

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Caracterização bioquímica e farmacológica de receptores AT1  
de angiotensina II contendo mutações relacionadas à fibrilação  
atrial em humanos**

SARAH CAPELUPE SIMÕES

RIBEIRÃO PRETO

2015

Sarah Capelupe Simões

**Caracterização bioquímica e farmacológica de receptores AT1  
de angiotensina II contendo mutações relacionadas à fibrilação  
atrial em humanos**

Orientador: Claudio Miguel da Costa Neto

Coorientador: Lucas Tabajara Parreiras e Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

RIBEIRÃO PRETO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Simões, Sarah Capelupe.

Caracterização bioquímica e farmacológica de receptores AT1 de angiotensina II contendo mutações relacionadas à fibrilação atrial em humanos. Ribeirão Preto, 2015

80 p.: il., 30cm.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto

Coorientador: Dr. Lucas Tabajara Parreiras e Silva

1. Receptor AT1. 2. Mutações sítio-dirigidas. 3. Agonismo 4. Estrutura e função

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Simões, Sarah Capelupe

Título: Caracterização bioquímica e farmacológica de receptores AT1 de angiotensina II contendo mutações relacionadas à fibrilação atrial em humanos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Aos meus pais, Luiz e Darcilei por todo amor, dedicação e confiança...Amo vocês!

E aos meus amores Renata e André Brandão por tornarem minha vida muito mais feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por tudo que vivi e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha família: minha mãe Darcilei, meu pai Luiz e minha irmã Renata. Pelo amor incondicional, e por todas as vezes que estive desanimada e cansada me deram a energia e a confiança que eu precisava.

Ao meu namorado André por ser além de companheiro, amigo e meu grande amor ser também o meu maior incentivador e por me fazer tão bem até nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Claudio Miguel da Costa Neto pela oportunidade, dedicação e pelo incentivo diário que me faz querer aperfeiçoar e aprender cada vez mais.

Ao meu coorientador Dr. Lucas Tabajara Parreiras e Silva que sem ele seria difícil ter desenvolvido este projeto, além de todos os ensinamentos científicos agradeço também a amizade e as longas conversas sobre como um pesquisador deve ser atencioso e criterioso.

Aos Professores, técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia por estarem sempre disponíveis e por serem tão atenciosos e solícitos.

Ao Prof. Marcelo Damário Gomes por permitir utilizar seu laboratório sempre que necessário e ao Dr. Felipe Teixeira pelas discussões científicas e por todas as vezes que me auxiliou no planejamento de experimentos.

Aos companheiros de laboratório e amigos: Andrea, André, Deisy, Diego, Larissa, Lucas e Vanessa, pelas discussões, auxílio nos experimentos e principalmente pela amizade.

Aos amigos de longa data em especial Ana Carla pela amizade e companheirismo nestes longos anos de convivência e aos amigos de Ribeirão

Preto e Divinópolis em especial o “Quinteto”, Luana, Aline Brito e Alinne Costa pelo apoio, confiança e amizade.

À FAPESP, CNPq, FAEPA e a CAPES por apoiar financeiramente a realização deste trabalho.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes”.*

*Marthin Luther King*

## RESUMO

Simoes,S,C.**Caracterização bioquímica e farmacológica de receptores AT1 de angiotensina II contendo mutações relacionadas à fibrilação atrial em humanos. 80 folhas.** Dissertação de (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2015

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são proteínas integrais de membrana caracterizados por possuírem sete alfa-hélices transmembranares. Esses receptores são importantes alvos de estudos biomédicos e aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente comercializados agem sobre estes receptores. O receptor de Angiotensina II do tipo 1 (AT1) é um GPCR e o principal mediador do Sistema Renina-Angiotensina que tem como principal efetor o octopeptídeo Angiotensina II (AngII). Recentemente foi descrito que as mutações A244S e I103T-A244S no receptor AT1 podem estar relacionadas com a predisposição à fibrilação atrial. Neste trabalho foi realizada a construção, caracterização bioquímica e farmacológica destes mutantes, bem como do mutante I103T, com o objetivo de compreender como a funcionalidade desses receptores mutantes poderiam contribuir para a predisposição à fibrilação atrial. Os mutantes I103T e I103T-A244S revelaram ser mais eficientes e potentes que o receptor selvagem em aumentar os níveis de cálcio intracelular em resposta à AngII. Todos os mutantes estudados apresentaram baixa eficiência quanto à ativação da via das MAPKs e apresentaram comportamento diferente do receptor selvagem quando bloqueados com o antagonista Losartan, seletivo para o receptor AT1 e muito usado na clínica como medicamento anti-hipertensivo. Esses dados ressaltam a relevância do estudo tanto em termos de melhor compreender as bases moleculares da relação entre as mutações e a doença, bem como possível prevenção ao uso de medicamentos que possam interagir e agir diferentemente em receptores com essas mutações.

Palavras chave: Receptor AT1, mutações sítio-dirigidas, agonismo, estrutura e função

## ABSTRACT

Simoes,S,C. **Biochemical and pharmacological characterization of angiotensin II AT1 receptors containing mutations associated to atrial fibrillation in humans. 80 folhas.** Dissertação de (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2015

G-protein coupled receptors (GPCRs) are integral membrane proteins characterized by having seven transmembrane alpha-helices. These receptors are important targets of biomedical studies and approximately 40% of currently marketed drugs act on such receptors. The angiotensin II type 1 receptor (AT1) is a GPCR and the main mediator of the Renin-Angiotensin System whose main effector is the octapeptide Angiotensin II (Ang II). It was recently described that I103T and A244S mutations in the AT1 receptor may be related to the susceptibility to atrial fibrillation. In this study we carried out the construction of these mutants and their biochemical and functional characterization. The I103T and I103T/A244S mutants were shown to be more efficient and potent than the wild-type receptor on the increase of intracellular calcium levels. All mutants showed lower efficacy for MAPK pathway activation and showed different behavior when compared to the wild-type receptor after antagonism with Losartan. These data highlight the relevance of the present study concerning a better understanding of the molecular basis of cardiovascular diseases and showing that conventional therapies for certain diseases may lead to adverse effects on patients carrying point mutations on the receptor sequence.

Keywords: AT1 Receptor,,Site-directed mutation, agonism, Structure and Function

## LISTA DE ABREVIATURAS

7TM - Sete hélices transmembranares

AngII - Angiotensina II

AT1 - Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2 - Receptor de angiotensina II do tipo 2

AT4 - Receptor de angiotensina II do tipo 4

BRET - Transferência de energia por ressonância bioluminescência

Bmax - Cálculo do número de receptores expressos

cAMP - Adenosina monofato cíclico

DAG - Diacilglicerol

DMEN - Meio de Cultura (*Dubelcco's modified Eagle's medium*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ECA Enzima conversora de angiotensina

EC - Extracelular

EC<sub>50</sub> - Concentração de agonista na qual se atinge 50% da ativação máxima

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

F<sub>mut</sub> - Fator de mutação

IC - Intracelular

IC<sub>50</sub> - Concentração de agonista na qual se atinge 50% de inibição da  
resposta máxima

IP<sub>3</sub> - Inositol trisfosfato

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

HEK - Célula embrionária humana de rim

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

NF-Kb - Factor nuclear *kappa B*

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

PEI - Polietilenoimina

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

PLC - Fosfolipase C

pERK - ERK fosforilada

Proteína G - Proteínas que ligam GTP

SFB - Soro fetal bovino

SRA - Sistema Renina-Angiotensina

tERK - ERK Total

TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminoetano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) .....	15
1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	18
1.3 Receptor AT1: Estrutura, função e sinalização .....	20
1.4 Receptor AT1: Estudos moleculares e funcionais com o uso da estratégia de mutações sítio-dirigidas.....	21
1.5 Ocorrência de mutações em GPCRs em humanos.....	23
1.6 Mutações A244S e I103T-A244S encontrados no receptor AT1 em pacientes com fibrilação atrial .....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral .....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Identificação das mutações .....	29
3.2 Mutações sítio-dirigidas.....	29
3.3 Transformação bacteriana .....	30
3.4 Mini preparação plasmidial.....	31
3.5 Cultura de células e transfecção de células HEK293T.....	32
3.6 Ensaio de “binding” com células inteiras .....	33
3.7 Ensaio de mobilização de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	34

3.8 Análise da ativação de proteína G <sub>q</sub> através de Transferência de Energia de Ressonância de Bioluminescência (BRET).....	35
3.9 Ensaio de fosforilação de ERK 1/2 .....	36
3.10 Análise Estatística .....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. Mutações sítio-dirigidas.....	40
4.2 Comparação funcional entre o receptor AT1 selvagem e o mutante I103T .....	42
4.2.1 Ensaio de “Binding” com células inteiras.....	42
4.2.2 Ensaio de mobilização de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	44
4.2.3 Análise da ativação de G <sub>q</sub> por BRET.....	46
4.2.4 Ensaio de fosforilação de ERK 1/2.....	48
4.3 Comparação funcional entre o receptor AT1 selvagem e o mutante A244S...50	
4.3.1 Ensaio de mobilização de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	50
4.3.2 Análise da ativação de G <sub>q</sub> por BRET.....	52
4.3.3 Ensaio de fosforilação de ERK 1/2.....	54
4.4. Comparação funcional entre o receptor AT1 selvagem e mutante I103T-A244S .....	56
4.4.1 Ensaio de “Binding” com células inteiras.....	56
4.4.2 Ensaio de mobilização de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	58
4.4.3 Análise da ativação de G <sub>q</sub> por BRET.....	60
4.4.4 Ensaio de fosforilação de ERK 1/2.....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>

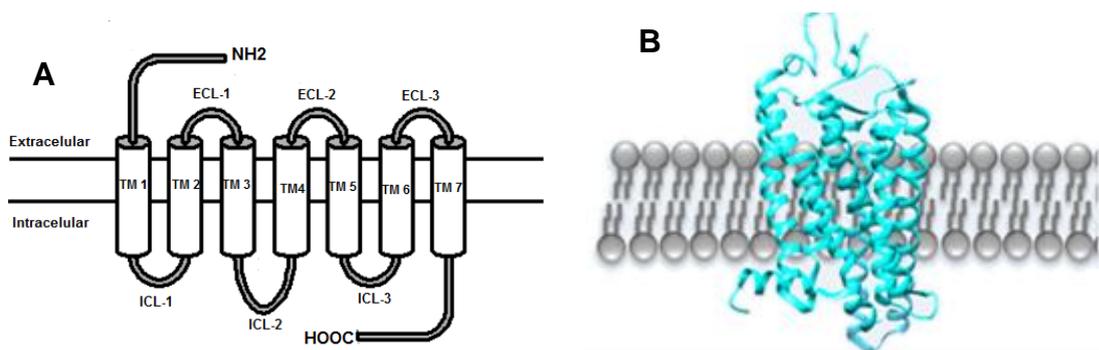
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

# *Introdução*

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), também conhecidos como receptores de sete domínios transmembranares (7TMRs), constituem a maior família de receptores de superfície celular; no código genético humano são encontrados mais de 800 tipos de GPCRs (WISE; JUPE; REES, 2004). Estes receptores são caracterizados por possuírem domínios alfa-helicoidais que atravessam a membrana sete vezes (TMs 1 a 7), interligados por três alças extracelulares (EC-1, EC-2 e EC-3) e três intracelulares (ICL-1, ICL-2 e ICL-3), onde o N-terminal fica voltado para a região extracelular e o C-Terminal para a região intracelular (Figura 1A). As regiões helicoidais e transmembranares do receptor não ficam dispersos na membrana, mas sim agrupados na forma de um feixe (Figura 1B).



**Figura 1 A: GPCR esquematizado na membrana plasmática em forma de serpentina B: GPCR em forma de feixe na membrana plasmática.**

Os GPCRs interagem com diferentes tipos de ligantes, incluindo fótons, íons, aminas biogênicas, neurotransmissores peptídicos e não peptídicos fatores

de crescimento e lipídeos (CHEN, L.; JIN; ZHOU, 2012; ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009), e medeiam uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo olfato, visão, cognição, percepção da dor, secreção exócrina e endócrina, metabolismo, inflamação, imunidade, controle cardíaco e neurotransmissão (GILCHRIST, 2008; SEACHRIST; FERGUSON, 2003).

Com base em análises de filogenia, sequência e estrutura, os GPCRs de vertebrados podem ser classificados em cinco famílias principais de receptores: tipo rodopsina (672 membros), tipo secretina (15 membros), glutamato (22 membros), adesão (33 membros) e “frizzled–taste” 2 (36 membros) (HENG; AUBEL; FUSSENEGGER, 2013), sendo que a família das rodopsinas é a mais diversificada, e os membros são caracterizados por motivos de sequências conservadas que acredita-se contribuir para que os receptores possuam estruturas e mecanismos de ativação semelhantes. Porém, apesar destas várias características em comum entre os GPCRs, cada receptor apresenta características únicas de estrutura, ativação e transdução de sinal, envolvendo o acoplamento a diferentes subtipos de proteína G, beta-arrestinas, bem como vias de sinalização dependentes de outras proteínas reguladoras. (ROSENBAUM et al., 2009).

Esses receptores são importantes alvos de estudo e aproximadamente 40% dos medicamentos comercializados atualmente os têm como alvos (HENG et al., 2013). A sinalização via GPCRs envolve o acoplamento do receptor ativado a uma(s) das proteínas G heterotriméricas, que são classificadas de acordo com o tipo de sua subunidade  $\alpha$  (HAMM, 1998). As quatro principais classes de proteína G são:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{12/13}$  e  $G_{q/11}$  (MCCUDDEN et al., 2005;

OLDHAM; HAMM, 2008). Estas proteínas heterotriméricas consistem em duas unidades funcionais, a subunidade  $G\alpha$  e o dímero  $G\beta\gamma$ .

Após a ativação do receptor e interação com a proteína G, ocorre a dissociação do heterotrímero (RASMUSSEN et al., 2011), sendo que os principais efeitos desta ativação dependerá do tipo de subunidade  $\alpha$  em questão:  $G_q$  (ativação via fosfolipase C),  $G_s$  (ativação via adenilato ciclase) e  $G_i$  (inibição da adenilato ciclase). De maneira resumida, as proteínas  $G_s$  ativam adenilato ciclase que catalisam a formação do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) o qual leva à ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila diversas proteínas alvo. As proteínas  $G_i$  atuam inibindo a adenilato ciclase, diminuindo os níveis de cAMP, e podem participar da ativação de canais de potássio e da inibição de canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) dependentes de voltagem. Proteínas  $G_{12/13}$  medeiam o estímulo da GTPase pequena Rho, e proteínas  $G_q$  ativam as fosfolipases  $C\beta$  que hidrolisam os fosfolípídeos de membrana fosfatidil 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), resultando na formação dos segundos-mensageiros inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  atua no retículo endoplasmático abrindo canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de  $IP_3$  o que acarreta no aumento da concentração citosólica deste íon. O DAG é responsável pela ativação da proteína quinase C (PKC) cuja ativação também é dependente de  $Ca^{2+}$  e que é capaz de fosforilar diversas proteínas alvo (OLDHAM; HAMM, 2008).

