

Juliano Zequini Polidoro

**O PAPEL DE ATRAP (*AT1R ASSOCIATED PROTEIN*) NA
MODULAÇÃO DE NHE3 MEDIADA POR ANGIOTENSINA II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

Juliano Zequini Polidoro

**O PAPEL DE ATRAP (*AT1R ASSOCIATED PROTEIN*) NA
MODULAÇÃO DE NHE3 MEDIADA POR ANGIOTENSINA II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Polidoro, Juliano Zequini.

O papel de ATRAP (AT1R associated protein) na modulação de NHE3 mediada por angiotensina II / Juliano Zequini Polidoro. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Biologia molecular de transportadores iônicos de membrana.

Versão do título para o inglês: The role of ATRAP (AT1R associated protein) on angiotensin II-mediated NHE3 modulation.

1. Fisiologia renal 2. Biologia molecular I. Rebouças, Profa. Dra. Nancy Amaral II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0110/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliano Zequini Polidoro.

Título da Dissertação: O papel de ATRAP (AT1R associated protein) na modulação
de NHE3 mediada por angiotensina II.

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 504/12 referente ao projeto intitulado: "*O papel de ATRAP (AT1R associated protein) na modulação de NHE3 mediada por angiotensina II*" sob a responsabilidade de **Juliano Zequini Polidoro**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.


PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP


PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Aos meus pais, pelo empenho para que
esse início de vida acadêmica se
tornasse possível.
Por fazerem de meus projetos seus
também.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças, por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório. Pelo amadurecimento pessoal e intelectual adquirido durante todos esses anos. Por ter me dado a oportunidade de vivenciar um ambiente de trabalho que sempre estimulou a curiosidade, a formação teórico-metodológica e a superação de desafios. Pela compreensão e paciência durante diversos momentos de execução do projeto. Finalmente, pela relação de carinho e respeito que sempre expressou.

Aos amigos e companheiros de laboratório Pedro Henrique Imenez Silva, Elida Adalgisa Neri, Gabriela Duarte Queiroz Leite e Camila Nogueira Alves Bezerra por todo o aprendizado metodológico e pelos fundamentais momentos de discussão durante o andamento do projeto. Pelo espírito de cooperação e pelos ótimos momentos de descontração. Por terem, enfim, feito do laboratório 222 minha segunda e querida casa.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cassola pela postura didática ao me ensinar a operar o microscópio de fluorescência e executar os experimentos de recuperação de pHi.

À Profa. Dra. Eugenia Costanzi-Strauss pela colaboração na produção dos adenovírus e pelas sugestões apresentadas neste tópico do trabalho.

Aos demais professores e colegas de pós-graduação do grupo temático da Fisiologia Renal pelas conversas acadêmicas e pelos momentos de café.

À Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão pela cordialidade ao ceder o microscópio de fluorescência de seu laboratório por diversas vezes.

Ao técnico-especialista Adilson da Silva Alves pelas rotineiras ajudas na execução dos experimentos de microscopia.

Aos professores da universidade que ministraram as disciplinas que cursei por fazerem parte desse processo de amadurecimento.

Ao Paulo, Marcelo, Diego, Ivan, Carol, Laís, Fernanda, Yve, Lígia, Flávia, Nathalia e Carlos Eduardo, meus queridos amigos que conheci durante a graduação, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis e pelos maravilhosos conselhos. Pela amizade que permanece.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES pelo fomento a esse trabalho.

*Se sonhar um pouco é perigoso, a solução para
isso não é sonhar menos, mas sonhar mais,
sonhar o tempo todo.*

(Em busca do tempo perdido -
Marcel Proust)

RESUMO

Polidoro JZ. O papel de ATRAP (AT1R associated protein) na modulação de NHE3 mediada por angiotensina II. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Angiotensina II é um dos mais importantes moduladores do transporte de água e solutos presentes no lúmen de túbulos proximais, apresentando um considerável papel na regulação da atividade da isoforma 3 do contra-transportador Na^+/H^+ (NHE3), responsável pela maior parte do transporte transcelular de Na^+ nesse segmento tubular. Tal mecanismo de regulação é dependente do receptor para Ang II de tipo 1 (AT1R), um receptor acoplado à proteína G heterotrimérica. Recentemente, foi identificada uma proteína que interage com a porção carboxiterminal de AT1R, denominada ATRAP, e que parece agir como um regulador negativo do receptor. Nosso trabalho buscou analisar, por meio de experimentos de super-expressão, como ATRAP interfere na modulação da atividade de NHE3 regulada por Ang II/AT1R em linhagem modelo de túbulos proximais (OKP). O método utilizado para se aferir a atividade do contra-transportador NHE3 foi a técnica de pulso ácido de NH_4Cl . Para a comparação da atividade de NHE3 entre os diferentes grupos experimentais, foram inferidas constantes de velocidade que melhor descreveriam a cinética da curva de recuperação de pH_i . Os grupos experimentais analisados envolviam além do controle, tratado ou não com Ang II previamente por 50 minutos, células super-expressando, por meio de técnica de lipotransfecção de plasmídeos, as proteínas recombinantes LacZ/myc-His, LacZ-V5-His, AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His tratadas com Ang II. Os dados indicam como esperado uma aceleração da cinética de recuperação de pH_i em células OKP promovida por Ang II. Quanto à nossa hipótese inicial envolvendo o papel da super-expressão de AT1aR e de ATRAP nessas células, ela foi corroborada parcialmente. A despeito do aumento de expressão do receptor AT1R em OKP, não observamos uma tendência de aumento da cinética de recuperação de pH_i . É possível que, por conta do papel de amplificação do sinal típico de uma GPCR como AT1R, esse aumento de expressão seja redundante para a regulação do fenômeno biológico analisado. Por outro lado, a super-expressão de ATRAP reduz a taxa de recuperação do pH intracelular, coerente com o que imaginávamos previamente com base nos relatos da literatura para o papel antagonista de ATRAP sobre AT1R. Pretendemos futuramente elucidar o mecanismo molecular exato subjacente a tal efeito, se há uma mudança da atividade intrínseca dos transportadores NHE3 residentes na membrana plasmática ou uma alteração da expressão de NHE3 na membrana plasmática por conta de regulação do tráfego vesicular. Além disso, deve ainda ser determinada a cascata de sinalização proeminente em tal regulação mediada por Ang II/AT1R e afetada pela expressão de ATRAP. Por fim, algumas estratégias alternativas de super-expressão e de silenciamento de ATRAP foram também geradas durante esse trabalho. Elas superam algumas das dificuldades metodológicas que enfrentamos e devem contribuir no objetivo de elucidação do papel biológico da proteína ATRAP.

Palavras-chave: Túbulo proximal. Sistema renina-angiotensina. Regulação molecular de transportadores iônicos. Contra-transportador NHE3. ATRAP.

ABSTRACT

Polidoro JZ. ATRAP (AT1R associated protein) role on modulation of angiotensin II-mediated NHE3 activity [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Angiotensin II is one of the most important modulators of water and ion transport at proximal tubule lumen, playing a considerable role in the regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3), which is responsible for the major part of transcellular Na⁺ transport at this nephron segment. Such regulatory mechanism depends on angiotensin II receptor type 1 (AT1R), a G protein-coupled receptor (GPCR). An AT1R carboxi-terminal interacting protein, called ATRAP, has been recently identified. ATRAP seems to play as a negative regulator of this receptor. This work aimed to address, by overexpression experiments, how ATRAP affects NHE3 modulation mediated by Ang II/AT1R in a proximal tubular cell line (OKP). The method of ammonium chloride acid pulse was used to measure NHE3 exchanger activity. For comparison of NHE3 activity in different experimental groups, we inferred a rate constant that best describes pHi recovery curves. Besides control group previously treated or not with Ang II, the experimental groups – cells overexpressing the recombinant proteins LacZ/myc-His, LacZ-V5-His, AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His – were all treated with Ang II. Our results have shown, as expected, a faster pHi recovery rate in OKP cells treated by Ang II. Regarding our initial hypothesis about the roles of AT1aR and ATRAP overexpression in these cells, it was partially corroborated. We have not observed any trend of a faster pHi recovery rate in OKP cells overexpressing AT1R. We believe that, due to the signal amplification mediated by a typical GPCR like AT1R, the receptor overexpression is redundant for regulation of NHE3. On the other hand, ATRAP overexpression decreases pHi recovery rate, consistent with our null hypothesis based on reports from the literature about inhibitory role played by ATRAP over AT1R. Future studies are necessary to elucidate the exact molecular mechanism underlying the effect promoted by ATRAP, namely, whether it is a change of intrinsic NHE3 activity or a change of NHE3 expression at plasma membrane due to traffic regulation. Furthermore, the major signaling cascade involved in this NHE3 regulation promoted by AngII/AT1R and modulated by ATRAP should be determined. Finally, some alternative strategies for overexpression and silencing of ATRAP were also developed during this work. They overcome some of the methodological issues that we have faced and may contribute to our goal to understand the biological role of ATRAP.

Keywords: Proximal tubule. Renin-angiotensin system. Molecular regulation of ion transporters. NHE3 antiporter. ATRAP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema geral de SRA sistêmico. Componentes, locais de atuação e efeitos renais. 19
- Figura 2:** Esquema de transporte em túbulo proximal. NHE3 é responsável pela maior parte da reabsorção de Na^+ e, secundariamente, de HCO_3^- . 20
- Figura 3:** Topologia de NHE3 com destaque para sítios regulatórios presentes na longa cauda carboxi-terminal intracelular. 22
- Figura 4:** Cinco vias clássicas de transdução de sinal dependentes de proteína G podem ser ativadas por AT1R. 24
- Figura 5:** Modelo clássico de sinalização, dessensibilização, internalização e reciclagem. O processo de dessensibilização do receptor por β -arrestina é garantido pela sua capacidade de promover impedimento estérico a uma nova associação entre proteína G e receptor. A internalização do receptor ocorre em um segundo momento, com o recrutamento de clatrina e AP-2. A dissociação de β -arrestina dos endossomos expõe os resíduos fosforilados e permite assim a atuação das fosfatases presentes nos endossomos. 25
- Figura 6:** A associação de β -arrestina ao receptor promove inicialmente dessensibilização por impedir novo acoplamento de proteína G e por recrutar enzimas que degradam segundos mensageiros (fosfodiesterase 4D e DAG-cinase). Posteriormente, a β -arrestina promove a formação do complexo endocítico e conseqüentemente influencia o tráfego vesicular do receptor. Por fim, β -arrestina também funciona como uma proteína andaime para complexos de sinalização em endossomos, sendo fundamental para uma mudança quantitativa e qualitativa no padrão de sinalização de vários GPCRs. 27
- Figura 7:** Sequência da cauda carboxi-terminal de AT1aR de rato. 28

Modificado de Fu et al. (2001). Os pontos pretos indicam os resíduos fosforilados por PKC.

Figura 8: Via endocítica de AT1R. O receptor é direcionado inicialmente para endossomos primários contendo Rab 5 e posteriormente são direcionados para duas vias de reciclagem distintas (rápida e lenta) ou então em um menor grau para a degradação. 29

Figura 9: Os vetores pcDNA 3.1/myc-His e pcDNA6/V5-His foram utilizados para a clonagem dos vetores recombinantes pcDNA 3.1-AT1aR-myc-His e pcDNA 6-ATRAP-V5-His. Os fragmentos de AT1aR e ATRAP foram amplificados a partir de cDNA de ratos Wistar e ambos clonados entre os sítios de restrição HindIII e NotI de seus respectivos vetores, à jusante do promotor forte CMV (citomegalovírus). Foram adicionadas sequências de início de tradução Kozac a cada um desses fragmentos e foram retirados os sítios de término de tradução a fim de que os *tags* myc-His e V5-His fossem incorporados às sequências de AT1aR e ATRAP. Os genes de resistência a ampicilina foram importantes para a seleção das bactérias transformadas e para os protocolos de amplificação dos vetores. Os genes de resistência à neomicina e à blasticidina foram importantes para a seleção das células OKP com super-expressão estável desses vetores. 38

Figura 10: A troca de solução fisiológica por uma solução rica em NH_4Cl provoca um forte aumento do pH intracelular (pHi). O influxo passivo de NH_3 até o equilíbrio com a concentração externa provoca a alcalinização das células ao tamponar íons H^+ do citossol. A alcalinização gerada favorece, em um segundo momento, processos de extrusão de bases e de influxo de ácidos como o próprio íon NH_4^+ , além de abolir processos de extrusão de ácidos até então existentes. Como resultado, a alcalinização é atenuada levemente, e 41

esse saldo de carga ácida provocará uma forte queda do pHi no momento de retirada da solução rica em NH₄Cl. A célula então promoverá a recuperação do pHi intracelular por meio de transportadores de ácidos e bases, cujas atividades podem ser então mais facilmente aferidas. HB e B se referem a ácidos fracos e a suas bases conjugadas, respectivamente.

- Figura 11:** Espectro de excitação fluorescente dependente de pH do BCECF. O aumento de 10x da região de comprimento de onda abaixo de 470 nm ilustra de forma clara o ponto isobéptico, em 440 nm. 42
- Figura 12:** Western blot utilizando anticorpo anti-myc (1:5000) para amostras extraídas com tampão baseado em Tris-HCl. Apenas a proteína controle LacZ-myc-His (LacZ, segunda coluna) foi super-expressa (tamanho predito de 127 KDa). Amostras de controle negativo não transfectado (CN, primeira coluna) e células transfectadas com pcDNA3.1/AT1aR-myc-His nas demais colunas. 45
- Figura 13:** Western blot utilizando anticorpo anti-myc (1:5000) para amostras extraídas com tampão RIPA. A super-expressão da proteína recombinante AT1aR-myc-His (coluna 3) foi finalmente confirmada. O padrão de bandas é, em geral, ligeiramente menor do que aquele teoricamente predito para a proteína (~45 KDa). Lisados de controle negativo (CN) e de células super-expressando LacZ-myc-His na primeira e segunda coluna, respectivamente. 46
- Figura 14:** Western blot utilizando anticorpo anti-V5 (1:5000) para amostras extraídas com tampão RIPA. A super-expressão da proteína recombinante ATRAP-V5-His (coluna 3) foi confirmada. O padrão de bandas é semelhante ao predito teoricamente (~18 KDa) para a proteína. Lisados de células não transfectadas (controle negativo [CN]) e de células super-expressando LacZ-V5-His foram aplicados na 47

primeira e segunda coluna, respectivamente. Abaixo, *blot* para GAPDH.

Figura 15: Comportamento do BCECF incubado em células OKP em função do pH da solução externa de calibração (faixa de pH de 5,4 a 8,6). Curvas de calibração foram geradas para seis experimentos independentes e os pKs foram preditos pelo programa Origin 9.1. A média dos pKs obtidos para cada curva foi utilizada nos cálculos de pHi de nossos experimentos. 49

Figura 16: Valores médios de τ preditos para as curvas de recuperação de pHi dos diferentes grupos amostrais. O tratamento prévio de curto prazo com AngII acentua significativamente a taxa de recuperação de pHi e, portanto, reduz a variável τ . O tratamento com AngII nas células super-expressando a proteína recombinante ATRAP apresenta um efeito estimulatório atenuado em comparação aos outros grupos tratados com o peptídeo. Os números em parênteses indicam o tamanho amostral de cada grupo experimental. Os dados foram comparados por teste ANOVA seguido de teste post-hoc Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. mock. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Média de pHi basal e de pHi no início do fenômeno de recuperação para os diferentes grupos experimentais. Os dados foram comparados por teste ANOVA seguido de teste post-hoc Bonferroni, não sendo encontrada qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína cinase B
AMPC	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
AT1R	Receptor de angiotensina II de tipo 1
AT1aR	Receptor de angiotensina II de tipo 1a de murino
AT1bR	Receptor de angiotensina II de tipo 1b de murino
AT2R	Receptor de angiotensina II de tipo 2
ATRAP	Proteína associada a receptor AT1R
BCECF	2',7'-bis(carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
CaM	calmodulina
CAML	<i>Calcium-modulating cyclophilin ligand</i>
DAG	Diacilglicerol
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
ENaC	Canal epitelial para Na ⁺
GFP	Proteína fluorescente verde
GIPs	Proteínas que interagem com GPCRs
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GRK	Cinase de receptor acoplado a proteína G
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
Jak2	Janus cinase 2
LacZ	Gene que codifica para a proteína β-galactosidase bacteriana
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
NADPH	Forma reduzida de dinucleotídeo nicotinamida-adenina fosfato
NBC	Cotransportador Na ⁺ -HCO ₃ ⁻

NCC	Cotransportador Na ⁺ -Cl ⁻
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NHE3	Isoforma 3 do trocador Na ⁺ -H ⁺
NKCC	Cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
OKP	Subclone P das células imortalizadas OK (<i>Opossum kidney</i>) derivadas de túbulo proximal de <i>Didelphis virginiana</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pHi	pH intracelular
PIP ₂	Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PTHr	Receptor de hormônio da paratireoide
RACK1	Receptor 1 para proteína cinase C ativada
RIPA	Tampão de lise celular que deriva seu nome da aplicação original para o qual foi desenvolvido, o ensaio de radio-imunoprecipitação
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
siRNA	RNA pequeno de interferência
SRA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição
TSHR	Receptor de hormônio tireoestimulante
VSMC	Células musculares lisas vasculares
WKY	Ratos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA)	19
1.2	A regulação do transporte de solutos em túbulo proximal: papel do SRA	21
1.2.1	<i>A regulação de NHE3 por Ang II</i>	22
1.3	O receptor para Ang II de tipo 1 (AT1R)	24
1.3.1	<i>Vias de sinalização de AT1R</i>	24
1.3.2	<i>A dessensibilização e a internalização de GPCRs</i>	25
1.3.3	<i>A dessensibilização e a internalização do receptor AT1R</i>	28
1.3.4	<i>A reciclagem de AT1R</i>	30
1.4	O papel de GIPs na regulação do tráfego e da sinalização de GPCRs. A identificação de ATRAP como proteína associada a AT1R	31
1.4.1	<i>Mecanismos de regulação de AT1R por ATRAP</i>	32
1.4.2	<i>Outras proteínas de associação a ATRAP e possíveis funções independentes de AT1R</i>	36
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Transfecção de vetores em células OKP	39
3.2	Western blot	40
3.3	Recuperação de pH intracelular (pHi)	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Super-expressão das proteínas recombinantes	46
4.2	Efeito estimulatório de Ang II e efeito inibitório da super-expressão de ATRAP sobre a recuperação de pHi	49
5	CONCLUSÃO	54
6	PERSPECTIVAS	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICES	65
	APÊNDICE A – Clones de expressão estável de ATRAP	65
	APÊNDICE B – Produção de adenovírus codificando ATRAP e AT1aR	68
	APÊNDICE C – Silenciamento de ATRAP endógena por siRNA	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA)

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) caracteriza-se como um dos principais sistemas neuro-hormonais de regulação do balanço hidro-eletrolítico e da pressão arterial sistêmica. Embora Ang III, Ang IV e Ang 1-7 também sejam peptídeos bioativos, Ang II é o produto mais importante do sistema e possui funções diretas de constrição de células musculares lisas vasculares e cardiomiócitos, estímulo à produção de aldosterona na glândula adrenal, liberação de catecolaminas da medula adrenal e das terminações simpáticas, e acentuação da sensação de sede e da ingestão de sal. É ainda de importância central para esses processos homeostáticos a capacidade de Ang II regular diretamente o transporte de fluido tubular ao longo do nefro, incluindo seu segmento proximal responsável por dois terços da reabsorção de água e de eletrólitos do filtrado glomerular (Gurley et al., 2011; Kobori et al., 2007).

A **figura 1** apresenta de modo simplificado o processo de formação de Ang II no SRA sistêmico. Brevemente, o substrato angiotensinogênio, produzido principalmente no fígado e liberado na circulação, é clivado pela aspartil protease renina, gerando Ang I, um decapeptídeo facilmente convertido em Ang II, não apenas pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) circulante, mas também por ECA expressa nas células endoteliais de muitos vasos, incluindo os pulmonares. A renina é produzida e estocada no aparelho juxta-glomerular renal em quantidades substanciais, de modo que a sua liberação em resposta a diversos estímulos – incluindo catecolaminas, hipotensão e hipovolemia – pode resultar em mudanças rápidas e consideráveis nos níveis de Ang I e conseqüentemente de Ang II (Kobori et al., 2007).

Esse quadro inicial não reflete, entretanto, a complexidade de SRA. Mais recentemente, tornou-se evidente a existência de sistemas renina-angiotensina teciduais independentes e inclusive intracelulares (Abadir et al., 2011; Filipeanu et al., 2001; Kobori et al., 2007; Westphal et al., 2008). Particularmente, o sistema SRA renal é único por possuir todos os componentes-chave presentes no SRA sistêmico (Kobori et al., 2007), apresentando níveis de Ang II muito maiores do que poderia ser explicado com base nas concentrações circulantes, provavelmente como

consequência de regulação diferencial de síntese e acúmulo do hormônio (Kobori et al., 2007; Zhuo et al., 2002).

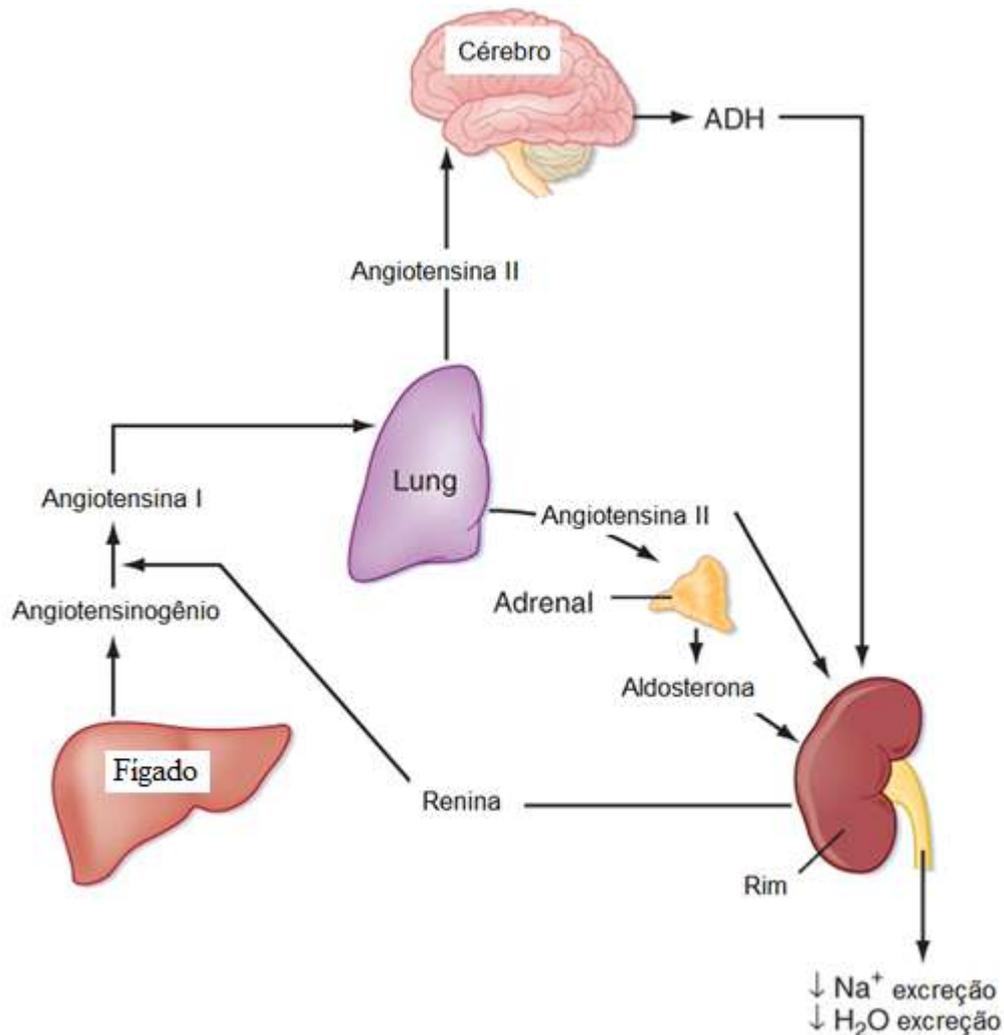


Figura 1. Esquema geral de SRA sistêmico. Componentes, locais de atuação e efeitos renais. Modificado a partir de Berne et al. (2008).

