Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central

Aprile García, Fernando

2014-04-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Aprile García, Fernando. (2014-04-11). Estudio de las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Aprile García, Fernando. "Estudio de las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-11.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Lic. Fernando Aprile García

Director de tesis: Dr Eduardo Arzt

Director Asistente: Dra Ana C Liberman

Consejero de Estudios: Dr Eduardo Arzt

Lugar de trabajo:

a. Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires – CONICET – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck.

b. Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular – Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Buenos Aires, 2014

Índice

ÍNDICE **2**
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS **8**
RESUMEN **11**
ABSTRACT **13**
AGRADECIMIENTOS **15**
ABREVIATURAS **19**

INTRODUCCIÓN **20**

1. DEPRESIÓN **21**
1.1. Introducción **21**
1.2. Epidemiología **22**
1.3. Neurobiología de la depresión **22**
1.3.1. Glutamato 23
1.3.2. BDNF 24
1.3.3. Hormonas del estrés y depresión 24
1.3.4. Inflamación y depresión 26
1.4. Astrocitos y depresión **29**
1.4.1. Tipos de células gliales 29
1.4.2. Astrocitos 30
1.5. Componente genético en depresión **31**
2. RECEPTORES PURINÉRGICOS **32**
2.1. Receptores P1 ..... **33**
2.2. Receptores P2 ..... **34**
2.3. Receptores P2Y **35**
2.4. Receptores P2X **36**
3. RECEPTORES P2X7 ..... **39**
3.1. Expresión de los receptores P2X7 ..... **40**
3.2. Estequiometría de los receptores P2X7 ..... **41**
3.3. Activación y propiedades farmacológicas de P2X7 ..... **41**
3.4. Mecanismos de transducción de señales asociados a P2X7 ..... **42**
3.5. Funciones en SNC **45**
3.6. Liberación de neurotransmisores **46**
3.7. Rol funcional de P2X7 en glía **47**
3.8. Efectos transcripcionales de P2X7 ..... **48**

3.8.1. Egr ... 49
3.8.2. NFAT ... 50
3.8.3. NFκB ... 51
3.8.4. CREB ... 52
3.8.5. AP-1 ... 52
4. PARP1 ... 53
4.1. PARPs ... 53
4.2. PARP1 ... 55
4.3. PARP1 e inflamación ... 57
5. VARIANTE POLIMÓRFICA DEL RECEPTOR P2X7: GLN460ARG ... 59
5.1. Polimorfismos de P2X7 ... 59
5.2. Asociación de la variante polimórfica de P2X7 Gln460Arg con depresión ... 60
5.3. Antecedentes experimentales: Función de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg ... 62

OBJETIVOS ... 65

MATERIALES Y MÉTODOS ... 67

1. APARATOS, ESTÍMULOS, ANTICUERPOS E INHIBIDORES ... 68
1.1. Aparatos o dispositivos especiales ... 68
1.2. Estímulos y agentes farmacológicos ... 68
1.3. Anticuerpos ... 68
1.4. Otros reactivos o materiales ... 69
2. MANEJO DE PLÁSMIDOS ... 70
2.1. Plásmidos utilizados ... 70
2.2. Subclonado de plásmidos ... 72
2.3. Purificación de fragmentos de ADN ... 74
2.4. Reacción de ligación ... 74
2.5. Preparación de bacterias competentes ... 75
2.6. Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos ... 75
2.7. Preparación de plásmidos a pequeña escala o mini-preparaciones ... 75
2.8. Análisis de plásmidos por enzimas de restricción ... 76
2.9. Preparación de plásmidos a gran escala o maxi preparaciones ... 76
3. CULTIVOS CELULARES ... 77
3.1. Líneas celulares ... 77
3.2. Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo ... 78

3.3. Generación de clones estables ... 78
3.4. Transfección estable ... 80
4. RT-PCR Y RT-PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL ... 81
4.1. Diseño de primers y controles ... 81
4.2. Extracción de ARN ... 82
4.3. Extracción de ARN para experimento de microarray ... 83
4.4. Reacción de retrotranscripción ... 83
4.5. Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) ... 84
4.6. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) ... 85
5. WESTERN BLOT ... 86
5.1. Preparación de los extractos celulares ... 86
5.2. Obtención de fracciones de núcleo y citoplasma ... 87
5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electro-transferencia y revelado ... 88
6. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN. ... 89
7. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS ... 90
7.1. Transfección transitoria de ADN para ensayos de FRET ... 90
7.2. Diseño y transfección transitoria de RNAi ... 90
8. MEDICIÓN DE CALCIO ... 91
9. FRET ... 92
10. MICROARRAY ... 94
11. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ... 95

RESULTADOS ... 96

1. FUNCIONALIDAD DE LAS VARIANTES DE P2X7 EN UN MODELO DE EXPRESIÓN ENDÓGENA ... 97
1.1. Caracterización de la línea celular 1321N1 ... 97
1.2. Coexpresión estable de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg en células 1321N1 ... 98
1.2.1. Respuesta intracelular de calcio mediada por P2X7 en clones 1321N1 coexpresores de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg ... 99
1.2.2. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por la activación de P2X7 en clones 1321N1 coexpresores de P2X7-WT y de P2X7-Gln460Arg ... 100
2. LOS CANALES P2X7 RECUPERAN SU FUNCIÓN LUEGO DEL SILENCIAMIENTO ESPECÍFICO DE UNA DE SUS VARIANTES ... 102
2.1. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7 ... 102
2.1.1. Diseño de RNAi específicos y puesta a punto de la transfección en clones HEK293 expresores de una única variante ... 102

2.1.2. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7- WT/Gln460Arg 104

2.2. Efectos funcionales del silenciamiento específico de las variantes de P2X7 105

2.2.1. Respuesta intracelular de calcio mediada por P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de sus variantes 105

2.2.2. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de sus variantes 106

3. INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES WT Y GLN460ARG DEL RECEPTOR P2X7 107

3.1. Interacción directa entre subunidades de P2X7 etiquetadas 108

3.1.1. Generación de clones coexpresores de las variantes de P2X7 fusionadas a etiquetas 108

3.1.2. Ensayos de co-inmunoprecipitación en clones coexpresores de las variantes de P2X7 etiquetadas..... 108

3.2. Interacción directa entre subunidades de P2X7 ensamblados en membrana de células vivas 109

3.2.1. Diseño de un biosensor para detectar interacciones entre subunidades de P2X7 mediante la técnica de FRET 110

3.2.2. Ensayos de FRET en células vivas 111

4. VALIDACIÓN IN VIVO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES P2X7 HETEROMÉRICOS 114

5. BÚSQUEDA DE NUEVOS BLANCOS INVOLUCRADOS EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR P2X7 Y SU VARIANTE POLIMÓRFICA 115

5.1. Identificación de PARP1 asociada a la vía de transducción de señales de P2X7: Enfoque proteómico 116

5.1.1. Proteómica de proteínas asociadas a la MAPKKK B-Raf.....116

5.1.2. Validación del resultado de la proteómica mediante inmunoprecipitación.....117

5.1.3. Localización subcelular de PARP1 y BRaf.....118

6. P2X7 ACTIVA A PARP1 120

6.1. La activación de P2X7 aumenta la parilación 120

6.2. El aumento en la parilación es mediado por PARP1..... 121

6.3. La coexpresión de las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg disminuye la parilación 122

7. EFECTOS TRANSCRIPCIONALES PRODUCIDOS POR LAS VARIANTES WILD-TYPE Y POLIMÓRFICA GLN460ARG DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7.... 123

7.1. Diseño y recolección de muestras para el microarray 124

7.2. Análisis de datos crudos..... 124

8. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE P2X7..... 126

8.1. Genes diferencialmente expresados por P2X7..... 126

9. ESTUDIO DEL IMPACTO DE LOS RECEPTORES P2X7 HETEROMÉRICOS A NIVEL TRANSCRIPCIONAL 135

9.1. Análisis bioinformático global 135

9.2. Obtención de genes candidatos 138

9.3. Validación del microarray 141

9.3.1. PCR cuantitativa sobre muestras del microarray 141

10. LAS VARIANTES DEL RECEPTOR P2X7 TIENEN UN EFECTO DIFERENCIAL SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CHUK Y RCAN1 142

10.1. Efectos de la activación de las variantes de receptores P2X7 sobre la expresión de CHUK y RCAN1 en clones estables HEK293 142

10.2. Efectos de la activación de las variantes de receptores P2X7 sobre la expresión de CHUK y RCAN1 en clones estables 1321N1 143

10.3. Patrón de expresión de CHUK y RCAN1 en cerebros de ratones humanizados para el receptor P2X7 humano 144

CONCLUSIONES 146

DISCUSIÓN 148

1. LA VARIANTE POLIMÓRFICA DE P2X7 GLN460ARG Y DEPRESIÓN 149

2. FUNCIÓN DE LAS VARIANTES P2X7-WT Y P2X7-GLN460ARG 151

3. INTERACCIÓN ENTRE LAS SUBUNIDADES P2X7-WT Y P2X7-GLN460ARG EN RECEPTORES P2X7 153

4. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES P2X7 HETEROMÉRICOS 154

5. ESTUDIOS *IN VIVO* DE LAS VARIANTES DE P2X7 Y SU CORRELATO CON TRASTORNOS DEL COMPORTAMIENTO 156

6. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS DISTINTAS VARIANTES DE RECEPTORES P2X7 158

7. PARP1 COMO MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE P2X7 159

8. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE P2X7 161

9. CONSECUENCIAS TRANSCRIPCIONALES DE LA ACTIVACIÓN DE LAS DISTINTAS VARIANTES DE P2X7 163

10. CHUK Y RCAN1 COMO GENES CANDIDATOS RELACIONADOS CON DEPRESIÓN 165

11. CONCLUSIONES FINALES 169

ANEXO 1 ..... **170**

1. VALIDACIÓN *IN VIVO* DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES P2X7 HETEROMÉRICOS **171**

1.1. Generación de ratones humanizados para el receptor P2X7 humano **171**

1.2. La expresión de P2X7 en heterocigosis afecta la calidad y arquitectura del sueño **171**

1.3. P2X7 en heterocigosis modifica la respuesta al estrés crónico **172**

ANEXO 2 ..... **178**

BIBLIOGRAFÍA **219**

Índice de figuras y tablas

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Similitud entre subunidades de receptores P2X. 37
Figura 2. Familia de receptores P2X. 38
Figura 3. P2X7 y componentes del complejo multiproteico asociado. 43
Figura 4. Vías de señalización activadas por el receptor P2X7 en células de la glía. 44
Figura 5. Mecanismos de activación de P2X7 en SNC. 46
Figura 6. Resumen de la regulación transcripcional mediada por la activación de P2X7.. 49
Figura 7. Parilación de proteínas. 54
Figura 8. Representación esquemática de la estructura de PARP1 y sus dominios principales.. 55
Tabla 1. Polimorfismos de P2X7. 60
Figura 9. Meta análisis: Asociación de P2X7-Gln460Arg con trastornos depresivos. 61
Figura 10. Activación de P2X7 en clones HEK293 expresores de las distintas variantes de P2X7.. 64

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Primers utilizados para PCR y PCR en tiempo real 82
Tabla 3. Anticuerpos para ensayos de Inmunoprecipitación 89
Tabla 4. RNAi empleado para el silenciamiento específico de genes 91

RESULTADOS

Figura 11. Expresión endógena y función del receptor P2X7 en la línea celular 1321N1.. 98
Figura 12. Respuesta intracelular de calcio en células 1321N1 expresoras de P2X7-WT y/o P2X7-Gln460Arg. 100
Figura 13. Activación de la MAPK ERK 1/2 en clones 1321N1 sobreexpresores de las variantes de P2X7. 101
Figura 14. Respuesta intracelular de calcio en células HEK293 sobreexpresoras de P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7.. 103
Figura 15. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7 en células HEK293 coexpresoras de P2X7- WT/Gln460Arg. 104
Figura 16. Respuesta intracelular de calcio en células HEK293 coexpresoras de P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7. 106
Figura 17. Activación de la MAPK ERK 1/2 en clones HEK293 sobreexpresores de las variantes de P2X7 luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7. 107
Figura 18. Coinmunoprecipitación entre las variantes etiquetadas de P2X7. 109

Figura 19. Activación de la MAPK ERK 1/2 en células HEK293 transfectadas con las variantes fluorescentes de P2X7. 111

Figura 20. Mediciones de FRET en membrana de células vivas de las variantes fluorescentes de P2X7. 113

Figura 21. Fosforilación de BRaf en la línea celular 1321N1.. 116

Figura 22. Identificación por proteómica de proteínas asociadas a BRaf.. 117

Figura 23. Validación de la interacción entre BRaf y PARP1 en células 1321N1.. 118

Figura 24. Validación de la interacción entre BRaf y PARP1 en células HT22.. 118

Figura 25. Localización subcelular de PARP1 y BRaf. 119

Figura 26. Localización subcelular de la interacción entre BRaf y PARP1.. 120

Figura 27. Detección de parilación dependiente de P2X7 en células 1321N1 P2X7-WT.. 121

Figura 28. Detección de parilación dependiente de P2X7 en células 1321N1 P2X7-WT mediado por PARP1.. 122

Figura 29. Parilación dependiente de P2X7 en clones 1321N1 sobreexpresores de las variantes de P2X7. 123

Figura 30. Dendograma (árbol de distancias) en base a la similitud en los perfiles globales de expresión. 125

Figura 31. Diagrama de genes diferencialmente expresados entre la línea celular HEK293 parental y los clones HEK293 P2X7-WT. 127

Tabla 5. Genes con máxima regulación diferencial entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales.... 130

Tabla 6. Términos GO enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. 132

Tabla 7. Vías de señalización enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. 134

Tabla 8. Resumen del análisis de GSEA para el contraste de clones P2X7-WT versus P2X7-WT/Gln460Arg.. 136

Tabla 9. Selección de grupos de genes obtenidos por GSEA enriquecidos en el contraste de clones P2X7-WT versus clones P2X7-WT/Gln460Arg.. 137

Figura 32. Diagrama de genes diferencialmente expresados entre los clones HEK293 P2X7-WT y los clones P2X7-WT/Gln460Arg 139

Tabla 10. Genes con expresión diferencial entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg . 141

Figura 33. Niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en muestras de clones HEK293 P2X7-WT y HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg empleadas para el microarray 142

Figura 34. Efectos de la activación de las variantes de P2X7 sobre los niveles de expresión de CHUK y RCAN1. 143

Figura 35. Efectos de la activación de las variantes de P2X7 sobre los niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en clones 1321 144

Figura 36. Niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en muestras de cerebro de ratones transgénicos para las variantes humanas de P2X7 145

ANEXO 1

Figura 1. Establecimiento de líneas murinas expresoras de las variantes humanas del receptor P2X7 174

Figura 2. Calidad y arquitectura del sueño en ratones transgénicos para las variantes de P2X7 humano 175

Figura 3. Protocolo de estrés por derrota social crónica (CSDS)..... 176

Figura 4. Consecuencias del estrés crónico a nivel comportamental en los ratones transgénicos para las variantes de P2X7 humano..... 177

ANEXO 2

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. 216

Tabla 2. Genes con expresión diferencial entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg ... 218

Estudio de las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7

y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central

Resumen

Los receptores P2X7 son canales de calcio activados por ATP conformados por subunidades de dos pasos de membrana que se asocian como homotrímeros. Sus efectos son mediados por activación de la vía de las MAPK que incluye a BRaf y ERK 1/2. En el sistema nervioso central, regulan la liberación de neurotransmisores y citoquinas, y la activación glial frente a situaciones inflamatorias. Mediante distintos estudios genéticos se encontró que pacientes con trastornos depresivos poseen, con una incidencia significativa, una variante polimórfica del gen P2X7, que consiste en un cambio de un único nucleótido que produce la sustitución de Glutamina por Arginina en la posición 460 (Gln460Arg).

El objetivo principal de esta tesis consiste en investigar la relación funcional entre esta variante polimórfica del receptor y la aparición de trastornos psiquiátricos. En particular, se estudiaron las cascadas de señalización activadas por el receptor P2X7, poniendo énfasis en el ingreso de calcio extracelular tras dicha activación, el rol de la cascada de las MAPK y los efectos funcionales y transcripcionales que derivan de dicha activación.

Primeramente, se observó que en homocigosis la variante mutada de P2X7 tiene la misma funcionalidad que el receptor wild-type (WT). En cambio, cuando ambas subunidades fueron coexpresadas se produjo una marcada disminución en la entrada de calcio y en la activación de la MAPK ERK 1/2. Se demostró además que ambas subunidades interactúan físicamente en la membrana celular de células coexpresoras, asociándose para formar trímeros funcionales de P2X7 compuestos por subunidades WT y Gln460Arg. A su vez, nuestro grupo colaborador en el Max-Planck en Munich, Alemania, demostró que solamente los ratones knock-in que expresan ambas variantes del receptor P2X7 humano, y no aquellos que expresan una única variante, muestran alteraciones del comportamiento similares a aquellas que presentan pacientes con depresión.

A continuación, se buscaron proteínas involucradas en la transducción de señales de P2X7 de interés en el marco de mecanismos inflamatorios o con un posible rol en depresión. Se detectó asociada a BRaf a la proteína Poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1), enzima clave en la respuesta celular a procesos inflamatorios. Se demostró que P2X7 activa a PARP1, aumentando los niveles totales de poli ADP-ribosilación. Estos resultados identifican a

PARP1 como un modulador clave de la transducción de señales de P2X7, y describen por primera vez a P2X7 como activador de PARP1.

Además se realizó un microarray de expresión génica con el fin de caracterizar las consecuencias de la coexpresión de ambas variantes a nivel transcripcional. Con estos datos se realizó un análisis bioinformático global de los perfiles de expresión génica, con el cual se hallaron alteradas distintas vías de señalización relacionadas con inflamación y depresión. También identificamos genes candidatos con expresión alterada que resultan de máximo interés en el mismo contexto: CHUK (o IKKα, quinasa del inhibidor de NFκB α) y RCAN1 (regulador de calcineurina 1). Esta expresión diferencial detectada en el microarray fue posteriormente confirmada en distintos modelos, validando y profundizando dichos hallazgos.

En conclusión, mediante la caracterización de las vías de transducción de señales asociadas a la activación de las distintas variantes de P2X7, el análisis de su impacto transcripcional y su asociación con nuevas moléculas se describen por primera vez los mecanismos moleculares y celulares que podrían proveer una explicación a la asociación entre la presencia de la variante mutada de P2X7 y la aparición de trastornos psiquiátricos como la depresión.

Palabras clave: P2X7, Calcio, ERK1/2, PARP1, Microarray, Depresión.

Study of signaling and inflammatory pathways of the P2X7 channel and its polymorphic variant Gln460Arg in central nervous system cells

Abstract

P2X7 receptors are ATP-gated calcium channels conformed by subunits with two transmembrane domains that assemble as homotrimers. Its effects are mediated by activation of the MAPK pathway that involves BRaf and ERK 1/2. In the central nervous system, they regulate neurotransmitter and cytokine release, as well as glial activation after inflammatory injury. Different genetic approaches have demonstrated that a significant amount of psychiatric patients suffering from major depression possess a polymorphic variant of the P2X7 gene, consisting in a single nucleotide change leading to a Glutamine for Arginine subtitution at the position 460 (Gln460Arg).

The main aim of this thesis is to investigate the functional interplay between this polymorphic variant and the onset of psychiatric symptoms. More specifically, signaling pathways elicited by P2X7 receptor were studied, with special emphasis in calcium uptake, MAPK role and the functional and transcriptional effects derived from their activation.

First of all, we report that the P2X7 polymorphic variant show the same functionality than its wild-type (WT) counterpart when expressed in homocygosis. In contrast, calcium uptake and MAPK ERK 1/2 activation were severely diminished when both subunits were coexpressed. We also show that both subunits physically interact in coexpressing cells, therefore assembling P2X7 receptors that bear WT and Gln460Arg subunits. At the same time, our partner research group at the Max-Planck Institute in Munich, Germany, showed that only knock-in mice for both variants of the human P2X7 receptor show behavior alterations reminiscent of those observed in psychiatric patients, while homozygous knock-in mice do not.

Afterwards, we looked for novel proteins involved in P2X7 signaling pathways that would be of interest in the context of inflammation and depression. We detected Poly ADP-ribose polymerase (PARP1), a key enzime for cellular response to inflammatory processes. P2X7 activates PARP1, enhancing cellular levels of ADP-ribose. These results identify PARP1 as a key modulator of P2X7 signaling mechanisms, and describe P2X7 as a novel activator of PARP1.

Also, we performed an expression microarray with the aim of depicting the transcriptional consequences of coexpressing both variants. This data was used to carry out a

global bioinformatic analysis of gene expression profile. We found that different signaling pathways related to inflammation and depression were altered. We also found candidate genes with altered gene expression that are of interest in this context: CHUK and RCAN1. Their differential expression detected on the microarray was confirmed employing different models, therefore validating and gaining insight into these findings.

Summing up, by means of characterizing the signaling pathways associated to the activation of the different P2X7 variants, the analysis of their transcriptional impact and the association with novel molecules we describe for the first time the molecular and cellular mechanisms that could provide an explanation for the association between the P2X7 polymorphic variant and the appearance of psychiatric illnesses such as depression.

Keywords: P2X7, Calcium, ERK1/2, PARP1, Microarray, Depression.

Agradecimientos

Los cinco años que duró este trabajo de tesis doctoral fueron años de constante cambio. Mi vida cambió mucho, como seguramente es algo natural durante esta etapa de joven adultez, y quiero agradecer a todos los que me rodearon este tiempo. En parte por el aporte de cada uno de Ustedes es que hoy, al terminar de escribir esta tesis, yo me pueda detener y observar mi vida y diga "gracias, la etapa que termina fue muy positiva y estoy muy contento por como son hoy las cosas". Siento que todo el esfuerzo que significó llevar a cabo este doctorado se ve realmente aliviado y recompensado gracias a que Ustedes fueron parte del mismo, gracias por estar cerca mío.

Seré breve, no quiero repetir los agradecimientos de la Tesina de Licenciatura que fueron profusos en palabras y descripciones. Las comparaciones son odiosas y esta vez espero demostrar con mi actitud lo que no explicito en palabras en estos párrafos.

Archie, te agradezco la confianza que depositaste en mí en los últimos años. Fue un desafío pero muy motivador a la vez saber que podía avanzar siguiendo mi propio criterio, el cual formé en parte con tus enseñanzas. Siento que las habilidades múltiples que aprendemos en el laboratorio serán muy útiles en el futuro.

Ana, gracias por estos años. Gracias por siempre preocuparte por como iban los experimentos, por la guía constante. Gracias por siempre pensar alternativas y nuevas ideas, y por encauzar las ideas cuando teníamos más dudas que certezas. Gracias por los consejos y recomendaciones con el rumbo a seguir. Creo que pese a todas las dificultades salimos adelante, y armamos un lindo proyecto.

A mis compañeros del laboratorio: Gracias. Gracias por estar ahí todos los días. Gracias por la buena onda, la buena predisposición. Pipetear cerca suyo es un placer, compañeros en las buenas y en las malas.

A mis amigos del laboratorio: GRACIAS. Gracias por convertirse en mis amigos. Gracias por las charlas y los consejos. Gracias por las cenas, las salidas, el bar y el boliche. Gracias por los congresos y los viajes. Gracias por las fotos, las anécdotas, las historias. Con

ustedes me sentí parte de un grupo, algo que se que voy a extrañar.

A los millones de eventos, que seguro me olvido de varios: Río-Angra, los 20 SAIC de Mar del Plata y ese departamento infernal, SISTAM y Bariloche con las chicas, La carrera de La Angostura, Villa Gesell, las vaquillonas con cuero, los asados, la pileta de Ciudad, los campamentos en Gualeguaychú, en Magdalena. Ustedes hicieron inolvidables estos recuerdos.

A la legión extranjera de personas que vinieron al laboratorio en todos estos años y le aportaron alegría, caos y descontrol. A los pibes del kayak. A los Locos. Al grupo de Península. Al grupo súper cosmopolita de Gottingen. Al grupo súper alemán de Munich.

A los amigos que hice durante el doctorado. De vuelta. A ustedes sí los nombro, para retenerlos, para mantenerlos conmigo. En esta vida loca que elegimos el futuro de cada uno dispara para todos lados, y se muy bien que vamos a llevar caminos muy distintos. Siempre los voy a recordar por los grandes recuerdos que tenemos juntos: Andrés -el profundo-, Carli -la catrasca-, Caro -la indie-, Dai -locutora, psicóloga, abogada, todo junto-, Guille -el que organiza todo-, Jose -el que sabe-, Lucas -el facha-, María -la que es igual a mi y me entiende todo-, Marian -el alma de la fiesta-, Marian H -crazy and cool-, Melu -la nena-, Rodri -compañero de aventuras- y Sergio -superhéroe full time-. Gracias a cada uno de ustedes. Con cada uno viví mucho, gracias por eso.

A los amigos de siempre no los nombro. Soy feliz por saber que son para siempre, que van a estar siempre.

A mis viejos porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias por convencerme que se puede, gracias por ser el ejemplo a seguir, gracias por siempre estar.

A los que ya no están. A los que no quiero que se vayan.

A los que se mueren de ganas de estar hoy conmigo: yo también me muero de ganas de estar con ustedes, y pronto voy a estar muy cerca!

Fede, casi todo mi doctorado viviste lejos. Pero creo que hicimos todo por estar lo más cerca posible. Este constante extrañarte es raro, duele. Pero la distancia hizo que nos conociéramos mucho más, que supiéramos lo fundamental de cada uno. No hay nadie como mi hermano. No quiero a nadie como a mi hermano.

A Carli ya la nombré entre los amigos, ahora la nombro de vuelta. Si me siento feliz es gracias a ella. Si siento que este doctorado termina muy bien es gracias a ella. Si siento que lo que está por venir no puede fallar es gracias a ella. Ya casi estoy allá, apenas leer esta tesis y nos vemos allá.

Quería ser breve, no me salió. Espero que disfruten esta tesis, yo disfruté su escritura.

"El único hombre práctico es aquel
cuyo sueño de hoy será la realidad de mañana"
JOSÉ MARTÍ

Abreviaturas

ACTH	Corticotrofina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BPD	Desorden bipolar
BzATP	Benzoil adenosin trifosfato
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CRHR1	Receptor de tipo 1 de hormona liberadora de corticotrofina
CSDS	Estrés por derrota social crónica
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEG	Electroencefalograma
ES	Error estándar
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster
GABA	Ácido gama amino butírico
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene set enrichment analysis
h	Hora/s
HIS	Histidina
HPA	Eje hipotálamico-hipofisario-adrenal
IkB	Proteína inhibidora de kB
IKK	Quinasa de IkB
IL	Interleuquina
MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos
MDD	Trastorno depresivo mayor
min	Minuto/s
NREMS	Sueño de tipo movimiento no rápido de ojos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAR	Poli ADP-ribosa
PKC	Proteín quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
REMS	Sueño de tipo movimiento rápido de ojos
ROI	Región de interés
s	Segundo/s
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
STREP	Streptavidina
WB	Western blot
WT	Wild type

INTRODUCCIÓN

1. Depresión

1.1. Introducción

La existencia de depresión como enfermedad ha sido reconocida con el término *melancholia* en textos médicos que datan desde la antigua Grecia. El término *depresión* describe tanto un estado de ánimo transitorio experimentado por casi todas las personas en algún momento de su vida así como también describe una enfermedad clínica. La depresión es una enfermedad que incluye desórdenes en los lazos afectivos y en el estado de ánimo, en las funciones neurovegetativas (alteraciones del apetito y del sueño), en la función cognitiva (sentimiento de culpa inapropiada y sentimientos de inutilidad) y en la actividad psicomotora (problemas de comportamiento o retardo mental) (1).

Entre estas serias enfermedades mentales el trastorno depresivo mayor (del inglés, major depressive disorder, MDD) y el desorden bipolar (del inglés, bipolar disorder, BPD) son los de mayor prevalencia (2). Ambas enfermedades se caracterizan no solo por un profundo desajuste de los lazos afectivos y del estado de ánimo, sino que también están asociadas a la pérdida de la función cognitiva, alteraciones del apetito y del sueño, fatiga y muchas otras alteraciones metabólicas, endócrinas e inflamatorias (3, 4). Habitualmente se nombra al MDD como desorden unipolar para distinguirlo del BPD, el cual es un estado depresivo con episodios de manía (5).

El criterio de diagnóstico actual para el MDD abarca un consenso clínico e histórico sobre los síntomas y signos más importantes de la enfermedad depresiva. Sin embargo, los individuos afectados muestran una amplia variación en sus síntomas clínicos. Además, las convenciones actuales para el diagnóstico resultan un poco arbitrarias, de manera que aún hoy continúa el debate acerca de la mejor manera de diagnosticar estas enfermedades tan complejas (6). La etiología de la depresión es desconocida, si bien hay varias teorías con distinto nivel de aceptación (7). El MDD puede ser espontáneo pero a menudo sigue a una experiencia emocional traumática o puede ser síntoma de otras enfermedades, casi siempre neurológicas, (por ejemplo, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple o enfermedad de Parkinson) o endócrinas (Enfermedad de Cushing o hipotiroidismo). El MDD también puede estar desencadenado por compuestos farmacológicos o drogas de abuso (8).

1.2. Epidemiología

El MDD tiene una prevalencia media a lo largo de la vida del 21% y alrededor de un 5% de la población padece esta enfermedad (9). El MDD es el más común de los desórdenes psiquiátricos y también una de las enfermedades más habituales, sobre todo en países desarrollados. La prevalencia es mayor en las mujeres: el radio de prevalencia entre mujeres y hombres oscila entre 1,5 y 2,5 (10). Cerca del 50% del riesgo de sufrir depresión se debe a factores genéticos (1). Estos factores genéticos pueden estar influenciando tanto el riesgo global de sufrir la enfermedad como también la sensibilidad del individuo a las adversidades ambientales que se le presentan a lo largo de la vida. Se han identificado varios factores de riesgo posibles para el MDD. Un amplio rango de adversidades provenientes del ambiente tales como pérdida del trabajo, dificultades maritales, graves problemas de salud y la pérdida de relaciones afectivas cercanas están asociadas con un aumento sustancial en el riesgo de sufrir de MDD (11). Las dificultades en la niñez, incluyendo el abuso sexual y físico, también aumentan el riesgo de sufrir MDD más tarde en la vida. Por último, ciertas características en la personalidad parecen aumentar el riesgo de sufrir MDD, que incluyen la predisposición a desarrollar alteraciones emocionales en situaciones de estrés (1). De esta manera se caracteriza a la depresión como una enfermedad habitual, costosa (12) y recurrente (13), asociada a una alta morbilidad y exceso de mortalidad (14). Hay pronósticos que indican que la depresión se convertirá en la segunda causa de invalidez a nivel mundial (por detrás de las enfermedades coronarias) (15).

1.3. Neurobiología de la depresión

Acerca de la neurobiología de estos trastornos han surgido varias hipótesis con evidencias experimentales que las apoyan en mayor o menor medida. El mecanismo terapéutico común de las drogas antidepresivas más empleadas es la potenciación de la neurotransmisión serotonérgica y noradrenérgica. Dada la efectividad aparente de los fármacos usados (inhibidores de la recaptación selectiva de noradrenalina y/o serotonina, e inhibidores de las enzimas degradativas de aminas biógenas), durante los últimos cuarenta años la investigación en MDD se centró en la transmisión serotonérgica y noradrenérgica (16, 17). Sin embargo, aún no se han descubierto los mecanismos causantes de la alteración en estos tipos de neurotransmisión. Además, los altos niveles de efectos secundarios producidos

por estos fármacos, así como también su falta de efectividad en aproximadamente la tercera parte de los pacientes, han llevado a la conclusión de que la hipótesis de una transmisión serotonérgica o noradrenérgica alterada no puede explicar por sí sola los mecanismos patológicos de la depresión. Es así como se han elaborado otras teorías (18).

1.3.1. Glutamato

En la década de 1930 se observaron por primera vez altas concentraciones de glutamato en el cerebro, hecho que sugirió que este aminoácido cumplía un rol en la fisiología neuronal (19). Más adelante, al encontrar sus receptores en el cerebro se descubrió que el glutamato cumplía efectivamente las funciones de un neurotransmisor específico (20, 21). En la actualidad se considera al glutamato como uno de los neurotransmisores excitatorios más determinantes en la función nerviosa (22) y se ha visto que tiene un rol fundamental en la regulación de la neuroplasticidad, el aprendizaje y la memoria (23).

Se han reportado evidencias de que el glutamato está involucrado en la patofisiología de los desórdenes del comportamiento. Se han observado cambios en los niveles de glutamato en plasma (24, 25), suero (26), líquido cefalorraquídeo (27) y tejido cerebral (28) de pacientes con desórdenes del comportamiento y víctimas de suicidio. También se han encontrado niveles alterados de glutamato en distintas áreas específicas del cerebro de pacientes con MDD o BPD (29, 30).

Por otra parte, el remodelado estructural y de dendritas en áreas específicas en el sistema nervioso central (SNC) tales como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala tiene un rol en los cuadros de depresión y ansiedad (31, 32). En este contexto, y teniendo en cuenta que el glutamato es necesario para el desarrollo normal del crecimiento dendrítico (33), se ha especulado con que una neurotransmisión glutamatérgica excesiva (debida principalmente a la exposición a estrés crónico), causa retracción de dendritas y pérdida de espinas neuronales (31).

Por último, la transmisión glutamatérgica podría estar alterada a nivel genético, dado que variaciones génicas en enzimas clave pueden influenciar sus niveles *in vivo* (34).

1.3.2. BDNF

Estudios histológicos y técnicas de neuroimagen funcionales han revelado alteraciones en la plasticidad sináptica y estructural en distintas áreas del cerebro de pacientes con MDD, incluyendo la corteza frontal y el hipocampo (35-37). En términos fisiopatológicos, se ha propuesto que estas alteraciones podrían impedir que el cerebro realice una respuesta adaptativa correcta frente a los estímulos ambientales (38). Estas observaciones llevaron al estudio de las neurotrofinas en el marco de depresión, dado que son factores de supervivencia neuronal de gran importancia en el establecimiento y mantenimiento de circuitos neuronales durante el desarrollo y también en adultos (39, 40). De esta manera, la neurotrofina BDNF (del inglés, brain-derived neurotrophic factor) parece estar involucrada en depresión. Primeramente se detectó que la expresión de BDNF se encuentra disminuida en el giro dentado del hipocampo de ratas sometidas a estrés crónico (41). Los estudios acumulados en la última década indican que esta neurotrofina es central en la patogénesis de la depresión y las conductas suicidas (42, 43). La expresión de BDNF, los genes regulados por BDNF y su receptor TrkB se encuentra disminuida en muestras *postmortem* de cerebros de individuos con depresión (44) y los niveles séricos de BDNF también se encuentran disminuidos en pacientes con MDD (45) y ciertos polimorfismos en este gen podrían ser predictivos del estado crónico de la enfermedad (46). Además, la expresión de BDNF se encuentra aumentada en pacientes bajo tratamiento antidepresivo (47, 48). En su conjunto, estos hallazgos apoyan una relación causal entre BDNF y la aparición de MDD.

1.3.3. Hormonas del estrés y depresión

Las situaciones de estrés y sus correlatos neurobiológicos están fuertemente involucrados en el origen y en el desarrollo de la depresión y trastornos de ansiedad (3, 49). La glándula hipófisis secreta corticotrofina (ACTH) en respuesta a cualquier tipo de estrés, lo que produce un aumento en la síntesis y liberación de cortisol (corticosterona en roedores) en la glándula adrenal. La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y la vasopresina son los neuropéptidos clave responsables del aumento periférico de hormonas del estrés. Ambos neuropéptidos son sintetizados en neuronas especializadas del núcleo paraventricular del hipotálamo e impactan en la hipófisis vía el sistema porta. Esta actividad neuroendócrina se asocia con una gran cantidad de otras proyecciones neurales lo que produce la liberación de

estos neuropéptidos en muchas áreas cerebrales implicadas en la neuroanatomía de la depresión y ansiedad, incluyendo el núcleo central de la amígdala, el hipocampo y estructuras corticales (50). Tanto CRH como la vasopresina están involucrados en la adaptación al estrés dado que producen variadas respuestas comportamentales orientadas a lidiar con una amenaza de manera óptima. De cualquier manera, cuando la situación de estrés se prolonga en el tiempo y se produce una hipersecreción de estos neuropéptidos, los efectos benéficos de un principio se convierten en una mayor susceptibilidad a comportamientos de ansiedad y depresión (51). La administración central de CRH en roedores o la sobreexpresión en ratones transgénicos produce cambios comportamentales incluyendo síntomas relacionados con ansiedad y depresión (52-54). Un alto número de investigaciones de índole básica y clínica indican que la depresión está asociada a una mala respuesta al estrés, debido al mal funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (del inglés, HPA). (3, 55). Los niveles alterados en las hormonas son una característica constante de los desórdenes del comportamiento y pueden anticipar el inicio de MDD (56), lo que apoya el rol del eje HPA en esta enfermedad (57). CRH se encuentra elevado en depresión y trastornos de ansiedad (58, 59).

En este sentido, la activación de mecanismos de señalización intracelulares mediados por CRH en distintas áreas cerebrales resulta de gran interés. La inyección intracerebroventricular de CRH *in vivo* produce un patrón específico de activación de la MAPK ERK 1/2 en el cerebro de ratón, en áreas límbicas del hipocampo y la amígdala (60). Estos resultados fueron confirmados en ratones transgénicos sobreexpresores de CRH en áreas límbicas (61). Dichas áreas están relacionadas con el procesamiento de la información ambiental y aspectos comportamentales del estrés. Estudios posteriores en ratones *knock out* demostraron que este efecto de CRH es mediado por su receptor de tipo 1 (CRHR1) en áreas límbicas (62). El hecho de que esta activación produzca un patrón de activación de ERK 1/2 tan específico aun cuando los mismos se expresan de manera abundante en todo el cerebro sugiere que la conexión funcional entre CRHR1 y la activación de ERK 1/2 son específicos de área (58).

La hipersecreción de CRH produce no solo alteraciones neuroendócrinas sino también cambios comportamentales. El líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos contiene altos niveles de CRH (51, 63), y se han detectado alteraciones en ensayos neuroendócrinos en pacientes con depresión (63, 64). Entre las alteraciones en las hormonas del estrés observadas en MDD se incluyen la pérdida de la inhibición de liberación de cortisol por dexametasona,

niveles aumentados de cortisol, mayor secreción de cortisol y una respuesta hiperactiva frente al estrés psicológico. Este mal funcionamiento del eje HPA es un buen predictor de la respuesta al tratamiento con antidepresivos (65-67). Por otra parte, un mal funcionamiento de los receptores de corticosteroides (el receptor de glucocorticoides y el receptor de mineralocorticoides) produce un aumento en magnitud y tiempo en la secreción de los neuropéptidos CRH y vasopresina en el cerebro y de ACTH y cortisol en la periferia (68). El cortisol es la principal hormona efectora de los mecanismos de respuesta al estrés. Dado que muchos genes expresados en el cerebro son activados o reprimidos por los corticoides, los cuales atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, la continua exposición a esta hormona del estrés (hipercortisolemia) también produce cambios en el comportamiento. (69), incluyendo comportamientos depresivos. Otra consecuencia a nivel comportamental de la hipercortisolemia es el déficit cognitivo, el cual está asociado a depresión. Diversos estudios sugieren que la secreción excesiva de corticosteroides afecta a las neuronas hipocampales aumentando su vulnerabilidad a la neurotransmisión excesiva de glutamato y estrés oxidativo (70-72). En consecuencia se supone que la exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides aumenta la vulnerabilidad del hipocampo, lo que produciría susceptibilidad al desarrollo de desórdenes relacionados con el estrés. Los antidepresivos probablemente producen su efecto terapéutico también mediante el aumento de la neurogénesis hipocampal (73). En línea con esta observación, un gen blanco del receptor de glucocorticoides que inhibe la neurogénesis hipocampal, *SGK1* (del inglés, serum- and glucocorticoid- inducible kinase 1), se encuentra sobreexpresado en pacientes con depresión y en modelos animales de comportamiento depresivo (70).

Además, existen evidencias que sugieren que los corticosteroides modifican la función del BDNF, lo que significaría una relación funcional entre las hormonas del estrés y los efectos del BDNF. Esto estaría implicado en la patogénesis del MDD (74). En su conjunto, todas estas observaciones apoyan el concepto según el cual la desregulación del eje HPA es un factor de riesgo para la depresión (3).

1.3.4. Inflamación y depresión

La respuesta inflamatoria es un proceso fisiológico que protege al organismo contra infecciones y patógenos y repara los tejidos dañados. Dicho proceso es favorable para el organismo, dado que promueve la activación de varios mediadores inflamatorios con el fin de

remover el agente dañino (75). El proceso de inflamación tiene varias etapas. A nivel celular hay una marcada respuesta a los estímulos proinflamatorios, y como resultado se producen citoquinas y quemoquinas (76). A nivel molecular, la aparición de señales proinflamatorias desemboca predominantemente en la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB, los cuales a su vez inducen la expresión de los mencionados mediadores inflamatorios, lo que asegura la propagación de la respuesta inflamatoria (77-79). Sin embargo, es necesario el retorno a la homeostasis, dado que si la respuesta inflamatoria se prolonga indefinidamente puede provocar daño a los tejidos y estados de inflamación crónica y autoinmunidad (80).

Luego de un daño, se produce la liberación local de mediadores inflamatorios tales como las citoquinas Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina 6 (IL-6) y TNFα, (del inglés, Tumor necrosis factor alpha), los cuales actúan en el SNC activando al eje HPA (81-84), que como ya se mencionó es el componente principal de la respuesta endócrina al estrés. Estas citoquinas producidas en la periferia pueden actuar ya sea vía el nervio vago que censa infecciones viscerales y transmite la señal a núcleos cerebrales en regiones como el hipotálamo y la amígdala, ya sea uniéndose al endotelio vascular e induciendo la producción de prostaglandinas o finalmente pueden ingresar al cerebro mediante un sistema de transporte activo (85-87). Una vez en el cerebro, estas citoquinas estimulan su propia síntesis (88, 89). Esto produce la activación del eje HPA culminando en la secreción de glucocorticoides en la glándula adrenal. Los glucocorticoides regulan la respuesta inmune, poniéndole fin. Los mayores efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se producen a través de la inhibición de la actividad transcripcional de los factores de transcripción inflamatorios AP-1 y NFκB, de lo que resulta una inhibición de la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios (77, 90). El rol de los glucocorticoides no está restringido a estos factores de transcripción, sino que en los últimos años se ha expandido a otros factores incluyendo CREB, NFAT, STAT, T-bet y GATA-3, importantes mediadores de la respuesta inmune (91-93)

De esta manera, hay un profundo diálogo entre las citoquinas, la activación del eje HPA y la modulación por glucocorticoides, controlando en su conjunto la respuesta inflamatoria dado que el aumento en los niveles de glucocorticoides luego de la activación del eje HPA por las citoquinas proinflamatorias contribuye al mantenimiento de la homeostasis durante la respuesta inmune (94). La alteración de estos mecanismos de retorno a la homeostasis con inflamación crónica es uno de los procesos fisiopatológicos más determinantes en muchas enfermedades, incluyendo depresión (80, 84, 87, 95).

En roedores, la influencia de la inflamación sobre el comportamiento se asocia con el "comportamiento de enfermedad" (del inglés, "sickness behavior"), que se caracteriza por letargo, un disminuido interés por aquello que los circunda, aislamiento social y menor consumo de agua y comida. (84, 96, 97). Estos síntomas correlacionan con los síntomas de depresión en humanos. Los mediadores comunes de este tipo de comportamiento son las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6. TNFα e INF-γ (interferón gamma). Se ha visto en distintos modelos cómo estas moléculas inflamatorias pueden estar relacionadas con estados depresivos. El estrés crónico y agudo induce comportamiento anhedónico y efectos antineurogénicos en ratones, los cuales pueden ser revertidos mediante administración del antagonista del receptor de IL-1β, IL-1Ra (98, 99). IL-1β y TNFα parecerían tener un rol directo en depresión dado que inhiben la expresión de BDNF que, como se mencionó, es clave en los procesos depresivos. Como se dijo con anterioridad, un rasgo característico observado en pacientes con MDD son los elevados niveles de glucocorticoides. Sin embargo, a pesar del potente efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides, los pacientes con MDD muestran elevados niveles de citoquinas proinflamatorias en circulación, incluyendo IL-1, IL-6, TNFα y algunos receptores solubles de interleuquinas (100-102). Las citoquinas proinflamatorias participan no solo en la respuesta inmune innata y en los mecanismos de inflamación, sino que también tienen efectos metabólicos y endócrinos importantes que incluyen el metabolismo de neurotransmisores, la función neuroendócrina y la plasticidad neuronal. Sorprendentemente, la administración de IL-6 en animales induce un comportamiento depresivo y neutraliza el efecto antidepresivo de la fluoxetina (103). De manera similar, individuos tratados con citoquinas inflamatorias como IFN-α (interferón alfa) e IL-2 desarrollan un cuadro depresivo que es indiferenciable de la depresión (104, 105). Además, es muy habitual que la depresión acompañe a enfermedades donde hay una clara activación del sistema inmune, como por ejemplo enfermedad cardiovascular, diabetes de tipo 2 (106) y artritis reumatoidea. Así, individuos con antecedentes de infarto de miocardio poseen marcadores inflamatorios en circulación y una mayor incidencia de depresión (107, 108). Un meta análisis de pacientes con artritis reumatoidea mostraron un marcado aumento en la incidencia de depresión (109). Estas tres líneas de evidencia clínica, a saber: inducción de depresión por administración de citoquinas, incidencia aumentada de depresión en poblaciones afectadas con enfermedades inflamatorias crónicas o autoinmunes y biomarcadores de inflamación elevados en circulación, constituyen el fundamento de la hipótesis de la inflamación en depresión.

1.4. Astrocitos y depresión

La glía fue identificada en primera instancia en el siglo XIX como grupo de células no neuronales. En aquel entonces se consideraba que la glía no era más que un elemento de sostén para las neuronas y que no participaba en el procesamiento de la información. En las últimas dos décadas, la investigación ha cambiado esta percepción y se han generado evidencias de que la glía es un elemento dinámico fundamental y que interactúa constantemente con las neuronas participando en el metabolismo cerebral, la transmisión sináptica y la comunicación entre neuronas (110). El descubrimiento de nuevas funciones gliales coincide con el aumento de la evidencia que involucra a la glía en la neuropatología de desórdenes neurológicos y desórdenes psiquiátricos, tales como MDD y BPD (111, 112).

1.4.1. Tipos de células gliales

Las células más numerosas del cerebro son las de la glía, superando a las neuronas en un radio de 10 a 1. Este radio cae a 1 a 1 en roedores, lo que implica que el aumento de glía con respecto a las neuronas estaría asociado con un desarrollo progresivo de funciones cerebrales más complejas (113). La glía del SNC, colectivamente denominada como neuroglía, puede ser dividida en tres subtipos: los astrocitos, los oligodendrocitos (ambos derivados del ectodermo) y la microglía (que se origina a partir del linaje de los monocitos y macrófagos). Cada tipo glial está caracterizado por una morfología y funciones específicas y pueden ser distinguidas entre sí mediante inmunohistoquímica o microscopía.

Los tres tipos de glía del SNC tienen un rol crucial en el adecuado funcionamiento de las neuronas. Algunas funciones gliales están más especializadas y restringidas a un tipo particular de glía (por ejemplo los oligodendrocitos producen mielina para aislar a los axones neuronales), mientras que otras funciones son compartidas por varios tipos de glía (por ejemplo tanto los astrocitos como la microglía participan en la respuesta al daño neuronal y secretan neurotrofinas). Las funciones de la astroglía son de las más complejas entre las células gliales y las más relacionadas con la patofisiología de la depresión (114).

1.4.2. Astrocitos

Los astrocitos son el tipo celular glial más numeroso y versátil. Habitualmente, sus proyecciones se adhieren a los vasos sanguíneos formando prolongaciones, de manera que envuelven al vaso y forman una membrana limitante. Así, tienen un rol fundamental en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica, de modo de restringir el pasaje de moléculas solubles y sustancias tóxicas desde la sangre hacia el cerebro. Además, dichas prolongaciones son muy ricas en transportadores de glucosa, lo que permite que los astrocitos capten glucosa, el principal combustible energético para las neuronas y la glía.

Los astrocitos expresan todos los receptores y canales iónicos descriptos en neuronas (115-118). Además, modulan los niveles extracelulares de neurotransmisores a través de transportadores específicos localizados en sus prolongaciones. Este sistema de transportadores regula tanto la disponibilidad como la recaptación de neurotransmisores a nivel sináptico (119). Se ha visto que los astrocitos son importantes en la recaptación de glutamato (120), GABA (121), serotonina (122), dopamina (123), noradrenalina e histamina (123); y que poseen las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT), ambas necesarias para regular los niveles extracelulares de estos neurotransmisores (124). Por otra parte, la habilidad que poseen los astrocitos en cultivo de captar serotonina puede ser bloqueada mediante el tratamiento con fluoxetina o paroxetina (122), lo que sugiere que la glía participaría junto con las neuronas de los efectos terapéuticos de estos compuestos en depresión. De esta manera, los astrocitos constituyen un elemento crucial en la "sinapsis tripartita" entre la neurona presináptica, las prolongaciones del astrocito y la neurona postsináptica, promoviendo la comunicación eficiente entre las neuronas.

Los astrocitos participan activamente en la recaptación, metabolismo y reciclado del glutamato. Mediante la recaptación del mismo, los astrocitos regulan los niveles extracelulares mediante un transportador de glutamato expresado exclusivamente en astrocitos (GLT-1 en roedores y EAAT-2 en el cerebro humano) (120). Sorprendentemente, el 90% de la recaptación de glutamato cerebral se debe a este transportador (125). Dado que las concentraciones elevadas de glutamato extracelular producen muerte neuronal, se infiere que los astrocitos tienen un rol importante en la neuroprotección por medio de la disminución de dichos niveles (111). Así, los niveles disminuidos de glutamato extracelular protegen a las neuronas y la deleción de *GLT-1* en ratones produce daño neuronal (115).

Por otra parte, los astrocitos cumplen un rol en los procesos inflamatorios y neurodegenerativos. Estos, la microglía y los oligodendrocitos son a la vez la fuente y el blanco de varias citoquinas inflamatorias (por ejemplo IL-1, IL-6 y TNFα), que como ya se explicó se expresan en condiciones patológicas y están involucradas en la regulación de la neuroinflamación. Los astrocitos responden activamente frente al daño neuronal, por lo que participan en los procesos neurodegenerativos; se activan en respuesta al daño, aumentando su tamaño y número. Los astrocitos así activados también sintetizan y liberan neurotrofinas tales como NGF, BDNF y GDNF (del inglés, glial-derived neurotrophic factor) (124). Como ya se mencionó, estos factores son importantes para la supervivencia neuronal, crecimiento, diferenciación y en la plasticidad y eficiencia sináptica, por lo que son cruciales en la patofisiología de la depresión (126). Por todo ellos se considera potencialmente a la glía como un nuevo blanco para la acción de los tratamientos antidepresivos (126).

La alteración de las funciones descriptas o el cambio en el número y morfología de las células gliales en áreas del cerebro relacionadas con aspectos emocionales del comportamiento podría ser un factor etiológico en el inicio o progresión de los desórdenes depresivos. Efectivamente, en pacientes con MDD o BPD, se detecta menor número de células gliales en estas áreas, lo cual puede ser una consecuencia de varios factores que impidan un normal desarrollo o función glial en el contexto de depresión. Hay varios factores que podrían estar influyendo sobre la glía en la neurofisiología de la depresión, entre ellos hormonas del estrés, neurotransmisores como glutamato o noradrenalina y citoquinas inflamatorias (114).

1.5. Componente genético en depresión

La depresión tiene un fuerte componente genético que contribuye en gran medida a la etiología de la enfermedad. Esta afirmación se basa en las observaciones realizadas en estudios familiares de gemelos y adopción, donde se vio que la heredabilidad de los trastornos depresivos es alta, siendo de entre 34% y 42% para MDD (127) y entre 60% y 85% para BPD (128). Sin embargo, la identificación de genes de susceptibilidad para depresión mediante estudios de asociación y ligamiento genético ha sido muy complicada, y muchos hallazgos en este sentido no han podido ser reproducidos (129).

La identificación individual de genes candidatos asociados a MDD y BPD es difícil dado que estas enfermedades psiquiátricas complejas están bajo la influencia de muchos

genes en simultáneo y están asociadas con la interacción entre las variantes génicas y la exposición a factores ambientales (130). De esta manera, MDD ha sido asociado con polimorfismos en el gen del receptor de glucocorticoides *NR3C1* (131), el gen de la MAO (132), el gen de la glicógeno sintasa kinasa 3β (133) y el gen del receptor metabotrópico de glutamato *GRM3* (134).

Se han obtenido mejores resultados cuando se estudiaron genes asociados con mecanismos biológicos conocidos o con vías metabólicas de drogas antidepresivas. Por ejemplo, existe una inserción funcional en el promotor del gen del transportador de serotonina *SLC6A4*, que junto con distintos polimorfismos de nucleótido único no sinónimos (del inglés, SNP) en el gen del receptor de serotonina 2a están asociados con la respuesta a los antidepresivos basados en la respuesta a serotonina (135). También se ha encontrado que el gen glutamatérgico *GRIK4* y un polimorfismo en el gen *BDNF* están asociados con la respuesta a distintos antidepresivos (136). Variaciones genéticas en el gen *FKBP5*, que codifica para una cochaperona del receptor de glucocorticoides que contribuye a la unión del cortisol, se asocian con la respuesta a antidepresivos (137), al igual que una variante del gen de la COMT que altera su actividad (138). Otros estudios de asociación genética a gran escala sugieren que la efectividad de los antidepresivos se puede prever por marcadores genéticos distintos a los tradicionales. Estos nuevos genes incluyen a *CRHR1* y al gen que codifica para la proteína de unión a CRH (CRHBP) (139).

Por último, un gen candidato para susceptibilidad a desórdenes del comportamiento es *P2RX7*, el cual ha sido identificado repetidamente en varios estudios genéticos de los últimos años (140-142). Este gen codifica para el receptor P2X7, un canal de calcio con funciones muy importantes en el SNC. Este receptor es el objeto de estudio de esta tesis, por lo que a continuación se ofrece un resumen del conocimiento actual sobre esta molécula.

2. Receptores purinérgicos

El nucleótido adenosina trifosfato (ATP) es la fuente de energía libre empleada por todas las células. En la década de 1950 se observó por primera vez que algunos nervios liberaban ATP (143), lo que llevó a proponer la existencia de “nervios purinérgicos” (144). Este concepto resultó muy significativo dado que le confirió una acción extracelular a una molécula históricamente restringida al espacio intracelular. En la actualidad hay fuertes

evidencias a nivel molecular, celular y sistémico que dan cuenta de los mecanismos de señalización mediados por ATP durante diversos procesos fisiológicos, lo que coloca a la señalización por ATP en un lugar de gran importancia. En términos evolutivos, el ATP resulta indispensable no solamente dentro de las células como molécula de energía, sino también como molécula de señalización entre ellas (145).

La transmisión purinérgica (así llamada debido a que los neurotransmisores son derivados de purinas, entre ellos el ATP) consiste en la liberación de estas a través de nervios a modo de transmisor o cotransmisor, que actúan como moléculas de señalización extracelular tanto en sinapsis como en uniones neuroefectoras. Al día de hoy, se cuenta con extensas pruebas del papel neurotransmisor del ATP, si no en todas, en la mayoría de las neuronas centrales y periféricas. Así, se fue observando cómo esta molécula tiene un papel tanto fisiológico como patológico en el organismo, lo que convierte a estos mecanismos de comunicación en importantes blancos terapéuticos para combatir un variado número de afecciones (146).

La existencia de receptores purinérgicos se halla implícita en el concepto de transmisión purinérgica. En un primer momento, se dividió a estos receptores en dos grandes familias, receptores P1 activables por adenosina y receptores P2 cuyo ligando es el ATP/ADP (147). Luego de muchos estudios para caracterizar a estos receptores que incluyen, entre otros, análisis farmacológicos, estructurales y de transducción de señales, se dividió a su vez a los receptores P2 en dos subfamilias, a saber: receptores P2X que son canales iónicos activados por ligando y receptores P2Y acoplados a proteínas G. En la actualidad se conocen siete subunidades de receptores P2X y ocho de P2Y (148).