Como um dos mecanismos para cessar a ativação de proteína G, a região c-terminal do receptor de alguns GPCRs é fosforilada por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs), processo que sinaliza para o

recrutamento de proteínas chamadas beta arrestinas. As beta arrestinas, por sua vez, medeiam a formação de vesículas de internalização e consequente dessensibilização destes receptores (DAWSON et al., 1993; ROSKAMS et al., 1993). Embora este seja o papel clássico das beta arrestinas, ao longo da última década, novas informações foram obtidas em relação às suas funções. Em particular, foi descrito que as beta arrestinas possuem capacidades multifuncionais por interagirem com diversas proteínas incluindo proteínas quinases, levando assim à fosforilação de numerosos alvos intracelulares (WITHEROW et al., 2004).

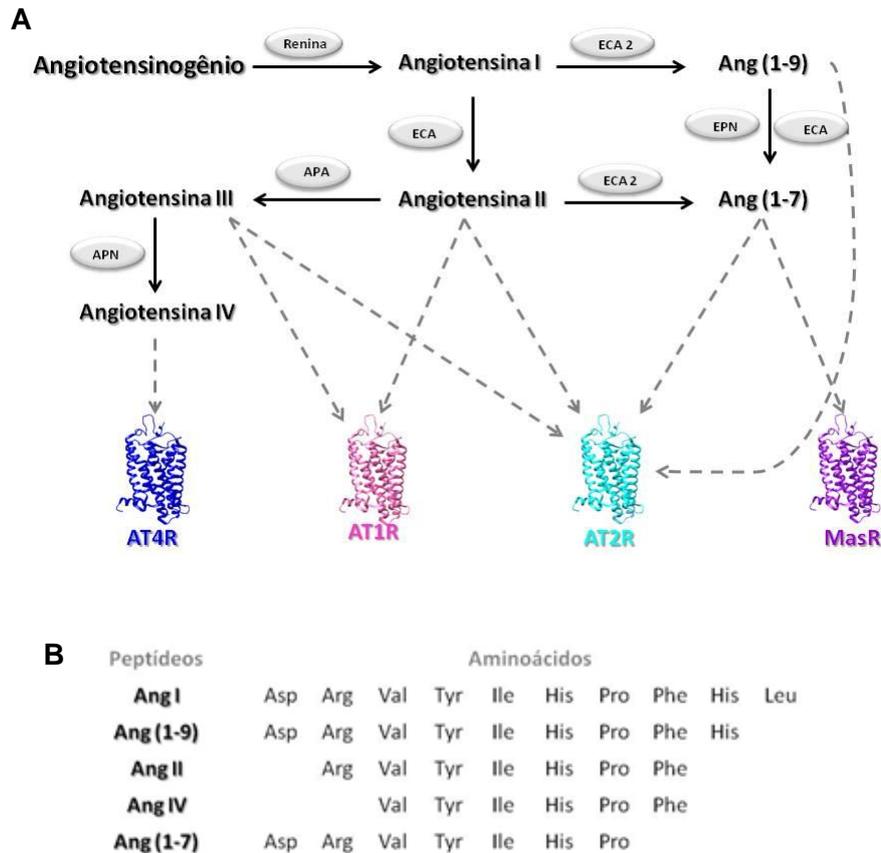
## **1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)**

O Sistema Renina-Angiotensina é complexo e composto por inúmeros peptídeos, enzimas e receptores que estão envolvidos na regulação da pressão arterial e homeostasia de íons e fluidos corporais.

O sistema é iniciado com o angiotensinogênio, glicoproteína que é gerada no fígado. Diferentes enzimas clivam esta proteína para gerar AngI, um decapeptídeo, e depois em AngII um octapeptídeo, e o principal efetor do sistema. Além disso, AngI também pode ser convertida para AngII através da enzima conversora de angiotensina I (ECA).

A AngII (1-8) é o principal efetor do SRA, porém podemos citar outros importantes peptídeos de angiotensina bioativos: angiotensina (2-8) (Ang III), Angiotensina IV (3-8) e angiotensina 1-7 Ang (1-7).

Os principais receptores que participam deste sistema (Fig 2) são: Receptor AT1 que está diretamente relacionado com controle da pressão arterial e balanço hidroeletrolítico; receptor AT2 que apesar de não ser profundamente entendido, sabe-se que possui função antagônica ao do receptor AT1 (PORRELLO; DELBRIDGE; THOMAS, 2009) e é abundantemente expresso em tecidos fetais. O receptor AT4 não é um GPCR e está principalmente distribuído no cérebro relacionado a regiões cognitivas, sensoriais e motoras (para revisão ver LEW et al., 2003). O receptor MAS possui atividades antagônicas àquelas do receptor AT<sub>1</sub> (SANTOS et al., 2003; ZOHN et al., 1998), embora suas vias de sinalização ainda não sejam completamente entendidas. Recentemente nosso grupo caracterizou que a ativação do receptor MAS leva à ativação de vias de sinalização não-canônicas, com potente efeito anti-inflamatório (LEW et al., 2003; SOUZA; COSTA-NETO, 2012). Todos os receptores citados no sistema renina-angiotensina estão ilustrados abaixo com seus respectivos agonistas (Fig. 2).



**Figura 2: Representação do Sistema Renina-Angiotensina:**A: Principais vias enzimáticas responsáveis por produzir os peptídeos ativos do SRA.**B:** Peptídeos ativos do SRA.EPN endopeptidase neuronal. APA aminopeptidase. Adaptado (COSTA-NETO et al., 2014)

### 1.3 Receptor AT<sub>1</sub>: Estrutura, função e sinalização

O receptor AT<sub>1</sub> medeia a maioria dos efeitos fisiológicos clássicos da AngII, incluindo vasoconstrição e liberação de aldosterona. Este GPCR apresenta a arquitetura comum a todos os outros receptores deste grupo (Fig 1A).

As respostas celulares mediadas por este receptor incluem: contração do músculo liso vascular, esteroidogênese adrenal e secreção de aldosterona, ativação neuronal, neurosecreção, transporte iônico, crescimento celular

proliferação, atividade pró-inflamatória, angiogênese, fibrose entre outras (DE GASPARO et al., 2000a)

O receptor AT<sub>1</sub> sinaliza preferencialmente via proteína Gq/11 promovendo ativação de fosfolipases C com subsequente aumento dos níveis dos mensageiros intracelulares dessa via (OLIVEIRA et al., 2007) e também leva ao recrutamento de beta arrestinas.

Além da capacidade descrita anteriormente das beta arrestinas levarem à sinalização celular, outra grande descoberta envolvendo as beta arrestinas, foi a caracterização de alguns compostos chamados de agonistas tendenciosos, do Inglês “biased agonists” (ativam preferencialmente uma via em detrimento de outras), que conseguem ativar a via dependente de beta arrestinas com menor ou nenhuma ativação da via de proteína G. Como por exemplo, o peptídeo [Sar<sup>1</sup>-ile<sup>-4</sup>-ile<sup>8</sup>]-AngII (SII) foi um dos primeiros agonistas tendenciosos a serem estudados, tendo sido descrito como capaz de levar a fosforilação de ERK1/2 dependente de beta arrestina 2, porém sem ativar as vias clássicas dependentes de proteína G após sua ligação ao receptor AT<sub>1</sub> (WEI et al., 2004).

#### **1.4 Receptor AT<sub>1</sub>: Estudos moleculares e funcionais com o uso da estratégia de mutações sítio-dirigidas**

Acredita-se que a ligação de um agonista ao seu receptor – no presente caso da AngII ao receptor AT<sub>1</sub> – induza (e/ou estabilize) conformações que o permitam acoplar com as vias de sinalização intracelulares. Estudos de

mutações sítio-dirigidas no receptor AT1 identificaram muitos dos aminoácidos e resíduos que estão envolvidos nos processos de ligação ao ligante, transdução do sinal, acoplamento de proteína G, e internalização do complexo agonista-receptor (OLIVEIRA et al., 2007).

Dentre os aminoácidos que, quando alterados, mostraram ser críticos para a manutenção da estrutura do receptor e conseqüentemente para ligação da AngII podemos citar os quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto externas e outros resíduos polares ou com carga que estão localizados nas regiões de superfície exposta do receptor, i.e. alças extracelulares e topos de regiões transmembranares (DE GASPARO et al., 2000b). Interessantemente, o resíduo Lys199, localizado na TM V foi proposto como um sítio de interação com o carboxi-terminal da AngII (NODA; SAAD; KARNIK, 1995). Além disso, os resíduos polares ou carregados localizados dentro dos domínios transmembranares hidrofóbicos, incluindo Asp74 no meio da TM II e Lys102 na parte superior da TM III parecem participar do mecanismo de transdução de sinal após ligação do agonista. Estudos envolvendo receptores AT1 mutantes já foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (COSTA-NETO et al., 2000; REIS et al., 2007). Dentre dados mais recentes, destacamos a construção de mutantes de Prolinas transmembranares, onde observamos que as mutações não causaram grandes alterações na afinidade por AngII porém efeito prejudicial na transdução de sinal (REIS et al., 2007).

Mutações em GPCRs normalmente causam efeitos deletérios (perda de função), porém interessantemente já foi descrito no receptor AT1 que a mutação N111A ou N111G (TM III) leva à ativação constitutiva do receptor; isto é, permite

que o receptor fique ativo, na ausência do agonista, a AngII (AUGER-MESSIER et al., 2003; NODA et al., 1996).

As mutações sítio-dirigidas juntamente com estudos de dinâmica molecular também permitiram mapear alguns resíduos importantes para ativação das vias de sinalização canônicas e não-canônicas do receptor AT1. Por exemplo, resíduos como Asp74, o “DRY motif” (região conservada nos GPCRs, localizada na base da TM III), Tyr215, Asn294 são resíduos e regiões essenciais para ativação de proteína G. Resíduos como Ser331, Ser338 e Ser348, na região carboxi-terminal do receptor são sítios importantes de fosforilação por GRKS no receptor e levam a internalização via beta arrestinas (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014). Já no estudo de Chaki e colaboradores (1994), foi possível ver que mutações nos aminoácidos polares dos segundo e terceiro ICs não afetaram o processo de internalização, enquanto o acoplamento da proteína G foi prejudicado. Os autores concluíram que os dois ICs não são necessários para a internalização do receptor.

Estes exemplos ilustram a importância de mutações sítio-dirigidas para desvendar a interação de agonistas e antagonistas com o receptor e podem auxiliar na descoberta dos aminoácidos que são críticos para promover tipos diferentes de rearranjos conformacionais que conduzem à ativação e transdução de sinal (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014).

### **1.5 Ocorrência de mutações em GPCRs em humanos**

Anomalias em GPCRs causadas por polimorfismos estão associadas a muitos fenótipos e predisposições a doenças. São descritos mais de 600 tipos

de mutações que inativam e quase 100 que superativam os GPCRs e estão relacionados com mais de 30 tipos de doenças humanas diferentes (SCHONEBERG et al., 2004; ZALEWSKA; SIARA; SAJEWICZ, 2014). Como exemplos de mutações naturais em GPCRs podemos citar as mutações no receptor de rodopsina relacionadas a doenças como retinite pigmentosa, nos receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos associadas a predisposições para doenças cardiovasculares e no receptor de vasopressina do tipo 2 relacionadas com diabetes insípida nefrogênica ou síndrome nefrogênica de antidiurese inadequada.

### **1.6 Mutações A244S e I103T-A244S encontradas no receptor AT1 de pacientes com fibrilação atrial**

Existem polimorfismos já identificados no gene do receptor AT1 humano, em particular podemos citar a mutação A1166C que está localizada na região 3' não traduzida, importante região regulatória, e vem sendo correlacionada com algumas patologias como: predisposição a doenças cardíacas, diabetes mellitus, câncer de mama, porém os estudos ainda não são conclusivos (CHEN, F. et al., 2015; DE GASPARO et al., 2000a; LIU et al., 2015; YANG; ZHOU, 2015). Outras mutações identificadas foram A244S e A244S-I103T, resíduos altamente conservados em mamíferos e aves. O estudo feito por Marott e colaboradores (2012) identificou estas mutações em paciente com fibrilação atrial e correlacionou estas alterações com predisposição para o desenvolvimento da doença.

A fibrilação atrial é caracterizada pelo rápido e descompassado batimento cardíaco chegando a 400-600 pulsos por minuto, sendo que em um indivíduo saudável fica em torno dos 60 pulsos/min e durante atividade física de 180-200 pulsos. Alguns distúrbios cardíacos predisõem à fibrilação atrial como pericardite, doença da válvula mitral, doenças cardíacas congênitas, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão, entre outras (NATTEL, 2002). Estudos recentes mostraram a relação entre o receptor AT1 e fibrilação atrial, e que alguns antagonistas deste receptor ajudaram muito no tratamento de pacientes com esta doença, principalmente em pacientes com o diagnóstico de hipertensão. (ANGELI; REBOLDI; VERDECCHIA, 2014; MANOLIS; KALLISTRATOS; POULIMENOS, 2012; MANOLIS; ROSEI; et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o efeito das mutações supracitadas, encontradas em pacientes com fibrilação atrial, na funcionalidade do receptor AT1 humano (i.e. A244S, I103T e I103T-A244S), avaliando diferentes perfis de sinalização celular em comparação com o receptor selvagem.

*Objetivos*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi construir receptores mutantes de AT1 humano (I103T, A244S e o duplo mutante I103T-A244S) e investigar a sinalização celular desempenhada por eles em comparação com o receptor selvagem.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Introdução de mutações na sequência do receptor AT1 humano utilizando a técnica de mutação sítio-dirigida;
- Estimar a afinidade dos mutantes pela AngII ;
- Estudar a resposta funcional dos mutantes na mobilização de  $Ca^{2+}$  quando estimulados com AngII e na presença de Losartan, antagonista do receptor AT1;
- Estudar ativação de proteína G após estímulo com AngII e na presença de Losartan;
- Estudar a funcionalidade dos mutantes na cinética de fosforilação de ERK1/2 após estímulo com AngII e na presença de Losartan;

# *Materiais e Métodos*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Identificação das mutações**

Foi realizada uma busca na literatura por variantes do receptor AT1 de humanos que ainda não tinham sido caracterizados funcionalmente. Foram identificadas duas mutações que haviam sido correlacionados com predisposição a fibrilação atrial em pacientes do sexo masculino. : A244S e a dupla mutação I103T-A244S. Foram construídos estes mutantes, assim como o I103T para complementação do estudo.

#### **3.2 Mutações sítio-dirigidas**

Para a obtenção dos mutantes, desenhamos os oligonucleotídeos para as cadeias complementares contendo a mutação desejada da região codificadora. Na tabela 1 pode-se encontrar os oligonucleotídeos senso (F) e anti-senso (R). Nesta tabela, a região em vermelho corresponde ao códon que foi alterado. Para a reação de PCR utilizamos um volume total de reação de 20  $\mu$ L. A reação continha 20 ng de DNA molde (AT1-humano clonado no vetor PCDNA3), 0,5  $\mu$ M de oligonucleotídeo (F) e 0,5  $\mu$ M de oligonucleotídeo (R), PCR Mix contendo DNA Polimerase de alta fidelidade e dNTPs a 0,5 mM (Thermo Scientific Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix) e água para completar o volume final desejado.