Do ponto de vista celular, tal regulação do nível de Ang II, sistêmica ou local, implica em uma maior ou menor ativação dos seus receptores de membrana. As moléculas de Ang II desempenham as principais funções do SRA por meio de sua associação aos receptores AT1R e AT2R da família de GPCRs, sendo que os efeitos de Ang II em resposta a situações de hipovolemia e hipotensão são executados de modo geral pelo receptor de tipo 1. Embora a sinalização mediada por AT2R possa provocar efeitos únicos, ela geralmente se opõe aos de AT1R (Mogi et al., 2007). Por fim, em murinos, há duas isoformas de receptores AT1R (AT_{1a}R e AT_{1b}R), codificadas por dois genes que apresentam distribuições de expressão

nitidamente distintas. A forma AT1aR, predominantemente renal (Gasc et al., 1994), representa a isoforma homóloga a AT1R humano.

1.2 A regulação do transporte de solutos em túbulo proximal: papel do SRA e de outros sistemas hormonais

Ang II regula vários mecanismos de transporte em túbulos proximais, incluindo o cotransportador basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Zheng et al., 2003), a bomba de Na^+/K^+ basolateral e a bomba de H^+ apical (Kobori et al., 2007). Contudo, dentre tais mecanismos, aquele quantitativamente mais importante é executado pelo trocador Na^+/H^+ , NHE3 (**Fig. 2**). Essa proteína é abundante na membrana apical desse segmento e é responsável pela maior parte do transporte transcelular de Na^+ e, secundariamente, também pela maior parte da reabsorção de bicarbonato. Ela está sujeita ainda a uma sofisticada modulação de sua atividade em diversos níveis, desde a transcrição, tradução e modificações pós-traducionais até a sua interação com outras proteínas que determinam sua localização em subcompartimentos celulares (Donowitz et al., 2009; Tse et al., 1994).

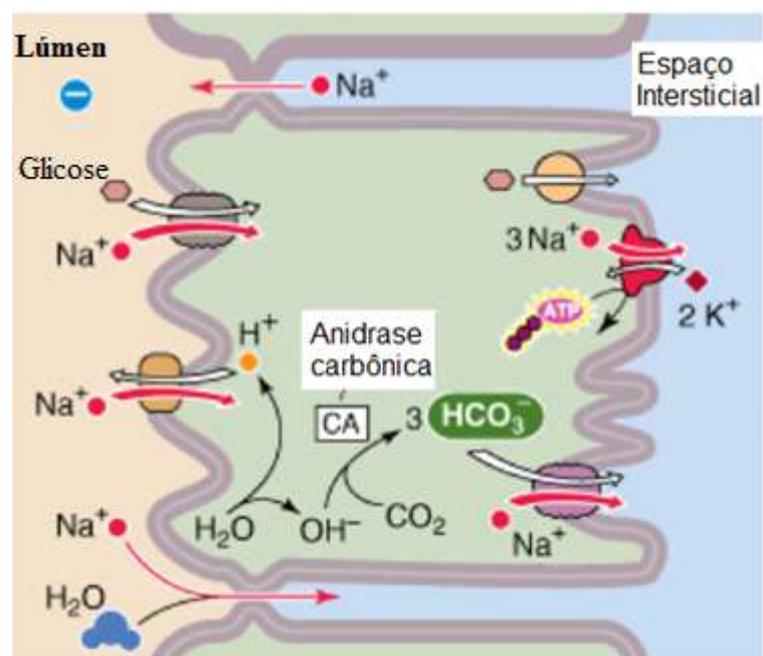


Figura 2. Esquema de transporte em túbulo proximal. NHE3 é responsável pela maior parte da reabsorção de Na^+ e, secundariamente, de HCO_3^- . Fonte: Modificado a partir de Boron e Boulpaep (2005).

Quando se analisa diretamente o efeito de angiotensina II sobre NHE3, observa-se que o hormônio promove um efeito bimodal similar ao documentado por Harris e Young (1977) para o transporte total em túbulo proximal, com concentrações fisiológicas (10^{-11} a 10^{-9} M) estimulando o permutador e com doses mais elevadas o inibindo (Houillier et al., 1996).

O aumento do transporte de fluido em túbulo proximal por meio de Ang II é desempenhado pelo disparo de sinalização via AT1R. Esse receptor está presente em membrana apical e basolateral de células de túbulo proximal. Tradicionalmente, tal aumento tem sido atribuído à ativação de PKC (Houillier et al., 1996; Liu, Cogan, 1990; Zheng et al., 2003) e/ou à perda da atividade de PKA provocada pela ativação da proteína $G_{\alpha i}$ com consequente inibição de adenilato ciclase (Liu, Cogan, 1989). Além disso, a ativação de cascata de tirosina cinase Src por Ang II também foi proposta estando relacionada a um aumento da atividade de NHE3 (Tsuganezawa et al., 1998) e também do cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ (Robey et al., 2002).

Já a inibição do transporte tubular mediada por Ang II, seja da atividade de NHE ou de NBC, é atribuída principalmente à ativação de PLA_2 por meio de AT1R (Houillier et al., 1996; Li et al., 2008; Zheng et al., 2003). De fato, há diversos relatos de que metabólitos do ácido araquidônico desempenham um papel na natriurese pressórica em túbulo proximal (Imig, 2004).

1.2.1 A Regulação de NHE3 por Ang II

NHE3 possui uma região amino-terminal com doze segmentos transmembrânicos envolvidos diretamente na atividade de contra-transporte e uma longa cauda citoplasmática regulatória que interage com diversas proteínas (**Fig. 3**). Em curto prazo, a regulação de atividade é promovida por uma série de fatores fisiológicos, tais como mudanças de pressão arterial, recrutamento de sinalização endócrina e distúrbios no balanço de ácido-base (Donowitz, Li, 2007).

Em estudos *in vitro*, a estimulação de AT1R por Ang II promove aumento da expressão proteica de NHE3 em longo prazo e da sua inserção na membrana plasmática em curto prazo (Li, Zhuo, 2007). Cano et al. (1994) observaram que o estímulo do contra-transporte Na^+/H^+ em células OKP não parece ser dependente de AMPc. Os mecanismos moleculares subjacentes ao estímulo da exocitose do trocador por Ang II ainda não estão claros, havendo relatos na literatura que

sugerem participação de c-Src (Tsuganezawa et al., 1998) e de PI 3-quinase e citoesqueleto de actina (du Cheyron et al., 2003). Curiosamente, PI 3-quinase pode ativar uma via baseada em SGK1, a qual foi relatada promovendo a fosforilação do resíduo Ser 663 e a exocitose do trocador em tratamento com glicocorticoides e insulina (Alexander, Grinstein, 2009; Donowitz, Li, 2007). Além disso, o fosfoinosítido PIP₃, gerado por PI 3-quinase, interage diretamente com NHE 3 (Donowitz, Li, 2007).

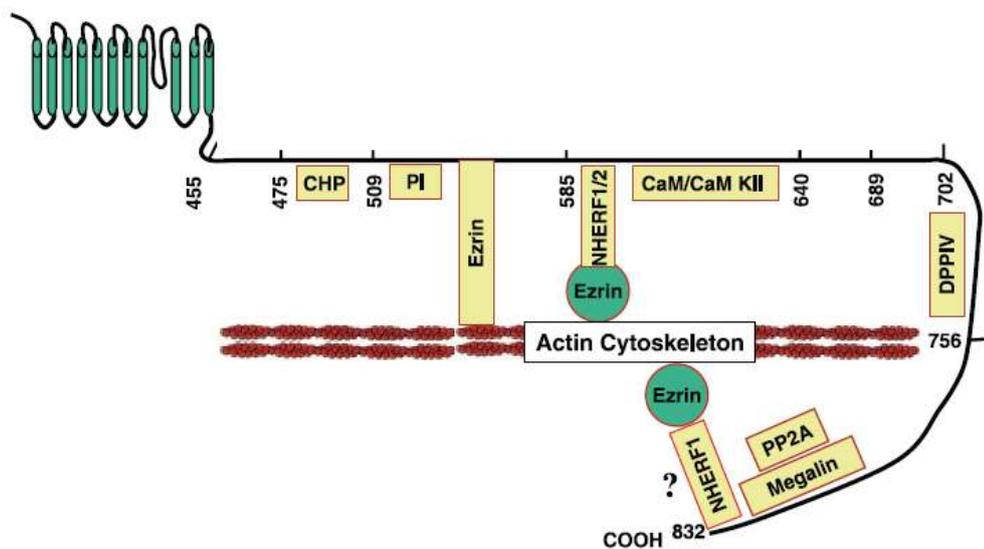


Figura 3. Topologia de NHE3 com destaque para sítios regulatórios presentes na longa cauda carboxi-terminal intracelular. Fonte: Modificado a partir de Donowitz e Li (2007).

Banday e Lokhandwala (2011) apresentaram ainda novos dados sobre a rápida regulação positiva de NHE3 por Ang II *in vivo*, embora não tenham confirmado a ocorrência de exocitose. Os autores, utilizando modelo animal de stress oxidativo com atividade de NHE3 dependente de Ang II acentuada, verificaram o envolvimento de PLC, Ca²⁺, Jak2 e CaM, mas não de ERK1/2 e de serina/treonina cinases, na estimulação de NHE3 por Ang II e na acentuação provocada por stress oxidativo. O tratamento com Ang II estimulou ainda a formação de um complexo JAK2-CaM-NHE3 em um processo dependente de Ca²⁺ (Banday, Lokhandwala, 2011). É possível que os resultados de Banday e Lokhandwala (2011), obtidos por ensaios de atividade em vesículas de membrana de borda em escova de túbulo proximal, sejam decorrentes de uma maior população de NHE3 nesses domínios de membrana em ratos submetidos a stress oxidativo. De todo modo, deve-se ainda esclarecer as aparentes discrepâncias entre os trabalhos de

Banday e Lokhandwala (2011), du Cheyron et al. (2003) e Tsuganezawa et al. (1998), tendo em vista os componentes das vias de sinalização e os diferentes contextos celulares e fisiológicos.

1.3 O receptor de Ang II de tipo 1 (AT1R)

1.3.1 Vias de sinalização de AT1R

A ativação de AT1R é provocada por mudanças críticas na conformação do receptor, mediadas pela ligação a Ang II e responsáveis pelo disparo de vias de sinalização, incluindo a clássica ativação de proteínas G heterotriméricas acopladas (Miura et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que AT1R também pode ser ativado em células sujeitas a estiramento mecânico sem a necessidade do agonista, um fenômeno que parece restrito a alguns GPCRs.

As vias de sinalização mediadas pela ligação do octapeptídeo ativo Ang II ao receptor AT1R tendem a provocar respostas múltiplas e complexas. Há cinco mecanismos clássicos de transdução do sinal mediados pelo acoplamento de proteínas G a AT1R: as cascatas de PLA₂, de PLC e de PLD, a ativação de canais para Ca⁺⁺ de tipo L, a inibição de adenilato ciclase, e a via de MAPK/JAK/STAT. A estimulação de fosfolipase C-β relacionada à proteína G_{q/11} é a via de sinalização intracelular mais bem descrita, na qual dois mensageiros secundários (IP₃ e DAG) são formados por hidrólise de fosfatidil-inositol bifosfato (PIP₂). IP₃ estimula a liberação de Ca⁺⁺ de reservas intracelulares e DAG induz a ativação de PKC. Já o disparo das vias de PLA₂ e de PLD estimula a liberação de ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Além disso, a estimulação de AT1R conjugado a proteína G_{i/o} pode também inibir a enzima adenilato ciclase em diversos tecidos, incluindo fígado e rim, atenuando assim a produção de AMPc. Ainda, a ativação do receptor está envolvida na abertura de canais para Ca⁺⁺ e no influxo de Ca⁺⁺ extracelular para as células. Por fim, o estímulo à fosforilação de resíduos de tirosina, mediada pela ativação de AT1R, pode levar a ativação de fatores de crescimento, transcrição e proliferação, incluindo MAPK, JAK e STAT (Dinh et al., 2001) (**Fig. 4**). Enquanto a produção e liberação dos segundos mensageiros clássicos IP₃, Ca⁺⁺ e AMPc ocorrem já segundos após o

estímulo agonista, as cascatas de MAPK e aquelas de JAK/STAT tendem a demorar minutos e horas para ocorrer, respectivamente (Fu et al., 2001).

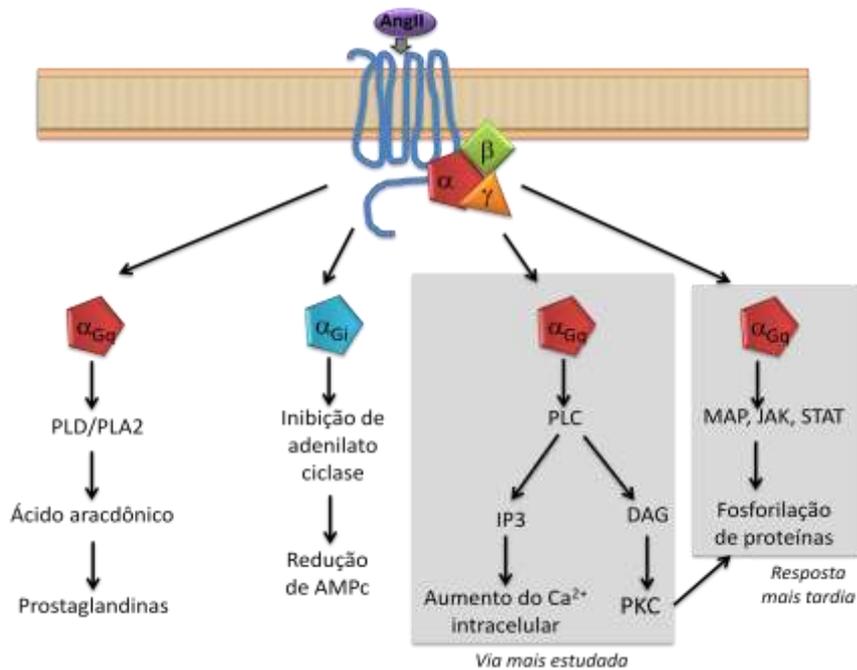


Figura 4. Cinco vias clássicas de transdução de sinal dependentes de proteína G podem ser ativadas por AT1R. Fonte: Adaptado de Dinh et al. (2001).

Para além das vias clássicas dependentes de proteína G, o receptor AT1R se mostrou também capaz de disparar vias de sinalização independentes de proteína G e dependentes de β-arrestina ou de tirosina cinases (Christensen et al., 2010). O complexo AT1R-β-arrestina em endossomos pode ancorar, por exemplo, as proteínas da via de MAPK – MEK1, Raf-1 e ERK1/2 –, formando assim um complexo capaz de responder por uma sinalização localizada e duradoura, em contraste à sinalização de MAPKs global e transitória dependente da via de proteína G (Luttrell et al., 2001).

1.3.2 A dessensibilização e a internalização de GPCRs

Diversos estudos ponderam uma nova concepção sobre o processo de internalização de GPCRs. Se originalmente a internalização foi considerada como um mecanismo primário de dessensibilização do receptor, ao retirá-lo do domínio efetor, algumas evidências tendem a questionar essa ideia, tornando o quadro mais complexo:

1) a dessensibilização do receptor precede sua internalização. A dessensibilização ocorre por meio de fosforilação do receptor por cinases relacionadas a GPCRs (GRKs) e pela consequente associação do receptor à β -arrestina, com rápida perda de ligação à proteína G e com estabilização do receptor em sua forma de baixa afinidade ao ligante. Apenas em um segundo momento as β -arrestinas promovem a associação de GPCRs a vesículas revestidas de clatrina por meio de sua ligação à cadeia pesada de clatrina e à proteína adaptadora 2 (AP-2) (Ferguson, 2001; Fu et al., 2001) (**Fig. 5**);

2) tratamentos farmacológicos que bloqueiam a internalização de GPCRs, como meio hipertônico de sacarose e concanavalina A, não impedem a dessensibilização do receptor mas impedem a sua ressensibilização;

3) a internalização promove um importante papel no processo de ressensibilização da resposta promovida pelos receptores, uma vez que os endossomos são enriquecidos com alta atividade de fosfatase.

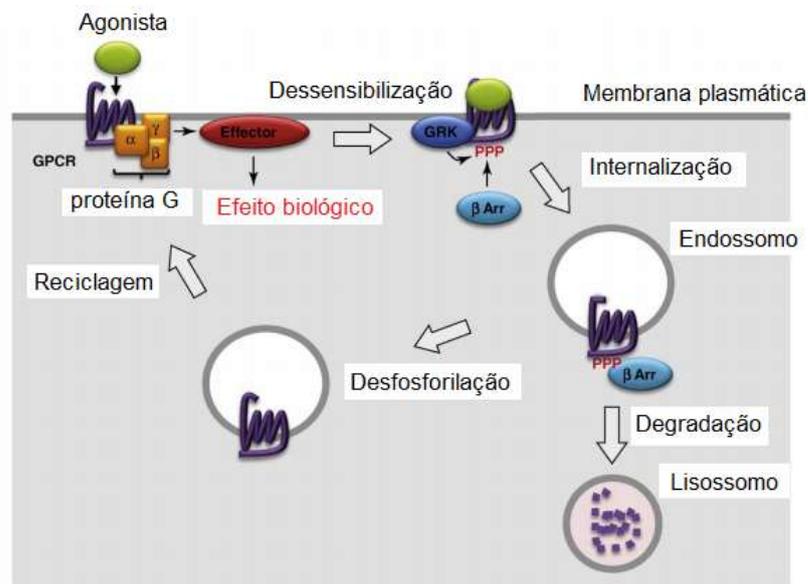


Figura 5. Modelo clássico de sinalização, dessensibilização, internalização e reciclagem. O processo de dessensibilização do receptor por β -arrestina é garantido pela sua capacidade de promover impedimento estérico a uma nova associação entre proteína G e receptor. A internalização do receptor ocorre em um segundo momento, com o recrutamento de clatrina e AP-2. A dissociação de β -arrestina dos endossomos expõe os resíduos fosforilados e permite assim a atuação das fosfatases presentes nos endossomos. Modificado a partir de Calebiro et al. (2010).

Desse modo, além do clássico papel da endocitose no direcionamento de receptores para degradação aos lisossomos ou a compartimentos endossomais estáveis, nota-se a existência de outros papéis biológicos desempenhados por esse processo celular, tais como o estímulo à ressensibilização do receptor e à sinalização em endossomos (Calebiro et al., 2010; Ferguson, 2001).

Para o estímulo à ressensibilização, a internalização deve ser ainda acompanhada pela dissociação de β -arrestina do endossomo, um evento que facilita a desfosforilação dos receptores ao tornar expostos os resíduos fosforilados no processo de dessensibilização (Ferguson, 2001). Nesse aspecto, os receptores GPCRs podem ser grosseiramente agrupados em duas classes (Oakley et al., 2000), A e B, conforme sua capacidade de se manterem mais ou menos associados à beta-arrestina em endossomos. Essa propriedade é determinada essencialmente pelas suas caudas carboxi-terminais, como deduzido em experimentos de receptores quiméricos (Anborgh et al., 2000; Gage et al., 2001; Oakley et al., 1999), e especialmente por *clusters* de serina e treonina fosforilados nessa região (Oakley et al., 2001). Tais *clusters* estão ausentes nas caudas dos receptores com reciclagem rápida e estão presentes naqueles com reciclagem lenta. Particularmente para AT1R, os clusters de serina e treonina SSLST e STLS da cauda carboxi-terminal, fosforilados após estímulo agonista, se mostraram importantes para a formação de complexos estáveis de receptor- β -arrestina em endossomos; por outro lado, o cluster SSS mais distal, que também é fosforilado após ligação do agonista ao receptor, não provocou efeito sobre a formação dos complexos nos endossomos. Ainda, a capacidade de ubiquitinação da β -arrestina associada ao receptor vem sendo demonstrada como outro determinante importante para a estabilidade desses complexos (Shenoy, Lefkowitz, 2011).

Por outro lado, embora a manutenção de β -arrestina em endossomos implique em uma desfosforilação mais lenta e, conseqüentemente, em uma cinética de reciclagem comprometida (Oakley et al., 1999), ela também permite o recrutamento dos complexos de sinalização dependentes de β -arrestina para esses endossomos (Shenoy, Lefkowitz, 2011). A importância desses complexos em endossomos vem sendo cada vez mais realçada: além da via de sinalização independente de proteína G mediada por β -arrestina, relatos recentes indicam que ao menos alguns receptores induzem a ativação das próprias proteínas G nesses endossomos de maneira também dependente de β -arrestina, gerando sinais

compartimentalizados e persistentes com implicações funcionais. PTHR e TSHR são dois dos receptores que foram vinculados a esse tipo de cascata (Calebiro et al., 2010; Wehbi et al., 2013).

Em suma, pode-se concluir que as β -arrestinas são importantes para determinar a dessensibilização, a internalização, a reciclagem e a sinalização em endossomos que são características de cada GPCR (**Fig. 6**).