2.1. Receptores P1

Los receptores P1 tienen como ligando a la adenosina. Hasta el momento han sido clonados cuatro subtipos, identificados como A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3 respectivamente. Su característica distintiva es que son receptores acoplados a proteína G. Como tales, poseen siete dominios transmembrana de aminoácidos hidrofóbicos, cada uno de ellos conformado por una α-hélice de entre 21 y 28 aminoácidos. El extremo aminoterminal se ubica en el espacio extracelular mientras que el extremo carboxílico es citosólico. Las porciones intracelulares interactúan con la proteína G apropiada, de modo de desencadenar la transducción de señales intracelulares al activarse el receptor. En cuanto a la unión del ligando, los residuos

aminoacídicos entre las regiones transmembrana son los más importantes, así como también los que confieren especificidad a esta unión (149). Los receptores P1 se expresan predominantemente en tejidos neuronales. Así, se los puede encontrar en neuronas de corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y médula espinal, pero también en sistema nervioso periférico. En cuanto a su función, los receptores de adenosina pueden inhibir (receptores A_1) o estimular (receptores A_2) la comunicación entre neuronas. De esta manera, contribuyen a una fina regulación de la función neuronal. Se ha reportado que la manipulación de estos receptores da lugar a alteraciones en el sueño, mecanismos cognitivos y memoria, daño neuronal y neurodegeneración (150, 151).

2.2. Receptores P2

Como ya se mencionó, los receptores activables por ATP o ADP, se pueden clasificar en canales iónicos P2X y receptores P2Y acoplados a proteínas G. Esta característica permite referirse a los primeros como receptores purinérgicos "rápidos", mientras que a los P2Y se los califica como receptores "lentos" debido a la necesidad de desencadenar toda una cascada de eventos de señalización intracelular para producir sus efectos. Los receptores P2X producen respuestas en el rango de los milisegundos dado que la unión del ligando desencadena directamente la apertura del canal. Debido a esta propiedad y a su afinidad relativamente baja por el ATP (en el rango micromolar), los receptores P2X son capaces de transmitir la señalización rápida a cortas distancias, como en el caso de liberación de este neurotransmisor desde una vesícula sináptica. Este fenómeno podría estar facilitando la liberación de otros neurotransmisores debido a la permeabilidad intrínseca de P2X al calcio, el ion que dispara la exocitosis. De todos modos se debe tener en cuenta que la alta permeabilidad al calcio de la mayoría de los receptores P2X influencia un amplio abanico de respuestas intracelulares, con cursos temporales que pueden exceder la duración de las corrientes iónicas causadas por la activación del receptor en sí mismo (152). Por el contrario, los receptores P2Y se activan por concentraciones nanomolares de ATP (mayor afinidad del receptor por su ligando) y esta unión dispara la producción de segundos mensajeros intracelulares que, además de amplificarla enormemente, prolongan su duración cientos de milisegundos e incluso segundos (153). Por ejemplo, la propagación de oleadas de calcio inducidas por ATP en astrocitos es una respuesta lenta mediada por la activación de receptores P2Y. Esta característica hace que los receptores P2Y sean apropiados para llevar a cabo funciones neuromodulatorias dado que

pueden detectar menores niveles de ATP desde grandes distancias del sitio de liberación (154).

2.3. Receptores P2Y

Hasta el momento se han caracterizado 8 receptores P2Y metabotrópicos: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, y $P2Y_{14}$. Los mismos poseen siete dominios transmembrana, que influyen en la formación del sitio de unión del ligando con el extremo amino terminal extracelular y el carboxilo terminal intracelular. Este último dominio posee motivos con secuencias consenso para proteínas quinasas. Entre las distintas variantes de estos receptores, son varios los dominios transmembrana que tienen alta homología de secuencias mientras que los *loops* intracelulares y el extremo carboxilo terminal son estructuralmente muy diversos, poniendo de manifiesto su capacidad de unir a distintas proteínas G, del tipo $G_{q/11}$, G_s, G_i o $G_{i/o}$, iniciadoras de la señalización intracelular. En respuesta a la activación por nucleótidos se pueden activar, o bien las vías de la fosfolipasa C (PLC) y liberarse calcio de depósitos intracelulares, o bien la adenilil ciclasa, modificándose los niveles de AMP cíclico (AMPc) (155).

Los receptores P2Y no se activan solamente por ATP sino también por otros nucleótidos, como ADP, UTP, UDP y glucosa UDP (156), de modo que cada receptor P2Y tendrá distintas afinidades para cada ligando, obteniéndose un perfil para cada uno de ellos, lo que permite, a grandes rasgos, caracterizarlos como receptores de mayor afinidad por nucleósidos tri ($P2Y_{2, 4, 11}$) o difosfatos ($P2Y_{1, 6, 12, 13, 14}$). Desde un punto de vista funcional esta clasificación parece particularmente importante. Varios tipos celulares liberan nucleótidos al espacio extracelular los cuales se transforman en otras especies mediante ectoenzimas (157). El ATP, por ejemplo, se convierte en ADP, luego en AMP y finalmente en adenosina por distintas ectoenzimas presentes en la superficie de la membrana extracelular (158).

En cuanto a su patrón de expresión, se ha visto que $P2Y_{1, 2, 6, 13, 14}$ están presentes en una amplia variedad de tejidos, incluyendo el sistema nervioso, mientras que $P2Y_4$ y $P2Y_{11}$ tienen un patrón restringido que excluye a tejidos neuronales. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la proteína de $P2Y_1$ son detectados en altos niveles en varias regiones del SNC incluyendo la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo. Mediante hibridación *in situ* de cortes cerebrales, la expresión de $P2Y_{12}$ coincide ampliamente con el tejido glial, y el ARNm de $P2Y_{13}$ es detectable en distintas regiones del cerebro tales como el tálamo, el hipocampo y el cerebelo (159, 160).

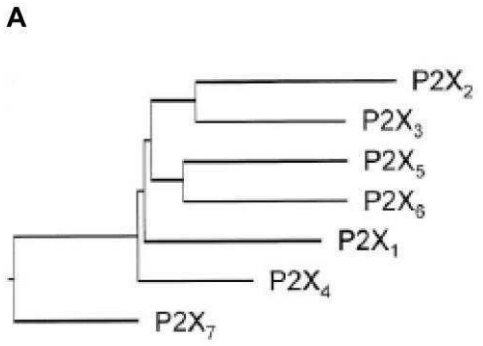
Entre las funciones más importantes de estos receptores se encuentra su papel modulador sobre los canales iónicos neuronales, que es el de adaptar las respuestas de las neuronas frente a cambios en los estímulos recibidos debido a modificaciones del ambiente externo. Los efectos de la activación de receptores P2Y sobre los canales iónicos neuronales que mejor se han observado son la inhibición de corrientes de calcio activadas por voltaje y la activación de canales de potasio dependientes de calcio. De este modo la modulación ejercida por los receptores P2Y produce en última instancia cambios en la liberación de neurotransmisores, por ejemplo la inhibición de la liberación de acetilcolina y noradrenalina mediante sitios de acción presinápticos en corteza e hipocampo, o casos tanto de inhibición como de facilitación en la liberación de dopamina, serotonina y glutamato a nivel presináptico. Esta modulación podrá tener efectos tanto pre como post sinápticos, de acuerdo a la localización de los receptores en cuestión (161).

2.4. Receptores P2X

Entre los canales iónicos que se activan mediante neurotransmisores se encuentran los receptores de la familia P2X. Estos canales se hallan entre los más simples que se conocen. Su ligando natural es el ATP y la unión del mismo produce la activación del receptor mediante un cambio conformacional permitiendo la apertura del canal iónico, aumentando así la permeabilidad a cationes pequeños como Na^+, K^+ y Ca^{+2}. Este último es el catión que más permea en estos canales.

Los receptores P2X se componen de siete subunidades (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7), que comparten desde un 40% hasta un 55% de identidad de secuencia a nivel peptídico. En todas las especies analizadas, la secuencia de P2X4 es la que más se parece al resto de las subunidades, mientras que P2X7 es la que más difiere del resto (Figura 1) (162).

P2X6 es la forma más corta, con 379 aminoácidos, en tanto que P2X7 es la subunidad más larga con 595 aminoácidos (163).



B

% de identidad

$P2X_1$	$P2X_2$	$P2X_3$	$P2X_4$	$P2X_5$	$P2X_6$	$P2X_7$	
100	31.8	37.3	46.6	35.8	39.8	32.1	$P2X_1$
	100	40.6	39.2	37.1	35.1	26.3	$P2X_2$
		100	40.5	37.5	35.1	31.0	$P2X_3$
			100	45.6	40.9	38.1	$P2X_4$
				100	45.4	26.8	$P2X_5$
					100	28.2	$P2X_6$
						100	$P2X_7$

Figura 1. Similitud entre subunidades de receptores P2X. (Tomada y modificada de Khakh et al., 2001(162)). (**A**) Dendograma de distancias entre las 7 subunidades de receptores P2X. (**B**) Porcentaje de identidad entre las 7 subunidades de P2X7 derivado de un alineamiento de secuencias.

Cada subunidad posee dos regiones hidrofóbicas de suficiente longitud como para cruzar la membrana. La primera región transmembrana parecería estar involucrada en la apertura del canal y la segunda formaría la pared del mismo. Estas regiones están separadas por la mayor parte de la proteína, de modo que la misma es predominantemente extracelular. Este *loop* extracelular comienza alrededor del aminoácido 52 y termina cerca de la prolina 329, inmediatamente antes del segundo dominio transmembrana y posee una alta glicosilación en tres residuos asparragina. La deleción de cualquiera de ellos produce la pérdida de función del canal. En este *loop* se pueden encontrar el sitio de unión al ATP, así como también sitios de unión de cationes (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{+} y Cu^{2+}) que pueden modular la actividad del receptor. La porción extracelular parece ser la más conservada, sobre todo diez residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuro intracatenarios que estabilizan la estructura terciaria de cada subunidad (Figura 2) (162).

Los extremos amino y carboxilo terminal se ubican en la porción citosólica. Los extremos amino terminales de todas las subunidades resultan ser cortos en relación a la porción carboxilo terminal, pero todos poseen la secuencia consenso para la proteín quinasa C (PKC), que pareciera ser importante para impedir la rápida desensibilización del receptor.

El extremo carboxilo terminal varía mucho de tamaño entre las diferentes subunidades, desde 28 en P2X6 a 242 residuos en P2X7. Esta porción del receptor tiene secuencias consenso para unión de proteín quinasas y otros elementos de señalización, de modo que está involucrado en la propagación de señales intracelulares (164).

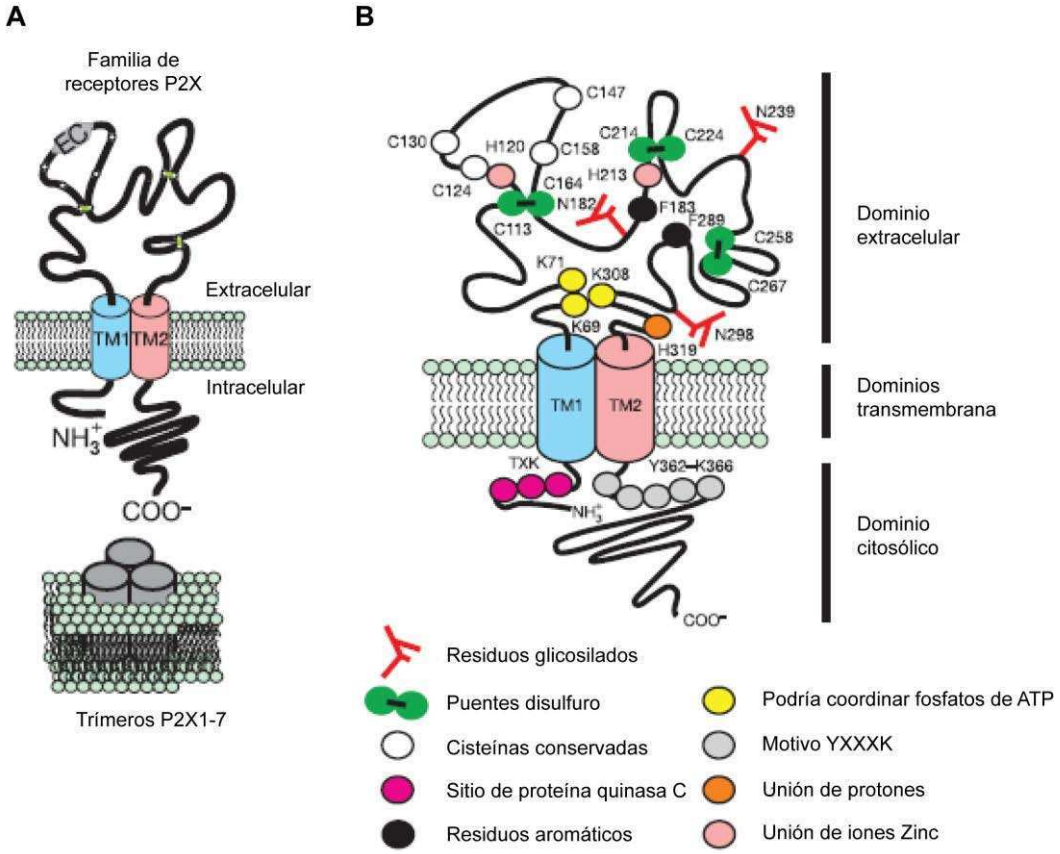


Figura 2. Familia de receptores P2X. (Tomada y modificada de Khakh y North, 2006 (145)). Esta familia de receptores de ATP comprende siete subunidades, $P2X_{1-7}$, que comparten varias características. (**A**) Todas las subunidades poseen 2 dominios transmembrana y una gran porción extracelular. En todos los casos el extremo amino terminal es más corto que el carboxilo terminal. Además, el canal iónico está conformado por tres subunidades de P2X que se asocian para formar trímeros en la membrana plasmática. (**B**) Topología y características distintivas de las subunidades de receptores P2X. Los números de los residuos corresponden a los receptores P2X2 de rata.

La estequiometría de este receptor estuvo largo tiempo en discusión pero en la actualidad se acepta que cada canal está conformado por tres subunidades que componen un trímero muy estrecho (Figura 2A) (164). Los trímeros pueden estar formados por subunidades idénticas o ser heterotrímeros. Cada subunidad presenta distintas afinidades al momento de asociarse con otras subunidades, siendo P2X5 la más promiscua dado que forma heterotrímeros con cualquier subunidad (163).

Como ya se mencionó, los receptores P2X se encuentran en casi todos los tejidos del organismo. En particular, en el sistema nervioso median la transmisión sináptica rápida del ATP a distancias cortas. Cada miembro de esta familia presenta distintos perfiles de expresión en el organismo y cumple variadas funciones, a veces, solapándose, otras, mostrando características únicas. P2X1 se activa sinápticamente en músculo liso, pero su función fisiológica en neuronas no es clara y su expresión es poco frecuente. Por el contrario, los

receptores P2X2 se hallan ampliamente representados en el sistema nervioso (neuronas mientéricas, células cromafines, células de Purkinje en cerebelo, neuronas del ganglio retinal) y tienen un papel muy importante en el SNC, autónomo y sensorial. La subunidad P2X3 se expresa solamente en neuronas sensoriales que detectan y transmiten las señales de dolor, mediando corrientes típicas de este receptor. P2X4 y P2X6 se expresan abundantemente en el SNC. P2X4 se encuentra en cerebelo, hipocampo y médula espinal mientras que P2X6 está asociado al sistema hipotálamo-neurohipofisario, regulando indirectamente la producción de hormona antidiurética en el núcleo supraóptico del hipotálamo. En cuanto a P2X5, es abundante en la región mesencefálica del cerebro donde media estímulos excitatorios. También se lo encuentra en médula adrenal, timo y linfocitos, donde su función aún no es del todo clara (164).

En neuronas, los receptores P2X se localizan tanto en el sinaptosoma como en el cuerpo celular. Estos últimos median efectos presinápticos, modificando la transmisión sináptica mediante mecanismos de facilitación o inhibición, según sea la localización del receptor en relación a la liberación del neurotransmisor en cuestión y al cambio de conductancia en la terminal nerviosa. En cuanto al sinaptosoma, es aquí donde el ATP puede modular la liberación de varios neurotransmisores como noradrenalina, ATP, ácido γ-aminobutírico (GABA), glutamato y acetilcolina, mediante la activación de canales P2X (165). De todos modos, se ha visto que la expresión de receptores P2X es mucho más importante a nivel postsináptico, es decir que forman parte de la transmisión sináptica mediada por el neurotransmisor ATP (166). Además, el ATP sináptico no es la única fuente de activación de los P2X: los astrocitos liberan ATP durante la estimulación química o mecánica (que recrea situaciones de injuria al sistema nervioso). Este ATP liberado modula la actividad de neuronas y sinapsis cercanas (167). Esta característica coloca a los receptores P2X en la mira como posibles mediadores de mecanismos fisiopatológicos del SNC.

3. Receptores P2X7

Como ya se dijo, las subunidades P2X7 son las que más difieren en su secuencia del resto de la familia de P2X. Por esta razón fue la última subunidad en ser identificada como tal e incorporada a la familia de receptores P2X. Previamente era nombrado como receptor P2Z y se lo estudiaba en macrófagos, el tipo celular donde se había encontrado su máxima expresión

(168). La función más estudiada era su rol en inflamación a nivel periférico: el ATP promueve el procesamiento y la liberación de citoquinas proinflamatorias (predominantemente IL-1 e IL-6) en macrófagos previamente activados con LPS actuando sobre estos receptores P2Z (169). Solo cuando se clonó este receptor a partir de una biblioteca de ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) de rata fue que se reconoció la necesidad de incluirlo en la familia de los P2X (170). Luego del primer clonado de *P2RX7* en rata, se identificaron los genes correspondientes en otras especies: humano (171), ratón (172) y *Xenopus laevis* (173), que tienen un nivel de homología en su secuencia aminoacídica de 80%, 85% y 50% respectivamente.

3.1. Expresión de los receptores P2X7

Los primeros estudios de expresión de P2X7 detectaron una amplia distribución de su ARNm, con una alta expresión en el sistema inmune como en timo y en bazo, pero también en otros órganos incluyendo cerebro, médula espinal, músculo esquelético, pulmón y placenta (170, 171). En los últimos años se empezó a estudiar el rol de P2X7 en el SNC . Los primeros estudios detectaron expresión de ARNm en el cerebro solamente en células ependimarias y de la microglía (174). Así, a pesar de haber sido clonado a partir de cerebro de rata, se propuso que el receptor P2X7 no se expresa en neuronas y se argumentaba que la expresión detectada en cerebro se debía a las células no neuronales del sistema nervioso. Sin embargo, utilizando métodos más sensibles de detección de RT-PCR e hibridación *in situ* se detectó expresión de P2X7 en varias áreas del SNC tales como la corteza, el hipocampo (175), el tronco del encéfalo (176) y la médula espinal (177-179). En estos tejidos se detectó que no solo se expresa en células gliales sino también en neuronas (180-183).

Es importante destacar que algunos estudios consideraron que la expresión de P2X7 en neuronas era materia de controversia, por la dificultad de detectar específicamente a P2X7 a nivel proteico, dada la falta de anticuerpos específicos (184-186). De cualquier manera, enfoques farmacológicos y el uso de ratones *knock out* demostraron el rol inequívoco de P2X7 en la regulación de distintas funciones neuronales, como se detalla en secciones posteriores (187-189).

3.2. Estequiometría de los receptores P2X7

Como se mencionó previamente, los distintos subtipos de P2X pueden asociarse de manera cruzada para conformar receptores triméricos compuestos por más de un subtipo (163, 190, 191). Esta heteromerización puede alterar tanto las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores, de manera que es muy importante tener en cuenta esta posibilidad al momento de analizar la funcionalidad de estos receptores (192, 193). Históricamente se consideró que los receptores P2X7 son los únicos de la familia de P2X que no se asocian con los demás subtipos, de modo que solamente forman receptores homoméricos (194, 195). Sin embargo, se ha propuesto que P2X7 podría asociarse en forma heteromérica con subunidades de P2X4 en sistemas de expresión heteróloga (196, 197). De cualquier manera, las evidencias experimentales más importantes afirman que la conformación de homotrímero es la forma predominante de P2X7 *in vivo* (198).

3.3. Activación y propiedades farmacológicas de P2X7

El sitio de unión para el ATP en los receptores P2X7 se ubica en el dominio extracelular del receptor, entre las regiones transmembrana, de manera similar a los otros subtipos P2X. La activación de P2X7 produce dos respuestas marcadamente distintas que dependen del tiempo de exposición al ATP, su ligando natural. A tiempos cortos se produce la apertura del canal de calcio, como ocurre con las otras subunidades P2X, aunque con distintas características cinéticas, pero en contacto prolongado o repetido con el ATP, se produce la apertura de un poro en la membrana plasmática que permite el paso de moléculas e iones de hasta 900 Da (170). La formación de este poro está asociada con un rearreglo en la estructura del citoesqueleto y desorganización de la membrana, que produce muerte celular, al menos en células inmunes (199, 200). El largo dominio carboxilo terminal de P2X7 es fundamental para la formación del poro. (170, 201).

Las características farmacológicas de activación del receptor P2X7 son notoriamente distinguibles con respecto a los demás miembros de la familia de P2X. Las principales características distintivas de los receptores P2X7 con las siguientes:

1) Baja potencia del ATP endógeno para activarlo, en comparación con el resto de los receptores P2X (requiere entre 100 mM y hasta 3 mM ATP para activarse), incluso en sistemas recombinantes y tejidos. Cabe aclarar que el resto de los receptores P2X se activan

con concentraciones relativamente bajas de ATP, en el orden de los pocos micromoles (163).

2) Alta sensibilidad -entre 10 y 30 veces más- al análogo 2', 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)ATP (BzATP) en comparación al ATP. Es por esto que se considera a BzATP como un ligando selectivo para P2X7 (202), aunque en modelos de coexpresión de varios receptores P2X se ha detectado que a altas concentraciones puede activar otros receptores como P2X1 y P2X3 (203).

3) Una marcada potenciación de su respuesta al reducir la disponibilidad extracelular de cationes divalentes como Zinc y Magnesio (204).

4) El compuesto Brilliant Blue G es un antagonista no competitivo muy potente, con una gran selectividad hacia los receptores P2X7 en el rango nanomolar, con valores IC50 de 10 nM para P2X7 de rata (205).

5) En comparación al resto de los P2X, P2X7 es un tipo de receptor de lenta desensibilización. Incluso, luego de muchos segundos de activación no se detecta desensibilización (163).

3.4. Mecanismos de transducción de señales asociados a P2X7

A nivel estructural, los receptores P2X7 difieren del resto de los P2X en que su dominio carboxilo terminal -ubicado en la cara citosólica- es mucho más largo. Este largo dominio citoplasmático le confiere propiedades únicas, tales como poseer la capacidad de activar mecanismos de señalización intracelulares y formar un complejo multiproteico que se asocia al receptor por medio del dominio citoplasmático (**Figura 3**). Este complejo multiproteico consta de al menos 11 proteínas que fueron oportunamente identificadas por espectrometría de masa (206). Entre ellas hay proteínas estructurales (subunidades específicas de laminina, integrina y actina), chaperonas (Hsp90 y Hsp70) y moléculas de señalización (PI4K y RPTPβ). Dichas moléculas de señalización comprenden el primer eslabón en la activación de la cascada de señalización intracelular de P2X7.

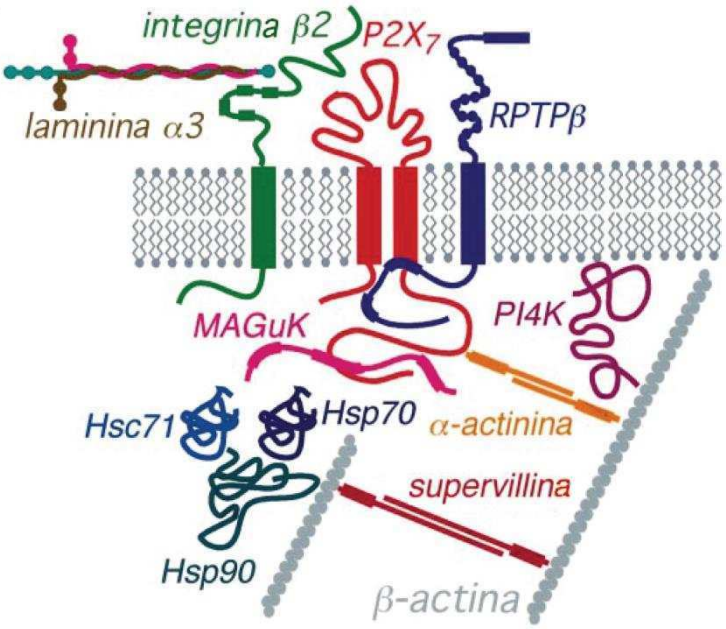


Figura 3. P2X7 y componentes del complejo multiproteico asociado. (Tomada y modificada de Kim et al., 2001 (206)). P2X7 posee una larga cola citoplasmática, que favorece su interacción con varias proteínas. Entre estas hay componentes del citoesqueleto (β-actina, α-actinina, supervillina), moléculas de señalización intracelular (4-fosfatidil inositol quinasa, PI4K y proteína tirosina fosfatasa β, RTPβ) y chaperonas (Hsp70, Hsc71 y Hsp90) .

La primera señal intracelular que sigue a la activación de los receptores P2X7 es un aumento sostenido en el nivel del calcio intracelular provocado por el influjo iónico a través del canal. Este efecto es el desencadenante de la activación de varias cascadas de señalización que producen distintos efectos. Entre éstos se pueden mencionar la liberación de neurotransmisores por liberación directa de vesículas dependiente de calcio y la modificación de la expresión génica por activación de distintos factores de transcripción, luego de la activación de diversas vías de quinasas.

La vía de transducción que más se ve modificada por la activación del receptor es la de las MAPK. Entre ellas, se ha observado que tanto en astrocitos como en microglía, la activación de P2X7 produce la fosforilación de ERK 1/2, JNK y p38, proteínas todas involucradas en procesos de apoptosis y activación de factores de transcripción inflamatorios, como NFκB, CREB y AP-1 (207). Al parecer, la activación de ERK 1/2 puede estar mediada por una vía dependiente de calcio y otra independiente. En la primera, el influjo de calcio favorece la fosforilación de residuos tirosina por la quinasa Pyk2 activable por calcio. Este evento amplifica la señal, dado que activa a PI3K, uno de los intermediarios en la activación de ERK 1/2, y también se reclutan moléculas adaptadoras como Shc que, mediante la

interacción con Grb2 y posterior activación del intercambiador de nucleótidos Sos, se activa la cascada de Ras, que produce la activación de la quinasa de ERK 1/2, MEK 1/2. En cuanto a la vía independiente de calcio, la activación de P2X7 estimula a la fosfolipasa D (PLD) que provoca un aumento del segundo mensajero diacilglicerol (DAG) que activa a la proteín quinasa C (PKC), en particular, la variante independiente de calcio, PKCδ (208). Un resumen de las vías de señalización activadas en células de la glía se muestra en la **Figura 4.**

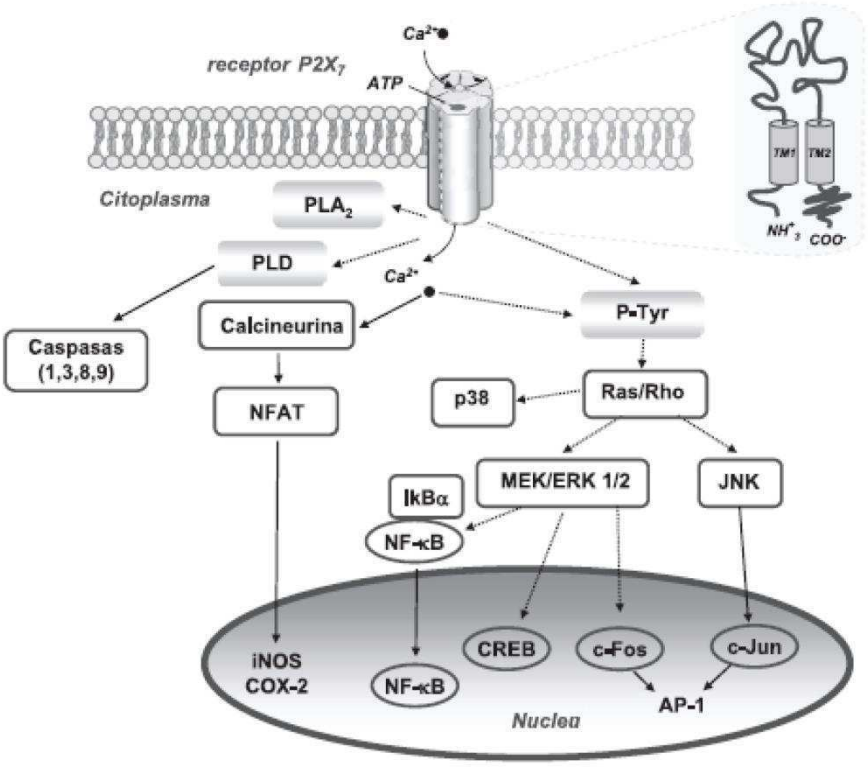


Figura 4. Vías de señalización activadas por el receptor P2X7 en células de la glía. (Tomada y modificada de Skaper et al., 2010 (209)). La activación de P2X7 produce la apertura del canal de modo rápido y reversible, el cual es muy permeable a calcio. El estímulo continuo puede producir la formación de un poro en la membrana de células de la microglía. La entrada de calcio activa a calcineurina y se activa el factor de transcripción NFAT. La activación de P2X7 también produce la activación de las fosfolipasas A2 y D (PLA2 y PLD), la fosforilación de tirosinas (P-Tyr) y la activación de la vía de las MAPK (MEK, ERK 1/2). Esta última vía influye sobre la actividad de los factores de transcripción NFκB, CREB y AP-1.

La vía de transducción de señales que involucra a ERK 1/2 resulta de particular interés en el contexto del SNC dado que tiene múltiples efectos modulatorios. Entre ellos, participa en procesos de neurogénesis y sobrevida neuronal modulando la apoptosis. Además, modula la actividad sináptica y los procesos de memoria y aprendizaje. Tiene un papel importante en procesos asociados a cambios en la conducta y trastornos del comportamiento en cuadros de ansiedad y depresión (58, 210).

3.5. Funciones en SNC

Dada la baja afinidad mencionada de los receptores P2X7 por su ligando endógeno, el ATP, cabe preguntarse bajo qué condiciones se acumulan concentraciones suficientemente elevadas de ATP extracelular como para activarlo. La disponibilidad de ATP extracelular en el sistema nervioso está determinada básicamente por el balance entre su liberación y su remoción mediante degradación enzimática. Dado que el ATP es ubicuo, todas las células metabólicamente activas del sistema nervioso son capaces de sintetizar este nucleótido, hecho que genera una enorme fuente para su liberación. Así, las fuentes celulares del ATP liberado para la activación de P2X7 podrían ser tanto neuronas, astrocitos, tejido endotelial y microglía (186). La mayor parte del ATP celular se genera en la mitocondria por fosforilación oxidativa. Luego, el mismo es captado y almacenado en vesículas sinápticas de las terminales nerviosas y de astrocitos. Hay distintos estímulos que podrían elevar las concentraciones de ATP en las cercanías de neuronas, astroglía y microglía expresora de P2X7 (211). En primer lugar, la actividad neuronal puede producir liberación de ATP en el espacio sináptico. Dado que esta es un área confinada, se produce un aumento localizado de la concentración de ATP y se activan los receptores P2X7, siempre y cuando los mismos se encuentren en dicho espacio (212). Por otra parte, la liberación de ATP se puede ver fuertemente aumentada debido a eventos patológicos como estrés mecánico o metabólico (213-215), señales inflamatorias como LPS e IL-1β y daño celular (216, 217). Estos eventos pueden producir un aumento en los niveles de ATP extracelular, lo que produce una activación generalizada de los receptores P2X7. Finalmente, teniendo en cuenta que la concentración intracelular libre de ATP se encuentra en el rango milimolar, el daño celular y la liberación masiva del ATP provoca concentraciones milimolares muy elevadas de ATP en el espacio extracelular (Figura 5).

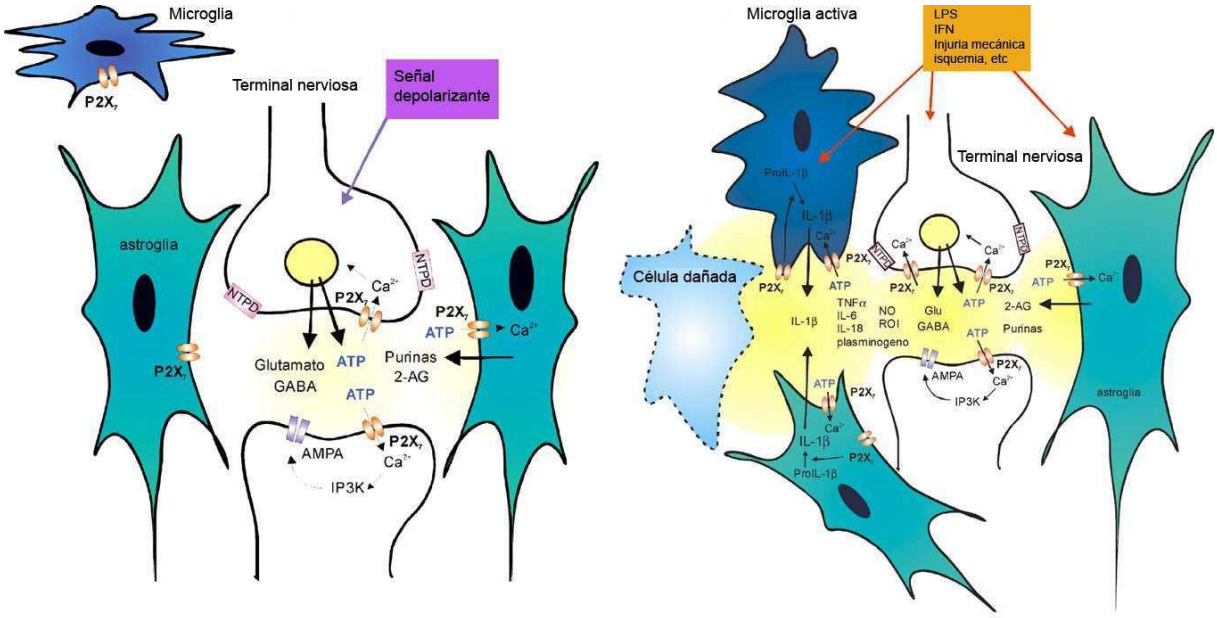


Figura 5. Mecanismos de activación de P2X7 en SNC. (Tomada y modificada de Sperlágh et al., 2006 (186)). (**A**) La despolarización de las terminales nerviosas durante la actividad neuronal fisiológica produce un aumento localizado en el ATP extracelular que activa los receptores P2X7 cercanos, sea en astrocitos o neuronas. Esto afecta la neurotransmisión alterando la eficacia sináptica a nivel pre o post sináptico. Así, P2X7 participa en la plasticidad neuronal involucrada en distintas funciones neuronales. (**B**). Las situaciones de estrés, como estrés mecánico, metabólico o inflamatorio y daño celular producen un ambiente rico en ATP extracelular, hecho que genera la activación masiva de los receptores P2X7 en astrocitos y microglía, potenciando distintos mecanismos de señalización patológicos, como toxicidad por glutamato, estrés oxidativo y liberación de citoquinas proinflamatorias.

3.6. Liberación de neurotransmisores

Un primer estudio evidenció la participación de los receptores P2X7 en la función neuronal a nivel presináptico (177), donde se describió que el BzATP despolarizaba e incrementaba el potencial de acción de las neuronas glutamatérgicas en médula espinal. Así, se propuso que P2X7 tiene una función predominante en el sistema nervioso promoviendo la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico. Dada la alta permeabilidad al calcio de P2X7, esta liberación de neurotransmisores puede iniciarse directamente por la activación del canal sin necesidad del disparo de potenciales de acción que activen canales de calcio dependientes de voltaje, siempre y cuando se localicen cerca de los sitios de las terminales nerviosas (212). Esta hipótesis fue luego comprobada en distintos modelos experimentales, como por ejemplo en corteza e hipocampo (182, 189, 218). También se detectó que los receptores P2X7 pueden promover la liberación de glutamato y GABA desde astrocitos (183, 219), por lo que los receptores P2X7 resultan ser candidatos interesantes como mediadores de

la comunicación entre glía y neuronas. Además de la facilitación presináptica, también se vio que P2X7 facilita la neurotransmisión glutamatérgica en la postsinapsis del núcleo paraventricular (220). En resumen, P2X7 altera la función pre y/o post sináptica de las terminales nerviosas. Dada la baja afinidad de estos receptores por el ATP, resulta probable que P2X7 sea un sensor de niveles aumentados de actividad neuronal y contribuya entonces a fenómenos de plasticidad como por ejemplo la formación de memoria. Otra posibilidad interesante es que P2X7 se active únicamente en condiciones patológicas, cuando el daño celular produce altos niveles de ATP extracelular.

3.7. Rol funcional de P2X7 en glía

Además de la transmisión nerviosa convencional, los receptores P2X7 median la comunicación entre células gliales y neuronas y también entre distintos tipos gliales (221). Como ya se mencionó, la glía es mucho más que un simple soporte para la red neuronal: tiene un rol activo en el procesamiento de la información, controlando así la homeostasis del microambiente neuronal, el desarrollo y diferenciación neuronal y la defensa contra patógenos. Para cumplir con sus diversas funciones, las células gliales deben comunicarse entre sí y con las neuronas. Para lograr este cometido utilizan su propio sistema de comunicación: los receptores P2X7 y otros receptores sensibles al ATP parecen tener un rol determinante en estos procesos (186).

Los receptores P2X7 participan en un amplio abanico de funciones normales y patológicas de los astrocitos. Al igual que en otros sistemas, la primera señal luego de la activación de P2X7 es un aumento sostenido en el calcio intracelular, lo cual es luego traducido a varias vías de señalización intracelular llevando a cabo de este modo diversas funciones (222). Un ejemplo de ello es el gran aumento en la producción y liberación de endocanabinoide 2-AG en astrocitos por P2X7, aumento cuya magnitud no se alcanza mediante ningún otro estímulo descrito hasta el momento (223). También, el ATP y BzATP potencian en astrocitos la producción de óxido nítrico debido al aumento en la expresión de la enzima iNOS luego de la exposición a LPS (224). Así, la activación de P2X7 parece ser una señal común para los transmisores astrocitarios que pueden luego modular la actividad sináptica.

Los astrocitos también participan en la neuroinflamación que subyace en distintas enfermedades del SNC incluyendo trauma, isquemia y neurodegeneración. Los estímulos

inflamatorios inducen rápidamente la proliferación y la hipertrofia de las células gliales, un proceso denominado gliosis reactiva, que se corresponde con la expresión y producción de citoquinas inflamatorias, quemoquinas y otros mediadores inflamatorios. Los receptores P2X7 están involucrados en la regulación de estas vías: por ejemplo, su activación promueve la expresión de MCP1, un factor crítico en la infiltración temprana de monocitos durante el proceso inflamatorio (225). Otras proteínas de señalización en astrocitos reguladas por P2X7 son Fosfolipasa D (226), TGF-β1 (227) y la proteín quinasa B (Akt) (228). Por último, P2X7 media el efecto del ATP de potenciar la expresión de NFκB inducida por IL-1β y de promover la expresión de AP-1 (229).

Los receptores P2X7 de la microglía tienen funciones muy similares a las que tienen en células del linaje de macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios. En respuesta a señales patológicas como isquemia e inflamación, la microglía sufre cambios morfológicos y se activa rápidamente, aumentando su capacidad fagocítica, proliferación y la producción de mediadores inflamatorios. El estímulo con ATP o BzATP produce la secreción de IL-1β luego del estímulo con LPS. Este rol de P2X7 como coestimulador del procesamiento postranscripcional de IL-1β se ha demostrado repetidamente (216, 230). La liberación de IL-1β mediada por P2X7 es la función mejor caracterizada en microglía, pero también se ha descrito la liberación de otras citoquinas como TNFα (231), IL-6 e IL-18 (232). También ocurren cambios a nivel transcripcional: P2X7 activa al factor de transcripción NFAT (233) y promueve la localización nuclear de NFκB (234). Por último, al igual que como ocurre en macrófagos, la activación sostenida de P2X7 conduce a la muerte celular por apoptosis mediante la activación de caspasas específicas (235).

3.8. Efectos transcripcionales de P2X7

En el último tiempo se ha visto que la activación de P2X7 produce alteraciones en la transcripción génica (236, 237). Esta novedosa función de P2X7 ha sido estudiada predominantemente en el marco de la regulación por P2X7 de mecanismos inflamatorios, por lo que los primeros datos que se tienen involucran la idea de que P2X7 activa a factores de transcripción y por consiguiente aumenta la síntesis de diversos factores inmunomoduladores en células inmunes (238). Hasta el momento, se ha reportado que los ligandos de P2X7 promueven la producción de moléculas reguladoras del sistema inmune incluyendo a VEGF, COX-2, IL-2, IL-6, IL-8 e iNOS (236, 239-243). Además estimulan la expresión, activación

y/o la translocación al núcleo de varios factores de transcripción incluyendo miembros de la familia de EGR, NFAT, NFκB CREB y AP-1 (236, 237, 243-247). Un resumen de estos hallazgos se detalla en la **Figura 6**.

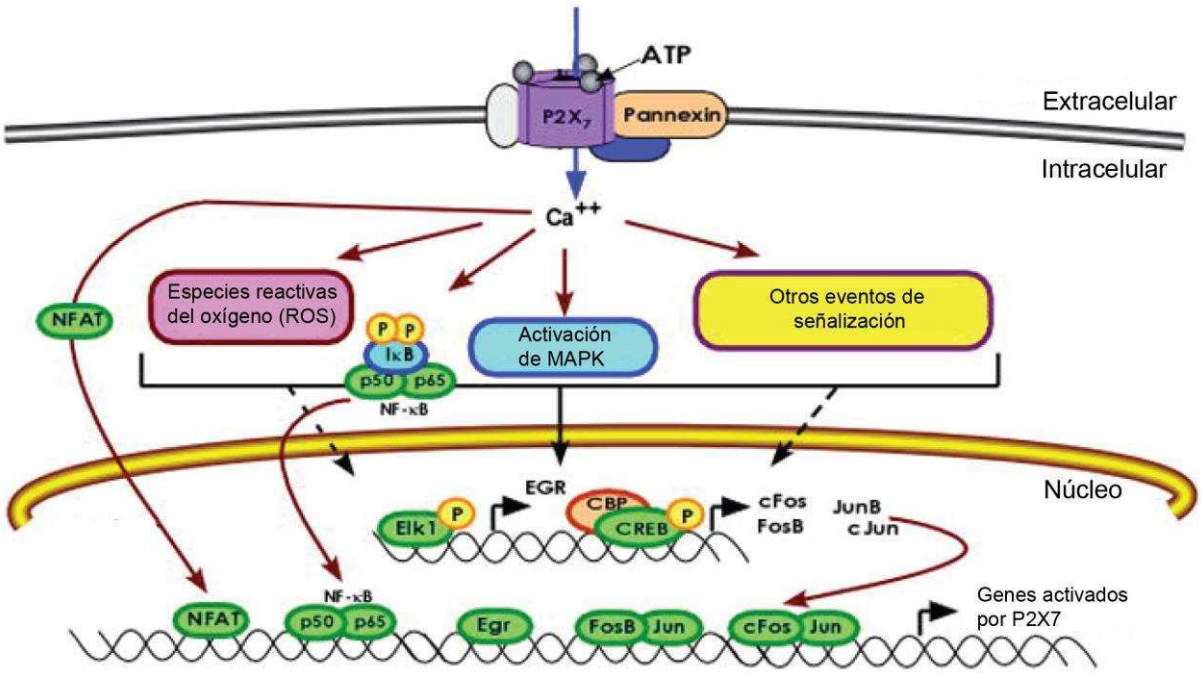


Figura 6. Resumen de la regulación transcripcional mediada por la activación de P2X7. (Tomada de Lenertz et al., 2011 (248)). Luego de la unión de su ligando, P2X7 inicia múltiples eventos de señalización, incluyendo la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la activación de varias cascadas de quinasas (MAPK) y la expresión y/o activación de diversos factores de transcripción (ilustrados en verde). Estos mecanismos son poco comprendidos aún, pero el influjo de calcio y la activación de las MAPK son centrales para la activación de los factores de transcripción. Hasta el momento se han reportado pocos ejemplos puntuales de regulación transcripcional y expresión de genes dependientes de P2X7, entre ellos los factores de transcripción Egr y miembros de la familia de AP1 (cFos, FosB y JunB).

La activación de factores de transcripción produce el mayor impacto en la regulación de la respuesta transcripcional de P2X7, de manera que a continuación se realiza un resumen de los factores de transcripción regulados por P2X7.

3.8.1. Egr

Egr-1, Egr-2 y Egr-3 son genes tempranos inmediatos con un rol importante en inmunidad. Su expresión se induce ante diversas señales mitogénicas. Se ha reportado que la activación de P2X7 induce la expresión de estos factores (246, 247). Este efecto se produce por medio de la

activación de la MAPK ERK 1/2 y el factor de transcripción Elk-1. Estos efectos se vieron en células de la microglía.

3.8.2. NFAT

El factor de transcripción NFAT regula la expresión de muchos mediadores inmunes. Se activa por aumento en los niveles de calcio citoplasmáticos. Al aumentar los niveles de calcio se activa Calmodulina, que a su vez activa a la fosfatasa Calcineurina. Esta fosfatasa desfosforila a NFAT y queda expuesta una señal de localización nuclear, lo que permite que NFAT se importe al núcleo y promueva la transcripción génica (249, 250). Se ha reportado en repetidas ocasiones que NFAT es regulado por P2X7, sobre todo en microglía, de manera que su activación es un mecanismo central para la expresión de mediadores inflamatorios regulada por P2X7 (233, 244, 251). Por otra parte, también se ha descripto un rol importante para NFAT en el desarrollo y en la función neuronal (252).

Calcineurina regula la actividad transcripcional de NFAT. Es muy abundante en cerebro y regula muchas respuestas mediadas por calcio, incluyendo la liberación de neurotransmisores, memoria, prolongación de neuritas y apoptosis (253). El regulador de Calcineurina es RCAN1 (del inglés, regulator of calcineurin 1), el cual resulta importante en el control de todos estos procesos mencionados. Se hará hincapié en RCAN1 dado que más adelante en esta tesis, se muestra la participación del mismo en nuestro modelo de estudio.

RCAN1 se expresa en el cerebro durante el desarrollo y en la adultez, en áreas específicas como la corteza cerebral, el hipocampo y la *substantia nigra* (254). Se expresa sobre todo en neuronas y astrocitos (255, 256). RCAN1 está relacionado con varios procesos celulares, como respuesta al estrés oxidativo (257) y respuesta inmune e inflamatoria (258). La expresión de RCAN1 está aumentada en respuesta a estímulos dañinos asociados al aumento de calcio intracelular como el estrés oxidativo (259). Además, está sobreexpresado en el cerebro de pacientes con Síndrome de Down y Enfermedad de Alzheimer (254, 260). De esta manera se vio que la sobreexpresión de RCAN1 se asocia con neurodegeneración, dado que produce cuerpos de inclusión y disfunción sináptica a nivel neuronal (261). En definitiva, los niveles de RCAN1 a nivel cerebral están fuertemente correlacionados con la viabilidad tanto de astrocitos como de neuronas (256, 257). Recientemente se ha vinculado a RCAN1 como un modulador de estados emocionales innatos y como un posible blanco terapéutico para la ansiedad (262).

3.8.3. NFκB

NFκB es un factor de transcripción distribuido de manera ubicua con numerosas funciones en la regulación génica. Se ha visto que los agonistas de P2X7 aumentan la actividad transcripcional de NFκB en diversos tipos celulares, como microglía y macrófagos (234, 245). NFκB puede tanto inducir como reprimir la transcripción al unirse a distintas secuencias de ADN en promotores o *enhancers* específicos. La activación de NFκB se debe a la fosforilación de la proteína inhibidora de κB (IκB) por el complejo quinasa de IκB (complejo IKK), lo que lleva a la degradación de IκB. Esto libera a NFκB y permite que trasloque libremente al núcleo (263). Los genes regulados por NFκB incluyen genes relacionados con apoptosis, adhesión celular, proliferación, respuesta inmune innata y adaptativa, inflamación y estrés celular (263, 264).

Se hará hincapié en la vía de transducción de señales de este factor de transcripción y en un elemento en particular de la misma (IKKα), dado que más adelante en esta tesis, se muestra la participación del mismo en nuestro modelo de estudio.

Las proteínas de la vía de NFκB se expresan ampliamente en el sistema nervioso maduro y en desarrollo y NFκB tiene una alta actividad en distintas áreas del cerebro en distintos estadíos (265). Hay una gran variedad de señales extracelulares que regulan la actividad de NFκB en el sistema nervioso, incluyendo neurotransmisores, neuropéptidos, neurotrofinas, citoquinas y moléculas de adhesión (265, 266). Se ha visto que NFκB está implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con el desarrollo o función neural, por ejemplo, moléculas de adhesión, receptores de neurotransmisores, neuropéptidos y neurotrofinas (267). La señalización por NFκB regula la neurogénesis en el embrión y en el adulto (268), la supervivencia neuronal (265), aspectos del aprendizaje, memoria, mecanismos cognitivos y comportamiento (266). Además, NFκB participa con efectos benéficos o perjudiciales en la respuesta celular al daño neuronal y enfermedades neurológicas. En algunos casos, NFκB tiene una función neuroprotectora frente a la apoptosis inducida por glutamato y estrés oxidativo, mientras que en otros casos NFκB potencia la apoptosis neuronal asociada a la isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas y situaciones inflamatorias (267).

IKKα forma parte del complejo IKK que fosforila a IκB activando así la vía de NFκB. De esta manera, es un factor importante en las funciones mediadas por NFκB, pero también se

ha visto que su activación produce efectos independientes de NFκB (269). Se cree que IKKα fosforila otros sustratos. Por ejemplo, IKKα contribuye directamente con la resolución de la inflamación fosforilando a RelA y produciendo su degradación. IKKα también se asocia a la proteína de unión a CREB (CBP) y funciona como una quinasa de histonas, regulando así el remodelado de la cromatina (269). También se han reportado efectos directos de IKKα a nivel del SNC. IKKα modula el crecimiento axonal (270, 271) y el remodelado neuronal y sináptico producido por el estrés crónico y los cambios comportamentales asociados (272).

3.8.4. CREB

El factor de transcripción CREB controla muchos procesos celulares, incluyendo la homeostasis de la glucosa, la supervivencia celular y la producción de mediadores inflamatorios. Su fosforilación estimula la interacción y activación con CBP o p300, lo que provoca un aumento en la unión al ADN en sitios de respuesta a CREB en los promotores de genes que responden a AMPc. Muchos genes inmunomoduladores contienen sitios de respuesta a CREB en sus promotores, entre ellos IL-2, IL-6, IL-10 y TNFα (273). Se ha visto que la activación de P2X7 puede estimular la función de CREB (237), aumentando su fosforilación por medio de un aumento en los niveles intracelulares de calcio y fosforilación de ERK 1/2, en macrófagos y en microglía. CREB se expresa en diferentes regiones del cerebro donde regula una gran variedad de funciones como crecimiento celular, proliferación y memoria frente a una gran variedad de eventos de señalización intracelular, incluyendo la eficiencia sináptica y cambios a largo plazo en la plasticidad sináptica. Es interesante destacar que previamente se ha vinculado a la cascada de señalización de CREB con la etiología de desórdenes del comportamiento y la respuesta a antidepresivos (274).

3.8.5. AP-1

Los factores de transcripción de la familia AP-1 son estimulados por varios factores como factores de crecimiento, luz ultravioleta y estrés oxidativo. Los mismos regulan la transcripción de genes importantes en procesos de diferenciación, hipoxia, proliferación y apoptosis (275). Esta familia de factores de transcripción incluye a c-Jun, JunB, JunD, Fra-1, Fra-2, c-Fos, FosB y ΔfosB. Los dímeros de estos factores se unen a los sitios AP-1 en los promotores de los genes blanco. La activación de P2X7 induce la expresión y activación de

los factores de transcripción AP-1 (236, 276). La magnitud de esta activación depende del factor en cuestión, por ejemplo: c-Fos y JunB aumenta moderadamente, mientras que la de FosB y ΔfosB es elevada y tras poco tiempo de activación de P2X7 (236).

Los factores FosB y ΔFosB son los miembros menos estudiados de la familia AP-1, pero en el último tiempo se ha visto que tienen un rol importante en inflamación y función neuronal. Su función mejor conocida es su rol en los cambios adaptativos en el cerebro en respuesta al estímulo con drogas de abuso. En este marco, se piensa que ΔFosB es un "interruptor" molecular en el desarrollo de adicción a las drogas (277). ΔFosB se acumula en áreas específicas del cerebro luego de estímulos crónicos como estrés o drogas variadas y su expresión persiste a lo largo de meses. Así se cree que ΔFosB regula los cambios adaptativos a largo plazo en el cerebro alterando sus perfiles transcripcionales (278-280). ΔFosB regula el comportamiento y es crítico para los aspectos psiquiátricos del mismo (281, 282).

4. PARP1

Como se verá más adelante en esta tesis (en la sección de resultados), la proteína PARP1 está relacionada con las vías de señalización de P2X7. En este contexto se ofrece una breve introducción acerca de PARP1, sus principales características y su relación funcional con los mecanismos de inflamación a nivel del SNC.

4.1. PARPs

Las Poli ADP-ribosa polimerasas forman una familia de 18 proteínas que fueron identificadas y agrupadas mediante búsqueda de homologías y caracterización *in silico* (283, 284). Los miembros de esta familia comparten el motivo estructural PARP en su dominio catalítico, que se encuentra altamente conservado. Estas enzimas catalizan el agregado de poli ADP-ribosa (PAR) en proteínas blanco (**Figura 7**). Esta modificación postraduccional se denomina parilación. PAR es un polímero grande y con carga negativa que funciona como modificación postraduccional. El contenido celular de los polímeros de PAR es producido por la actividad catalítica de las proteínas PARP, las cuales polimerizan unidades de ADP-ribosa a partir de moléculas de NAD+ y las unen covalentemente a las proteínas blanco (285, 286).

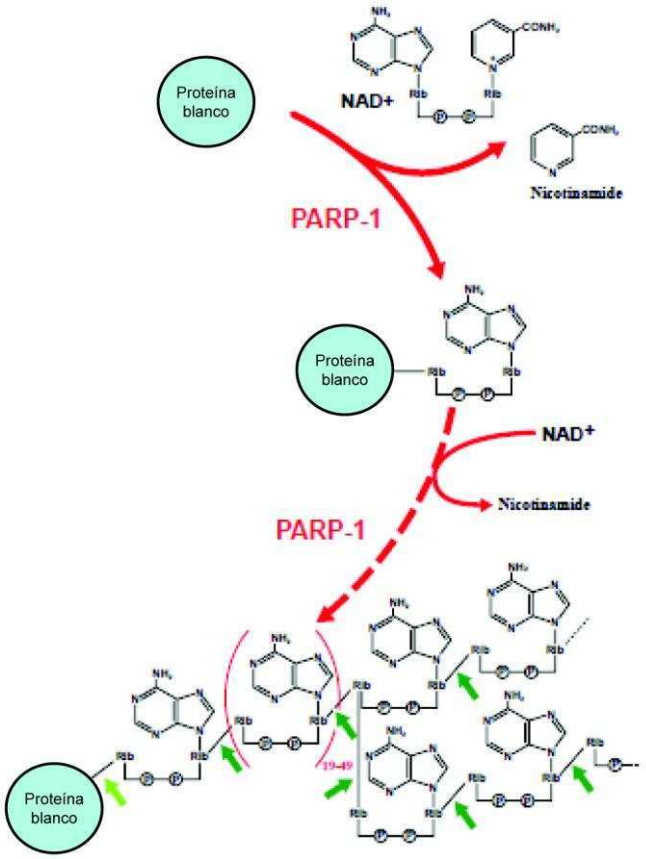


Figura 7. Parilación de proteínas. (Tomada de Rouleau et al., 2004(287)). Las enzimas PARP (PARP1 es la de mayor abundancia) hidrolizan NAD+ de modo de polimerizar unidades de ADP-ribosa en las proteínas blanco, con la consecuente liberación de nicotinamida. Estas enzimas catalizan los 3 pasos de esta reacción de parilación: 1) mono ADP ribosilación de la proteína blanco, 2) elongación y 3) ramificación de la cadena de poli ADP-ribosa. La ramificación ocurre en promedio cada 20-50 residuos de ADP-ribosa.

Actualmente se acepta que esta modificación ocurre en residuos aminoacídicos de glutamato, aspartato y lisina. En los últimos años ha habido cierto progreso que ha permitido dilucidar los sitios específicos de adición de los polímeros de PAR (288). El agregado covalente de PAR produce cambios en la carga neta de las proteínas así modificadas y un marcado efecto estérico dado el gran tamaño de los polímeros de ADP-ribosa. De esta manera, se modifica su actividad alterando interacciones proteínas-proteína, interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, actividad enzimática y localización subcelular (289).