**Tabela 1-** Sequência de oligonucleotídeos utilizados para as mutações sítio-dirigidas.

Nome	Mutação	Sequências dos Oligonucleotídeos	Códon Original
CN#231	I103T	F: GGCAATTACCTATGTAAG <b>ACT</b> GCTTCAGCCAGCGT	<b>ATT</b>
CN#232	I103T	R: ACGCTGGCTGAAGC <b>AGT</b> CCTTACATAGGTAATTG	
CN#233	A244S	F: TTTAAGATAATTATG <b>TCA</b> ATTGTGCTTTTCTTT	<b>GCA</b>
CN#260	A244S	R: AAGCACAAT <b>TGA</b> CATAATTATCTTAAAAATATCATCATT	

O duplo mutante I103T-A244S foi construído a partir do mutante I103T com os oligonucleotídeos usados para fazer a mutação do A244S.

A reação de PCR iniciou-se com a desnaturação do DNA molde a 98°C por 10 segundos. Em seguida a temperatura de anelamento utilizada foi de 52°C por 5 segundos e a temperatura de polimerização foi de 72°C por 3 min. Foram realizados um total de 20 ciclos e um passo extra de 72°C por 10 min. O produto de PCR foi tratado com 0,2 µL de DpnI (10 U/µL) (Invitrogen) deixado por 18 horas a 37°C. Esta enzima é específica para DNA metilados, e portanto apenas o DNA molde é degradado (Figura 3).

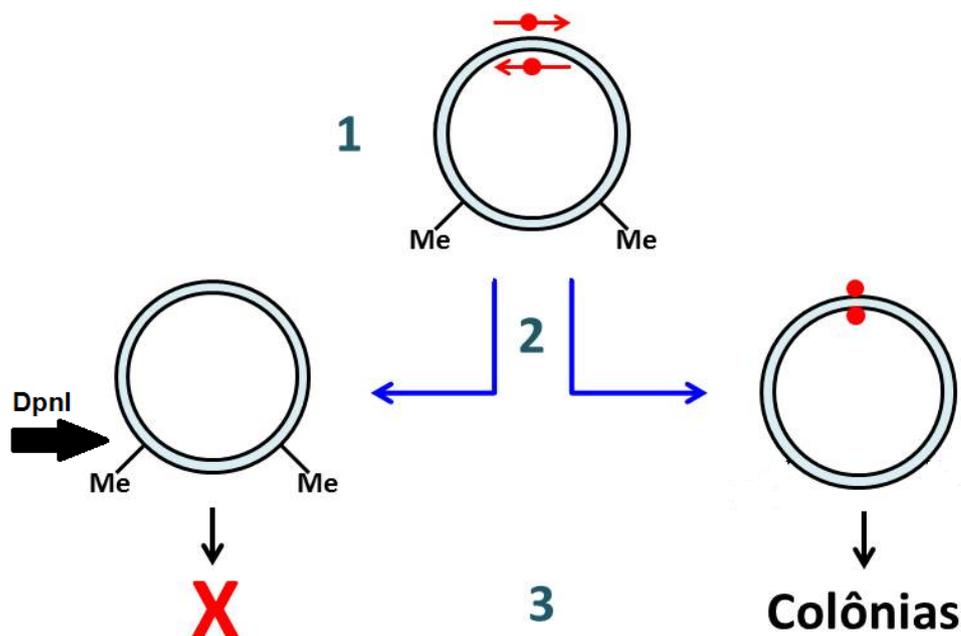
### 3.3 Transformação bacteriana

Para a transformação bacteriana foram usados 5 µL do produto de PCR tratado com DpnI para transformar 50 µL de bactérias competentes por choque térmico. As bactérias foram colocadas em um microtubo de 1,5 mL no gelo junto

com o produto de PCR por 30 min. Logo após, foram colocadas no banho térmico a 42°C por 2 min e posteriormente colocadas no gelo novamente. Foram adicionados 400 µL meio LB e crescidas em agitação por uma hora a 37°C. As bactérias competentes transformadas com os vetores de interesse foram semeadas em placas contendo 10 mL de meio Agar e 30 µg/mL do antibiótico ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 horas.

### **3.4 Mini preparação plasmidial**

Algumas colônias de bactérias transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 30 µg/mL de Ampicilina e incubadas a 37°C sob agitação constante de 300 rpm durante 16 horas. 1,4 mL de cada suspensão foram utilizados para mini-preparação de DNA plasmidial, utilizando o “Gene JET Plasmid Mini Prep Kit” (Thermo Scientific). Para confirmar a inserção da mutação no receptor, as amostras foram enviadas para sequenciamento automático. O plasmídeo apresentando a mutação desejada foi amplificado e purificado utilizando-se o “QIAGEN PLASMID Midi Kit “.



**Figura 3:** Etapas para a realização das mutações

1. Plasmídeos contendo o gene de interesse e síntese dos oligonucleotídeos mutagênicos.
2. Cópia do DNA com Mix PCR (2x) (Thermo Scientific) para a incorporação da mutação.
3. Digestão com a enzima DpnI e transformação de bactérias competentes.

### 3.5 Cultura de células e transfecção de células HEK293T

Para os estudos propostos neste projeto foi utilizada a linhagem de células HEK293T (“Human embryonic kidney”), largamente descrita na literatura para estes tipos de estudo. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µM, em um ambiente umidificado com 5% de CO<sub>2</sub>.

Um dia antes da transfecção,  $6 \times 10^6$  células foram semeadas em placas de Petri de 100mm. As transfecções transientes foram realizadas utilizando Polietilenoimina 25KDa (PEI) como agente transfectante (HAMDAN et al., 2007). Dois dias depois da transfecção as células foram utilizadas para os ensaios posteriores.

### **3.6 Ensaio de “binding” com células inteiras**

Os ensaios de “binding” nas células HEK293T foram realizados 48 horas após a transfecção com o receptor AT1 selvagem e com os mutantes I103T, A244S e I103T-A244S. 24 horas após a transfecção, as células foram transferidas para placas de 24 poços, na quantidade de  $3 \times 10^5$  células por poço. As placas foram previamente tratadas com uma solução de poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS), e lavadas com PBS, antes de receberem as células. Após adição das células em meio DMEM suplementado, as placas foram incubadas na estufa até o dia seguinte, e imediatamente antes de ser iniciado o ensaio de “binding” foram lavadas brevemente com tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7,4, NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, 0,1% albumina de soro bovino). Os experimentos de “binding” foram realizados em tampão de “binding” gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7,4, contendo MgCl<sub>2</sub> 5mM, albumina de soro bovino 0,1% (p/v), e bacitracina (Sigma) numa concentração final de 100 µg/mL) e iniciados com a adição do ligante marcado (<sup>125</sup>I-AngII 50000cpm/poço) na presença de diferentes concentrações de ligante frio (AngII), em um volume final de reação de 525µL. Após a adição do ligante marcado (diluído no tampão de “binding”), as placas

foram deixadas por pelo menos 16 horas a 4°C. Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com tampão de lavagem gelado e foi adicionado em cada poço 200µL de tampão de lise (ureia 48%, detergente NONIDET P-40 2%, preparado em ácido acético 3M), para subsequente contagem radioativa em contador  $\gamma$  (Packard Cobra II Gamma Counter). Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima de AngII radioativa, e através de cálculos de regressão não-linear realizados com o software GraphPad Prism foram calculados os valores de IC<sub>50</sub>.

### **3.7 Ensaios de mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Vinte e quatro horas após a transfecção, as células HEK293T transfectadas com o receptor AT<sub>1</sub> selvagem ou suas versões mutantes foram semeadas em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente (ViewPlate-96, PerkinElmer), pré-tratadas com poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS). A quantidade de célula cultivada na placa foi de  $5 \times 10^4$  células por poço em 50µL de meio DMEM sem fenol suplementado com 10% de SFB e estreptomicina/penicilina. Quarenta e oito horas após a transfecção as células foram incubadas por 1 hora a 37°C com 50µL do indicador fluorescente (FLIPR<sup>®</sup>, FLIPR Calcium 5 Assay Kit, Molecular Devices) com probenecida (Sigma). A probenecida é um inibidor do transportador de ânions orgânicos dependentes de ATP e foi utilizado para inibir a extrusão do indicador fluorescente. Em seguida, as placas foram inseridas no leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) e iniciou-se a mensuração de fluorescência após a excitação a 485nm

e emissão a 525nm. As medidas foram feitas durante 90 segundos (uma medida a cada 2,0 segundos) e 25 $\mu$ L do agonista em concentrações crescentes foram injetados automaticamente pelo equipamento no tempo de 16 segundos. Alguns experimentos foram realizados em presença de Losartan na concentração de 10<sup>-5</sup>M incubados 30 min, durante a incubação com o indicador fluorescente, FLIPR. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta utilizando-se os valores de área sob a curva da resposta utilizando-se o programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

### **3.8 Análise da ativação de proteína G<sub>q</sub> através de Transferência de Energia de Ressonância de Bioluminescência (BRET)**

A ativação da proteína G<sub>q</sub> pelos receptores selvagem e os diferentes mutantes foi avaliada em células HEK293T cotransfectadas com G<sub>αq</sub>-RlucII, G<sub>β1</sub>, G<sub>γ1</sub>-GFP10 e receptor AT<sub>1</sub> para análise de BRET<sup>2</sup>. Dois dias depois da transfecção, as células foram lavadas e ressuspensas em 6mL de PBS em temperatura ambiente. Em seguida, 80 $\mu$ L da suspensão foram distribuídos por poço em placas brancas de 96 poços (Optiplate; PerkinElmer) e tratados com diferentes concentrações de AngII na presença ou ausência de Losartan na concentração de 10<sup>-5</sup>M incubado por 30 min antes da ativação. Também foi realizado o tratamento da célula apenas com Losartan 10<sup>-5</sup>M sem ativação posterior com AngII. A coelenterazina 400A foi utilizada como substrato da luciferase gerando luz com pico de emissão máximo em 400nm. As medidas de BRET foram realizadas pelo leitor de placas *VICTOR X Light Luminescence*

(PerkinElmer). Os sinais foram calculados pela razão da intensidade da luz emitida pelo acceptor (GFP10) pela intensidade da luz emitida pelo doador (RlucII). Os valores foram corrigidos através da subtração dos sinais de BRET detectados quando somente RlucII foi expressa. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta e o  $EC_{50}$  de foi calculado a partir de regressão não-linear pelo programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

### **3.9 Ensaios de fosforilação de ERK1/2**

Para realizar o ensaio de fosforilação de ERK1/2, 24 horas após a transfecção, células HEK293T contendo receptores selvagem ou mutantes foram semeadas em placas de 6 poços ( $3 \times 10^5$  células por poço) previamente tratadas com poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS) e crescidas em DMEM suplementado com SFB e estreptomicina/penicilina. Para o ensaio de ativação de ERK, as células foram privadas de SFB aproximadamente por 16 horas. O ensaio foi realizado 48 horas após a transfecção. No início do experimento, o meio de cultura foi aspirado e foram então adicionados 800  $\mu$ L de DMEM sem SFB em cada poço. Em seguida, foram realizados os estímulos com 800  $\mu$ L de DMEM sem SFB contendo AngII no dobro da concentração final nos tempos de 2, 5, 10 e 20 e 30 minutos a 37°C. No poço controle (ausência de estímulo) foram adicionados 800  $\mu$ L de DMEM sem SFB e sem AngII. A concentração final de AngII utilizada para ativação foi de 100nM. Após a incubação com o agonista, as placas foram imediatamente colocadas em gelo. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 60 $\mu$ L de tampão de lise gelado (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, NaCl

150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, SDS 0.1%, Nonidet P-40 1%) acrescido do coquetel de inibidores de protease (Sigma fast<sup>TM</sup> Protease Inhibitor), e de inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio 1mM e fluoreto de sódio 10mM). O lisado celular foi recuperado, homogeneizado por 30 minutos a 4°C e centrifugado por 15min, a 4°C, a 13.000rpm. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford e 40 µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e foi realizado “western blotting” utilizando anticorpos contra ERK total (tERK, Santa Cruz) na diluição de 1:2000 e ERK fosforilada (pERK, Santa Cruz) na diluição de 1:1000. As bandas foram reveladas utilizando o kit ECL (Santa Cruz) e o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. Alguns ensaios foram realizados com 10<sup>-5</sup>M de Losartan pré-incubados por 30 min antes da ativação com AngII 100 nM. Os valores densitométricos correspondentes às bandas de pERK foram normalizados em relação à tERK e, em seguida, os valores da razão (pERK/tERK) foram normalizados em relação ao controle e plotados utilizando-se o programa Graph-Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA).

### **3.10 Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (epm) de 3, 4 ou 5 experimentos. Diferenças entre valores médios foram investigados

pelo teste  $t$  de *Student* não pareado usando o programa GraphPad Prism (versão 5 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

*Resultados*

## 4-RESULTADOS

### 4.1 Mutações sítio-dirigidas

Como já mencionado anteriormente, as mutações estudadas neste trabalho foram identificadas em pacientes com fibrilação atrial. Porém estes receptores mutantes não haviam sido caracterizados bioquímica e farmacologicamente até o presente estudo. Como o receptor AT1 é descrito estar relacionado com o desenvolvimento da fibrilação atrial, é importante estudar como estes receptores mutantes se comportam funcionalmente após ativação pela AngII e quando esta ativação se dá na presença do antagonista clássico do receptor AT1, Losartan.

Conforme descrito em Materiais e Métodos, utilizamos a técnica de PCR para fazer as mutações sítio-dirigidas.

Após a confirmação do sucesso na geração das mutações, foi realizada a preparação plasmidial em maior escala e o foi dado início à caracterização funcional dos receptores mutantes comparando-os com o receptor selvagem. Abaixo as figuras 4, 5 e 6 apresentam os alinhamentos dos resultados obtidos por sequenciamento com a sequência de nucleotídeos do receptor selvagem, mostrando as bases mutadas levando à alteração de um determinado códon.

## I103T



Figura 4: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do receptor AT1 selvagem com o mutante I103T após sequenciamento. A mudança do códon ATT para ACT gerou a troca do resíduo de aminoácido isoleucina para o de treonina.

## A244S

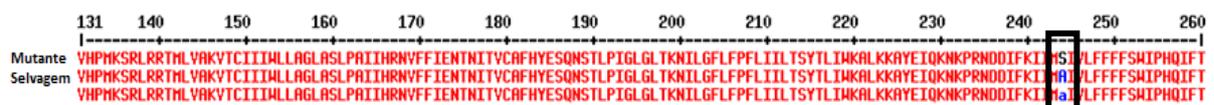


Figura 5: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do receptor AT1 selvagem com o mutante A244S após sequenciamento. A mudança do códon GCA para TCA gerou a troca do resíduo de aminoácido alanina para o de serina.