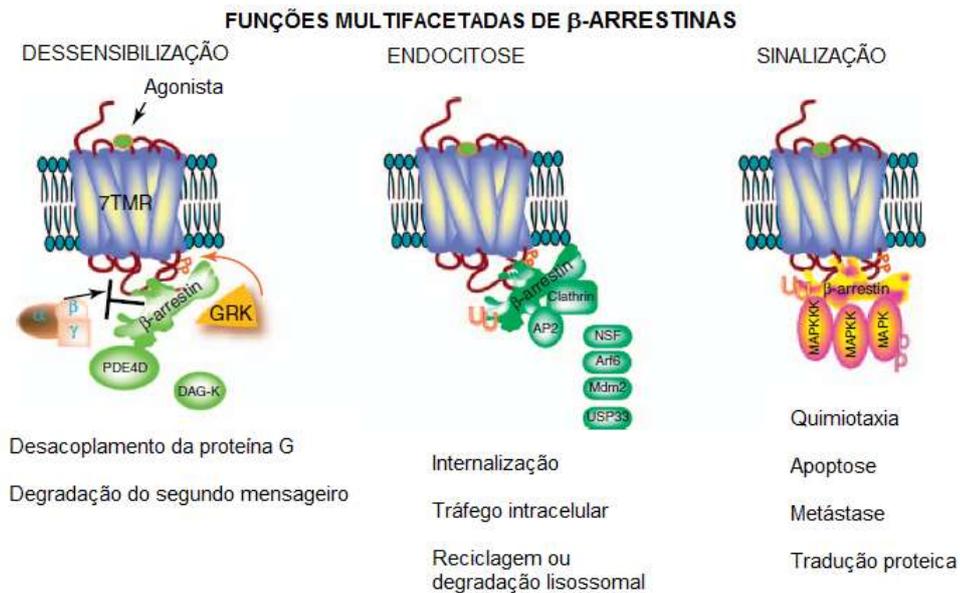


Figura 6. A associação de β -arrestina ao receptor promove inicialmente dessensibilização por impedir novo acoplamento de proteína G e por recrutar enzimas que degradam segundos mensageiros (fosfodiesterase 4D e DAG-cinase). Posteriormente, a β -arrestina promove a formação do complexo endocítico e conseqüentemente influencia o tráfego vesicular do receptor. Por fim, β -arrestina também funciona como uma proteína andaime para complexos de sinalização em endossomos, sendo fundamental para uma mudança quantitativa e qualitativa no padrão de sinalização de vários GPCRs. Modificado a partir de Shenoy e Lefkowitz (2011).

1.3.3 A dessensibilização e a internalização do receptor AT1R

A região carboxi-terminal de AT1R é rica em resíduos de serina, treonina e tirosina, apresentando sítio para fosforilação por GRKs e três sítios potenciais de fosforilação por PKC (Fu et al., 2001) (**Fig. 7**). Embora haja relatos de que a fosforilação do receptor após estímulo agonista não seja necessária para a dessensibilização e internalização de alguns GPCRs (Murray et al., 1998), o modelo mais comum para GPCRs envolve a fosforilação e a conseqüente associação do receptor à β -arrestina. Oppermann et al. (1996) e Tang et al. (1998) fornecem

O provável envolvimento do motivo STL no processo de internalização é um resultado muito interessante, uma vez que ele está ausente em AT2R, um receptor cuja internalização em sistemas celulares é tipicamente ausente ou extremamente distinta daquela de AT1R (Hein et al., 1997; Senbonmatsu et al., 2003). Da mesma forma, é sugestiva a proposta de participação do segmento entre os resíduos 316-319, pois ele apresenta uma dileucina, um sinal clássico de internalização mediada por clatrina (Marsh, McMahon, 1999).

Considerando ainda as rotas de tráfego celular, foi observado que AT1R colocaliza-se com vesículas endocíticas associadas a Rab 5 logo após a sua internalização, sendo direcionado posteriormente ou para um compartimento de reciclagem rápido marcado com Rab 4 ou então para um compartimento de reciclagem lenta marcado para Rab 11 e localizado na região juxtannuclear (Hunyady et al., 2002) (**Fig. 8**). Tais proteínas Rab parecem interagir com os últimos dez aminoácidos de AT1R, sendo que a deleção dessa região provocou o direcionamento dos receptores para lisossomos (Esseltine et al., 2011).

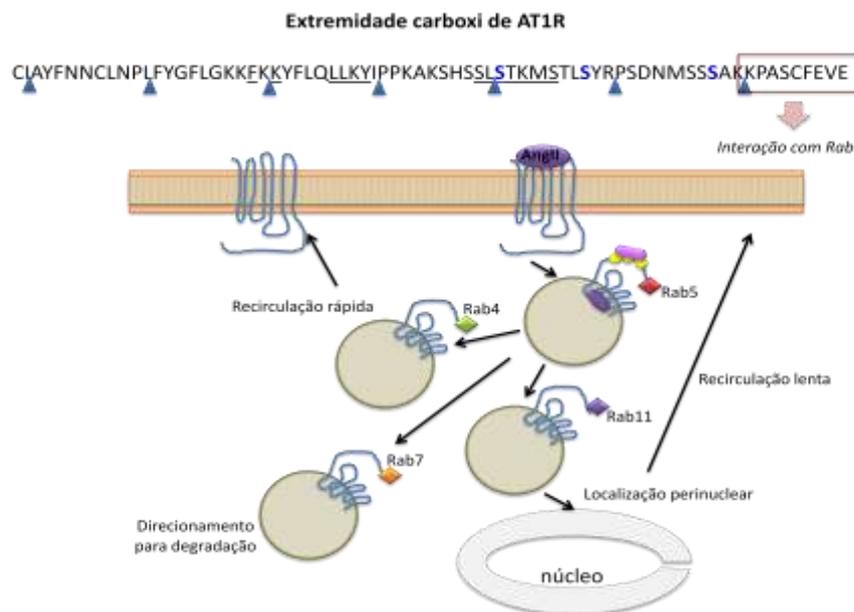


Figura 8. Via endocítica de AT1R. O receptor é direcionado inicialmente para endossomos primários contendo Rab 5 e posteriormente são direcionados para duas vias de reciclagem distintas (rápida e lenta) ou então em um menor grau para a degradação. Fonte: Baseado em Hunyady et al. (2002).

1.3.4 A reciclagem de AT1R

A taxa de reciclagem de AT1R, ao contrário de sua internalização, aparentemente depende da sinalização do receptor. Adams et al. (1999) demonstraram que o tratamento sustentado com Ang II provoca impacto no nível em que a proteína retorna à superfície, enquanto um tratamento subsequente com losartan aumentava a taxa de reciclagem dos receptores internalizados. Um candidato a regulador foi apresentado por Becker et al. (1995), que demonstraram que a reciclagem de AT1R de membrana apical em túbulo proximal era regulada por isoformas de PLA₂ independente de Ca⁺⁺.

1.4 O papel de GIPs na regulação do tráfego e da sinalização de GPCRs. A identificação de ATRAP como proteína associada a AT1R

Atualmente se sabe que os GPCRs, de modo geral, interagem não apenas com proteínas G, mas também com muitas outras proteínas que, em seu conjunto, são denominadas GIPs (*GPCR interacting proteins*) e estão envolvidas em tráfego e direcionamento, sinalização, e regulação alostérica (Bockaert et al., 2003).

Daviet et al. (1999), utilizando o método de duplo híbrido em fungos (*yeast two-hybrid system*), identificaram, em uma biblioteca de cDNA de rim de camundongo, uma proteína que interage com os 20 últimos aminoácidos (resíduos 339-359) do domínio C-terminal citoplasmático de AT1R, mas não com outros GPCRs (AT2R, m3-muscarínico, bradicinina B2, endotelina B, β2-adrenérgico), e que foi denominada ATRAP (*AT1 receptor-associated protein*). Tal interação foi confirmada pelos mesmos autores por meio de ensaios de ligação *in vitro* e imunoprecipitação e também por Lopez-Illasaca et al. (2003) por meio de experimentos de BRET e *pull-down* com constructos AT1R e ATRAP.

ATRAP apresenta uma história evolutiva recente, sem homólogos em invertebrados, e possui identidade relativamente conservada, sendo que as principais diferenças de sequência estão presentes principalmente na extremidade carboxi. Trata-se de uma proteína integral de membrana com três segmentos transmembrânicos (resíduos 14-36, 55-77 e 88-108), uma considerável região hidrofílica (resíduos 109-161) e sítios preditos para fosforilação por PKC e CaMKII. Foi proposto que ATRAP se associa com microdomínios de membrana semelhantes a balsas lipídicas insolúveis em Triton X-100, sendo que o primeiro dos segmentos integrais de membrana apresenta uma sequência significativamente menos

hidrofóbica e é possivelmente um sinal de ancoragem. Em novo ensaio de duplo-híbrido e experimentos de *pull-down*, foi identificada a região entre os resíduos 110 e 122 de ATRAP como aquela responsável pela interação com AT1R. Ainda, a cauda carboxi-terminal e o terceiro segmento transmembrânico de ATRAP parecem ser importantes para a localização da proteína na periferia da célula, enquanto os dois primeiros segmentos transmembrânicos, principalmente a região entre os resíduos 40-80, contribuem para a retenção da proteína no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Lopez-Illasaca et al., 2003). Curiosamente, essa região da sequência de ATRAP é responsável por sua associação à proteína de retículo endoplasmático CAML (Guo et al., 2005).

Quanto à distribuição celular, HEK-293 transfectada com constructos para AT1R e ATRAP apresentava, sem a necessidade de estímulo prévio por Ang II, colocalização significativa, embora parcial, dessas proteínas, tanto na periferia da célula como em uma região perinuclear proeminente associada ao retículo endoplasmático e ao complexo de Golgi, (Lopez-Illasaca et al., 2003), em concordância com os dados de Daviet et al. (1999). Além disso, Tsurumi et al. (2006) também observaram colocalização parcial de ATRAP com AT1R *in vivo* em vários segmentos tubulares. Por fim, para linhagem de cardiomiócitos, a colocalização tende a ser menor. Tanaka et al. (2005) demonstraram marcação preponderante de ATRAP em endossomos e complexo de Golgi em linhagem cardíaca H9c2 transfectada para AT1R e ATRAP, com baixa colocalização com AT1R na periferia da célula em condições basais.

1.4.1 Mecanismos de regulação de AT1R por ATRAP

A ausência de domínios catalíticos óbvios, assinaturas funcionais ou homologias significativas a outras proteínas descritas, dificulta o entendimento do papel funcional de ATRAP. Entretanto, os últimos estudos têm lançado luz sobre essa questão. Embora ATRAP não altere aparentemente a afinidade de ligação do agonista ao receptor (Daviet et al., 1999), a super-expressão de ATRAP tende a atenuar a sinalização de AT1R estimulada por Ang II (cascatas de PLC/IP₃, c-fos, Akt, ERK, STAT, CAML/NFAT, NADPH oxidase, entre outros) e respostas fisiológicas subjacentes (Azuma et al., 2007; Cui et al., 2000; Daviet et al., 1999; Guo et al., 2005; Lopez-Illasaca et al., 2003; Min et al., 2009; Oppermann et al.,

2010; Oshita et al., 2006; Tanaka et al., 2005; Wakui et al., 2010a; Wakui et al., 2010b). Tal atenuação, não encontrada em células super-expressando constructos de ATRAP com cauda carboxi-terminal deletada, pode ser explicada ao menos em parte por um menor acoplamento intrínseco de proteínas G ao receptor ligado a Ang II, um resultado observado em ensaios de membranas totais (Lopez-Illasaca et al., 2003).

Ainda, a super-expressão de ATRAP diminui a quantidade de AT1R expresso na membrana plasmática após tratamento com Ang II, como se pode concluir pelos experimentos em culturas celulares e em modelos de animais transgênicos e nocauteados, sugerindo que a proteína funcione como um regulador negativo desse receptor (Azuma et al., 2007; Cui et al., 2000; Lopez-Illasaca et al., 2003; Oppermann et al., 2010; Wakui et al., 2010b). Como Lopez-Illasaca et al. (2003) destacam, esse resultado poderia advir de um estímulo à endocitose do receptor ou uma atenuação da sua reciclagem. Trata-se de uma ponderação importante já que há um processo dinâmico de internalização e reciclagem contínuas do receptor mesmo na presença do agonista, como observam Hein et al. (1997).

De fato, os resultados dos trabalhos sobre ATRAP são confusos quanto ao mecanismo de tráfego envolvido. Enquanto Cui et al. (2000) e Lopez-Illasaca et al. (2003) observam uma redução ainda maior da expressão de AT1R na membrana plasmática das células VSMC e HEK-293 com super-expressão de ATRAP após 24 horas e 5 minutos de tratamento com Ang II, respectivamente, Azuma et al. (2007) e Tanaka et al. (2005) não observaram diferença de expressão de AT1R em membrana plasmática após tratamento com Ang II durante 60 minutos em VSMC com ou sem super-expressão de ATRAP e relataram, na verdade, uma redução da capacidade dos receptores reciclarem para a membrana após a remoção de Ang II do meio nas células com super-expressão de ATRAP. Essa modulação da reciclagem não foi adequadamente analisada nos dois trabalhos prévios. É possível que o resultado de longa duração obtido por Cui et al. (2000) também reflita um envolvimento do processo de reciclagem.

Caso ATRAP interfira de fato na taxa de endocitose do receptor, é possível que a maior duração do experimento empregado por Azuma et al. (2007) em comparação a Lopez-Illasaca et al. (2003) tenha mascarado esse papel, um cenário plausível considerando que o tratamento com Ang II em células HEK-293 provoca internalização máxima de AT1aR em 30 minutos, sendo as taxas de endocitose e

exocitose semelhantes a partir de então (Hein et al., 1997). A ausência virtual de interação entre ATRAP e AT1R na membrana plasmática de cardiomiócitos (Tanaka et al., 2005) advoga a favor da hipótese de modulação de reciclagem, embora esse mecanismo possa ser dependente de tipo celular.

Além disso, outra dificuldade para a elucidação do tráfego de AT1R regulado por ATRAP decorre do resultado observado por Tanaka et al. (2005) de que a expressão de AT1R endógeno e recombinante na membrana plasmática já era menor em condições basais devido à super-expressão de ATRAP, um dado que foi corroborado pelos resultados de Oppermann et al. (2010) e Wakui et al. (2010b) que demonstram aumento e diminuição da expressão basal de AT1R na membrana plasmática de rins de camundongos nocauteados e transgênicos, respectivamente. Trata-se de um resultado divergente em relação às observações de Cui et al. (2000), Daviet et al. (1999) e Lopez-Illasaca et al. (2003) e podem decorrer dos diferentes tipos celulares utilizados ou pelos protocolos experimentais envolvidos. Daviet et al. (1999) trabalharam com células COS-7 co-transfectadas transitoriamente para AT1R e ATRAP, Lopez-Illasaca et al. (2003) utilizaram HEK-293 com super-expressão estável tanto de AT1R como de ATRAP e Cui et al. (2000) analisaram a expressão de AT1R na superfície de VSMC 24 horas após a transfecção de vetor de ATRAP, ao passo que Tanaka et al. (2005) analisaram o mesmo tipo celular 48 horas após a transfecção. Curiosamente, Cui et al. (2000) só foram capazes de observar redução da resposta proliferativa em células transfectadas com vetor para ATRAP a partir de 48 horas após a transfecção. Como Azuma et al. (2007) reconhecem, novas pesquisas se fazem necessárias para um adequado entendimento da modulação do tráfego de AT1R por ATRAP.

Do ponto de vista funcional, vale ainda destacar os resultados de Oppermann et al. (2010) obtidos com camundongos nocauteados para ATRAP. Esses animais mostram expansão de volume extracelular, aumento de pressão arterial, diminuição do pH da urina e aumento da reabsorção de sódio sensível a acetazolamida (um inibidor da anidrase carbônica) em túbulos proximais, o que sugere um papel da proteína ATRAP na modulação negativa da atividade de NHE3, resultado que motivou o presente trabalho. Além disso, outros estudos com animais transgênicos instigam a análise do papel de ATRAP no rim. Embora tanto camundongos transgênicos com super-expressão de ATRAP generalizada (Oshita et al., 2006) ou com super-expressão restrita ao coração (Wakui et al., 2010a) apresentem inibição

de hipertrofia cardíaca induzida por infusão de Ang II, apenas o grupo com super-expressão generalizada foi capaz de atenuar de modo consistente o aumento de pressão arterial provocada por tal infusão. Por outro lado, Wakui et al. (2010b) não observaram menor hipertensão induzida por Ang II em camundongos com super-expressão de ATRAP, mas nesse caso a dose infundida foi consideravelmente maior (2500 vs. 1000 ng/kg/min).

Recentemente, Wakui et al. (2013), aproveitando-se da oportunidade gerada pela obtenção casual de linhagens de camundongos transgênicos com super-expressão de ATRAP restrita aos tecidos renais, apresentaram os primeiros resultados funcionais mais conclusivos sobre o papel de ATRAP na fisiologia renal. Os autores observaram que o aumento de pressão arterial induzida por infusão de Ang II (1000 ng/kg/min ou 2000 ng/kg/min) foi significativamente diminuída nesses camundongos transgênicos, uma resposta que foi acompanhada por diferenças no balanço corpóreo de Na^+ entre os grupos durante o período de tratamento de Ang II (balanço positivo no grupo selvagem e balanço praticamente nulo no grupo transgênico) e por uma maior natriurese no grupo transgênico. Importante, os níveis basais de pressão arterial e balanço de Na^+ não apresentavam diferença significativa entre o grupo transgênico e selvagem. Do ponto de vista molecular, os autores encontraram um aumento dos transcritos para α -ENaC após a infusão de Ang II apenas no grupo selvagem, sem diferenças de expressão para outros transportadores como NHE3, NKCC2 e NCC entre os dois grupos. Essa regulação de expressão de α -ENaC foi confirmada em estudo *in vitro* com cultura primária de túbulo convoluto distal de camundongo, em que se observou que a super-expressão de ATRAP resultava na supressão do efeito estimulatório de Ang II sobre a expressão do transcrito de α -ENaC. Considerando essas evidências e uma vez que a expressão de ATRAP recombinante nos camundongos transgênicos era extremamente elevada especialmente nos túbulos distais, os autores propuseram que os efeitos fisiológicos observados eram decorrentes de uma modulação de transporte promovida por ATRAP nesses segmentos. Entretanto, a expressão de ATRAP no grupo transgênico estava também significativamente elevada, embora em um menor nível, em túbulos proximais, de modo que a contribuição do túbulo proximal nesses processos investigados não pode ser descartada, como reconhecem os próprios autores. Importante ainda a conclusão de que ATRAP está

aparentemente envolvida especificamente em uma inibição de ativação patológica de AT1R, sem efeito considerável sobre a atividade de sinalização basal do receptor.

1.4.2 Outras proteínas de associação a ATRAP e possíveis funções independentes de AT1R

Como já sugeriam alguns dados dos estudos de Daviet et al. (1999) e Lopez-Illasaca et al. (2003), ATRAP foi descrita mais recentemente se associando a outras proteínas e modulando respostas celulares independentes de AT1R (Garner et al., 2011; Guo et al., 2005; Min et al., 2009; Wang et al., 2002).

Guo et al. (2005) identificaram o segmento entre os aminoácidos 40 e 80 de ATRAP associando-se à região amino-terminal da proteína CAML por meio de experimentos de duplo-híbrido, imunoprecipitação e BRET. Quando vetores de ATRAP e CAML foram cotransfectados, houve uma forte colocalização das proteínas em estruturas de retículo endoplasmático perinucleares. Funcionalmente, ATRAP interfere na cascata de ativação do fator transcricional NFAT mediada por CAML que é induzida por Ang II e também na cascata de ativação de NFAT induzida pela super-expressão de CAML. Ou seja, ATRAP modulou negativamente a ação de CAML de modo dependente e independente de Ang II. Embora os autores postulem a existência de outra proteína importante nessa cascata, deduzida da observação de que a super-expressão da porção amino-terminal de CAML aumenta a sensibilidade do efeito de Ang II sobre a atividade transcricional de NFAT, essa abordagem experimental, classicamente utilizada para impedir as interações proteicas de interesse, poderia resultar em um impedimento da modulação de CAML por ATRAP por competição de ligação.

O papel de ATRAP na modulação da via CAML/NFAT dependente e independente de AT1R foi corroborado por Min et al. (2009) com cultura VSMC derivada de camundongos transgênicos super-expressando ATRAP. Nessa cultura, tanto o tratamento com Ang II como a exposição a UV geraram respostas de ativação de NFAT que foram menores do que aquelas de cultura obtida de camundongos selvagens.

ATRAP interage também com RdgB β , uma proteína que transfere fosfatidilinositol do retículo endoplasmático para a membrana plasmática e que é

conhecida por seu envolvimento na fisiologia da retina (Cockcroft, Garner, 2012; Garner et al., 2011). O papel funcional dessa interação não foi estabelecido. Curiosamente, células de epitélio pigmentado da retina oriundas de camundongos nocauteados para ATRAP apresentaram um menor transiente de Ca^{2+} induzido por ativação de AT1R, tanto no valor máximo como naquele da fase sustentada, sendo o mecanismo subjacente parcialmente dependente de estoques de Ca^{2+} sensíveis a IP_3 (Barro-Soria et al., 2012). Trata-se do primeiro relato de ATRAP modulando positivamente uma resposta induzida por ativação de AT1R e é tentador especular uma ação importante de ATRAP sobre a transferência de fosfoinosídeos e a cascata de PLC/ IP_3 nesse tipo celular. Uma vez que RdgB β também é expresso em rim e coração (Garner et al., 2011), o papel de ATRAP sobre a sinalização de Ca^{++} pode ser mais complexo do que inicialmente imaginado.

Finalmente, outra proteína associada a ATRAP em situação basal é RACK1, como observado em experimentos de duplo-híbrido, *pull-down*, imunoprecipitação e ensaio de ligação *in vitro*, sendo observada em condições basais (Wang et al., 2002). RACK1 é uma proteína andaime com grande capacidade de ancorar diversas proteínas e regular cascatas de sinalização (Adams et al., 2011). RACK1 inibe, por exemplo, a ativação de PLC β II e de adenilato ciclase II mediada por $G_{\beta\gamma}$ (Chen et al., 2004) e estabiliza a atividade de PKC β II (Adams et al., 2011). Além disso, RACK1 regula negativamente a endocitose de receptor M2 muscarínico, direciona endossomos de reciclagem para centrossomos (Reiner et al., 2010), acentua a exportação do receptor para tromboxano A2 do retículo endoplasmático para a membrana plasmática e aumenta a expressão de AT1R na superfície da célula (Parent et al., 2008). O papel da associação entre ATRAP a RACK1 também não está determinado até o momento.

2 OBJETIVO

No presente trabalho, utilizamos uma linhagem modelo de túbulo proximal de *Opossum* (OKP) por apresentar características estáveis de túbulos proximais e por expressar uma única forma de permutador Na^+/H^+ , o NHE3 (Ardaillou et al., 2000). O presente trabalho procurou super-expressar proteínas AT1aR e ATRAP exógenas (cDNA de rato) em células OKP e assim avaliar mais claramente a atividade de NHE3 regulada por AT1R e modulada por ATRAP. O ensaio funcional consistiu na análise de recuperação de pH intracelular (pHi) após a aplicação de um pulso ácido de NH_4Cl . Nossa hipótese inicial é a de que a super-expressão de AT1aR acentuaria e a super-expressão de ATRAP inibiria a cinética da recuperação de pHi.

3 MÉTODOS

3.1 Transfecção de vetores em células OKP

As células OKP foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) high-glicose com adição de piruvato de sódio (10 mM), 10% de soro fetal bovino, 0,5 U/ml de penicilina e 0,5 ml/ml de estreptomicina. Para a transfecção das células, utilizamos o lipossomo catiônico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), em uma razão de vetor/Lipofectamina 2000 igual a 1:2 (1 µg de vetor para 2 µl de Lipofectamina 2000 por poço de 24 well) durante 6 horas em meio DMEM high-glicose sem soro. O meio de transfecção foi subsequentemente trocado novamente por meio DMEM high-glicose sem soro. Os detalhes da estrutura dos vetores utilizados são apresentados na **Figura 9**.