4.2. PARP1

El miembro mejor estudiado de esta familia es PARP1 (**Figura 8**), una enzima nuclear con una amplia variedad de funciones descriptas. En un principio fue caracterizada como capaz de unirse a las hebras de ADN dañado y en consecuencia aumentar su actividad enzimática, por lo que fue descripta entonces como un mediador importante en las respuestas al daño al ADN (290). A lo largo de la última década se ha demostrado que PARP1 no solo media la reparación del ADN, sino que también tiene un rol importante en variados procesos nucleares tales como la replicación y transcripción del ADN, el remodelado de la cromatina, y el mantenimiento de la estabilidad genómica (291).

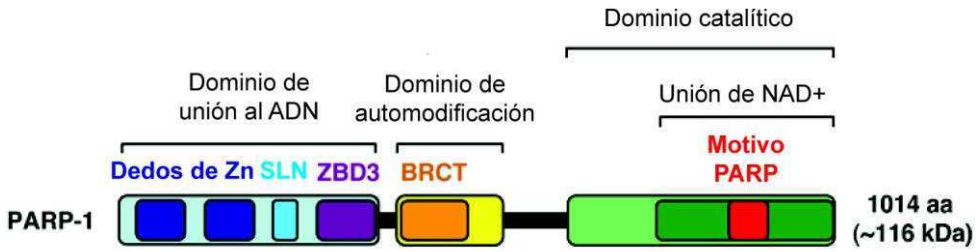


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de PARP1 y sus dominios principales. PARP1 tiene 3 dominios funcionales y estructurales: 1) un dominio amino terminal de unión al ADN el cual contiene 2 dedos de Zinc, una señal de localización nuclear (**SLN**) y un dominio de unión al Zinc (**ZBD3**), 2) un dominio de automodificación central que contiene un motivo similar a BRCA1 (**BRCT**) y 3) un dominio catalítico carboxilo terminal el cual contiene un dominio de unión a NAD+ y el **motivo PARP** que es el dominio estructural característico de esta familia de proteínas.

El número de proteínas descriptas como blancos de la actividad enzimática de PARP1 se encuentra en continuo aumento. Se ha demostrado que PARP1 modifica histonas, factores de transcripción, enzimas y proteínas estructurales del núcleo. Por ejemplo, mediante la parilación de histonas se regula la estructura de la cromatina (292). PARP1 también parila un amplio número de proteínas que reparan el ADN tales como p53 (293). Finalmente, también se demostró que PARP1 parila y altera la función de varios factores de transcripción, incluyendo a AP-1, NFκB, CTCF y YY1 (294). En conclusión, las funciones celulares que se encuentran reguladas por PARP1 son definidas en última instancia a través de la parilación de proteínas.

De cualquier manera, las funciones de PARP1 no dependen exclusivamente de su actividad intrínseca de parilación, sino que también dependen de su asociación con diferentes

proteínas, tales como factores relacionados con la transcripción (294). En particular, el rol de PARP1 en la regulación de la expresión génica ha sido profundamente estudiado en el último tiempo (294-296), y se ha podido establecer que puede modular la expresión génica a distintos niveles en condiciones basales, o en respuesta a señales activadoras como estrés celular: a) modulando la estructura de la cromatina, b) funcionando como un coregulador en la unión de factores de transcripción al ADN y c) regulando la metilación del ADN (291).

a) Modulación de la cromatina. Los primeros efectos observados de PARP1 sobre el genoma fueron la modulación de la estructura de la cromatina y la parilación de histonas (297, 298), validados posteriormente (299, 300). PARP1 se une a los nucleosomas e interactúa dinámicamente con diferentes tipos de dominios de la cromatina, y de esta manera modifica su estructura (292). La activación de PARP1 promueve el decondensado de la cromatina y el reinicio de la transcripción (299). PARP1 se sitúa en los promotores de casi todos los genes transcripcionalmente activos (301), hecho que sugiere un rol permisivo para la formación de estructuras en la cromatina que son facilitadores de la transcripción (299, 301, 302).

b) Coregulación de la transcripción. PARP1 también puede regular la expresión génica actuando como un coregulador, junto con la maquinaria transcripcional, con otros coreguladores con actividad enzimática y con factores de transcripción que se unen a secuencias específicas de ADN, tales como NFκB, Elk1, NFAT, Oct-1 y Sox2. El efecto de PARP1 sobre estos activadores puede ser tanto estimulatorio como inhibitorio y podrá requerir o no de su actividad enzimática. PARP1 está enriquecido alrededor de los sitios de inicio de la transcripción de genes que se están expresando activamente, lo que lo convierte en un excelente marcador de promotores activos. Cabe destacar que PARP1 había sido identificado como el factor de transcripción basal IIC (TFIIC) (302) que coregula la formación del complejo de preiniciación de la ARN polimerasa II antes de la unión del factor TFIID, lo que aumenta la transcripción génica. Además, varios trabajos han reportado que PARP1 es responsable de ensamblar complejos coreguladores en los promotores de genes blanco, funcionando así como una proteína de andamiaje sin unirse al ADN y sin requerir de su actividad catalítica, reclutando otras enzimas coreguladoras necesarias para la transcripción (291). Por ejemplo, en respuesta a distintos estímulos inflamatorios PARP1 facilita la interacción física directa entre la acetiltranferasa p300/CBP, la subunidad p50 de NFκB y el complejo *Mediator* (303, 304). En otros casos se describió a PARP1 como un "factor de intercambio" en promotores específicos, liberando factores inhibitorios y reclutando factores estimulatorios a los factores de transcripción unidos a dichos promotores (305, 306).

c) Modulación de la metilación del ADN. PARP1 puede modificar la metilación del ADN genómico (307, 308). PARP1 regula tanto la expresión como la actividad de la ADN metiltransferasa Dnmt1 (309), y también se demostró que interactúa directamente con Dnmt1 luego del agregado de nuevos polímeros de PAR, lo que inhibe la actividad ADN metiltransferasa de Dnmt1 (310).

4.3. PARP1 e inflamación

Las respuestas biológicas mediadas por PARP1 mejor caracterizadas son la respuesta inmune y la inflamatoria (311). PARP1 se automodifica marcadamente luego de infecciones bacterianas (312) y los ratones *Parp-1*$^{-/-}$ son resistentes a inflamación en diferentes modelos experimentales, tales como shock séptico inducido por LPS y diabetes inducida por estreptozotocina (313, 314). Resulta interesante observar que la respuesta inflamatoria dependiente de PARP1 no se encuentra limitada a las células del sistema inmune: PARP1 también está implicado en la respuesta al estrés proinflamatoria en células del SNC. La activación de PARP1 en células de la glía promueve la acción de los factores de transcripción que controlan la expresión de genes de la respuesta inflamatoria, tales como NFκB y AP-1. En modelos de isquemia cerebral, la expresión de los genes de IL-6, IL1-β, COX-2, iNOS e ICAM-1 se encuentran elevados, mientras que en ratones *Parp-1*$^{-/-}$ o luego de la administración de inhibidores de PARP1 la expresión de estos genes se encuentra significativamente reducida (315-319).

Estos resultados llevaron a la conclusión de que PARP1 es un factor clave en la respuesta inflamatoria. En este sentido, hace más de dos décadas se describió que los inhibidores de PARP1 tienen propiedades antiinflamatorias (320), tema que aún hoy es intensamente estudiado. Se ha reportado que un número considerable de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de mediadores proinflamatorios interactúan con PARP1. El primero de ellos en ser identificado fue NFκB (321, 322). Cuando se anuló la expresión de PARP1, la expresión génica inducida por NFκB en respuesta a injuria luego de la activación con LPS se vio drásticamente disminuida, por lo que se redujo la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNFα e iNOS (322). Estos efectos también se observaron en el SNC. Células gliales PARP-1$^{-/-}$ mostraron tener menor unión al ADN de NFκB, con la consecuente reducción en la expresión de mediadores proinflamatorios incluyendo a IL-6, IL1-β, TNFα, COX-2 e iNOS (316). También se describió que otros

factores de transcripción y cofactores involucrados en la regulación de la inflamación están modulados por PARP, como por ejemplo AP-1 (313, 323), NFAT (324, 325), SIRT1 (326) y Sp1 (316). El mecanismo preciso de regulación de estos factores de transcripción aún está en discusión, pero el punto en común en todos los casos es que la actividad de PARP1 aumenta la capacidad de unión de dichos factores de transcripción al ADN. Al regular su actividad, PARP1 regula en última instancia la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL1-β, IL-6 e IL-12, que a su vez activan la expresión de otras citoquinas, quemoquinas, iNOS y COX-2, lo que sugiere que PARP1 tiene un rol importante en respuestas inflamatorias patológicas.

De acuerdo a lo descripto, PARP1 es un regulador clave de la transcripción en un amplio rango de sistemas que incluyen células neuronales y gliales, lo que le confiere un papel importante en la fisiología del sistema nervioso. PARP1 ha sido implicado en patologías neuronales pero también en la función neuronal normal, por ejemplo, en los procesos de aprendizaje y memoria (327). Se ha visto que PARP1 está involucrado en diferentes mecanismos de injuria que afectan a las neuronas (328). Además, la activación de PARP1 se detectó en varios desórdenes neurodegenerativos (329), y altos niveles de esta son suficientes para producir muerte neuronal (330) y de astrocitos (331). En enfermedades crónicas del SNC con un alto componente inflamatorio como en el modelo de encefalomielitis experimental autoinmune (del inglés, EAE) se encontró acumulación de PAR en los astrocitos que rodeaban las placas de EAE desmielinizadas y en menor medida en microglía, oligodendrocitos y neuronas (332). Finalmente, muestras de autopsias de pacientes con enfermedad de Alzheimer mostraron acumulación de PAR en neuronas piramidales corticales y en astrocitos pero no en microglía, lo que sugiere una activación diferencial de PARP1 (333). La activación de PARP1 desencadena la muerte neuronal producida por fragmentos del péptido β-amiloide, lo que involucra a PARP1 en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (334). La activación de PARP1 en astrocitos parecería ser un rasgo común de los desórdenes neurodegenerativos crónicos, lo que sugiere que PARP1 podría tener un rol en estas enfermedades inflamatorias.

5. Variante polimórfica del receptor P2X7: Gln460Arg

5.1. Polimorfismos de P2X7

Hasta el momento, se han reportado cerca de 20 SNPs, cambios de una base en la secuencia nucleotídica del gen *P2RX7* que dan lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica. En la tabla 1 se detalla la localización y hallazgos funcionales de dichos polimorfismos. Los SNPs de P2X7 identificados se distribuyen a lo largo de toda la proteína, incluyendo el dominio extracelular, el segundo dominio transmembrana y el dominio intracelular carboxilo terminal. Los SNPs más estudiados son Glu496Ala y Gln460Arg, ubicándose ambos en el dominio carboxilo terminal. Se han descripto varios polimorfismos que producen pérdida de función en el receptor, tales como Arg307Gln (335), Pro451Leu (336), Glu496Ala (337) y Ile568Asn (338). También se describieron polimorfismos que confieren ganancia de función, como His155Tyr, localizado en la porción extracelular del receptor y aumenta el ingreso de calcio (339). En cambio, no se encontraron cambios en la funcionalidad de otros SNPs, como Gln460Arg (339, 340), Ala348Thr y Thr357 (339).

El polimorfismo Glu496Ala ha sido correlacionado con una mayor susceptibilidad a tuberculosis en varias poblaciones (341-343). Este polimorfismo produce una disminución en la capacidad de formación del poro, aunque no queda claro si mantiene su función normal de canal de calcio (337, 339, 344). Por otra parte, monocitos con este polimorfismo liberan menos IL-1β e IL-18, factores inmunomoduladores que como ya se mencionó son regulados por P2X7 (345). Las implicancias funcionales del polimorfismo Gln460Arg se presentan a continuación.

SNP	Características
V76A	Menor actividad del canal y del poro
R117W	Menor actividad del canal y del poro
G150R	Menor actividad del canal y del poro
H155Y	Mayor actividad del canal y del poro
A176V	En el dominio extracelular
E186K	Pegado a un sitio de N-glicosilación crítico; menor actividad del canal y del poro
L191P	Cercano a un sitio de N-glicosilación crítico; menor actividad del canal y del poro
R270H	Sin cambios en la función
R270C	En el dominio extracelular
R276H	En el dominio extracelular
R307Q	Menor actividad del canal y del poro; en el bolsillo de unión de ATP; se expresa en la superficie celular
L320P	En el dominio extracelular
A348T	Mayor actividad del canal y del poro; se lo correlaciona con infección por *T. gondii*
T357S	Menor actividad del canal y del poro
I367T	Ubicado en el dominio intracelular cercano al segundo dominio transmembrana
P430R	En el dominio intracelular
A433V	En el dominio intracelular
Q460R	Su funcionalidad no es clara, correlacionado con MDD y BD
E496A	Menor actividad del poro pero parece tener función normal de canal; correlacionado con cáncer papilar tiroideo y tuberculosis
H521Q	En el dominio intracelular
V522I	Actividad del canal y del poro normales
R544Q	Sin cambios en la función
I568N	Menor actividad del canal y del poro; ubicado en el dominio C-terminal; no se expresa en la superficie celular
R578Q	Menor actividad del poro y señalización intracelular; ubicado en el dominio C-terminal

Tabla 1. Polimorfismos de P2X7. (Tomada y modificada de Lenertz et al., 2011 (248)). Se muestran los polimorfismos de nucleótido único (SNP) reportados para P2X7, junto con sus consecuencias funcionales y asociación con enfermedades.

5.2. Asociación de la variante polimórfica de P2X7 Gln460Arg con depresión

El gen *P2RX7* es un potencial candidato asociado con susceptibilidad a sufrir trastornos afectivos. En estudios genéticos de correlación entre fenotipos y características génicas se ha asociado a este gen en varias ocasiones con trastornos afectivos y desórdenes depresivos (140, 346-350). Desde entonces se estudiaron asociaciones entre distintos SNPs en *P2RX7* y desórdenes depresivos como BPD y MDD. La mayoría de los estudios se centraron en el polimorfismo Gln460Arg, que produce la substitución de una glutamina por una arginina en la posición 460 de la secuencia aminoacídica de P2X7. Mientras que varios de estos estudios reportaron asociaciones significativas de este SNP con BPD y MDD (142, 351-357), otros fallaron en reproducir estos resultados (358-361). Resulta interesante destacar que los

portadores heterocigotas para *P2RX7*-wild-type (WT) y *P2RX7*-Gln460Arg se encuentran sobrerepresentados en los pacientes con estos desórdenes depresivos (352).

Dado que no todos los estudios realizados concuerdan con la asociación entre P2X7-Gln460Arg y trastornos depresivos, se realizó un meta análisis junto con nuestros colaboradores Dr. Jan Deussing y Dr. Bertram Mueller-Myhsok del Instituto Max-Planck de Psiquiatría de Múnich, Alemania para unificar todos los datos existentes hasta el momento y definir la significancia de esta asociación. Teniendo en cuenta todos los estudios se encontró que las diferencias entre los sujetos control y los sujetos con desórdenes depresivos son significativas, lo que le otorga mayor fuerza al concepto que postula que el SNP Gln460Arg de P2X7 confiere una mayor susceptibilidad al desarrollo de trastornos afectivos (**Figura 9**).

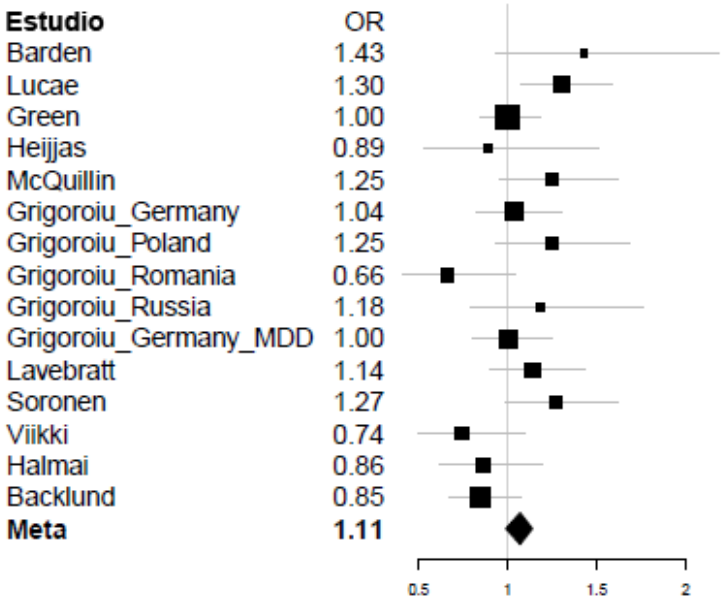


Figura 9. Meta análisis: Asociación de P2X7-Gln460Arg con trastornos depresivos. Se obtuvieron las distribuciones génicas de todas las publicaciones. Para cada muestra se calculó la razón de probabilidades (**OR**, del inglés Odds Ratio) y el error estándar usando el Test exacto de Fisher. Se muestra el correspondiente diagrama de Forest para el modelo de desventaja heterocigota, que resultó ser el modelo más adecuado para explicar la asociación (P=0,005 y OR=1,11). Líneas grises: Intervalo de confianza. Cuadrados negros: Media del estudio. El tamaño del cuadrado representa el peso de cada estudio en el meta análisis.

En particular, se encontró que el modelo de expresión heterocigota (es decir, pacientes con un alelo de P2X7-WT y un alelo de P2X7-Gln460Arg) sería el que mejor explica esta asociación.

Aún no existen datos que expliquen esta asociación a nivel fisiológico o molecular, pero se ha propuesto que el mal funcionamiento de P2X7 podría estar alterando mecanismos de neuroprotección ante las respuestas fisiológicas a daño previamente comentadas. Sin

embargo, como ya se mencionó, los únicos dos abordajes experimentales existentes hasta el día de hoy que analizan la funcionalidad de este polimorfismo de P2X7 han descripto que la mutación Gln460Arg no afecta la entrada de calcio en células HEK293 transfectadas con el canal mutado (339, 340).

5.3. Antecedentes experimentales: Función de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg

El estudio de la funcionalidad de las distintas variantes del receptor P2X7 fue iniciado en el grupo de trabajo con anterioridad a la realización de esta tesis de doctorado. El tesista defendió su tesina de licenciatura en el año 2009, en la que mostró los primeros resultados de este tema. Se ofrece aquí un resumen de los mismos, dado que son el puntapié inicial para los resultados que se muestran en esta tesis.

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad de las distintas variantes del receptor P2X7 se empleó como modelo inicial a la línea celular HEK293, que carece de expresión de P2X7 endógeno (339). Sobre esta línea celular se generaron clones estables que expresaran una u otra variante del receptor (clones P2X7-WT y clones P2X7-Gln460Arg) y también se generaron clones que coexpresan ambas variantes (clones P2X7-WT/Gln460Arg). El clonado de ambas variantes en vectores de expresión adecuados, la transfección, establecimiento y mantenimiento de los clones se encuentra detallado en Materiales y Métodos 2.1 y 3.3 dado que también se utilizaron en la tesis de doctorado. Sobre estos clones se realizaron dos enfoques experimentales complementarios, basados en la activación de P2X7: medición de entrada de calcio y fosforilación de la MAPK ERK 1/2. Ambos enfoques mostraron que ambas variantes de P2X7 tienen igual funcionalidad cuando son expresadas por separado, mientras que la coexpresión de las dos en una misma célula produce una disminución en la función del receptor. De esta manera, los clones HEK293 P2X7-WT y los clones HEK293 P2X7-Gln460Arg presentaron un marcado aumento en los niveles de calcio intracelular frente a la activación de P2X7, mientras que esta respuesta resultó menor en los clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg (**Figura 10A**). De manera análoga, los clones HEK293 P2X7-WT y los clones HEK293 P2X7-Gln460Arg presentaron un marcado aumento en los niveles de fosforilación de la MAPK ERK 1/2 frente a la activación de P2X7, mientras que esta respuesta fue menor en los clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg (**Figura 10B**). Vale destacar que en la línea celular HEK293 parental que no expresa P2X7 endógeno no se observó entrada de calcio o fosforilación de ERK 1/2 frente al estímulo, lo que asegura

que el efecto medido en los distintos clones se debe al agregado de las variantes de P2X7.

Estos datos constituyen la primera observación en el sentido que la coexpresión de P2X7-WT y la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg en la misma célula produce una disminución en la actividad de canal iónico de P2X7 y compromete seriamente su capacidad de transducir la correspondiente señal intracelular. Este mecanismo de disminución de función del receptor P2X7 cuando se expresa en heterocigosis podría estar relacionado con la asociación descripta entre la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg y las enfermedades psiquiátricas MDD y BPD. Es por ello que en este trabajo de doctorado se propone estudiar en profundidad las vías de señalización del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del SNC, poniendo el énfasis en los aspectos relacionados con inflamación y mecanismos que puedan sugerir una explicación para la asociación entre P2X7 y trastornos psiquiátricos.

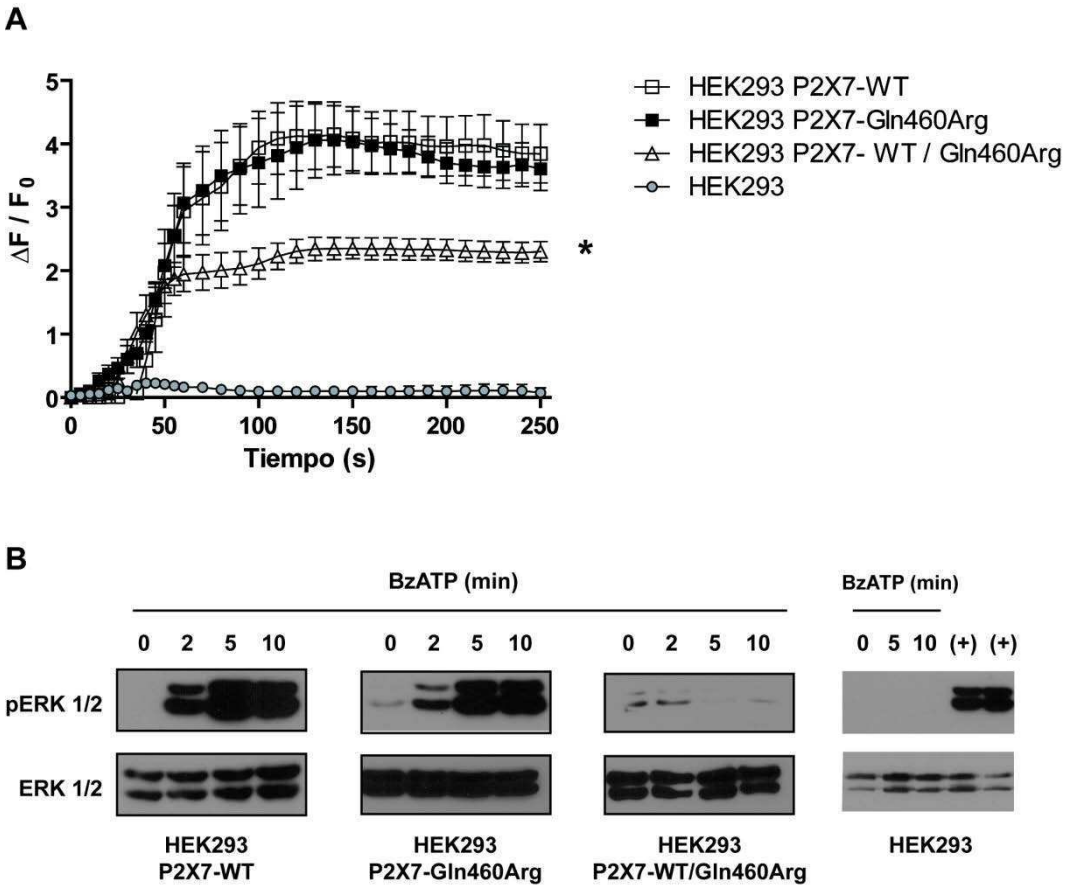


Figura 10. Activación de P2X7 en clones HEK293 expresores de las distintas variantes de P2X7. (**A**) Respuesta intracelular de calcio en clones HEK293 sobreexpresores de las distintas variantes de P2X7. Las células se preincubaron con el agente dispersante Pluronic F-127 y el fluorocromo sensible a calcio Fluo-4 AM durante 45 min. Se detectó el aumento de calcio intracelular inducido por el agregado de BzATP 50 μM a los 10 s. Cada punto de la curva representa la media ± ES de 9 clones de HEK293 P2X7-WT, de 7 clones de HEK293 P2X7- WT/Gln460Arg, de 4 clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg y de 3 mediciones de HEK293 parentales, evaluados en 10 experimentos independientes. *: P<0,0001 vs HEK293 P2X7-WT y vs HEK293 P2X7-Gln460Arg. ANOVA de medidas repetidas. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni. (**B**) Activación de la MAPK ERK 1/2 en clones HEK293 sobreexpresores de las variantes de P2X7. Células HEK293 P2X7-WT, P2X7-Gln460Arg, coexpresoras P2X7- WT/Gln460Arg y HEK293 parentales se estimularon con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron Western Blot con anticuerpos anti p-ERK 1/2 (1/500) y anti ERK 1/2 (1/1000). La detección de ERK 1/2 sobre las mismas membranas sirvió como control de carga. **(+)**: Control positivo. Tratamiento con suero fetal bovino 10% durante 10 min, estímulo activador de la vía de las MAPK en general. Se muestran imágenes representativas de un experimento de un total de tres con resultados similares. **BzATP**: 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP, análogo sintético de ATP, un ligando específico de P2X7 en la concentración empleada.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar la activación del receptor P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en el contexto de la asociación descripta con trastornos psiquiátricos tales como depresión a nivel del sistema nervioso central, donde P2X7 tiene un rol en la respuesta inflamatoria.

Habiendo observado previamente que la coexpresión de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg produce la pérdida de función del receptor, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar la respuesta a calcio y la activación de mecanismos de señalización intracelular en células del SNC.
- Confirmar la pérdida de función de P2X7 debido a la coexpresión de ambas variantes.
- Evaluar si existe interacción entre las variantes de P2X7 a nivel del receptor.
- Buscar nuevos blancos involucrados en la señalización mediada por P2X7 y su variante polimórfica.
- Estudiar la relevancia de estos nuevos blancos en el contexto inflamatorio del SNC.
- Caracterizar las modificaciones en la transcripción génica a nivel global debido a la activación de las distintas variantes de P2X7.
- Identificar genes candidato diferencialmente expresados que podrían explicar la asociación entre la variante polimórfica de P2X7 y los trastornos psiquiátricos.

La hipótesis de este trabajo es que la coexpresión de las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg tienen consecuencias funcionales que modifican la respuesta celular frente a la activación del receptor. El estudio de estas consecuencias permitiría explicar la asociación descripta con depresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aparatos, estímulos, anticuerpos e inhibidores

1.1. Aparatos o dispositivos especiales

Se detallan solamente los equipos que tienen alguna característica específica de aplicación en los experimentos detallados en este trabajo de tesis, sin mencionar aquellos de uso general como pueden ser campanas de flujo laminar, freezers o centrífugas.

- Espectrofotómetro (Bio Rad)
- Termociclador DNAEngine (Bio-Rad)
- Termocicladora en tiempo real: Real-time System CFX96 (BioRad)
- Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad)
- Microscopio de fluorescencia confocal FV1000 BX61 (Olympus)
- Microscopio de fluorescencia BX-FLA (Olympus).

1.2. Estímulos y agentes farmacológicos

BzATP: [2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP]. Análogo sintético del ATP. Ligando selectivo para receptores P2X7. En todos los casos se lo utilizó en concentración 50 μM.

1.3. Anticuerpos

De la empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA):

- IgG monoclonal de ratón anti fosfo-ERK1/2: reconoce forma fosforilada; 1:500.
- IgG monoclonal de conejo anti B-Raf: 1:1000.

De la empresa Cell Signalling (Beverly, MA, USA):

- IgG policlonal de conejo anti p42/44 (ERK1/2 total): reconoce forma fosforilada y no fosforilada; 1:1000.
- IgG policlonal de conejo anti fosfo-BRaf Ser446: reconoce forma fosforilada; 1:1000.
- IgG policlonal de conejo anti Histona H3; 1:10000

De la empresa Abcam (Cambridge, RU, UK):

- IgG policlonal de ratón anti PARP1; 1:1000.
- IgG policlonal de rata anti HSC-70; 1:2000.
- IgG policlonal de ratón anti-GAPDH; 1:10000.

De la empresa Biorad (Hercules, CA, USA):

- IgG-HRP policlonal de cabra anti-conejo; 1:3000.
- IgG-HRP policlonal de cabra anti-ratón; 1:3000.

De la empresa IBA (Göttingen, Alemania)

- IgG monoclonal de ratón anti STREP; 1:1000.

De la empresa BD BioSciences (New Jersey, USA)

- IgG monoclonal de conejo anti Poli-ADP ribosa; 1:10000.

De la empresa Covance (Madison, USA)

- IgG monoclonal de ratón anti-6xHis; 1:1000.

1.4. Otros reactivos o materiales

De la empresa Sigma (Madison, USA): BSA 99 % de pureza, Proteína G-Agarosa, Proteína A-Sepharosa, Glutamina, Membrana de nitrocelulosa de 0.45 µM de poro, PMSF, Ortovanadato.

De la empresa Gibco BRL-Life Technologies-Invitrogen (New York, USA): DMEM baja glucosa, Opti-MEM, Penicilina-estreptomicina, Geneticina (G418), Tripsina, PBS estéril, Lipofectamina (lipoFECTAMINE Reagent®), Plus Reagent®, dNTPs, Taq ADN polimerasa, Fluo-4AM, Pluronic F-127.

De la empresa Molecular Research Centre (Cincinnati, USA): Tri Reagent.

De la empresa Promega (Madison, WI, USA): Enzimas de restricción, MMLV-RT (Transcriptasa Reversa), RNAsin.

De la empresa Qiagen (Hylden, Alemania): Columnas QIAGEN® de afinidad para purificación de ADN plasmídico.

De la empresa Carls Roth GmbH (Karlsruhe, Alemania): Fenol neutro y fenol ácido (Roti-Phenol®).

De la empresa Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA): Proteína A/G Plus.

Para el cultivo de células se utilizaron materiales descartables como botellas de cultivo, placas de Petri, tubos cónicos de centrifuga, criotubos y pipetas de las marcas TTP, GBO, Eppendorf, Axygen, NUNC y Corning.

2. Manejo de plásmidos

2.1. Plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos, con la finalidad que se detalla en cada caso.

La totalidad de estos plásmidos fueron generados mediante técnicas de subclonado, de acuerdo a como se detalla en la siguiente sección.

pcDNA3 P2X7-WT: Vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen) al cual se le insertó en su sitio múltiple de clonado la secuencia codificante de ADNc de la variante WT de P2X7. Este vector contiene el gen de resistencia a Neomicina. El mismo fue utilizado para generar clones estables sobrexpresores de P2X7-WT, como se detalla en 3.3.

pcDNA3 P2X7-460: Vector de expresión pcDNA3.1/ZEO(+) (Invitrogen) al cual se le insertó en su sitio múltiple de clonado la secuencia codificante de ADNc de la variante Gln460Arg de P2X7. Este vector contiene el gen de resistencia a Zeocina. El mismo fue utilizado para generar clones estables sobrexpresores de P2X7-Gln460Arg, como se detalla en 3.3.

pEXPR-IBA7 STREP tag P2X7-WT: Vector de expresión pEXPR-IBA7 STREP-tag (IBA) al cual se le insertó en su sitio múltiple de clonado la secuencia codificante de ADNc de la variante WT de P2X7, respetando el marco de lectura para obtener la transcripción de la proteína de fusión P2X7-WT con una etiqueta de Streptavidina en el extremo carboxilo terminal. Este vector contiene el gen de resistencia a Neomicina. El mismo fue utilizado para generar clones estables sobrexpresores de P2X7-WT, como se detalla en 3.3.

pEXPR-IBA43 6xHistidine-tag P2X7-Gln460Arg: Vector de expresión pEXPR-IBA43 (IBA) al cual se le insertó en su sitio múltiple de clonado la secuencia codificante de ADNc de la variante Gln460Arg de P2X7, respetando el marco de lectura para obtener la transcripción de la proteína de fusión P2X7-Gln460Arg con una etiqueta de 6 repeticiones de Histidina en el extremo amino terminal. Este vector contiene el gen de resistencia a Neomicina. El mismo fue utilizado para generar clones estables sobrexpresores de P2X7-WT, como se detalla en 3.3.

P2X7 WT-Cerulean: Vector de expresión modificado por subclonado. El mismo contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión entre P2X7-WT y la proteína fluorescente Cerulean en el extremo carboxilo terminal. El mismo fue utilizado para realizar transfecciones transitorias en células HEK293 para los ensayos de FRET.

P2X7 Gln460Arg-Cerulean: Vector de expresión modificado por subclonado. El mismo contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión entre P2X7-Gln460Arg y la proteína fluorescente Cerulean en el extremo carboxilo terminal. El mismo fue utilizado para realizar transfecciones transitorias en células HEK293 para los ensayos de FRET.

P2X7 WT-cpVenus: Vector de expresión modificado por subclonado. El mismo contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión entre P2X7-WT y alguna permutación circular de la proteína fluorescente Venus en el extremo carboxilo terminal. Se utilizaron 5 variantes con distintas permutaciones circulares de Venus para generar 5 plásmidos con estas características, los cuales fueron utilizados para realizar transfecciones transitorias en células HEK293 para los ensayos de FRET.

P2X7 Gln460Arg-cpVenus: Vector de expresión modificado por subclonado. El mismo contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión entre P2X7-Gln460Arg y alguna permutación circular de la proteína fluorescente Venus en el extremo carboxilo terminal. Se utilizaron 5 variantes con distintas permutaciones circulares de Venus para generar 5 plásmidos con estas características, los cuales fueron utilizados para realizar transfecciones transitorias en células HEK293 para los ensayos de FRET.

TrkA-Cerulean: Vector de expresión que contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión entre el receptor de NGF (del inglés, Nerve growth factor) TrkA y la proteína fluorescente Cerulean. El mismo fue cedido gentilmente por el Dr. E. Hoijman y utilizado para realizar tranfecciones transitorias en células HEK293 para los ensayos de FRET.

2.2. Subclonado de plásmidos

Los siguientes plásmidos fueron generados para este trabajo de tesis mediante técnicas de subclonado.

pcDNA3 P2X7-WT: La secuencia de cDNA de P2X7-WT incorporada en el plásmido pGemT-Easy Vector (Promega) fue cedida gentilmente por el Dr Marcelo Paez-Pereda (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania). La misma fue liberada de dicho plásmido mediante digestión con la enzima de restricción NotI y posteriormente insertada en el sitio NotI del sitio múltiple de clonado del vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen).

pcDNA3 P2X7-Gln460Arg: La secuencia de cDNA de P2X7-Gln460Arg incorporada en el plásmido pNKS2 fue cedida gentilmente por el Dr Marcelo Paez-Pereda. La misma fue liberada de dicho plásmido mediante digestión con la enzima de restricción XbaI y posteriormente insertada en el sitio XbaI del sitio múltiple de clonado del vector de expresión pcDNA3.1/ZEO(+) (Invitrogen).

pEXPR-IBA7 STREP tag P2X7-WT: El plásmido pcDNA3 P2X7-WT fue digerido con las enzimas KpnI y XhoI liberando así el ADNc de P2X7-WT. Este fragmento fue insertado en el sitio múltiple de clonado del plásmido pEXPR-IBA7 STREP-tag.

pEXPR-IBA43 6xHistidine-tag P2X7-Gln460Arg: El plásmido pcDNA3 P2X7-Gln460Arg fue digerido con las enzimas KpnI y ApaI liberando de esta manera el ADNc de P2X7-Gln460Arg. Este fragmento fue insertado en el vector pBK-CMV, el cual fue utilizado como plásmido intermediario. El mismo fue posteriormente digerido con las enzimas KpnI e HindIII y ligado en el sitio correspondiente del plásmido pEXPR-IBA43 6xHistidine-tag.

P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg fusionados a Cerulean y cpVenus: Para la generación de las construcciones de P2X7 unidas a las proteínas fluorescentes, los ADNc de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg fueron amplificados por PCR a partir de los plásmidos pcDNA3 P2X7-WT y pcDNA3 P2X7-Gln460Arg respectivamente. Los *primers* directos contienen un sitio de restricción para HindIII y los *primers* reversos contienen un sitio de restricción para SmaI y fueron diseñados de modo tal de remover el codón *stop* del ADNc de P2X7. Los productos de PCR fueron ligados respetando el marco de lectura en el sitio múltiple de clonado del plásmido pEYP-N1 (Promega) (Cedido gentilmente por el Dr. M. Blaustein, Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Universidad de Buenos Aires). Se emplearon los siguientes *primers*:

P2X7-WT Directo: 5' TCAAGCTTTATCCATCACAC 3'.

P2X7-Gln460Arg Directo: 5' AAAAGCTTAGGGAGGGAGGCTG 3'.

P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg Reverso: 5' GGCCCGGGAGTAAGGACTCT 3'.

A continuación, se removió la secuencia de EYFP (del inglés, enhanced yellow fluorescent protein) de estos vectores pEYP-N1 por medio de digestión con las enzimas AgeI y XbaI para ser reemplazada ya sea por las variantes Cerulean o Venus. Estas variantes fueron amplificadas por PCR a partir de los plásmidos pRSETb (Invitrogen). El plásmido pRSETb-Cerulean fue gentilmente cedido por el Dr Mitkowski (Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen, Alemania) y los 5 plásmidos pRSETb conteniendo 5 permutaciones circulares de Venus -cp49Venus, cp157Venus, cp173Venus, cp195Venus y cp229Venus- fueron gentilmente cedidos por el Dr Nagai (Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Sapporo, Japón). Los *primers* directos poseen un sitio de restricción AgeI y los *primers* reversos un sitio XbaI los cuales respetan el marco de lectura. Para las variantes de Venus se usó un único par de primers que se aparean en el sitio múltiple de clonado del plásmido pRSETb.

Cerulean Directo: 5' AAACCGGTCATGGTGAGCAAGGG 3'.
Cerulean Reverso: 5' GGTCTAGATTACTTGTACAGCTCG 3'.
cpVenus Directo: 5' AAACCGGTGGACGATGACGATAAGG 3'.
cpVenus Reverso: 5' GGTCTAGAAGCAGCCGGATCAAGC 3'.

Todas las amplificaciones por PCR de fragmentos para su posterior purificación y subclonado se llevaron a cabo de manera idéntica al protocolo desarrollado en Materiales y Métodos 4.5 pero con High Fidelity Polimerasa, la cual posee mayor fidelidad de replicación que la TaQ polimerasa, para minimizar errores. El producto final de todos los subclonados por PCR fue secuenciado para comprobar que no se hubieran introducido mutaciones por errores de replicación y todas las construcciones fueron a su vez chequeadas funcionalmente.

2.3. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática de plásmidos o por amplificación por PCR se recuperaron mediante la purificación por gel. Para ello se corrió electroforéticamente la muestra en un gel conteniendo 1-1,5% agarosa disuelta en buffer TBE 1x (Tris-HCl 25 mM, Borato 100 mM; EDTA10 mM, pH: 8.0) conteniendo bromuro de etidio a 80V. Para identificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb plus (Invitrogen). Las muestras se sembraron en un *buffer* conteniendo un 20% de Glicerol y Azul de Bromofenol como colorante indicativo del frente de corrida. Las bandas se visualizaron en el transiluminador UV. Los fragmentos de agarosa conteniendo las bandas de interés se recortaron utilizando un bisturí y se transfirieron a un tubo eppendorf. Luego la purificación del DNA se realizó utilizando el kit de extracción a partir de gel, Qiaex II (Qiagen). Por este método se aislaron de gel todos los fragmentos obtenidos por PCR o a partir de clivaje desde un plásmido de origen con enzimas de restricción, para su posterior subclonado a las construcciones deseadas.

2.4. Reacción de ligación

Las reacciones de ligación se hicieron a 4ºC durante 16 h, en 20 µl de buffer de ligación (Tris-HCl 50 mM pH: 7.5; $MgCl_2$ 7 mM; DTT 1 mM), en presencia de ATP 500 µM y 1 U de ADN ligasa del fago T4.

2.5. Preparación de bacterias competentes

Se siguió el protocolo de transformación descripto por Sambrook (362). Bacterias Escherichia coli cepa DH5α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas con ansa en una placa de LB-agar libres de antibiótico de manera dispersa como para obtener colonias individuales, y posteriormente incubadas a 37°C por 16 h. Se tomó una colonia aislada y se la inoculó en 5 ml de medio LB, el cual fue incubado durante 16 h en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación en el crecimiento, se inocularon 200 ml de dicho cultivo en medio LB nuevo que se incubo en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y el precipitado bacteriano se resuspendió en 100 ml de $CaCl_2$ 100 nM preenfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El precipitado fue resuspendido en 5 ml de $CaCl_2$ 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Esta suspensión bacteriana se alicuotó en 200 µl en tubos eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a –80°C hasta su utilización.

2.6. Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos

Se siguió el protocolo de transformación descripto por Sambrook (362). 50 µl de bacterias competentes DH5α de eficiencia al menos $1x10^6$ colonias/µg de DNA transformado, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo. Luego se agregaron entre 10ng y 100 ng de plásmido, y se las incubó 20 min en hielo. Rápidamente, se les aplicó un shock térmico de 90 s a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego, se agregaron 900 µl de medio LB sin antibiótico durante 45 min a 37°C. Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 µl), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

2.7. Preparación de plásmidos a pequeña escala o mini-preparaciones

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (363). Tubos de vidrio conteniendo 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias

provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas en LB agar. Los cultivos fueron mantenidos por 20 h aproximadamente a 37°C en agitación a 180 rpm. Luego, 1,5 ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000 rpm, 5 min. El precipitado celular fue resuspendido en 300 µl de Solución de resuspensión P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) conteniendo ARNasa A (5 0 µg/ml). Luego, 300 µl de Solución de desnaturalización P2 (NaOH 0,2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de renaturalización P3 (KAcO 3M pH 5,2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700 µl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el material precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70%. El precipitado finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de H_2O.

2.8. Análisis de plásmidos por enzimas de restricción

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron analizados mediante mapeos por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias mini- preparaciones de ADN plasmídico fueron verificadas simultáneamente. 2-3 µl de ADN plasmidíco proveniente de mini-preparaciones fueron sometidos a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 µl de ADN plasmídico, 2 µl de *buffer* de restricción, 0,5 U de la enzima de restricción escogida y H_2O hasta completar 20 µl de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en *buffer* TBE (Tris-HCl 25 mM, Ácido Bórico 100 mM; EDTA10 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente, las bandas fueron puestas de manifiesto mediante exposición a luz UV y documentadas fotográficamente en papel térmico.

2.9. Preparación de plásmidos a gran escala o maxi preparaciones

Los plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala con el objeto de obtener una masa suficiente como para llevar adelante los experimentos de transfecciones. Para ello, las maxi-preparaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso de columnas de

afinidad (QIAGEN). Brevemente, 350 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado, fueron inoculados con una alícuota de suspensión de bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas en LB agar.

Los cultivos fueron mantenidos por 20 h aproximadamente a 37°C en agitación a 180rpm. Los cultivos, en fase logarítmica de crecimiento, fueron trasvasados a botellas de policarbonato de 500 ml y centrifugados a 6000 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado celular fue resuspendido en 10 ml de solución de resuspensión P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM) conteniendo ARNasa A (50 µg/ml). Luego, 10 ml de solución de lisis P2 (NaOH 0,2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 10ml de solución de renaturalización P3 (KAcO 3 M pH 5,2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 20.000 g durante 10 min a 4°C. Mientras tanto, las columnas se equilibraron con buffer de QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, isopropanol 15%, Triton X-100 0,15%). El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxipreparaciones). La columna fue vaciada por gravedad y lavada dos veces con 30 ml de buffer de lavado QC (NaCl 1mM, MOPS 50 mM, isopropanol 15%). Finalmente, el ADN retenido en la columna fue eluído con 15 ml de buffer de elución QF (NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,5, Isopropanol 15%). El ADN eluído fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000g. El ADN precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% y el precipitado fue secado al aire durante 20 min y resuspendido en H2O miliQ. La calidad del ADN plasmídico se verificó en geles de agarosa y la concentración final se midió por espectrofotometría.

3. Cultivos celulares

3.1. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares HEK293, 1321N1 y HT22.

HEK293: Esta línea celular deriva de células embrionarias de riñón humano. Son células adherentes y de aspecto fibriblástico. La línea celular fue cedida gentilmente por el Dr Francesco Di Virgilio (Universidad de Ferrara, Ferrara, Italia).

1321N1: Esta línea celular deriva de un astrocitoma humano. Las mismas son adherentes y tienen morfología glial.

HT22: Esta línea celular corresponde a un subclon de la línea HT4, la cual deriva de un cultivo primario de hipocampo de ratón. Fue cedida generosamente por el Dr. Dietmar Spengler (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Múnich, Alemania).

3.2. Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Las células HEK293 fueron cultivadas en medio esencial mínimo de cultivo DMEM alta glucosa (4,5 g/ml) suplementado con bicarbonato de sodio (2,4 g/L), HEPES (2,2 g/L), suero fetal bovino (SFB) previamente decomplementado por calor a 65°C durante 30 min (10% final), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y glutamina (4 mM).

Tanto las células 1321N1 como las HT22 fueron cultivadas en medio esencial mínimo de cultivo DMEM baja glucosa (1 g/ml) suplementado con bicarbonato de sodio (2,4 g/L), HEPES (2,2 g/L), suero fetal bovino (SFB) previamente decomplementado por calor a 65°C durante 30 min (10% final para el caso de las 1321N1 y 5% final para las HT22), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y glutamina (4 mM). En el caso de los clones estables generados a partir de cada línea en particular, el medio de cultivo correspondiente también contiene el agente selectivo adecuado para asegurar la expresión del transgén transfectado en cada caso.

Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO2. Todas las líneas se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96 h de una dilución 1:5 a 1:20 dependiendo la tasa de crecimiento. Para el mantenimiento, así como para el plaqueo de las células para cada experimento, las células fueron lavadas con PBS y despegadas de la placa de cultivo por medio del tratamiento con tripsina durante 1-5 min a 37°C.

3.3. Generación de clones estables

Se generaron las siguientes líneas sobreexpresoras de transgenes por medio de transfección de plásmidos de DNA y posterior selección para garantizar la integración estable del mismo al genoma de la línea celular.

Clones HEK293 P2X7-WT: Células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3 P2X7-WT con resistencia a Neomicina. Se seleccionaron clones resistentes a Neomicina sobreexpresores de P2X7-WT. Se obtuvieron 9 clones.

Clones HEK293 P2X7-Gln460Arg: Células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3 P2X7-Gln460Arg con resistencia a Zeocina. Se seleccionaron clones resistentes a Zeocina sobreexpresores de P2X7-Gln460Arg. Se obtuvieron 7 clones.

Clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg: Un clon HEK293 P2X7-WT (clon 13) fue transfectado con el plásmido pcDNA3 P2X7-Gln460Arg con resistencia a Zeocina. Se seleccionaron clones con doble resistencia a Neomicina y Zeocina sobreexpresores de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg. Se obtuvieron 11 clones.

Clones 1321N1 P2X7-WT: Células 1321N1 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3 P2X7-WT con resistencia a Neomicina. Se seleccionaron clones resistentes a Neomicina sobreexpresores de P2X7-WT. Se obtuvieron 5 clones.

Clones 1321N1 P2X7-Gln460Arg: Células 1321N1 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3 P2X7-Gln460Arg con resistencia a Zeocina. Se seleccionaron clones resistentes a Zeocina sobreexpresores de P2X7-WT. Se obtuvieron 5 clones.

Clones 1321N1 P2X7-WT/Gln460Arg: Un clon 1321N1 P2X7-WT (clon 6) fue transfectado con el plásmido pcDNA3 P2X7-Gln460Arg con resistencia a Zeocina. Se seleccionaron clones con doble resistencia a Neomicina y Zeocina sobreexpresores de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg. Se obtuvieron 8 clones.

Clones HEK293 P2X7-WT-STREP P2X7-Gln460Arg-HIS: Células HEK293 fueron transfectadas en simultáneo con los plásmidos pEXPR-IBA7 STREP tag P2X7-WT y pEXPR-IBA43 6xHistidine-tag P2X7-Gln460Arg ambos con resistencia a Neomicina. Se seleccionaron clones resistentes a Neomicina sobreexpresores de P2X7-WT-STREP y de P2X7-Gln460Arg-HIS. Se obtuvieron 20 clones.

3.4. Transfección estable

Se realizó el siguiente protocolo general de transfección celular y establecimiento de clones sobreexpresores estables para la obtención de todos los clones estables mencionados.

Se sembró la línea celular correspondiente en placas de 6 pocillos 48 h previo al momento de la transfección, de manera de llegar a este punto con 70-80% de confluencia. Cada pocillo se transfectó con 1 μg del plásmido correspondiente con 4 μL de Lipofectamina 2000 2 mg/ml (Invitrogen) durante 4 h en 2,5 ml de Opti-MEM. Transcurrido este tiempo se reemplazó el medio por medio de cultivo de mantenimiento para cada tipo celular. Al día siguiente las células transfectadas se plaquearon en nuevos pocillos en diluciones altas (entre 1/20 y 1/100 dependiendo de la línea celular) de manera de obtener células individuales en la superficie del pocillo e impedir el sobrecrecimiento de la población celular. 48 hs luego de la transfección se cambió el medio por medio con antibiótico de selección (G-418 800 ug/ml o Zeocina 100 ug/ml). Vale destacar que estas concentraciones de antibiótico son suficientes para producir la muerte de células no transfectadas con plásmidos que contengan dicha resistencia en el lapso de 4-8 días. Se renovó el medio con antibiótico de selección cada 48-72 h. Con el transcurrir de los días se pudo observar la muerte y desprendimiento de muchas células debido a la toxicidad del antibiótico. Luego de 1-2 semanas de selección, se hicieron evidentes focos de células resistentes. Estas células provienen de una única célula transfectada con el plásmido correspondiente, el cual eventualmente se integró al genoma de manera estable. Cuando los focos tuvieron un tamaño considerable (visibles al ojo humano sin amplificación) se los tripsinizó individualmente y se transfirió la totalidad del mismo a un pocillo de placa de 24 pocillos. Cada uno de estos focos representa un clon estable de la transfección correspondiente, originados cada uno a partir de una única célula exitosamente transfectada y que mantiene la expresión de la resistencia a antibiótico. A continuación se dejó crecer cada clon hasta alcanzar 80% confluencia y se los comenzó a amplificar transfiriéndolos a superficies progresivamente mayores. Durante dicho proceso de amplificación que llevó en general entre 4 y 6 semanas se mantuvo siempre el antibiótico de selección. No todos los clones obtenidos de los focos sobrevivieron a dicho proceso. Luego de un mínimo de 4 semanas y al conseguir una amplificación tal de tener cada clon en placas de 10cm se procedió a congelar varias ampollas de cada clon y a caracterizar la expresión del transgén por RT-PCR.

4. RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real

4.1. Diseño de primers y controles

La mayoría de los primers empleados en este trabajo de tesis fueron diseñados por el tesista. En algunos casos el laboratorio ya contaba con secuencias probadas o las mismas fueron provistas por grupos colaboradores. Para el diseño de nuevas secuencias de primers se utilizó el programa Beacon Designer 6.0 que optimiza la búsqueda de *primers* para realizar PCR a partir de la secuencia de ARNm de cada transcripto anotada en la base de datos *RefSeq* del NCBI. Se procuró elegir pares de primers que hibridaran en distintos exones, para no confundir con productos de la amplificación de ADN genómico. Se verificó la especificidad de los *primers* realizando una búsqueda en las bases del datos del NCBI a través de la herramienta BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) y se analizaron los amplicones con el programa GenomeBrowser de UCSC (www.genome.ucsc.edu).

En la **Tabla 2** se detalla la totalidad de los *primers* empleados en esta tesina, así como también sus condiciones de uso.

A) PCR común

Nombre	Secuencia Directo	Secuencia Reverso	MgCl2 (mM)	Annealing (ºC)
P2X7 human	gtggatgaatcccacattaggatggtg	tactgcccttcactcttcggaaac	2	58
Actina	gtggggcgccccaggcacca	cggttggccttggggttcagg	2	58
P2X7 WT FRET	tcaagctttatccatcacac	ggcccgggagtaaggactct	2	58
P2X7 Gln460Arg FRET	aaaagcttagggagggaggctg	ggcccgggagtaaggactct	2	58
Cerulean FRET	aaaccggtcatggtgagcaaggg	ggtctagattacttgtacagctcg	2	62
cpVenus FRET	aaaccggtggacgatgacgataagg	ggtctagaagcagccggatcaagc	2	62

B) PCR en Tiempo Real

Nombre	Secuencia Directo	Secuencia Reverso	MgCl2 (mM)	Annealing (ºC)
P2X7-WT	ggacaaccagaggagataca	tggtagagcaggaggaactg	2,5	65
P2X7-Gln460Arg	gaaccagcagctactagggagaag	gagtcgcctcctttctaagcagcc	2,5	65
CHUK human	ctatgctgaggttggtgtc	ctgtaggagtgatctgaagg	4	68
RCAN1 human	ggctggcccttactgctttat	tacagacccacgcagtcaag	4	68
RPL19 human	caatgccaactcccgtcagcagatc	gtgtttttccggcatcgagccc	4	60
CHUK mouse	attggagttggttagcagaatgac	cggactggtaagtgaggaatgg	4	63
RCAN1 mouse	tgtggagtccgtcgtagc	tggcatcaggttattcagagtg	4	68
HPRT mouse	tgggcttacctcactgctttcc	cctggttcatcatcgctaatcacg	4	63

Tabla 2. Primers utilizados para PCR y PCR en tiempo real. Se muestran las secuencias de todos los *primers* directos y reversos empleados para amplificar mediante reacciones de PCR **(A)** y PCR en Tiempo Real **(B)**. Se detallan además las concentraciónes de cloruro de magnesio y temperaturas de *annealing* óptimas para el uso de los mismos.

4.2. Extracción de ARN

Se aisló ARN total de células en cultivo siguiendo el método de tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo (364). Se descartó el medio de cultivo de una placa de 3,5 cm de diámetro confluente al 80%, y se lisaron las células con 500 µl de solución D (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM, pH 7,0; N-lauril-sarcosil 0,5% m/v; β-mercaptoetanol 0,1 M) la cual permite la ruptura de las células sin que el ARN sea degradado. Luego, se extrajo el ARN por el agregado de 75 µl de acetato de sodio 2 M (pH 4), 500 µl de fenol ácido y 150 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1) e incubando en hielo 15 min. Posteriormente, se centrifugó 20 min a 15.000 g a 4°C y se tomó cuidadosamente la fase acuosa superior, quedando el ADN, lípidos y proteínas en la fase orgánica y la interfase. El ARN se precipitó incubando la fase acuosa con un volumen de isopropanol a -20°C por lo

menos 2 h y centrifugándolo 30 min a 15.000g a 4°C. Finalmente, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, se lo secó y se resuspendió en 20 µl de agua milliQ estéril. Para cuantificar el ARN se realizó una dilución 1/100 de cada muestra en agua milliQ estéril y libre de ARNasas y se determinó su concentración en un espectrofotómetro por absorbancia a 260 nm. La pureza de las muestras fue evaluada calculando el índice de A260/A280, el cual es un buen estimativo de la cantidad de proteínas contaminantes en la muestra. Las muestras que se utilizaron tenían un índice entre 1,8 y 2,0. Además se comprobó la integridad del ARN corriendo 2 µl en un gel de agarosa 2% y verificando la ausencia de bandeados y la presencia de bandas definidas para los ARN ribosomicos.

4.3. Extracción de ARN para experimento de microarray

Con el fin de asegurar una óptima calidad del ARN obtenido y emplear las pautas requeridas para obtener muestra de ARN aceptable para realizar el microarray, las muestras de ARN para dicha técnica se obtuvieron mediante el método de reactivo de TRIzol, como se describe a continuación. El mismo es también una adaptación del método de Chomczynski y Sacchi (364). Se descartó el medio de cultivo de una placa de 3,5cm de diámetro confluente al 80%, y se lisaron las células con 500 µl de TRI Reagent (Molecular Research Centre). Se agregaron 100 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó 15 min a 12.000g a 4°C y se tomó cuidadosamente la fase acuosa superior, quedando el ADN, lípidos y proteínas en la fase orgánica y la interfase. El ARN se precipitó incubando la fase acuosa con un volumen de isopropanol durante 10 min a temepratura ambiente. Luego se centrifugó 10 min a 12.000g a 4°C. Finalmente, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, se lo secó y se resuspendió en 20 µl de agua milliQ estéril.

