acreditamos estar contribuindo na área de biofísica translacional e farmacologia, uma vez que as moléculas encontradas, podem posteriormente serem utilizadas para o tratamento das doenças em que o receptor está envolvido ou mesmo se conseguirmos uma molécula que diferencie o poro (canal não seletivo) do canal de baixa condutância já será um grande passo na área de estudo do receptor P2X7.

Objetivos

Objetivo Geral

Identificar a estrutura 3D do receptor P2X7 e possíveis moléculas de alta afinidade ao receptor P2X₇R através do *screening* virtual.

Objetivos específicos

- 1.0) Screening virtual de moléculas de alta afinidade ao receptor p2x7
 - 1.1) Realizar a modelagem por homologia do receptor P2X7 tendo como modelo a estrutura cristalográfica do receptor P2X4;
 - 1.2) Avaliar por *docking* molecular a constante de afinidade moléculas pelo receptor P2X7 a partir de bibliotecas disponíveis na rede, a fim de selecionar potenciais antagonistas ou agonistas;
 - 1.3) Verificar por ensaios funcionais o efeito exercido pelas moléculas selecionadas no *screening* virtual através de ensaios funcionais como eletrofisiologia e de captação de corantes fluorescentes.
- 2) Determinar a estrutura do domínio transmembrana 1 e 2 do receptor p2x7 humano por ressonância magnética nuclear de líquidos;
 - 2.1) Determinar a estrutura do domínio transmembrana 1, 2 e do segmento extracelular do receptor P2X7 humano por Ressonância Magnética Nuclear;
 - 2.2) Produzir receptores P2X7 mutantes em células HEK-293 utilizando a técnica de mutagênese sítio dirigida;
 - 2.3) Propor um modelo de organização das regiões transmembrana baseado nos resultados de acessibilidade a cisteína.

Métodos

Modelagem por Homologia

Realizaremos os experimentos de modelagem comparativa do receptor P2X7 a partir da estrutura do receptor P2X4 já com a estrutura determinada por

cristalografia em seu estado fechado e aberto utilizando o software Modeller versão 9.18 (Pierdominici-Sottile et al 2016).

Screening virtual

O screening virtual será realizada de acordo com (Costanzi *et al.*, 2009; Costanzi *et al.*, 2012b; Costanzi *et al.*, 2012a). Utilizaremos as moléculas disponíveis na empresa Life Chemicals, Inc (www.lifechemicals.com) que possui cerca de 360.000 compostos catalogados. Outro screening será realizado de acordo com (Dunkel *et al.*, 2006; Fullbeck *et al.*, 2006) que possui apenas compostos naturais com aproximadamente 50.000 compostos.

Captação de Corantes

Uma das formas de avaliar a função do poro é através de ensaios de captação de corantes, brevemente, adicionamos o agonista (ATP) e o corante fluorescente, dessa forma espera-se que o agonista ative o receptor e seu poro associado então permitindo a passagem do corante para dentro da célula. No caso de teste com antagonistas o procedimento é o mesmo com a diferença que antes da adição do agonista deixa-se incubando o antagonista por 10 a 15 min, assim esse antagonista bloqueia a ação do agonista e não permite a abertura do poro, não havendo entrada do corante fluorescente. Nesse sentido, verificaremos o efeito *in vitro* das moléculas adquiridas junto as empresas, após a etapa do screening virtual, tanto para uma ação agonista quanto para uma ação antagonista. Nesse ensaio, incubaremos as células previamente tripsinizadas, em uma placa de 96 poços com 10^5 células em estufa 5% CO₂ e 37°C por 24h e depois procederemos como descrito acima.

Eletrofisiologia de moléculas selecionadas por Screening Virtual

Usaremos a técnica de *patch-clamp* na configuração *whole-cell*. O registro será feito usando amplificador Axopatch-1D (Axon instruments, Inc. Sam Mateo, E.U.A.). As células serão transferidas da estufa para o microscópio (Nikon eclipse TE-2000). O procedimento será realizado como descrito pelo nosso grupo em Alberto e colaboradores (Alberto *et al.*, 2013) e as soluções conforme Faria e colaboradores (Faria *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2015).