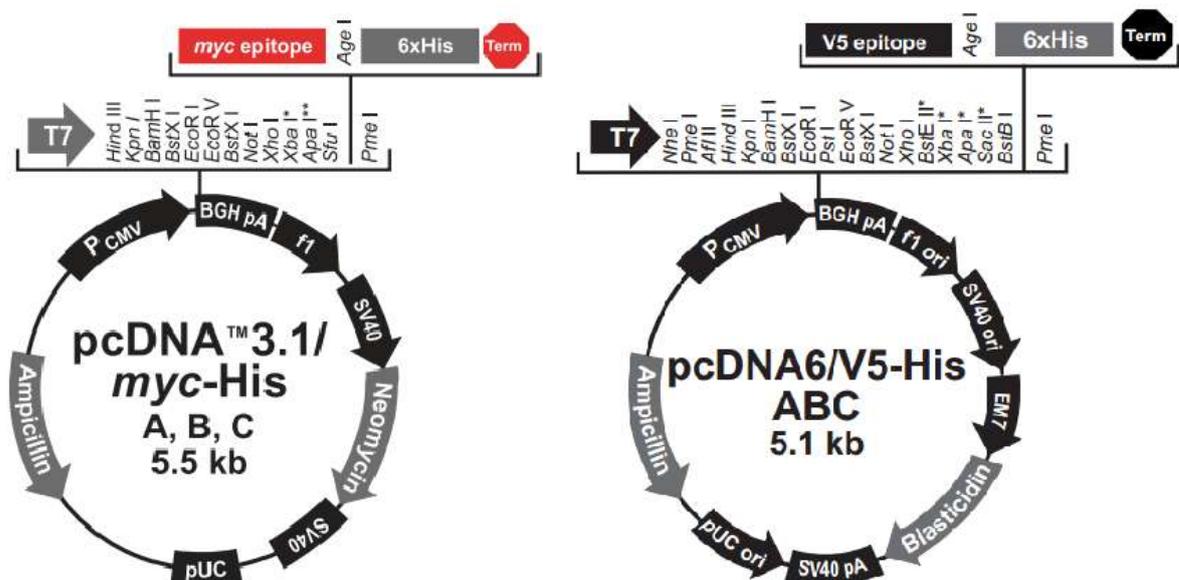


Figura 9. Os vetores pcDNA 3.1/myc-His e pcDNA6/V5-His (Invitrogen) foram utilizados para a clonagem dos vetores recombinantes pcDNA 3.1-AT1aR-myc-His e pcDNA 6-ATRAP-V5-His. Os fragmentos de AT1aR e ATRAP foram amplificados a partir de cDNA de ratos Wistar e ambos clonados entre os sítios de restrição HindIII e NotI de seus respectivos vetores, à jusante do promotor forte CMV (citomegalovírus). Foram adicionadas sequências de início de tradução Kozac a cada um desses fragmentos e foram retirados os sítios de término de tradução a fim de que os *tags* myc-His e V5-His fossem incorporados às sequências de AT1aR e ATRAP. Os genes de resistência a ampicilina foram importantes para a seleção das bactérias transformadas e para os protocolos de amplificação dos vetores. Os genes de resistência à neomicina e à blastidicina foram importantes para a seleção das células OKP com super-expressão estável desses vetores.

3.2 Western blot

Para analisar a expressão de proteínas recombinantes LacZ-myc-His, LacZ-V5-His, AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His em células OKP transfectadas, utilizamos a técnica de Western blotting. Inicialmente, entre 48 e 60 horas após a realização do protocolo de transfecção, as células foram lisadas em tampão RIPA (150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 50 mM de Tris pH 8,0), em gelo, e então agitadas em *shaker* orbital por cerca de 10 horas a 4 °C. As amostras eram então centrifugadas a 13000 rpm por 20 minutos e ao sobrenadante foi aplicado igual volume de *sample buffer* (0,05% de azul de bromofenol, 2% de SDS, 20% de glicerol, 2% de β -mercaptoetanol, 5mM de Tris-HCl pH 6,8). A mistura foi aquecida a 65 °C por 10 minutos e enfim submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (8 ou 12%), utilizando marcadores Full Range Rainbow (GE, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) e Spectra Multicolor Broad Range (Pierce, Rockford, Illinois, EUA). Após a corrida de eletroforese, as proteínas separadas em gel foram transferidas para membrana de PVDF Immobilon (Milipore, Billerica, Massachussets, EUA), utilizando-se equipamento de transferência Semidry OWL (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachussets, EUA) a 400 mA por 2 horas. Posteriormente, as membranas foram coradas em solução de Ponceau S 5% para verificar a eficiência de transferência, enxaguadas em água destilada e secas a temperatura ambiente. A membrana foi então bloqueada com solução *blotto* (PBS, 0,1% de tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) por 1 hora a temperatura ambiente antes de serem incubadas com o anticorpo primário (anti-actina [BD, Franklin Lakes, New Jersey, EUA], anti-GAPDH, anti-myc [Invitrogen] e anti-V5-His [Invitrogen]). A diluição dos anticorpos utilizada foi de 1:5000, sendo as membranas incubadas a 4 °C, *overnight*, sob leve agitação. No dia seguinte, as membranas receberam 3 lavagens de 5 minutos com solução *blotto*. As membranas foram então submetida a nova incubação com anticorpos secundários (anti-mouse IgM 1:2000 para anti-actina, anti-mouse IgG 1:30000 para anti-V5 e anti-mouse IgG 1:2000 para os demais anticorpos primários), sendo posteriormente lavadas novamente por 3 vezes em solução de bloqueio. A partir daí, em ambos os casos, as membranas foram lavadas por duas vezes com PBS 1x. A visualização das bandas foi feita ao se banhar as membranas por 10 minutos geralmente em reagente ECL Plus ou em ECL Prime (Pierce) no caso de detecção

de AT1R-myc-His. A seguir as membranas foram expostas a um filme hipersensível BioMax (Kodak, Rochester, Nova Iorque, EUA). A análise de densitometria das bandas foi realizada utilizando-se o programa *ImageJ* (NIH).

3.3 Recuperação de pH intracelular (pHi)

O experimento de recuperação de pHi foi realizado em um sistema de perfusão contínua. O método utilizado foi a técnica de pulso de NH_4Cl , que permite uma rápida e considerável acidificação das células. A recuperação do pHi após tal pulso nos permite aferir mais facilmente a atividade de transportadores de bases e ácidos.

Células OKP foram cultivadas em lamínulas e privadas de soro 48 h antes do procedimento. As lamínulas foram colocadas em uma câmara de acrílico mantida a aproximadamente 37°C , montada na platina de um microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000 B e incubadas em solução controle *tyrode* (132 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de CaCl_2 , 2 mM de MgCl_2 e 5 mM de glicose, pH 7,4). As células foram então expostas a uma solução *tyrode* contendo NH_4Cl (112 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de CaCl_2 , 2 mM de MgCl_2 , 5 mM de glicose, 20 mM de NH_4Cl , pH 7,4). Inicialmente, a exposição ao NH_4Cl gera uma rápida alcalinização intracelular, devido à entrada de moléculas NH_3 por difusão pela membrana plasmática, as quais tamponam íons H^+ do meio intracelular gerando NH_4^+ . A elevação do pHi tende a cessar quando as concentrações de NH_3 dos meios intra- e extracelular se equilibram. Em seguida há uma queda gradual do pHi decorrente fundamentalmente do metabolismo celular inerentemente ácido, de um retardo de processos de alcalinização baseados em extrusão de ácido (como o próprio transportador NHE3) como reflexo da queda de seu substrato H^+ e do gradiente mais favorável a processos de extrusão de bases e influxo de ácidos como o NH_4^+ (Boron, 2004).

Após um período de aproximadamente 4 minutos de acidificação, o meio contendo NH_4Cl é retirado e as células são novamente incubadas com solução controle. Nessa fase, há uma queda abrupta do pHi gerada pela saída de NH_3 , a qual desloca o equilíbrio da reação $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$ para a direita e assim favorece a formação de carga adicional de íon H^+ livre no meio intracelular. A recuperação do pHi é registrada a partir desse momento até o período em que o pHi se torne

constante. A **Figura 10** consiste em um esquema que ilustra o processo de alcalinização, acidificação e recuperação de pH_i típicos desse experimento. O fenômeno de recuperação de pH_i em células OKP é atribuído fundamentalmente à atividade dos transportadores NHE3, premissa baseada em trabalho prévio desenvolvido no laboratório (Queiroz-Leite et al. 2011). Nele, foi demonstrado que a recuperação de pH_i em células OKP era reduzida completamente por perfusão em solução livre de Na^+ , não era afetada pelo inibidor das isoformas NHE1 e NHE2 HOE694 e era drasticamente reduzida pelo inibidor específico de NHE3 S3226.

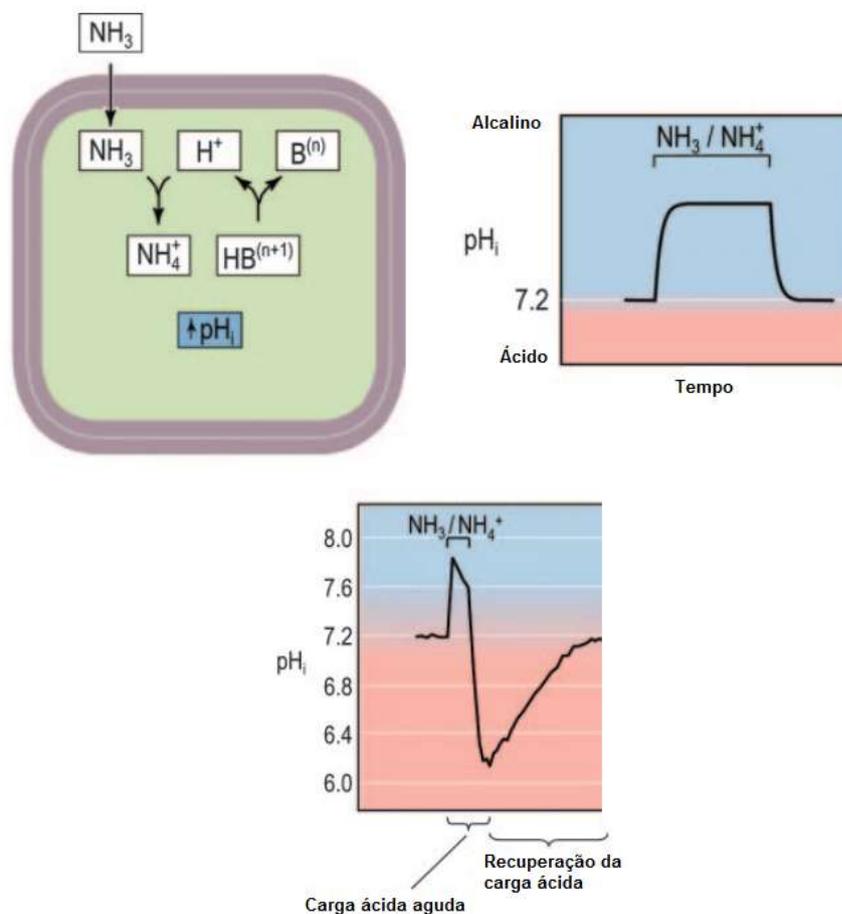


Figura 10. A troca de solução fisiológica por uma solução rica em NH_4Cl provoca um forte aumento do pH intracelular (pH_i). O influxo passivo de NH_3 até o equilíbrio com a concentração externa provoca a alcalinização das células ao tamponar íons H^+ do citossol. A alcalinização gerada favorece, em um segundo momento, processos de extrusão de bases e de influxo de ácidos como o próprio íon NH_4^+ , além de abolir processos de extrusão de ácidos até então existentes. Como resultado, a alcalinização é atenuada levemente, e esse saldo de carga ácida provocará uma forte queda do pH_i no momento de retirada da solução rica em NH_4Cl . A célula então promoverá a recuperação do pH_i intracelular por meio de transportadores de ácidos e bases, cujas atividades podem ser então mais facilmente aferidas. HB e B se referem a ácidos fracos e a suas bases conjugadas, respectivamente. Figuras modificadas a partir de Boron (2004).

Para a predição do pH_i , utilizamos a forma esterificada da sonda fluorescente sensível à pH BCECF (Invitrogen), que quando excitada de modo máximo em comprimento de onda de 495 nm emite luz no comprimento de onda de 530 nm. O BCECF foi escolhido por apresentar duas características especiais. Primeiramente, seu espectro de excitação é dependente de pH. Em caso de queda do pH_i , ocorre protonação do BCECF e a intensidade da fluorescência cai e, contrariamente, quando ocorre alcalinização do meio intracelular, sua intensidade de fluorescência se eleva. Em segundo lugar, há ainda um comprimento de onda no espectro de excitação do BCECF que não é dependente de pH, que corresponde a 440 nm e é chamado de ponto isobéptico (**Fig. 11**). Desse modo, as variações de fluorescência nesse ponto são resultado unicamente de perda de fluorescência independente de pH_i . Considerando finalmente as intensidades de fluorescência emitidas em ambos os comprimentos de onda de excitação durante o percurso do experimento, é possível descartar que uma variação de fluorescência em comprimento de onda de excitação de 495 nm seja decorrente de um mero *bleaching* do fluoróforo ao invés de ser uma resposta à mudança de pH_i . Em outras palavras, a análise da emissão de luz em 530 nm é feita com base na razão das intensidades emitidas após a excitação em 495 nm e 440 nm ($R = I_{495}/I_{440}$).

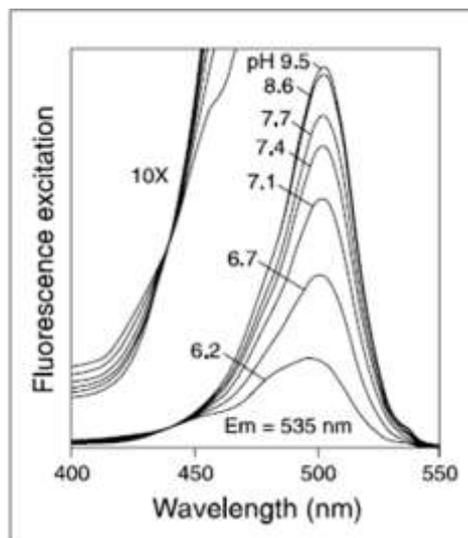


Figura 11. Espectro de excitação fluorescente dependente de pH do BCECF. O aumento de 10X da região de comprimento de onda abaixo de 470 nm ilustra de forma clara o ponto isobéptico, em 440 nm. Figura extraída de <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01150.pdf>.

A determinação do pHi envolveu o cálculo sugerido pelo fabricante do fluoróforo: $pH = pK + \frac{R-R_{min}}{R_{max}-R}$, sendo Rmin e Rmax os valores mínimo e máximo das razões R ($R = I_{495}/I_{440}$) para o BCECF. Os valores de Rmin e de Rmax foram determinados para cada experimento realizado utilizando uma solução de calibração *tyrode KCl* (130 mM de KCl, 10 mM de NaCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de CaCl₂, 2 mM de MgCl₂) nos pHs de 8,6 e 5,4, respectivamente. Essas soluções de calibração continham 10 µM de nigericina (Invitrogen), um ionóforo de H⁺/K⁺.

Ainda, para a determinação do valor de pK do BCECF, realizamos uma calibração experimental prévia como também sugerido pelo manual do fabricante. Em experimentos separados, as células foram permeabilizadas com nigericina e expostas a soluções *tyrode* com pHs distintos (pHs 5,4 a 8,6, com intervalos de 0,4 unidades de pH). As razões R obtidas foram analisadas pelo programa Origin 9.1 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA) para *fitting* de curva e para predição do valor de pH que gera metade da variação de razão de fluorescência. O valor de pK correspondente, obtido para cada curva experimental, foi utilizado para a predição do pK médio do indicador em células OKP, sendo esse valor então aplicado à fórmula de predição de pHi descrita acima.

Além disso, deve-se destacar que as células foram incubadas com BCECF na concentração de 5 µM, na ausência ou presença de AngII, por 50 minutos, sendo então lavadas com solução controle para remover o fluoróforo não incorporado. Logo depois, as manobras do experimento de pulso de cloreto de amônio eram realizadas. A concentração de AngII utilizada, 10⁻¹⁰ M, foi determinada em experimentos-piloto, por conta de seu efeito estimulatório à recuperação de pHi.

Analisamos os grupos de células transfectadas com os diferentes plasmídeos construídos no trabalho (pcDNA 3.1-LacZ-myc-His, pcDNA 6-LacZ-V5-His, pcDNA 3.1-AT1aR-myc-His e pcDNA 6-ATRAP-V5-His) e o grupo controle submetido à incubação com Lipofectamina 2000 isoladamente (grupo *mock*) com relação à taxa de recuperação de pHi (dpHi/dt). As razões de fluorescência foram aferidas para a população de células em aumento de 20x na microscopia de fluorescência. Considerando o problema de heterogeneidade de expressão inerente aos experimentos de lipotransfecção dupla, os grupos analisados envolvem apenas a transfecção simples de cada vetor.

Por fim, analisamos as taxas de recuperação $dpHi/dt$ de culturas que sofreram acidificações para níveis de pHi semelhantes, para que qualquer efeito dos tratamentos sobre essas taxas decorresse de regulações dos transportadores e não de gradientes distintos de próton através da membrana. Procurando uma maneira mais objetiva de se prever as cinéticas dessas recuperações, utilizamos o programa Origin 9.1 para a inferência de constantes de recuperação (τ) para cada curva. Uma vez que as curvas de recuperação de pHi seguem um perfil exponencial, o aumento de pHi a partir do início da curva de recuperação foi predito tendo como base a equação $\Delta pH = e^{-\tau/t}$, onde t é o tempo despendido desde o início da recuperação do pHi . Desse modo, os valores médios de τ para cada grupo amostral foram comparados entre si, utilizando o método estatístico ANOVA seguido de teste post-hoc de Bonferroni, sendo estabelecido um nível de significância (α) de 0,05.

Comparamos ainda os valores de pHi das células no início do experimento (pHi basal) e no início das curvas de recuperação, para analisar se eventuais diferenças nas cinéticas de recuperação celular poderiam ser explicadas por acomodamento diferencial dos grupos experimentais a pH s distintos ou por diferentes gradientes de pH através da membrana. Os parâmetros foram também comparados por método ANOVA seguido de teste de Bonferroni, com nível de significância (α) de 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Super-expressão das proteínas recombinantes

Nos experimentos iniciais de Western blot, o protocolo de extração de proteínas se baseava no tampão comum Tris-HCl (*sample buffer*). Esse protocolo se mostrou eficaz na detecção da super-expressão das proteínas recombinantes LacZ (**Fig. 12**), mas não de AT1R-myc-His nem de ATRAP-V5-His.



Figura 12. Western blot utilizando anticorpo anti-myc (1:5000) para amostras extraídas com tampão Tris-HCl. Apenas a proteína controle LacZ-myc-His (LacZ, segunda coluna) foi super-expressa (tamanho predito de 127 KDa). Amostras de controle negativo não transfectado (CN, primeira coluna) e células transfectadas com pcDNA3.1/AT1aR-myc-His nas demais colunas.

Após tentativas de ajustes no protocolo de western, a adequada confirmação de super-expressão dessas proteínas recombinantes só foi possível com a utilização do tampão de extração RIPA, sugerido pelo fabricante de anticorpos Abcam para a análise de proteínas integrais de membrana. A partir de então, também em acordo com as recomendações encontradas, as amostras foram aquecidas a 65 °C, uma vez que temperaturas maiores favorecem a formação de agregados proteicos de grande peso molecular para proteínas transmembrânicas.

Seguindo esse novo protocolo, portanto, confirmamos a super-expressão de AT1R-myc-His (**Fig. 13**) e de ATRAP-V5-His (**Fig. 14**). A análise dos resultados de western blot para AT1R-myc-His aponta a presença de várias bandas extremamente próximas em uma região que varia aproximadamente entre 35 e 45 kDa. Apesar do peso em geral ligeiramente menor do que o predito teoricamente ($\{[\text{comprimento do constructo AT1aR-myc-His}/270] \times 10\} = \sim 45 \text{ kDa}$), trata-se do peso molecular recorrentemente encontrado para AT1aR em Western blots realizados no laboratório.

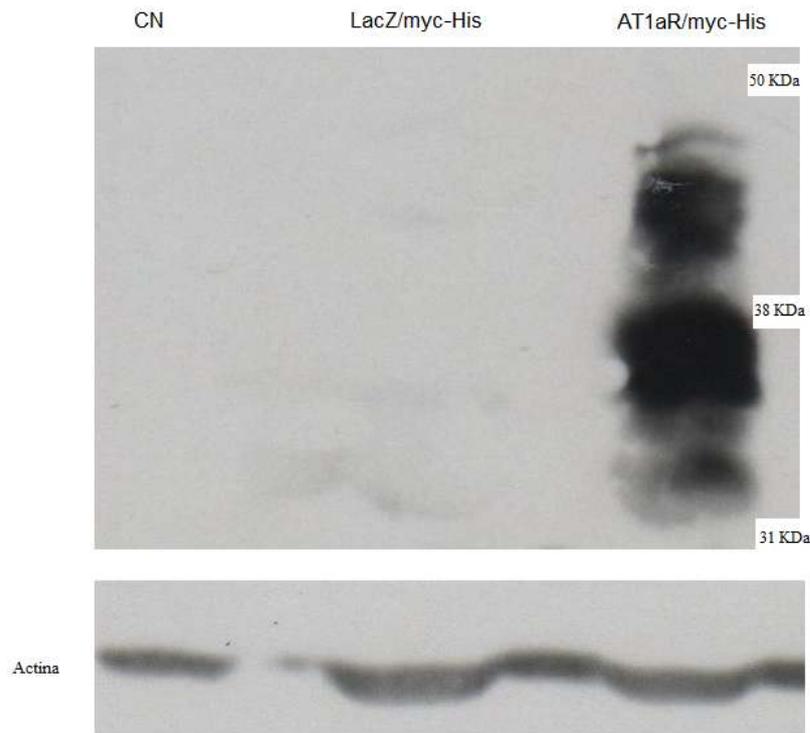


Figura 13. Western blot utilizando anticorpo anti-myc (1:5000) para amostras extraídas com tampão RIPA. A super-expressão da proteína recombinante AT1aR-myc-His (coluna 3) foi finalmente confirmada. O padrão de bandas é, em geral, ligeiramente menor do que aquele teoricamente predito para a proteína (~45 KDa). Lisados de controle negativo (CN) e de células super-expressado LacZ-myc-His na primeira e segunda coluna, respectivamente.