4.4. Reacción de retrotranscripción

Se desnaturalizó el ARN incubándolo 5 min a 65°C y pasándolo inmediatamente a hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. Luego, se realizó la transcripción reversa incubando 1 µg de ARN, 500 µM de cada dNTP, 20U de RNAsin (Promega), 5 µM de oligo-dT, 300 U de la enzima retrotransciptasa M-MLVT RT (Promega) y su buffer correspondiente en un volumen final de 20 µl a 37°C durante 1 hora. Se inactivó a la enzima

incubando 5 min a 95°C.

4.5. Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se tomaron 2,5 µl de ADNc obtenidos de la reacción de retrotranscripción y se realizó la reacción de PCR incubando con la siguiente mezcla de reacción:

- 2,5 µl de buffer de PCR 10 X sin $MgCl_2$
- 1 µl de $MgCl_2$ 50 mM
- 1 µl de primers (directo y reverso) 100 µM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,15 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen)
- H_2O hasta completar volumen final de 25 µl

Se utiliza un termociclador (BioRad) con el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial 95°C 10 min
- 40 Ciclos de reacción de la polimerasa:
  Desnaturalización 95°C 20 s
  Apareamiento de los primers 58°C 20 s
  Elongación 72°C 20 s
- Extensión final 72°C 10 min

Los productos de amplificación fueron visualizados corriendo el volumen total de la reacción en un gel de agarosa entre 1% y 2% de acuerdo al tamaño de producto esperado con bromuro de etidio y utilizando un transiluminador UV.

4.6. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)

Mezcla de reacción de PCR que se agrega a una dilución del ADNc:

- 2,5 µl de buffer de PCR 10 X sin $MgCl_2$
- X µl de $MgCl_2$ 50 mM
- 0,25 µl o 1 µl de primers (directo y reverso) 100 µM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,5 µl de DMSO
- 0,15 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen)
- 0,015 µl de SyBR Green (Roche) dilución 1/60 en DMSO del stock
- H_2O hasta completar volumen final de 25 µl

El magnesio y la cantidad de primers se ajusta para cada par de primers: el magnesio en un rango de concentraciones de entre 1 mM y 4 mM y los primers en un rango de entre 1 µM y 4 µM.

Las condiciones de reacción de qPCR para cada par de primers empleado fue cuidadosamente puesta a punto, de manera de obtener únicamente el producto de amplificación deseado. Para esto, se determinaron las condiciones de reacción en las cuales se obtienen curva de melting con picos óptimos y se obtienen una única banda como producto de amplificación al correr el producto de qPCR en un gel de agarosa. Las variables a ajustar fueron, a saber:

-concentración de magnesio
-concentración de primers
-agregado o no de DMSO a la mezcla de reacción
-temperatura óptima de apareamiento de los primers

Cada muestra fue medida por duplicado o triplicado para el gen a determinar su expresión y para un control externo, de modo de relativizar los niveles de expresión de cada muestra con el fin de corregir posibles diferencias en cantidad de molde inicial. Para estos fines se eligieron los genes β-Actina, RPL19 y HPRT que tienen niveles de expresión elevados y prácticamente constantes en todas las condiciones probadas.

Como control negativo de amplificación se emplea mezcla de reacción sin agregado de

molde. Se considera una medición con valor positivo a aquella que tiene un valor de Ct de como mínimo 10 ciclos mayor que el control negativo.

Además se utiliza una curva de calibración preparada con diluciones seriadas (1/2) de una mezcla de todos los ADNc que se van a utilizar en la qPCR. El ADNc de cada muestra es diluido 30-50 veces para que entre en el rango de diluciones de la curva. Se utilizan 5 µl de ADNc diluido como molde de cada reacción. Un programa típico sería el siguiente:

- Desnaturalización inicial 95°C 3 min
- 40 Ciclos de reacción de la polimerasa:
  Desnaturalización 95°C 20 s
  Apareamiento de los primers *Temperatura óptima* 15 s
  Elongación 72°C 15 s
  Medición de fluorescencia
- Desnaturalización final 95°C 15 s
- Medición de *curva de melting* desde 65°C a 95°C adquiriendo valores de fluorescencia cada 0,2°C

Las cuantificaciones se realizaron mediante el método de Delta Ct (365). Brevemente, se determinó el valor de Ct para cada muestra (promediando los duplicados o triplicados técnicos) para el gen de interés y el gen de referencia empleado en cada caso. Luego se obtuvo el nivel de expresión arbitrario mediante interpolación en la curva de calibración generada con las diluciones seriadas y se relativizaron los niveles de expresión de cada muestra al valor del gen de referencia.

5. Western Blot

5.1. Preparación de los extractos celulares

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos o placas de 4 cm de diámetro. 24-48 h más tarde, al alcanzar 70% de confluencia, fueron lavadas con PBS y hambreadas con Opti-MEM durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, en el caso que corresponda, las células fueron estimuladas según sea indicado en cada experimento. Transcurrido el tratamiento las

células fueron mantenidas en hielo, se les aspiró el medio y se las lavó con PBS frío. Se lisaron directamente con 100 µl de *cracking buffer* (Laemmli buffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol y 5% v/v β-mercaptoetanol). Los extractos fueron levantados en tubos eppendorf con ayuda de un *rubber*, sonicados por 12 s a una amplitud del 10% en un sonicador de punta (Fisher Scientific) y finalmente calentados a 95°C por 5 min.

5.2. Obtención de fracciones de núcleo y citoplasma

Cuando fue necesario, se obtuvieron preparaciones de extractos celulares separando las porciones citosólicas y nucleares. Para esto, no se lisaron las células en *cracking buffer* como se detalló previamente, sino que se siguió el siguiente protocolo, modificado a partir de Kang y Kim (366). Algunas variables del protocolo original fueron modificadas para el tipo celular 1321N1 en particular, dado que se vio que las condiciones óptimas de extracción núcleo-citoplasma eran muy variables para cada tipo celular. Se ajustaron los tiempos de incubación y las concentraciones de detergentes y concentraciones salinas. La disgregación de la membrana plasmática para obtener el extracto citosólico se evaluó por microscopía óptica de transmisión y el éxito final se evaluó mediante WB de marcadores para citosol y núcleo.

El protocolo de extracción se inició a partir de 1 placa de 10 cm de células 1321N1 80% confluentes (alrededor de 500.000 células). Se lava con PBS y se levantan las células en 1 ml de PBS-EDTA 1 mM. Se centrifuga 3 min a 3000 rpm a 4°C y se resuspende en precipitado de células en 100 µL de *buffer* L1 completo (Tris-HCl pH=8 50 mM; EDTA 0,2 mM; NP40 0,1%; glicerol 10%; cóctel de inhibidores de proteasas en las concentraciones indicadas por el fabricante, ortovanadato de sodio 8 mM y PMSF 1 mM). Se incuba 5 min en hielo y luego se centrifugó 5 min a 5000 rpm a 4°C. Se guarda el sobrenadante que es el extracto citosólico, agregando *cracking buffer* 6X y almacenando a -20°C. El precipitado se lava con 500 µL de buffer L1 y luego se resuspende el precipitado en 100 µL de *buffer* L2 completo (Tris-HCl pH=8 50 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,1%; cóctel de inhibidores de proteasas en las concentraciones indicadas por el fabricante, ortovanadato de sodio 8 mM y PMSF 1 mM). Se sonica en un sonicador de baño de agua Diagenode (Bioruptor) en intensidad máxima durante 2 ciclos de 30 s y luego se centrifuga 10 min a 10000 g. Se guarda el sobrenadante que es el extracto nuclear, agregando *cracking buffer* 6X y almacenando a -20°C.

5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electro-transferencia y revelado

Las muestras preparadas en *cracking buffer* fueron resueltas en geles de poliacrilamida 6-15% desnaturalizantes (de acuerdo al peso molecular que tuviera la proteina deseada) en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, 0.1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular *Broad Precision Marker* (Bio Rad, Hercules,CA). Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro a 100 V durante 1h (1:30 h para proteinas de alto peso molecular) en *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0.05% SDS, 20% metanol). Luego, se tiñeron transitoriamente las membranas con Rojo Ponceau para chequear el proceso hasta ese paso y comparar aproximadamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1 h en agitación con solución de bloqueo TBS-Tween (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS, 0,05% Tween-20) con 5% m/v de leche descremada para bloquear los sitios inespecíficos en la membrana. Teniendo en cuenta que la leche tiene fosfatasas, para la inmunodetección de fosfoproteínas, la solución de bloqueo fue inactivada previo a su uso calentándola durante 1 h a 60°C. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en la misma solución de bloqueo o en BSA 5%-TBS-Tween, según el anticuerpo utilizado. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 min con TBS-Tween. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanito en una dilución 1:3000 en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego de tres lavados sucesivos con TBS-Tween y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada mediante un *kit* de quimioluminiscencia (SuperSignal West Dura, PIERCE, Rockford, IL, USA) utilizando un equipo digital LAS-1000 Imaging System (Fuji, Tokyo, Japan) o un revelador automatico de placas radiograficas (JPI). Para el revelado del control de carga sobre la misma membrana (se procuró que el anticuerpo empleado para cada control de carga fuera de diferente especie a la del anticuerpo empleado en primer lugar), se la lavó exhaustivamente durante al menos 5 h, y luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente y se continuó el protocolo de revelado.

6. Ensayos de inmunoprecipitación.

Las células fueron crecidas hasta una confluencia del 80% en placas de de 10 cm de diametro. Luego, fueron lavadas con PBS frío y levantadas con el buffer RIPA modificado (50 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP-40) al que se le agregó el cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biomedicals; en las concentraciones indicadas por el fabricante), ortovanadato de sodio (Sigma; 8 mM) y PMSF (Sigma; 1 mM). Los extractos fueron lisados durante 1 h a 4°C en rotor giratorio. Se centrifugó durante 10 min a 3000 g y se recuperó el sobrenadante que contiene el extracto proteico. Los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se realizaron a 4°C durante toda la noche utilizando el anticuerpo específico para caso en particular (ver **Tabla 3**). Los inmunoprecipitados fueron recuperados con bolitas de agarosa o sefarosa. Se realizó un paso de *preclearing* (1 h a 4°C en rotor giratorio) antes de la IP utilizando suero comercial no inmune de conejo (Santa Cruz Biotechnology) o de ratón (Santa Cruz Biotechnology) más bolitas de proteína correspondiente en cada caso para disminuir el pegado no específico al anticuerpo. Los inmunoprecipitados fueron lavados dos veces con el buffer RIPA modificado y una última vez con PBS frío. Luego fueron resuspendidos en *cracking buffer*. Después de calentar a 95ºC por 5 min, las muestras fueron centrifugadas a baja velocidad y los sobrenadantes fueron corridos en un SDS-PAGE.

Anticuerpo	Marca	Catálogo	Especie	Cantidad	Bolitas
BRAF	Santa Cruz	SC-9002	Conejo	1 υg	A-Sepharosa
PARP1	Santa Cruz	SC-1561	Cabra	1 υg	G-Agarosa
PAR	BD Biosciences	551813	Conejo	1 υg	A-Sepharosa
HIS	Covance	MMS-156R	Ratón	500 ng	A-Sepharosa
STREP	IBA	2-1507-001	Ratón	500 ng	A-Sepharosa

Tabla 3. Anticuerpos para ensayos de Inmunoprecipitación. Se detallan los datos de cada anticuerpo empleado en las reacciones de inmunoprecipitación mostradas en esta tesis. **Cantidad**: masa de anticuerpo inmunoprecipitante agregado por tubo de reacción. **Bolitas**: Tipo de bolitas empleadas para la precipitación del anticuerpo.

7. Transfecciones transitorias

7.1. Transfección transitoria de ADN para ensayos de FRET

Las células HEK293 fueron sembradas al 40% de confluencia en placas de cultivo de 6 pocillos a las que se le agrego previamente un portaobjetos circular de 25 mm de diámetro estériles para microscopia. 24h más tarde fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de polipropileno se colocaron entre 100 ng y 300 ng de plásmido y 250 µl de Opti-MEM, y en otro, 4 µl de Lipofectamina 2000, y 250 µl de Opti-MEM, por cada pocillo a transfectar. Transcurridos 15 min, se transfirió todo el contenido del tubo con Lipofectamina 2000 al tubo con ADN, se mezcló por inversion y se incubó por 20 min para que se formaran los complejos entre el policatión y el ADN. Luego, se agregó la mezcla a la placa, previamente lavada con PBS para eliminar trazas de suero y con 2 ml de Opti-MEM. Se incubó durante 4 h a 37°C y a 5% CO2 para la transfección y luego se reemplazó el medio por medio completo de mantenimiento habitual. 48 h después de la transfección las células en el portaobjetos fueron analizadas por microscopia confocal.

7.2. Diseño y transfección transitoria de RNAi

Las secuencias de oligonucleótidos de RNA de interferencia (RNAi) utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 4**. Todas estas secuencias fueron diseñadas por el tesista, empleando distintas estrategias. Se ha reportado que es posible diseñar RNAi capaces de diferenciar transcriptos que solamente difieren en un único nucleótido (367, 368). De esta manera fue posible diseñar RNAi que silencien específicamente cada variante de P2X7: P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg. A su vez, el oligo de RNAi para silenciar a PARP1 fue diseñado con ayuda del software de la compañía Ambion Research (http://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/life-science/rnai/synthetic-rnai-analysis.html).

Se diseñó además un RNAi inespecífico que no silencia ningún transcripto conocido en el transcriptoma humano.

RNAi	Secuencia
Inespecífico	UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT
P2X7-WT	AACCAGAGGAGAUACAGAUTT
P2X7-Gln460Arg	AACCAGAGGAGAUACGGATT
PARP1	GGUGGUUGACAGAGAUUCUTT

Tabla 4. RNAi empleado para el silenciamiento específico de genes. Se detalla la secuencia correspondiente a la hebra codificante del gen blanco. Se utilizaron oligos de RNA complementarios anillados, con dos timidinas en el extremo 3'.

Se siguió el mismo procedimiento para la transfección de RNAi en celulas HEK293 y en células 1321N1. Las células fueron sembradas al 50-60% de confluencia en placas de 10cm de diámetro. 24 h más tarde fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de polipropileno se colocó el volumen de RNAi para obtener una concentración final de 20 nM y 1500 µl de Opti-MEM, y en otro, 24 µl de Lipofectamina 2000, y 1500 µl de Opti-MEM, por placa. Transcurridos 10 min, se transfirieron 1500 µl del tubo con Lipofectamina 2000 al tubo con RNAi, se mezcló por inversión y se incubó por 20 min para que se formaran los complejos entre el poli-catión y el ARN. Luego, se agregó la mezcla a la placa, previamente lavada con PBS para eliminar trazas de suero y con 6 ml de Opti-MEM. Se incubó a las células durante 5 h a 37°C y a 5% CO_2 para la transfección y luego se reemplazó el medio por medio completo. 24 h después de la transfección las células se plaquearon en placas de 6 pocillos para los ensayos de Western Blot a la densidad adecuada, agregando el mismo número de células para cada condición. Se estimularon las células a partir de transcurridas 72 h de la transfección.

8. Medición de calcio

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20-24°C). Las células fueron crecidas en placas de Petri de 4 cm de diámetro (50% confluencia). Primeramente fueron cargadas durante 45 min en oscuridad y a 37°C con Fluo-4 AM 6 µM (Molecular Probes) y Pluronic F-127 0.14% (Molecular Probes) en un *buffer* mínimo con calcio (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM $NaHCO_3$, 1 mM Na_2HPO_4, 10 mM glucosa, 20 mM Hepes pH 7.4). Luego se lavó con dicho *buffer* para eliminar restos del fluoróforo y las placas fueron colocadas en la platina del microscopio de

fluorescencia Olympus BX-FLA. Se iluminó a las células con una lámpara de mercurio USH-I 02DH (USHIO) y las células fueron observadas con un objetivo 40X y cámara CCD Quantixa (Photometrix). Se utilizó un filtro de excitación 460-490nm (band pass), un espejo dicroico de 505nm, y un filtro de barrera a 515nm (high pass). Los tiempos de exposición fueron de entre 100 y 300 ms, y los cuadros fueron adquiridos cada 5 s. Luego de la adquisición de las primeras 2 imágenes (10 s de experimento) se aplicó rápidamente BzATP sobre el *buffer* de modo de obtener una concentración 50 μM. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Axon Imaging Workbench 2.1 y analizadas con el programa Image J 1.29v (NIH). Para la cuantificación se seleccionaron las células que se activaron luego de la aplicación de BzATP, y se restó el valor de intensidad del fondo de la imagen. Los datos se presentan como $\Delta F/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia basal (antes de la estimulación) y ΔF es el cambio en la fluorescencia alcanzado con el estímulo respecto de la condición basal.

9. FRET

2 días luego de la transfección (Ver 7.1) las células fueron sometidas a microscopía para determinar los niveles de FRET entre las proteínas fluorescentes transfectadas. Se tomaron imágenes de células vivas a 37°C en medio de cultivo DMEM sin agregados. Se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX81 con un objetivo 60X, 1,35 de apertura numérica de inmersión en aceite (Olympus).Las imágenes confocales se obtuvieron con el módulo confocal Olympus Fluoview FV1000, con un láser multi-argón (457, 488 y 515 nm) de 30 miliwats. Se utilizaron 3 configuraciones distintas para el análisis de FRET entre el par fluorescente Cerulean-Venus, a saber: (i) **FRET**: Ex 458 nm/Em 530-630 nm -excitación del dador Cerulean y recolección de fluorescencia en el ancho de banda de emisión del aceptor Venus-, (ii) **Dador**: Ex 458 nm/Em 466-494 nm -excitación del dador Cerulean y recolección de fluorescencia en el ancho de banda de emisión del dador Cerulean-, (iii) **Aceptor**: Ex 515 nm/Em 530-630 nm -excitación del aceptor Venus y recolección de fluorescencia en el ancho de banda de emisión del aceptor Venus-. La adquisición de imágenes se realizó con el software FV10-ASW (Olympus). Para la cuantificación se utilizó el software ImageJ versión 1.43 con el *plugin* PixFRET. Este *plugin* permite generar imágenes de FRET mediante el método de *sensitized emission*, por medio de computar las imágenes de una muestra adquiridas en la configuración de 3 canales descripta, cuantificando los niveles

de intensidad pixel a pixel (369).

Un parámetro muy importante en el cálculo de FRET por medio del método de *sensitized emission* es la evaluación de la contaminación de señales de fluorescencia entre los espectros del dador y el aceptor, dado que ambos se solapan (del inglés, spectral bleed-thoughs: SBTs). Este parámetro informa sobre la cantidad de luz detectada en el canal de **FRET** que no se debe a transferencia de energía (emisión del dador en el canal del aceptor y la excitación del aceptor cuando se excita al dador). Los SBTs del dador y el aceptor en la configuración de **FRET** fueron determinados en células transfectadas solamente con el dador (P2X7-Cerulean) o solamente con el aceptor (P2X7-Venus), calculando el radio de intensidad (I) en las configuraciones apropiadas luego de restar el fondo:

$$SBT_{Dador} = \frac{I_{FRET}}{I_{Dador}}$$, cuando solo se expresa el dador,

$$SBT_{Aceptor} = \frac{I_{FRET}}{I_{Aceptor}}$$, cuando solo se expresa el aceptor.

Con el *plugin* PixFRET se puede graficar el SBT de cada pixel en cada imagen como función de la intensidad del fluoróforo. A continuación estos valores de SBT se ajustan a un modelo lineal o exponencial con el fin de mejorar la precisión del cálculo, dado que los SBTs pueden no ser constantes debido al uso de distintos fotomultiplicadores en los canales de **Dador** y **FRET**.

A continuación las mediciones de FRET en células coexpresoras del dador y el aceptor se corrigen por el SBT y se normalizan (NFRET) de acuerdo a los niveles de expresión de dichas proteínas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{NFRET} = \frac{I_{FRET} - SBT_{Dador} X\ I_{Dador} - SBT_{Aceptor} X\ I_{Aceptor}}{\sqrt{{}_{Dador} XI_{Aceptor}}} X\ 100$$

El hecho de normalizar los valores de FRET a la raíz cuadrada del producto entre las intensidades de fluorescencia del dador y el aceptor permite controlar las variaciones en los niveles de expresión de cada fluoróforo entre distintas células, por lo que se obtiene una medida de FRET que es directamente comparable entre distintas muestras (370).

10. Microarray

El ARN para realizar las mediciones correspondientes se obtuvieron mediante extracción como se detalla en 4.3. Dichas muestras fueron hibridadas en microarrays de expresión que cubren todo el transcriptoma humano, representado en 47316 sondas (ILLUMINA gene expression arrays: array type HumanHT-12_V4_0_R2_15002873_B). Debido a la cantidad de muestras, se emplearon 2 arrays. Se midieron los niveles de fluorescencia crudos para cada una de las sondas en todas las muestras empleadas. Los datos crudos fueron analizados utilizando el lenguaje de programación estadística y gráfica R (http://www.r-project.org/). Una vez obtenidos los datos crudos de los distintos arrays, los mismos fueron pre-procesados utilizando el paquete R beadarray que esta disponible a través del proyecto BioConductor. Este paquete fue específicamente desarrollado para realizar el control de calidad y análisis inicial de datos obtenidos por BeadArrays de Illumina. (www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/beadarray.html). Dichos datos se normalizaron con la función *vsn* del lenguaje R (371).

Para el análisis de expresión diferencial entre los distintos tipos de muestras se usaron distintas funciones del paquete de programas LIMMA (372), las cuales se pueden usar con los datos normalizados obtenidos previamente. Los genes regulados significativamente se ordenaron usando el método empírico de BAYES (373), el cual emplea información del conjunto de todas las muestras analizadas para estimar la varianza de la medición para cada gen. Mediante este enfoque se logra estabilizar el análisis estadístico, sobre todo para cuando se usan pocos arrays, como es este caso (374). 10996 genes no mostraron señal de expresión en ninguna muestra (no se detectó señal por encima de los niveles de fondo), por lo que se los consideró irrelevantes y fueron excluídos en los análisis posteriores, con el fin de no subestimar los valores de varianza en la estimación de BAYES.

Para corregir los valores de significancia debido al testeo múltiple se usó el parámetro de la frecuencia de falsos descubrimientos (del inglés, *false discovery rate*, FDR). Esto permite obtener un valor ajustado de valor de significancia P.

El dendograma se realizó con una función de clustering jerárquico llamada hclust incluida en R. (https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html).

Los heatmaps se realizaron la función heatmap también incluida en R. La gama de colores sustituida por la misma utilizada en GSEA (ver análisis funcional). (http://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/stats/html/heatmap.html).

Para los análisis bioinformáticos se usaron distintas herramientas, a saber: Gene Ontology (http://www.geneontology.org/) se utilizó para asignar la Función Molecular y el Proceso Biológico para cada gen. GSEA -Gene Set Enrichment Analysis- (http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp) se utilizó para obtener asociaciones entre los genes obtenidos en el microarray y grupos de genes agrupados según algún criterio relevante previamente reportado.

11. Tratamiento estadístico de los datos

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de forma independiente. Los resultados son presentados como la media ± ES de cada condición experimental. Cuando fue posible se probó la homogeneidad de la varianza de los datos y su distribución normal. Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas o bien mediante prueba T de Student (comparación entre dos medias), o bien mediante ANOVA de uno o dos factores o ANOVA de medidas repetidas para el caso de las mediciones de calcio (GraphPad Prism versión 5 for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA), seguido de un contraste a posteriori de Bonferroni cuando más de 2 medias fueron comparadas.

RESULTADOS

1. Funcionalidad de las variantes de P2X7 en un modelo de expresión endógena

Con los antecedentes experimentales presentados en la introducción, se comprobó si el efecto observado de disminución de la funcionalidad de P2X7 en heterocigosis es reproducible en otros modelos además del estudiado en células HEK293. Se decidió explorar la funcionalidad de P2X7 en una línea celular derivada de astrocitos, dado que los mismos tienen un rol importante en los procesos fisiopatológicos relacionados con depresión y trastornos psiquiátricos (18, 114, 375, 376). De esta manera, se estudió a P2X7 en un modelo de expresión endógena, empleando la línea celular 1321N1, derivada de astrocitoma humano.

1.1. Caracterización de la línea celular 1321N1

En primer lugar, se caracterizó la expresión y función de P2X7 en la línea celular 1321N1. La expresión endógena de P2X7 fue confirmada por RT-PCR **(Figura 11A)**. Es importante aclarar que la variante expresada es P2X7-WT. Como ya se mencionó, el ligando endógeno de todos los receptores P2X es el ATP. Un análogo sintético es el 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP (BzATP), que ha demostrado ser específico para receptores P2X7 dado que no activa otros canales al emplearlo en concentraciones adecuadas (en el rango del orden micromolar bajo) (377, 378). A diferencia de las células HEK293 que no expresan *P2RX7*, esta línea astrocitaria expresa el gen *P2RX7* de manera endógena. Dicha expresión tiene consecuencias funcionales dado que al estimular estas células con BzATP se observa un aumento en los niveles intracelulares de calcio y fosforilación de la MAPK ERK 1/2 **(Figura 11B-C).**

De esta manera, esta línea celular resulta un modelo adecuado para estudiar a P2X7 en un modelo endógeno de expresión.

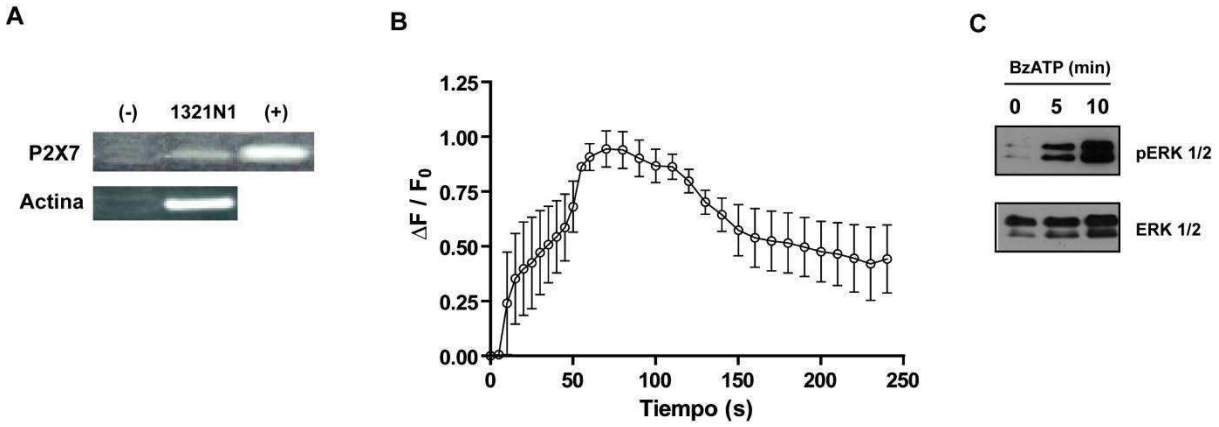


Figura 11. Expresión endógena y función del receptor P2X7 en la línea celular 1321N1. (A) Detección de ADNc de P2X7. Se extrajo ARN de células 1321N1, a partir del cual sintetizó ADNc y se realizó una reacción de RT-PCR con *primers* diseñados para amplificar cDNA de P2X7. El producto de PCR se resolvió en un gel 2% de agarosa teñido con bromuro de etidio y se lo visualizó en un transiluminador UV. **(-)**: Control negativo, reacción de PCR sin molde. **(+)**: Control positivo, plásmido que contiene la secuencia codificante de P2X7. La banda detectada tiene el tamaño esperado para los primers utilizados. Sobre las muestras de ADNc se realizó además PCR con primers para amplificar ADNc de actina, como control positivo. **(B)** Ingreso de calcio mediado por P2X7 endógeno. Las células se preincubaron con el agente dispersante Pluronic F-127 y el fluorocromo sensible a calcio Fluo-4 AM durante 45 min. Se detectó el aumento de calcio intracelular inducido por el agregado de BzATP 50 μM a los 10 segundos. Cada punto de la curva representa la media ± ES de tres experimentos independientes. **(C)** Activación de la MAPK ERK 1/2. Las células se estimularon con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó un Western Blot con anticuerpos anti p-ERK 1/2 (1/500) y anti ERK 1/2 (1/1000). La detección de ERK 1/2 sobre las mismas membranas sirvió como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento de un total de tres con resultados similares.

1.2. Coexpresión estable de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg en células 1321N1

Con el propósito de estudiar los efectos de la expresión de las distintas variantes de P2X7 sobre la expresión endógena en 1321N1, se generaron dos tipos de clones estables, a saber: clones sobreexpresores de P2X7-WT y clones sobreexpresores de P2X7-Gln460Arg. El clonado de ambas variantes en vectores de expresión adecuados, la transfección, establecimiento y mantenimiento de dichos clones se encuentra detallado en Materiales y Métodos 2.1 y 3.3. Luego de dicho proceso, se obtuvieron 10 clones 1321N1 P2X7-WT y 9 clones 1321N1 P2X7-Gln460Arg. De esta manera, los primeros expresan tanto P2X7-WT endógeno como transgénico y los últimos expresan P2X7-WT endógeno y el transgén de la variante polimórfica de P2X7 de modo que se obtiene una línea coexpresora de ambas variantes del receptor.

1.2.1. Respuesta intracelular de calcio mediada por P2X7 en clones 1321N1 coexpresores de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg

En estos clones se determinó la respuesta intracelular de calcio frente al estímulo con BzATP. En la **Figura 12** se observa que, salvo un leve corrimiento en la cinética de activación, no hubo diferencias significativas entre la línea parental 1321N1 y los clones 1321N1 P2X7-WT, dado que los niveles de calcio intracelular alcanzados en ambas líneas resultaron muy similares. No ocurrió lo mismo con los clones 1321N1 P2X7-Gln460Arg, en los que se observó una marcada disminución de la respuesta, la cual resultó casi nula.

De este modo se puede ver que la expresión exógena de P2X7-Gln460Arg provoca la pérdida de funcionalidad de P2X7-WT endógeno. Para confirmar esta observación, se generó una nueva ronda de clones coexpresores de ambas variantes de P2X7, transfectando P2X7-Gln460Arg en un clon sobreexpresor de P2X7-WT. Una vez más, los clones coexpresores mostraron una disminución en la entrada de calcio mediada por BzATP (Figura XXX, la misma).

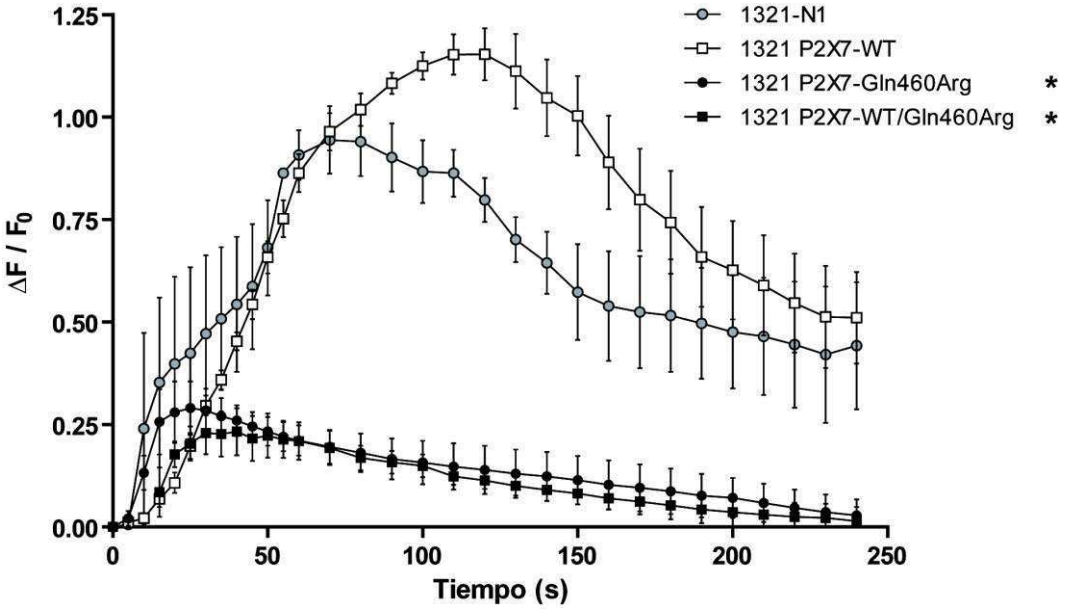


Figura 12. Respuesta intracelular de calcio en células 1321N1 expresoras de P2X7-WT y/o P2X7-Gln460Arg. Las células se preincubaron con el agente dispersante Pluronic F-127 y el fluorocromo sensible a calcio Fluo-4 AM durante 45 min. Se detectó el aumento de calcio intracelular inducido por el agregado de BzATP 50 μM. Cada punto de la curva representa la media ± ES de 6 clones de 1321N1 P2X7-WT, de 6 clones de 1321N1 P2X7-Gln460Arg, de 4 clones de 1321N1 P2X7-WT/Gln460Arg y de 3 mediciones de 1321N1 parentales; evaluados en cuatro experimentos independientes. *: P < 0,0001 vs 1321N1 y vs 1321N1 P2X7-WT. ANOVA de medidas repetidas. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

1.2.2. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por la activación de P2X7 en clones 1321N1 coexpresores de P2X7-WT y de P2X7-Gln460Arg

La disminución en la función de P2X7 en células coexpresoras de ambas variantes también se evidenció al estudiar la fosforilación de ERK 1/2 en los clones 1321N1. Las células que sólo expresan P2X7-WT -endógeno o transfectado- muestran una mayor activación de ERK 1/2 con respecto a los clones que también expresan P2X7-Gln460Arg **(Figura 13)**.

De esta manera se pone en evidencia en un modelo glial de expresión endógena del canal WT que la mutación puntual de P2X7 provoca cambios en la funcionalidad del canal solamente cuando ambas variantes son coexpresadas.

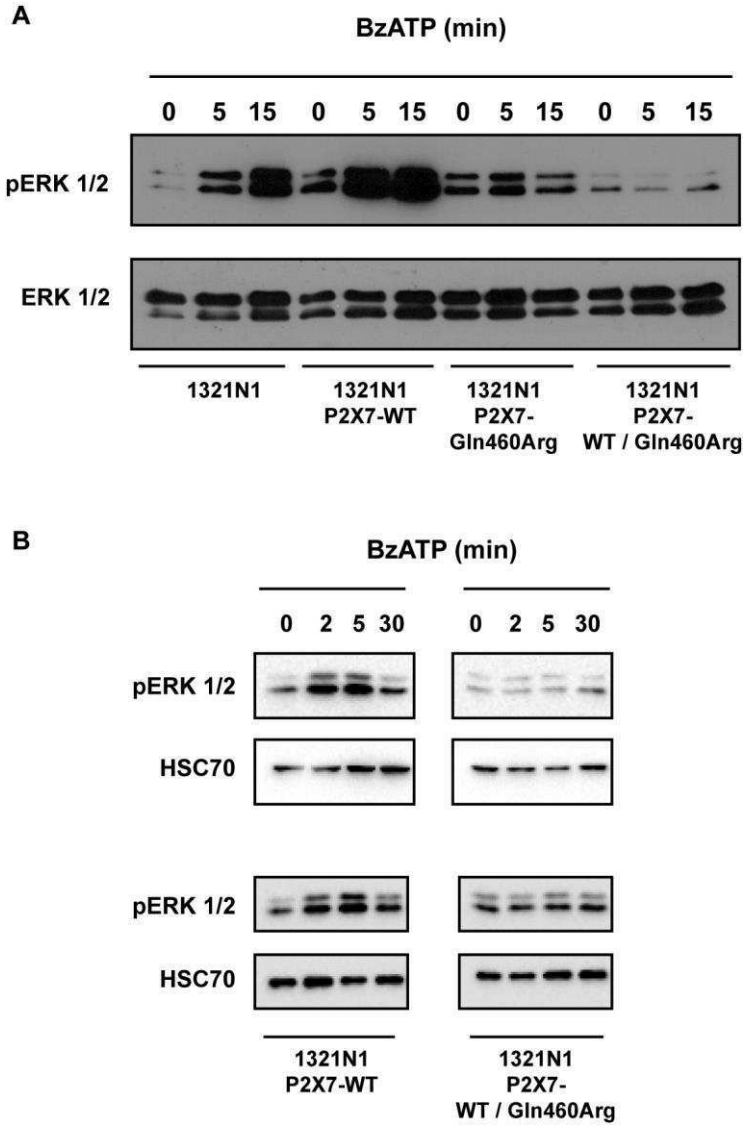


Figura 13. Activación de la MAPK ERK 1/2 en clones 1321N1 sobreexpresores de las variantes de P2X7. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante el tiempo indicado en cada caso. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron Western Blot con anticuerpos anti p-ERK 1/2 (1/500), anti ERK 1/2 (1/1000) y anti HSC70 (1/2000). La detección de ERK 1/2 o de HSC70 sobre las mismas membranas sirvió como control de carga. **(A)** Comparación entre 1321N1 parentales y todas las variantes sobreexpresoras de P2X7. **(B)** Comparación entre clones 1321N1 P2X7-WT (clones 6 y 9) y 1321N1 P2X7-WT/Gln460Arg (clones 1 y 21). Para cada clon se muestran imágenes representativas de dos (A) y tres (B) experimentos con resultados similares.

2. Los canales P2X7 recuperan su función luego del silenciamiento específico de una de sus variantes

Con el objetivo de verificar que es la coexpresión de ambas variantes de P2X7 lo que produce una pérdida en la función del receptor, se procedió a realizar experimentos de rescate: sobre células coexpresoras de ambas variantes con función de P2X7 disminuida se silenció la expresión de una de ellas, de modo de comprobar si es posible recuperar la función normal al tener expresión de una única variante.

Para corroborar esta hipótesis, se trabajó con los clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg, a los que se les silenció específicamente la expresión de P2X7-WT o bien de P2X7-Gln460Arg, de modo de obtener expresión de una única variante.

2.1. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7

2.1.1. Diseño de RNAi específicos y puesta a punto de la transfección en clones HEK293 expresores de una única variante

Primeramente fue necesario diseñar dos pares de oligos de ARN de interferencia (RNAi) para silenciar específicamente cada una de las variantes de P2X7. Como ambas difieren en tan solo un nucleótido, su diseño debió ser meticuloso, de manera de obtener RNAi que solamente silenciaran la expresión de una de las variantes, pero no la otra. Se han reportado ejemplos de RNAi capaces de silenciar una secuencia de ARN sin alterar la expresión de secuencias que difieren en solo una base (367, 368), de modo que se siguió este ejemplo de diseño, de acuerdo a como se detalla en Materiales y Métodos 7.2.

Una vez diseñado, fue necesario controlar que efectivamente cada RNAi silenciara solamente la variante deseada. Para esto se realizaron mediciones de calcio sobre clones HEK293 expresores de una única variante de P2X7. Luego de ensayar distintas condiciones de transfección de RNAi (concentración empleada de RNAi, tiempo de transfección y tiempo de recuperación postransfección) se logró el silenciamiento específico de las variantes de P2X7 **(Figura 14)**.

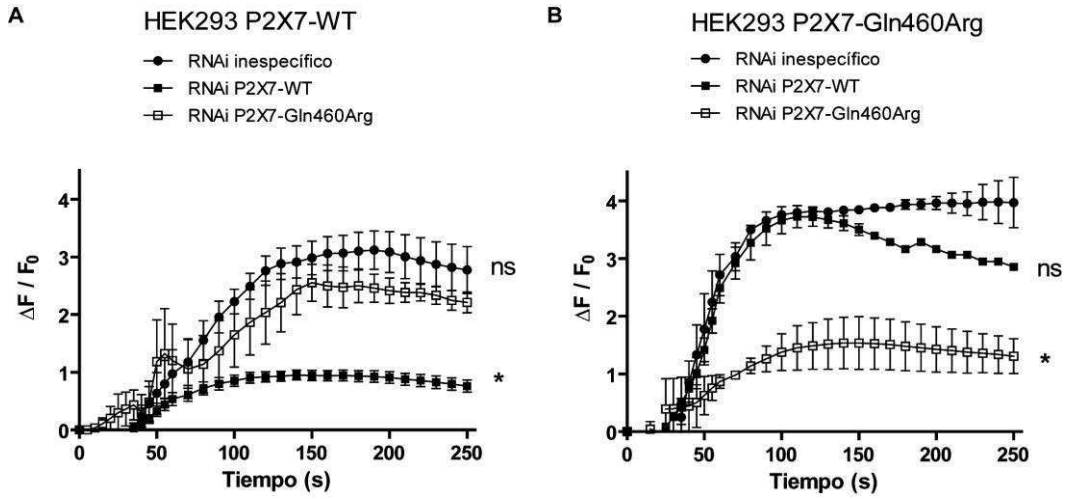


Figura 14. Respuesta intracelular de calcio en células HEK293 sobreexpresoras de P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7. (A) Empleo de oligos de RNAi específico en células HEK293 P2X7-WT. **(B)** Empleo de oligos de RNAi específico en células HEK293 P2X7-Gln460Arg. En ambos casos las células fueron transfectadas a una confluencia del 60% con el RNAi indicado en una concentración 100 nM durante 4 h con Lipofectamina 2000. Luego de 72 h, se preincubaron las células con el agente dispersante Pluronic F-127 y el fluorocromo sensible a calcio Fluo-4 AM durante 45 min. Se detectó el aumento de calcio intracelular inducido por el agregado de BzATP 50 μM. Cada punto de la curva representa la media ± ES de tres mediciones. *: P < 0,0001 vs RNAi inespecífico. **ns**: no significativo vs RNAi inespecífico en cada caso. ANOVA de medidas repetidas. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

De esta manera, se encontraron condiciones de transfección adecuadas en las cuales el RNAi-WT solamente reduce la entrada de calcio en clones HEK293 P2X7-WT y no sobre clones HEK293 P2X7-Gln460Arg con respecto al empleo de un RNAi inespecífico. De la misma manera, estas condiciones de transfección también permitieron que el RNAi-Gln460Arg únicamente disminuyera la entrada de calcio en clones HEK293 P2X7-Gln460Arg y no en clones HEK293 P2X7-WT con respecto al empleo de un RNAi inespecífico. Vale aclarar que los niveles de entrada de calcio en clones sin transfectar o transfectados con RNAi inespecífico fueron muy similares, lo que muestra que la transfección de RNAi en sí misma no modifica la activación del receptor. Se concluyó que el diseño de RNAi y la puesta a punto de su uso fueron exitosos.

Con las condiciones de silenciamiento obtenidas, se procedió entonces a realizar los experimentos de rescate de la función de P2X7 en clones HEK293 coexpresores de ambas variantes.

2.1.2. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7- WT/Gln460Arg

Se midieron los niveles de ARN mensajero de ambas variantes luego del silenciamiento, de modo de confirmar en los clones coexpresores que el silenciamiento fuera específico para cada subunidad sin alterar la expresión de la otra variante. Los niveles de expresión de cada ARN mensajero se midieron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) usando primers específicos para cada variante de P2X7. Una vez más, el diseño de primers que solamente amplifiquen una variante de P2X7 y no la otra fue cuidadosamente puesto a punto, todo lo cual se encuentra detallado en Materiales y Métodos 4.1 y 4.6.

Como se puede ver en la **Figura 15**, se consiguió silenciar alternativamente las variantes P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg con el empleo de RNAi específicos en clones HEK293 coexpresores de ambas variantes.

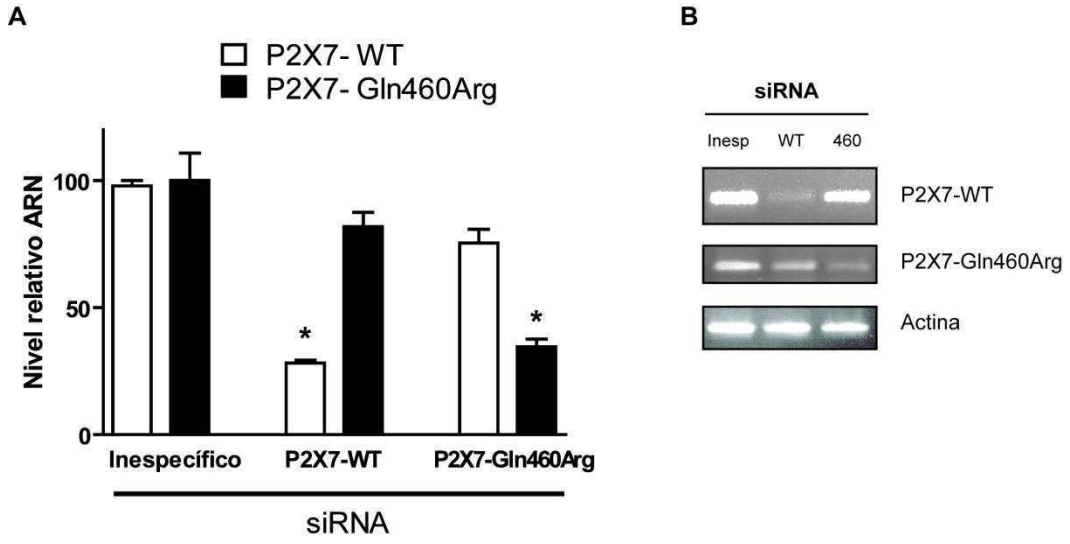


Figura 15. Silenciamiento específico de las variantes de P2X7 en células HEK293 coexpresoras de P2X7- WT/Gln460Arg. Las células fueron transfectadas con RNAi contra P2X7-WT o contra P2X7-Gln460Arg o con RNAi inespecífico como control. Se transfectó 100 nM de RNAi y se dejaron pasar 72 h antes de evaluar sus efectos. Los niveles de ARN mensajero fueron evaluados mediante RT-qPCR con primers específicos para cada variante. **(A)** Cuantificación de los niveles de mensajero empleando el método de delta Ct. *: $P < 0,01$. ANOVA de un factor. Contraste a posteriori: test de Bonferroni. **(B)** Productos únicos de PCR demostrando la especificidad de los primers. Ejemplo representativo de un experimento de transfección de un total de tres con resultados similares.

2.2. Efectos funcionales del silenciamiento específico de las variantes de P2X7

Se estudiaron los efectos funcionales del silenciamiento de cada una de las variantes de P2X7 en clones coexpresores HEK293.

2.2.1. Respuesta intracelular de calcio mediada por P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de sus variantes

Cuando se silenció específicamente P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg en clones coexpresores de ambas variantes, se observó una reversión en la disminución de la entrada de calcio en comparación a la entrada observada en estos clones coexpresores. Al silenciar alternativamente cada una de las dos variantes de P2X7 (empleando RNAi contra P2X7-WT o contra Gln460Arg), el ingreso de calcio aumentó de manera muy similar en ambos casos **(Figura 16)**. Esta reversión en el fenotipo no se obtuvo cuando se transfectaron los clones coexpresores con RNAi inespecífico. La transfección con RNAi inespecífico no modificó los niveles de entrada de calcio con respecto a las células sin transfectar. De esta manera, se puede ver que el silenciamiento específico de cualquiera de las variantes de P2X7 en clones coexpresores de ambas variantes produce un aumento en la entrada de calcio, alcanzándose niveles similares a los observados en los clones que solo expresan una variante de P2X7.

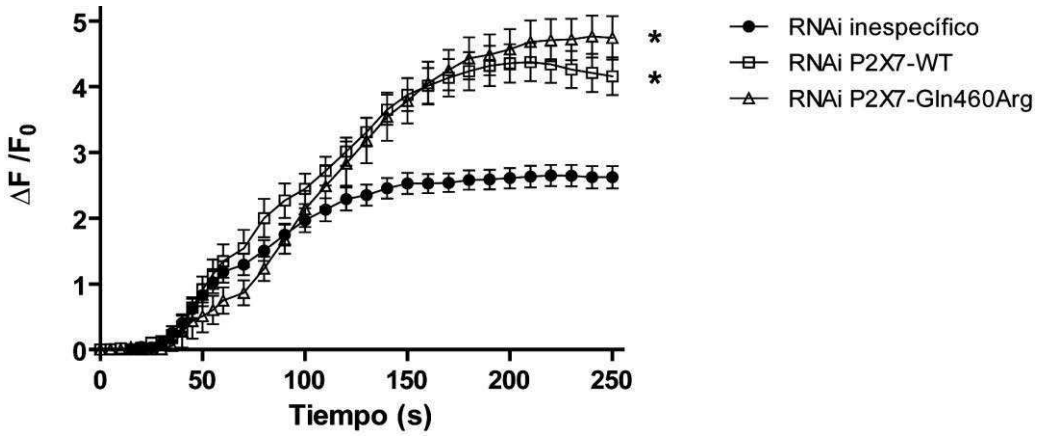


Figura 16. Respuesta intracelular de calcio en células HEK293 coexpresoras de P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7. Las células fueron transfectadas a una confluencia del 60% con el RNAi indicado en una concentración 100 nM durante 4 h con Lipofectamina 2000. Luego de 72 h, se preincubaron las células con el agente dispersante Pluronic F-127 y el fluorocromo sensible a calcio Fluo-4 AM durante 45 min. Se detectó el aumento de calcio intracelular inducido por el agregado de BzATP 50 μM. Cada punto de la curva representa la media ± ES de cuatro mediciones. *: P < 0,0001 vs RNAi inespecífico. ANOVA de medidas repetidas. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

2.2.2. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por P2X7 en clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg luego del silenciamiento específico de sus variantes

A continuación se estudiaron los efectos del silenciamiento sobre la activación de ERK 1/2 en los clones coexpresores. Estos clones muestran una activación de ERK 1/2 reducida **(Figura 17A)**. Cuando estas células coexpresoras fueron transfectadas con RNAi específico para P2X7-WT o RNAi específico para P2X7-Gln460Arg, la activación de ERK 1/2 se restableció, siendo muy similar a la observada en los clones que sólo expresan una variante de P2X7. Esto no ocurrió al transfectar RNAi inespecífico **(Figura 17B)**

En conclusión, cuando se silenció alguna de las variantes en los clones coexpresores, estos se comportaron funcionalmente como los clones que solo expresan una variante de P2X7. De esta manera se verifica que es la coexpresión de ambas variantes de P2X7 lo que produce una pérdida en la función del receptor (medida como entrada de calcio y activación de vías de señalización intracelulares disminuidas).

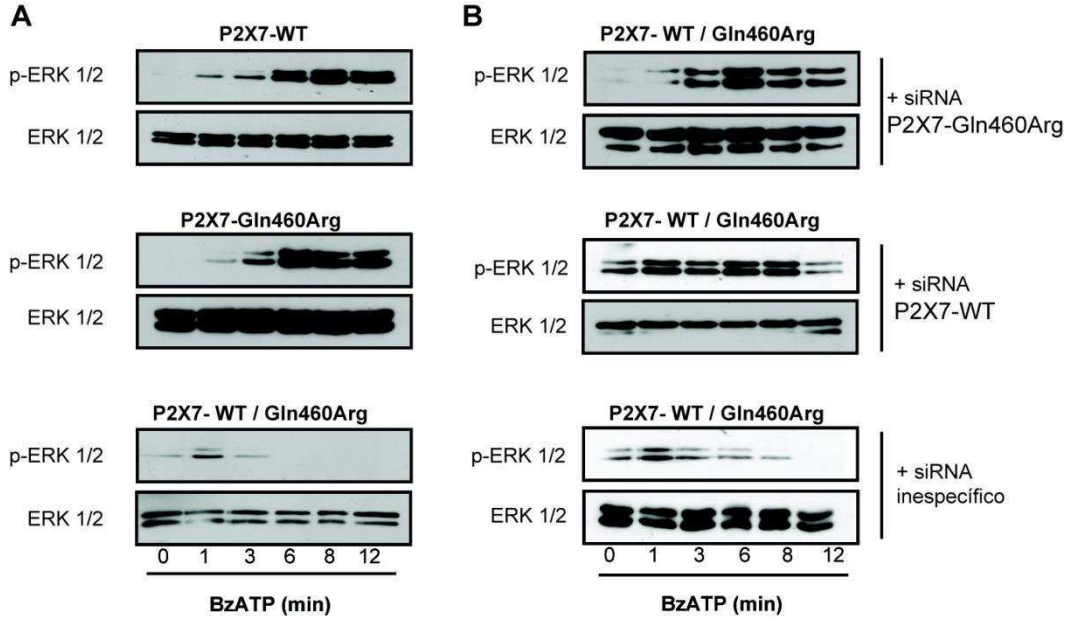


Figura 17. Activación de la MAPK ERK 1/2 en clones HEK293 sobreexpresores de las variantes de P2X7 luego del silenciamiento específico de las variantes de P2X7. (A) Activación de ERK 1/2 en clones sin transfectar. **(B)** Activación de ERK 1/2 en clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg transfectados con los oligos de RNAi específicos de P2X7. Las células fueron transfectadas a una confluencia del 60% con el RNAi indicado en una concentración 100 nM durante 4 h con Lipofectamina 2000. Luego de 72 h, las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante el tiempo indicado. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron Western Blot con anticuerpos anti p-ERK 1/2 (1/500). La detección de ERK 1/2 (1/1000) sobre las mismas membranas sirvió como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento de silenciamiento de tres con resultados similares.

3. Interacción de las variantes WT y Gln460Arg del receptor P2X7

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que los receptores P2X7 únicamente conformados por subunidades P2X7-WT o por subunidades P2X7-Gln460Arg presentan igual funcionalidad, con altos niveles de activación. Dado que es la coexpresión de ambas variantes de P2X7 lo que produce la pérdida de función del receptor, es válido suponer que ambas subunidades se asocien durante el ensamblado del receptor de manera que los trímeros de P2X7 resulten conformados por subunidades de ambas variantes en células coexpresoras. Estos trímeros compuestos por ambas subunidades serían los que presentan menor funcionalidad, explicando así los resultados observados hasta el momento.

Para corroborar esta hipótesis se decidió explorar si efectivamente ambas subunidades de P2X7 interactúan entre sí. Para esto se realizaron dos enfoques experimentales complementarios, a saber: Co-inmunoprecipitación (Co-IP) de las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg y mediciones de FRET entre ambas subunidades.

3.1. Interacción directa entre subunidades de P2X7 etiquetadas

3.1.1. Generación de clones coexpresores de las variantes de P2X7 fusionadas a etiquetas

Con el fin de poder diferenciar a nivel proteico entre ambas variantes del receptor (difieren únicamente en un aminoácido en la posición 460), se generaron proteínas de fusión entre cada subunidad de P2X7 y una etiqueta distinta. En particular, se agregó la secuencia del péptido de Streptavidina (etiqueta STREP) a P2X7-WT (P2X7-WT-STREP) y se agregaron seis residuos de Histidina (etiqueta HIS) a P2X7-Gln460Arg (P2X7-Gln460Arg-HIS). Ambas proteínas de fusión se insertaron en vectores de expresión y se generaron clones HEK293 expresores de las distintas variantes etiquetadas de P2X7, como se detalla en Materiales y Métodos 2.1 y 3.3. Es importante mencionar que el agregado de estas etiquetas a las variantes de P2X7 no modificó su funcionalidad en cuanto a la entrada de calcio o fosforilación de la MAPK ERK 1/2.

De esta manera, se generó un modelo de coexpresión de receptores P2X7 con etiquetas distintas, que permite diferenciar ambas variantes a nivel proteico.

3.1.2. Ensayos de co-inmunoprecipitación en clones coexpresores de las variantes de P2X7 etiquetadas

Se realizaron ensayos de Co-IP en células coexpresoras de ambas variantes de P2X7. La **Figura 18** muestra que P2X7-WT interactúa con P2X7-Gln460Arg. Esto se evidenció tanto cuando la Co-IP se realizó con un anticuerpo anti STREP y el Western Blot (WB) con un anticuerpo anti HIS **(Figura 18** paneles superiores), como cuando la etiqueta HIS fue inmunoprecipitada y luego se detectó a STREP mediante WB **(Figura 18** paneles inferiores). Los anticuerpos demostraron ser específicos para cada una de las etiquetas STREP y HIS, dado que no hubo inmunodetección en los WB utilizando extractos de HEK293 parentales que no expresan las variantes etiquetadas de P2X7.