## I103T-A244S

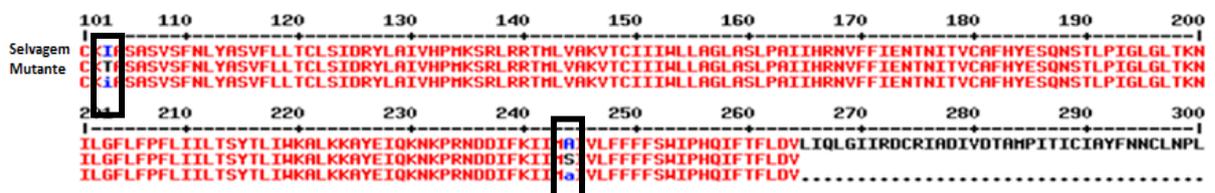


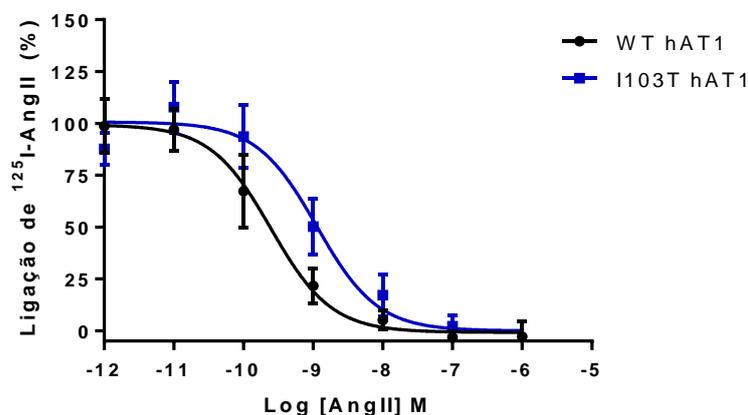
Figura 6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do receptor AT1 selvagem com o mutante A244S-I103T após sequenciamento. Dupla mutação no receptor- troca dos códons ATT para ACT e GCA para TCA geraram as seguintes mudanças de resíduos de aminoácidos: isoleucina para treonina e alanina para serina respectivamente.

## **4.2 Comparação funcional entre receptores AT1 selvagem e mutante I103T**

### **4.2.1 Ensaios de “Binding” com células inteiras**

O ensaio de “Binding” foi feito com o intuito de avaliar a afinidade dos receptores selvagem e mutantes pela AngII.

Os ensaios foram feitos com células HEK293T inteiras e transfectadas transientemente com o plasmídeo codificando cada receptor. Iniciou-se os ensaios 48 horas após a transfecção, período em que a expressão do receptor AT1 é máxima (dados anteriores obtidos no laboratório). As concentrações de AngII não marcada variaram de  $10^{-6}$ M a  $10^{-12}$ M. Foram feitos 4 experimentos independentes com cada ponto em duplicata, e os valores estão na tabela 2. Os gráficos foram normalizados como porcentagem (Fig.7). A principal observação é que o receptor mutante levou à menor afinidade do agonista, sugerindo que esta mutação, em adição a A244S, leve a uma maior expressão de receptores para compensar essa menor afinidade à AngII,



**Fig 7: Ensaio de “Binding” para o receptor WT e mutante I103T:** Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima de AngII radioativa. O radioligante utilizado foi  $^{125}\text{I}$ -AngII. N=4 experimentos independentes.

**Tabela 2-** Ensaio de “Binding” realizados em células HEK 293T expressando o receptor selvagem ou o receptor mutante I103T

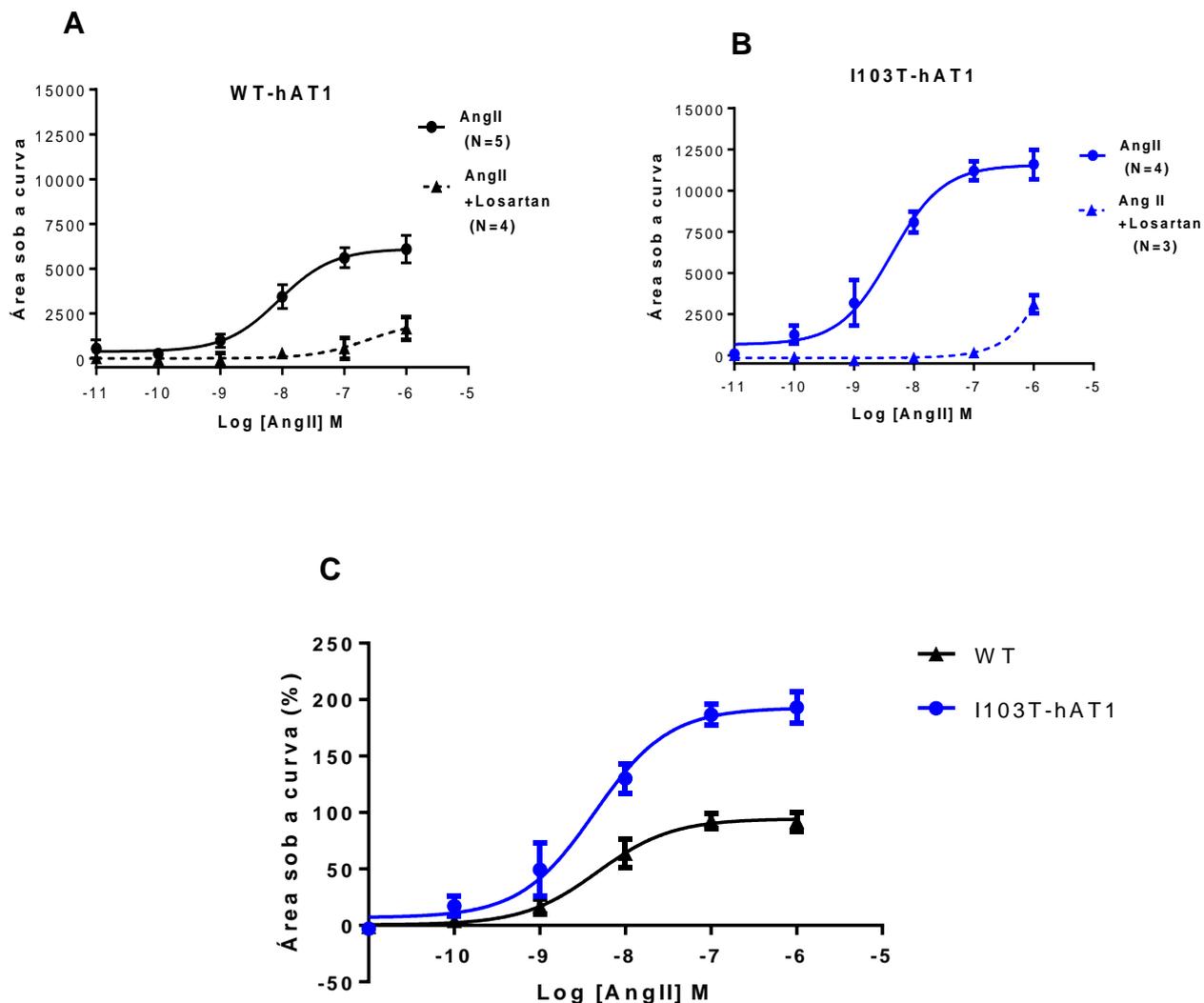
Receptor	$\text{pIC}_{50} \pm \text{E.P.M}$	$\text{IC}_{50}$ (nM)	$\text{pKd} \pm \text{E.P.M}$	Bmax (Média)	$F_{\text{mut}}$
WT-hAT1	9,67 ( $\pm 0,088$ )	0,24	9,57 ( $\pm 0,26$ )	15602	1,0
I103T-hAT1	8,98 ( $\pm 0,096$ )**	1,12	9,18 ( $\pm 0,15$ )	79077,2	4,6

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados através de regressão não linear com o programa GraphPad e são apresentados como média. Os valores de  $\text{pIC}_{50}$  e de  $\text{pKd}$  são apresentados como média e  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). O  $F_{\text{mut}}$  corresponde ao fator de mudança causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $\text{IC}_{50}$  do mutante sobre o selvagem. Os asteriscos representam diferenças significativas do valor de  $\text{IC}_{50}$  do mutante em relação ao do selvagem (teste t não pareado, \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.1.2 Ensaaios de Mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular

A via clássica de ativação do receptor AT1 é a ativação da proteína Gq que inclui ativação de PLC e aumento dos níveis de IP3 e cálcio intracelular. Foram feitos ensaios para investigar a capacidade do receptor mutante de mobilizar cálcio intracelular quando ativado com agonista endógeno AngII, na presença e ausência do antagonista, Losartan. Os ensaios com o receptor mutante foram feitos em células HEK 293T, em paralelo com o receptor selvagem, em ambos os casos expressando os receptores transientemente. A concentração de AngII variou de 10<sup>-6</sup>M a 10<sup>-11</sup>M, e do antagonista foi 10<sup>-5</sup>M. Cada ponto foi realizado em triplicata e foram feitos 3 ou mais experimentos de forma independente. A eficiência máxima foi apresentada de forma normalizada como porcentagem, e de forma comparativa entre o receptor selvagem e o receptor mutante I103T.

Na figura 8A e 8B são apresentadas as curvas dose-resposta de mobilização de cálcio intracelular para os dois receptores quando ativados por AngII. O receptor mutante apresentou maior eficiência em comparação com o receptor selvagem, mas não apresentou alteração de potência. Este dado sugere que o aumento de cálcio intracelular possa ser um indício que este mutante esteja relacionado com desenvolvimento da fibrilação atrial em pacientes que expressam a variante I103T-A244S-AT1. Em relação ao efeito do antagonista de AT1 sobre os receptores selvagem e mutante, ambos tiveram suas respostas drasticamente diminuídas, sugerindo que a eficácia do tratamento de pacientes que possuam fibrilação atrial e com o quadro de hipertensão com o bloqueador do receptor AT1 não seja comprometida.



**Figura 8: Ensaio de Mobilização de Cálcio intracelular para o receptor WT e mutante I103T: A e B:** Curva de concentração dose-resposta calculada através da área sob a curva induzida por AngII (linha contínua) e o mesmo cálculo foi feito para a outra curva (linha pontilhada) induzida por AngII previamente incubada com Losartan. **C:** Gráfico comparativo entre WT (preto) e I103T (azul) normalizado como porcentagem da resposta máxima induzida por Ang II no receptor WT.

A tabela 3 representa de forma resumida todos os valores obtidos nestes experimentos para os dois receptores.

**Tabela 3-** Potência ( $EC_{50}$ ), resposta máxima  $E_{max}$  (%) e  $F_{mut}$

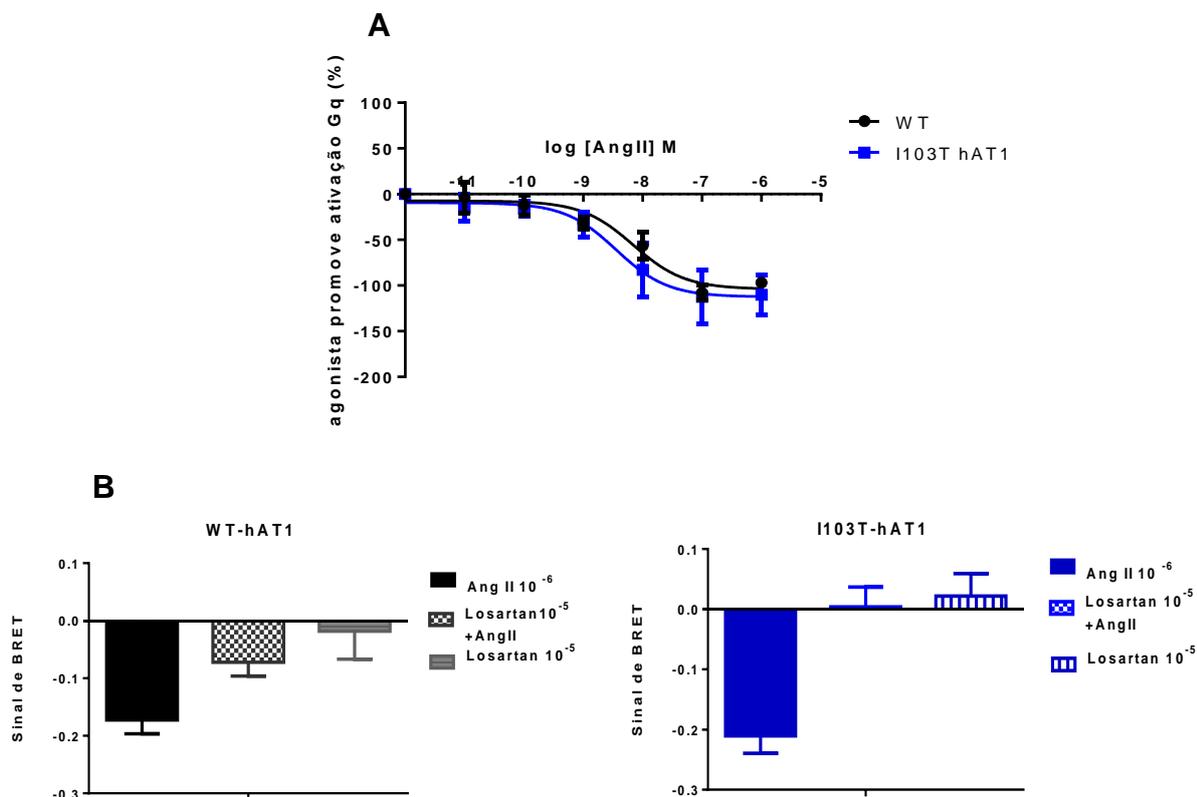
Receptor	$pEC_{50} \pm E.P.M$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}(\%)$	$F_{mut}$
WT-hAT1	8,31 ( $\pm 0,19$ )	8,82	100	1,0
I103T-hAT1	8,41 ( $\pm 0,31$ )	5,39	193,9	0,61

Os valores de  $pEC_{50}$  são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A média dos  $EC_{50}$  foi apresentado em nM. A resposta máxima ( $E_{max}$ ) normalizada como porcentagem da resposta máxima do receptor selvagem e do mutante em relação ao selvagem. O  $F_{mut}$  corresponde ao fator de mudança causados pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $EC_{50}$  do mutante sobre o selvagem.