De fato, a existência de deslocamentos (“*shifts*”) das bandas de western blot em relação ao peso molecular predito, inclusive com padrões de bandas semelhantes ao observado nesse trabalho, é um fato relativamente comum para proteínas transmembrânicas. A técnica de SDS-PAGE parte do pressuposto de que as proteínas da amostra e da calibração adotem formas equivalentes após tratamento com SDS e se liguem com mesma afinidade ao detergente, mas o estudo metodológico de Rath et al. (2009) demonstrou que os “*shifts*” observados para proteínas de membrana eram explicados em grande parte por uma maior ou menor afinidade a SDS, retardando ou acelerando, respectivamente, a velocidade de corrida. Ainda, tais diferenças de afinidade decorriam em parte de uma desnaturação incompleta da proteína, com segmentos transmembrânicos interagindo entre si e não com moléculas de detergente. É possível que, da mesma forma, uma desnaturação incompleta, associada a menor carga de SDS, explique uma migração acelerada no gel e, conseqüentemente, um leve deslocamento para baixo no peso molecular deduzido para AT1R/myc-His em relação ao predito. Por

fim, uma outra explicação comumente aventada é a existência de modificações pós-traducionais que, de algum modo, modificam o padrão de migração no gel, hipótese plausível considerando o grau de regulação e a complexidade de tráfego de AT1aR. Dentre tais modificações, deve-se destacar a observação de que as caudas amino e carboxi-terminal de AT1R sofrem clivagem regulada (Cook et al., 2007), de modo que uma eventual clivagem do terminal amino poderia também responder ao menos parcialmente pelas bandas de menor peso molecular.

Já para ATRAP-V5-His, a banda conspícua encontrada nos blots apresentava tamanho molecular semelhante ao teoricamente predito para a proteína recombinante (~20 KDa) (**Fig. 14**). Importante ressaltar que, ao contrário de AT1R/myc-His, a confirmação da super-expressão dessa proteína recombinante foi possível mesmo sem o período de incubação após a lise celular.

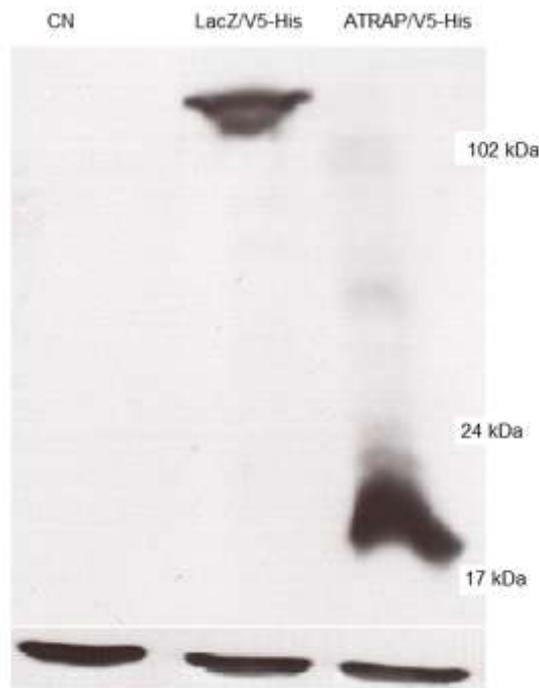


Figura 14. Western blot utilizando anticorpo anti-V5 (1:5000) para amostras extraídas com tampão RIPA. A super-expressão da proteína recombinante ATRAP-V5-His (coluna 3) foi confirmada. O padrão de bandas é semelhante ao predito teoricamente (~18 KDa) para a proteína. Lisados de células não transfectadas (controle negativo [CN]) e de células super-expressando LacZ-V5-His foram aplicados na primeira e segunda coluna, respectivamente. Abaixo, *blot* para GAPDH.

Ainda, ao contrário dos resultados de Lopez-Illasaca et al. (2003), não encontramos expressão preferencial de ATRAP recombinante nas frações de *pellet* dos lisados celulares. É possível que as pequenas diferenças nas composições dos

tampões de lise celular utilizados ou outras condições de extração negligenciadas expliquem tais diferenças. Outra possível razão envolve o uso de *tag* de hemaglutinina (HA) no constructo de ATRAP do grupo de Lopez-Illasaca, uma vez que a proteína hemaglutinina é encontrada preferencialmente distribuída em balsas lipídicas (Le Roy, Wrana, 2005). Ainda, a conclusão desses autores sobre a distribuição espacial de ATRAP em balsas lipídicas decorre da falta de solubilização da proteína recombinante em tampão de lise celular composto de Triton X-100, uma inferência criticada por diversos artigos metodológicos que ponderam que outros parâmetros podem influenciar a solubilização das proteínas (Chini, Parenti, 2004).

Finalmente, tendo a confirmação da super-expressão de todas as proteínas recombinantes não fluorescentes, realizamos os protocolos de seleção estável e obtivemos culturas com expressão estável para ATRAP-V5-His, Lac-V5-His e LacZ-myc-His (ver Apêndice), mas não obtivemos confirmação de seleção de clones expressando AT1aR-myc-His, o que nos levou a analisar o efeito das proteínas recombinantes sobre NHE3 em protocolos de expressão transitória.

4.2 Efeito estimulatório de Ang II e efeito inibitório da super-expressão de ATRAP sobre a recuperação de pHi

Em um primeiro momento, realizamos a calibração *in situ* do BCECF carregado nas células OKP. O perfil de mudança da razão de fluorescência em função do pH da solução de calibração assume um aspecto compatível com a de um sistema tampão (**Figura 15**). O brusco aumento ou diminuição da razão de fluorescência em torno de um ponto de pH indica uma desprotonação ou protonação significativa nesse intervalo de pH, consistente com o comportamento de tampões em torno de seus respectivos pKs. O *fitting* de cinco curvas de calibração independentes, obtido pelo programa Origin 9.1 (OriginLab), nos permitiu inferir um pK médio de $7,217 \pm 0,04174$ para o indicador incubado em células OKP. Esse valor médio foi utilizado então para a determinação do pHi ao longo das curvas de recuperação de nossos ensaios funcionais.

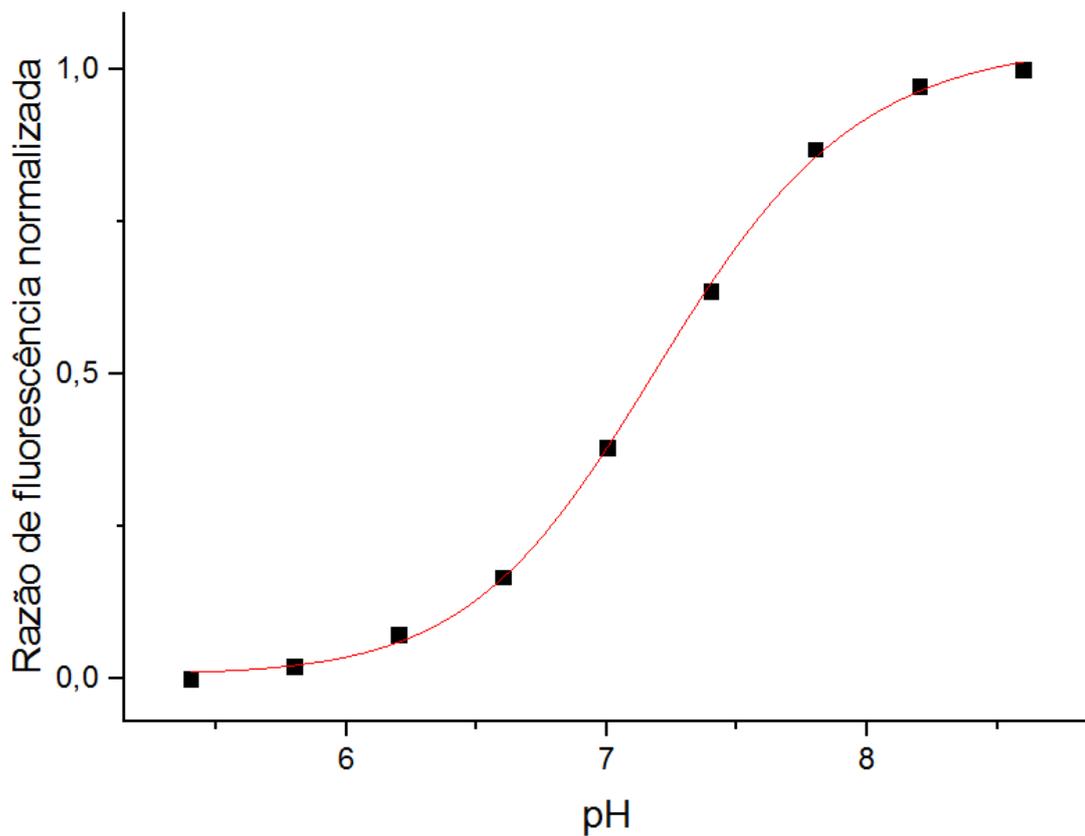


Figura 15. Comportamento do BCECF incubado em células OKP em função do pH da solução externa de calibração (faixa de pH de 5,4 a 8,6). Curvas de calibração foram geradas para cinco experimentos independentes e os pKs foram preditos pelo programa Origin 9.1. A média dos pKs obtidos para cada curva foi utilizada nos cálculos de pHi de nossos experimentos.

Quanto à análise das curvas de recuperação de pHi em si, a média da variável τ para cada grupo experimental é apresentada na **Figura 16**. Podemos observar um efeito significativo do tratamento de curto prazo da Ang II sobre a cinética do fenômeno no grupo *mock* e nos grupos transfectados com os vetores que codificam para LacZ-myc-His, LacZ-V5-His e AT1aR-myc-His, em comparação ao grupo controle *mock* não tratado previamente com Ang II. Embora não tenhamos tido sucesso na identificação de AT1R endógeno de OKP, seja por PCR seja por western blot, o efeito celular de Ang II sobre a taxa de recuperação de pHi indicam a sua presença.

Como esperado, a super-expressão das proteínas recombinantes LacZ-myc-His e LacZ-V5-His não apresentou efeito sobre a cinética de recuperação de pHi, ao compararmos tais grupos com o controle também tratado com Ang II. Por outro lado, ao contrário do que poderíamos esperar em um primeiro momento, a super-

expressão de AT1aR não provocou qualquer tendência de aumento em $dpHi/dt$. É possível que o efeito amplificador de sinal mediado pelo receptor GPCR endógeno torne a expressão do receptor recombinante redundante para o papel fisiológico que AT1R desempenha nesse processo.

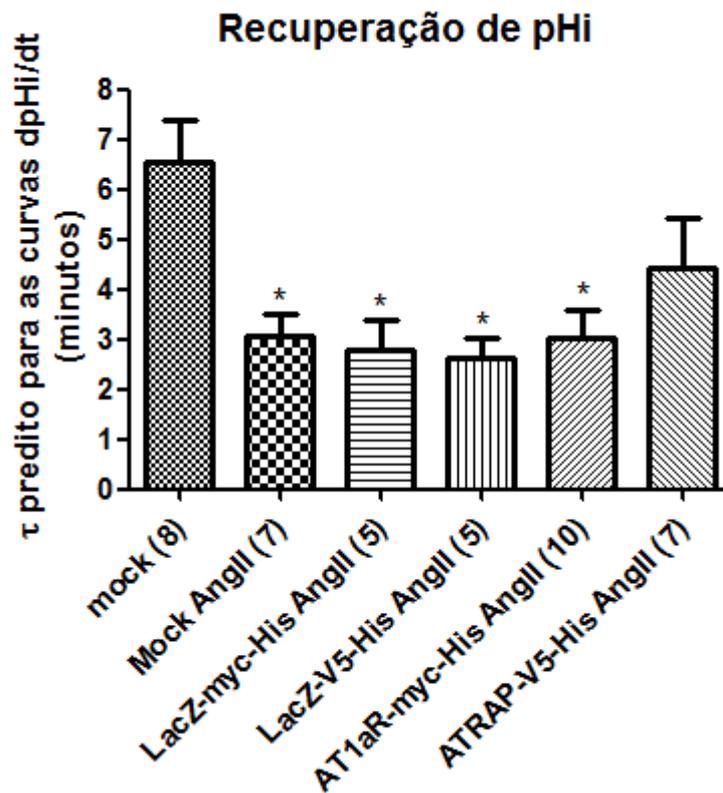


Figura 16. Valores médios de τ preditos para as curvas de recuperação de pHi dos diferentes grupos amostrais. O tratamento prévio de curto prazo com AngII acentua significativamente a taxa de recuperação de pHi e, portanto, reduz a variável τ . O tratamento com AngII nas células super-expressando a proteína recombinante ATRAP apresenta um efeito estimulatório atenuado em comparação aos outros grupos tratados com o peptídeo. Os números em parênteses indicam o tamanho amostral de cada grupo experimental. Os dados foram comparados por teste ANOVA seguido de teste post-hoc Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. mock.

Já no grupo transfectado com o vetor que codifica para ATRAP-V5-His, encontramos um menor efeito estimulatório de Ang II sobre a cinética de recuperação de pHi . Observa-se uma tendência nítida de redução do valor da variável τ em comparação ao grupo controle não tratado com Ang II, mas sem a detecção de uma diferença significativa, ao contrário do observado nos outros quatro grupos experimentais. O desvio-padrão nesse grupo foi considerável

fundamentalmente porque a população de cinéticas de recuperação assumiu um aspecto bimodal: quatro das sete lamínulas analisadas apresentaram cinética retardada em um nível próximo do controle não tratado com Ang II, enquanto as outras três lamínulas analisadas nesse grupo experimental apresentaram cinéticas similares àquelas dos demais grupos tratados com Ang II. Como o método de lipotransfecção não nos garante que a população de células analisadas tenha sido realmente transfectada, é provável que tenhamos assim aferido cinéticas de campos populacionais com eficiências altas e baixas de transfecção, de modo que o efeito biológico real de ATRAP esteja subestimado nessa abordagem experimental. Isso poderia explicar por que apenas parte do grupo experimental tenha apresentado uma significativa redução da taxa $dpHi/dt$.

Embora ATRAP seja expressa de modo endógeno, os dados indicam que um aumento de expressão de ATRAP recombinante não é redundante para o fenômeno celular analisado. Uma vez que a proteína ATRAP interage justamente com um receptor da classe de GPCRs, caracterizados por sua capacidade de amplificação de sinal, é possível que um aumento da expressão do receptor não leve a um aumento das respostas biológicas mediadas por esse receptor por conta da saturação de elementos distais da cascata, mas que a super-expressão de uma proteína associada inibitória como ATRAP possa reduzir essa amplificação e, desse modo, a resposta biológica associada.

Considerando ainda os resultados do trabalho desenvolvido no laboratório previamente (Queiroz-Leite et al., 2011), podemos inferir que o efeito de Ang II sobre a cinética de recuperação de pHi decorre de um estímulo à troca Na^+/H^+ mediada por NHE3 e de que o menor efeito de Ang II observado no grupo com super-expressão de ATRAP envolve justamente uma inibição do estímulo a NHE3 mediado por AT1R/AngII. Esses dados sustentam o relato anterior de Oppermann et al. (2010) que inferiram um papel regulador negativo sobre NHE3 para a proteína ATRAP, baseando-se principalmente nos dados de fluxo de reabsorção de sódio sensível à acetazolamida e nos dados de pH urinário.

É importante destacar, por fim, que as diferenças encontradas entre as taxas de recuperação de pHi não poderiam ser explicadas por diferenças no pHi basal das células no início do experimento de pulso de NH_4Cl ou por diferenças no pHi no início da curva de recuperação de pHi . Ou seja, as cinéticas distintas entre os grupos experimentais não decorrem de um acomodamento diferencial das células a

valores de pHi basal diferentes ou a diferentes gradientes de prótons durante o fenômeno de recuperação. Os valores de tais parâmetros são apresentados na **Tabela 1**, não havendo diferenças significativas entre os grupos experimentais.

	Mock (8)	Mock AngII (7)	LacZ-myc-His AngII (5)	LacZ-V5-His AngII (5)	AT1aR-myc-His Ang II (10)	ATRAP-V5-His AngII (7)
pHi no início do experimento	7,021 ± 0,06057	7,079 ± 0,07485	7,046 ± 0,06003	7,116 ± 0,06294	7,078 ± 0,04645	7,035 ± 0,06252
pHi no início da etapa de recuperação	6,129 ± 0,03809	6,165 ± 0,02563	6,097 ± 0,02921	6,195 ± 0,06042	6,103 ± 0,03676	6,16 ± 0,03040

Tabela 1. Média de pHi basal e de pHi no início do fenômeno de recuperação para os diferentes grupos experimentais. Os dados foram comparados por teste ANOVA seguido de teste post-hoc Bonferroni, não sendo encontrada qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais.

5 CONCLUSÃO

Os experimentos indicam, como já demonstrado em estudos prévios do laboratório, que Ang II apresenta efeito estimulatório sobre a cinética de recuperação de pHi em células OKP. Tal estímulo não foi acentuado pela super-expressão de AT1aR recombinante, ao contrário do que imaginávamos inicialmente. Acreditamos que, por conta da capacidade de amplificação de sinal característica das proteínas GPCRs, um aumento de expressão do receptor em relação ao nível endógeno seja redundante para o fenômeno biológico estudado.

Por outro lado, os resultados para o grupo com super-expressão de ATRAP corroboram nossa hipótese inicial, ao indicar uma atenuação do efeito de Ang II sobre a recuperação de pHi. Embora OKP expresse ATRAP endógena, o aumento de expressão dessa proteína, em sua forma recombinante, promoveu um retardo da cinética de $dpHi/dt$ em comparação aos demais grupos experimentais tratados com Ang II. Considerando, ainda, que a recuperação de pHi em células OKP reflete essencialmente a atividade de troca Na^+/H^+ mediada pelo contra-transportador NHE3, podemos concluir que a regulação positiva de NHE3 via AT1R/AngII é prejudicada pelo aumento de expressão da proteína ATRAP.

6 PERSPECTIVAS

Durante a execução do projeto nos deparamos com problemas metodológicos substanciais. Os problemas inerentes à lipotransfecção de vetores – a saber, a transfecção parcial da população de células OKP analisadas – nos levou a desenvolver vetores adenovirais codificando para AT1aR e ATRAP (ver apêndice), um sistema de super-expressão que se mostrou viável para transdução global da população de células. Não houve tempo hábil para utilizá-los nesse trabalho, mas pretendemos executar os próximos projetos de elucidação do papel da proteína ATRAP utilizando esse novo sistema.

Outros dois sistemas desenvolvidos e que serão utilizados futuramente envolvem a expressão estável da proteína ATRAP e a estratégia alternativa de silenciamento de ATRAP para o entendimento do seu papel funcional (ver apêndice). Quanto ao primeiro, os clones de células OKP expressando ATRAP recombinante de modo estável podem eliminar o problema encontrado no trabalho presente quanto à variabilidade de resposta do grupo de células com expressão transitória de OKP, embora a menor expressão de proteína recombinante encontrada em clones de seleção estável possa, por outro lado, atenuar os efeitos encontrados nesse experimento.

Em relação à abordagem de silenciamento, os resultados para a técnica de siRNA, reunidos até o momento, são promissores e indicam uma forte redução de expressão de ATRAP endógena utilizando um dos oligonucleotídeos de siRNA desenhados. Essa estratégia pode complementar as conclusões geradas pelos experimentos de super-expressão das proteínas recombinantes.

Independentemente do método experimental empregado, precisamos ainda elucidar qual é o exato mecanismo molecular subjacente à regulação promovida por ATRAP, se ocorre uma mudança intrínseca da atividade dos contra-transportadores NHE3 residentes na membrana plasmática ou uma mudança da expressão dessa proteína na membrana plasmática por alteração das vias de tráfego vesicular ou se ambas. Por fim, a literatura ainda diverge sobre quais são as cascatas de sinalização proeminentes na regulação de NHE3 via AT1R/AngII e essa é outra questão que deve ser ainda respondida. Nosso interesse inicial tem como foco cascatas de sinalização envolvendo Ca^{++} .

REFERÊNCIAS*

- Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Fedarko NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *PNAS*. 2011;108(36):14849-54.
- Adams B, Obertone TS, Wang X, Murphy TJ. Relationship between internalization and mRNA decay in down-regulation of recombinant type 1 angiotensin II receptor (AT1) expression in smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1999;55:1028-36.
- Adams DR, Ron D, Kiely PA. RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. *Cell Commun Signal*. 2011;9:22.
- Alexander RT, Grinstein S. Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. *J Experimental Biol*. 2009;212:1630-37.
- Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol*. 2000;14(12):2040-53.
- Ardailou R, Ronco P, Rondeau E, Friedlander G. Biology of renal cells in culture. In: *The Kidney* 6ed. Saunders. 2000;93-191.
- Azarani A, Goltzman D, Orłowski J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na⁺/H⁺ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. *J Biol Chem*. 1995;270(34):20004-10.
- Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Illasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2007;50:926-32.
- Banday AA, Lokhandwala MF. Oxidative stress causes renal angiotensin II type 1 receptor upregulation, Na⁺/H⁺ exchanger 3 overstimulation, and hypertension. *Hypertension*. 2011;57(3):452-59.
- Barro-Soria R, Stindi J, Müller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, Strauß O. Angiotensin-2-mediated Ca²⁺ signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and TRPV2 channel. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e49624.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Becker BN, Cheng HF, Burns KD, Harris RC. Polarized rabbit type 1 angiotensin II receptors manifest differential rates of endocytosis and recycling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1995;269:C1048-56.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Physiology* 6ed. Philadelphia: Elsevier. 2008.

Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett*. 2003;546(1):65-72.

Boron WF. Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ*. 2004;28:160-79.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology*, updated ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.

Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(5):221-8.

Cano A, Miller RT, Alpern RJ, Preisig PA. Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. *Am J Physiol*. 1994;266(6):C1603-8.

Chen S, Dell EJ, Lin F, Sai J, Hamm HE. RACK1 regulates specific functions of G β γ . *J Biol Chem*. 2004;279:17861-68.

Chini B, Parenti M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol*. 2004;32:325-38.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.

Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngsø C, Sarwar U, Røgebo R, Sheikh SP, Gammeltoft S, Olsen JV, Hansen JL. Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(7):1540-53.

Cockcroft S, Garner K. 14-3-3 protein and ATRAP bind to the soluble class IIB phosphatidylinositol transfer protein RdgB β at distinct sites. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(2):451-6.

Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, Moe OW. Acute Regulation of Na⁺/H⁺ Exchanger NHE3 by Parathyroid Hormone via NHE3 Phosphorylation and Dynamin-dependent Endocytosis. *J Biol Chem*. 2000;275:31601-8.

Conchon S, Peltier N, Corvol P, Clauser E. A noninternalized nondesensitized truncated AT1a receptor transduces an amplified Ang II signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1998;274:E336-45.

Cook JL, Mills SJ, Naquin RT, Alam J, Re RN. Cleavage of the angiotensin II type 1 receptor and nuclear accumulation of the cytoplasmic carboxy-terminal fragment. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(4):C1313-22.

Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Tamura K, Daviet L, Horiuchi M. ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;279(3):938-41.

Cunningham R, Steplock D, Wang F, Huang H, E X, Shenolikar S, Weinman EJ. Defective PTH regulation of NHE3 activity and phosphate adaptation in cultured NHERF-1^{-/-} renal proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37815-21.

Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem.* 1999;274:17058-62.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science.* 2001;100:481-92.

Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev.* 2007;87:825-72.