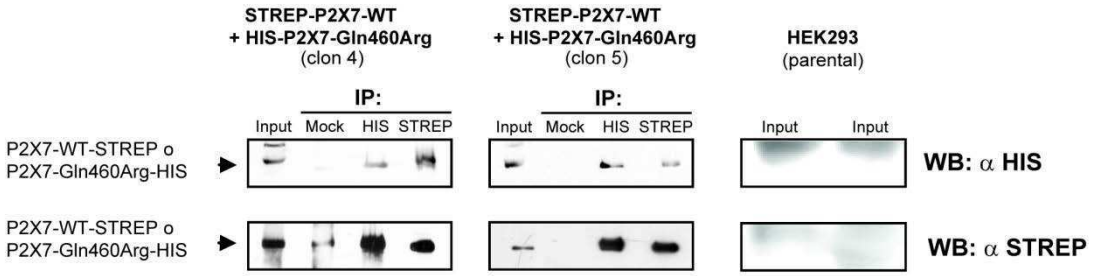


Figura 18. Coinmunoprecipitación entre las variantes etiquetadas de P2X7. Se realizaron ensayos de Co-IP sobre extractos proteicos de clones HEK293 coexpresores de STREP-P2X7-WT y HIS-P2X7-Gln460Arg, usando anticuerpos anti HIS (αHIS) y anti STREP (αSTREP) en presencia de Proteína A-G plus Agarosa. Se usaron los mismos anticuerpos para el revelado de WB. Panel derecho: control demostrando que los anticuerpos empleados no detectan bandas inespecíficas en células parentales sin transfectar. Input: Extractos proteicos crudos sin inmunoprecipitar; **Mock**: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de ratón, como control negativo de inmunoprecipitación. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Es importante destacar que los ensayos de Co-IP se realizaron a partir de fracciones de membrana celular tratadas con alta concentración de detergente (solución de Co-IP con SDS 0,1%) como se detalla en Materiales y Métodos 6. Esto se hizo con el fin de extraer las proteínas integrales embebidas en la membrana como es el caso de los receptores P2X7. El hecho de poder detectar la interacción entre las subunidades aún bajo estas condiciones permite suponer que dicha interacción en la membrana es fuerte.

Este resultado provee una primera evidencia acerca de la interacción entre las subunidades WT y Gln460Arg de P2X7.

3.2. Interacción directa entre subunidades de P2X7 ensamblados en membrana de células vivas

A continuación se investigó si la interacción entre subunidades de P2X7 detectada mediante el método bioquímico de Co-IP también se podía detectar a nivel de la membrana plasmática de células vivas. Para este fin, se utilizó la técnica de Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Esta técnica evidencia si dos moléculas se encuentran lo suficientemente cerca en el espacio como para que ocurra el fenómeno de transferencia de energía de resonancia entre ambas. La transferencia de energía mencionada ocurre solamente entre pares específicos de moléculas fluorescentes, de modo que la técnica requiere fusionar

dichas moléculas fluorescentes a las proteínas de interés. Si se detecta FRET, esto significa que las moléculas fluorescentes están lo suficientemente cerca, lo que indica que las proteínas de interés interactúan. Por lo tanto esta técnica permitiría concluir con mayor certeza que efectivamente son los canales compuestos por ambas subunidades ensambladas en la membrana celular los que producen una pérdida de función del receptor.

3.2.1. Diseño de un biosensor para detectar interacciones entre subunidades de P2X7 mediante la técnica de FRET

Como primera instancia para la medición de señales de FRET, fue necesario generar las variantes fluorescentes adecuadas para cada subunidad de P2X7. En base a bibliografía se seleccionó el par de proteínas fluorescentes Cerulean-Venus -ambas derivadas de la proteína fluorescente verde GFP-, por ser un par adecuado para estudiar interacción entre subunidades de receptores de membrana (379-381). El hecho de que ambas proteínas fluorescentes estén a una distancia de interacción no alcanza para que ocurra el fenómeno de FRET sino que además, ambas proteínas deben estar adecuadamente orientadas en el espacio una respecto de la otra, para que la transferencia de energía sea eficiente y se detecte señal de FRET. Para lograr este requisito, se utilizaron cinco variantes de Venus, que son permutaciones circulares de la proteína fluorescente original, lo que le confiere a dichas variantes distintas conformaciones tridimensionales, de manera que al enfrentarse con su par Cerulean, alguna de ellas tendrá la conformación correcta para mostrar FRET, si es que están a la distancia adecuada de interacción (382). De este modo se generaron las siguientes variantes de P2X7 por subclonado: P2X7-WT-Cerulean y P2X7-Gln460Arg-Cerulean y 5 variantes de Venus en P2X7-WT y en P2X7-Gln460Arg. En todos los casos la proteína fluorescente se incorporó en el extremo carboxilo terminal de P2X7, donde está reportado que no afecta a la funcionalidad del receptor (383).

Una vez generadas, se estudió si estas variantes fluorescentes de P2X7 eran funcionales. Esto fue confirmado mediante transfección transiente de las construcciones generadas y posterior medición de activación de la MAPK ERK 1/2 por WB **(Figura 19).**

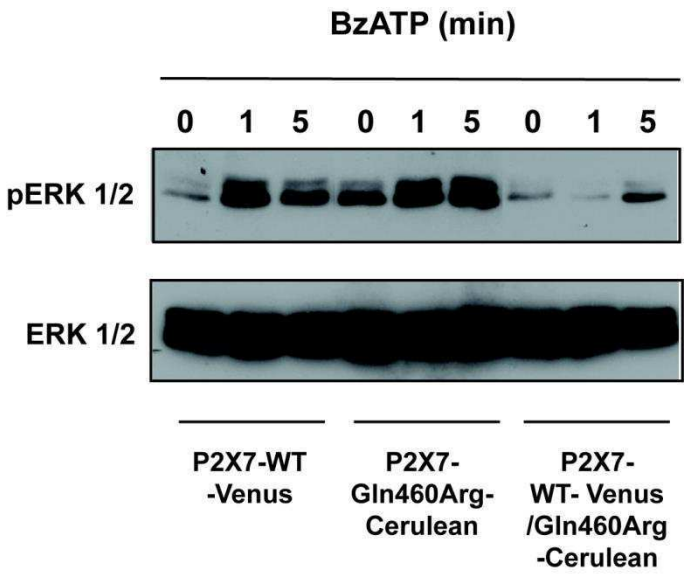


Figura 19. Activación de la MAPK ERK 1/2 en células HEK293 transfectadas con las variantes fluorescentes de P2X7. Las células se transfectaron con las variantes fluorescentes Cerulean y Venus de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg. 48 h después fueron estimuladas con BzATP 50 µM durante el tiempo indicado en cada caso. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron Western Blot con anticuerpos anti p-ERK 1/2 (1/500) y anti ERK 1/2 (1/1000). La detección de ERK 1/2 sobre las mismas membranas sirvió como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento de transfección de dos con resultados similares.

Los resultados de la **Figura 19** muestran que las proteínas de fusión de las variantes de P2X7 unidas a las proteínas fluorescentes elegidas son funcionales. Además se vuelve a evidenciar que la coexpresión de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg en la misma célula disminuye la activación de ERK 1/2. Cabe aclarar que no se pudo caracterizar la función de dichas proteínas mediante los ensayos de calcio dado que sus espectros de excitación y emisión coinciden en gran medida con los del fluoróforo empleado para la detección de calcio.

3.2.2. Ensayos de FRET en células vivas

Los ensayos de FRET fueron realizados en células vivas, mediante el método de *sensitized emission* (369, 384). Primero fue necesario corroborar que dicho método produjera señales de FRET adecuadas. Estos controles se realizaron empleando las variantes fluorescentes de P2X7-WT, dado que todas las variantes de P2X7-WT deberían interactuar sin importar la proteína fluorescente que tienen unida. De esta manera se eligió la permutación circular de Venus que mayor nivel de FRET mostraba, la que se utilizó para el resto de las mediciones.

Con el ensayo de FRET puesto a punto, se procedió a estudiar la interacción entre las

distintas subunidades. Las células cotransfectadas con P2X7-WT-Cerulean y P2X7-WT-Venus, así como también células cotransfectadas con P2X7-Gln460Arg-Cerulean y P2X7-Gln460Arg-Venus mostraron altos niveles de señal de FRET **(Figura 20)**. En ambos casos los canales P2X7 estaban compuestos por una única variante, P2X7-WT o bien P2X7-Gln460Arg. Esto asegura la interacción entre las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus.

Se obtuvieron señales de FRET equivalentes a estos controles positivos cuando se coexpresaron P2X7-WT y P27-Gln460Arg en la misma célula, sin importar el fluoróforo que tuvieran unido: P2X7-WT-Cerulean cotransfectado con P2X7-Gln460Arg-Venus o P2X7-WT-Venus cotransfectado con P2X7-Gln460Arg-Cerulean, confirmándose entonces la interacción en membrana entre las variantes WT y Gln460Arg del receptor P2X7 **(Figura 20).**

Como control negativo se empleó una proteína de membrana que no interactúa con P2X7: TrkA. Así, al cotransfectar P2X7-WT-Cerulean y TrkA-Venus o TrkA-Cerulean y P2X7-WT-Venus no se observaron niveles apreciables de FRET, demostrando que la interacción entre subunidades de P2X7 es específica.

En conjunto, estos resultados muestran por primera vez la interacción en membrana de las variantes WT y Gln460Arg de P2X7 y la estricta dependencia de la presencia de ambas para que se produzca una alteración en la función del receptor.

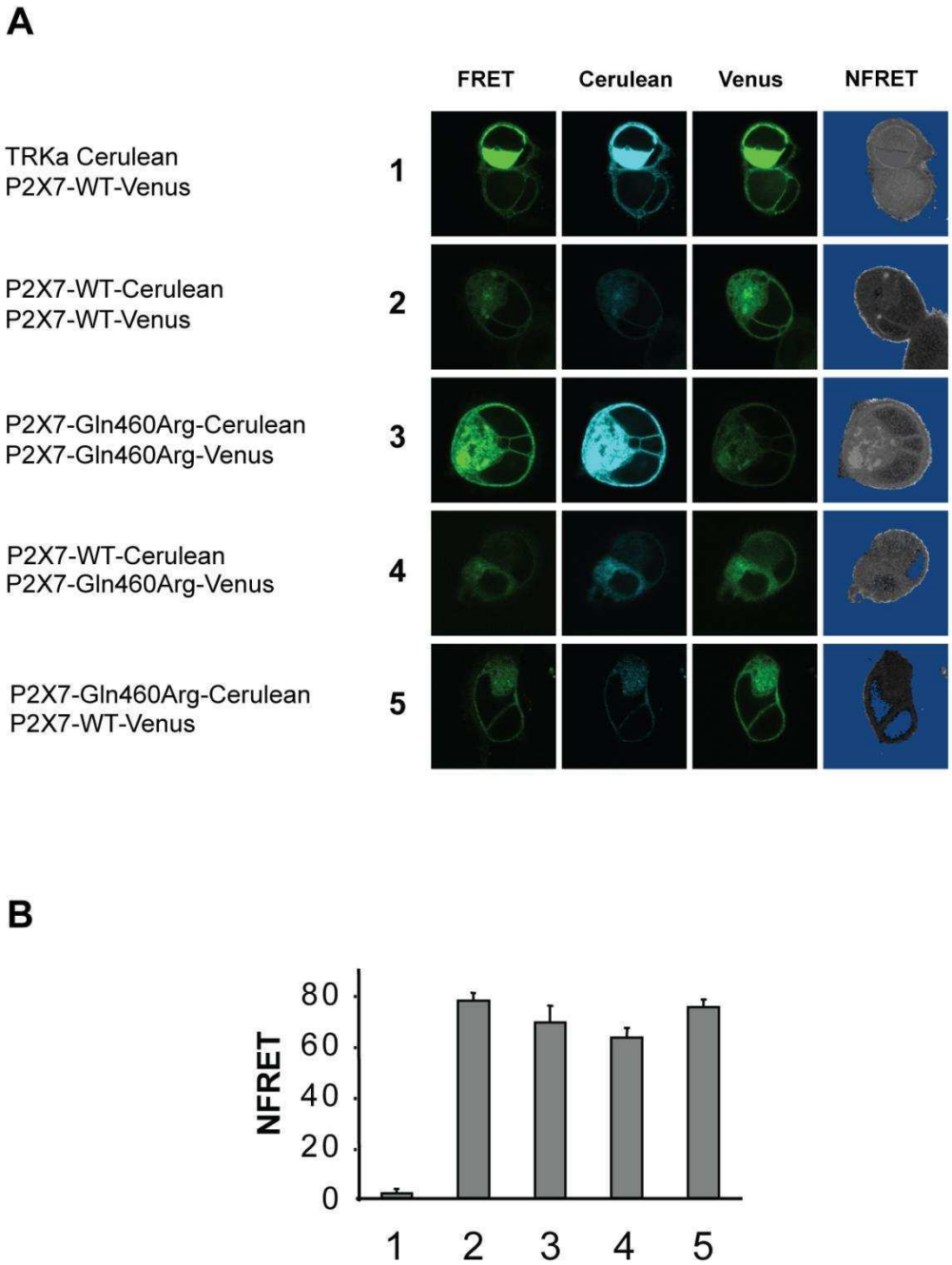


Figura 20. Mediciones de FRET en membrana de células vivas de las variantes fluorescentes de P2X7. Las células HEK293 fueron transfectadas con 50 ng de los plásmidos indicados y 48 h después fueron analizadas por microscopía confocal. Se evaluó la presencia de FRET entre dichas proteínas de fusión cuantificando píxel a píxel mediante el método de *sensitized emmision* y posterior análisis de imágenes con el complemento PixFRET del programa ImageJ. **(A)** Detección de señales de FRET por microscopía confocal. Primer columna: imagen de FRET: Excitación a 458 nm y Emisión a 530-630 nm. Segunda y tercer columnas: Fluorescencia individual de Cerulean y Venus respectivamente. Cuarta columna: NFRET, imagen de FRET normalizado de la misma célula. La escala de grises incluye señales de amplitud positiva y negativa. Los píxeles con señales menores al umbral se marcan en azul. Se muestran imágenes representativas de cada condición de transfección. **(B)** Cuantificación de NFRET. Se delimitaron múltiples regiones de interés (ROIs) en la membrana celular de cada célula, y se cuantificaron las amplitudes de la señal. Cada barra representa la media ± ES de 5-10 células, delimitando 4-6 ROIs por célula, evaluadas en cuatro experimentos independientes.

4. Validación in vivo de la pérdida de función de los receptores P2X7 heteroméricos

Habiendo demostrado mediante distintos enfoques experimentales que la coexpresión de P2X7-WT y la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg es lo que produce una pérdida de función en el receptor, resulta interesante estudiar el impacto funcional de la expresión en heterocigosis del polimorfismo *in vivo*. Para esto, el grupo liderado por el Dr. Jan Deussing en el Instituto Max Planck de Psiquiatría de Múnich, Alemania, basado en nuestros resultados, generó ratones transgénicos que expresan las distintas variantes del receptor P2X7 humano. Dicho grupo y el nuestro tienen una colaboración científica en el marco del proyecto de P2X7 y desórdenes depresivos.

Es importante destacar que los experimentos que se relatan a continuación fueron realizados por dicho grupo de trabajo. Dado que complementan, enriquecen y le dan un marco i*n vivo* a los hallazgos de caracterización funcional, y que más adelante en esta tesis (Resultados 10.3) se muestran resultados propios a partir de muestras obtenidas de estos ratones transgénicos, es que se consideró pertinente comentar en detalle dichos hallazgos en esta tesis.

Se generaron dos líneas murinas en las cuales el receptor P2X7 de ratón fue sustituido por el receptor P2X7-WT humano o por la variante polimórfica Gln460Arg. Luego se efectuaron cruzas con estas dos líneas y se obtuvo así una línea heterocigota para P2X7 humano. Sobre estas líneas se monitoreó la actividad electroencefalográfica (EEG) y el comportamiento normal de vigilia-sueño, dado que los trastornos del sueño es uno de los síntomas más significativos que acompañan a los trastornos afectivos o del estado de ánimo (385). Se vio que los ratones heterocigotas tienen la arquitectura del sueño alterada y una menor calidad del mismo en comparación con los ratones homocigotas. Por otra parte se sometió a las tres líneas de ratones transgénicos a un protocolo de estrés por derrota social crónica (del inglés, CSDS). Este protocolo es un modelo establecido de depresión (386, 387). Los ratones transgénicos para P2X7 humano mostraron cambios profundos provocados por el protocolo de CSDS, tanto fisiológicos como neuroendócrinos. En particular, solamente los ratones heterocigotas mostraron niveles muy elevados de corticosterona. Luego se llevó a cabo un amplio rango de ensayos de comportamiento, con el fin de evaluar las consecuencias del protocolo de CSDS a nivel comportamental. Estos ensayos demostraron que los ratones heterocigotas tienen un estado de mayor excitación, un aumento en el comportamiento relacionado con ansiedad y además desarrollaron déficits en el comportamiento social y

evitaron situaciones sociales. Este déficit en el comportamiento social evoca varias condiciones psiquiátricas que incluyen a los trastornos afectivos o del estado de ánimo. Los ratones heterocigotas mostraron además signos de comportamiento anhedónico, un síntoma característico de depresión (388, 389). Teniendo en cuenta estos hallazgos, los ensayos realizados sobre estos ratones transgénicos brindan claras evidencias de que la variante polimórfica Gln460Arg de P2X7 expresada en heterocigosis provoca un aumento en la vulnerabilidad a desarrollar trastornos del comportamiento en respuesta al estrés crónico. Estos resultados comprueban a nivel fisiológico las consecuencias funcionales caracterizadas a nivel molecular y celular por el tesista.

Una explicación más detallada de estos resultados así como las figuras correspondientes se pueden consultar en el **Anexo 1**.

5. Búsqueda de nuevos blancos involucrados en la señalización mediada por P2X7 y su variante polimórfica

Los resultados detallados hasta este punto, muestran las consecuencias funcionales de la coexpresión de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg, en cuanto que produce la pérdida de función del receptor. A continuación se procedió a buscar nuevos blancos involucrados en la señalización mediada por P2X7 que se encuentren alterados de alguna manera por la presencia de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg. Para esto, se emplearon dos enfoques complementarios: por un lado, la búsqueda de proteínas involucradas en los mecanismos de señalización de P2X7 no descriptas como tales hasta el momento, y por el otro, la búsqueda de genes con niveles de expresión génica alterados debido a la activación de las distintas variantes de P2X7. Para el primer enfoque se empleó la técnica de proteómica que permite mediante espectrometría de masa identificar proteínas, en este caso asociadas a los elementos de señalización de P2X7, mientras que para la detección de genes con expresión alterada se utilizó la técnica de microarray de expresión, que permite cuantificar los niveles de expresión de todos los genes en distintas condiciones, en este caso comparando células expresoras de las distintas variantes de P2X7.

5.1. Identificación de PARP1 asociada a la vía de transducción de señales de P2X7: Enfoque proteómico

Se llevó a cabo un abordaje de identificación de proteínas involucradas en la señalización de P2X7 mediante proteómica, en colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Chris Turck del Max Planck Institute de Múnich, Alemania.

5.1.1. Proteómica de proteínas asociadas a la MAPKKK B-Raf

La MAPKKK BRaf está involucrada en la señalización en células del SNC (390-392). Esto se comprobó en el modelo de la línea celular 1321N1, donde la activación de P2X7 produce la fosforilación de BRaf dependiente del tiempo **(Figura 21)**.

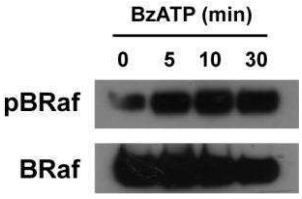


Figura 21. Fosforilación de BRaf en la línea celular 1321N1. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante el tiempo indicado. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó un WB con anticuerpos anti p-BRaf (1/1000), y anti BRaf (1/1000). La detección de BRaf sobre la misma membrana sirvió como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento de tres con resultados similares.

Teniendo en cuenta que BRaf se expresa en el contexto del SNC y que sirve de anclaje a muchas otras proteínas, formando complejos multiproteicos que modulan las vías de señalización involucradas (393), resulta interesante explorar si hay nuevas proteínas asociadas a BRaf en la vía de señalización de P2X7.

De esta manera, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la MAPKKK BRaf en condiciones basales o de estímulo con BzATP. Los inmunoprecipitados se resolvieron por SDS/PAGE, se tiñó el gel y las bandas diferenciales detectables entre tratamientos fueron sometidas a identificación mediante espectrometría de masa **(Figura 22)**.

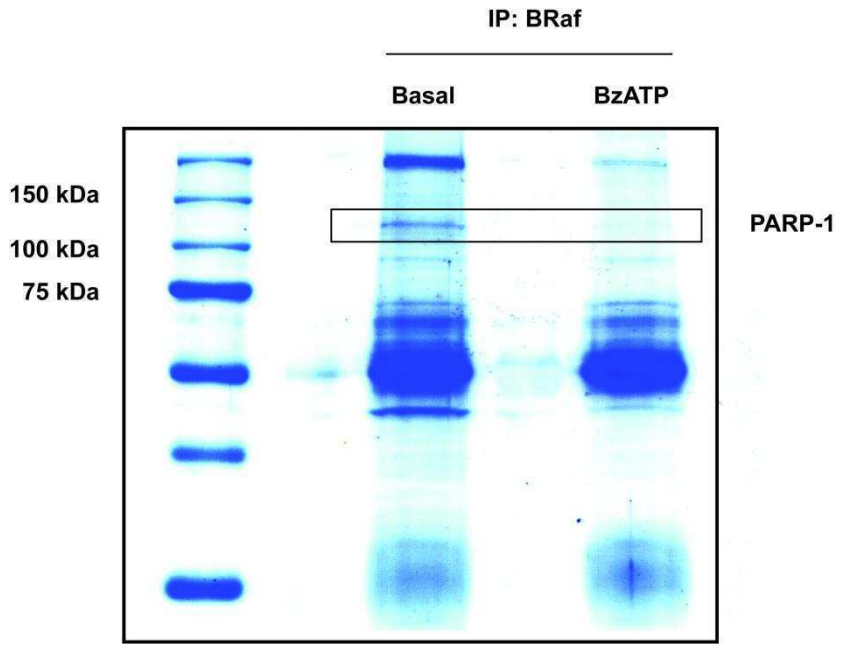


Figura 22. Identificación por proteómica de proteínas asociadas a BRaf. Las células fueron estimuladas o no con BzATP 50 μM durante 3 min. Se utilizaron 3 placas de 10cm con células 80% confluentes por condición. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpo policlonal de conejo anti BRaf en presencia de Proteína A-G plus Agarosa. Los inmunoprecipitados fueron resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, fijado y teñido con "Coomassie Blue Gel Code". Las bandas diferenciales entre condiciones fueron cortadas del gel y analizadas mediante espectrometría de masa (MS/MS). Recuadro: banda diferencial identificada como PARP1 luego del análisis de espectrometría de masa.

Mediante este enfoque se encontró asociado a BRaf, entre otras, a la proteína Poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) (113kDa), cuya interacción disminuye tras el estímulo con BzATP **(Figura 22)**. El hallazgo de PARP1 ligado a la transducción de señales de P2X7 resulta muy interesante, dado que PARP1 es un componente clave en la respuesta celular a procesos inflamatorios. Hasta el momento, la relación entre P2X7 y PARP1 no ha sido descripta, así como tampoco la asociación entre PARP1 y BRaf.

5.1.2. Validación del resultado de la proteómica mediante inmunoprecipitación

Los hallazgos de la proteómica se validaron mediante ensayos de Co-IP en células 1321N1. En ambos casos, cuando se inmunoprecipitó BRaf y cuando se inmunoprecipitó PARP1 se detectó a la otra proteína asociada **(Figura 23)**. Estos resultados confirman a PARP1 como proteína que interactúa con BRaf.

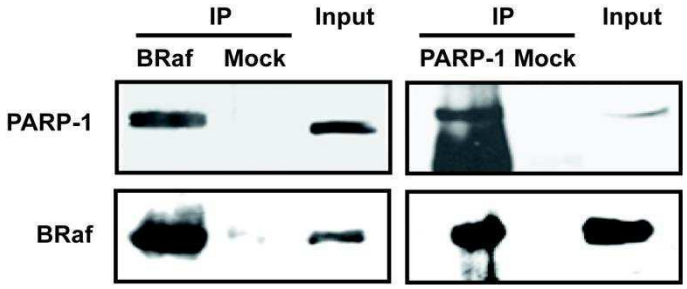


Figura 23. Validación de la interacción entre BRaf y PARP1 en células 1321N1. Se obtuvieron extractos celulares a partir de placas de 10cm 80% confluentes. Se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos policlonales de conejo anti BRaf o anti PARP1 en presencia de Proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con los mismos anticuerpos (ambos 1/1000). Input: 10% de extracto proteico crudo sin inmunoprecipitar; Mock: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de conejo, como control negativo de inmunoprecipitación. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Con el fin de evaluar si esta interacción se produce en otros tipos celulares del sistema nervioso, se realizaron los ensayos de Co-IP en una línea celular derivada de neuronas hipocampales de ratón, HT-22. Una vez más, se evidenció la interacción BRaf-PARP1 **(Figura 24).**

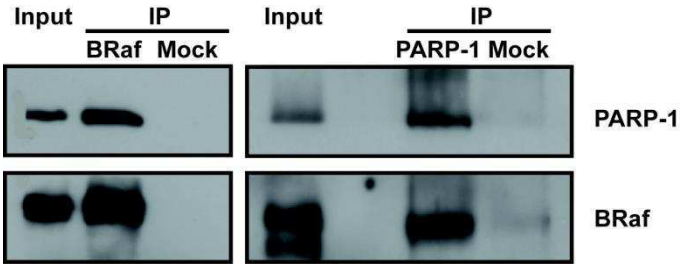


Figura 24. Validación de la interacción entre BRaf y PARP1 en células HT22. Se obtuvieron extractos celulares a partir de placas de 10cm 80% confluentes. Se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos policlonales de conejo anti BRaf o anti PARP1 en presencia de Proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con los mismos anticuerpos (ambos 1/1000). Input: 10% de extracto proteico crudo sin inmunoprecipitar; Mock: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de conejo, como control negativo de inmunoprecipitación. Se muestra un experimento representativo de dos con resultados similares.

5.1.3. Localización subcelular de PARP1 y BRaf

Dado que PARP1 está reportado como una proteína de localización nuclear y BRaf es predominantemente citoplasmática, se estudió la localización subcelular de las mismas en células del SNC, de modo de explicar la interacción detectada.

Para ello, se realizaron purificaciones de fracciones subcelulares de citoplasma y

núcleo de células 1321N1, y luego se detectaron las proteínas de interés mediante la técnica de WB. De acuerdo a lo esperado, PARP1 resultó muy abundante en núcleo, pero también se lo detectó de manera minoritaria en citoplasma. De modo análogo y en concordancia con lo reportado, BRaf se encontró mayoritariamente en citoplasma, pero también se lo detectó en núcleo **(Figura 25).** Resulta interesante destacar que el tratamiento con BzATP no modificó apreciablemente la localización subcelular de dichas proteínas, salvo tal vez en el caso de BRaf donde se aprecia un leve aumento de su presencia en el núcleo a los 10 minutos de tratamiento con BzATP.

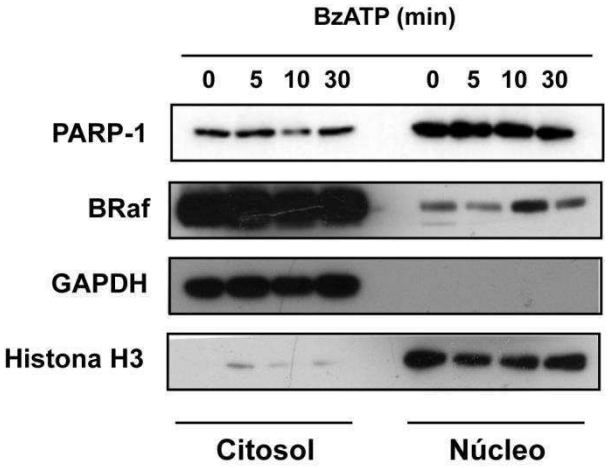


Figura 25. Localización subcelular de PARP1 y BRaf. Se obtuvieron extractos citosólicos y nucleares a partir de células 1321N1 estimuladas con BzATP 50 μM durante los tiempos indicados. La fracción citosólica se obtuvo mediante disrupción de la membrana plasmática en solución hipotónica con detergente no iónico y la fracción nuclear se extrajo a continuación con una solución de alta concentración salina. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó un WB con anticuerpos anti PARP1 y anti BRaf (ambos 1/1000). La detección de GAPDH e Histona H3 (ambos 1/10000) se usó como marcador de fracciones citosólicas y nucleares respectivamente, al mismo tiempo que como control de carga. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos con resultados similares.

A continuación se estudió la interacción BRaf-PARP1 en extractos citosólicos y nucleares. Para ello, se realizaron purificaciones de fracciones subcelulares de citoplasma y núcleo para luego realizar los ensayos de Co-IP entre BRaf y PARP1. Como se puede ver en la **Figura 26** la interacción se detectó en ambos compartimentos, a pesar de que PARP1 es minoritario en citoplasma.

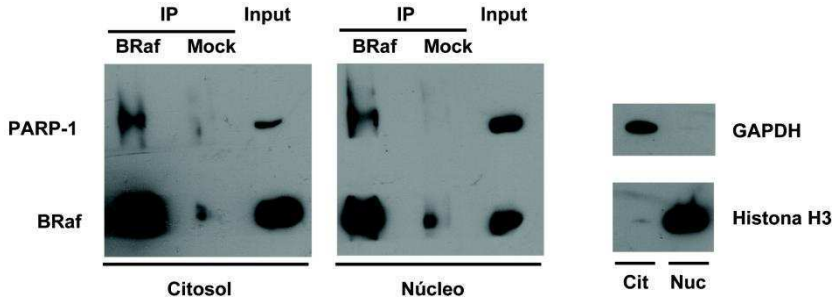


Figura 26. Localización subcelular de la interacción entre BRaf y PARP1. Se obtuvieron extractos citosólicos y nucleares a partir de células 1321N1. La fracción citosólica se obtuvo mediante disrupción de la membrana plasmática en solución hipotónica con detergente no iónico y la fracción nuclear se extrajo a continuación con una solución de alta concentración salina. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpo policlonal de conejo anti BRaf en presencia de Proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con anticuerpos anti PARP1 y anti BRaf (ambos 1/1000). Input: 10% de extracto proteico crudo sin inmunoprecipitar; Mock: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de conejo, como control negativo de inmunoprecipitación. La detección de GAPDH e Histona H3 (ambos 1/10000) se usó como marcador de fracciones citosólicas y nucleares respectivamente. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos con resultados similares.

6. P2X7 activa a PARP1

Habiendo demostrado que PARP1 está involucrado en la vía de señalización de P2X7, se profundizó acerca de la manera en que participa en la misma. Teniendo en cuenta que PARP1 es una enzima que media la parilación de proteínas, se estudió si P2X7 modula esta modificación postraduccional.

6.1. La activación de P2X7 aumenta la parilación

Cuando se trató a los clones 1321N1 sobreexpresores de P2X7-WT con BzATP, se detectó un aumento generalizado de los niveles de parilación celular **(Figura 27A-B)**. Este fenómeno se detectó tanto en citoplasma como en núcleo **(Figura 27C)**. Los bajos niveles de PARP1 citoplasmático son suficientes para producir un aumento considerable en los niveles de parilación.

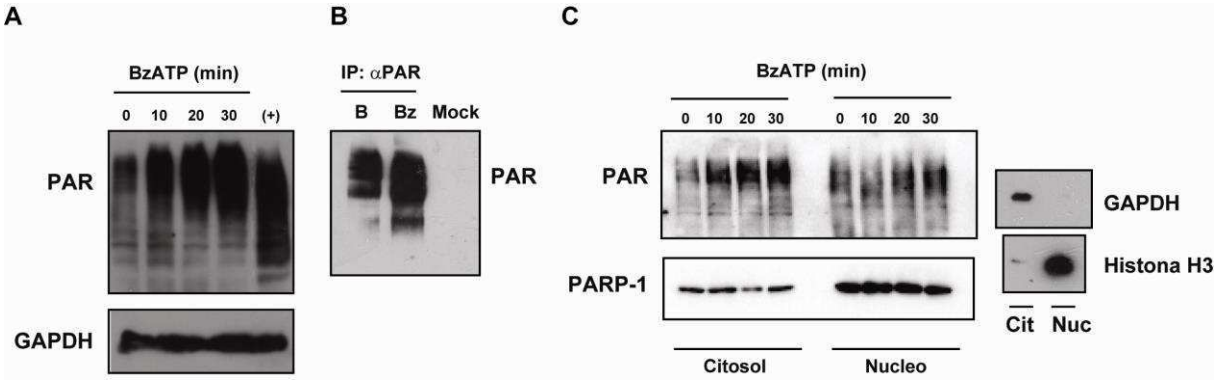


Figura 27. Detección de parilación dependiente de P2X7 en células 1321N1 P2X7-WT. Las células se estimularon con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron WB con un anticuerpo que detecta residuos de poli-ADP-ribosa (PAR). **(A)** Detección de parilación en extractos crudos. Se utilizó anticuerpo anti GAPDH (1/10000) como control de carga. **(+)**: Tratamiento con H_2O_2 10 mM durante 10 min como control positivo de aumento de parilación. **(B)** Inmunoprecipitación de proteínas pariladas en condiciones basales y estimuladas con BzATP 50 μM durante 30 min. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpo monoclonal de conejo que detecta residuos de PAR en presencia de Proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con el mismo anticuerpo anti PAR (1/10000). Mock: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de conejo, como control negativo de inmunoprecipitación. **(C)** Detección de parilación en extractos citosólicos y nucleares. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante los tiempos indicados. La fracción citosólica se obtuvo mediante disrupción de la membrana plasmática en solución hipotónica con detergente no iónico y la fracción nuclear se extrajo a continuación con una solución de alta concentración salina. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó un WB con anticuerpos anti PAR (1/10000) y anti PARP1 (1/1000). La detección de GAPDH e Histona H3 (ambos 1/10000) se usó como marcador de fracciones citosólicas y nucleares respectivamente. Para cada panel se muestran imágenes representativas de tres experimentos con resultados similares.

6.2. El aumento en la parilación es mediado por PARP1

A continuación se estudió si PARP1 era efectivamente la proteína involucrada en mediar el aumento de la parilación desencadenado por la activación de P2X7. Para esto, se realizaron experimentos de silenciamiento de PARP1, empleando un RNAi diseñado para tal fin. Cuando se silenció la expresión de PARP1, se obtuvo una disminución considerable en el aumento en los niveles de parilación general producto de la activación de P2X7 **(Figura 28A)**. Se pudo comprobar además que PARP1 es blanco de su propia actividad enzimática (es decir, se autoparila). Luego del estímulo con BzATP, aumentaron los niveles de PARP1 autoparilado **(Figura 28B)**, demostrando que la activación de P2X7 produce su activación.

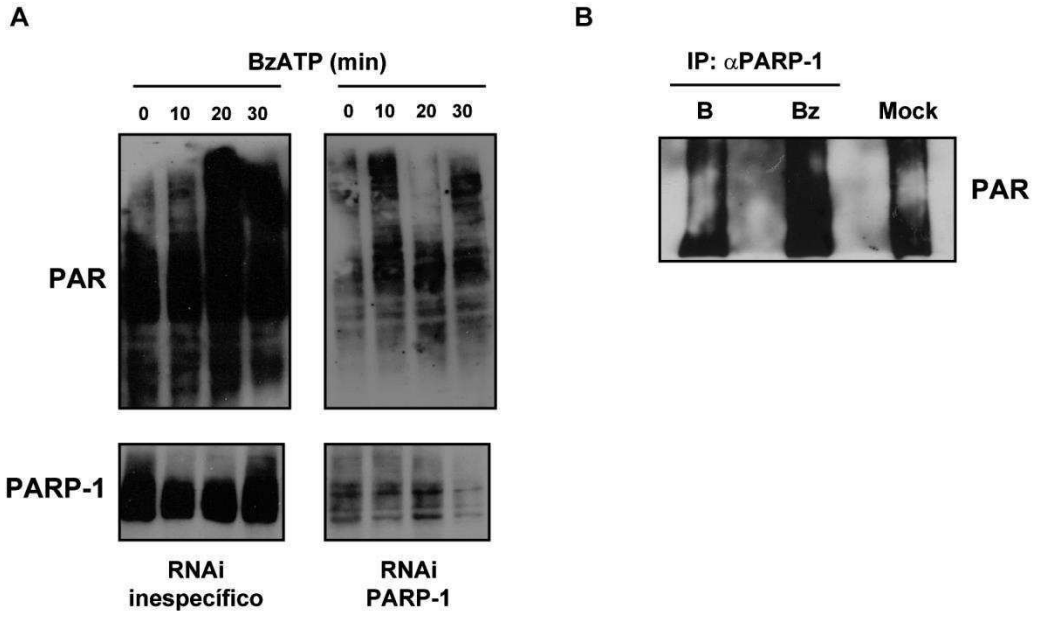


Figura 28. Detección de parilación dependiente de P2X7 en células 1321N1 P2X7-WT mediado por PARP1. Las células se estimularon con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron WB con un anticuerpo que detecta residuos de poli-ADP-ribosa (PAR). **(A)** Detección de parilación luego del silenciamiento específico de PARP1. Las células fueron transfectadas a una confluencia del 60% con el RNAi indicado en una concentración 20 nM durante 5h con Lipofectamina 2000. Luego de 72h, las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron Western Blot con anticuerpos anti PAR (1/10000). La detección de PARP1 (1/1000) sirvió como control de silenciamiento. **(B)** Inmunoprecipitación de PARP1 en condiciones basales y estimuladas con BzATP 50 μM durante 30 min. Con los extractos proteicos obtenidos se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal de conejo anti PARP1 en presencia de Proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con el mismo anticuerpo anti PAR (1/10000). Mock: Inmunoprecipitación realizada con IgGs normales de conejo, como control negativo de inmunoprecipitación. Para cada panel se muestran imágenes representativas de tres experimentos con resultados similares.

6.3. La coexpresión de las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg disminuye la parilación

Se estudió el efecto que tiene sobre el aumento de la parilación mostrado anteriormente **(Figura 27)** la activación de las distintas variantes de P2X7 en células 1321N1. Se emplearon clones 1321N1 sobreexpresores de P2X7-WT o sobreexpresores de ambas variantes P2X7-WT/Gln460Arg. Se encontró que estos últimos muestran un aumento marcadamente menor en los niveles de parilación luego del tratamiento con BzATP **(Figura 29)**.

En conjunto, estos resultados identifican a PARP1 participando en la vía de transducción de señales de P2X7, y sugieren por primera vez a P2X7 como activador de PARP1.

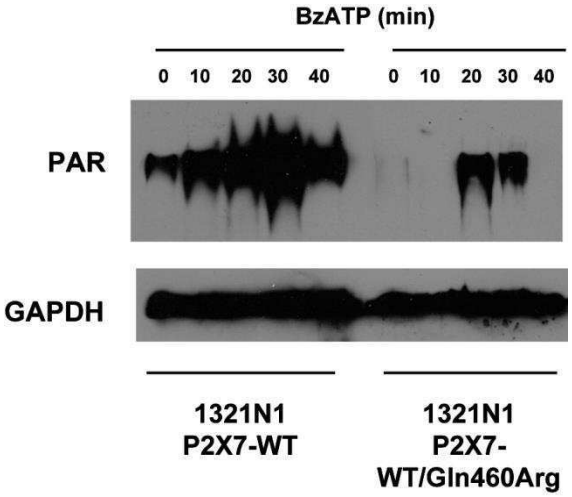


Figura 29. Parilación dependiente de P2X7 en clones 1321N1 sobreexpresores de las variantes de P2X7. Se utilizaron clones 1321N1 P2X7-WT y 1321 P2X7-WT/Gln460Arg. Las células se estimularon con BzATP 50 μM. Con los extractos proteicos obtenidos se realizaron WB con un anticuerpo que detecta residuos de poli-ADP-ribosa (PAR). Se utilizó anticuerpo anti GAPDH (1/10000) como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento de un total de tres con resultados similares.

7. Efectos transcripcionales producidos por las variantes Wild-Type y polimórfica Gln460Arg del receptor purinérgico P2X7

A continuación se estudiaron las consecuencias de la activación de las distintas variantes de los receptores P2X7 a nivel de la expresión génica, con el objetivo de caracterizar cambios en la expresión de genes individuales o grupos de genes relacionados con inflamación y depresión, de modo de hallar genes que relacionen la pérdida de función del canal y los trastornos psiquiátricos.

Si bien está documentado que la activación de los receptores P2X7 produce la transcripción de distintos genes en distintos modelos celulares (236, 246, 394), hasta el momento no se ha realizado un análisis de este fenómeno a gran escala y mucho menos se han estudiado las posibles diferencias en la transcripción de genes mediada por las distintas variantes de P2X7. Es por ello que se buscó caracterizar a gran escala la posible modificación del patrón de transcripción por activación de las distintas variantes de P2X7. Para esto, se utilizó la técnica de microarray.

7.1. Diseño y recolección de muestras para el microarray

Como material biológico se utilizaron los clones sobreexpresores de las distintas variantes de P2X7 derivadas de la línea celular HEK293: clones sobreexpresores P2X7-WT, y coexpresores de ambas variantes: P2X7-WT/P2X7-Gln460Arg. Como control negativo de activación de P2X7 se utilizó la línea HEK293 parental, que no expresa dicho receptor, sirviendo de referencia en cuanto a la expresión génica independiente de P2X7. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante 3 horas antes de proceder con la extracción de RNA. Se recolectó RNA de 5 clones de cada variante, así como también de 5 réplicas de la línea parental. Así cada clon o réplica parental cumple la función de réplica biológica para cada fenotipo de expresión de P2X7. Con el objetivo de validar la funcionalidad de los clones empleados, se midió la entrada de calcio tras la activación de P2X7, pudiéndose confirmar en todos los casos que los clones que solo expresan una única variante de P2X7 presentan una elevada entrada de calcio frente a los clones coexpresores de ambas variantes que muestran una entrada disminuida, tal como se mencionó previamente (**Introducción 5.3**).

El RNA extraído fue estudiado en la plataforma de microarray del Instituto Max Planck de Psiquiatría de Múnich, Alemania, en el marco de la colaboración con el grupo del Dr. Jan Deussing. En dicha plataforma, se realizó la hibridación de las muestras en un array de expresión con sondas para todos los genes humanos. El análisis de los resultados fue realizado por el tesista en colaboración con el Dr. Jan Deussing y el asesoramiento bioinformático del Dr. Patricio Yankilevich del IBioBA-CONICET-MPSP.

7.2. Análisis de datos crudos

Primeramente, se realizó un agrupamiento de datos. Se tomó el patrón de expresión global de cada muestra y luego se agruparon todas las muestras mediante un árbol de distancias (dendograma) **(Figura 30).**

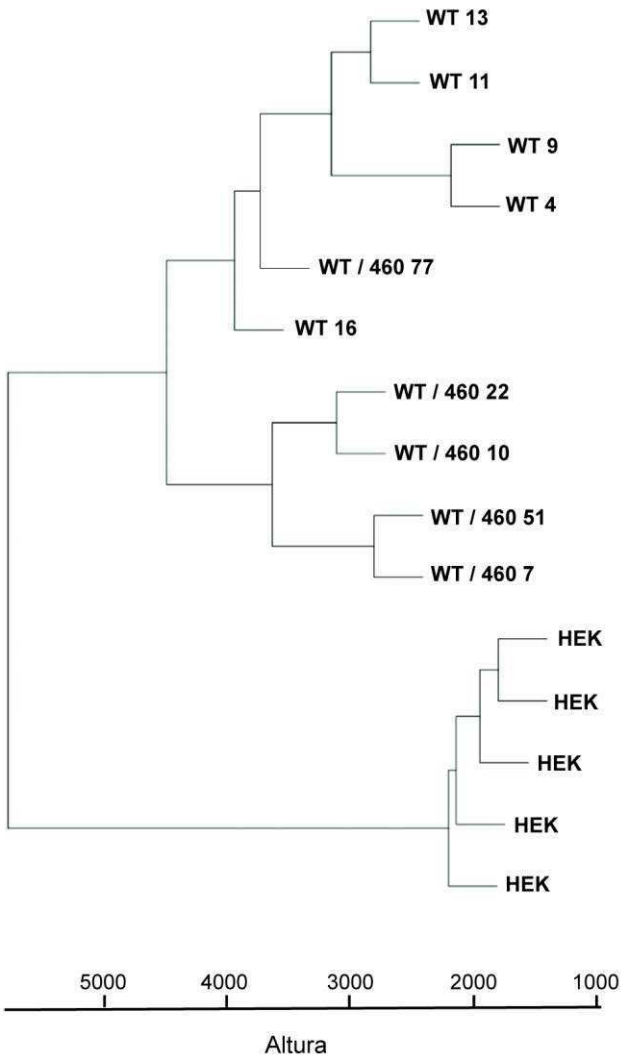


Figura 30. Dendograma (árbol de distancias) en base a la similitud en los perfiles globales de expresión. El árbol de distancias provee una manera sencilla de evaluar rápidamente las similitudes entre los perfiles de expresión génica de cada muestra. Se realizó un agrupamiento jerárquico de las muestras analizadas en el microarray de acuerdo a las distancias entre sus perfiles de expresión génica. Se excluyeron del análisis dos muestras que eran muy dispares con respecto al resto de las de su tipo. Se detalla el número de clon de cada muestra. **HEK:** cada una de las réplicas de las células HEK293 parentales.

Este agrupamiento arrojó los siguientes resultados: a excepción de un clon P2X7-WT (clon 16) y un clon coexpresor P2X7-WT/Gln460Arg (clon 77) que se ubican en posiciones intermedias, el resto de los clones se agruparon por cercanía a los de su mismo tipo, pudiéndose armar subgrupos en el árbol que coincidían perfectamente con los fenotipos estudiados. Además, se puede ver que las réplicas HEK293 parentales son muy similares entre sí y se encuentran alejadas de todos los clones, lo que resulta esperable. El análisis del dendograma sirve para validar globalmente el microarray: las réplicas parentales forman un grupo alejado de todos los clones expresores de las distintas variantes de P2X7, mientras que

los distintos clones muestran un patrón de expresión génica similar de acuerdo a la similitud en la funcionalidad previamente reportada para la actividad del canal P2X7 en sus distintas variantes.

8. Perfil transcripcional de P2X7

Antes de analizar las diferencias en la transcripción de genes mediada por las distintas variantes de P2X7 (WT y Gln460Arg), se decidió estudiar el perfil transcripcional concerniente a la activación de P2X7-WT, dado que hasta el momento no existe ningún estudio a gran escala que lo reporte.

El diseño del microarray realizado permite responder esta pregunta, dado que se puede comparar entre los datos de los clones P2X7-WT y las réplicas HEK293 parentales, las cuales carecen del receptor endógeno. Como todas estas muestras fueron estimuladas con BzATP, las diferencias en expresión génica entre ambos grupos habrán sido producidas por la activación de P2X7-WT.

8.1. Genes diferencialmente expresados por P2X7

Se fijaron ciertos parámetros para definir genes diferencialmente expresados entre grupos, en este caso genes con expresión diferencial entre el grupo de réplicas HEK293 parentales y el grupo de clones P2X7-WT. Se define un gen diferencialmente expresado entre grupos si muestra un cambio en sus niveles de expresión mayor o igual a 1,5 veces con respecto al otro grupo (del inglés, *Fold Change* $\geq |1,5|$) con un valor estadístico $P \leq 0,05$. Con este criterio, el contraste entre el grupo HEK293 parental y el grupo de clones P2X7-WT resultó tener 1995 genes diferencialmente expresados. La lista completa de estos genes con sus valores se puede ver en el **Anexo 2 Tabla 1**.

Para comenzar a describir esta gran cantidad de datos, primero se realizó un "mapa de calor" (del inglés, *Heat Map*) **(Figura 31).** Este diagrama es una representación gráfica de los datos donde cada valor individual de la matriz de datos original es representado en una escala de colores.

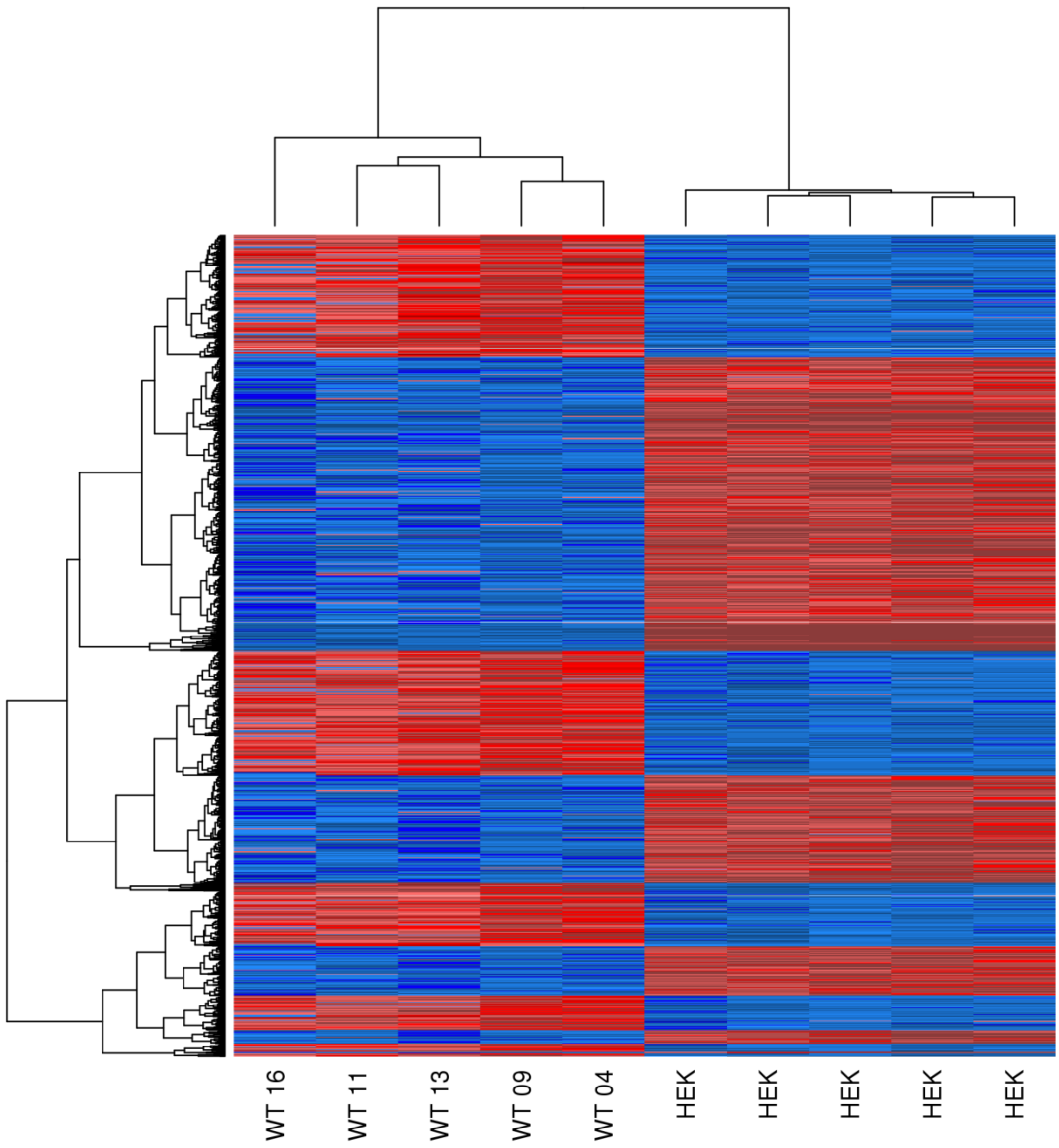


Figura 31. Diagrama de genes diferencialmente expresados entre la línea celular HEK293 parental y los clones HEK293 P2X7-WT. Se consideraron los datos de expresión de las réplicas HEK293 parentales y de los clones P2X7-WT. Se obtuvieron los genes diferencialmente expresados entre estos grupos de acuerdo al criterio de Fold Change ≥ |1,5| con un valor estadístico P ≤ 0,05. Los 1995 genes así obtenidos se los agrupó de acuerdo a similitud en sus perfiles de expresión en relación a cada muestra analizada. Columnas: muestras. Filas: genes. **HEK**: cada una de las réplicas de las células HEK293 parentales. **WT**: Clones HEK293 P2X7-WT. Se detalla el número de clon de cada muestra. Escala de colores: azul representa baja expresión y rojo representa alta expresión.

En la **Figura 31** se pueden observar las marcadas diferencias de expresión entre ambos grupos para los 1995 genes diferencialmente expresados. La confección del Heat Map se basa en el agrupamiento de los datos en función de dos criterios en simultáneo: se agrupan las muestras del microarray por similitud en sus perfiles de expresión (columnas en el

diagrama) y también se agrupan los genes de acuerdo a similitud de expresión (filas en el diagrama). En cuanto a las muestras, se puede ver que los clones P2X7-WT tienen una expresión similar para los genes representados, y lo mismo ocurre para las réplicas HEK293 parentales. A su vez, las diferencias entre ambos grupos son notables, y es así como se detectan 2 bloques marcadamente diferenciados en el sentido vertical del diagrama. De esta manera, se concluye que ambos grupos tienen un perfil de expresión génica marcadamente diferencial, producido por la presencia o ausencia de P2X7-WT. En cuanto a los genes, un análisis más detallado del diagrama permite ver que en este contraste se forman bloques de genes con expresión similar en el sentido horizontal del diagrama. Esto da cuenta de que la presencia de P2X7-WT origina cambios en la expresión génica con efectos puntuales: para cada grupo de genes el efecto es distinto (por ejemplo, en algunos casos produce un aumento (en rojo) y en otros una disminución de la expresión (en azul), y entre distintos grupos esta magnitud es distinta).

A continuación, se procedió a realizar un análisis más detallado sobre esta lista de 1995 genes diferencialmente expresados entre los clones P2X7-WT y la línea HEK293 parental. Para ello, primero se analizaron los genes con mayor magnitud de expresión diferencial. En la **Tabla 5** se describen los 30 genes regulados positivamente y los 30 genes regulados negativamente en mayor magnitud.