#### 4.2.3 Análise da ativação de Gq por BRET

O ensaio de BRET foi realizado para quantificar o nível de ativação de proteína Gq após o estímulo pelo agonista AngII, uma vez que observamos um aumento na liberação de cálcio intracelular promovido pelo mutante I103T-AT1, mostrado na Figura 8B, e é descrito que o receptor AT1 pode levar ao influxo extracelular de cálcio por induzir da abertura de canais de cálcio na membrana plasmática (MAROTT et al., 2013). A curva dose resposta foi feita com AngII em concentrações que variaram de  $10^{-6}M$  a  $10^{-11}M$ , na presença e ausência de Losartan a  $10^{-5}M$ , e o BRET foi lido após 5 minutos de estímulo. Cada ponto foi realizado em duplicata e foram feitos 3 experimentos de forma independente. A ativação de proteína Gq no receptor mutante apresentou o mesmo perfil da ativação promovida pelo receptor selvagem, e não houve diferença estatística considerável entre os valores de  $IC_{50}$  (Fig 9A), sugerindo que a maior

mobilização de cálcio induzida pelo mutante I103T-AT1 seja devido a algum fator cascata abaixo de Gq, ou que ele induza uma maior abertura de canais de cálcio da membrana. De toda maneira, o manejo de cálcio intracelular é afetado diretamente por esta mutação. O comportamento dos dois receptores frente a presença do antagonista de AT1 nas duas situações descritas acima, foi bem semelhantes (Fig 9B).



**Figura 9: A: Ensaio de “BRET” Ativação de proteína Gq nos receptores WT e I103T:** Curvas de concentração dose-resposta para ativação de proteína Gq em presença de Ang II. Os valores foram normalizados em relação a ativação máxima do receptor selvagem. **B:** Ação do Losartan nos receptores WT (preto) e I103T (azul).

A tabela 4 descreve todos os valores obtidos nos experimentos.

**Tabela 4-** Valores de  $IC_{50}$  para ativação de proteína Gq.

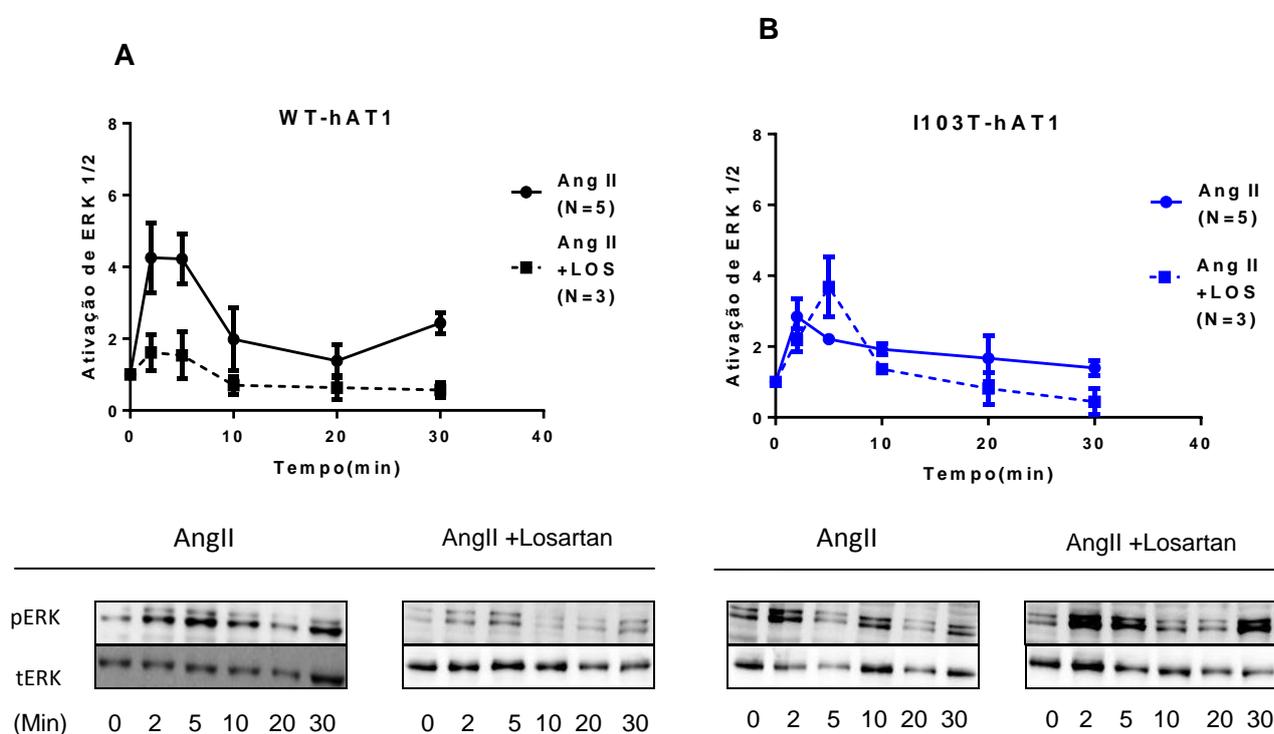
Receptor	$pIC_{50} \pm E.P.M$	$IC_{50}(nM)$	$F_{mut}$
WT-hAT1	8,16 ( $\pm 0,21$ )	6,97	1,0
I103T-hAT1	8,44 ( $\pm 0,13$ )	3,56	0,57

Os valores de  $pIC_{50}$  são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A média dos  $IC_{50}$  foram apresentados em nM. O  $F_{mut}$  corresponde ao fator de mudanças causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $IC_{50}$ .

#### 4.2.4 Ensaios de fosforilação de ERK 1/2

Os ensaios de fosforilação de ERK 1/2 foram realizados em células HEK293T expressando transientemente o receptor AT1 selvagem e em paralelo o receptor AT1 mutante I103T. As células foram estimuladas por 0 (basal), 2, 5, 10, 20, 30 minutos com AngII a 100nM, em paralelo foi feito o mesmo com placas contendo células transfectadas com os mesmos receptores que foram pré-incubadas com Losartan. Nesta pré-incubação o antagonista estava na concentração de  $10^{-5}M$ . A figura 10 mostra as imagens ilustrativas de “western blots” para tERK e para pERK e os gráficos de cinética de ativação de ERK 1/2 em relação ao basal. Apesar de o mutante apresentar ativação de ERK semelhante ao do receptor selvagem nos tempos iniciais, a intensidade de ativação foi bem inferior se comparada com o receptor selvagem (Fig 10A e 10B). Em presença do antagonista de AT1 o mutante mesmo tendo baixa ativação de ERK não teve a fosforilação inibida (Fig 10B), diferentemente do receptor selvagem que reduziu significativamente a ativação de ERK (Fig10A),

sugerindo que o antagonista clássico, Losartan, aja como um antagonista tendencioso no mutante I103T-AT1, uma vez que ele neutraliza a mobilização de cálcio mas não afeta a ativação de ERK1/2 por esse mutante. Esses dados também refletem a importância funcional do resíduo de Isoleucina 103, localizado na TM3, região importante do receptor para interação com o agonista e antagonista (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014).



**Figura 10 – Cinética de fosforilação de ERK1/2 após ativação do receptor AT1 selvagem e mutante I103T. A:** Fosforilação de ERK 1/2 com ativação do receptor selvagem (A) e mutante (I103T) com Ang II (linha contínua), e pré incubação com Losartan (linha tracejada) e posterior ativação com AngII. Dados representando a média do número de experimentos indicados no gráfico.

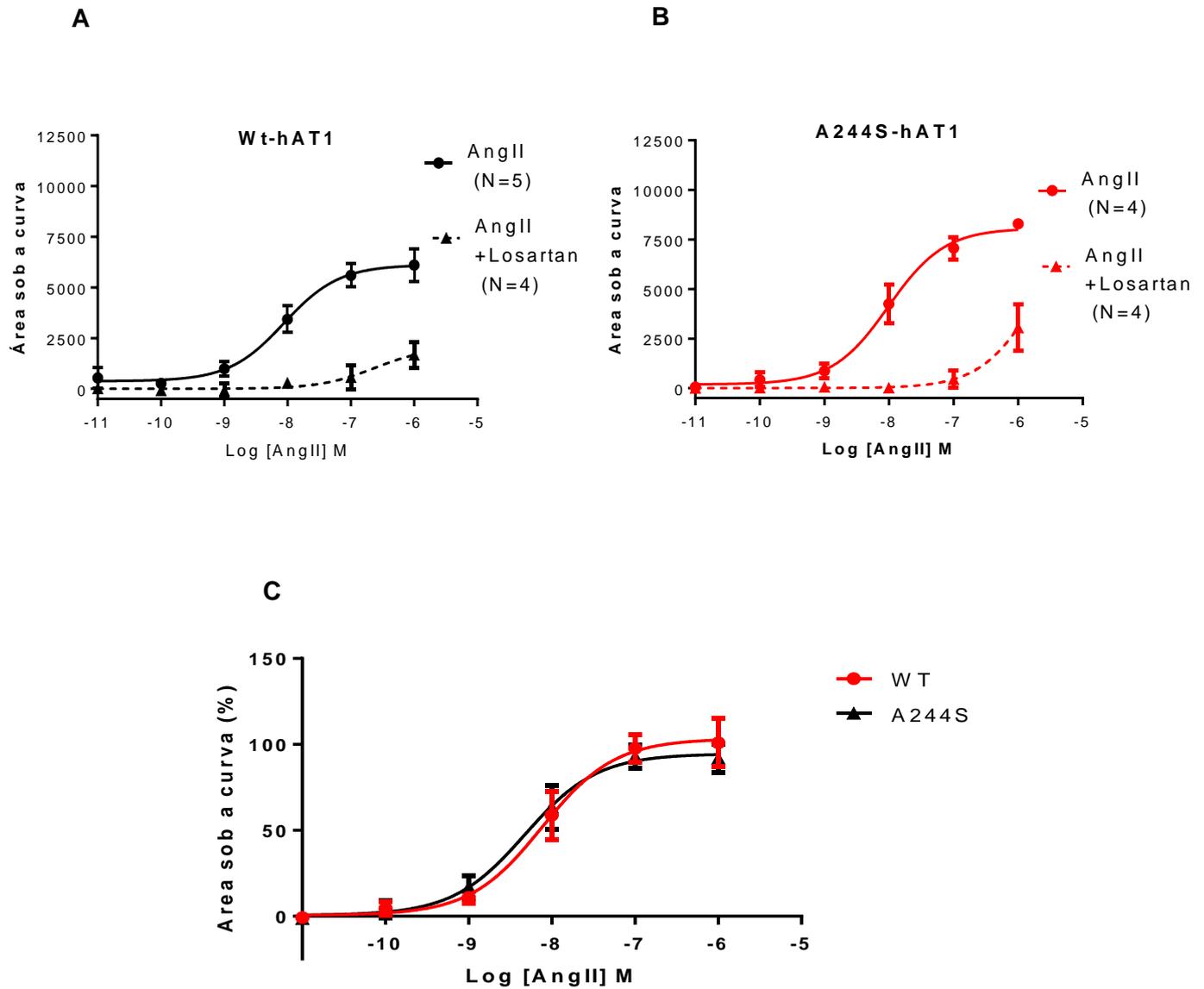
### **4.3 Comparação funcional entre receptor AT1 selvagem e o mutante A244S.**

#### **4.3.1 Ensaios de mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

Foram feitos ensaios para investigar a capacidade do receptor mutante de mobilizar cálcio intracelular quando ativado com agonista endógeno AngII. Os ensaios foram feitos nas mesmas condições estabelecidas para o mutante anterior utilizando o mesmo o indicador de fluorescência o FLIPR5.

A eficiência máxima foi apresentada de forma normalizada como porcentagem, e de forma comparativa entre receptor selvagem e receptor mutante A244S. O mutante apresentou eficiência e potência semelhante ao receptor selvagem (Fig.11C), e em presença do antagonista do receptor AT1 ambos tiveram a mobilização de cálcio diminuída drasticamente (Fig .11A e 11B). Sugerindo que para a eficácia do tratamento de pacientes que possuam esta mutação e fibrilação atrial com bloqueador do receptor AT1 não seja comprometida.

Os valores de  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{E}_{\text{max}}$  e  $\text{F}_{\text{mut}}$  para os dois receptores estão descritos na tabela 5.



**Figura 11: Ensaio de Mobilização de Cálcio intracelular para o receptor WT (selvagem) e mutante A244S: A e B:** Curva de concentração dose-resposta calculada através da área sob a curva induzida por AngII (linha contínua) e o mesmo cálculo foi feito para a outra curva (linha tracejada) induzida por AngII previamente incubada com Losartan. **C:** Gráfico comparativo entre WT (preto) e A244S (vermelho) normalizado como porcentagem da resposta máxima induzida por Ang II no receptor WT.

**Tabela 5** - Potência ( $EC_{50}$ ), resposta máxima  $E_{max}$  (%) e  $F_{mut}$ .

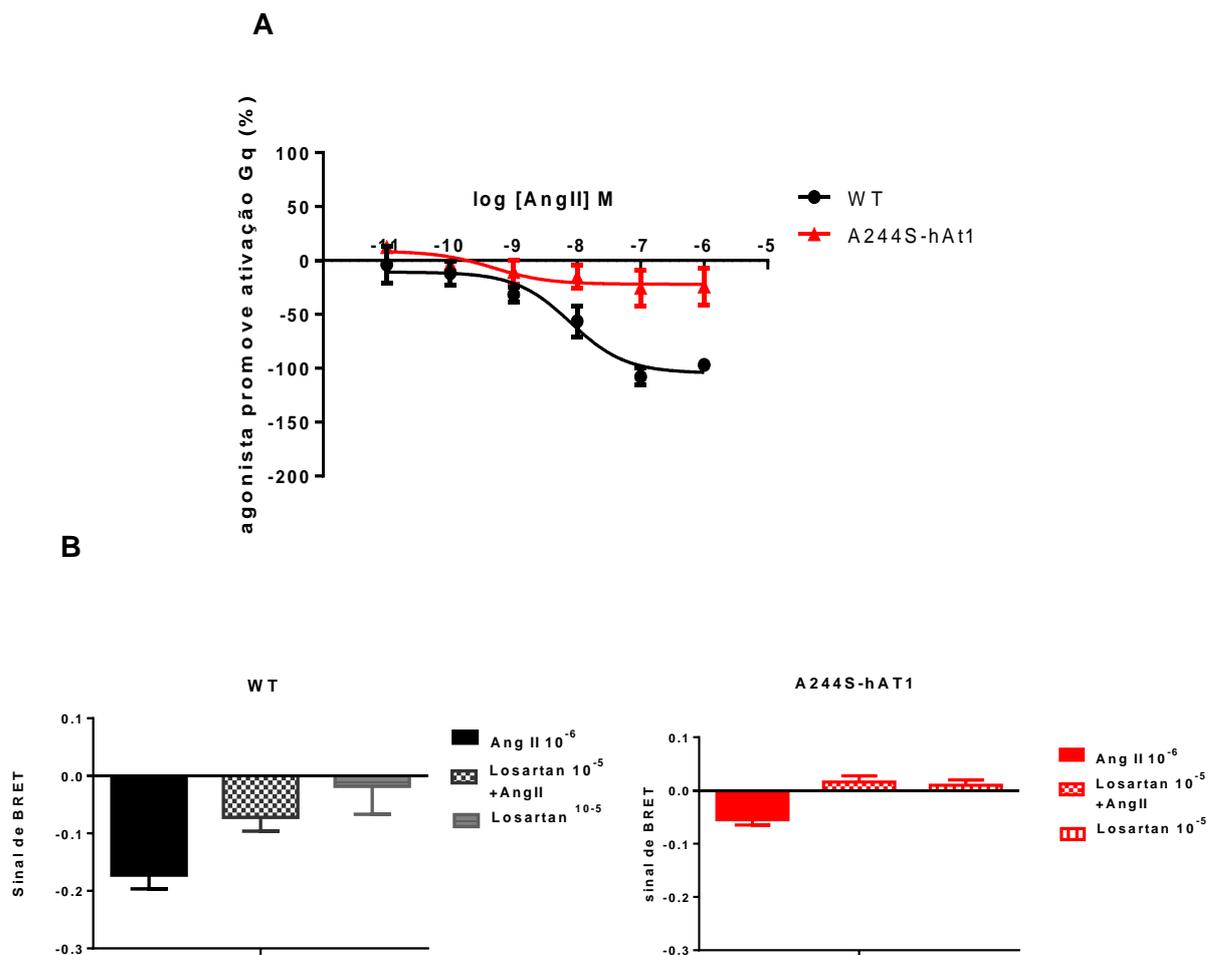
Receptor	$pEC_{50} \pm E.P.M$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	$F_{mut}$
WT-hAT1	8,31 ( $\pm 0,19$ )	8,82	100	1,0
<b>A244S-hAT1</b>	<b>8,11 (<math>\pm 0,17</math>)</b>	<b>7,6</b>	<b>94,5</b>	<b>0,86</b>

Os valores de  $pEC_{50}$  são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A média dos  $EC_{50}$  foi apresentado em nM. A resposta máxima ( $E_{max}$ ) normalizada como porcentagem da resposta máxima do receptor selvagem e do mutante em relação ao selvagem. O  $F_{mut}$  corresponde ao fator de mudança causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $EC_{50}$  do mutante sobre o selvagem.