Donowitz M, Mohan S, Zhu CX. NHE3 regulatory complexes. *J Exp Biol.* 2009;212:1638-46.

du Cheyron D, Chalumeau C, Defontaine N, Klein C, Kellermann O, Paillard M, Poggioli J. Angiotensin II stimulates NHE3 activity by exocytic insertion of the transporter: role of PI 3-kinase. *Kidney International.* 2003;64:939-49.

Esseltine JL, Dale LB, Ferguson SSG. Rab GTPases Bind at a Common Site within the Angiotensin II Type I Receptor Carboxyl-Terminal Tail: Evidence that Rab4 Regulates Receptor Phosphorylation, Desensitization, and Resensitization. *Molecular Pharmacology.* 2011;79(1):175-84.

Ferguson SSG. Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacol Rev.* 2001;53:1-24.

Filipeanu CM, Henning RH, Nelemans SA, de Zeeuw D. Intracellular angiotensin II: from myth to reality? *J Renin-Angiotensin-Aldosterone-System.* 2001;2(4):219-26.

Fu GD, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research.* 2001;11(3):165-80.

Gage RM, Kim KA, Cao TT, von Zastrow M. A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44712-20.

Garner K, Li M, Ugwuanya N, Cockcroft S. The phosphatidylinositol transfer protein RdgB β binds 14-3-3 via its unstructured C-terminus, whereas its lipid-binding domain

interacts with the integral membrane protein ATRAP (angiotensin II type I receptor-associated protein). *Biochem J.* 2011;439(1):97-111.

Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension.* 1994;24:531-7.

Gloerich M, Ponsioen B, Vliem MJ, Zhang Z, Zhao J, Kooistra MR, Price LS, Ritsma L, Zwartkruis FJ, Rehmann H, Jalink K, Bos JL. Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol.* 2010;30(22):5421-31.

Guo S, Lopez-Illasaca M, Dzau VJ. Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as transducer of angiotensin II-mediated nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12536-41.

Gurley SB, Riquier-Brison AD, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, Snouwaert JN, Le TH, McDonough AA, Koller BH, Coffman TM. AT_{1A} angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab.* 2011;13(4):469-75.

Harris PJ, Young JA: Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Arch.* 1977;367:295-7.

Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT₁ and AT₂ receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol.* 1997;11:1266-77.

Honegger KJ, Capuano P, Winter C, Bacic D, Stange G, Wagner CA, Biber J, Murer H, Hernando N. Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). *PNAS.* 2006;103(3):803-8.

Houillier P, Chambrey R, Achard JM. Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int.* 1996;50:1496-1505.

Hunyady L, Baukal AJ, Gáborik Z, Olivares-Reyes JA, Bor M, Szaszák M, Lodge R, Catt KJ, Balla T. Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT₁ angiotensin receptor. *J Cell Biol.* 2002;157(7):1211-22.

Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT₁ angiotensin receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31378-82.

Hunyady L, Bor M, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ. A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:16602-9.

Imig JD. 20-HETEs or EETs: which arachidonic acid metabolite regulates proximal tubule transporters and contributes to pressure natriuresis? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R3-5.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;59(3):251-87.

Kocinsky HS, Dynia DW, Wang T, Aronson PS. Phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F212-8.

Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6:112-26.

Leong PKK, Devillez A, Sandberg MB, Yang LE, Yip DKP, Klein JB, McDonough AA. Effects of ACE inhibition on proximal tubule sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(4):F854-63.

Li XC, Zhuo JL. Selective knockdown of AT₁ receptors by RNA interference inhibits Val⁵-AngII endocytosis and NHE-3 expression in immortalized rabbit proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:C367-78.

Li Y, Yamada H, Kita Y. Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ transport. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:252-9.

Liu FY, Cogan MG. Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest*. 1989;84:83-91.

Liu FY, Cogan MG. Role of protein kinase C in proximal bicarbonate absorption and angiotensin signaling. *Am J Physiol*. 1990;258:F927-33.

Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The angiotensin II type 1 receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Molecular Biology of the Cell*. 2003;14:5038-50.

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *PNAS*. 2001;98(5):2449-54.

Marsh M, McMahon HT. The Structural Era of Endocytosis. *Science*. 1999;285:215-20.

Min LJ, Mogi M, Tamura K, Iwanami J, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Jing F, Iwai M, Horiuchi M. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/nuclear factor of activated T cells pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(6):798-809.

Modrall JG, Nanamori M, Sadoshima J, Barnhart DC, Stanley JC, Neubig RR. Ang II type 1 receptor downregulation does not require receptor endocytosis or G protein coupling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:801-9.

Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. Emerging Concepts of Regulation of Angiotensin II Receptors: New Players and Targets for Traditional Receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2532-9.

Miura S, Saku K, Karnik SS. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res*. 2003;26(12):937-43.

Murray SR, Evans CJ, von Zastrow M. Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J Biol Chem*. 1998;273(39):24987-91.

Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109:1417-27.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32248-57.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis. *J Biol Chem*. 2001;276:19452-60.

Oakley RH, Laporte AS, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1 and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(22):17201-10.

Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ. Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*. 1996;271(22):13266-72.

Oppermann M, Gess B, Schweda F, Castrop H. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:468-77.

Oshita A, Iwai M, Chen R, Ide A, Okumura M, Fukunaga S, Yoshii T, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Attenuation of inflammatory vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein. *Hypertension*. 2006;48:671-6.

Parent A, Laroche G, Hamelin E, Parent JL. RACK1 regulates the cell surface expression of the G-protein coupled receptor for thromboxane A₂. *Traffic*. 2008;9(3):394-407.

Queiroz-Leite GD, Peruzzetto MC, Neri EA, Rebouças NA. Transcriptional regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by chronic exposure to angiotensin II in renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(3):470-6.

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(6):1760-5.

Reiner CL, McCullar JS, Kow RL, Le JH, Goodlett DR, Nathanson NM. RACK1 associates with muscarinic receptors and regulates M2 receptor trafficking. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13517.

Robey RB, Ruiz OS, Espiritu DJ. Angiotensin II stimulation of renal epithelial cell Na/HCO₃ cotransport activity: a central role for Src family kinase/classic MAPK pathway coupling. *J Membr Biol*. 2002;187:135-45.

Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price Jr E, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2003;22:6471-82.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(9):521-33.

Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, Sakai M, Tsurumi Y, Noda Y, Umemura M, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Letters*. 2005;579:1579-86.

Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y, Inagami T. Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res*. 1998;82(5):523-31.

Thekkumkara T, Linas SL. Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F623-9.

Thomas WG, Baker KM, Motel TJ, Thekkumkara TJ. Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *J Biol Chem*. 1995;270:22153-9.

Tse C-M, Levine SA, Yun CHC. Molecular properties, kinetics and regulation of mammalian Na⁺/H⁺ exchangers. *Cell Physiol Biochem*. 1994;4:282-300.

Tsuganezawa H., Preisig PA, Alpern RJ. Dominant negative c-Src inhibits angiotensin II induced activation of NHE3 in OKP cells. *Kidney International*. 1998;54:394-8.

Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, Koide Y, Sakai M, Yabana M, Noda Y, Hashimoto T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Kiuchi Y, Iwai M, Horiuchi M, Umemura S. Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney International*. 2006;69:488-94.

Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga A, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S.

Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299:F991-1003.

Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda S, Shigenaga A, Maeda A, Mogi M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S. Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension.* 2010;55:1157-64.

Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension.* 2013;61(6):1203-10.

Wang W, Huang Y, Zhou Z, Tang R, Zhao W, Zeng L, Xu M, Chen C, Gu S, Ying K, Xie Y, Mao Y. Identification and characterization of AGTRAP, a human homolog of murine angiotensin II receptor-associated protein (Agtrap). *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(1):93-102.

Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga J-P. Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor–arrestin–G $\beta\gamma$ complex. *PNAS.* 2013;110(4):1530-5.

Westphal S, Perwitz N, Iwen KAH, Kraus D, Schick R, Fasshauer M, Klein J. Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by β -adrenergic stimulation of JAK/STAT. *Horm Metab Res.* 2008;40:165-71.

Wiederkehr MR, Zhao H, Moe OW. Acute regulation of Na/H exchanger NHE3 activity by protein kinase C: role of NHE3 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1999;276:C1205-17.

Yang LE, Sandberg MB, Can AD, Pihakashi-Maunsbach K, McDonough AA. Effect of dietary salt on renal Na⁺ transporter subcellular distribution abundance, and phosphorylation status. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(4):F1003-16.

Yip, JW, Ko WH, Viberti G, Haganir RL, Donowitz M, Tse CM. Regulation of the epithelial brush border Na/H exchanger isoform 3 stably expressed in fibroblasts by fibroblast growth factor and phorbol esters is not through changes in phosphorylation of the exchanger. *J. Biol. Chem.* 1997;272:18473-80.

Yun CHC, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A. NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(40):25856-63.

Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW. Acute Inhibition of Na/H Exchanger NHE-3 by cAMP – Role of protein kinase A and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem.* 1999;274(7):3978-87.

Zheng Y, Horita S, Hara C, Kunimi M, Yamada H, Sugaya T, Goto A, Fujita T, Seki G: Biphasic regulation of renal proximal bicarbonate absorption by luminal AT1A receptor. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1116-22.

Zhuo JL, Imig JD, Hammond TG, Orengo S, Benes E, Navar LG. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension. *Hypertension.* 2002;39:116-21.

Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biology.* 2004;6(6):499-506.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Clones de expressão estável de ATRAP

A concentração de antibióticos geneticina G-418 (análogo de neomicina) e de blasticidina, necessários para o protocolo de transfecção estável de células OKP, foi previamente determinada. A partir de uma confluência de 30%, foram adicionados os antibióticos G-418 (no caso dos vetores baseados em pcDNA 3.1/myc-His) ou blasticidina (no caso dos vetores baseados em pcDNA 6/V5-His) ao meio, havendo reposição do meio com antibiótico a cada dois dias. Verificou-se que 600 µg/ml de G-418 durante duas semanas e 1 µg/ml de blasticidina durante uma semana eram concentrações suficientes para que não restassem células OKP não transfectadas em cultura.

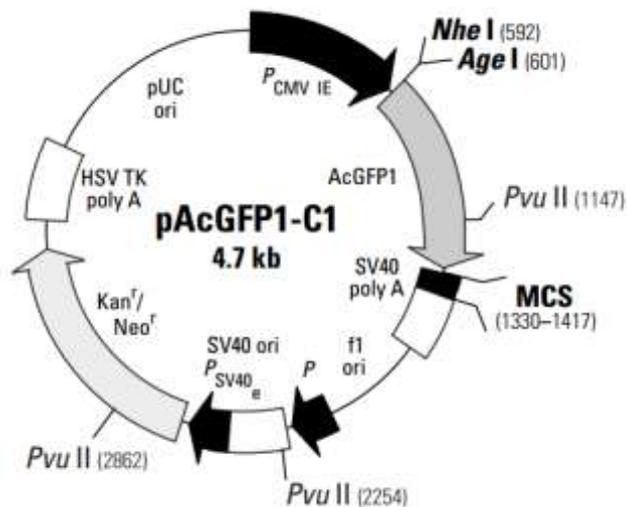


Figura A1. Estrutura detalhada do vetor pAcGFP1-C1 (Invitrogen) usado para a padronização do protocolo de seleção estável. O vetor contém cassete de resistência a kanamicina e neomicina. A kanamicina é empregada nos protocolos de transformação de bactérias competentes e para amplificação do vetor. O antibiótico geneticina (G-418), um análogo da neomicina, é utilizado para a seleção das células mamalianas transfectadas com o vetor e que expressam a proteína recombinante GFP de modo estável por conta da integração do vetor ao genoma da célula. No vetor, a sequência de GFP é dirigida por um promotor forte (promotor CMV [citomegalovírus]) à montante.

Entretanto, em nossas primeiras tentativas de obtenção de células com expressão estável, utilizando tais doses, foram obtidas populações heterogêneas de células quanto à expressão da proteína recombinante. Desse modo, para a padronização do protocolo de seleção estável, decidimos usar células transfectadas

com o vetor pAcGFP-C1, que possuíam gene de resistência a geneticina, pois permitiam uma rápida avaliação da expressão da proteína recombinante por toda a população. Os detalhes do vetor pAcGFP-C1 são apresentados na **Figura A1**.

Como a integração do constructo ao genoma da célula é um evento raro, decidimos utilizar toda a população celular transfectada, sem realizar diluição prévia como sugerem certos protocolos. Além disso, uma vez que o meio seletivo com geneticina ainda permite que uma célula sensível se divida por até três vezes no período inicial de seleção, optamos por uma dose inicial alta (1000 µg/ml) para uma seleção considerável da população original, isolando apenas um pequeno conjunto de células que, em sua maioria, se mantinham por mais três de semanas em meio seletivo. Além disso, outro ajuste importante ao protocolo foi que a transferência das células transfectadas para a placa de petri com meio seletivo ocorreu após dez dias da transfecção. Essa estratégia foi determinada a fim de que as células com super-expressão transiente tivessem menor capacidade de divisão desde o início do processo de seleção, evitando assim populações heterogêneas e agrupados celulares que são menos susceptíveis à seleção por antibiótico.

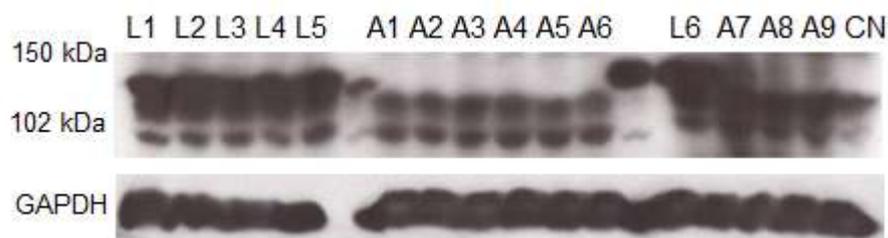


Figura A2. Western blot utilizando anticorpo anti-myc (1:5000) para amostras super-expressando de modo estável LacZ-myc-His (L1 a L5). Não foi obtida super-expressão estável de AT1R-myc-His em níveis consideráveis nas respectivas amostras selecionadas (A1 a A6). Abaixo, *blot* para GAPDH. L6, Transfecção transiente para LacZ-myc-His; CN, controle negativo, A7 a A9, amostras transfectadas transitoriamente para AT1R-myc-His.

Para um fácil isolamento dos conjuntos populacionais selecionados, as placas de petri utilizadas para a seleção estável estavam forradas com lamínulas. Os isolados foram semeados em novas placas, analisados para super-expressão estável e, nos casos de sucesso, criopreservados em nitrogênio líquido. Obtivemos sucesso na obtenção de clones de expressão estável para LacZ-myc-His (**Fig. A2**) e para LacZ-V5-His e ATRAP-V5-His (**Fig. A3**), mas não para AT1aR-myc-His. Esse fracasso se deve em parte provavelmente à dificuldade de detecção por western blot

de AT1aR recombinante, mesmo em lisados de células com expressão transiente e, conseqüentemente alta, dessa proteína.

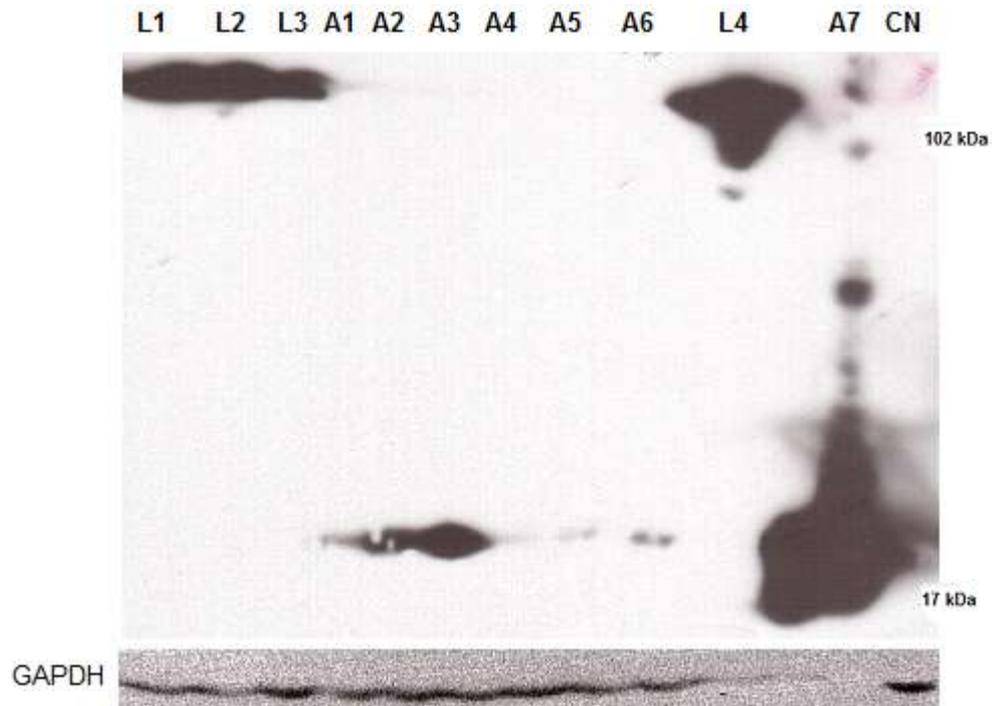


Figura A3. Western blot utilizando anticorpo anti-V5 (1:5000) para amostras extraídas com tampão RIPA. A super-expressão transitória das proteína recombinantes LacZ-V5-His (linha L4) e ATRAP-V5-His (linha A7) foram confirmadas, com bandas de tamanho semelhante ao predito (~127 KDa e ~20 KDa). Ainda, foram isolados clones super-expressando ATRAP (linhas A1 a A6) e LacZ-V5-His (L1 a L3) após protocolo de seleção estável. As culturas derivadas de L1 e do clone A3, de maior expressão, foram congeladas. Abaixo, blot para GAPDH. CN, controle negativo. Foi aplicada uma menor quantidade de amostra de L4 e A7 para evitar a saturação dessas bandas antes da detecção das bandas correspondentes às amostras dos clones de expressão estável.

APÊNDICE B - Produção de adenovírus codificando ATRAP e AT1aR

Considerando a recomendação apresentada pela banca do exame de qualificação para que se desenvolvesse um modelo de super-expressão mais eficiente e homogêneo, iniciamos uma etapa de produção de adenovírus para a transdução de OKP como alternativa ao protocolo de lipofecção, dado que os adenovírus são capazes de transduzir com altíssima eficiência diversas linhagens celulares.

Para a construção dos vetores adenovirais codificando para AT1aR/myc-His e ATRAP/V5-His, foram escolhidos o vetor de entrada pENTR2B Dual Selection Vector (**Fig. B1**) e o vetor de destino pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen) (**Fig. B2**), cujas técnicas de clonagem correspondentes foram o método clássico de clonagem por enzima de restrição e o método baseado em recombinação homóloga (tecnologia Gateway).

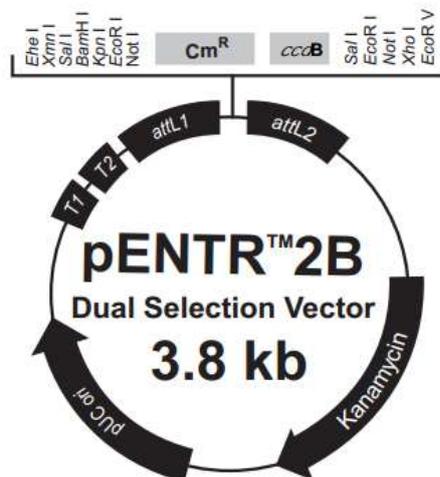


Figura B1. Detalhes do vetor de entrada *pENTR2B Dual Selection Vector* utilizado para o primeiro processo de clonagem dos fragmentos de AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His. O vetor apresenta um gene de resistência a kanamicina utilizado para seleção das bactérias transformadas e amplificação do vetor e um gene de resistência a cloranfenicol (Cm^R) que é perdido no processo de clonagem. Há ainda, na região intercalada pelos sítios de restrição, o gene *ccdB*, um gene letal que afeta a atividade da topoisomerase bacteriana. A sua perda durante a etapa de ligação do inserto de interesse garante que apenas as bactérias transformadas com vetores que efetivamente ligaram o inserto sobrevivam. Os sítios de recombinação attL1 e attL2 são importantes para a segunda etapa de clonagem, pois garantem a recombinação homóloga com o vetor adenoviral e, conseqüentemente, o direcionamento do inserto de interesse para esse segundo vetor.

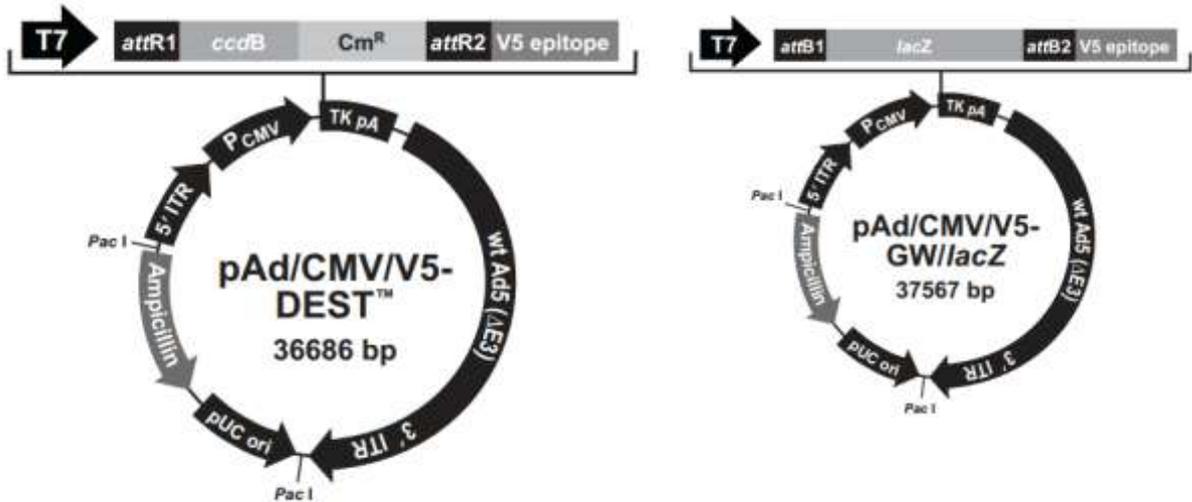


Figura B2. Estrutura do vetor adenoviral pAd/CMV/V5-DEST. Assim como o vetor de entrada, esse vetor também apresenta o gene letal *ccdB* e o gene de resistência a cloranfenicol, perdidos com a recombinação do inserto de interesse. O gene de resistência a ampicilina é também importante para a seleção de bactérias transformadas e para a amplificação do vetor, enquanto as sequências *attR1/2* são importantes para a recombinação homóloga com o vetor de entrada. Há ainda os sítios de restrição para a enzima *Pac I*, importantes na linearização do vetor e, conseqüentemente, na exposição das extremidades 5'-ITR e 3'-ITR (repetições terminais invertidas) do vírus, exposição importante para o processo de replicação inicial dos vírus. O vetor tem como base a sequência do sorotipo 5 de adenovírus humano (Ad5) e é deletado para as regiões E1 e E3 de adenovírus, sendo assim incapaz de promover a replicação do vírus em células da natureza. Apenas em células com expressão estável dos genes E1a e E1b, como na linhagem HEK293a, tais vetores adenovirais podem de fato desencadear a produção e replicação de adenovírus. Por fim, a expressão do fragmento de interesse é dirigida pelo promotor forte CMV (citomegalovírus). À direita, os detalhes do vetor pAd/CMV/LacZ-V5, usado como controle positivo de transdução das células OKP.