A) Contraste clones P2X7-WT versus HEK293 parentales: genes regulados positivamente

Orden	Fold Change	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)	Función molecular (Gene Ontology)
1	34,56	5.93 x 10 -21	TNC	tenascin C	syndecan binding
2	12,39	5.02 x 10 -19	ZNF711	zinc finger protein 711	sequence-specific DNA binding
3	4,95	1.09 x 10 -16	MESP1	mesoderm posterior 1 homolog	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity
4	9,99	2.49 x 10 -16	DPYSL4	Dihydropyrimidinase-like 4	Hydrolase activity
5	18,09	2.77 x 10 -16	SH3BGR	SH3 domain binding Glutamic acid-rich protein	SH3/SH2 adaptor activity
6	5,83	1.54 x 10 -15	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with Thrombospondin type 1 motif, 1	metallopeptidase activity
7	12,73	2.1 x 10 -15	ADAMTS5	ADAM metallopeptidase with Thrombospondin type 1 motif, 5	metallopeptidase activity
8	4,44	2.8 x 10 -15	TMEM47	transmembrane protein 47	ND
9	3,57	3.39 x 10 -15	FBXL16	F-box and leucine-rich Repeat protein 16	ND
10	23,95	4.7 x 10 -15	SOX11	SRY (sex determining region Y) -box 11	RNA polymerase II core promoter Sequence-specific DNA binding
11	14,04	1.93 x 10 -14	AMOT	angiomotin (AMOT)	angiostatin binding
12	5,29	2.02 x 10 -14	KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	voltage-gated potassium Channel activity
13	10,05	4.49 x 10 -14	SOX17	SRY (sex determining region Y) -box 17	RNA polymerase II core promoter Sequence-specific DNA binding
14	4,10	3.42 x 10 -13	SLC30A3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	zinc transporting ATPase activity
15	3,48	6.29 x 10 -13	RIPK4	receptor-interacting Serine-threonine kinase 4	protein serine/threonine kinase activity
16	2,73	9.77 x 10 -13	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	calcium ion binding
17	2,68	1.13 x 10 -12	DBN1	drebrin 1 (DBN1)	actin binding
18	2,92	1.34 x 10 -12	DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase	oxidoreductase activity
19	3,91	1.62 x 10 -12	TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity
20	3,25	1.94 x 10 -12	GLA	galactosidase, alpha	alpha-galactosidase activity
21	3,15	3.97 x 10 -12	CCND1	cyclin D1	transcription factor binding
22	5,55	4.48 x 10 -12	PCDH19	Protocadherin 19	calcium ion binding
23	2,50	5.71 x 10 -12	PITX1	paired-like homeodomain Transcription factor 1	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity
24	3,61	8.34 x 10 -12	RAC3	ras-related C3 botulinum toxin Substrate 3	GTPase activity
25	2,82	9.2 x 10 -12	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1	tubulin binding
26	3,01	9.34 x 10 -12	DPP7	Dipeptidyl-peptidase 7	serine-type peptidase activity
27	2,55	1.36 x 10 -11	CASP3	caspase 3, apoptosis-related Cysteine peptidase	cysteine-type endopeptidase activity
28	4,14	1.53 x 10 -11	BMP2	bone morphogenetic protein 2	receptor binding
29	2,82	1.53 x 10 -11	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	calcium ion binding
30	15,82	2.25 x 10 -11	ZNF22	zinc finger protein 22	zinc ion binding

B) Contraste clones P2X7-WT versus HEK293 parentales: genes regulados negativamente

Orden	Fold Change	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)	Función molecular (Gene Ontology)
1	-53,96	8.52 x 10 -26	MYOM2	myomesin (M-protein) 2	structural constituent of muscle
2	-15,84	1.65 x 10 -24	OCIAD2	OCIA domain containing 2	ND
3	-25,93	6.3 x 10 -24	PTGR1	prostaglandin reductase 1	oxidoreductase activity
4	-23,15	6.3 x 10 -24	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	protein kinase C binding
5	-17,88	1.38 x 10 -23	FAM162B	family with sequence similarity 162, Member B	ND
6	-16,85	2.45 x 10 -23	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, Member A2	retinal binding
7	-23,53	2.45 x 10 -23	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	GTP binding
8	-15,57	3.37 x 10 -23	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1	oxidoreductase activity, Acting on NAD(P)H
9	-29,69	3.75 x 10 -23	ECHDC2	enoyl Coenzyme A hydratase Domain containing 2	catalytic activity
10	-29,51	9.05 x 10 -23	COCH	coagulation factor C homolog	protein binding
11	-29,97	2.95 x 10 -22	NEFL	neurofilament, light polypeptide	structural constituent of cytoskeleton
12	-10,47	5.71 x 10 -22	TRO	trophinin	protein binding
13	-8,24	8.52 x 10 -22	ANKRD19	ankyrin repeat domain 19	ND
14	-19,48	1.56 x 10 -21	SLC25A43	solute carrier family 25, member 43	ND
15	-10,94	3.76 x 10 -21	MAOA	monoamine oxidase A	primary amine oxidase activity
16	-8,63	7.82 x 10 -21	MAGEB2	melanoma antigen family B	ND
17	-9,76	2.58 x 10 -20	EPDR1	ependymin related protein 1	calcium ion binding
18	-9,35	3.24 x 10 -20	HDHD1A	haloacid dehalogenase-like hydrolase Domain containing 1A	phosphatase activity
19	-11,70	4.62 x 10 -20	DDX12	PREDICTED: DEAD/H box Polypeptide 12	ATP-dependent DNA helicase activity
20	-6,60	9.47 x 10 -20	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	ubiquitin protein ligase binding
21	-7,62	1.39 x 10 -19	DYNLT3	dynein, light chain, Tctex-type 3	motor activity
22	-6,87	3.18 x 10 -19	MSN	moesin	structural constituent of cytoskeleton
23	-10,32	6.37 x 10 -19	CDO1	cysteine dioxygenase, type I	cysteine dioxygenase
24	-9,89	6.95 x 10 -19	GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	electron carrier activity
25	-6,13	1.06 x 10 -18	CRYGD	crystallin, gamma D	protein binding
26	-5,32	1.57 x 10 -18	SYT11	synaptotagmin XI	transporter activity
27	-5,82	2.01 x 10 -18	RAC2	ras-related C3 botulinum Toxin substrate 2	GTPase activity
28	-6,30	2.01 x 10 -18	PHF11	PHD finger protein 11	zinc ion binding
29	-6,14	8.87 x 10 -18	TACSTD1	tumor-associated calcium Signal transducer 1	ND
30	-5,98	1.04 x 10 -17	ACOT1	acyl-CoA thioesterase 1	thiolester hydrolase activity

Tabla 5. Genes con máxima regulación diferencial entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. Se muestran los genes diferencialmente expresados en el contraste de clones P2X7-WT versus HEK293 parentales. A) Genes regulados positivamente en los clones P2X7-WT y B) Genes regulados negativamente en los clones P2X7-WT. Para cada caso, se muestran los 30 genes con mayor valor estadístico. Los genes están ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**). **Fold Change**: Veces de cambio en la expresión génica con respecto a HEK293 parentales. Función molecular: Se muestra el término de la base de datos Gene Ontology más frecuente para cada gen. **ND**: Función molecular no determinada.

Este análisis permite ver que hay una gran variedad de genes diferencialmente expresados. Si se observa la función molecular de los mismos, se concluye que hay muchas funciones que se ven afectadas por la activación de P2X7-WT. Para analizar esta observación con mayor profundidad, se procedió a contrastar la lista de los 1995 genes diferencialmente

expresados con diferentes herramientas bioinformáticas, lo que permite agrupar estos genes de distintas maneras: según sus funciones biológicas, asociación con publicaciones relevantes y por vías de señalización afectadas

En primer lugar, se obtuvieron los términos de la base de datos de Gene Ontology (GO) basados en procesos biológicos que están sobrerepresentados en dicha lista de genes. Los mismos se describen en la **Tabla 6**.

A) Términos GO enriquecidos entre los genes regulados positivamente en los clones P2X7-WT

Orden	Término GO	Número De genes	Valor P
1	Axon guidance	22	0.00195
2	Anatomical structure formation	56	0.00523
3	Positive regulation of angiogenesis	10	0.00597
4	Organ morphogenesis	144	0.00652
5	Regulation of cell adhesion	36	0.00751
6	Epithelial to mesenchymal transition	10	0.00789
7	Oxidoreductase activity	9	0.00825
8	Dendrite	16	0.00864
9	Cell migration	94	0.00870
10	Regulation of cell migration	28	0.00877
11	Vasculature development	55	0.00898
12	Negative regulation of cellular biosynthetic process	29	0.00906
13	Angiogenesis	48	0.00917
14	Positive regulation of protein amino acid phosphorylation	20	0.00936
15	Negative regulation of transcription factor activity	15	0.00969
16	Glycosphingolipid metabolic process	12	0.00969
17	Gland development	13	0.00969
18	Endothelial cell migration	11	0.00977
19	Sphingolipid metabolic process	27	0.00978
20	Regulation of protein amino acid phosphorylation	30	0.00979

B) Términos GO enriquecidos entre los genes regulados negativamente en los clones P2X7-WT

Orden	Término GO	Número De genes	Valor P
1	Intermediate filament cytoskeleton	24	0.00053
2	Structural constituent of cytoskeleton	57	0.00093
3	Amino acid metabolic process	77	0.00118
4	Intermediate filament	24	0.00323
5	Integrator complex	13	0.00363
6	Oxidoreductase activity acting on the aldehyde Or oxo group of donors	22	0.00531
7	Amino acid and derivative metabolic process	100	0.00578
8	Axon	12	0.00882
9	Metalloexopeptidase activity	12	0.00885
10	Organic acid metabolic process	177	0.00894
11	Carboxylic acid metabolic process	175	0.00922
12	Neuron projection	21	0.00923
13	Protein tetramerization	14	0.00928
14	Amine metabolic process	140	0.00938
15	Nitrogen compound metabolic process	153	0.00948
16	Amino acid transmembrane transporter activity	29	0.00969
17	Amino acid derivative biosynthetic process	10	0.00975
18	Inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity	12	0.00977
19	Transferase activity transferring alkyl or aryl Other than methylgroups	30	0.00985
20	Thiolester hydrolase activity	16	0.00987

Tabla 6. Términos GO enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. Se muestran los términos GO más representados entre los genes del contraste de clones P2X7-WT versus HEK293 parentales. **(A)** Términos GO de genes regulados positivamente en los clones P2X7-WT y **(B)** Términos GO de los genes regulados negativamente en los clones P2X7-WT. Para cada caso, se muestran los 20 términos GO con mayor valor estadístico, ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**).

Este agrupamiento de los datos permite ver cuáles son las funciones biológicas que se encuentran alteradas. Los términos GO más enriquecidos incluyen entre otros a términos relacionados con la función neuronal y neurogénesis como el guiado de axones en su polarización, la formación de estructuras anatómicas, migración celular, dendritas, estructura del citoesqueleto y axones, metabolismo de aminoácidos y neurotransmisores.

A continuación se buscaron vías de señalización alteradas entre el grupo de clones P2X7-WT y la línea parental HEK293. Para esto se empleó la herramienta bioinformática

online GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). GSEA es un método computacional que determina si un grupo definido de genes muestra diferencias estadísticamente significativas entre 2 fenotipos. A su vez, se alimenta de una extensa base de datos, donde los genes se agrupan en distintas categorías y forman grupos de genes, donde cada grupo representa una vía de señalización. En la **Tabla 7** se muestran las vías de señalización alteradas.

A) Vías de señalización enriquecidas entre los genes regulados positivamente en los clones P2X7-WT

Orden	Vía de señalización	Número De genes	Valor P
1	Vía del receptor de ácido retinoico	26	0.00063
2	Vía de degradación de β-catenina	18	0.00114
3	Vía del receptor de andrógenos	52	0.00185
4	Vía de supervivencia de células granulares	26	0.00217
5	Vía de BMP	40	0.00275
6	Vía de ATF2	59	0.004
7	Vía de Presenilina1	45	0.00546
8	Vía de Wnt	89	0.00572
9	Vía canónica de NFκB	23	0.00621
10	Vía de transcripción de receptores nucleares	48	0.00644
11	Vía de quinasa de adhesión focal	58	0.00651
12	Glucólisis	28	0.00714
13	Vía de señalización de TGFβ	86	0.008
14	Vía de señalización de prolactina	23	0.00879
15	Inactivación de ERKs	12	0.00885
16	Vía de EGFR	11	0.00921
17	Vía de Cdk5	11	0.00937
18	Digestión de carbohidratos dietarios	11	0.00947
19	Señalización por Notch3	12	0.00972
20	Vía de ErbB2 y ErbB3	43	0.00983

B) Vías de señalización enriquecidas entre los genes Regulados negativamente en los clones P2X7-WT

Orden	Vía de señalización	Número De genes	Valor P
1	Degradación de Valina, Leucina e Isoleucina	44	0.00014
2	Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	17	0.00042
3	Metabolismo de butanoato	34	0.00421
4	-oxidación mitocondrial de ácidos grasos	13	0.00778
5	Vía de reciclado de L1CAM	27	0.00848
6	Ciclo de liberación de neurotranmisores	34	0.0088
7	Metabolismo de Glicina, Serina y Treonina	31	0.00907
8	Metabolismo de Triptofano	40	0.0092
9	Biosíntesis de aminoacil tRNA	41	0.00929
10	Metabolismo de Arginina y Prolina	54	0.00941
11	Degradación de glicanos	15	0.00942
12	Vía de Integrina 4	11	0.00965
13	Biosíntesis de folato	11	0.00981
14	Síntesis procesiva de la cadena retrasada de ADN	15	0.00991
15	Metabolismo de Cisteína y Metionina	34	0.00995
16	Formación del complejo de incisión en el proceso de NER	23	0.00995
17	Metabolismo de aminoácidos y derivados	198	0.00997
18	Vía de leptinas	11	0.01
19	Excisión y reparado de nucleótidos a nivel genómico global	35	0.01
20	Procesamiento de ARNm	149	0.01

Tabla 7. Vías de señalización enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. Se muestran las vías de señalización más representados entre los genes regulados positivamente **(A)** y entre los genes regulados negativamente **(B)** del contraste de clones P2X7-WT versus HEK293 parentales. Para cada caso, se muestran las 20 vías de señalización con mayor valor estadístico, ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**).

Este agrupamiento de los datos permite ver cuáles son las vías de señalización que se encuentran alteradas. Entre las vías más enriquecidas en este análisis se encuentran vías relacionadas con mecanismos inflamatorios, desarrollo neuronal y metabolismo de neurotransmisores.

De esta manera, se caracterizó el perfil transcripcional de P2X7-WT. Se concluye que la activación de los receptores P2X7 tiene profundas consecuencias en la regulación de la expresión génica, dando lugar al aumento y disminución en los niveles de expresión de una gran cantidad de genes. En consecuencia, se observa la alteración de una variada cantidad de funciones moleculares y vías de señalización.

A continuación se buscó qué genes tienen una expresión alterada debido a la pérdida de función de las variantes de P2X7 en heterocigosis.

9. Estudio del impacto de los receptores P2X7 heteroméricos a nivel transcripcional

Habiendo caracterizado el impacto transcripcional de P2X7-WT en células HEK293, se procedió a realizar la comparación entre los perfiles de expresión génica de los clones HEK293 P2X7-WT y los clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg.

9.1. Análisis bioinformático global

En primer lugar, se realizó un análisis bioinformático descriptivo de las diferencias de expresión génica a nivel global entre los clones HEK293 P2X7-WT y los clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg. Para ello, se agruparon los datos de expresión para cada muestra en su grupo correspondiente: P2X7-WT (grupo WT) y P2X7-WT/Gln460Arg (grupo combinado). Con este agrupamiento se obtiene una matriz de niveles de expresión de cada grupo para cada sonda empleada en el microarray. Como ya se podía ver en la **Figura 30**, existen diferencias globales en los niveles de expresión génica que producen que ambos grupos resulten claramente diferenciados.

Con el fin de caracterizar estas diferencias de expresión, y agrupar los datos de manera biológicamente relevante, se procedió a realizar el análisis de patrones de expresión con la herramienta bioinformática GSEA, de manera análoga a lo realizado en el estudio del perfil transcripcional de P2X7 (**Resultados 6.1**).

En la **Tabla 8** se muestra un resumen de los datos obtenidos mediante el análisis de GSEA. Como se puede observar, se encontró un gran número de grupos de genes diferencialmente expresados. Dada la gran cantidad de información que este enfoque generó, se procedió a inspeccionar visualmente los resultados obtenidos y se generó una selección *ad-hoc* a partir de los datos completos. El criterio empleado fue detectar grupos de genes que por sus características pudieran estar potencialmente involucrados en mecanismos celulares de inflamación o asociados con enfermedades psiquiátricas, de manera de comprobar si los perfiles diferenciales de expresión detectados en el microarray son coincidentes con grupos de genes previamente asociados con dichos trastornos. En la **Tabla 9** se detallan los grupos de genes encontrados mediante este enfoque.

Base de datos empleada	Cantidad de grupos de genes enriquecidos con P ≤ 0,01
GSEA: Publicaciones	600
GSEA: Vías de señalización	129
GSEA: Motivos	402

Tabla 8. Resumen del análisis de GSEA para el contraste de clones P2X7-WT versus P2X7-WT/Gln460Arg. Los datos de expresión de todos los genes para los clones P2X7-WT y los clones P2X7-WT/Gln460Arg se ingresaron en la base de datos GSEA. GSEA agrupa los datos en grupos de genes. Los grupos de genes se definen de distinta manera de acuerdo a la subdivisión en cuestión, a saber: **Publicaciones** (un grupo de genes está definido por una publicación que reportó esos genes agrupados en algún estudio de expresión); **Vías de señalización** (los grupos de genes agrupan genes que forman parte de una misma vía de señalización); **Motivos** (los grupos de genes agrupan genes con secuencias consenso de pegado de algún factor). Se muestra la cantidad de grupos de genes en cada sección el GSEA que resultó enriquecido con un valor P ≤ 0,01.

A) GSEA: Grupos de genes reportados en publicaciones

Orden	Publicación	Número de genes	Valor P
78	Seki: Respuesta inflamatoria a LPS	74	0.00069
102	Zhang: Respuesta a inhibidor de IKK y TNF	210	0.00146
113	Phong: Blancos de TNF	61	0.00224
146	Phong: Respuesta a TNF vía p38	158	0.00434
149	Chemnitz: Respuesta a prostaglandina E2	134	0.00442
152	Croonquist: Falta de IL-6	95	0.00448
159	Okumura: Respuesta inflamatoria a LPS	178	0.00526
245	Chuang: Respuesta a estrés oxidativo	27	0.00928
283	Kyng: Respuesta a estrés ambiental	56	0.00982
298	Hinata: Blancos de NFκB en fibroblastos	83	0.00985
313	Rhein: Terapia con glucocorticoides	73	0.00993
321	Halmos: Blancos de CEBPα	51	0.00996
337	Phong: Respuesta completa a TNF vía p38	67	0.00997
365	Nemeth: Respuesta inflamatoria a LPS	87	0.01
398	Tian: Señalización de TNF vía NFκB	28	0.01
433	Aston: Trastorno depresivo mayor	153	0.01
440	Nemeth: Respuesta inflamatoria a LPS	31	0.01
480	Zhou: Señalización por TNF	53	0.01
501	Schoen: Señalización por NFκB	33	0.01
517	Gery: Blancos de CEBP	125	0.01
524	Jain: Señalización por NFκB	73	0.01

B) Vías de señalización

Orden	Vía de señalización	Número de genes	Valor P
1	Vía río abajo de ERBB1	103	0.00002
3	Vía de señalización de p53	67	0.00009
12	Vía de AP1	69	0.00107
37	Vía de NFAT3	54	0.00625
54	Vía de ATF2	59	0.00864
60	Señalización por ERKs	35	0.00918
65	Vía de MAPK	86	0.00962
106	Activación de NFκB y MAPK mediada por señalización de TLR4	67	0.00998
111	Activación del reactoma de la familia de factores de transcripción de AP1	10	0.00999

C) Grupos de genes con sitios de respuesta a factores de transcripción

Orden	Factor de transcripción	Número de genes	Valor P
30	AP1	260	0.00004
71	CREB	202	0.00006
205	NFκB	243	0.00293

Tabla 9. Selección de grupos de genes obtenidos por GSEA enriquecidos en el contraste de clones P2X7-WT versus clones P2X7-WT/Gln460Arg. Se muestran los grupos de genes obtenidos por GSEA relacionados con inflamación y enfermedades psiquiátricas. **(A)** Los grupos de genes de GSEA representan publicaciones depositadas en la base de datos. Se detalla el primer autor de la publicación. **(B)** Los grupos de genes de GSEA representan genes que conforman una vía de señalización. **(C)** Los grupos de genes de GSEA representan genes que comparten secuencias de pegado en su promotor para factores de transcripción específicos. Los grupos de genes se muestran ordenados de acuerdo al valor estadístico (**Valor P**). **Orden**: Número de orden en la lista original, previo al filtrado visual por relación con inflamación y depresión.

En esta tabla se puede ver que los perfiles diferenciales de expresión entre el grupo de clones P2X7-WT y el grupo de clones P2X7-WT/Gln460Arg se asocian a situaciones de inflamación o de asociación con trastornos psiquiátricos. Por ejemplo, hay coincidencias con publicaciones donde se reportan cambios en la expresión génica debido a respuestas inflamatorias generales (LPS, prostaglandinas), mediadas por citoquinas inflamatorias (TNF, Interferones, Interleuquinas), o bien mediadas por factores de transcripción proinflamatorios (NFκB, CREB, AP1 y ATF2). También hay coincidencias con publicaciones que estudiaron específicamente cambios en la expresión génica por trastornos depresivos. En cuanto a las vías de señalización alteradas, se detectaron vías de señalización inflamatorias: NFAT, AP1 y NFκB. También se detectaron vías de MAPK y de la familia de ERK, y la vía de apoptosis de p53. Por último, se encontraron también grupos de genes con sitios consenso en sus promotores para los factores de transcripción inflamatorios AP1, CREB y NFκB.

De esta manera, se obtiene un panorama global de los efectos transcripcionales

mediados por las distintas variantes de P2X7: se pudo detectar un enriquecimiento notable en mecanismos relacionados con vías de señalización y factores de transcripción inflamatorios, así como también coincidencias con estudios previos de asociación con depresión.

9.2. Obtención de genes candidatos

A continuación se procedió a refinar los datos obtenidos en el microarray para el contraste entre el grupo de clones P2X7-WT y el grupo de clones P2X7-WT/Gln460Arg para lo cual se volvió a aplicar el estricto criterio de corte empleado anteriormente: por alto valor estadístico y un importante cambio en los niveles de expresión. De esta manera, solo se consideran genes diferencialmente expresados a aquellos que tuvieron un cambio de 1,5 veces en su expresión y un valor estadístico $P<0,05$. Así, se encontró que hay 53 genes diferencialmente expresados entre los clones P2X7-WT y los clones P2X7-WT/Gln460Arg **(Figura 32 y Tabla 10).**

En la **Tabla 10** se puede ver la identidad de los genes diferencialmente expresados en este contraste así como también sus datos de expresión. En el **Anexo 2 Tabla 2** se detalla para cada gen su función molecular y el proceso biológico en que se encuentra involucrado, de acuerdo a los términos de la base de datos de Gene Ontology.

Se obtienen así los genes con mayor diferencia de expresión entre los grupos P2X7-WT y P2X7-WT/Gln460Arg. Entre estos, hay 2 genes muy interesantes en el contexto de inflamación y relacionados con P2X7: *CHUK* y *RCAN1*. De acuerdo a lo expuesto en la Introducción de esta tesis, ambos son candidatos interesantes para ser estudiados en profundidad.

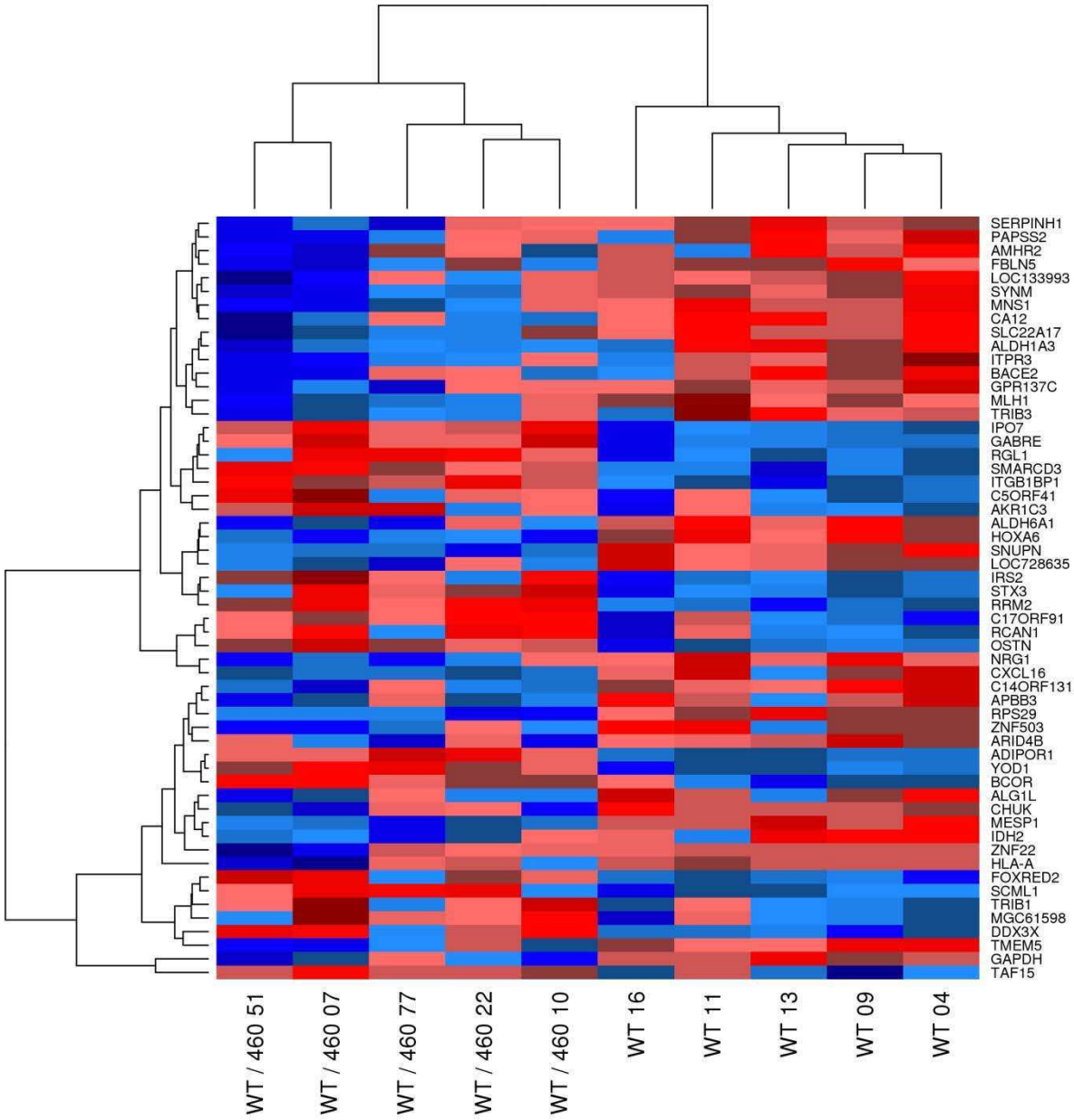


Figura 32. Diagrama de genes diferencialmente expresados entre los clones HEK293 P2X7-WT y los clones P2X7-WT/Gln460Arg. Se obtuvieron los genes diferencialmente expresados entre estos grupos de acuerdo al criterio de Fold Change ≥ |1,5| con un valor estadístico P ≤ 0,05. Los 53 genes así obtenidos fueron agrupados de acuerdo a similitud en sus perfiles de expresión en relación a cada muestra analizada. Columnas: muestras. Filas: genes. **WT/460**: Clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg. **WT**: Clones HEK293 P2X7-WT. Se detalla el número de clon de cada muestra. Escala de colores: azul representa baja expresión y rojo representa alta expresión.

Orden	FC	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)
1	2.14	0.00004	OSTN	osteocrin
2	1.96	0.00045	RRM2	Ribo nucleotide reductase M2 polypeptide
3	1.81	0.00075	IPO7	Importin 7
4	-1.57	0.00135	MESP1	mesoderm posterior 1 homolog
5	-1.74	0.00135	HOXA6	homeobox A6
6	1.55	0.00135	ADIPOR1	adiponectin receptor 1
7	1.58	0.00146	YOD1	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog
8	1.57	0.00146	ITGB1BP1	integrin beta 1 binding protein 1
9	-1.50	0.00261	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
10	-1.63	0.00280	RPS29	ribosomal protein S29
11	1.55	0.00280	BCOR	BCL6 co-repressor
12	-1.60	0.00355	SNUPN	Snurportin 1
13	1.56	0.00383	STX3	Syntaxin 3
14	-1.87	0.00383	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1
15	1.74	0.00396	GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon
16	1.55	0.00549	RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1
17	1.50	0.00671	SCML1	sex comb on midleg-like 1
18	1.51	0.00733	DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked
19	-1.55	0.00733	ALG1L	asparagine-linked glycosylation 1-like
20	1.52	0.00825	SMARCD3	SWI/SNF related, actin dependent regulator of chromatin, d3
21	-1.59	0.00826	CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
22	1.58	0.00861	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
23	-1.53	0.00903	CA12	carbonic anhydrase XII
24	-1.64	0.01019	SYNM	synemin, intermediate filament protein
25	2.21	0.01019	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, (TBP)-associated factor
26	-1.66	0.01019	LOC728635	PREDICTED: similar to peroxisomal alcohol dehydrogenase
27	-1.63	0.01019	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2
28	-1.58	0.01090	SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1
29	-1.79	0.01115	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
30	1.56	0.01130	IRS2	insulin receptor substrate 2
31	1.94	0.01137	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
32	-1.80	0.01336	ZNF503	zinc finger protein 503
33	-1.52	0.01336	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
34	-1.57	0.01336	ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
35	-2.02	0.01424	MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
36	-1.77	0.01512	NRG1	Neuregulin 1
37	-1.58	0.01588	APBB3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3
38	-1.51	0.01725	TMEM5	transmembrane protein 5
39	1.64	0.01741	RCAN1	regulator of calcineurin 1
40	-3.39	0.01842	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
41	-1.74	0.01842	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
42	-1.51	0.01933	GPR137C	G protein-coupled receptor 137C
43	-1.60	0.01982	ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)
44	-1.54	0.02001	LOC133993	PREDICTED: hypothetical LOC133993
45	-1.60	0.02095	FBLN5	Fibulin 5
46	-1.90	0.02501	ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
47	-1.57	0.02821	SLC22A17	solute carrier family 22, member 17
48	1.74	0.02842	TRIB1	tribbles homolog 1
49	-2.11	0.03288	TRIB3	tribbles homolog 3
50	-1.99	0.03465	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
51	1.55	0.03470	MGC61598	PREDICTED: similar to ankyrin-repeat protein Nrarp
52	-1.51	0.04101	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II
53	-2.05	0.04427	ZNF22	zinc finger protein 22

Tabla 10. Genes con expresión diferencial entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg. Se muestran los genes diferencialmente expresados en el contraste de clones P2X7-WT/Gln460Arg versus clones P2X7-WT. Los genes están ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**). **FC**: (fold change), veces de cambio en la expresión génica de clones P2X7-WT/Gln460Arg con respecto a clones P2X7-WT.

9.3. Validación del microarray

Los genes *CHUK* y *RCAN1* resultan de sumo interés en el marco de procesos inflamatorios y su relación con P2X7, de modo que haber encontrado su expresión alterada los convierte en potenciales candidatos para explicar la asociación descripta entre la expresión en heterocigosis de las variantes polimórficas de P2X7, los hallazgos en los animales transgénicos y los desórdenes psiquiátricos como depresión y trastorno bipolar. Resulta necesario entonces confirmar que las diferencias en expresión génica detectadas mediante la técnica de microarray son reales y reproducibles. Para ello, se empleó la técnica complementaria de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), la cual está aceptada como parámetro de validación de datos de microarray (395).

9.3.1. PCR cuantitativa sobre muestras del microarray

En primer lugar, se realizó RT-qPCR sobre las mismas muestras empleadas para la lectura del microarray. Esto representa la confirmación directa de que la lectura del microarray fue correcta para el caso de CHUK y RCAN1. Para estas reacciones y las subsiguientes se seleccionó un control de carga: RPL19. El mismo es de uso habitual en reacciones de RT-qPCR y mostró perfiles de expresión muy parejos en todas las muestras (además de que no surgió como diferencialmente modulado en los datos del microarray), de manera que resulta adecuado su uso en este caso.

Se pudo reproducir la alteración en los perfiles de expresión de CHUK y RCAN1 entre los clones HEK293 P2X7-WT y los clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg: se detectó que CHUK muestra una menor expresión en clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg **(Figura 33A)** y una mayor expresión de RCAN1 en dichos clones **(Figura 33B),** tal como surgió del análisis del microarray.

De esta manera, se confirmó mediante RT-qPCR que CHUK y RCAN1 tienen un perfil de expresión alterado en las muestras utilizadas para realizar el microarray.

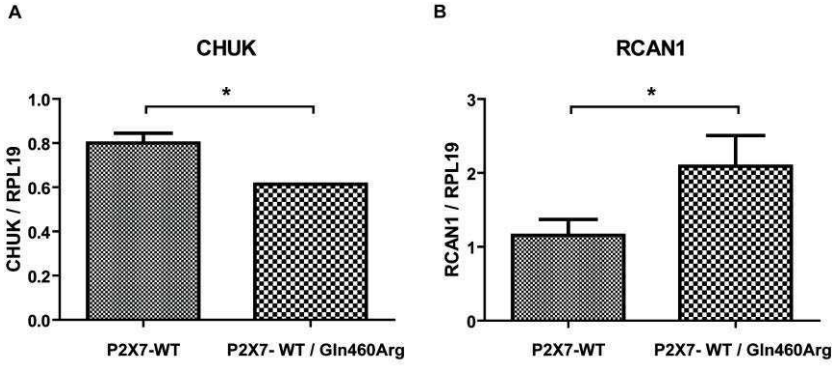


Figura 33. Niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en muestras de clones HEK293 P2X7-WT y HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg empleadas para el microarray. Se utilizó el mismo RNA de las muestras medidas en el microarray, a partir del cual se obtuvo ADNc. Este molde se usó para reacciones de qPCR con primers específicos para CHUK **(A)**, y RCAN1 **(B)**. La cuantificación se realizó mediante el método de curva estándar, y los datos se normalizaron a los niveles de expresión de RPL19. Las mediciones se realizaron por duplicado, midiendo cada primer en la misma reacción. Los valores representan la media ± ES de 5 clones en cada grupo. *: P<0,05. Test t de Student.

10. Las variantes del receptor P2X7 tienen un efecto diferencial sobre la activación transcripcional de CHUK y RCAN1

10.1. Efectos de la activación de las variantes de receptores P2X7 sobre la expresión de CHUK y RCAN1 en clones estables HEK293

A continuación, se estudió el efecto de la activación de las distintas variantes de P2X7 sobre la expresión de estos genes.

Se vio que el tratamiento con BzATP solamente aumenta la expresión de CHUK en clones HEK293 P2X7-WT, pero no en clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg así como tampoco en la línea parental **(Figura 34A)**. En el caso de RCAN1, BzATP aumentó su expresión en los clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg, pero no en los clones HEK293 P2X7-WT o en la línea parental **(Figura 34B)**.

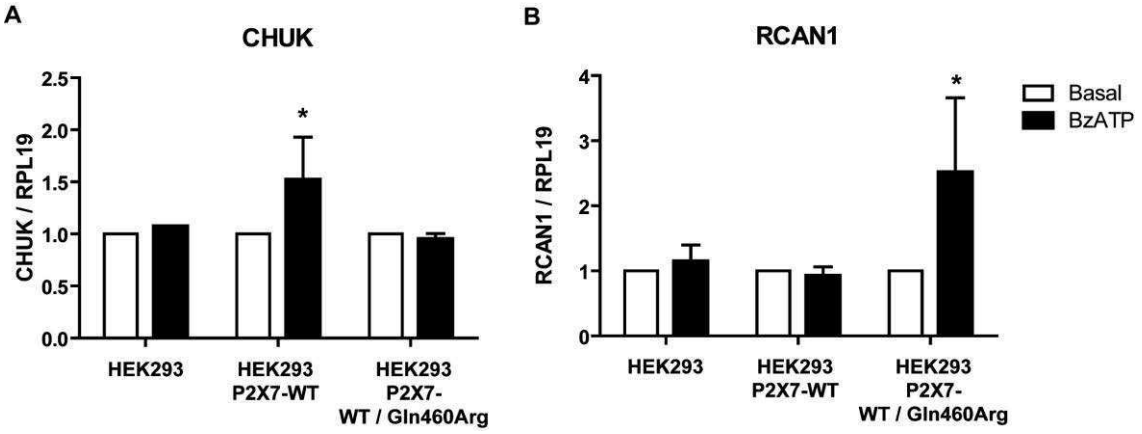


Figura 34. Efectos de la activación de las variantes de P2X7 sobre los niveles de expresión de CHUK y RCAN1. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante 3h. Se extrajo RNA, a partir del cual se obtuvo ADNc. Este molde se usó para reacciones de qPCR con primers específicos para CHUK **(A)**, y RCAN1 **(B)**. La cuantificación se realizó mediante el método de curva estándar, y los datos se normalizaron a los niveles de expresión de RPL19. Los datos se relativizaron al basal de cada clon. Las mediciones se realizaron por duplicado, midiendo cada primer en la misma reacción. Los valores representan la media ± ES de tres experimentos con dos clones de cada variante. *: P<0,05. ANOVA de dos factores. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

Estos resultados van en el sentido de lo detectado en el microarray y posteriormente validado por RT-qPCR: el aumento en la expresión de CHUK debido a la activación de P2X7 en los clones expresores de P2X7-WT no se observa en los clones heterocigotas para las variantes de P2X7. A su vez, la expresión aumentada de RCAN1 tras la activación de P2X7 solamente se evidencia en los clones heterocigotas y no en los clones expresores de P2X7-WT. Vale destacar que en las mediciones efectuadas en la línea parental HEK293 que no expresa P2X7 endógeno no se detectaron modificaciones en los niveles de expresión de los genes analizados debido al tratamiento con BzATP.

10.2. Efectos de la activación de las variantes de receptores P2X7 sobre la expresión de CHUK y RCAN1 en clones estables 1321N1

A continuación se estudió si los patrones alterados de expresión génica de CHUK y RCAN1 debido a la heterocigosis de las variantes de P2X7 se observan en el modelo de la línea astrocitaria 1321N1, de manera de aproximar los hallazgos del microarray en un modelo más cercano a las situaciones de inflamación en SNC. De este modo, se evaluó la expresión de estos genes en los clones 1321N1 sobreexpresores de P2X7-WT y en los clones coexpresores de ambas variantes de P2X7. Se detectó que los niveles de expresión de CHUK aumentan en función del tiempo de estímulo de P2X7 solamente en los clones 1321 P2X7-

WT, mientras que en los clones coexpresores de ambas variantes de P2X7 no se detectaron variaciones en dichos niveles **(Figura 35A).** Para el caso de RCAN1 ocurrió la situación contraria: solamente hubo aumento en los niveles de expresión para el caso de los clones coexpresores **(Figura 35B).**

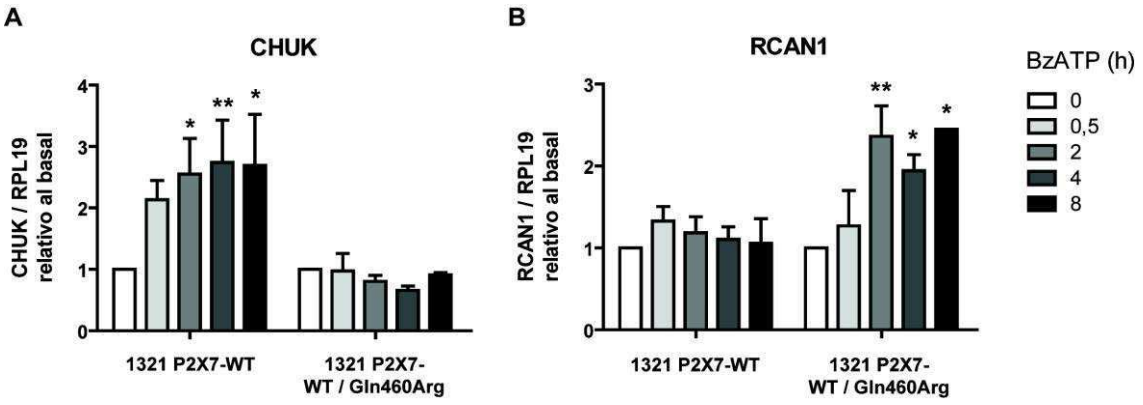


Figura 35. Efectos de la activación de las variantes de P2X7 sobre los niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en clones 1321. Las células fueron estimuladas con BzATP 50 μM durante los tiempos indicados. Se extrajo RNA, a partir del cual se obtuvo ADNc. Este molde se usó para reacciones de qPCR con primers específicos para CHUK **(A)**, y RCAN1 **(B)**. La cuantificación se realizó mediante el método de curva estándar, y los datos se normalizaron a los niveles de expresión de RPL19. Los datos se relativizaron al basal de cada clon. Las mediciones se realizaron por duplicado, midiendo cada primer en la misma reacción. Los valores representan la media ± ES de cuatro experimentos con dos clones de cada variante. *: P<0,05 y **: P<0,01. ANOVA de dos factores. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

De esta manera, se demuestra que la expresión génica de CHUK y RCAN1 también se ve modulada diferencialmente por las distintas variantes de P2X7 en la línea celular astrocitaria 1321N1.

10.3. Patrón de expresión de CHUK y RCAN1 en cerebros de ratones humanizados para el receptor P2X7 humano

A posteriori, se midieron los niveles de expresión de estos genes en muestras de ARN de cerebro de los ratones transgénicos para las variantes de P2X7 humano.

Como se puede ver en la **(Figura 36),** los ratones heterocigotas para ambas variantes de P2X7 humano presentan niveles de expresión de CHUK disminuidos y de RCAN1 aumentados con respecto a los ratones homocigotas para cada variante de P2X7. Estas observaciones concuerdan con lo observado a lo largo del análisis transcripcional de CHUK y RCAN1 en todos los modelos analizados: la coexpresión de P2X7-WT y de P2X7-Gln460Arg

produce una disminución en los niveles de expresión de CHUK y un aumento en los niveles de expresión de RCAN1.

Con estos hallazgos, se concluye que CHUK y RCAN tienen un perfil de expresión génica regulado diferencialmente por las distintas variantes de P2X7, tanto en un modelo de línea celular astrocitaria como en el modelo *in vivo* de cerebro de ratón.

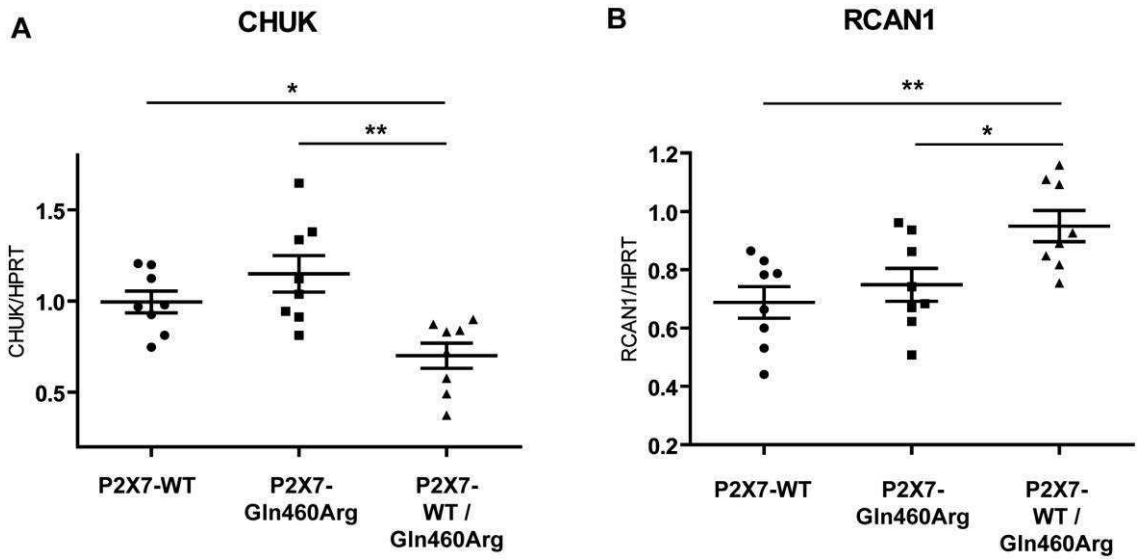


Figura 36. Niveles de expresión de CHUK y RCAN1 en muestras de cerebro de ratones transgénicos para las variantes humanas de P2X7. Se utilizó RNA extraído a partir de tejido de cerebros enteros, a partir del cual se obtuvo ADNc. Este molde se usó para reacciones de qPCR con primers específicos para CHUK **(A)**, y RCAN1 **(B)**. La cuantificación se realizó mediante el método de curva estándar, y los datos se normalizaron a los niveles de expresión de HPRT. Cada muestra se midió por triplicado. Cada punto representa el valor obtenido para cada muestra, y para cada grupo se detalla la media ± ES. n = 8 ratones en cada grupo. **: P<0,05. *: P<0,1. ANOVA de un factor. Contraste a posteriori: Test de Bonferroni.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra que:

1. Las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg tienen igual funcionalidad en cuanto a la entrada de calcio y activación de la MAPK ERK 1/2 cuando se expresan en homocigosis.

2. La coexpresión de ambas variantes en la misma célula produce pérdida de función del receptor.

3. El silenciamiento específico de cada una de las variantes en células coexpresoras P2X7-WT/Gln460Arg restaura la función del receptor.

4. Las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg interactúan a nivel de la membrana plasmática en células coexpresoras.

5. PARP1 interactúa con BRaf en el contexto de la vía de transducción de señales de P2X7.

6. La activación de P2X7 aumenta los niveles de parilación celular mediados por PARP1, que se ve disminuida en el caso de la coexpresión de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg.

7. La activación de P2X7-WT genera profundos cambios en la transcripción génica.

8. Existen diferencias entre el perfil transcripcional producido por activación de P2X7-WT y de P2X7-WT/Gln460Arg, las cuales involucran a vías de señalización, factores de transcripción y grupos de genes asociados con inflamación y depresión.

9. Existen genes candidatos diferencialmente expresados de acuerdo a la variante de P2X7 expresada que podrían explicar la asociación de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg con depresión.

10. Los niveles de expresión del gen *CHUK* se ven aumentados luego de la activación de P2X7-WT, pero no luego de la activación de P2X7-WT/Gln460Arg.

11. Los niveles de expresión del gen *RCAN1* se ven aumentados luego de la activación de P2X7-WT/Gln460Arg, pero no luego de la activación de P2X7-WT.

DISCUSIÓN

1. La variante polimórfica de P2X7 Gln460Arg y depresión

La depresión es un trastorno psiquiátrico con un alto impacto epidemiológico. Dado que los orígenes de su fisiopatología no han sido determinados con certeza hasta el momento, han surgido distintas hipótesis relativas a sus causas, entre ellas la asociación del trastorno con fallas en los sistemas de transmisión noradrenérgica, serotonérgica y glutamatérgica (18). Por ejemplo, una transmisión glutamatérgica excesiva podría estar afectando la estructura y función neuronal (31). También se ha propuesto que las neurotrofinas como el BDNF podrían tener un rol importante en esta enfermedad dado que son factores de supervivencia neuronal y su disminución está relacionada con la aparición de estos trastornos (40). Por otra parte, las situaciones de estrés están fuertemente involucradas en el origen y en el desarrollo de la depresión, debido a la activación crónica del eje HPA (3). Esto genera hipersecreción de CRH y de glucocorticoides, a la vez que se pierde el control por *feedback* negativo mediante glucocorticoides, lo que produce la activación constante de este eje neuroendócrino. De esta manera, la hipersecreción de CRH produce no solo alteraciones neuroendócrinas sino también cambios comportamentales que se asocian con el origen de la depresión (58). El estrés crónico produce también hipercortisolemia, lo que origina cambios a nivel comportamental y cognitivo. Por último, también existen muchas evidencias que avalan la teoría según la cual un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias en el CNS produce estados depresivos (84). Estas citoquinas tienen efectos a nivel central, con consecuencias sobre la plasticidad neuronal y el metabolismo de neurotransmisores. Pero el efecto más determinante radica en la activación sostenida del eje HPA, con consecuencias funcionales similares a las descriptas con anterioridad. Como se puede ver, existen distintos mecanismos a nivel del SNC que al estar alterados podrían convertirse en factores precipitantes en la etiología de la depresión.

Existen amplias evidencias acerca de que la vulnerabilidad individual a sufrir la enfermedad no solamente está determinada genéticamente sino que también está altamente ligada a factores ambientales como el estrés (396). El estrés sostenido o crónico y una mala respuesta a esta situación en combinación con una predisposición genética serían capaces de desencadenar la aparición de estos trastornos psiquiátricos (3). Así, los desórdenes del comportamiento son considerados a menudo como trastornos relacionados al estrés. En este sentido, las hipótesis que identifican a la activación sostenida del eje HPA como desencadenante de la depresión cobran especial importancia, sobre todo en individuos predispuestos genéticamente incapaces de montar una adecuada respuesta frente a situaciones

de estrés crónico.

Dado el fuerte componente genético que parece tener la depresión (127, 128), la identificación de genes de susceptibilidad es un campo amplio de investigación, con varios resultados alentadores en cuanto a la determinación de genes alterados que puedan estar involucrados en las diversas hipótesis del origen de la depresión. Es en este punto donde el gen *P2RX7* entra en escena como un nuevo candidato a ser considerado en relación a enfermedades psiquiátricas como MDD y BPD. Este gen ha sido identificado como asociado a estos trastornos repetidamente en distintos estudios genéticos de los últimos años (140-142). Hasta el momento se han identificado cerca de 20 SNPs en la secuencia codificante de *P2RX7*. Algunos de estos polimorfismos producen ganancia o pérdida de función o no se les ha asignado ninguna función alterada hasta el momento. En particular, se ha descripto que el polimorfismo Gln460Arg no produce cambios en la función del canal (339, 340). Este polimorfismo en particular ha sido fuertemente caracterizado en función de su asociación con desórdenes psiquiátricos. Mientras que varios de estos estudios reportaron asociaciones significativas de este SNP con BPD y MDD (142, 351-357), otros fallaron en reproducir estos resultados (358-361). Para unificar todos los datos existentes hasta el momento y definir la significancia de esta asociación se realizó un meta análisis. Los resultados del mismo favorecen un modelo de desventaja heterocigota para la asociación entre el SNP Gln460Arg de P2X7 con MDD y BPD. Esto quiere decir que la máxima correlación entre este polimorfismo y la enfermedad se obtiene en pacientes heterocigotas para el polimorfismo (es decir que poseen un alelo wild-type y un alelo polimórfico). Este resultado concuerda con un estudio previo que reportó que los portadores heterocigotas del polimorfismo están sobre representados entre los pacientes con depresión (352), lo que sugiere que el genotipo heterocigota en particular podría predisponer a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

Se propone entonces una nueva hipótesis como una de las causas de este trastorno y se establece por primera vez un vínculo entre el receptor P2X7 (y por consiguiente al ATP como neurotransmisor) y un desorden psiquiátrico.

Por lo tanto, estudiar cuáles son las modificaciones que produce la presencia del polimorfismo Gln460Arg de P2X7 en la funcionalidad de este canal resulta de vital importancia para la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y el probable desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la depresión. En este sentido, en este trabajo se estudiaron las vías de señalización e inflamatorias del canal P2X7 y su variante polimórfica Gln460Arg en células del sistema nervioso central.

2. Función de las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg

En un estudio previo realizado durante la tesina de licenciatura, se estudió la funcionalidad de P2X7-WT y la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg. Clones sobreexpresores de P2X7-WT o de P2X7-Gln460Arg mostraron la misma activación frente al estímulo con BzATP, análogo del ATP -el ligando endógeno de P2X7- en ensayos de medición de ingreso de calcio intracelular y activación de la MAPK ERK 1/2. Estos resultados concuerdan con los dos trabajos publicados hasta el momento que evaluaron la actividad de la variante Gln460Arg de P2X7 (339, 340). En estos estudios se analizan linfocitos humanos con las variantes WT y Gln460Arg de P2X7 y células HEK293 transfectadas establemente con dichas variantes. Todas las células utilizadas expresaban alguna variante de P2X7 en homocigosis. Mediante ensayos similares a los del presente trabajo los autores concluyen que P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg tienen la misma funcionalidad.

En la búsqueda de diferencias entre ambas variantes del receptor, y teniendo en cuenta que el fenotipo asociado de depresión se presenta con mayor incidencia en sujetos que poseen en heterocigosis el polimorfismo de P2X7, se estudió la funcionalidad del receptor en células coexpresoras de ambas variantes del mismo. Para ello se utilizó un clon HEK293 sobreexpresor de P2X7-WT y se lo sometió a una nueva ronda de transfección con el transgén P2X7-Gln460Arg. Los clones coexpresores de ambas variantes obtenidos de esta manera fueron analizados en cuanto a su activación por BzATP y se encontró que todos los clones coexpresores estudiados mostraban una marcada disminución en el aumento del calcio intracelular y en la fosforilación de ERK 1/2 con respecto a los clones expresores de una única variante.

Habiendo descripto que la mutación Gln460Arg de P2X7 disminuye la actividad del canal solamente cuando es coexpresado con la variante P2X7-WT, se estudió este fenómeno en células de la glía. En este sentido, cabe destacar que las células gliales son muy importantes en el SNC dado que cumplen una gran variedad de funciones estructurales y funcionales. Como ya se mencionó en la introducción, la glía interactúa constantemente con las neuronas participando en el metabolismo cerebral, la transmisión sináptica y la comunicación entre neuronas (110). De esta manera, cada vez más se describe a la glía como involucrada en la neuropatología de desórdenes neurológicos y psiquiátricos (111). En particular, es importante recordar que los astrocitos cumplen un rol en los procesos inflamatorios y neurodegenerativos, siendo a la vez fuente y blanco de varias citoquinas

inflamatorias (114). Dado el importante componente inflamatorio y de respuesta al estrés que tiene la depresión y el hecho de que P2X7 es un modulador de la respuesta inflamatoria a nivel del SNC, resulta interesante estudiar la funcionalidad de las variantes de P2X7 en astrocitos.

Se usó entonces una línea celular proveniente de astrocitos humanos; la misma expresa P2X7 de manera endógena y responde a BzATP en los ensayos de calcio y fosforilación de ERK 1/2 realizados. La transfección estable de la misma variante P2X7-WT no muestra cambios notorios en la activación del receptor con respecto a la línea parental, pero la transfección estable de P2X7-Gln460Arg hace que la respuesta al estímulo de BzATP sea casi nula. De este modo, se vuelve a observar que la mutación puntual de P2X7 produce una disminución en la función del canal sólo en un contexto de coexpresión con el alelo normal, en este caso en un modelo de expresión endógena en astrocitos. Por lo tanto, se concluye que la mutación puntual de P2X7 tiene efectos sobre la apertura del canal y el consiguiente ingreso de calcio al espacio intracelular, y también influye en la activación de al menos una vía de señalización intracelular ligada a los efectos de la activación de P2X7. Esta disminución en la activación de ERK 1/2 parecería estar relacionada directamente con el menor influjo de calcio en células coexpresoras de ambas variantes de P2X7, dado que se ha descripto que la fosforilación de ERK 1/2 mediada por P2X7 es dependiente de la entrada de calcio. El aumento del calcio intracelular promueve la activación de proteínas adaptadoras por fosforilación de residuos tirosina específicos que llevan en última instancia a la activación de la cascada de la proteína Ras, que finalmente activa a ERK 1/2 (208).

El ensayo que evidencia de manera definitiva que efectivamente es la coexpresión de ambas variantes de P2X7 lo que produce una pérdida en la función del canal son los experimentos de silenciamiento específico de cada una de las variantes en células coexpresoras. Dada la respuesta disminuida de entrada de calcio y fosforilación de ERK 1/2 en estos clones coexpresores, cuando se silenció específicamente a P2X7-WT o a P2X7-Gln460Arg (de manera que el clon termine expresando una única variante) se recuperó la alta funcionalidad observada en los clones expresores de una única variante. En conclusión, dado que al silenciar alguna de las variantes en los clones coexpresores estos se comportan funcionalmente como los clones expresores de una única variante, se verifica que es la coexpresión de ambas variantes de P2X7 lo que produce una pérdida de función del receptor.

3. Interacción entre las subunidades P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg en receptores P2X7

Teniendo en cuenta que los receptores P2X7 se ensamblan a modo de trímeros (el gen *P2RX7* codifica para una subunidad que se asocia con otras dos de modo de conformar el trímero P2X7) (163), es válido suponer que la pérdida de función observada en clones coexpresores de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg se produzca debido a la presencia de trímeros de P2X7 conformados por ambas variantes. De acuerdo a los resultados obtenidos, los trímeros de P2X7 conformados exclusivamente por variantes P2X7-WT (en el caso de clones sobreexpresores de P2X7-WT) o conformados exclusivamente por variantes P2X7-Gln460Arg (en el caso de clones sobreexpresores de P2X7-Gln460Arg) tienen la misma funcionalidad. En cambio, en los clones coexpresores de ambas variantes, la pérdida de función podría deberse a trímeros conformados por una mezcla de variantes P2X7-WT con P2X7-Gln460Arg donde dicha mezcla de variantes produzca de alguna manera la pérdida de función.

Para comprobar esta hipótesis se verificó si existe interacción entre ambas subunidades. Un resultado positivo significaría que ambas variantes interactúan como subunidades del mismo trímero. Esto se llevó a cabo mediante 2 enfoques complementarios: ensayos de Co-IP y medición de señales de FRET. En ambos casos se detectó interacción entre las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg. Los ensayos de Co-IP se realizaron en clones coexpresores de ambas variantes, cada una fusionada a etiquetas distintas para diferenciarlas con anticuerpos específicos durante la inmunoprecipitación y posterior WB. El agregado de las distintas etiquetas o proteínas fluorescentes en ningún caso modificó la funcionalidad de los receptores. Es interesante destacar que los extractos proteicos para estos experimentos se obtuvieron a partir de fracciones de membrana celular tratadas con alta concentración de detergente iónico. Esto fue necesario para asegurar la correcta extracción de las proteínas integrales embebidas en la membrana como es el caso de los receptores P2X7. El hecho de poder detectar la interacción entre las subunidades aún bajo estas condiciones permite suponer que dicha interacción en la membrana es fuerte, como sería en el caso de que ambas subunidades formen parte del mismo trímero. En cuanto a los ensayos de FRET, también se obtuvieron resultados que demuestran interacción entre ambas variantes. Las mediciones de FRET se llevaron a cabo en células vivas transfectadas con ambas variantes de P2X7, cada una fusionada a una proteína fluorescente adecuada para realizar estas mediciones. A continuación se realizó la correspondiente cuantificación de señal de FRET

evaluando solamente la superficie de la membrana plasmática. De esta manera el diseño de este experimento permite corroborar la interacción entre P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg en receptores P2X7 ensamblados correctamente en la membrana plasmática de células vivas. Se concluye entonces que en células coexpresoras de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg se produce la interacción entre ambas variantes dando lugar a trímeros de P2X7 conformados por ambas subunidades. Son estos trímeros heteroméricos compuestos por P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg los que presentan una menor funcionalidad con respecto a los receptores P2X7 homotriméricos compuestos exclusivamente por una de estas variantes.

4. Estructura y función de los receptores P2X7 heteroméricos

No queda claro el mecanismo estructural por el cual el polimorfismo Gln460Arg puede estar alterando la conformación del trímero de P2X7 compuesto por ambas variantes de modo de producir una pérdida de función en el receptor. Es válido suponer que este polimorfismo que produce el cambio de un residuo glutamina por un residuo arginina, podría estar modificando la estructura terciaria del canal por cambios en la interacción entre los residuos de la proteína.