#### 4.3.2 Análise da ativação de Gq por BRET

Os parâmetros para este experimento foram os mesmos utilizados para o mutante anterior. Cada ponto foi realizado em duplicata e foram feitos 3 experimentos de forma independente.

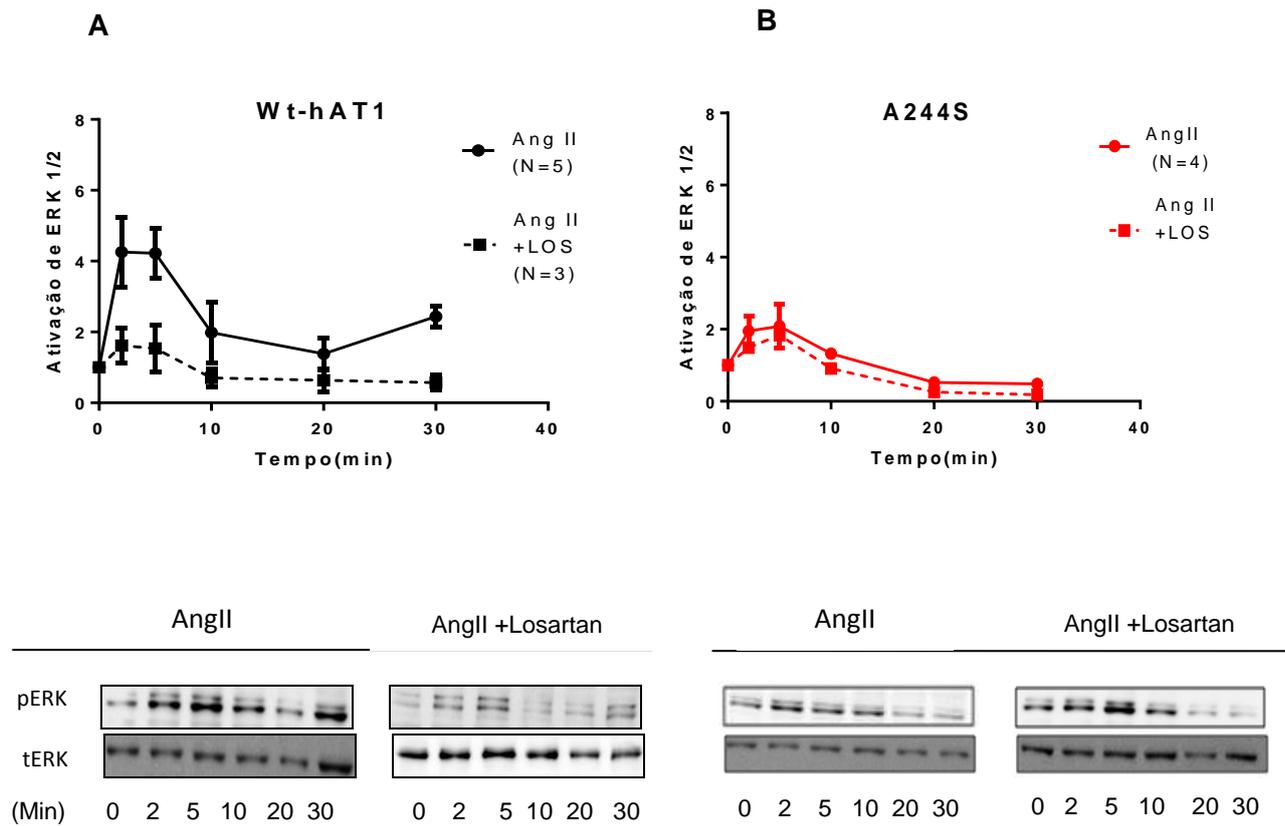
Os valores referentes ao experimento não foram descritos em tabela porque o receptor mutante não apresentou ativação de proteína Gq significativo, (Fig 12A). O comportamento dos dois receptores frente a presença do antagonista do AT1 nas duas situações descritas acima, foram bem semelhantes (Fig 12B).



**Figura 12: Ensaios de BRET Ativação de proteína Gq nos receptores WT e A244S: A:** Curvas de concentração dose-resposta para ativação de proteína Gq em presença de Ang II, normalizadas como porcentagem de ativação máxima do receptor selvagem **B:** Ação do Losartan nos receptores WT (preto) e A244S (vermelho).

### 4.3.3 Ensaios de fosforilação de ERK 1/2

Os ensaios de fosforilação de ERK 1/2 foram realizados em células HEK293T expressando transientemente o receptor AT1 selvagem e em paralelo o receptor AT1 e o mutante A244S. As células foram estimuladas por 0 (basal), 2, 5, 10, 20, 30 minutos com AngII a 100nM, em paralelo foi feito o mesmo com placas contendo células transfectadas com os mesmos receptores que foram pré-incubadas com Losartan,. Nesta pré-incubação o antagonista estava na concentração de  $10^{-5}$ M. A figura 13 mostra as imagens ilustrativas de “western blots” para tERK e para pERK e os gráficos de cinética de ativação de ERK 1/2 em relação ao basal. Apesar de o mutante apresentar ativação de ERK semelhante ao do receptor selvagem nos tempos iniciais a intensidade de ativação foi bem inferior se comparada com o receptor selvagem igual ao mutante anterior. E em presença do inibidor de AT1 o mutante mesmo tendo baixa ativação de ERK também apresentou baixa inibição de fosforilação (Fig 13B), diferentemente do receptor selvagem que reduziu significativamente a ativação de ERK (Fig 13 A).



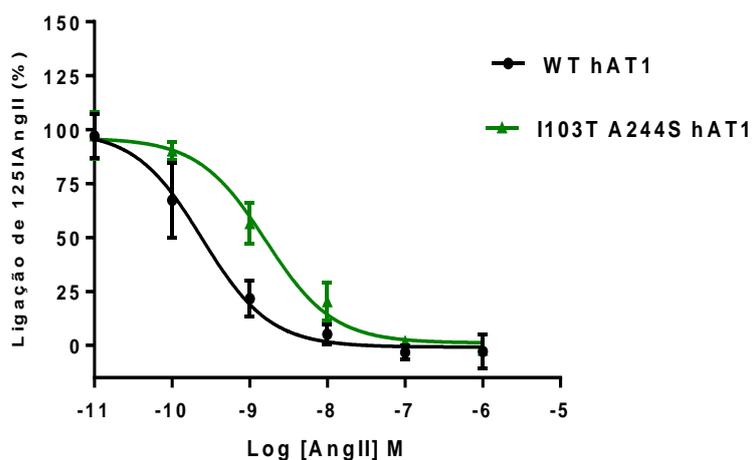
**Figura 13 – Cinética de fosforilação de ERK1/2 após ativação do receptor AT1 selvagem e mutante A244S. A:** Fosforilação de ERK 1/2 com ativação do receptor selvagem (A) e mutante (A244S) com Ang II (linha contínua), e pré incubação com Losartan (linha tracejada) e posterior ativação com AngII. Dados representando a média do número de experimentos indicados no gráfico.

#### **4.4 Comparação funcional entre receptor AT1 selvagem e mutante I103T-A244S.**

##### **4.4.1 Ensaio de “Binding” com células inteiras**

Os ensaios de “Binding” foram feitos com os mesmos parâmetros e com o mesmo intuito descrito para o primeiro mutante e detalhados em Materiais e Métodos

Foram feitos 3 experimentos independentes para o receptor mutante e cada ponto em duplicata. Os gráficos foram normalizados como porcentagem (Fig 14). A principal observação é que o receptor com dupla mutação apresentou menor afinidade pelo agonista e maior número de receptores na membrana, sugerindo que esta mutação, leve a uma maior expressão de receptores para compensar essa menor afinidade à AngII. Dados obtidos nos experimentos descritos na tabela 6.



**Fig 14: Ensaio de “Binding” para o receptor WT (selvagem) e mutante I103T-A244S:** Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima de AngII radioativa. O radioligante utilizado foi  $^{125}\text{I}$ -AngII. N=3 experimentos independentes.

**Tabela 6-** Ensaio de “Binding” realizados em células HEK 293T expressando receptor selvagem ou receptor mutante I103T-A244S.

Receptor	$\text{pIC}_{50} \pm$ E.P.M	$\text{IC}_{50}$ (nM)	$\text{pKd} \pm$ E.P.M	Bmax (Média)	$F_{\text{mut}}$
WT-hAT1	9,67 ( $\pm 0,088$ )	0,24	9,57 ( $\pm 0,26$ )	15602	1,0
I103T-A244S	8,9 ( $\pm 0,069$ )**	1,25	8,59 ( $\pm 0,18$ )	84945	5,02

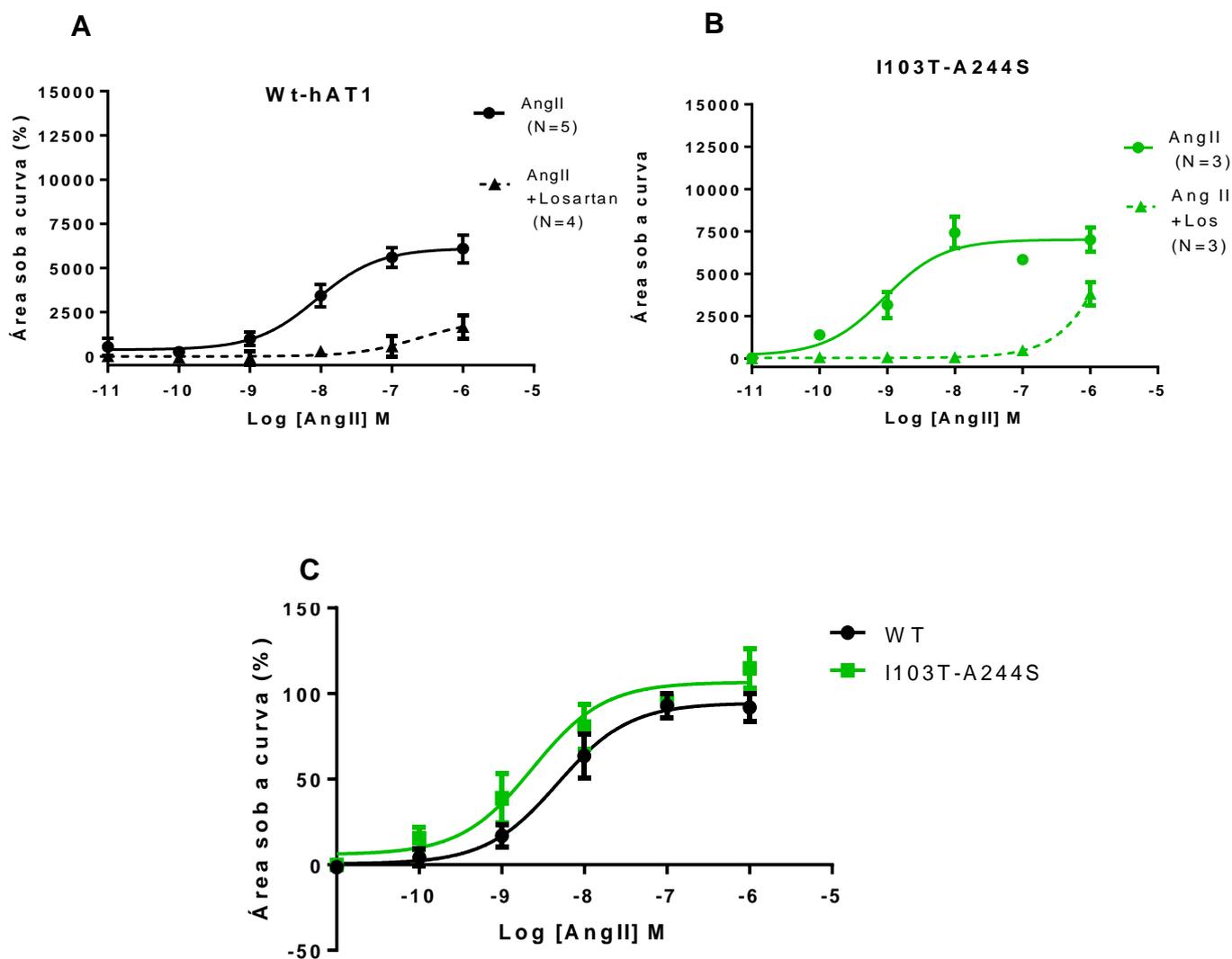
Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados através de cálculos de regressão não linear realizado com o programa GraphPad e são apresentados como média. Os valores de  $\text{pIC}_{50}$  e de  $\text{pKd}$  são apresentados como média e  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). O  $F_{\text{mut}}$  corresponde ao fator de mudanças causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $\text{IC}_{50}$ . Os asteriscos representam diferenças significativas do valor de  $\text{IC}_{50}$  do mutante em relação ao do selvagem (teste t não pareado, \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.3.2 Ensaios de mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Foram feitos ensaios para investigar a capacidade do receptor mutante de mobilizar cálcio intracelular quando ativado com agonista AngII. Os ensaios foram feitos nas mesmas condições estabelecidas para os mutantes anteriores utilizando o mesmo indicador de fluorescência, FLIPR5.

Cada ponto foi realizado em triplicata e foram feitos 3 ou mais experimentos de forma independente.