Amplificação dos vetores pENTR2B e pAd/CMV/V5-DEST

Inicialmente, realizamos a amplificação desses dois vetores. Por conterem em sua sequência o gene letal *ccdB*, a amplificação foi realizada em uma linhagem de bactérias quimicamente competentes mutadas para topoisomerase (*One Shot ccdB survival 2T1*). As células foram transformadas por protocolo de choque térmico. Para 100 μ l de bactéria competente, 1,7 μ l de β -mercaptoetanol diluído em água (1:10) foram adicionados e as células foram incubadas em gelo por 10 minutos, com agitações breves a cada 2 minutos. Posteriormente, 50 ng de vetor de entrada e 300 ng de vetor adenoviral foram adicionados a cada tubo, respectivamente. Houve nova incubação em gelo por 30 minutos, choque térmico por 45 segundos a 42 °C e retorno das amostras ao gelo por mais 2 minutos. Adicionamos 900 μ l de meio SOC a cada tubo e incubamos as células em *shaker* a 225 rpm e 37 °C, antes de

semearmos em placas de meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo 50 µg/ml de kanamicina + 30 µg/ml de cloranfenicol e 50 µg/ml de ampicilina + 30 µg/ml de cloranfenicol, respectivamente.

Realizamos plaqueamento réplica e inoculamos uma pequena porção de cada colônia em 10 ml de meio LB adicionado dos respectivos antibióticos para crescimento *overnight* a 37 °C. Os tubos foram posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de tampão STE, sendo 50 µl da amostra homogeneizados em 200 µl de glicerol e os estoques foram preservados a -80 °C.

Para a obtenção de grande quantidade dos plasmídeos utilizados nesse processo de produção de adenovírus, realizamos maxipreps das bactérias transformadas seguindo um protocolo caseiro (*home made*). Em 500 ml de meio LB adicionados do respectivo antibiótico para cada vetor, aplicamos um pequeno volume de cada solução estoque de bactéria transformada. O meio foi posteriormente mantido a 37 °C em *shaker* a 250 rpm *overnight* ou até atingir uma densidade óptica em 500 nm (OD₅₀₀) entre 0,4-0,8.

Os meios foram centrifugados a 3000 rpm por 15min, sendo o *pellet* de bactérias ressuspensionado em 10ml de solução GTE. Posteriormente, aplicamos lizozima e uma solução de lise NaOH/SDS (0,2 M e 1%, respectivamente) ao *pellet* ressuspensionado, mantendo a solução final em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, quando então adicionamos solução de acetato de potássio 5 M para precipitação de DNA genômico após centrifugação em 10000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado em novos tubos por meio de um funil com filtro para evitar o retorno de parte do *pellet* e foi então precipitado com solução de isopropanol puro durante 10 minutos no gelo e com centrifugação a 10000 g por 10 minutos logo depois. O *pellet* foi ressuspensionado com solução de TE 1x. Em seguida, precipitamos o RNA da amostra por meio da adição de uma solução de LiCl 5 M gelada, sendo mantida a mistura em gelo por 10 minutos e centrifugada a 10000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e novamente precipitado em solução de isopropanol por 10 minutos em gelo e centrifugado por 15 minutos a 10000 g. O *pellet* foi então ressuspensionado em 1 ml de TE 1x, sendo adicionados 2 µl de RNase A para cada ml de amostra final a fim de digerir o RNA remanescente. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight* a 37 °C. Deve-se pontuar que todas as etapas de centrifugação desse segundo dia ocorreram a 4 °C.

Já no terceiro dia, antes de reiniciar o protocolo, foi analisada a ausência de RNA nas amostras verificando a ausência de um arrasto em uma corrida de 1 µl da solução em gel de agarose 1% para os vetores de entrada e de 0,6% para os vetores adenovirais. Os marcadores utilizados na eletroforese foram 1kb DNA Ladder e 1 kb DNA Extension Ladder (Invitrogen), respectivamente. A quantificação dos vetores foi realizada por meio do espectrofotômetro Nanodrop 1000.

Clonagem de AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His em pENTR2B

Aproveitando o sucesso que tivemos na confirmação de expressão das proteínas recombinantes AT1aR e ATRAP fundidas aos tags C-terminais myc-His e V5-His, respectivamente, decidimos utilizar os vetores pcDNA3.1/AT1aR-myc-His e pcDNA6-V5-His como *templates* para a clonagem desses segmentos nos vetores de entrada.

Como apresentado na seção de Material e Métodos, as sequências de AT1aR e ATRAP nesses vetores são flanqueadas pelos primers T7 (5'TAATACGGACTCACTATAGGG-3') e BGH (5'-ATCTTCCGTGTCAGCTCCG-3'). Esses primers foram utilizados para a amplificação dos nossos fragmentos de interesse (no caso do primer BGH, adicionamos adaptadores contendo o sítio de restrição para EcoRV [5'-ACACGATATCATCTTCCGTGTCAGCTCCG-3']). As reações de PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos divididos em desnaturação (94 °C por 30s), anelamento (45 °C por 30s) e extensão (72 °C, 1 minuto para a amplificação do segmento contendo ATRAP e um 1,5 minuto para o segmento contendo AT1aR); e um ciclo final de 72 °C por mais 7 minutos. As reações de PCR se deram com uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos divididos em desnaturação (94 °C por 30s), anelamento (T_m por 30 s) e extensão (72 °C, sendo o tempo igual a 60 segundos por kb de fragmento de interesse); e finalizando com uma etapa final de alongamento de 72 °C por 7 min. As concentrações finais dos reagentes utilizados na reação foram: 400 nM de primer T7, 400 nM de primer BGH, 50 ng do vetor molde, 200 µM de DNTPs, 3 mM de MgCl₂ e 0,05 U/µl Taq Polimerase. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% com o uso do marcador 1 kb DNA Ladder. Após a confirmação dos tamanhos esperados dos *amplicons* (~1250 pb e ~660 pb, respectivamente), os produtos de PCR foram purificados para a retirada de

dímeros de primer por meio de colunas de cromatografia de exclusão molecular Microspin S-300 HR (GE), quantificados em Nanodrop 1000 e utilizados para reação de ligação ao vetor PGEM-T Easy (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA).

As reações de ligação foram realizadas com 50 ng de vetor e 1µl de T4 DNA Ligase (Promega), seguindo as orientações do fabricante, com volume final de 10µl. O montante de inserto para a ligação foi definido pela fórmula $\{(50 \text{ ng} \times \text{tamanho do inserto}) / 3 \text{ kb}\} \times 3$, sendo que 3 kb se refere ao comprimento do vetor e 50 ng é a massa de vetor presente em 1µl da amostra utilizada. As reações foram incubadas a 4 °C *overnight* e utilizadas para as reações de transformação em bactérias competentes *E. coli TOP10* seguindo o protocolo descrito acima. Nas placas transformadas, triamos a correta inserção dos fragmentos de interesse por meio de PCR de colônia, inoculando uma pequena porção de colônias individuais nas soluções das reações de PCR em condições já descritas e utilizando o primer sp6 (5'-AAGCTATGCATCCAACGCG-3') do vetor PGEM-T Easy e o primer BGH presentes nos insertos.

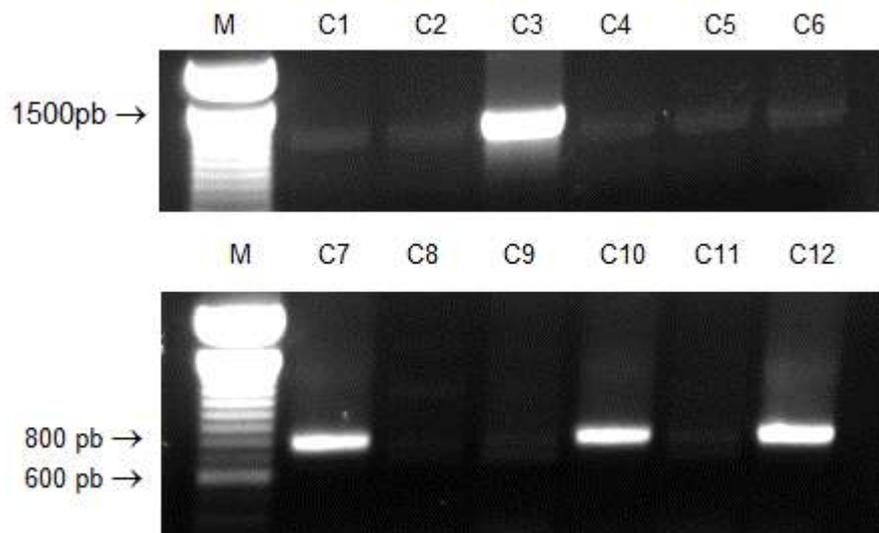


Figura B3. Eletroforese dos produtos de PCR de colônia para triagem de diferentes colônias de *E. coli TOP10* transformadas com PGEM+AT1aR-myc-His (painel superior) e PGEM+ATRAP-V5-His (painel inferior). Utilizamos o marcador (M) 100pb DNA Ladder (Invitrogen). A colônia 3 (C3) da placa de transformação com PGEM+AT1aR-myc-His e as colônias 7, 10 e 12 (C7, C10 e C12) da placa de transformação com PGEM+ATRAP-V5-His foram cultivadas em placa espelho, sendo seus vetores amplificados para as etapas subsequentes de clonagem.

Com a confirmação dos tamanhos esperados para os amplicons, ~1340 pb para PGEM+AT1aR e ~750 pb para PGEM+ATRAP (**Fig. B3**), realizamos plaqueamento réplica das colônias de interesse e uma porção da colônia da placa espelho foi utilizada para crescimento *overnight* a 37 °C em shaker a 225 rpm em meio LB com ampicilina. A cultura foi então centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm e o *pellet* de bactérias ressuspendido em meio STE. A ressuspensão foi utilizada para a extração de DNA plasmidial por meio do kit Miniprep (Promega). Os plasmídeos obtidos foram finalmente clivados por enzimas de restrição (Sal I e EcoRV) seguindo as recomendações do fabricante (Fermentas) e esses insertos foram utilizados para a reação de ligação com o vetor pENTR2B, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado com a fosfatase alcalina FastAP (Thermo Scientific).

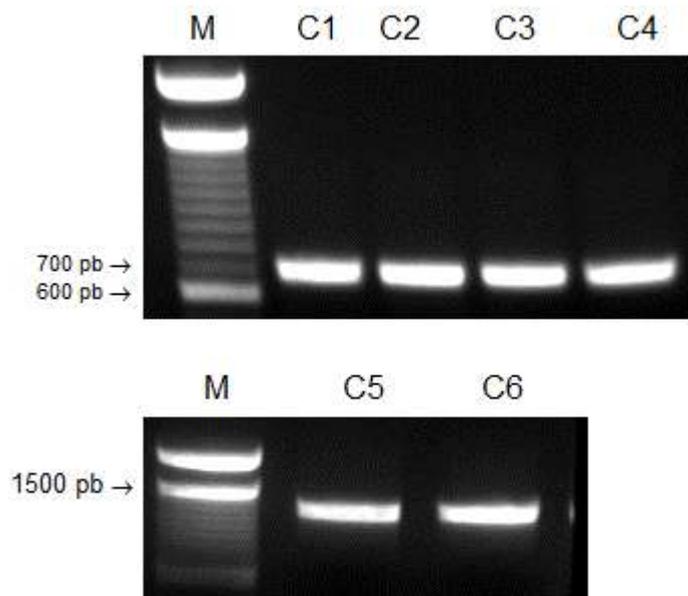


Figura B4. Triagem da transformação de *E. coli TOP10* pelos vetores de entrada (pENTR2B) ligados aos insertos AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His por meio de eletroforese dos produtos de PCR de colônia. As colônias 1 a 4 (C1 a C4) e 5 e 6 (C5 e C6) foram positivas para a ligação dos insertos de ATRAP e de AT1aR, respectivamente, sendo utilizadas para a reação de recombinação com o vetor adenoviral vazio.

Os protocolos de ligação e de transformação foram realizados como descrito acima. O PCR de colônia para confirmar a correta ligação de AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His em pENTR2B foi realizada seguindo também os mesmos padrões, utilizando novamente os primers T7 e BGH. Não utilizamos os primers próprios do vetor, *pENTR forward* (5'-GACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAAC-3') e *pENTR*

reverse (5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACACGGGC-3'), por se mostrarem ineficazes para a reação de PCR. Com a confirmação do tamanho esperado para os amplicons (**Fig. B4**), obtivemos minipreps de cada vetor de entrada (pENTR2B-AT1aR-myc-His e pENTR2B-ATRAP-V5-His) que foram utilizadas nas reações de recombinação com o vetor adenoviral acceptor. Tais reações foram realizadas por meio do kit LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos da reação de recombinação foram utilizados para a transformação de bactérias TOP10 em placas LB com ampicilina.

A triagem das colônias foi realizada por sequenciamento de maxipreps dos vetores adenovirais. As reações de sequenciamento foram realizadas com 400 ng de vetor, em um volume final de 20 µl, adicionando 3 µl de tampão big dye v3.1 5x, 2 µl de big dye terminator e 2 µl de primer BGH em concentração de 2,5 µM. A reação de sequenciamento envolvia uma etapa de desnaturação de 95 °C por 5 minutos e 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos. Ao produto da reação foram adicionados 80 µl de isopropanol 75%, sendo o homogenato mantido a temperatura ambiente por 20 minutos seguido de centrifugação a 13000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 250 µl de etanol 70% ao tubo, sendo a solução submetida posteriormente a centrifugação a 13000rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram secas em Speed Vac por 8 minutos, ressuspenso em 20 µl de TSR (Applied Biosystem, Foster City, California, EUA), mantidas a 95 °C por 5 minutos, colocadas em gelo por 2 minutos, sendo em seguida colocadas no aparelho de sequenciamento. Houve confirmação das sequências esperadas para os insertos.

Produção dos adenovírus codificando para LacZ-V5, AT1aR-myc-His e ATRAP-V5-His

Após a verificação das sequências, realizamos os protocolos de maxiprep para amplificação do montante de plasmídeos e então digerimos os vetores adenovirais por enzima de restrição PacI (ThermoScientific), a qual expõe as regiões ITRs importantes para replicação viral. A correta digestão dos vetores adenovirais foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,6%, utilizando o marcador 1kb

Extension DNA Ladder (Invitrogen) (**Fig. B5**). Os vetores clivados foram posteriormente purificados e quantificados.

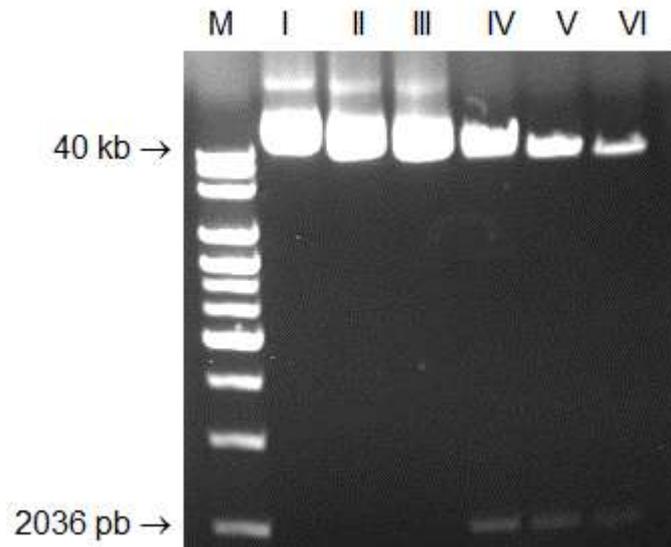


Figura B5. Eletroforese dos vetores adenovirais pAd-LacZ-V5 (colunas I e IV), pAd-AT1aR-myc-His (colunas II e V) e pAd-ATRAP-V5-His (colunas III e VI). As amostras das colunas IV, V e VI foram digeridas previamente com enzima de restrição Pac I que cliva os vetores em duas regiões, produzindo fitas de DNA de ~2080 pb e ~36 kb.

Para a reação de transfecção das células HEK293a, 1 µg de cada vetor digerido foi utilizado em poços de placas 6-well, utilizando 2 µl de Lipofectamina 2000 de acordo com as recomendações do fabricante. Cada well transfectado foi cultivado por mais 48 horas, tripsinizado e semeado em placas de petri. O meio das placas de petri era trocado a cada 48 horas até que regiões de efeito citopático (também chamadas de “placas”) fossem observadas, regiões essas que indicam replicação e produção de adenovírus seguidas de lise. Nesse momento, havia uma nova troca de meio de cultura e se esperava então a progressão dos níveis de efeito citopático. O meio foi recolhido e utilizado para duas rodadas de amplificação da titulação dos estoques de adenovírus. Essas etapas de amplificação consistiam na utilização de parte do estoque inicial de adenovírus produzido e o cultivo dessas células até a observação de efeitos citopáticos maiores, indicando um aumento da quantidade de adenovírus produzidos. Esses estoques amplificados, particularmente o estoque que codifica para LacZ-V5, foram utilizados em nossos ensaios de transdução em OKP.

Transdução de OKP com adenovírus

Para a padronização do protocolo de transdução de células OKP, utilizamos os adenovírus que codificam para a proteína controle LacZ-V5. As células foram plaqueadas em confluências distintas, transduzidas por períodos variáveis em meio DMEM sem soro e então analisadas 48 horas após a transdução por meio de ensaio de expressão de beta-galactosidase (*β -Gal Staining kit* [Invitrogen]) de acordo com as recomendações do fabricante. A eficiência de transdução foi comparada entre as amostras 1 hora após a incubação das células com X-gal. Observamos que a transdução das células em uma confluência inicial de 60-70% por 10 horas com o adenovírus controle resultava em uma transdução de praticamente toda a população celular, embora o nível de expressão de β -galactosidase entre as células ainda fosse variável e ainda que o nível de expressão médio por célula fosse menor do que nas células eficientemente transfectadas com o vetor pcDNA 6/LacZ-V5-His. O sistema adenoviral mostrou-se, portanto, adequado e superior ao sistema de lipotransfecção de plasmídeos (**Fig. B6**). No momento, estamos realizando a amplificação dos adenovírus desenvolvidos que codificam para AT1aR e ATRAP e pretendemos utilizá-los em estudos futuros.

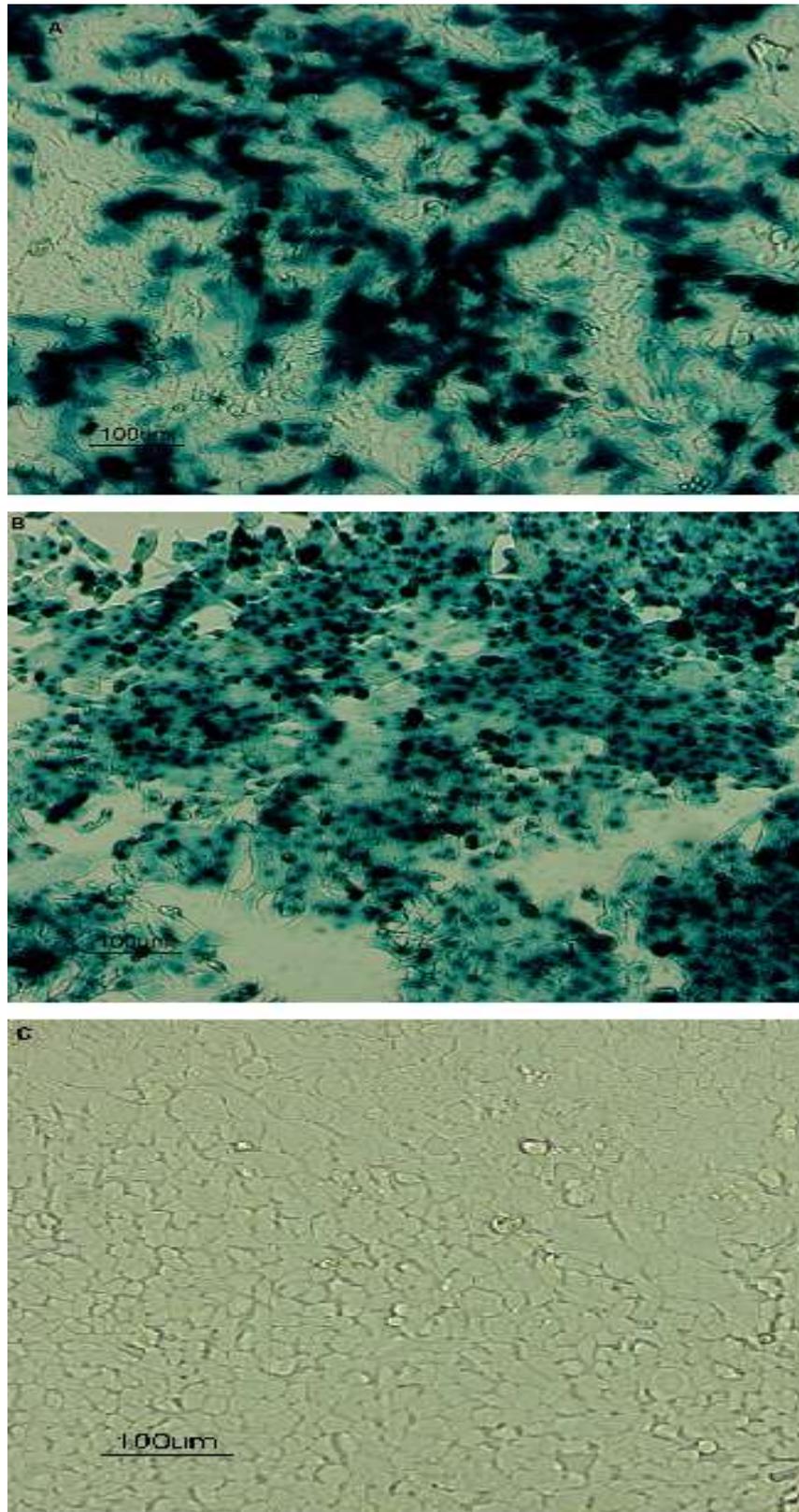


Figura B6. Expressão de beta-galactosidase em células super-expressando o plasmídeo pcDNA6-LacZ-V5 (A) e em células transduzidas com adenovírus que codificam para LacZ-V5-His (B). O controle negativo, células sem expressão de proteína LacZ recombinante é apresentado em (C). O sistema adenoviral mostrou-se mais eficiente do que o método de lipofecção até então executado, apresentando eficiência de transdução próxima de 100%.