Evidencias funcionales y bioquímicas indican que diferentes miembros de la familia de receptores P2X forman heterómeros (397). La composición de las subunidades de estos heterómeros tiene efectos en su funcionalidad. Los receptores heteroméricos muestran distintas respuestas farmacológicas en comparación con los correspondientes receptores homoméricos. Se ha visto que P2X7 forma únicamente trímeros homoméricos (198). El hecho de que los receptores P2X heteroméricos presenten diferentes propiedades farmacológicas permite suponer que las variantes P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg forman receptores heteroméricos con diferentes propiedades al asociarse entre sí, con las características de menor funcionalidad que se demostraron en este trabajo. En este sentido ha habido reportes que muestran alteraciones en la función de receptores P2X7 debido a asociación heteromérica con variantes distintas a la normal. El primer reporte consistió en la descripción de la existencia de una variante truncada de P2X7, que no tiene función cuando es la única variante que se expresa, pero es capaz de interactuar y heterooligomerizar con P2X7-WT (conformando así trímeros heteroméricos) lo que anula la actividad de P2X7 (398). De manera similar, existen variantes truncadas de P2X7 que no poseen gran parte del extremo

carboxilo terminal que se expresan incluso en ratones *knock out* para P2X7. Estas variantes truncadas escaparon a la inactivación perseguida por la estrategia del *knock out* y por sí mismas tienen cierto grado de funcionalidad (240). Sin embargo, en estudios posteriores se vio que cumplen la función de dominante negativo en presencia de la variante normal de P2X7, disminuyendo sus niveles de activación (399). De manera similar se han descripto variantes de P2X7 con mutaciones en el dominio extracelular (P2X7R-Trp,Cys167-168Ala,Ala y P2X7R-Cys168Ala), que anulan selectivamente la función de P2X7 a modo de dominante negativo cuando son coexpresadas con P2X7-WT (400).

Los ensayos de Co-IP y FRET que se presentan en este trabajo avalan el concepto según el cual el polimorfismo Gln460Arg no impide la formación de heterotrímeros de P2X7, dado que se detectó la interacción entre las variantes en canales ubicados en la membrana celular. Esto resulta esperable dado que si es posible que existan heterómeros entre P2X7-WT y variantes con algunas mutaciones e incluso con variantes truncadas como se acaba de describir, es lógico suponer que existan heterómeros entre P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg que únicamente difiere en un aminoácido. Esto concuerda con la observación que muestra que la asociación de subunidades en trímeros (sean a modo de homómero o heterómero con distintas variantes) depende de los residuos de cisteína localizados en el *loop* extracelular de las subunidades de P2X7, los que forman puentes disulfuro entre las subunidades, estabilizando dicho trímero (401).

El polimorfismo Gln460Arg impacta no solo a nivel de entrada de calcio sino también sobre la transducción de señales de P2X7 luego de su activación. Esto podría estar relacionado con el hecho de que el dominio carboxilo terminal de P2X7 donde se ubica este polimorfismo es un dominio al cual se unen varios componentes de señalización intracelular (402). Estos sitios de unión podrían verse alterados en su conformación espacial debido a la presencia del polimorfismo en alguna de las subunidades del trímero, con consecuencias negativas para la activación de las correspondientes vías de señalización. Estudios de secuencias demostraron que en el extremo carboxilo terminal de P2X7 (más precisamente en las posiciones 441-460) existe un motivo de unión de proteínas de tipo SH3 (del inglés, Src homology 3 protein binding motif) (403). Está reportado que sobre este motivo se une una tirosina quinasa con motivo SH3 (tirosina quinasa Src) y que esta misma quinasa está involucrada en la activación de ERK 1/2 luego de la activación de P2X7 (208). De este modo, dado que el motivo SH3 incluye a la posición 460, la heterooligomerización entre P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg podría estar alterando la conformación de este dominio a nivel del trímero

de P2X7, afectando en consecuencia las interacciones entre el receptor y los elementos de señalización como la quinasa mencionada, produciéndose entonces una transducción defectuosa de la señal.

Para confirmar estas hipótesis se deberían llevar a cabo estudios estructurales detallados. Hasta el momento, no se ha podido obtener la cristalografía de rayos X del receptor P2X7. La herramienta más similar con la que se cuenta es la estructura cristalina del receptor P2X4 de pez cebra (Zebrafish), tanto en su conformación cerrada como abierta con ATP unido (404, 405). Esto ha representado un avance muy importante en el campo de estudio de los receptores purinérgicos, dado que permitió obtener una gran cantidad de datos estructurales que expliquen las observaciones funcionales realizadas hasta el momento. Teniendo en cuenta que los receptores P2X4 comparten una alta homología de secuencia con el resto de los integrantes de la familia de P2X, se han podido extrapolar los datos a las otras subunidades de la familia. Así, se han obtenido avances en cuanto a la descripción del sitio de unión del ATP, del mecanismo de apertura del canal y del canal iónico en sí mismo (406). Sin embargo, no existen datos que se puedan extrapolar en el caso del dominio carboxilo terminal de P2X7. P2X7 es el único de su familia que posee este largo dominio (mayor a 200 aminoácidos), de manera que la estructura de rayos X de P2X4 no aporta datos significativos en este sentido. El único enfoque serio para caracterizar la estructura de este dominio único de P2X7 es mediante la obtención de su estructura (403). Solamente con esta herramienta será posible, en un paso posterior, modelar las posibles alteraciones que el polimorfismo Gln460Arg pueda estar generando sobre la estructura tridimensional del trímero. De esta manera sería posible entender las estructuras que producen a nivel funcional las alteraciones debido a la formación de heterómeros de P2X7 entre las variantes WT y Gln460Arg.

5. Estudios *in vivo* de las variantes de P2X7 y su correlato con trastornos del comportamiento

Dada la asociación descripta entre la variante polimórfica Gln460Arg y trastornos psiquiátricos como MDD y BPD (sobre todo en heterocigosis con P2X7-WT de acuerdo a Lucae et al., 2006 (352) y el meta análisis realizado), es necesario estudiar las consecuencias funcionales producidas por el heterómero de P2X7 en el marco de mecanismos que puedan estar relacionados con estas enfermedades. Para el caso de los pacientes con depresión en los

que la variante mutada se expresa en heterocigosis junto con P2X7-WT, el receptor sería probablemente un heterotrímero conformado por subunidades WT y Gln460Arg. Así, la interacción entre estas dos variantes a nivel del complejo del receptor podría estar afectando tanto la actividad de canal iónico como la posterior transducción de señales intracelulares. Es necesario entonces caracterizar sus consecuencias funcionales, de modo de aproximar una explicación para la asociación con depresión.

La relevancia de P2X7 en relación a los desórdenes del comportamiento ha sido estudiada previamente en distintas líneas de ratones *knock out* para P2X7, con resultados confusos y en ciertas ocasiones contradictorios. (240, 407). En un estudio se describió que ratones *knock out* para P2X7 tienen un fenotipo similar a ratones tratados con antidepresivos en lo que a parámetros comportamentales se refiere. De cualquier manera, los autores de este trabajo aceptan que este fenotipo podría ser la consecuencia de mecanismos neurales compensatorios durante el desarrollo que podrían estar enmascarando el rol funcional original del gen anulado (407). A su vez, otra línea de ratones *knock out* para P2X7 (obtenidos mediante una estrategia diferente) produjo resultados aparentemente opuestos, dado que las hembras de estos ratones no mostraban el comportamiento antidepresivo previamente reportado y exhibían además una respuesta adaptativa disminuida frente al estrés y también un aumento en el comportamiento relacionado con ansiedad, ambos parámetros ligados a comportamientos depresivos (408). En otro estudio se analizaron solamente machos de esta última línea *knock out* para P2X7 y se obtuvieron resultados similares (409). De cualquier manera estos resultados deben evaluarse con precaución dado que se observó que estos ratones *knock out* expresan una variante truncada de P2X7 que es funcional (399, 410). Resumiendo, la suma de estos hallazgos apoya el rol de P2X7 en los trastornos del comportamiento, pero no son suficientes para establecer las causas subyacentes.

En este sentido, los resultados obtenidos por nuestro grupo colaborador del MPI de Múnich, Alemania en ratones humanizados para las distintas variantes del receptor P2X7 humano resultan de gran interés. Estos resultados constituyen la primera descripción en un modelo *in vivo* de las consecuencias funcionales de los receptores P2X7 heteroméricos. Los ratones homocigotas tanto para P2X7-WT como para P2X7-Gln460Arg tuvieron resultados similares en todos los estudios comportamentales realizados. Sin embargo, los ratones heterocigotas que coexpresan ambas variantes de P2X7 mostraron parámetros alterados en línea con un fenotipo que comparte características con los trastornos psiquiátricos en humanos, como se describe a continuación.

Los trastornos del sueño son uno de los síntomas más comunes de los trastornos afectivos. Las alteraciones en los electroencefalogramas (EEG) son un importante predictor de episodios depresivos a punto de ocurrir, y en general preceden a la manifestación completa de la enfermedad. En este sentido, los ratones homocigotas mostraron un comportamiento normal en cuanto a todos los parámetros del sueño analizados, mientras que los ratones heterocigotas demostraron tener una arquitectura del sueño alterada, evidenciada por pérdida de sueño profundo, sueño fragmentado y alteraciones en el EEG. Estas características se detectan habitualmente en pacientes con trastornos afectivos. Con el fin de comprobar si la heterocigosis de P2X7 predispone al desarrollo de la enfermedad, se sometió a los ratones a un protocolo de estrés crónico, repetidamente validado como modelo de depresión en ratones (386, 387). El estrés crónico tiene un gran impacto en los ratones, tanto a nivel comportamental como fisiológico. Este hecho se manifestó en todos los genotipos de los ratones, los que mostraron cambios comportamentales y activación sostenida del eje HPA. Sin embargo, solamente los ratones heterocigotas exhibieron un comportamiento de elevada ansiedad debido al estrés en comparación con ratones no sometidos al protocolo de estrés crónico. Además, solamente los ratones heterocigotas mostraron déficit en el comportamiento social y signos de anhedonia. Por último, resulta interesante observar que los ratones heterocigotas hayan tenido un aumento muy notorio en los niveles de corticosterona circulante luego del protocolo de estrés crónico. Este hallazgo se correlaciona con la observación de que en pacientes con depresión existe una alteración en el eje HPA, con niveles elevados de CRH y glucocorticoides (3).

En su conjunto, estos resultados indican que solamente los ratones heterocigotas para ambas variantes de P2X7 humano presentan una elevada sensibilidad al estrés y muestran síntomas comportamentales relacionados con depresión.

6. Mecanismos involucrados en la activación de las distintas variantes de receptores P2X7

La pérdida de función de los receptores P2X7 heteroméricos y el fenotipo observado en los ratones expresores de estas variantes humanas hace suponer que la presencia en heterocigosis de la variante polimórfica Gln460Arg tiene efectos funcionales a nivel celular que están relacionados en última instancia con la aparición de trastornos psiquiátricos. Con el

objetivo de encontrar cuáles son los mecanismos moleculares que explican este fenómeno se procedió a buscar nuevos blancos involucrados en la señalización mediada por P2X7 que se encuentren alterados de alguna manera por la presencia de la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg. Con este objetivo, se emplearon dos enfoques complementarios: por un lado, la búsqueda de proteínas involucradas en los mecanismos de señalización de P2X7 no descriptas como tales hasta el momento y por el otro, la búsqueda de genes con niveles de expresión génica alterados debido a la activación de las distintas variantes de P2X7.

Para el primer enfoque se empleó la técnica de proteómica, que permite mediante espectrometría de masa identificar proteínas, en este caso asociadas a los elementos de señalización de P2X7; mientras que para la detección de genes con expresión alterada se utilizó la técnica de microarray de expresión, que permite cuantificar los niveles de expresión de todos los genes en distintas condiciones, en este caso comparando células expresoras de las distintas variantes de P2X7.

7. PARP1 como mediador de los efectos de P2X7

La técnica de proteómica permitió identificar a PARP1 asociado a BRaf en células del SNC. Se decidió realizar proteómica sobre proteínas asociadas a BRaf dado que se sabe que esta quinasa es abundante en SNC y en general sirve de anclaje a muchas otras proteínas. Es habitual que BRaf forme parte de complejos multiproteicos los cuales a su vez modulan la señalización en la que BRaf participa (58, 392, 393). Además, se pudo ver que BRaf forma parte de los mecanismos de señalización de P2X7 (la activación del receptor produjo su fosforilación dependiente del tiempo), de manera que resulta un candidato interesante para estudiar cuáles son las proteínas que se encuentran asociadas al mismo. Hasta el momento no se ha descripto a PARP1 relacionado con P2X7, mucho menos en asociación con BRaf. Dado que PARP1 tiene un rol importante en los mecanismos de respuesta celular a inflamación, en particular en la respuesta inflamatoria frente al estrés en el SNC, es un candidato interesante a ser estudiado en relación a P2X7 en el contexto de inflamación, estrés y depresión. Surge entonces la hipótesis de que PARP1 puede estar participando de los efectos mediados por P2X7.

La principal función de PARP1 es la de agregar residuos de PAR a proteínas blanco, es decir que es una enzima clave en la modificación postraduccional conocida como parilación.

En consonancia con esto, es interesante observar que la activación de P2X7 produce un aumento en los niveles celulares de parilación, y que dicho aumento es mediado por PARP1. Este hallazgo valida y refuerza el concepto de que PARP1 forma parte de los mecanismos de señalización de P2X7. De esta manera, la activación de los receptores P2X7 abre una puerta a toda una nueva serie de efectos que PARP1 podría estar mediando debido al aumento en la parilación proteica. Los resultados que se muestran en este trabajo son el puntapié inicial en esta línea de investigación, dado que evidencian que tras la activación de P2X7 PARP1 se vuelve activo enzimáticamente y aumentan los niveles de parilación celular. Sería necesario describir a continuación cuáles son las consecuencias funcionales de este fenómeno. El número de proteínas que se describen como blanco de parilación por PARP1 está en constante aumento. Se ha demostrado que PARP1 modifica histonas, factores de transcripción, enzimas y proteínas estructurales del núcleo. Por ejemplo, mediante la parilación de histonas se regula la estructura de la cromatina (292). También se demostró que PARP1 parila y altera la función de varios factores de transcripción, incluyendo a AP-1, NFκB, CTCF y YY1 (294). Sería interesante examinar si alguna de estas proteínas es blanco de parilación de PARP1 tras su activación por P2X7. Otro enfoque a mayor escala sería el de realizar una proteómica de proteínas pariladas luego de la activación de P2X7, con el fin de caracterizar cuáles son las proteínas que se parilan debido a la activación de P2X7. El avance en alguno de estos sentidos profundizaría los conocimientos acerca de la relación entre P2X7 y PARP1, sobre todo en el contexto de inflamación y depresión.

Por otra parte, se ha visto en distintos modelos experimentales que PARP1 participa en la regulación de la expresión génica, dado que la modula a distintos niveles en condiciones basales, o en respuesta a señales activadoras como estrés celular (294-296). En particular, en el SNC PARP1 regula la actividad de factores de transcripción fundamentales en los procesos de inflamación como NFκB y AP-1, de manera que influye sobre los niveles de transcripción de mediadores inflamatorios como IL-6, IL1-β, TNFα, COX-2 e iNOS (313, 316). Sería interesante explorar si alguno de estos efectos de PARP1 a nivel transcripcional es producido también por activación de P2X7.

Por último, el hallazgo que muestra que el aumento de la parilación mediado por P2X7 se ve notoriamente disminuido en células coexpresoras de ambas variantes de P2X7-WT y P2X7-Gln460Arg resulta muy interesante dado que permite suponer que una menor activación de PARP en las células coexpresoras podría tener algún rol en los mecanismos mediados por P2X7 en relación a la aparición de trastornos psiquiátricos.

En conclusión, los hallazgos obtenidos en esta tesis en relación a PARP1 lo identifican como partícipe de la vía de transducción de señales de P2X7, a la vez que sugieren por primera vez a P2X7 como un activador de la actividad de PARP1. Esto podría tener consecuencias funcionales interesantes en el marco de los mecanismos de respuesta a inflamación en el SNC desencadenados por P2X7 así como también podría indicar la existencia de un rol de PARP1 en la asociación de la variante polimórfica Gln460Arg de P2X7 con trastornos psiquiátricos.

8. Perfil transcripcional de P2X7

El segundo enfoque empleado con el objetivo de encontrar cuáles son los mecanismos moleculares que explican la asociación entre la variante Gln460Arg de P2X7 y los trastornos psiquiátricos, fue buscar genes con niveles de expresión génica alterados debido a la activación de las distintas variantes de P2X7. Para esto se realizó un microarray de expresión. Como se explicó en la Introducción, está documentado que la activación de los receptores P2X7 produce la modulación de la transcripción de variados genes en distintos modelos celulares (248). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ningún análisis a gran escala que evalúe directamente las consecuencias a nivel de la expresión génica que produce la activación del receptor P2X7, y mucho menos se han estudiado las posibles diferencias en la transcripción de genes mediada por las distintas variantes de P2X7. De esta manera, si bien el objetivo final de la realización del microarray fue comparar los perfiles de expresión génica de P2X7-WT y P2X7-WT/Gln460Arg, se estudió primero la activación de P2X7-WT en sí misma. Se compararon los perfiles de expresión resultantes de aplicar BzATP en la línea celular HEK293 que no expresa P2X7 endógeno (y que como se demostró no presenta entrada de calcio o activación de ERK 1/2 con BzATP) y en clones HEK293 P2X7-WT. Este análisis dio como resultado el perfil transcripcional derivado de la activación de los receptores P2X7-WT. Se encontraron una gran cantidad de genes con expresión alterada debido a la activación de P2X7. Empleando un criterio de corte estricto (es decir considerando que un gen está diferencialmente expresado si presenta un mínimo de 1,5 veces de diferencia entre las dos condiciones y además el valor estadístico de esta diferencia resulta menor o igual a 0,05), se encontraron 1995 genes diferencialmente expresados. Es interesante destacar que la activación de P2X7 produjo tanto activación como inhibición de la expresión génica, dado

que de este total de genes diferencialmente expresados, 863 tuvieron expresión aumentada y 1132 tuvieron expresión disminuida en los clones HEK293 P2X7-WT. Esto confiere una primera aproximación al notorio efecto que tiene la activación de P2X7 sobre la expresión génica. Teniendo en cuenta que el genoma humano consta de aproximadamente 30000 genes que codifican para proteínas (411), resulta notorio que la activación de P2X7 produce cambios en los niveles de expresión de casi 2000 genes, es decir, alrededor del 7%. Esta estimación confirma la magnitud del efecto de P2X7 sobre la transcripción parcialmente reportado hasta el momento y reafirma el concepto de los profundos cambios que pueden ocurrir a nivel celular (a nivel de la transcripción en este caso) debido a la activación de este canal iónico. Un análisis más detallado de las consecuencias transcripcionales de la activación de P2X7 proviene del análisis bioinformático realizado con este grupo de datos. Se encontró que los 1995 genes diferencialmente expresados se pueden agrupar mediante distintos parámetros en bases de datos. En primer lugar, se obtuvieron los términos GO que corresponden a los genes con expresión alterada. Se obtuvieron términos GO muy diversos, pero que apuntan a dar cuenta de que la activación de P2X7 regula procesos y mecanismos variados y de gran importancia en la fisiología celular. Por ejemplo, aparecieron términos GO relacionados con el desarrollo (angiogénesis, organogénesis, migración celular, desarrollo vascular), con la función neuronal (movimiento axonal, dendritas, axones, proyección neuronal, metabolismo de neurotransmisores), con la estructura celular (citoesqueleto, filamentos intermedios), con el metabolismo celular y enzimático (distintas actividades enzimáticas, metabolismo de lípidos, metabolismo de aminoácidos, procesos metabólicos variados, metabolismo de aminas y compuestos nitrogenados) **(Tabla 6)**. También se analizaron las vías de señalización a las que pertenecen los genes diferencialmente expresados. Se encontró que existe un gran número de vías de señalización alteradas, de índole muy variada: vías hormonales (de ácido retinoico, de andrógenos, de prolactina), vías del desarrollo (de BMP, de Wnt, de TGFβ, de Notch), vías metabólicas (de glucólisis, de carbohidratos, de aminoácidos, de ácidos grasos, de leptinas), vías de respuesta inflamatoria (de ATF2, de NFκB, de moléculas de adhesión) y vías involucradas con la función neuronal (de receptores ErbB, de liberación de neurotransmisores, de metabolismo de neurotransmisores) **(Tabla 7)**. Estos resultados caracterizan los efectos sobre la transcripción génica mediados por activación de P2X7. Se puede concluir que P2X7 produce un importante cambio en la transcripción génica, ejemplificado en la cantidad y variedad de genes, procesos biológicos y vías de señalización que resultan alterados.

Estos resultados van en el sentido de los reportes previos que indican que P2X7

modifica la expresión génica (236, 237). Cada uno de estos reportes examinó los efectos de P2X7 sobre genes puntuales o grupos de genes acotados en distintos modelos, la mayoría de ellos en el marco de procesos inflamatorios o respuesta inmune. Vale la pena mencionar el único trabajo realizado hasta el momento que examina de manera indirecta la influencia de P2X7 a nivel de transcripción global. En él (409) se efectuó un array de expresión sobre muestras de amígdala de ratones normales o *knock out* para P2X7, en condiciones basales o expuestos a shock séptico por LPS. En cuanto a la comparación en condiciones basales entre ratones normales y *knock out* para P2X7 se reportan cambios en la expresión de alrededor de 8400 genes. Estos resultados son muy valiosos en cuanto que describen las consecuencias a nivel transcripcional de la deleción de P2X7 en un tejido neural como es la amígdala. De cualquier manera, no queda clara la razón última de esta expresión génica alterada, dado que no se estimula directamente al receptor (de modo que se estaría analizando la influencia de la presencia o ausencia del receptor a nivel de la amígdala y no las consecuencias de su activación específica) y por otra parte al tratarse de un modelo de animal *knock out* podrían existir mecanismos compensatorios que dificulten el análisis puntual del efecto de P2X7, como por ejemplo la presencia de otras variantes parcialmente funcionales de P2X7, como ya se mencionó con anterioridad (399, 410). En este sentido, el microarray realizado sobre clones HEK293 permite detectar cambios en la expresión génica debidos exclusivamente a la activación de P2X7, en un marco general, sin circunscribirse a ningún tejido en particular. Resulta válido argumentar que las diferencias en la expresión génica detectadas en una línea celular inmortalizada como HEK293 pueden diferir en gran medida de lo que ocurre realmente en el tejido de un organismo vivo, pero de cualquier manera permite caracterizar a grandes rasgos estas alteraciones, para luego examinarlas en mayor profundidad en un contexto adecuado de acuerdo al gen o mecanismo puntual que se desee estudiar. Estos resultados son entonces la caracterización global inicial y necesaria para evaluar los efectos transcripcionales de P2X7 y sientan las bases para futuros estudios.

9. Consecuencias transcripcionales de la activación de las distintas variantes de P2X7

Una vez caracterizado el impacto transcripcional de P2X7-WT en células HEK293, se procedió a realizar la comparación entre los perfiles de expresión génica de los clones HEK293 P2X7-WT y los clones coexpresores HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg. En primera

instancia se realizó el análisis bioinformático de dicho contraste. Esto permitió caracterizar a nivel global las diferencias existentes entre los perfiles de expresión de ambos tipos de clones. Dado que el objetivo central consiste en encontrar asociaciones entre la variante polimórfica P2X7-Gln460Arg y los trastornos depresivos, los resultados obtenidos se focalizaron en relación a procesos de inflamación, estrés y relacionados con depresión. De esta manera se encontró un gran número de coincidencias entre el perfil de expresión diferencial de los clones coexpresores y estos fenómenos. Los datos de este contraste coinciden en gran medida con datos de publicaciones que estudiaron procesos relacionados con inflamación. Ejemplos de ello son publicaciones que se centraron en diversos procesos inflamatorios como mecanismos inflamatorios frente a LPS, frente a prostaglandinas, frente a estrés ambiental, frente a estrés oxidativo. También hubo coincidencias con publicaciones que estudiaron vías de señalización inflamatorias como las iniciadas por TNF, por IL-6 y con vías mediadas por NFκB, p38 y CREB. A su vez el patrón de expresión diferencial de los clones coexpresores coincidió con un estudio en el que se evaluaron genes diferencialmente expresados en MDD **(Tabla 9, orden 433)**. En este estudio se comparó mediante microarray el perfil transcripcional en la corteza temporal de 12 pacientes con MDD y 14 controles (412). A grandes rasgos este estudio describe alteraciones en niveles de expresión de genes relacionados con desarrollo neuronal, comunicación celular y transducción de señales. Resulta interesante que las diferencias de expresión entre los clones P2X7-WT y los clones P2X7-WT/Gln460Arg coincidan en gran medida con las reportadas en este estudio. A posteriori se buscaron vías de señalización alteradas que estén relacionadas con inflamación o depresión: se detectaron las vías de señalización de NFAT, AP1 y NFκB. También se detectaron vías de MAPK y de la familia de ERK, y la vía de apoptosis de p53 **(Tabla 9)**. Finalmente, cuando se agrupó a los genes de acuerdo a sus sitios consenso de unión a factores de transcripción se pudo ver que aparecían los factores de transcripción inflamatorios AP1, CREB y NFκB **(Tabla 9)**. En particular, el factor de transcripción CREB resulta interesante en este contexto, dado que se lo ha visto repetidamente asociado con MDD y BPD (413, 414). El hecho de que un gran número de genes con sitios consenso para unión de CREB en sus promotores estén diferencialmente expresados en los clones expresores de las distintas variantes de P2X7 puede estar dando la pauta de que CREB es un mediador importante de la respuesta transcripcional de P2X7, lo que podría tener un rol en depresión.

Con todo este material se obtuvo un panorama global de los efectos transcripcionales mediados por las distintas variantes de P2X7 orientado a detectar mecanismos relacionados

con inflamación y depresión: se detectó un enriquecimiento notable en vías de señalización y factores de transcripción inflamatorios, así como también coincidencias con estudios previos de asociación con depresión. Es importante destacar que a grandes rasgos, algunas de las vías de señalización y factores de transcripción mencionados ya han sido reportados como regulados por P2X7 (236, 237, 243-245, 248). Por un lado, ello confiere mayor solidez a estos hallazgos mediante métodos bioinformáticos, pero también proporciona una visión general de cuáles son los mecanismos de señalización alterados en las células coexpresoras de ambas variantes de P2X7. No parece azaroso que las vías y factores de transcripción generalmente asociados con respuestas inflamatorias aparezcan sobre representados en este contraste.

A continuación se identificaron los genes diferencialmente expresados entre los clones HEK293 P2X7-WT y los clones HEK293 P2X7-WT/Gln460Arg. Como era de esperar, este contraste produjo diferencias menos notorias con respecto al contraste realizado entre la línea parental HEK293 y los clones sobreexpresores de P2X7-WT. Diferencias razonables dado que en un caso se está comparando entre ausencia y presencia de P2X7 y en el otro caso se busca encontrar diferencias entre las distintas variantes de P2X7. Así, mientras que en el perfil transcripcional de P2X7-WT se obtuvieron 1997 genes con expresión diferencial, en el caso de P2X7-WT vs P2X7-WT/Gln460Arg se obtuvo una reducida lista de 53 genes empleando los mismos criterios de corte. Estos genes son de gran interés puesto que dan cuenta de las diferencias fundamentales que existen a nivel de la transcripción entre los clones que solamente expresan P2X7-WT y los clones que coexpresan ambas variantes de P2X7.

10. CHUK y RCAN1 como genes candidatos relacionados con depresión

La lista de genes diferencialmente expresados obtenida comprende una variedad de genes con distintas funciones. Sin embargo, hay cuatro de ellos que sobresalen del resto en cuanto a su posible asociación con depresión, a saber: Neuregulina 1 (*NRG*1), la subunidad épsilon del receptor de GABA de tipo A (*GABRE*), Regulador de Calcineurina 1 (*RCAN1*) y la quinasa ubicua de dominio conservado hélice-vuelta-hélice (*CHUK*). Cada uno de estos genes resulta de máximo interés en el contexto de depresión, tal como se describe a continuación. En particular, el resultado del microarray para los genes *CHUK* y *RCAN1* fue validado y se profundizó acerca de su regulación transcripcional por las variantes de P2X7 en distintos modelos celulares e *in vivo*.

La vía de señalización de NFκB es central en lo que a respuesta inflamatoria se refiere (264). Como ya se mencionó, esta vía de señalización aparece repetidamente en los resultados del microarray, por lo que resulta un mecanismo central para la activación de las variantes de P2X7. En el sistema nervioso NFκB está implicado en la regulación de distintos aspectos de la función neural como neurotransmisores y neurotrofinas y en la glía media una gran cantidad de respuestas inflamatorias (267). El gen *CHUK* codifica para la proteína IKKα, una de las quinasas del complejo IKK, el cual fosforila a IκB activando la vía de NFκB frente a distintos estímulos. De esta manera, resulta probable que *CHUK* tenga un rol importante en los mecanismos mencionados a nivel del SNC frente a situaciones de injuria o estrés celular. Además, IKKα tiene efectos directos en el SNC independientemente de la vía de NFκB, por ejemplo, modulando el crecimiento axonal y el remodelado neuronal en respuesta a estrés crónico (272). El hallazgo de que *CHUK* se encuentra diferencialmente expresado en los clones expresores de las distintas variantes de P2X7 es muy interesante. Los resultados del microarray fueron confirmados sobre los mismos clones empleados y luego se caracterizó su regulación por P2X7 en clones HEK293 y en clones 1321N1. Se observó que la activación de P2X7 solamente produce aumentos significativos en la expresión de *CHUK* en clones expresores de P2X7-WT, pero no en clones coexpresores de ambas variantes. Este hallazgo permite plantear la hipótesis según la cual frente a la activación de receptores P2X7 en el SNC, las células responderán de manera distinta de acuerdo a las variantes de P2X7 que expresen, resultando en distintos niveles de expresión de CHUK, lo cual posiblemente tenga consecuencias a nivel de la vía de señalización de NFκB o de los efectos mediados directamente por IKKα. De este modo, frente a un mismo estímulo se producirá una respuesta distinta que, dados los mecanismos descriptos de inflamación y función neuronal en los que IKKα está involucrado, podrá tener un impacto significativo sobre la aparición de trastornos psiquiátricos. Además se midieron los niveles de expresión de CHUK en cerebro de los ratones humanizados para las distintas variantes de P2X7. CHUK resultó tener una expresión disminuida en los ratones que expresan ambas variantes de P2X7 humano en comparación a los ratones que solamente expresan P2X7-WT o bien solamente P2X7-Gln460Arg. Este hecho está en concordancia con los resultados obtenidos en líneas celulares y apoya la hipótesis de que CHUK puede tener un rol a nivel de SNC sobre las consecuencias fisiopatológicas de la coexpresión de ambas variantes de P2X7. Un paso importante en esta nueva línea de investigación sería en primer lugar, confirmar la regulación de la expresión de CHUK por

P2X7 a nivel de proteína, es decir evaluando a IKKα y en segundo lugar, estudiar si la vía de NFκB o los efectos directos de IKKα están alterados en las células coexpresoras de ambas variantes de P2X7.

RCAN1 está involucrado en la vía de señalización del factor de transcripción inflamatorio NFAT, cuya actividad transcripcional es regulada por P2X7 (244). RCAN1 se expresa en distintas áreas cerebrales, mayoritariamente en astrocitos y media distintos procesos como la respuesta al estrés oxidativo y la respuesta inmune e inflamatoria. En el contraste entre clones expresores de P2X7-WT y clones coexpresores de ambas variantes se encontró que la vía de señalización de NFAT se encuentra alterada y RCAN1 es uno de los genes diferencialmente expresados. Los resultados del microarray fueron confirmados sobre los mismos clones empleados, y luego se caracterizó su regulación por P2X7 en clones HEK293 y en clones 1321N1. Se observó que la activación de P2X7 solamente produce aumentos significativos en la expresión de *RCAN1* en clones coexpresores de P2X7-WT/Gln460Arg pero no en clones expresores de P2X7-WT. De manera análoga a lo dicho en el caso de CHUK, este hallazgo permite plantear la hipótesis según la cual frente a la activación de receptores P2X7, las células responderán de manera distinta de acuerdo a las variantes de P2X7 que expresen, generando niveles distintos de RCAN1, lo que podría influir sobre la regulación de NFAT. De esta manera, frente a un mismo estímulo se produciría una respuesta distinta que podría tener un impacto significativo sobre la aparición de trastornos psiquiátricos, de acuerdo a los mecanismos descriptos de inflamación y función neuronal en los que RCAN1 y NFAT están involucrados. Se midió además la expresión de RCAN1 en los cerebros de ratones humanizados para las distintas variantes de P2X7. RCAN1 resultó tener una expresión aumentada en los ratones que expresan ambas variantes de P2X7 humano en comparación a los ratones que solamente expresan P2X7-WT o bien P2X7-Gln460Arg. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos en líneas celulares y apoya la hipótesis según la cual RCAN1 puede tener un rol a nivel de SNC sobre las consecuencias fisiopatológicas de la coexpresión de ambas variantes de P2X7. El hallazgo de que la expresión de RCAN1 esté aumentada en células y ratones coexpresores de ambas variantes de P2X7 resulta muy interesante. En ratones *knock out* para RCAN1 se observó que está favorecida la activación del factor de transcripción CREB y el consiguiente aumento en la expresión de BDNF, una neurotrofina protectora frente a trastornos psiquiátricos (42). A nivel comportamental, estos ratones demostraron menores niveles de ansiedad, mientras que la sobreexpresión de RCAN1 anuló estos efectos protectores (262). Además, la sobreexpresión

de RCAN1 ha sido descripta como favorecedora de neurodegeneración y mala función sináptica (261). De esta manera, se identifica a RCAN1 como un inhibidor de los efectos protectores frente a situaciones de ansiedad y estrés, así como también favorecedor de mecanismos patológicos que podrían potenciar los trastornos psiquiátricos. Un paso importante en el estudio de la relación entre RCAN1 y las variantes de P2X7 sería en primer lugar confirmar la regulación de la expresión de RCAN1 por P2X7 a nivel de proteína y luego estudiar si los mecanismos descriptos relacionados con depresión están alterados en las células coexpresoras de ambas variantes de P2X7.

Otro de los genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg es *GABRE*. Este gen codifica para la subunidad épsilon del receptor de GABA de tipo A. Estos receptores son canales de cloro heteropentaméricos activados por GABA. Hasta el momento se han descripto 19 subunidades. Los mecanismos de inhibición rápida en el SNC están gobernados por los receptores de GABA de tipo A, los cuales contrarrestan de esta manera las acciones excitatorias del glutamato. Estos receptores se expresan de manera ubicua en el SNC, de modo que los cambios en su expresión o función están involucrados en muchos aspectos de la función cerebral (415). Los déficits en la transmisión GABAérgica mediada por los receptores de tipo A han sido asociados con variados trastornos del SNC, incluyendo trastornos de ansiedad (416) y desórdenes del comportamiento (417, 418). El rol de los receptores de GABA de tipo A en depresión ha suscitado mucho interés debido a los variados compuestos con efectos antidepresivos que impactan sobre la transmisión GABAérgica como los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, gabapentinas y neuroesteroides (419). Se ha visto además que los niveles de GABA se encuentran alterados en pacientes con depresión (420). Estos hallazgos apuntan a que los receptores de GABA de tipo A pueden estar involucrados en la fisiopatología de la depresión. Dado que el gen *GABRE* codifica para una de las subunidades del receptor de GABA y que el receptor está conformado por cinco subunidades, resulta difícil aventurar cuáles serían las consecuencias a nivel funcional de la alteración de los niveles de expresión solamente en GABRE, como muestran los resultados del microarray. De cualquier manera este hallazgo resulta interesante, dada la relación establecida entre la transmisión GABAérgica y los trastornos depresivos.

Por último, otro gen que resultó diferencialmente expresado entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg fue *NRG1*. NRG1 es un factor trófico de crecimiento que cumple sus efectos estimulando al receptor de tipo tirosina quinasa ErbB. Existen varias

isoformas de NRG1, que se expresan en distintos niveles y con patrones de expresión variados en el cerebro (421). Se ha visto que NRG1 cumple un rol determinante en el desarrollo del SNC dado que contribuye en el guiado de axones, el desarrollo de células gliales y la formación de sinapsis (422). Se ha identificado repetidamente a NRG1 como un gen de susceptibilidad para esquizofrenia, pero en el último tiempo se ha reportado también su asociación con BPD (423-425). Dado el importante rol que NRG1 tiene en el SNC y su asociación con trastornos psiquiátricos es interesante observar que su expresión se vea modulada diferencialmente por la activación de las distintas variantes de P2X7. Se debería estudiar a continuación cuáles son las consecuencias funcionales de los distintos niveles de expresión de NRG1.

11. Conclusiones finales

El presente trabajo muestra por primera vez evidencia directa de que la coexpresión e interacción de P2X7 WT con la variante P2X7-WT/Gln460Arg produce una reducción significativa en la función normal del receptor, que parece tener su origen en la interacción entre ambos tipos de subunidades. La heteromerización de las variantes de P2X7 produce cambios en la transcripción génica, que podrían estar relacionados con la aparición de trastornos psiquiátricos. A su vez, se describe por primera vez a PARP1 relacionado con la vía de transducción de señales de P2X7. Así PARP1 podría ser un mediador de los mecanismos moleculares desencadenados por P2X7 en el SNC.

Como conclusión general de este trabajo, se encontró un mecanismo mediante el cual la variante polimórfica de P2X7 Gln460Arg produce un cambio en la funcionalidad del receptor cuando se expresa en heterocigosis. Dada la asociación descripta entre esta mutación y depresión, este trabajo es el puntapié inicial para seguir profundizando los estudios de este mecanismo. Esta es la primera vez que se describe un fenotipo distinto al WT para esta variante de P2X7, lo que lo coloca en la posición de importante blanco terapéutico para desórdenes del sistema nervioso central como la depresión.

ANEXO 1

1. Validación *in vivo* de la pérdida de función de los receptores P2X7 heteroméricos

1.1. Generación de ratones humanizados para el receptor P2X7 humano

Se generaron dos líneas murinas en las cuales el receptor P2X7 de ratón fue sustituido por el receptor P2X7-WT humano o por la variante polimórfica Gln460Arg. Esta estrategia de *knock in* asegura que la expresión de las variantes humanas de P2X7 sean controladas por los elementos regulatorios endógenos del gen P2X7 murino. De esta manera, la expresión temporal y espacial de las variantes humanas de P2X7 en ambas líneas humanizadas de ratón (línea homocigota para P2X7-WT y línea homocigota para P2X7-Gln460Arg) no muestra diferencias con la expresión de P2X7 murino endógeno, como se puede ver por hibridación *in situ* (**Figura 1A**). Además, ambas líneas murinas expresan receptores P2X7 funcionales. Esto se evidencia por la capacidad de sus macrófagos peritoneales de liberar Interleuquina-1β luego de ser estimulados con LPS y BzATP (**Figura 1B**).

Se efectuaron cruzas con estas dos líneas y se obtuvo así una línea heterocigota para P2X7 humano.

1.2. La expresión de P2X7 en heterocigosis afecta la calidad y arquitectura del sueño

Los trastornos del sueño constituyen uno de los síntomas más importantes que acompañan a los trastornos afectivos o del estado de ánimo (385). Es por esto que se monitoreó la actividad electroencefalográfica (EEG) y el comportamiento normal de vigilia-sueño en los ratones con las variantes de P2X7 humano.

Ninguno de los tres genotipos de ratones mostraron alteraciones en el comportamiento de vigilia-sueño, dado que la distribución del sueño de tipo movimiento rápido de ojos (REMS) y sueño de tipo movimiento no rápido de ojos (NREMS) fue normal (**Figura 2A** y **2B**). Sin embargo, los ratones heterocigotas mostraron un mayor número de episodios de entrada en sueño REMS durante el ciclo diurno, lo que indica una mayor tendencia a sueño de tipo REMS y ciclos de sueño más fragmentados en comparación a los ratones homocigotas para ambas variantes de P2X7 (**Figura 2C**).

Por otra parte, la actividad de onda lenta durante el sueño NREMS, (que mide la profundidad del sueño NREMS), resultó constantemente menor en los ratones heterocigotas (**Figura 2D**). De igual manera, se detectó muy poco sueño NREMS de tipo SWS_2 (sueño

profundo) en los ratones heterocigotas lo que sugiere etapas de sueño NREMS menos profundas. (**Figura 2E**). Esta observación también estuvo reflejada en los espectrogramas: los ratones heterocigotas tuvieron EEG con potencias reducidas en las actividades de baja frecuencia (**Figura 2F**).

Estos resultados indican que los ratones heterocigotas tienen la arquitectura del sueño alterada y una menor calidad de sueño en comparación con los ratones homocigotas.

1.3. P2X7 en heterocigosis modifica la respuesta al estrés crónico

La reducida calidad del sueño de los ratones heterocigotas para P2X7 podría estar reflejando un estadío en la enfermedad previo a los síntomas o una mayor vulnerabilidad de estos ratones a desarrollar síntomas relacionados con trastornos afectivos o del estado de ánimo. Por esto, se sometió a las tres líneas de ratones transgénicos a tres semanas de un protocolo de estrés por derrota social crónica (del inglés, chronic social defeat stress, CSDS). Este protocolo es un modelo establecido de depresión (386, 387).

Los ratones transgénicos para P2X7 humano mostraron cambios profundos provocados por el protocolo de CSDS, tanto fisiológicos como neuroendócrinos. Se observó disminución de la calidad del pelo (**Figura 3A**), aumento progresivo del peso corporal (**Figura 3B**), atrofia del timo (**Figura 3C**), crecimiento de la glándula adrenal (**Figura 3D**) y niveles basales elevados de corticosterona plasmática (**Figura 3E**).

Con la excepción de los niveles de corticosterona, no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos de P2X7, lo que indica que el protocolo de CSDS provocó marcados efectos similares en las tres líneas transgénicas. En particular, los niveles de corticosterona se vieron profundamente alterados por el protocolo de CSDS solamente en el caso de los ratones heterocigotas para las variantes de P2X7: dichos ratones con estrés crónico mostraron niveles muy elevados de dicha hormona (**Figura 3E**).

Luego se llevó a cabo un amplio rango de ensayos de comportamiento, con el fin de evaluar las consecuencias del protocolo de CSDS a nivel comportamental, en relación a las posibles alteraciones en los estados emocionales.

En general, los ratones con estrés crónico mostraron movilidad disminuida con respecto a los ratones que no habían sido sometidos a estrés. Sin embargo, durante los primeros 5 minutos del ensayo de movilidad los ratones heterocigotas estresados tuvieron un aumento en la movilidad y disminución en la inmovilidad, lo que sugiere que se encontraban

en un estado de mayor excitación (**Figura 4A-C**). Luego del protocolo de CSDS, los ratones heterocigotas mostraron una disminución en el tiempo de estadía en el ensayo del brazo abierto en el laberinto elevado (open arm time in elevated plus maze) significativamente mayor con respecto a los ratones homocigotas, lo que demuestra un aumento en el comportamiento relacionado con ansiedad (**Figura 4D**). Además, los ratones heterocigotas sometidos a CSDS desarrollaron déficits en el comportamiento social, como se evidencia en la disminución significativa en la preferencia por el compañero en el ensayo de sociabilidad (del inglés, sociability test) (**Figura 4E**). Hallazgo similar se produjo al evitar situaciones sociales (del inglés, social avoidance test). Luego de CSDS, los ratones heterocigotas compartieron significativamente menos tiempo con su compañero en comparación a los mismos ratones sin estresar (**Figura 4F**). Este déficit en el comportamiento social evoca varias condiciones psiquiátricas que incluyen a los trastornos afectivos o del estado de ánimo (389). Finalmente, se aplicó también el ensayo de olfato de orina de hembra (del inglés, female urine sniffing test (426)) y se encontró que solamente los ratones heterocigotas sometidos a CSDS dedicaron significativamente menos tiempo a olfatear la orina de hembra, hecho que concuerda con un comportamiento anhedónico, un síntoma característico de depresión (388, 389) (**Figura 4G**).

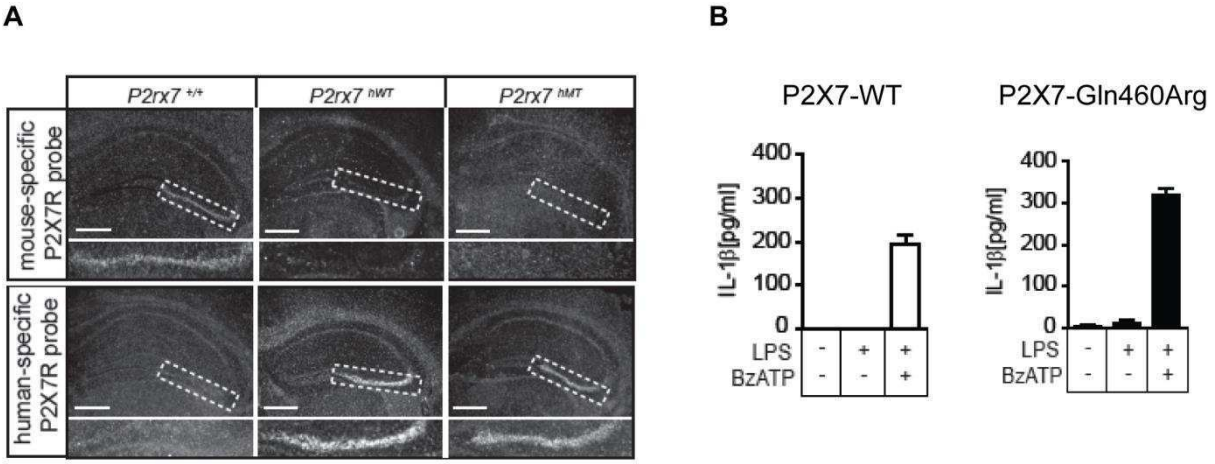


Figura 1. Establecimiento de líneas murinas expresoras de las variantes humanas del receptor P2X7. **(A)** La expresión de ARNm de P2X7 humano en los ratones transgénicos muestra el mismo patrón de expresión que el P2X7 murino, de acuerdo a la hibridación *in situ.* (Escala: 100 μm). Se muestra además una ampliación de la región CA3 del hipocampo. **(B)** Validación de la funcionalidad de los receptores P2X7-WT (izquierda) y P2X7-Gln460Arg (derecha) mediante medición de liberación de Interleuquina-1β. Se midió la secreción de Interleuquina-1β de macrófagos peritoneales de las líneas de ratón humanizadas para P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg en respuesta a estimulación con LPS y posterior tratamiento con BzATP. Los datos se expresan como media ± ES (n = 4).

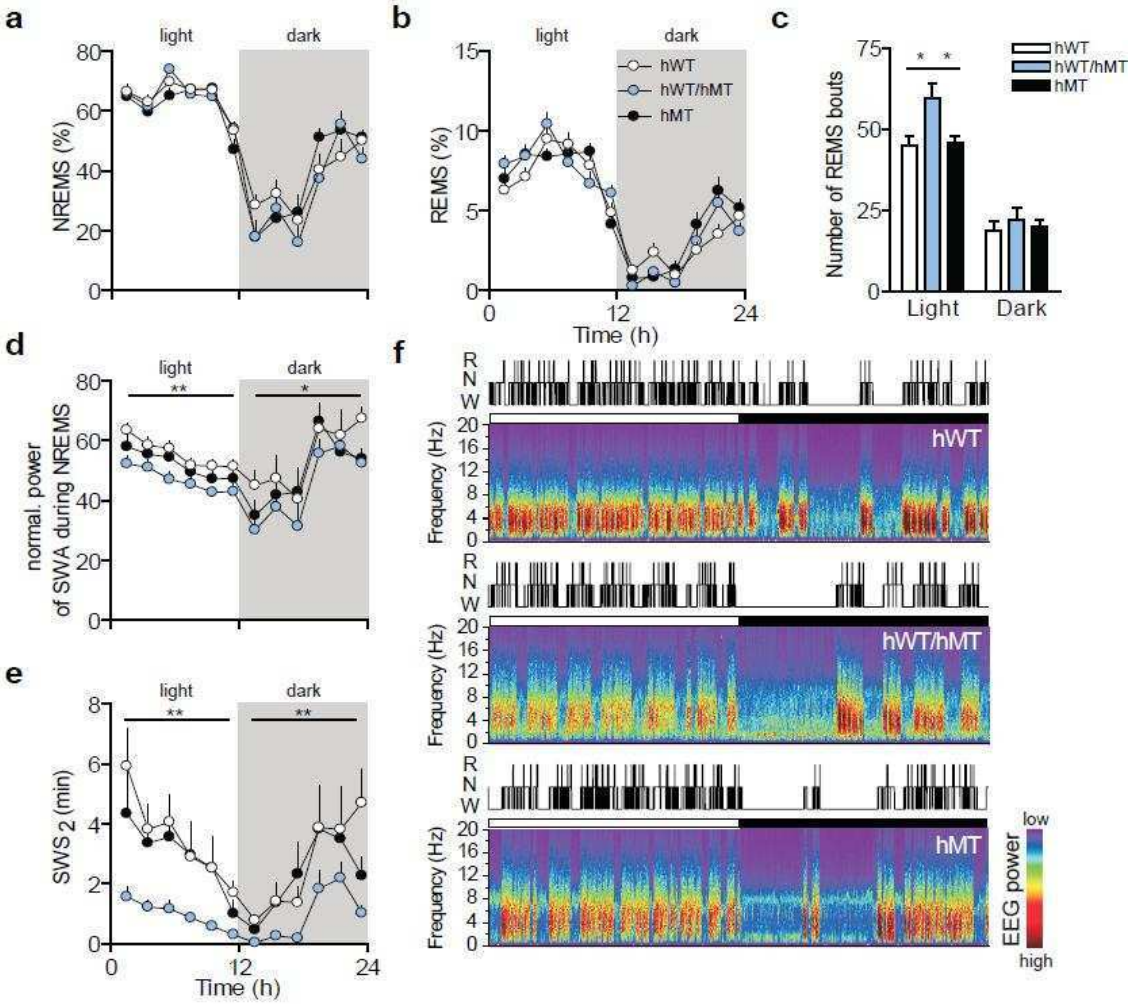


Figura 2. Calidad y arquitectura del sueño en ratones transgénicos para las variantes de P2X7 humano. Para monitorear el comportamiento espontáneo de vigilia-sueño, los ratones fueron implantados de manera crónica con electrodos para electroencefalograma (EEG) y para electromiografía (EMG). Se utilizó un polisomnógrafo para realizar dichas mediciones. La línea de base fue fijada 2 semanas después de la operación de implantación de electrodos. Las mediciones de EEG y EMG se realizaron durante 24h en ratones transgénicos adultos sin sujeción. Los estados de vigilancia se definen como vigilia, movimiento no rápido de ojos (NREMS) y movimiento rápido de ojos (REMS). El tiempo transcurrido en cada estado se expresa como porcentaje cada 2h. Los datos se expresan como media ± ES. **(A)** Cuantificación de sueño de tipo (NREMS). **(B)** Cuantificación de sueño de tipo REMS. **(C)** Cuantificación de episodios de entrada en sueño de tipo REMS en los ciclos diurno y nocturno. *: P<0,05. ANOVA de dos factores. **(D)** Medición de la actividad de onda lenta durante el sueño NREMS. *: P<0,05 y **: P<0,001. ANOVA de dos factores. **(E)** Medición de sueño profundo (NREMS de tipo SW_2). **: P<0,001. ANOVA de dos factores. **(F)** Hipnogramas y espectrogramas de un animal representativo de cada grupo.

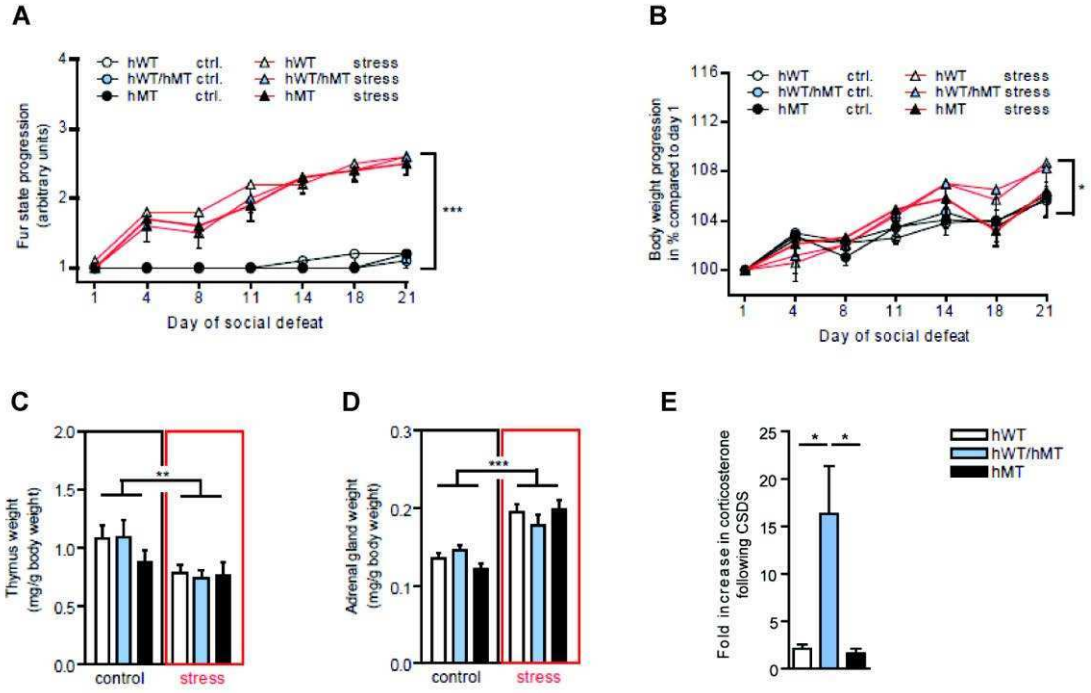


Figura 3. Protocolo de estrés por derrota social crónica (CSDS). Para someter a los ratones a CSDS se los introdujo en la jaula de un ratón dominante, que los dominó rápidamente. Luego de la derrota, se separó a los animales por un fino enrejado en la caja, lo que permitió el contacto sensorial entre ambos animales durante 24h. Este protocolo se repitió cada día frente a un ratón dominante distinto durante 3 semanas. Los ratones control se mantuvieron en sus jaulas sin contacto con ratones dominantes. Todos los ratones fueron manipulados, pesados y la calidad de su pelo evaluada cada 4 días. **(A)** Evaluación de la calidad del pelo a lo largo del protocolo de CSDS. "Fur state progression": Escala arbitraria de calidad del pelo donde el valor 1 representa pelo limpio e inalterado, y el valor 4 corresponde a pelo desordenado, sucio y con lastimaduras y llagas. ***: P<0,0005. ANOVA de medidas repetidas. n=10-13. **(B)** Evaluación del peso corporal a lo largo del protocolo de CSDS, expresado en porcentaje respecto del peso inicial. *: P<0,05. ANOVA de medidas repetidas. n=10-13. **(C)** Evaluación del peso del timo luego del protocolo de CSDS. Los valores se normalizaron al peso corporal de cada ratón.**: P<0,005. ANOVA de dos factores. n=10-13. **(D)** Evaluación del peso de la glándula adrenal luego del protocolo de CSDS. Los valores se normalizaron al peso corporal de cada ratón.***: P<0,0005. ANOVA de dos factores. n=10-13. **(E)** Medición de secreción basal de corticosterona al término del protocolo de CSDS. Los valores se expresan en relación a los niveles de secreción previos al protocolo de CSDS, los cuales resultaron idénticos entre las distintas líneas transgénicas. *: P<0,05. ANOVA de dos factores. N=10-13.