Desenho dos peptídeos para o RNM

Os peptídeos serão desenhados com base nas predições das regiões TM1 e TM2, usando a sequência do receptor P2X7 humano. Os peptídeos serão comprados junto à empresa Genemed Synthesis (Texas – EUA).

Preparação da amostra

Os peptídeos serão inseridos em micelas de SDS, Octyl ou DPC segundo o protocolo descrito por Killian *et al.* As micelas vão funcionar como miméticos de membrana, e a escolha do detergente será definida pelos resultados dos experimentos de Dicroísmo Circular (DC).

Experimentos de dicroísmo circular

As amostras serão analisadas por DC antes dos experimentos de RMN, para verificar se o peptídeo inserido nas micelas adotou um dobramento. Os experimentos serão feitos em um espectropolarímetro Jasco 715. Brevemente, o peptídeo diluído será adicionado a uma cubeta por onde passará uma luz polarizada. Cada espectro de DC será a média de 4 leituras com banda de 2 nm. A temperatura utilizada é de 298 K com taxa de leitura de 50 nm/min.

Experimentos de RMN

Os experimentos serão feitos no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas – UFRJ. O magneto utilizado será magneto Bruker

Avance III 800 MHz (frequência do próton) . Serão adquiridos espectros de TOCSY e NOESY. Os dados serão processados pelo programa TopSpin (Bruker, Reino Unido) e os espectros serão assinalados pelo programa CcpNmr Analysis (Plone Foundation, UK). A estrutura será calculada pelo programa ARIA e a estrutura será validada pela plataforma PROCHECK.

Desenho das mutações

A estrutura dos peptídeos irá servir de base para a escolha dos resíduos a serem mutados, mas a princípio consideramos os resíduos 339, 342 e 345 importantes para responder nossos questionamentos. O objetivo desta etapa do projeto será propor quais os resíduos poderiam estar formando a luz do canal e se seriam importantes para sua condutância e seletividade iônica.

Mutagêneses Sítio Dirigida

O protocolo de mutagênese sítio dirigida será feito com base no descrito por Brownie et al. Será usado o Kit Stratagene QuickChange (Invitrogen). Os receptores P2X7 mutantes carregarão um Tagx pra facilitar a purificação por HPLC. Os resíduos escolhidos serão trocados por cisteína (Caseley et al., 2017; Harkat et al., 2017). Será utilizado o vetor plasmidial com o cDNA do P2X7 humano e este será introduzido no citoplasma por meio de transfecção baseada em Lipofectamina®.

Western Blotting

A presença do receptor P2X7 será confirmada por Western Blotting utilizando anticorpos específicos pra o receptor P2X7 humano (empresa Alomone Labs - Israel).

Análise Estatística

Todos os resultados serão expressos como média \pm desvio padrão da média (DP). Todos os dados serão previamente submetidos ao teste de normalidade. No caso de nossos dados seguirem uma distribuição normal utilizaremos o teste T para comparações de dois grupos ou ANOVA paramétrico para comparações de mais de dois grupos. Caso nossos dados não sigam uma distribuição normal, utilizaremos o teste Mann-Whitney (similar ao teste T para amostras não paramétricas) ou o teste Kruskal-Wallis para comparações de mais de dois grupos. Os gráficos e a análise estatística serão realizados com o GraphPad Prism software (versão 5; GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Perspectivas

Na primeira etapa do nosso projeto esperamos ter como resultados algumas moléculas antagonistas do receptor P2X7 avaliadas inicialmente pelo *screening* virtual *in silico* de 360.000 moléculas depositadas no banco de dados da empresa Life Chemical e disponíveis para esse tipo de experimento. E posteriormente testadas e confirmadas *in vitro*, através da avaliação da captação de corantes, uma vez que a própria empresa sintetiza e vende tais moléculas. O que possibilita a geração de patentes para desenvolvimento de drogas analgésicas e anti-inflamatórias.

Por fim, na última etapa do projeto estaremos indicando a estrutura 3D do receptor P2X7, através dos experimentos de ressonância magnética, e posteriormente revelando quais os resíduos se encontram voltados para a luz do canal, quais se encontram inseridos na membrana e quais participam do sítio de ligação do receptor-ATP elucidando assim mais um ponto que permanece aberto na literatura há pelo menos 25 anos.