APÊNDICE C - Silenciamento de ATRAP endógena por siRNA

Visando o silenciamento da expressão de proteína ATRAP endógena, solicitamos – a partir da sequência para ATRAP de *Monodelphis domestica* convergente nos bancos de dados Blast e Ensembl – o desenho de siRNAs do tipo *Silencer Select* (Ambion), que teoricamente apresentam maior eficiência de silenciamento com menores quantidades transfectadas e, conseqüentemente, geram menores efeitos inespecíficos sobre outros genes. As sequências-senso dos siRNA desenhados foram:

1) 5'-GCGCAUACCAGACCAUUGAtt-3'

2) 5'-UGACAUUCUCAGACUCCUAtt-3'

3) 5'-CCAUCCUCCUGGAUAUCAUtt-3'

Controle negativo (*Scramble*) 5'-UAACGACGCGACGACGUAAAtt-3'

Padronização do protocolo de transfecção de siRNA em OKP

Para a padronização da transfecção, as células foram submetidas a protocolo de transfecção direta e reversa, em confluências distintas, utilizando os lipossomos Lipofectamina 2000 e RNAiMAX (Invitrogen) e avaliadas quanto à incorporação do oligo fluorescente *BLOCK-iT siRNA* (Invitrogen), nosso controle positivo de transfecção, em microscopia de fluorescência.

A despeito das sugestões do fabricante, não obtivemos sucesso na transfecção de OKP quando utilizamos o lipossomo específico RNAiMAX (Invitrogen), mesmo quando em grande quantidade. Por sua vez, as quantidades usualmente utilizadas de Lipofectamina 2000 (2 µl em poços de 24-well) foram extremamente eficazes na transfecção de praticamente todas as células analisadas 24 horas após o início da transfecção, mas não em períodos anteriores em que a intensidade de fluorescência era significativamente menor. Concluímos, ainda, que as condições ótimas envolviam transfecção direta de no mínimo 60 nM de oligo fluorescente (30 pmol de oligo em 500 µl de meio) por poço de 24-well em confluência inicial de 40-50% (**Figura C1**).

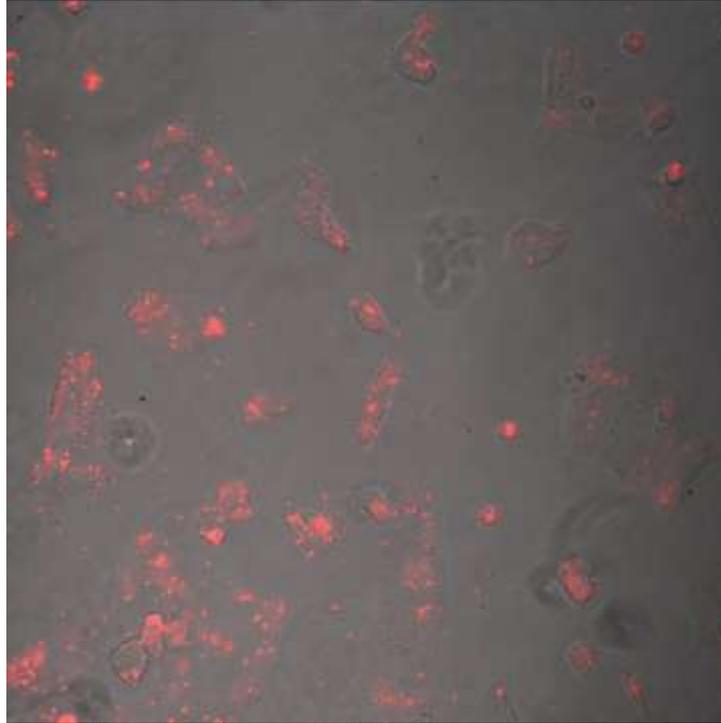


Figura C1. Microscopia confocal de células OKP transfectadas com oligo de siRNA fluorescente Block-iT siRNA Alexa Fluor utilizando Lipofectamina 2000. Após 24 horas, os oligos ficam incorporados em praticamente todas as células.

PCR e sequenciamento de ATRAP expressa em OKP

Paralelamente à padronização da transfecção de siRNA, decidimos confirmar a viabilidade dos oligos de siRNA desenhados para ATRAP em OKP (*Didelphis virginiana*), amplificando e sequenciando parte de cDNA de ATRAP, utilizando os seguintes primers, baseados no banco de dados para *Monodelphis domestica*:

- 1) 5'-CGTTTTGGTGC ACTGGCTAC-3' (senso)
- 2) 5'-TACCGAAGTGCTCTGTGTCG-3' (anti-senso)
- 3) 5'-TGTCCGACACAGAGCACTTC-3' (senso)
- 4) 5'-AAGGGACGAACTGTTGGCTT-3' (anti-senso)
- 5) 5'-GGCCATTACCATCCTCCTGG-3' (senso)
- 6) 5'-CAGGTCTGCATAGGGGTGTG-3' (anti-senso)

Inicialmente, obtivemos RNA total de OKP pelo método de extração por Trizol. As células foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos, sendo o pellet de células incubado com trizol (1ml por 10 cm² de monocamada de células) por 10 minutos em temperatura ambiente para se permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Foi adicionado então 0,2 ml de

clorofórmio para cada 1 ml de trizol e as amostras foram então agitadas vigorosamente por inversão durante 15 segundos. Houve nova incubação das amostras por 3 minutos em temperatura ambiente, seguida por centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase superior aquosa incolor, que contem RNA, foi então recuperada e transferida para um novo tubo, sendo o RNA precipitado por incubação da amostra por 10 minutos com isopropanol gelado (0,5 ml para cada 1 ml de trizol utilizado na amostra) e posterior centrifugação novamente a 12000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então retirado e o *pellet* vortexado brevemente por duas vezes após adição de etanol 70% gelado (0,5 ml para cada 1 ml de trizol utilizado). Por fim, foi realizada uma centrifugação final a 14000 rpm por 1 minuto a 4 °C. O etanol foi retirado e as amostras foram secadas brevemente ao ar livre por 5 minutos, sendo o *pellet* então ressuscitado em 30 µl de água DEPC.

Analizamos então a integridade dos RNAs extraídos por meio de corrida de alíquotas das amostras em gel de agarose em condições desnaturantes (MOPS/formaldeído) e observação das bandas de RNAs ribossomais 28S e 18S. Após a confirmação da integridade, o RNA foi purificado por meio do kit *RNeasy mini Kit* (Qiagen) utilizando DNase para eliminação de resíduos genômicos, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA purificado foi então quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop 1000 e as razões de absorvância em 260 nm e em 280 nm (razão 260/280) deveriam estar na faixa de 2,2 para que as amostras fossem consideradas puras.

Procedemos a seguir a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa utilizando 5 µg de RNA total purificado, *primers* randômicos e a enzima transcriptase reversa *Super Script III* (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Este cDNA foi então utilizado para as reações de PCR.

Utilizamos o programa AnnHyb® para a obtenção das temperaturas de annealing (T_m) teóricas dos primers. A partir das temperaturas obtidas, realizamos PCR de gradiente, com diferenças de 2 °C entre as temperaturas de annealing de cada amostra, sendo que, no total, o gradiente se estendeu em 4 °C para cima e 4 °C para baixo do T_m teórico obtido pelo programa. As reações de PCR se deram com uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos divididos em desnaturação (94 °C por 30s), anelamento (T_m por 30 s) e extensão (72 °C, sendo o tempo igual a 60 segundos por kb de fragmento de interesse); e finalizando com uma etapa final de alongamento de 72 °C por 7 min. Parte do produto de PCR

(3 μ l em 50 μ l) foi utilizado para verificar a amplificação em gel de agarose 1%. As concentrações finais dos reagentes utilizados na reação foram: 400 nM de primer sense, 400 nM de primer antisense, 2 μ l de DNA, 200 μ M de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$, 0,05 U/ μ l Taq Polimerase.

Realizamos seis combinações de primers para os experimentos de PCR (primers 1 e 2, primers 3 e 4, primers 3 e 6, primers 5 e 6, primers 1 x 4, e primers 1 e 6), sendo que as três últimas combinações se mostraram adequadas para a reação de amplificação com desempenho ótimo com temperatura de anelamento (T_m) de 62 °C. Considerando os tamanhos preditos teoricamente para esses três *amplicons* (~250 pb, ~420 pb, ~400 pb), verificamos que os produtos de PCR apresentavam tamanhos adequados (**Fig. C2**).

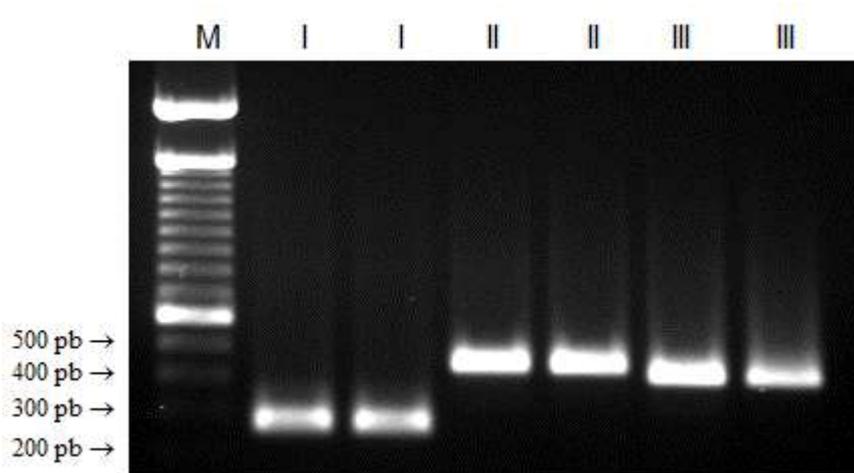


Figura C2. Produtos de PCR da sequência de ATRAP endógena utilizando distintos pares de primers (par I [primers 5 e 6], par II [primers 1 e 4], e par III [primers 1 e 6]). M, marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen).

As reações de seqüenciamento subsequentes foram realizadas com uma massa de DNA *template* de 150-200 ng da amostra de produto de PCR. Inicialmente, para a retirada de dímeros de primer presentes nos produtos de PCR, realizamos uma etapa de purificação prévia utilizando colunas de cromatografia de exclusão molecular Microspin S-300 HR (GE). A partir dessa purificação, realizamos a reação de seqüenciamento. Em um volume final de 20 μ l, foram adicionados 3 μ l de tampão de seqüenciamento 5x, 2 μ l de *big dye terminator 3.1* (Applied Biosystem) e 2 μ l de primer em concentração 2,5 μ M. Inicialmente a solução foi colocada em termociclador programado da seguinte maneira: uma etapa de desnaturação de 95

°C de 5 minutos e 30 ciclos com 95 °C por 30 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. O produto da reação foi então precipitado com solução de isopropanol/etanol. Ao produto da reação foram adicionados 80µl de isopropanol 75% sendo mantido o volume final homogeneizado à temperatura ambiente por 20 minutos com centrifugação a 13000 rpm por 25 minutos logo depois. Removeu-se o isopropanol da solução por inversão e foram adicionados 250 µl de etanol 70% ao tubo, homogeneizando e centrifugando em seguida a 13000 rpm por 5 min. Removeu-se o etanol também por inversão. Por fim, para secar devidamente o *pellet*, os tubos foram colocados em *Speed Vac* por 8min. As amostras foram ressuspensas em 20 µl de TSR (Applied Biosystem), sendo adicionadas ao bloco a 95 °C por 5 minutos e logo depois em gelo por 2 minutos, sendo em seguida colocadas no aparelho de sequenciamento.

Considerando que o produto de PCR obtido com os primers 1 e 4 apresentava o maior quadro de leitura e teoricamente abrangia os três oligonucleotídeos de siRNA desenhados previamente, decidimos sequenciá-lo preferencialmente, utilizando tanto o primer senso quanto o antisense para uma resolução ótima da sequência. A **Figura C3** apresenta toda a sequência obtida. Verificou-se que os oligos 2 e 3 de siRNA apresentavam 100% de identidade em relação à sequência de ATRAP de OKP, enquanto o oligo 1 apresentava divergência em sua antepenúltima base.

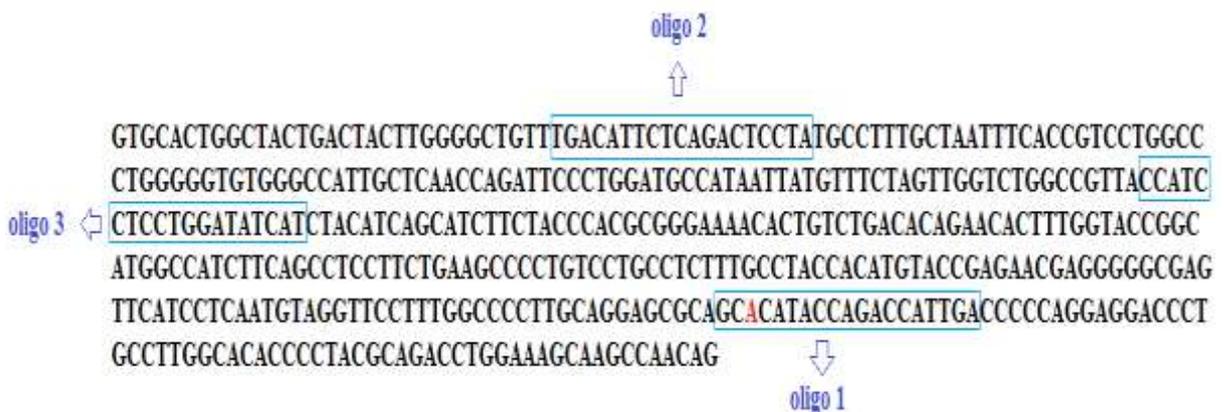


Figura C3 – Sequência obtida para ATRAP expressa em OKP. As sequências idênticas aos oligos de siRNA desenhados estão destacadas em azul. Realce em vermelho para a base divergente entre o oligo 1 de siRNA desenhado e a sequência de ATRAP de OKP.

Silenciamento da expressão de ATRAP endógena

Por conta de problemas na reprodutibilidade de identificação da proteína ATRAP endógena de OKP por Western blot, decidimos realizar a análise do silenciamento de ATRAP no nível transcricional. cDNAs das amostras foram sintetizados a partir de 1 µg de RNA total purificado seguindo os métodos já detalhados, extraídos das células 36 horas após o início da transfecção direta. Para uma primeira inspeção visual, semi-quantitativa, realizamos PCR convencional para ATRAP (primers 1 e 4) e para β-actina (primers 5'-GTGATCACCATTTGGCAAT-3' e 5'-CGCTATTGGCATACAAATCCTT-3') utilizando um número de ciclos de amplificação que não demonstrava ainda saturação, a saber, 30 e 25 ciclos. A temperatura de anelamento foi de 62 °C e 50 °C, respectivamente. Alíquotas (3 µl) do produto de amplificação foram submetidos à corrida em gel de agarose 1% (**Fig. C4**) e a intensidade das bandas foi quantificada pelo programa ImageJ (NIH). A média das intensidades das bandas de ATRAP em relação às bandas de actina (razão ATRAP/actina) é apresentada na **Figura C5**. Pode-se observar que o oligonucleotídeo 2 desempenha uma ligeira redução da expressão de ATRAP endógena, enquanto o oligonucleotídeo 3 reduz em mais de 70% tal expressão. O oligonucleotídeo 1, que apresenta um *mismatch* com a sequência de ATRAP endógena, foi ineficaz no silenciamento do transcrito. Embora o número amostral seja pequeno, os dados indicam diferença significativa e apontam a eficiência do oligo 2 e, principalmente, do oligo 3 para a abordagem de silenciamento de ATRAP.

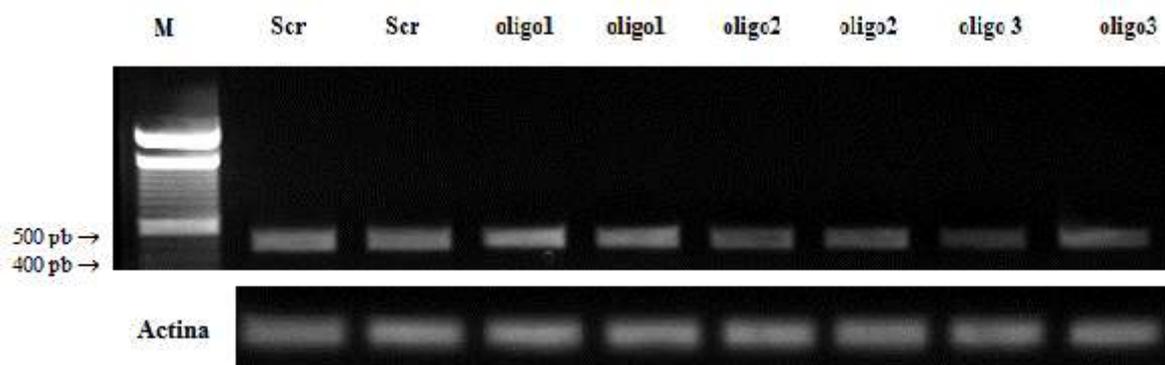


Figura C4. Corrida dos produtos de amplificação para ATRAP (painel superior) e para actina (painel inferior) de OKP em gel de agarose 1%. As amostras foram submetidas a tratamento prévio com oligonucleotídeos de siRNA controle negativo (*scramble*) e com os oligonucleotídeos 1, 2 e 3 desenhados para o silenciamento de ATRAP endógena. É possível notar o silenciamento de transcritos de ATRAP para as amostras tratadas com oligos 2 e 3.

Em outro experimento com oligonucleotídeos de siRNA, analisamos as amostras por meio de RT-PCR. cDNA foi sintetizado do modo descrito acima, sendo 4 μ l utilizados para cada amostra. A amplificação foi realizada no sistema de detecção ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) utilizando os reagentes do kit de SYBR Green-PCR Core Reagents (Applied Biosystems) e os mesmos primers do PCR convencional. As concentrações ótimas de primers senso e antisense para ATRAP e β -actina foram de 100nM e 200nM, respectivamente, a fim de evitar o aparecimento de dímeros de primer na reação. As reações ocorreram ainda com 250 μ M de dNTPs e 1,5 mM de $MgCl_2$ e procederam com etapa de desnaturação prévia do DNA a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto. Ao final de cada reação, uma curva de dissociação foi realizada para cada amostra a fim de verificar a especificidade da reação e a ausência de dímeros de primer.

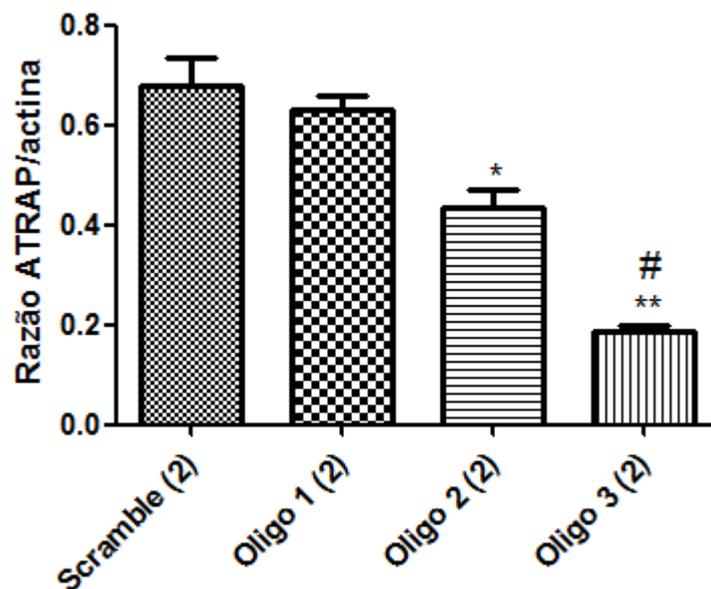


Figura C5. Média das intensidades das bandas de ATRAP para as amostras tratadas com oligonucleotídeos de siRNA (*siRNA scramble* e *oligonucleotídeos 1, 2 e 3*) em relação às bandas de actina. Os números em parênteses consistem no número amostral. * $p < 0,05$ vs. *Scramble*; ** $p < 0,01$ vs. *Scramble*, # $p < 0,05$ vs. Oligo 2.

Foram então analisados o ΔCt – a diferença entre o ciclo limiar (*threshold cycle*; *Ct*) de ATRAP e o ciclo limiar (*Ct*) de β -actina – e o $\Delta\Delta Ct$, a diferença entre o ΔCt das amostras tratadas com os oligonucleotídeos 1, 2 e 3 em relação ao ΔCt das amostras tratadas com o oligonucleotídeo *Scramble*. A expressão relativa de ATRAP nas amostras pode ser então dada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ao analisar essa expressão relativa, os

dados obtidos são coerentes com aqueles semi-quantitativos gerados pelo PCR convencional. Observamos nesse caso uma tendência de redução da expressão de ATRAP nas células tratadas com os oligonucleotídeos 2 e 3 em comparação aos níveis do grupo tratado com oligo *scramble*, havendo diferença significativa entre os grupos tratados com oligonucleotídeo *scramble* e com oligo 3, a despeito do pequeno número amostral (**Fig. C6**).

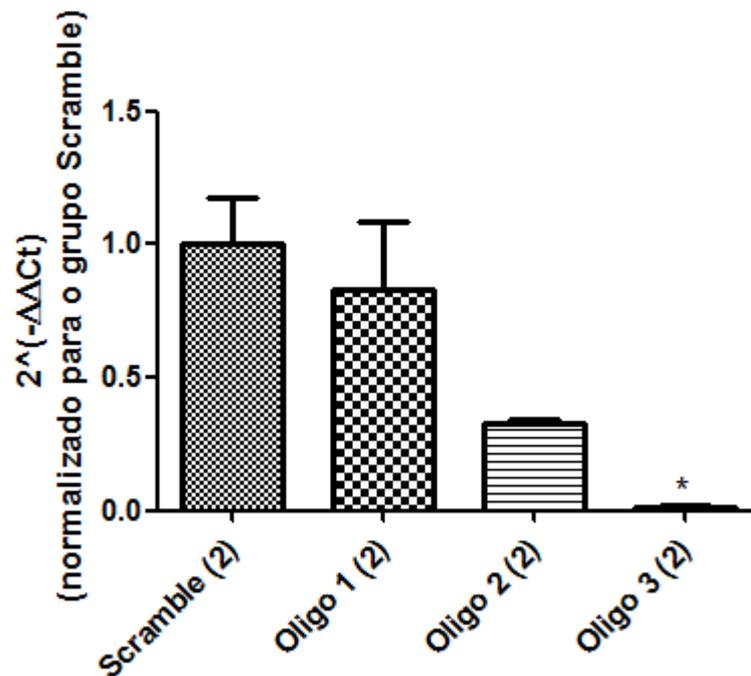


Figura C6. Análise da expressão de transcritos de ATRAP em células OKP tratadas com os oligonucleotídeos de siRNA *scramble*, oligo 1, oligo 2 e oligo 3. Os dados estão normalizados para o valor médio do grupo *scramble*. ΔCt , a diferença entre o ciclo limiar (*threshold cycle*; *Ct*) de ATRAP e o ciclo limiar (*Ct*) de β -actina; $\Delta\Delta Ct$, a diferença entre o ΔCt das amostras tratadas com os oligonucleotídeos 1, 2 e 3 em relação ao ΔCt das amostras tratadas com o oligonucleotídeo *Scramble*. Os números entre parênteses indicam o tamanho amostral dos grupos experimentais. * $p < 0,05$ vs. *Scramble*.