A eficiência máxima foi apresentada de forma normalizada como porcentagem, e de forma comparativa entre receptor selvagem e receptor mutante I103T-A244S. Os valores de  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{E}_{\text{max}}$  e  $\text{F}_{\text{mut}}$  para os dois receptores estão descritos na tabela 7. O receptor mutante apresentou maior potência e maior eficiência para mobilizar cálcio na presença do agonista (Fig 15C). Na presença do antagonista do receptor AT1, o mutante conseguiu mobilizar mais cálcio do que o receptor selvagem (Fig 15A e 15B).



**Figura 15: Ensaio de Mobilização de Cálcio intracelular para o receptor WT (selvagem) e mutante A244S: A e B:** Curva de concentração dose-resposta calculada através da área sob a curva induzida por AngII (linha contínua) e o mesmo cálculo foi feito para a outra curva (linha tracejada) induzida por AngII previamente incubada com Losartan. **C:** Gráfico comparativo entre WT (preto) e I103T-A244S (verde) normalizado como porcentagem da resposta máxima induzida por Ang II no receptor WT (selvagem).

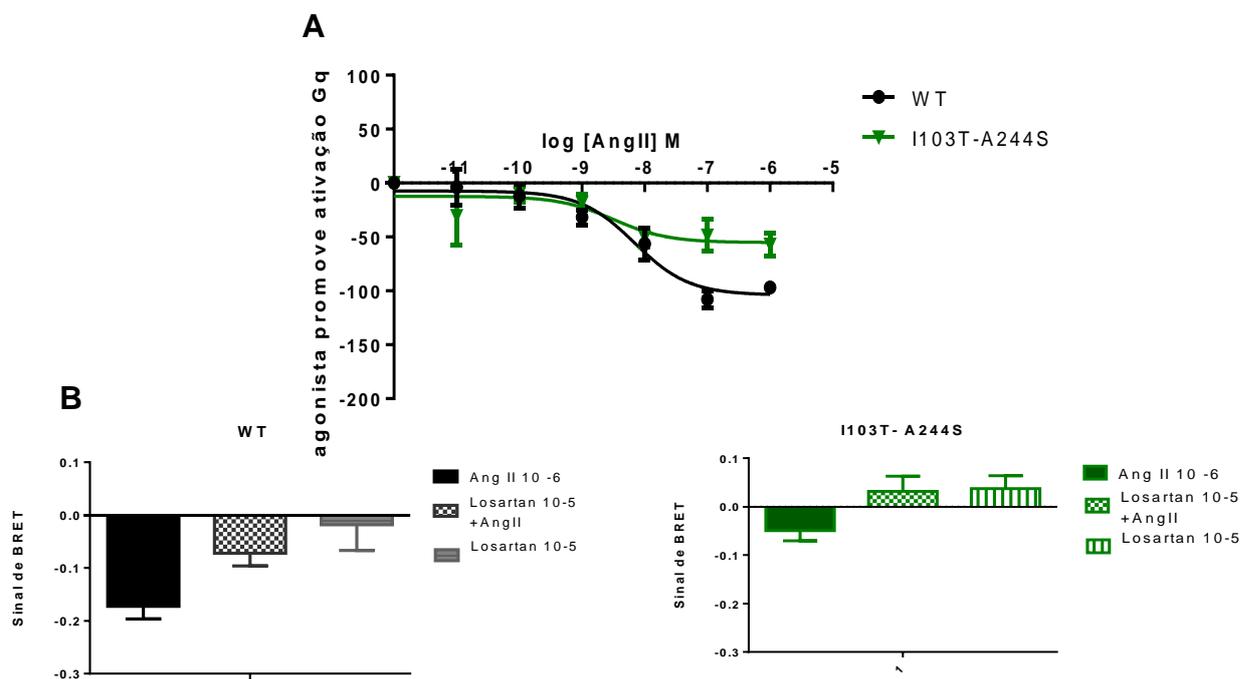
**Tabela 7-** Potência ( $EC_{50}$ ), resposta máxima  $E_{max}$  (%) e  $F_{mut}$ 

Receptor	$pEC_{50} \pm$ E.P.M	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	$F_{mut}$
WT-hAT1	8,31 ( $\pm 0,19$ )	8,82	100	1,0
I103T-A244S	9,41 ( $\pm 0,23$ )*	0,91	114,8	0,10

Os valores de  $pEC_{50}$  são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A média dos  $EC_{50}$  foi apresentado em nM. A resposta máxima ( $E_{max}$ ) normalizada como porcentagem da resposta máxima do receptor selvagem e do mutante em relação ao selvagem. O  $F_{mut}$  corresponde ao fator de mudança causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de  $EC_{50}$  do mutante sobre o selvagem. Os asteriscos representam diferenças significativas do valor de  $EC_{50}$  do mutante em relação ao do selvagem (teste t não pareado, \* $p < 0,05$ )

#### 4.4.3 Análise da ativação de Gq por BRET

Estes ensaios foram feitos dentro dos parâmetros determinados para os mutantes relatados anteriormente e descrito detalhadamente em Materiais e Métodos, o resultado da cinética é mostrado na figura 16. Os valores referentes ao experimento estão descritos na tabela 8. A dupla mutação no receptor AT1 reduziu em cerca de 50% a capacidade de ativar a proteína Gq, porém os valores de  $pIC_{50}$  não apresentaram diferença estatística significativa. E o comportamento dos dois receptores frente à presença do antagonista de AT1 foi semelhante.



**Figura 16: Ensaios de “BRET” Ativação de proteína Gq nos receptores WT e I103T- A244S:**  
**A:** Curvas de concentração dose-resposta para ativação de proteína Gq em presença de Ang II, normalizadas como porcentagem de ativação máxima do receptor selvagem **B:** Ação do Losartan nos receptores WT (preto) e I103T-A244S (verde).

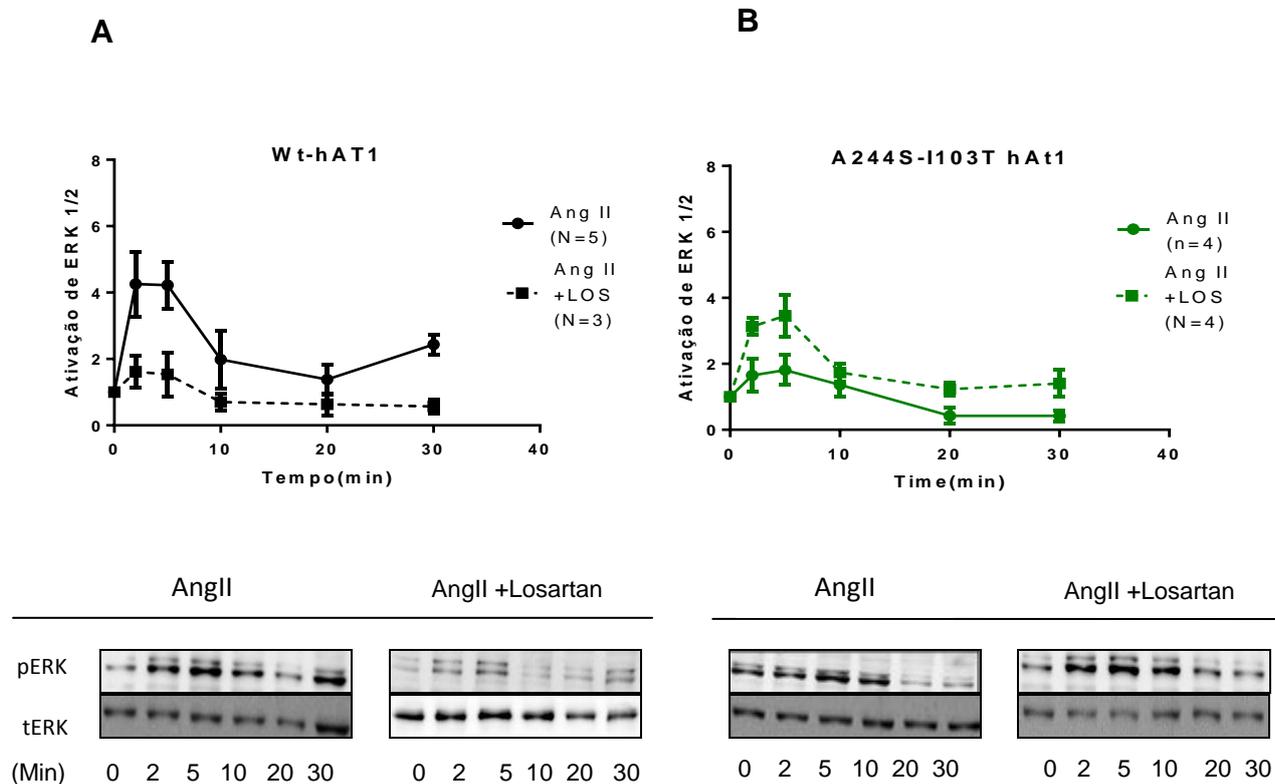
**Tabela 8-** Valores de EC50 para ativação de proteína Gq

Receptor	pIC <sub>50</sub> ± E.P.M	IC <sub>50</sub> (nM)	Fmut
WT-hAT1	8,16 (±0,21)	6,97	1,0
I103T-A244S	8,49 (±0,65)	3,17	0,45

Os valores de pIC<sub>50</sub> são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M). A média dos IC<sub>50</sub> foram apresentados em nM. O F<sub>mut</sub> corresponde ao fator de mudanças causado pela mutação nos padrões avaliados e é calculado como a razão dos valores de IC<sub>50</sub>

#### 4.4.4 Ensaios de fosforilação de ERK 1/2

Os ensaios de fosforilação de ERK 1/2 foram realizados em células HEK293T expressando transientemente o receptor AT1 selvagem e em paralelo o receptor AT1 mutante I103T-A244S. As células foram estimuladas por 0 (basal), 2, 5, 10, 20, 30 minutos com AngII a 100nM, em paralelo foi feito o mesmo com placas contendo células transfectadas com os mesmos receptores que foram pré-incubadas com Losartan,. Nesta pré-incubação o antagonista estava na concentração de  $10^{-5}$ M. A figura 10 mostra as imagens ilustrativas de “western blots” para tERK e para pERK e os gráficos de cinética de ativação de ERK 1/2 em relação ao basal. A dupla mutação no receptor gerou um comportamento inesperado, apesar da baixa ativação de ERK quando ativado apenas com AngII, na presença do antagonista e seguinte ativação com com agonista, o receptor mutante apresentou maior ativação (Fig 16 A), perfil completamente diferente do receptor selvagem que tem a ativação drasticamente reduzida em presença do antagonista.



**Figura 16 – Cinética de fosforilação de ERK1/2 após ativação do receptor AT1 selvagem e mutante I103T.** Fosforilação de ERK 1/2 com ativação do receptor selvagem (A) e mutante (I103T) com Ang II (linha contínua), e pré incubação com Losartan (linha tracejada) e posterior ativação com AngII. Dados representando a média do número de experimentos indicados no gráfico.

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

O receptor AT1 de angiotensina II é classicamente envolvido em importantes eventos fisiológicos vasculares e renais, portanto ele participa diretamente da instalação e progressão de várias enfermidades cardiovasculares como hipertensão, insuficiência cardíaca e infarto (TSAI et al., 2004). Marotti e colaboradores (2013), com base em um estudo genético com pacientes que apresentavam fibrilação atrial, mostraram evidências de que as mutações I103T-A244S e A244S no receptor AT1 estavam diretamente associadas com a predisposição ao desenvolvimento de fibrilação atrial em homens. Porém, até o momento, não foram realizados estudos complementares para caracterizar bioquimicamente ou funcionalmente estas variantes genótípicas do receptor AT1. Tendo em mãos estas informações, foram construídos, com base na sequência de nucleotídeos do receptor AT1 de humanos, os mutantes I103T-A244S e A244S que são citados no estudo como possíveis causas a predisposição à fibrilação atrial, e o mutante I103T para a complementação dos estudos.

Estas mutações estão localizadas nas TM3 (I103T) e TM6 (A244S), porções transmembranares que possuem resíduos críticos para formação do “binding pocket” (sítio de ligação do agonista), estão diretamente relacionadas com a interação de agonistas peptídicos e não peptídicos e também com antagonistas em diferentes GPCRs. Mutações pontuais na TM3 como por exemplo nos resíduos Leu102, Ser105, Val116 em outros resíduos nesta mesma região levaram à perda de afinidade do agonista. Já na TM6, além de ser importante para ligação da AngII, também é uma região crítica para a ativação

do receptor. Mutações pontuais nos resíduos Val254, His256, e Phe259 causou comprometimento da transdução de sinal sem perda notável de afinidade pela AngII (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014; DE GASPARO et al., 2000a; MARTIN et al., 2004).

Alguns estudos apontam diretamente que distúrbios no Sistema Renina-Angiotensina podem gerar doenças cardiovasculares graves (TSAI et al., 2004). Este sistema também é implicado na ocorrência de fibrilação atrial, uma doença que pode ter várias origens primárias, como por exemplo: hipertensão, sedentarismo, doenças cardíacas congênitas e insuficiência cardíaca congestiva. Esta enfermidade já foi também relacionada com mutações na enzima conversora de angiotensina (NATTEL, 2002; WANG et al., 2013). Em pacientes hipertensos, o desenvolvimento de fibrilação atrial aumenta o risco de mortalidade. Outro problema gerado pela hipertensão em pacientes com esta doença é a formação de tecido fibroso. A AngII está diretamente relacionada com a formação deste tipo de tecido agravando ainda mais a situação do paciente (LAU et al., 2012). Como a doença pode ter várias origens, o tipo de tratamento é diferenciado para cada paciente. Em alguns casos, o uso de beta bloqueadores é suficiente, em outros tem que ser terapia combinada com inibidores de canais de cálcio como verapamil. Já em situações mais graves tem que se implementar marca passos e uso de medicamentos antitrombóticos (CAMM et al., 2010). Como dito anteriormente, a hipertensão aumenta o risco de mortalidade em pessoas com fibrilação atrial. Medicamentos como inibidores da ECA ou antagonistas do AT1 são usados como opção de tratamento para esses pacientes (ANGELI et al., 2014; MANOLIS; KALLISTRATOS; et al., 2012; MANOLIS; ROSEI; et al., 2012).

Tendo em vista todas estas informações a respeito da importância do receptor AT1, e principalmente a região que estas mutações se encontram, fizemos alguns ensaios funcionais *in vitro* para analisar o comportamento destes receptores frente à ativação com o agonista endógeno e na presença do antagonista Losartan, sempre comparando com o receptor selvagem.

Para estimar a afinidade dos receptores mutantes pelo agonista foi realizado o ensaio de “binding” que mostrou que os mutantes I103T (Fig 7) e I103T-A244S (Fig 14) possuem menor afinidade pelo agonista quando comparado ao selvagem. Esta menor afinidade pode ter ocorrido pelo excesso de receptores na membrana como mostra o cálculo do Bmax (tabelas 2 e 6), já que é necessário maior quantidade de Ang II para preencher 50% dos receptores presentes na membrana. Ou também porque a mutação I103T está localizada próxima demais dos resíduos Leu102, Ala104 e Ser105, que como mencionado anteriormente são resíduos importantes para que ocorra a interação com AngII (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014).

Os ensaios de mobilização de cálcio e de BRET foram feitos para analisar a capacidade dos receptores mutantes ativarem a via clássica realizada pelo receptor AT1 selvagem quando estimulados com AngII, via Gq e subsequente aumento de cálcio intracelular, também na presença de Losartan. O mutante I103T apresentou menor afinidade pela AngII nos ensaios de “binding”, porém apresentou potência (Emax) superior ao do receptor selvagem (Fig 8). Provavelmente esta mutação de alguma forma favoreceu a ida do receptor para membrana. Apesar deste aumento significativo da capacidade de mobilização de cálcio pelo mutante, os ensaios de BRET mostraram de forma mais discreta o aumento da potência para ativação de proteína Gq (Fig 9A), o ensaio de BRET

parece ser menos sensível e provavelmente por isso não vimos maior diferença entre receptor selvagem e mutante ou pode ser que o sinal gerado pela ativação do mutante seja mais amplificado e por isso vemos maior aumento de cálcio intracelular. O Losartan conseguiu inibir tanto a mobilização de cálcio intracelular quanto o recrutamento de proteína Gq, e quando usado como possível ativador no ensaio de BRET não gerou nenhum efeito, assim como no receptor selvagem (Fig 9B).

O mutante A244S não apresenta valores de afinidade para Ang II e de Bmax alterados, o que foi corroborado pelos ensaios de mobilização de cálcio que mostraram potência e Emax bem próximos aos do receptor selvagem (Tabela 5). O ensaio de cálcio é bastante sensível, e portanto a potência ou eficiência máxima provavelmente apresentariam diferenças significativas caso o receptor mutante apresentasse afinidade muito diferente pela AngII. O ensaio de BRET não corrobora com o ensaio de mobilização de cálcio, já que este mutante não conseguiu ativar proteína Gq (Fig 12). O aumento de cálcio intracelular pode ter outras fontes, como canais de cálcio presentes na membrana celular. Este resultado também pode ser interpretado de outra forma, uma vez que a mutação pode ter induzido uma mudança conformacional no receptor e a interação com a proteína Gq pode não ter ocorrido de forma a permitir a ocorrência do BRET.

O mutante I103T-A244S apresentou menor afinidade pela AngII nos ensaios de "binding" (Fig 14). Como discutido anteriormente, é possível que a mutação na posição I103T possa influenciar positivamente a ida do receptor para membrana. A capacidade de promover aumento de cálcio intracelular foi semelhante ao receptor selvagem (Emax), porém a potência foi aproximadamente 10x maior (Tabela 7). Apesar do Emax ser semelhante e a

potência ser superior, os ensaios de BRET (Fig 15) mostraram que este mutante ativa cerca de 50% a menos a proteína Gq se comparado com a ativação promovida pelo receptor selvagem. Dessa forma, podemos sugerir que a mutação A244S está influenciando negativamente a ativação de proteína Gq e o cálcio pode estar sendo mobilizando por outras vias. Além disso, como comentado anteriormente, não podemos excluir a possibilidade de que a mutação possa induzir uma mudança conformacional no receptor que por sua vez seja prejudicial ao BRET. O losartan conseguiu inibir tanto a mobilização de cálcio intracelular quanto o recrutamento de proteína Gq, porém se comparado com o receptor selvagem a diminuição de mobilização de cálcio na presença do inibidor foi relativamente menor. O losartan quando usado como ativador no ensaio de BRET não gerou nenhuma resposta no receptor mutante ou no selvagem.

Para complementar a caracterização dos mutantes, resolvemos analisar a cascata de ativação das MAPK via fosforilação de ERK após o estímulo com AngII e na presença do antagonista Losartan. O que pudemos observar é que, apesar dos mutantes conseguirem mobilizar cálcio, ou seja responder de forma eficiente ao estímulo com agonista e ter resposta bloqueada na presença do antagonista, quando analisamos a ativação da cascata MAPK via fosforilação de ERK o comportamento dos mutantes é bastante diferente. Os mutantes I103T (Fig 10B) e A244S (Fig.13B) em presença de AngII apresentam baixa fosforilação de ERK. Quando pré-incubados com Losartan e após ativados com AngII, essa pouca ativação não é reduzida. Lembrando que o receptor I103T apresenta cerca de cinco vezes mais receptores na membrana que o selvagem, e mesmo assim a capacidade de fosforilar ERK foi bem menor. Já o duplo

mutante (I103T-A244S) apresenta comportamento mais inusitado. Quando estimulado com AngII o perfil de fosforilação é semelhante ao dos outros mutantes, bem inferior ao do receptor selvagem; mas quando pré-incubado com Losartan e subsequentemente estimulado com AngII, o perfil de fosforilação de ERK é bastante aumentado. Sabendo que a ativação de MAPK está diretamente relacionada com aumento da formação de fibrose no tecido cardíaco, é possível inferir que o tratamento de um paciente que possua esta mutação com este antagonista provavelmente levaria a um agravamento do seu quadro clínico.

Como exposto anteriormente, estudos têm mostrado que mutações em GPCRs podem alterar o tipo de sinalização e conseqüentemente a resposta celular após interação com um agonista ou antagonista (SCHONEBERG et al., 2004; SHUKLA, 2014). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com esses relatos e permitem concluir que mutações em GPCRs que são alvos de medicamentos a para o tratamento de determinadas patologias (e.g. losartan para hipertensão) podem influenciar a interação do receptor com o medicamento, levando à ineficácia deste ou até mesmo a efeitos colaterais indesejados. Podemos utilizar o duplo mutante (I103T-A244S) como exemplo. O agravamento da fibrilação atrial está diretamente envolvido com a formação de tecido fibroso no coração, que é formado principalmente pela ativação da cascata das MAPKs (NATTEL, 2002), vias de sinalização comumente ativadas pelo receptor AT1. Um paciente que possuir esta mutação e fizer tratamento para hipertensão com o Losartan terá a via das MAPKs mais ativa e conseqüentemente terá agravamento ou desenvolvimento de fibrilação atrial. Outros estudos precisam ser feitos para confirmar qual via promove esta ativação e se o losartan promove algum tipo de “antagonismo tendencioso”, tendo

a capacidade de antagonizar apenas algumas vias de sinalização desencadeadas pelo receptor AT1 mutante (no caso do duplo mutante, a via de proteína G) e permitindo a ativação de outras, possivelmente beta arrestinas.

*Conclusões*

## 6- CONCLUSÕES

1) Nossos dados mostram que os mutantes do receptor AT1 A244S, I103T, A244S-I103T apresentaram perfis de sinalização bem diferentes daqueles do receptor selvagem, como destacado abaixo.

- a. O receptor mutante I103T apresentou menor afinidade pelo agonista, maior potência para mobilizar cálcio e ativar proteína Gq, o perfil de fosforilação de ERK se mostrou semelhante ao do receptor selvagem, porém com menor eficiência. O pré-tratamento com Losartan não conseguiu bloquear a fosforilação de ERK.
- b. O receptor mutante A244S apesar de aumentar cálcio intracelular com potência e eficiência semelhante ao receptor selvagem, não conseguiu ativar proteína Gq, ou o ensaio não conseguiu mensurar esta ativação. O perfil de ativação da via de MAPK também reduzido, com baixo nível de fosforilação de ERK. O pré-tratamento com Losartan não surtiu efeito sobre a fosforilação de ERK.
- c. O duplo mutante I103T-A244S apresentou um comportamento intermediário entre os dois mutantes citados anteriormente. Este mutante apresentou menor afinidade e valor de Bmax 6 vezes superior ao do receptor selvagem, apresentou maior potência e eficiência na mobilização de cálcio intracelular. A ativação de proteína Gq foi cerca de 50% menor que a ativação

promovida pelo receptor selvagem. A ativação da via da MAPK em presença de AngII foi semelhante aos outros mutantes, de forma ineficiente. Podemos concluir que estas mutações podem promover uma conformação no receptor que não favorece a ativação das MAPKs, quando ativados por AngII. O pré-tratamento com Losartan promoveu uma resposta de fosforilação de ERK aumentada.

- 2) Interessante notar que apesar de não ser possível a correlação direta dos resultados aqui obtidos com a fibrilação atrial descrita em humanos que possuem estas mutações, nossos dados sugerem que possivelmente pacientes que possuam a dupla mutação (I103T-A244S) tenham efeitos não esperados quando tratados com Losartan, e, portanto neste caso, outros tratamentos anti-hipertensivos deveriam ser considerados.

## *Referências*

## 7- Referências

ANGELI, F.; REBOLDI, G.; VERDECCHIA, P. Hypertension, inflammation and atrial fibrillation. **Journal of hypertension**, v. 32, n. 3, p. 480-3, Mar 2014.

AUGER-MESSIER, M. et al. The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II maintains a high affinity conformation despite being uncoupled from its cognate G protein Gq/11alpha. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5277-84, Dec 2003.

BALAKUMAR, P.; JAGADEESH, G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. **Journal of molecular endocrinology**, v. 53, n. 2, p. R71-92, Oct 2014.

CAMM, A. J. et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). **Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology**, v. 12, n. 10, p. 1360-420, Oct 2010.

CHEN, F. et al. Association of angiotensin capital I, Ukrainian capital I, Ukrainian type 1 receptor (A1166C) polymorphism with breast cancer risk: An update meta-analysis. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, Jun 3 2015.

CHEN, L.; JIN, L.; ZHOU, N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 791-806, Sep 2012.

COSTA-NETO, C. M. et al. Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins. **Clinical science**, v. 126, n. 11, p. 753-74, Jun 2014.

COSTA-NETO, C. M. et al. Mutational analysis of the interaction of the N- and C-terminal ends of angiotensin II with the rat AT(1A) receptor. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 6, p. 1263-8, Jul 2000.

DAWSON, T. M. et al. Beta-Adrenergic-Receptor Kinase-2 and Beta-Arrestin-2 as Mediators of Odorant-Induced Desensitization. **Science**, v. 259, n. 5096, p. 825-829, Feb 5 1993.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 415-72, Sep 2000a.

\_\_\_\_\_. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415-72, Sep 2000b.

GILCHRIST, A. A perspective on more effective GPCR-targeted drug discovery efforts. **Expert opinion on drug discovery**, v. 3, n. 4, p. 375-89, Apr 2008.

HAMDAN, F. F. et al. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29089-100, Oct 5 2007.

HAMM, H. E. The many faces of G protein signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 2, p. 669-72, Jan 9 1998.

HENG, B. C.; AUBEL, D.; FUSSENEGGER, M. G Protein-Coupled Receptors Revisited: Therapeutic Applications Inspired by Synthetic Biology. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Oct 11 2013.

LAU, Y. F. et al. Hypertension and atrial fibrillation: epidemiology, pathophysiology and therapeutic implications. **Journal of human hypertension**, v. 26, n. 10, p. 563-9, Oct 2012.

LEW, R. A. et al. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). **Journal of neurochemistry**, v. 86, n. 2, p. 344-50, Jul 2003.

LIU, D. X. et al. Association of AT1R polymorphism with hypertension risk: An update meta-analysis based on 28,952 subjects. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, May 18 2015.

MANOLIS, A. J.; KALLISTRATOS, M. S.; POULIMENOS, L. E. Recent clinical trials in atrial fibrillation in hypertensive patients. **Current hypertension reports**, v. 14, n. 4, p. 350-9, Aug 2012.

MANOLIS, A. J. et al. Hypertension and atrial fibrillation: diagnostic approach, prevention and treatment. Position paper of the Working Group 'Hypertension Arrhythmias and Thrombosis' of the European Society of Hypertension. **Journal of hypertension**, v. 30, n. 2, p. 239-52, Feb 2012.

MAROTT, S. C. et al. AT1 mutations and risk of atrial fibrillation based on genotypes from 71,000 individuals from the general population. **British journal of clinical pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 114-24, Jul 2013.

MARTIN, S. S. et al. Analysis of the third transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor by cysteine scanning mutagenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51415-23, Dec 3 2004.

MCCUDDEN, C. R. et al. G alpha selectivity and inhibitor function of the multiple GoLoco motif protein GPM2/LGN. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1745, n. 2, p. 254-64, Sep 10 2005.

NATTEL, S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 219-26, Jan 10 2002.

NODA, K. et al. The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. **Biochemistry**, v. 35, n. 51, p. 16435-42, Dec 24 1996.

NODA, K.; SAAD, Y.; KARNIK, S. S. Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28511-4, Dec 1 1995.

OLDHAM, W. M.; HAMM, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 1, p. 60-71, Jan 2008.

OLIVEIRA, L. et al. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. **Physiological reviews**, v. 87, n. 2, p. 565-92, Apr 2007.

PORRELLO, E. R.; DELBRIDGE, L. M.; THOMAS, W. G. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. **Frontiers in bioscience**, v. 14, p. 958-72, 2009.

RASMUSSEN, S. G. et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 549-55, Sep 29 2011.

REIS, R. I. et al. Participation of transmembrane proline 82 in angiotensin II AT1 receptor signal transduction. **Regulatory peptides**, v. 140, n. 1-2, p. 32-6, Apr 5 2007.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 356-63, May 21 2009.

ROSKAMS, J. et al. Beta-Adrenergic-Receptor Kinase-2 and Beta-Arrestin-2 as Mediators of Odorant-Induced Desensitization. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 267-267, Mar 13 1993.

SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8258-63, Jul 8 2003.

SCHONEBERG, T. et al. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. **Pharmacol Ther**, v. 104, n. 3, p. 173-206, Dec 2004.

SEACHRIST, J. L.; FERGUSON, S. S. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. **Life sciences**, v. 74, n. 2-3, p. 225-35, Dec 5 2003.

SHUKLA, A. K. Biasing GPCR signaling from inside. **Sci Signal**, v. 7, n. 310, p. pe3, 2014.

SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 5, p. 2117-22, May 2012.

TSAI, C. T. et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. **Circulation**, v. 109, n. 13, p. 1640-6, Apr 6 2004.

WANG, S. X. et al. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene confer a risk to lone atrial fibrillation in Chinese male patients. **Chinese medical journal**, v. 126, n. 24, p. 4608-11, 2013.

WEI, H. et al. Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 46, p. 48255-61, Nov 12 2004.

WISE, A.; JUPE, S. C.; REES, S. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 43-66, 2004.

WITHEROW, D. S. et al. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 23, p. 8603-7, Jun 8 2004.

YANG, C. H.; ZHOU, T. B. Relationship between the angiotensinogen A1166C gene polymorphism and the risk of diabetes mellitus developing into diabetic nephropathy. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, Feb 1 2015.

ZALEWSKA, M.; SIARA, M.; SAJEWICZ, W. G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. **Acta Pol Pharm**, v. 71, n. 2, p. 229-43, Mar-Apr 2014.

ZOHN, I. E. et al. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 3, p. 1225-35, Mar 1998.