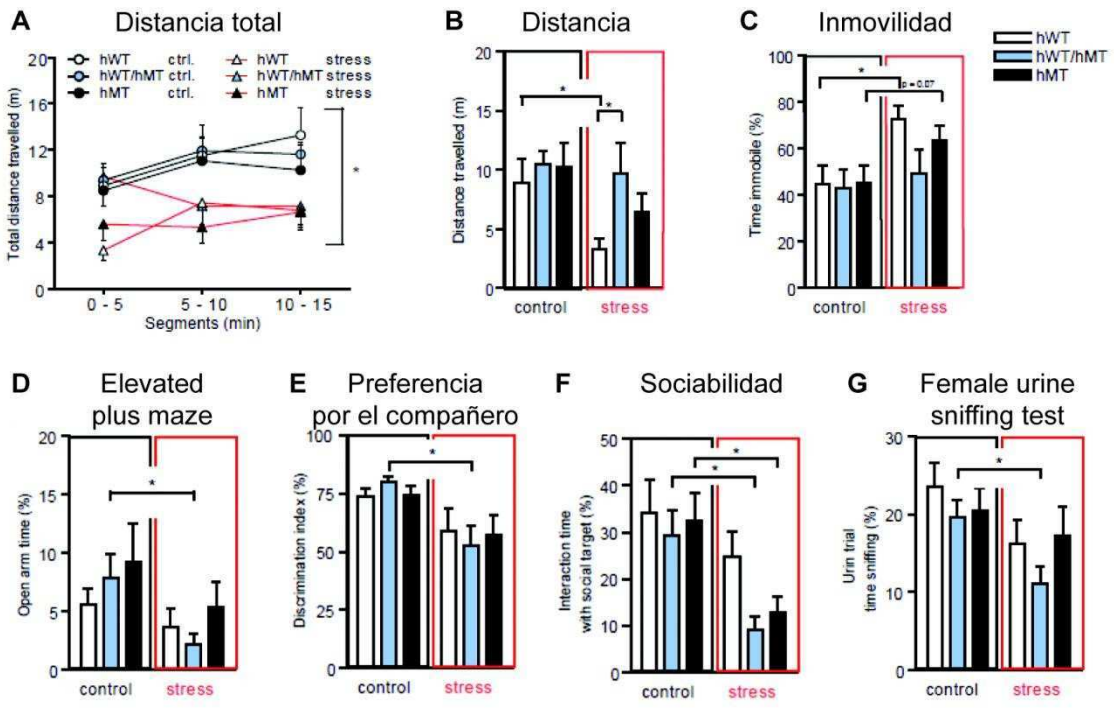


Figura 4. Consecuencias del estrés crónico a nivel comportamental en los ratones transgénicos para las variantes de P2X7 humano. Se realizaron distintos ensayos comportamentales en animales control y previamente sometidos al protocolo de CSDS. **(A-C)** Ensayo de movilidad en campo abierto (Open field test). **(A)** Distancia total recorrida a lo largo de la duración del test. **(B)** Distancia recorrida durante los primeros 5 minutos de duración del test. **(C)** Tiempo de inmovilidad durante los primeros 5 minutos de duración del test. **(D)** Ensayo de ansiedad en el laberinto elevado (Elevated plus maze). Se midió el porcentaje de tiempo de duración del test en el que los ratones se ubicaban en el brazo abierto del laberinto. **(E)** Ensayo de preferencia por el compañero. Se midió el porcentaje de tiempo ocupado por el ratón en interactuar con un compañero en lugar de explorar un objeto. **(F)** Ensayo de sociabilidad (Social avoidance test). Se midió el tiempo durante el cual cada ratón interactuaba con un compañero. **(G)** Ensayo de olfato de orina de hembra (female urine sniffing test). Se midió el porcentaje de tiempo que el ratón dedicó a olfatear un algodón embebido en orina de hembra en celo. *: P<0,05. ANOVA de dos factores. N=10-13.

ANEXO 2

Orden	FC	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)
1	-53,96	8,52E-26	MYOM2	myomesin (M-protein) 2, 165kDa (MYOM2)
2	-15,84	1,65E-24	OCIAD2	OCIA domain containing 2 (OCIAD2),
3	-25,93	6,30E-24	PTGR1	prostaglandin reductase 1 (PTGR1)
4	-23,15	6,30E-24	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)
5	-17,88	1,38E-23	FAM162B	family with sequence similarity 162, member B (FAM162B)
6	-16,85	2,45E-23	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 (ALDH1A2),
7	-23,53	2,45E-23	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family (RAB32)
8	-15,57	3,37E-23	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial (DECR1),
9	-29,69	3,75E-23	ECHDC2	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2 (ECHDC2)
10	-29,51	9,05E-23	COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus) (COCH)
11	-29,97	2,95E-22	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa (NEFL)
12	-10,47	5,71E-22	TRO	trophinin (TRO),
13	-8,24	8,52E-22	ANKRD19	ankyrin repeat domain 19 (ANKRD19)
14	-18,76	8,52E-22	PTGR1	prostaglandin reductase 1 (PTGR1)
15	-19,48	1,56E-21	SLC25A43	solute carrier family 25, member 43 (SLC25A43)
16	-10,94	3,76E-21	MAOA	monoamine oxidase A (MAOA),
17	-10,21	3,88E-21	OCIAD2	OCIA domain containing 2 (OCIAD2),
18	34,56	5,93E-21	TNC	tenascin C (TNC)
19	-8,63	7,82E-21	MAGEB2	melanoma antigen family B, 2 (MAGEB2)
20	-11,13	2,46E-20	TRO	trophinin (TRO),
21	-9,76	2,58E-20	EPDR1	ependymin related protein 1 (zebrafish) (EPDR1)
22	-9,35	3,24E-20	HDHD1A	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A (HDHD1A)
23	-11,70	4,62E-20	DDX12	PREDICTED: DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12
24	15,10	7,92E-20	TNC	tenascin C (hexabrachion) (TNC)
25	-6,60	9,47E-20	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome) (MID1),
26	-7,62	1,39E-19	DYNLT3	dynein, light chain, Tctex-type 3 (DYNLT3)
27	-6,87	3,18E-19	MSN	moesin (MSN)
28	12,39	5,02E-19	ZNF711	zinc finger protein 711 (ZNF711)
29	-10,32	6,37E-19	CDO1	cysteine dioxygenase, type I (CDO1)
30	-9,89	6,95E-19	GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating) (GLDC)
31	-6,13	1,06E-18	CRYGD	crystallin, gamma D (CRYGD)
32	-5,32	1,57E-18	SYT11	synaptotagmin XI (SYT11)
33	-5,82	2,01E-18	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
34	-6,30	2,01E-18	PHF11	PHD finger protein 11 (PHF11),
35	-5,05	2,51E-18	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 (ALDH1A2),
36	-5,83	4,27E-18	COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus) (COCH)
37	-6,14	8,87E-18	TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1)
38	-5,98	1,04E-17	ACOT1	acyl-CoA thioesterase 1 (ACOT1)
39	-4,70	1,30E-17	INA	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha (INA)
40	-10,84	1,63E-17	IRS2	insulin receptor substrate 2 (IRS2)
41	-5,46	3,14E-17	PRTFDC1	phosphoribosyl transferase domain containing 1 (PRTFDC1)
42	-4,56	3,57E-17	FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma (FUCA2)
43	-5,33	6,06E-17	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13 (MAPK13)
44	-5,38	1,04E-16	F12	coagulation factor XII (Hageman factor) (F12)
45	4,95	1,09E-16	MESP1	mesoderm posterior 1 homolog (mouse) (MESP1)
46	-7,51	1,09E-16	TAF7L	TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
47	-3,79	1,15E-16	FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific) (FUT4)
48	-6,48	1,69E-16	TPD52L1	tumor protein D52-like 1 (TPD52L1),
49	-5,18	2,25E-16	TPD52L1	tumor protein D52-like 1 (TPD52L1),
50	9,99	2,49E-16	DPYSL4	dihydropyrimidinase-like 4 (DPYSL4)

51	-5,92	2,50E-16	EMILIN2	elastin microfibril interfacer 2 (EMILIN2)
52	-3,94	2,69E-16	ATL3	atlastin GTPase 3 (ATL3)
53	18,09	2,77E-16	SH3BGR	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein (SH3BGR),
54	-3,41	2,93E-16	CLN5	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5 (CLN5)
55	-4,73	3,96E-16	LAMC3	laminin, gamma 3 (LAMC3)
56	-6,08	4,53E-16	MAP7D2	MAP7 domain containing 2 (MAP7D2)
57	-3,94	5,32E-16	UCHL3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase) (UCHL3)
58	-4,35	9,00E-16	KLHDC9	kelch domain containing 9 (KLHDC9),
59	-3,51	1,34E-15	PLIN2	perilipin 2 (PLIN2)
60	5,83	1,54E-15	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 (ADAMTS1)
61	12,73	2,10E-15	ADAMTS5	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5
62	-4,70	2,44E-15	MT1F	metallothionein 1F (MT1F)
63	-4,29	2,47E-15	PHF11	PHD finger protein 11 (PHF11),
64	4,44	2,80E-15	TMEM47	transmembrane protein 47 (TMEM47)
65	-2,92	2,80E-15	PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (PARP12)
66	3,57	3,39E-15	FBXL16	F-box and leucine-rich repeat protein 16 (FBXL16)
67	-3,84	3,70E-15	CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1 (CSRP1)
68	-4,73	4,61E-15	RASEF	RAS and EF-hand domain containing (RASEF)
69	23,95	4,70E-15	SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11 (SOX11)
70	-8,56	5,09E-15	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5 (FXYD5),
71	-3,99	6,21E-15	TNS3	tensin 3 (TNS3)
72	-3,93	7,02E-15	FLNC	filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC)
73	-4,12	7,73E-15	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein (SPON1)
74	-11,38	1,05E-14	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5 (FXYD5),
75	-3,00	1,30E-14	PIBF1	progesterone immunomodulatory binding factor 1 (PIBF1)
76	14,04	1,93E-14	AMOT	angiomotin (AMOT),
77	5,29	2,02E-14	KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2 (KCNQ2),
78	-3,42	2,32E-14	SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1 (SERPINB1)
79	-3,85	2,93E-14	ZNF532	zinc finger protein 532 (ZNF532)
80	-4,05	3,50E-14	DSCR6	Down syndrome critical region gene 6 (DSCR6)
81	-3,25	4,04E-14	CCDC3	coiled-coil domain containing 3 (CCDC3)
82	10,05	4,49E-14	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17 (SOX17)
83	-3,25	4,49E-14	LOC644743	PREDICTED: hypothetical LOC644743 (LOC644743)
84	-3,48	4,68E-14	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL),
85	-3,01	5,40E-14	POU4F1	POU class 4 homeobox 1 (POU4F1)
86	-3,71	5,95E-14	MAGEB6B	PREDICTED: melanoma antigen family B, 6B pseudogene (MAGEB6B)
87	-3,26	6,72E-14	PAPLN	papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein (PAPLN)
88	-2,71	8,08E-14	SERP2	stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2 (SERP2)
89	-3,65	1,17E-13	OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 (OXCT1),
90	-3,88	1,22E-13	ICA1	islet cell autoantigen 1, 69kDa (ICA1),
91	-3,48	1,39E-13	ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2 (ACOT2),
92	-3,22	1,86E-13	HSPB8	heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8)
93	-2,89	1,93E-13	CNNM1	cyclin M1 (CNNM1)
94	-3,29	2,05E-13	LOC440145	similar to RIKEN cDNA 2410129H14 (LOC440145)
95	-4,80	2,48E-13	KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
96	4,10	3,42E-13	SLC30A3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3 (SLC30A3)
97	-3,20	3,42E-13	LOXL4	lysyl oxidase-like 4 (LOXL4)
98	-3,06	3,45E-13	TBC1D4	TBC1 domain family, member 4 (TBC1D4)
99	-2,77	5,36E-13	NAAA	N-acylethanolamine acid amidase (NAAA),
100	3,48	6,29E-13	RIPK4	receptor-interacting serine-threonine kinase 4 (RIPK4)
101	-3,56	6,73E-13	LEPR	leptin receptor (LEPR),
102	-2,96	7,19E-13	NDFIP2	Nedd4 family interacting protein 2 (NDFIP2)
103	-3,09	7,70E-13	MYCBP2	MYC binding protein 2 (MYCBP2)

104	-3,61	7,70E-13	MFAP2	microfibrillar-associated protein 2 (MFAP2),
105	2,73	9,77E-13	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2)
106	2,68	1,13E-12	DBN1	drebrin 1 (DBN1),
107	-2,77	1,22E-12	NAAA	N-acylethanolamine acid amidase (NAAA),
108	-2,90	1,28E-12	Sep-07	septin 7 (SEPT7),
109	-2,76	1,31E-12	SLC35D2	solute carrier family 35, member D2 (SLC35D2)
110	2,92	1,34E-12	DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR)
111	-2,76	1,39E-12	ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3),
112	-4,25	1,56E-12	ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltranferase 1 (ST6GAL1),
113	-3,58	1,57E-12	CDO1	cysteine dioxygenase, type I (CDO1)
114	3,91	1,62E-12	TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha
115	3,25	1,94E-12	GLA	galactosidase, alpha (GLA)
116	-2,51	2,00E-12	DKFZP686O24166	hypothetical protein DKFZp686O24166 (DKFZp686O24166)
117	-2,25	2,52E-12	CSDC2	cold shock domain containing C2, RNA binding (CSDC2)
118	-2,30	2,54E-12	OVOL2	ovo-like 2 (Drosophila) (OVOL2)
119	-3,07	2,58E-12	TSPAN7	tetraspanin 7 (TSPAN7)
120	-2,79	2,86E-12	HRASLS3	HRAS-like suppressor 3 (HRASLS3)
121	3,15	3,97E-12	CCND1	cyclin D1 (CCND1)
122	5,55	4,48E-12	PCDH19	protocadherin 19 (PCDH19)
123	2,50	5,71E-12	PITX1	paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1)
124	-2,31	6,22E-12	SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2),
125	-2,48	7,22E-12	MOSPD2	motile sperm domain containing 2 (MOSPD2)
126	3,61	8,34E-12	RAC3	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3
127	-2,81	8,58E-12	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)
128	-2,64	8,60E-12	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit (POLA1)
129	-6,00	8,60E-12	DMKN	dermokine (DMKN),
130	-2,39	9,09E-12	DIS3	DIS3 mitotic control homolog (S, cerevisiae) (DIS3)
131	2,82	9,20E-12	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1 (AGTPBP1)
132	3,01	9,34E-12	DPP7	dipeptidyl-peptidase 7 (DPP7)
133	-5,03	9,37E-12	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2)
134	-2,74	9,52E-12	TMEM126B	transmembrane protein 126B (TMEM126B)
135	-2,67	1,07E-11	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome) (MID1),
136	-2,39	1,10E-11	PPIL3	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3 (PPIL3), tv PPIL3b
137	-3,31	1,17E-11	KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3 (KDELR3),
138	2,55	1,36E-11	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP3), tv alpha
139	-2,95	1,39E-11	IGDCC3	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3 (IGDCC3)
140	-2,79	1,39E-11	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)
141	-3,39	1,45E-11	SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 (SLC27A2)
142	-2,21	1,50E-11	ARGLU1	arginine and glutamate rich 1 (ARGLU1)
143	4,14	1,53E-11	BMP2	bone morphogenetic protein 2 (BMP2)
144	2,82	1,53E-11	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast) (CDH11)
145	-7,62	1,63E-11	DMKN	dermokine (DMKN),
146	-3,00	2,06E-11	CLYBL	citrate lyase beta like (CLYBL)
147	-5,11	2,07E-11	DMKN	dermokine (DMKN),
148	-2,41	2,20E-11	B3GALNT1	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group) (B3GALNT1),
149	15,82	2,25E-11	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15) (ZNF22)
150	2,98	2,26E-11	NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor) (NFIX)
151	-2,88	2,50E-11	NSBP1	nucleosomal binding protein 1 (NSBP1)
152	-2,04	2,75E-11	CLCNKA	chloride channel Ka (CLCNKA),
153	-2,68	2,79E-11	PGCP	plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP)
154	-2,33	2,83E-11	TICAM1	toll-like receptor adaptor molecule 1 (TICAM1),
155	2,64	3,01E-11	PCDH10	protocadherin 10 (PCDH10),
156	-2,36	3,09E-11	LXN	latexin (LXN)

157	-2,72	3,50E-11	OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
158	-2,38	3,53E-11	TMEM126B	transmembrane protein 126B (TMEM126B)
159	2,16	3,72E-11	GPX4	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase) (GPX4),
160	-2,16	3,91E-11	ANGPTL2	angiopoietin-like 2 (ANGPTL2)
161	-3,26	4,55E-11	HOOK1	hook homolog 1 (Drosophila) (HOOK1)
162	2,68	4,90E-11	RRAGD	Ras-related GTP binding D (RRAGD)
163	-2,66	4,97E-11	GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa) (GAD1), tv GAD25
164	-2,45	5,48E-11	LCN15	lipocalin 15 (LCN15)
165	-2,09	6,16E-11	FLJ14712	PREDICTED: hypothetical protein FLJ14712 (FLJ14712)
166	-2,40	6,86E-11	SESN1	sestrin 1 (SESN1)
167	-2,01	7,01E-11	PJA1	praja ring finger 1 (PJA1),
168	3,08	7,06E-11	LARP6	La ribonucleoprotein domain family, member 6 (LARP6),
169	-2,47	7,07E-11	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1),
170	-2,33	7,26E-11	FANCB	Fanconi anemia, complementation group B (FANCB),
171	-2,14	7,58E-11	FBXO6	F-box protein 6 (FBXO6)
172	-2,44	7,58E-11	C14ORF169	chromosome 14 open reading frame 169 (C14orf169)
173	2,62	7,58E-11	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)
174	3,38	8,35E-11	BCL6B	B-cell CLL/lymphoma 6, member B (zinc finger protein) (BCL6B)
175	-2,48	8,97E-11	CLYBL	citrate lyase beta like (CLYBL)
176	-2,32	8,97E-11	HES5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila) (HES5)
177	-2,25	9,31E-11	LAMA3	laminin, alpha 3 (LAMA3),
178	-2,43	9,59E-11	CNFN	cornifelin (CNFN)
179	-2,20	9,59E-11	SETDB2	SET domain, bifurcated 2 (SETDB2)
180	2,78	9,84E-11	NELL2	NEL-like 2 (chicken) (NELL2)
181	-2,09	1,04E-10	MANSC1	MANSC domain containing 1 (MANSC1)
182	-2,39	1,06E-10	SCARA5	scavenger receptor class A, member 5 (putative) (SCARA5)
183	-2,91	1,11E-10	SLAIN1	SLAIN motif family, member 1 (SLAIN1),
184	-2,55	1,13E-10	PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB),
185	-3,13	1,13E-10	FLJ40504	hypothetical protein FLJ40504 (FLJ40504)
186	-2,23	1,13E-10	CTPS2	CTP synthase II (CTPS2),
187	-2,18	1,17E-10	FHOD1	formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1)
188	-2,73	1,17E-10	PHYHD1	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1 (PHYHD1)
189	-2,50	1,27E-10	FBXO4	F-box protein 4 (FBXO4),
190	-2,13	1,28E-10	AK2	adenylate kinase 2 (AK2), tv AK2B
191	2,08	1,31E-10	TIMM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast) (TIMM23)
192	2,58	1,41E-10	MID2	midline 2 (MID2),
193	-2,24	1,47E-10	UBE4B	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast) (UBE4B)
194	-2,18	1,53E-10	MED12	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog (yeast) (MED12)
195	2,94	1,57E-10	DRD1IP	dopamine receptor D1 interacting protein (DRD1IP)
196	2,17	1,66E-10	C15ORF59	chromosome 15 open reading frame 59 (C15orf59)
197	2,27	1,66E-10	TP53I13	tumor protein p53 inducible protein 13 (TP53I13)
198	2,22	1,66E-10	SCARA3	scavenger receptor class A, member 3 (SCARA3),
199	-3,06	1,67E-10	LOC440585	PREDICTED: hypothetical LOC440585, (LOC440585)
200	-2,56	1,69E-10	HEYL	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like (HEYL)
201	-2,16	1,69E-10	OSBPL7	oxysterol binding protein-like 7 (OSBPL7),
202	17,93	1,72E-10	C8ORF4	chromosome 8 open reading frame 4 (C8orf4)
203	-2,35	1,74E-10	KRT18	keratin 18 (KRT18),
204	-1,92	1,78E-10	RPUSD4	RNA pseudouridylate synthase domain containing 4 (RPUSD4)
205	-4,70	1,93E-10	LOC646723	PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin-18)
206	-2,45	1,93E-10	FANCB	Fanconi anemia, complementation group B (FANCB),
207	2,20	1,96E-10	CTXN1	cortexin 1 (CTXN1)
208	2,21	2,00E-10	TMSB10	thymosin beta 10 (TMSB10)
209	-2,35	2,06E-10	FAAH2	fatty acid amide hydrolase 2 (FAAH2)

210	2,53	2,08E-10	DMRTA2	DMRT-like family A2 (DMRTA2)
211	-2,33	2,10E-10	RNF219	ring finger protein 219 (RNF219)
212	-2,33	2,11E-10	SMPDL3B	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B (SMPDL3B),
213	-2,46	2,15E-10	PRRX2	paired related homeobox 2 (PRRX2)
214	2,61	2,15E-10	FGF13	fibroblast growth factor 13 (FGF13), A
215	-2,65	2,15E-10	ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A) (ENPEP)
216	2,12	2,19E-10	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1),
217	5,32	2,19E-10	SOX18	SRY (sex determining region Y)-box 18 (SOX18)
218	-2,74	2,36E-10	HSPA4L	heat shock 70kDa protein 4-like (HSPA4L)
219	-2,17	2,40E-10	HSD17B11	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11 (HSD17B11)
220	-1,99	2,50E-10	SPIN3	spindlin family, member 3 (SPIN3)
221	3,17	2,56E-10	PDK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3 (PDK3)
222	3,63	2,59E-10	PPP2R2C	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma isoform (PPP2R2C),
223	2,57	2,87E-10	SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1 (SLC25A1)
224	-2,11	2,91E-10	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1)
225	2,90	2,98E-10	TBX1	T-box 1 (TBX1), tv C
226	2,25	3,15E-10	RXRA	retinoid X receptor, alpha (RXRA)
227	2,16	3,22E-10	KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3 (KHDRBS3)
228	-2,64	3,40E-10	LAMA1	laminin, alpha 1 (LAMA1)
229	-3,05	3,68E-10	GAMT	guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT),
230	-1,87	3,92E-10	FAM73B	family with sequence similarity 73, member B (FAM73B)
231	-2,23	4,00E-10	ABHD1	abhydrolase domain containing 1 (ABHD1)
232	-2,05	4,36E-10	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family (RAB31)
233	2,77	4,69E-10	DLL1	delta-like 1 (Drosophila) (DLL1)
234	3,14	4,71E-10	HS,296031	cDNA clone IMAGE:5262734
235	-2,08	4,79E-10	CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4)
236	2,08	5,47E-10	LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), tv LAMP2A
237	-2,76	6,22E-10	IGDCC4	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4 (IGDCC4)
238	-2,19	6,37E-10	PITPNM1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1 (PITPNM1)
239	-2,23	6,51E-10	TMEM144	transmembrane protein 144 (TMEM144)
240	2,83	6,70E-10	FBLN1	fibulin 1 (FBLN1), tv D
241	-2,16	6,92E-10	YIPF6	Yip1 domain family, member 6 (YIPF6)
242	-2,29	7,24E-10	ZC3H12B	zinc finger CCCH-type containing 12B (ZC3H12B)
243	-2,24	7,24E-10	CTSF	cathepsin F (CTSF)
244	2,94	7,24E-10	COL3A1	collagen, type III, alpha 1 (COL3A1)
245	-2,32	7,24E-10	DARS2	aspartyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (DARS2),
246	2,03	7,24E-10	ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDIA)
247	2,23	7,42E-10	C11ORF70	chromosome 11 open reading frame 70 (C11orf70)
248	2,23	7,49E-10	MTCP1	mature T-cell proliferation 1 (MTCP1), , tv B1
249	2,15	8,17E-10	TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila) (TRIB2)
250	-1,81	8,26E-10	RNMT	RNA (guanine-7-) methyltransferase (RNMT)
251	-2,12	8,35E-10	CUL4A	cullin 4A (CUL4A),
252	-2,61	8,35E-10	ANXA3	annexin A3 (ANXA3)
253	2,13	8,60E-10	KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3 (KHDRBS3)
254	-2,77	8,89E-10	GAMT	guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT),
255	2,80	9,12E-10	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK),
256	2,85	9,13E-10	TSPO	translocator protein (18kDa) (TSPO), tv PBR-S
257	2,35	9,17E-10	TSPO	translocator protein (18kDa) (TSPO), tv PBR
258	-2,07	9,33E-10	BIVM	basic, immunoglobulin-like variable motif containing (BIVM)
259	-2,31	9,69E-10	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1 (HUWE1)
260	2,57	1,01E-09	HOXA6	homeobox A6 (HOXA6)
261	-1,98	1,06E-09	THOC1	THO complex 1 (THOC1)
262	-2,00	1,08E-09	ANAPC4	anaphase promoting complex subunit 4 (ANAPC4)

263	-2,46	1,18E-09	OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
264	-2,40	1,18E-09	DYNC2H1	dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 (DYNC2H1)
265	-2,42	1,21E-09	NUP188	nucleoporin 188kDa (NUP188)
266	1,82	1,26E-09	TIMM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast) (TIMM23)
267	-1,90	1,26E-09	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4)
268	8,43	1,37E-09	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15) (ZNF22)
269	-23,42	1,48E-09	BEX1	brain expressed, X-linked 1 (BEX1)
270	2,24	1,50E-09	GPX4	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase) (GPX4),
271	-2,16	1,57E-09	ACBD7	PREDICTED: acyl-Coenzyme A binding domain containing 7 (ACBD7)
272	-2,01	1,63E-09	FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4),
273	2,38	1,63E-09	H2AFY	H2A histone family, member Y (H2AFY),
274	-2,57	1,63E-09	TSPAN7	tetraspanin 7 (TSPAN7)
275	2,68	1,64E-09	ARHGAP22	Rho GTPase activating protein 22 (ARHGAP22)
276	-2,28	1,73E-09	NMB	neuromedin B (NMB),
277	-2,52	1,80E-09	BEX5	brain expressed, X-linked 5 (BEX5)
278	-3,79	1,82E-09	LIN28B	lin-28 homolog B (C, elegans) (LIN28B)
279	1,84	1,82E-09	GPS1	G protein pathway suppressor 1 (GPS1),
280	1,96	1,86E-09	FAM58A	family with sequence similarity 58, member A (FAM58A)
281	-1,97	1,87E-09	SRPR	signal recognition particle receptor (docking protein) (SRPR)
282	-2,23	1,88E-09	KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3 (KDELR3),
283	-1,99	1,90E-09	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide (DFFA),
284	2,21	1,98E-09	ADCK2	aarF domain containing kinase 2 (ADCK2)
285	-1,97	2,07E-09	COMMD6	COMM domain containing 6 (COMMD6),
286	-2,42	2,22E-09	MCM3APAS	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S, cerevisiae) associated protein antisense
287	-1,99	2,25E-09	BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1 (BBS1)
288	1,83	2,28E-09	CLTB	clathrin, light chain (Lcb) (CLTB),
289	-4,17	2,31E-09	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12 (KCTD12)
290	-1,87	2,35E-09	ZMYM3	zinc finger, MYM-type 3 (ZMYM3),
291	-2,05	2,39E-09	HHEX	hematopoietically expressed homeobox (HHEX)
292	2,81	2,45E-09	CDX2	caudal type homeobox 2 (CDX2)
293	2,89	2,53E-09	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein (ID3)
294	2,10	2,55E-09	TIMM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast) (TIMM23)
295	-2,00	2,62E-09	ASAP3	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3 (ASAP3)
296	-1,87	2,76E-09	UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2)
297	-2,80	2,95E-09	VAMP8	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin) (VAMP8)
298	1,96	2,96E-09	RTKN	rhotekin (RTKN),
299	-2,03	3,00E-09	PGM2	phosphoglucomutase 2 (PGM2)
300	1,99	3,09E-09	SRF	serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)
301	2,33	3,09E-09	PDZD4	PDZ domain containing 4 (PDZD4)
302	-2,04	3,20E-09	C9ORF6	chromosome 9 open reading frame 6 (C9orf6)
303	-1,96	3,23E-09	HS,555260	17000532215901 GRN_ES cDNA 5, mRNA sequence
304	-1,77	3,40E-09	C5ORF51	chromosome 5 open reading frame 51 (C5orf51)
305	-1,97	3,55E-09	ELP3	elongation protein 3 homolog (S, cerevisiae) (ELP3)
306	-2,00	3,55E-09	CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2 (CISD2)
307	2,02	3,56E-09	ITGB5	integrin, beta 5 (ITGB5) XM_944688 XM_944693
308	-1,97	3,61E-09	HDAC8	histone deacetylase 8 (HDAC8)
309	2,11	3,61E-09	NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila) (NKX2-5)
310	-2,06	3,65E-09	HS,535028	cDNA: FLJ22720 fis, clone HSI14320
311	-1,83	3,66E-09	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4)
312	-2,08	3,66E-09	SEH1L	SEH1-like (S, cerevisiae) (SEH1L),
313	-2,19	3,67E-09	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (GJA1)
314	2,02	3,87E-09	TUSC1	tumor suppressor candidate 1 (TUSC1)
315	2,02	3,96E-09	LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), tv LAMP2B

316	-2,05	3,98E-09	CPXM1	carboxypeptidase X (M14 family), member 1 (CPXM1)
317	-2,04	3,98E-09	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family (RAP2A)
318	1,92	4,01E-09	KIAA1279	KIAA1279 (KIAA1279)
319	-2,63	4,08E-09	RBP1	retinol binding protein 1, cellular (RBP1)
320	-2,58	4,09E-09	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) (CDKN2C),
321	-2,26	4,10E-09	HCP5	HLA complex P5 (HCP5)
322	2,23	4,15E-09	CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (CAMK2N1)
323	2,60	4,15E-09	ABHD8	abhydrolase domain containing 8 (ABHD8)
324	-2,02	4,18E-09	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12
325	-2,08	4,19E-09	ZNF280D	zinc finger protein 280D (ZNF280D),
326	-2,17	4,21E-09	ARMCX6	armadillo repeat containing, X-linked 6 (ARMCX6),
327	-1,69	4,22E-09	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1 (SH3KBP1),
328	-2,00	4,22E-09	ICA1	islet cell autoantigen 1, 69kDa (ICA1),
329	2,64	4,28E-09	KLHL22	kelch-like 22 (Drosophila) (KLHL22)
330	-1,82	4,34E-09	FRAG1	FGF receptor activating protein 1 (FRAG1)
331	-2,55	4,50E-09	TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3 (TP53I3),
332	-2,13	5,04E-09	FBXO22	F-box protein 22 (FBXO22),
333	-1,90	5,04E-09	EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic (EPHX2)
334	2,43	5,04E-09	CRYL1	crystallin, lambda 1 (CRYL1)
335	1,87	5,04E-09	PMP22	peripheral myelin protein 22 (PMP22),
336	-2,30	5,04E-09	C13ORF7	chromosome 13 open reading frame 7 (C13orf7)
337	2,51	5,07E-09	EYA1	eyes absent homolog 1 (Drosophila) (EYA1),
338	-2,72	5,18E-09	KBTBD11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11 (KBTBD11)
339	-2,40	5,47E-09	CA12	carbonic anhydrase XII (CA12),
340	-2,60	5,47E-09	ARHGEF5	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5 (ARHGEF5)
341	-1,81	5,60E-09	CHN2	chimerin (chimaerin) 2 (CHN2),
342	-1,84	5,75E-09	ROR2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2)
343	-1,75	5,77E-09	TFDP1	transcription factor Dp-1 (TFDP1)
344	-1,82	5,77E-09	ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7 (ABCB7)
345	-2,16	5,84E-09	SLC7A3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3
346	2,32	5,99E-09	HS,4892	clone 24841 mRNA sequence
347	-5,27	6,13E-09	BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic (BCAT1)
348	-2,50	6,26E-09	KRT8	keratin 8 (KRT8)
349	2,42	6,42E-09	HS,348844	cDNA FLJ41813 fis, clone NT2RI2011450
350	-1,88	6,42E-09	BIVM	basic, immunoglobulin-like variable motif containing (BIVM)
351	-1,94	6,64E-09	HS,558212	Human HeLa mRNA isolated as a false positive in a two-hybrid-screen
352	-1,89	6,66E-09	PAQR7	progestin and adipoQ receptor family member VII (PAQR7)
353	1,88	6,80E-09	TK1	thymidine kinase 1, soluble (TK1)
354	-2,11	6,96E-09	TMEM69	transmembrane protein 69 (TMEM69)
355	-2,28	7,15E-09	BAPX1	bagpipe homeobox homolog 1 (Drosophila) (BAPX1)
356	1,89	7,21E-09	TCEAL1	transcription elongation factor A (SII)-like 1 (TCEAL1),
357	2,39	7,25E-09	STRA13	stimulated by retinoic acid 13 homolog (mouse) (STRA13)
358	-1,77	7,80E-09	SLC35A2	solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2 (SLC35A2),
359	-1,85	8,18E-09	FBXL21	F-box and leucine-rich repeat protein 21 (FBXL21)
360	2,35	8,43E-09	FAM125B	family with sequence similarity 125, member B (FAM125B),
361	-2,08	8,96E-09	PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (PPAT)
362	-1,87	9,08E-09	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A (FNDC3A),
363	-1,95	9,31E-09	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A (FNDC3A),
364	1,67	9,72E-09	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (CTNNA1)
365	2,55	9,94E-09	WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3 (WNT3)
366	2,35	1,00E-08	LRP3	low density lipoprotein receptor-related protein 3 (LRP3)
367	2,72	1,01E-08	METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator (METRN)
368	-1,74	1,03E-08	WDR12	WD repeat domain 12 (WDR12)

369	-1,76	1,05E-08	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1 (LIMCH1)
370	1,86	1,06E-08	TSPAN17	tetraspanin 17 (TSPAN17),
371	2,02	1,09E-08	FAM131A	family with sequence similarity 131, member A (FAM131A)
372	-2,55	1,15E-08	NRIP3	nuclear receptor interacting protein 3 (NRIP3)
373	2,00	1,16E-08	SCARA3	scavenger receptor class A, member 3 (SCARA3),
374	-2,37	1,16E-08	ENOSF1	enolase superfamily member 1 (ENOSF1)
375	-2,36	1,16E-08	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma) (GPX3)
376	1,85	1,22E-08	TESK1	testis-specific kinase 1 (TESK1)
377	-2,46	1,22E-08	SPIN4	spindlin family, member 4 (SPIN4)
378	-1,74	1,22E-08	ZBTB44	zinc finger and BTB domain containing 44 (ZBTB44)
379	-1,82	1,25E-08	FRAS1	Fraser syndrome 1 (FRAS1)
380	1,88	1,25E-08	NLGN2	neuroligin 2 (NLGN2)
381	-1,93	1,27E-08	TRIM56	tripartite motif-containing 56 (TRIM56)
382	-1,98	1,28E-08	TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III (TGFBR3)
383	2,79	1,28E-08	TMEM158	transmembrane protein 158 (TMEM158)
384	-1,76	1,29E-08	KIAA1712	KIAA1712 (KIAA1712)
385	-2,18	1,29E-08	PIBF1	progesterone immunomodulatory binding factor 1 (PIBF1)
386	2,10	1,30E-08	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1 (HLA-DPA1)
387	-1,72	1,32E-08	AFG3L2	AFG3 ATPase family gene 3-like 2 (yeast) (AFG3L2),
388	2,11	1,33E-08	ANAPC11	anaphase promoting complex subunit 11 (ANAPC11),
389	2,22	1,33E-08	C10ORF58	chromosome 10 open reading frame 58 (C10orf58),
390	2,34	1,33E-08	ZNF428	zinc finger protein 428 (ZNF428)
391	2,09	1,38E-08	DPP7	dipeptidyl-peptidase 7 (DPP7)
392	-1,99	1,38E-08	PLAC8	placenta-specific 8 (PLAC8)
393	-1,84	1,39E-08	TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1)
394	2,19	1,42E-08	TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha
395	-1,91	1,44E-08	TRO	trophinin (TRO),
396	-2,06	1,46E-08	SLAIN1	SLAIN motif family, member 1 (SLAIN1),
397	2,12	1,50E-08	RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated) (RABAC1)
398	-2,27	1,51E-08	CUL4A	cullin 4A (CUL4A),
399	1,85	1,53E-08	PTK7	PTK7 protein tyrosine kinase 7 (PTK7), tv PTK7-2
400	-2,10	1,56E-08	ANKDD1A	ankyrin repeat and death domain containing 1A (ANKDD1A)
401	-2,17	1,59E-08	DLEU1	deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding) (DLEU1), non-coding RNA,
402	1,97	1,60E-08	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21)
403	-2,13	1,60E-08	LAMA4	laminin, alpha 4 (LAMA4)
404	-1,79	1,60E-08	MRPL49	mitochondrial ribosomal protein L49 (MRPL49),
405	4,18	1,61E-08	ZNF83	zinc finger protein 83 (ZNF83)
406	-1,75	1,66E-08	SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2 (SH3GLB2)
407	1,76	1,66E-08	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (CTNNA1)
408	1,82	1,66E-08	SAT2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2 (SAT2)
409	-3,29	1,66E-08	GSTO2	glutathione S-transferase omega 2 (GSTO2)
410	2,90	1,73E-08	PCDHB2	protocadherin beta 2 (PCDHB2)
411	-1,85	1,73E-08	KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10 (KBTBD10)
412	2,28	1,74E-08	RAI1	retinoic acid induced 1 (RAI1)
413	1,91	1,74E-08	ANAPC11	anaphase promoting complex subunit 11 (ANAPC11),
414	-2,31	1,79E-08	CKMT1B	creatine kinase, mitochondrial 1B (CKMT1B),
415	-1,83	1,80E-08	PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1 (PAAF1)
416	2,10	1,81E-08	PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U (PTPRU),
417	1,89	1,84E-08	RORB	RAR-related orphan receptor B (RORB)
418	-1,87	1,92E-08	SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2),
419	-1,80	1,93E-08	ACAD8	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8 (ACAD8),
420	-1,84	1,93E-08	WDR12	WD repeat domain 12 (WDR12)
421	1,92	1,96E-08	ENY2	enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila) (ENY2)

422	2,56	1,98E-08	SULF1	sulfatase 1 (SULF1)
423	-1,95	1,98E-08	AASDH	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase (AASDH)
424	2,01	2,00E-08	LPAR1	lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1),
425	-1,99	2,09E-08	SLTM	SAFB-like, transcription modulator (SLTM),
426	2,05	2,11E-08	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1),
427	1,95	2,12E-08	ITGB5	integrin, beta 5 (ITGB5) XM_944688 XM_944693
428	1,75	2,15E-08	TEAD3	TEA domain family member 3 (TEAD3)
429	-1,80	2,17E-08	THYN1	thymocyte nuclear protein 1 (THYN1),
430	1,83	2,18E-08	TRAPPC5	trafficking protein particle complex 5 (TRAPPC5),
431	-1,73	2,19E-08	COL2A1	collagen, type II, alpha 1
432	2,79	2,20E-08	FBLN1	fibulin 1 (FBLN1), tv C
433	-1,86	2,23E-08	C11ORF74	chromosome 11 open reading frame 74 (C11orf74)
434	-1,74	2,25E-08	FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue (FUCA1)
435	-2,04	2,25E-08	NR2E1	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 (NR2E1)
436	2,52	2,25E-08	LPIN1	lipin 1 (LPIN1)
437	1,80	2,26E-08	ZNF319	zinc finger protein 319 (ZNF319)
438	-1,83	2,38E-08	ATP6AP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2 (ATP6AP2)
439	-4,48	2,41E-08	ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 (ITPR3)
440	1,87	2,44E-08	RBM9	RNA binding motif protein 9 (RBM9),
441	1,97	2,44E-08	SPATA20	spermatogenesis associated 20 (SPATA20)
442	2,12	2,47E-08	LMNA	lamin A/C (LMNA),
443	-1,86	2,49E-08	RTN3	reticulon 3 (RTN3),
444	-1,77	2,62E-08	FLJ39632	PREDICTED: misc_RNA (FLJ39632), miscRNA,
445	-2,09	2,70E-08	TAF9L	TAF9-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
446	2,22	2,72E-08	ZNF586	zinc finger protein 586 (ZNF586)
447	1,94	2,74E-08	ITGB1	integrin, beta 1
448	-2,45	2,77E-08	C13ORF34	chromosome 13 open reading frame 34 (C13orf34)
449	-1,59	2,88E-08	KLHL8	kelch-like 8 (Drosophila) (KLHL8)
450	2,26	2,89E-08	MID2	midline 2 (MID2),
451	4,18	2,91E-08	KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung) (KLF2)
452	-2,15	2,96E-08	UPF3A	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast) (UPF3A),
453	-2,31	3,03E-08	DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila) (DACH1),
454	1,83	3,04E-08	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6)
455	2,72	3,06E-08	SERTAD4	SERTA domain containing 4 (SERTAD4)
456	-2,07	3,14E-08	HIST1H2BJ	histone cluster 1, H2bj (HIST1H2BJ)
457	-1,99	3,25E-08	OSBPL10	oxysterol binding protein-like 10 (OSBPL10)
458	-1,80	3,27E-08	ATP7B	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide (ATP7B),
459	1,88	3,53E-08	GRINA	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1
460	-2,62	3,60E-08	SPR	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase) (SPR)
461	-1,76	3,76E-08	C9ORF78	chromosome 9 open reading frame 78 (C9orf78)
462	1,76	3,79E-08	C6ORF125	chromosome 6 open reading frame 125 (C6orf125)
463	2,24	3,85E-08	APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (APLP1),
464	-1,95	3,91E-08	KRT18	keratin 18 (KRT18),
465	1,74	3,92E-08	WASF3	WAS protein family, member 3 (WASF3)
466	2,49	3,93E-08	MGAT3	mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT3),
467	-1,68	3,99E-08	MIER1	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis) (MIER1),
468	-1,64	4,09E-08	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S, pombe) (CHEK1)
469	-1,93	4,09E-08	EXTL2	exostoses (multiple)-like 2 (EXTL2),
470	2,09	4,10E-08	CBX4	chromobox homolog 4 (Pc class homolog, Drosophila) (CBX4)
471	-1,61	4,23E-08	CHD1L	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (CHD1L)
472	-2,46	4,25E-08	CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1A (CKMT1A),
473	-1,74	4,48E-08	SECISBP2	SECIS binding protein 2 (SECISBP2)
474	2,02	4,50E-08	LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein (LGALS3BP)

475	1,86	4,69E-08	BLVRA	biliverdin reductase A (BLVRA)
476	1,90	4,75E-08	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha (PKIA), tv 7
477	-2,07	4,76E-08	UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1 (UBE1),
478	1,79	4,84E-08	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3 (MSRB3),
479	-1,89	4,93E-08	SFRS2B	splicing factor, arginine/serine-rich 2B (SFRS2B)
480	-1,69	5,00E-08	PSMG2	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2 (PSMG2)
481	-1,92	5,02E-08	RPL34	ribosomal protein L34 (RPL34),
482	-1,85	5,11E-08	UTP14C	UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast) (UTP14C)
483	-1,81	5,17E-08	CTSL2	cathepsin L2 (CTSL2)
484	2,07	5,17E-08	FAM127A	family with sequence similarity 127, member A (FAM127A)
485	-1,85	5,20E-08	CLCNKA	chloride channel Ka (CLCNKA),
486	2,14	5,27E-08	ZFPM1	zinc finger protein, multitype 1 (ZFPM1)
487	1,70	5,28E-08	C17ORF61	chromosome 17 open reading frame 61 (C17orf61)
488	-2,15	5,31E-08	KIAA0363	PREDICTED: KIAA0363 protein (KIAA0363)
489	-3,20	5,33E-08	CD44	CD44 molecule (Indian blood group) (CD44),
490	-1,62	5,33E-08	PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase
491	-1,79	5,35E-08	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1), tv alpha
492	1,86	5,46E-08	FAM195B	family with sequence similarity 195, member B (FAM195B),
493	-1,93	5,61E-08	ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 (ABCE1),
494	2,33	5,74E-08	PALM	paralemmin (PALM),
495	-1,84	5,82E-08	LOC653381	PREDICTED: similar to Sorbitol dehydrogenase (L-iditol 2-dehydrogenase)
496	-2,38	6,06E-08	CHST7	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7 (CHST7)
497	1,87	6,10E-08	NENF	neuron derived neurotrophic factor (NENF)
498	1,85	6,28E-08	C1ORF106	chromosome 1 open reading frame 106 (C1orf106)
499	1,84	6,28E-08	BAD	BCL2-antagonist of cell death (BAD),
500	1,95	6,28E-08	KCTD8	potassium channel tetramerisation domain containing 8 (KCTD8)
501	2,21	6,49E-08	TSPO	translocator protein (18kDa) (TSPO), tv PBR
502	-1,67	6,56E-08	BAT2D1	BAT2 domain containing 1 (BAT2D1)
503	-1,88	6,56E-08	RBM26	RNA binding motif protein 26 (RBM26)
504	1,72	6,56E-08	PDCL3	phosducin-like 3 (PDCL3)
505	-1,73	6,63E-08	TCHP	trichoplein, keratin filament binding (TCHP)
506	-1,77	6,65E-08	NFXL1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1 (NFXL1)
507	1,92	6,68E-08	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E)
508	-1,61	6,69E-08	SPTLC1	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1 (SPTLC1),
509	1,79	6,70E-08	SIRPA	signal-regulatory protein alpha (SIRPA),
510	1,86	6,70E-08	CDR2L	cerebellar degeneration-related protein 2-like (CDR2L)
511	-1,81	6,73E-08	CGN	cingulin (CGN)
512	1,72	6,78E-08	NFYA	nuclear transcription factor Y, alpha (NFYA),
513	-1,63	6,83E-08	CYB5D1	cytochrome b5 domain containing 1 (CYB5D1)
514	2,13	6,88E-08	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa (FKBP1A), 2A
515	2,64	7,21E-08	TBX2	T-box 2 (TBX2)
516	-2,09	7,29E-08	PLAC1	placenta-specific 1 (PLAC1)
517	-1,80	7,40E-08	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH)
518	1,76	7,42E-08	MEA1	male-enhanced antigen 1 (MEA1)
519	-2,02	7,42E-08	FLJ10986	hypothetical protein FLJ10986 (FLJ10986)
520	-1,89	7,49E-08	CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein (CD59),
521	-1,83	7,51E-08	PCID2	PCI domain containing 2 (PCID2)
522	3,49	7,51E-08	KLF6	Kruppel-like factor 6 (KLF6),
523	-1,81	7,61E-08	PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3 (PSD3),
524	-1,90	7,65E-08	SLTM	SAFB-like, transcription modulator (SLTM),
525	1,75	7,70E-08	TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2 (TIMP2)
526	-1,88	7,70E-08	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1 (MNS1)
527	-1,88	7,70E-08	LRRK1	leucine-rich repeat kinase 1 (LRRK1)

528	-1,96	7,97E-08	NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 (NEK1)
529	1,76	8,08E-08	CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3 (CMTM3),
530	1,92	8,16E-08	ITGB1	integrin, beta 1
531	-1,95	8,27E-08	CLIP3	CAP-GLY domain containing linker protein 3 (CLIP3)
532	-1,94	8,33E-08	ANKRD57	ankyrin repeat domain 57 (ANKRD57)
533	-1,67	8,56E-08	TIMM17B	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast) (TIMM17B),
534	2,23	8,63E-08	C22ORF36	chromosome 22 open reading frame 36 (C22orf36)
535	-2,23	8,80E-08	PNMA2	paraneoplastic antigen MA2 (PNMA2)
536	-1,60	8,81E-08	CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1 (CDK5RAP1),
537	-1,64	8,83E-08	ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
538	1,88	8,94E-08	CHCHD6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6 (CHCHD6)
539	-1,64	8,94E-08	VCX	variable charge, X-linked (VCX)
540	-1,90	8,94E-08	ARHGEF16	Rho guanine exchange factor (GEF) 16 (ARHGEF16)
541	1,90	8,94E-08	GPR137B	G protein-coupled receptor 137B (GPR137B)
542	-2,75	8,99E-08	HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk (HIST1H2BK)
543	1,67	9,15E-08	DDX50	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50 (DDX50)
544	-1,89	9,18E-08	LAS1L	LAS1-like (S, cerevisiae) (LAS1L)
545	1,81	9,20E-08	SLC2A6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 (SLC2A6)
546	-1,85	9,22E-08	HSD17B11	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11 (HSD17B11)
547	-1,66	9,28E-08	USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) (USP14),
548	-1,82	9,28E-08	PLEKHB1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1 (PLEKHB1)
549	1,73	9,45E-08	AES	amino-terminal enhancer of split (AES),
550	-1,80	9,50E-08	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
551	1,91	9,50E-08	RILPL1	Rab interacting lysosomal protein-like 1 (RILPL1)
552	-1,91	9,50E-08	GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase
553	1,74	9,52E-08	TEX264	testis expressed 264 (TEX264)
554	-1,88	9,52E-08	BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 (BDH1), ,
555	1,75	9,58E-08	NRBP1	nuclear receptor binding protein 1 (NRBP1)
556	3,17	9,70E-08	KLF6	Kruppel-like factor 6 (KLF6),
557	-2,95	9,75E-08	NEFM	neurofilament, medium polypeptide 150kDa (NEFM)
558	-1,65	9,76E-08	MED28	mediator complex subunit 28 (MED28)
559	-1,79	9,86E-08	ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 (ABCE1),
560	-1,81	1,02E-07	ARMCX6	armadillo repeat containing, X-linked 6 (ARMCX6),
561	1,83	1,03E-07	LEMD2	LEM domain containing 2 (LEMD2)
562	1,81	1,03E-07	MED30	mediator complex subunit 30 (MED30)
563	-2,03	1,08E-07	C13ORF25	PREDICTED: chromosome 13 open reading frame 25 (C13orf25)
564	-1,63	1,08E-07	CLNS1A	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A (CLNS1A)
565	1,86	1,08E-07	POMZP3	POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion (POMZP3),
566	-1,90	1,08E-07	RAB38	RAB38, member RAS oncogene family (RAB38)
567	-1,84	1,10E-07	IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 (IMPA2)
568	-1,76	1,11E-07	MOSPD2	motile sperm domain containing 2 (MOSPD2)
569	1,66	1,14E-07	SMOX	spermine oxidase (SMOX),
570	-2,02	1,14E-07	RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1 (RGL1)
571	1,83	1,16E-07	E2F2	E2F transcription factor 2 (E2F2)
572	1,85	1,16E-07	TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2 (TIMP2)
573	1,76	1,17E-07	DDRGK1	DDRGK domain containing 1 (DDRGK1)
574	1,84	1,18E-07	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha (PKIA),
575	2,93	1,20E-07	HBQ1	hemoglobin, theta 1 (HBQ1)
576	2,06	1,23E-07	C10ORF35	chromosome 10 open reading frame 35 (C10orf35)
577	2,24	1,23E-07	NRP1	neuropilin 1 (NRP1),
578	-1,66	1,23E-07	UBAC2	UBA domain containing 2 (UBAC2)
579	2,58	1,23E-07	TCEAL3	transcription elongation factor A (SII)-like 3 (TCEAL3),
580	-1,71	1,24E-07	FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1 (FUBP1)

581	2,15	1,24E-07	ANKRD9	ankyrin repeat domain 9 (ANKRD9)
582	-1,76	1,24E-07	TMEM218	transmembrane protein 218 (TMEM218)
583	-1,96	1,27E-07	SUMO3	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (S, cerevisiae) (SUMO3)
584	1,86	1,27E-07	OAT	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy) (OAT),
585	2,30	1,28E-07	LHX2	LIM homeobox 2 (LHX2)
586	-1,63	1,30E-07	BZW2	basic leucine zipper and W2 domains 2 (BZW2)
587	-1,62	1,30E-07	MRPL21	mitochondrial ribosomal protein L21 (MRPL21), ,
588	-1,81	1,30E-07	SUMF2	sulfatase modifying factor 2 (SUMF2),
589	2,14	1,30E-07	LRRC20	leucine rich repeat containing 20 (LRRC20),
590	-2,21	1,32E-07	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D) (IFITM2)
591	1,91	1,32E-07	LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), tv LAMP2A
592	1,89	1,35E-07	RHBDF1	rhomboid 5 homolog 1 (Drosophila) (RHBDF1)
593	-1,71	1,35E-07	CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3-like 4 (CREB3L4)
594	-1,91	1,39E-07	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) (LGALS3)
595	-1,60	1,42E-07	C2ORF34	chromosome 2 open reading frame 34 (C2orf34)
596	-1,99	1,42E-07	TMEM216	transmembrane protein 216 (TMEM216)
597	1,98	1,44E-07	SELM	selenoprotein M (SELM)
598	2,31	1,47E-07	LIN7B	lin-7 homolog B (C, elegans) (LIN7B)
599	1,65	1,51E-07	KIF5B	kinesin family member 5B (KIF5B)
600	-1,68	1,51E-07	SLC25A43	solute carrier family 25, member 43 (SLC25A43)
601	-2,02	1,55E-07	NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP),
602	-2,11	1,55E-07	EML3	echinoderm microtubule associated protein like 3 (EML3)
603	-1,62	1,55E-07	NONO	non-POU domain containing, octamer-binding (NONO)
604	-2,56	1,55E-07	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1 (MNS1)
605	-1,63	1,58E-07	ZFP106	zinc finger protein 106 homolog (mouse) (ZFP106)
606	1,90	1,59E-07	C12ORF35	chromosome 12 open reading frame 35 (C12orf35)
607	-1,72	1,60E-07	ZFP106	zinc finger protein 106 homolog (mouse) (ZFP106)
608	2,03	1,60E-07	SLC29A4	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4 (SLC29A4)
609	1,75	1,61E-07	SQSTM1	sequestosome 1 (SQSTM1)
610	-1,56	1,62E-07	B3GALT6	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase polypeptide 6 (B3GALT6)
611	3,19	1,66E-07	PPP2R2C	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma isoform
612	-2,80	1,69E-07	LOC286467	PREDICTED: hypothetical protein LOC286467 (LOC286467), misc RNA,
613	2,04	1,70E-07	CCDC46	coiled-coil domain containing 46 (CCDC46),
614	-1,74	1,70E-07	PKN3	protein kinase N3 (PKN3)
615	-1,71	1,72E-07	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
616	-1,63	1,72E-07	CARKD	carbohydrate kinase domain containing (CARKD)
617	-1,65	1,75E-07	AKR1A1	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase) (AKR1A1),
618	2,06	1,76E-07	VIM	vimentin (VIM)
619	-1,67	1,76E-07	C9ORF6	chromosome 9 open reading frame 6 (C9orf6)
620	-1,79	1,76E-07	THYN1	thymocyte nuclear protein 1 (THYN1),
621	-1,68	1,78E-07	NSUN4	NOP2/Sun domain family, member 4 (NSUN4)
622	-1,99	1,87E-07	GPATCH3	G patch domain containing 3 (GPATCH3)
623	-1,62	1,90E-07	MYO19	myosin XIX (MYO19),
624	2,10	1,92E-07	CPT1C	carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C),
625	-1,66	1,92E-07	GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa) (GAD1), tv GAD67
626	-1,88	1,92E-07	ZNF519	zinc finger protein 519 (ZNF519)
627	-1,78	1,92E-07	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide (DFFA),
628	1,82	1,93E-07	PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha) (PSME1),
629	1,87	1,94E-07	SYT9	synaptotagmin IX (SYT9)
630	-1,78	1,94E-07	CREBZF	CREB/ATF bZIP transcription factor (CREBZF)
631	-1,92	1,94E-07	CPNE1	copine I (CPNE1), tv 8
632	-1,93	1,96E-07	DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (DKK3),
633	1,89	1,96E-07	AFF2	AF4/FMR2 family, member 2 (AFF2)

634	2,18	1,96E-07	VPS37D	vacuolar protein sorting 37 homolog D (S, cerevisiae) (VPS37D)
635	-1,54	1,96E-07	PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2
636	-1,77	1,98E-07	SPA17	sperm autoantigenic protein 17 (SPA17)
637	-1,64	2,00E-07	DAGLA	diacylglycerol lipase, alpha (DAGLA)
638	-1,73	2,01E-07	ZADH2	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2 (ZADH2)
639	-2,01	2,01E-07	LRRC49	leucine rich repeat containing 49 (LRRC49)
640	-1,74	2,02E-07	CWF19L2	CWF19-like 2, cell cycle control (S, pombe) (CWF19L2)
641	-1,78	2,02E-07	NUDT6	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6 (NUDT6),
642	-1,61	2,06E-07	SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24
643	-1,67	2,06E-07	DBT	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2 (DBT),
644	-2,21	2,18E-07	C9ORF9	chromosome 9 open reading frame 9 (C9orf9)
645	-1,88	2,18E-07	ARMCX2	armadillo repeat containing, X-linked 2 (ARMCX2)
646	1,87	2,18E-07	KLHDC8B	kelch domain containing 8B (KLHDC8B)
647	2,08	2,18E-07	SMAD9	SMAD family member 9 (SMAD9)
648	-1,76	2,18E-07	WDR45	WD repeat domain 45 (WDR45),
649	1,82	2,19E-07	ZNF746	zinc finger protein 746 (ZNF746)
650	1,91	2,20E-07	RAB11FIP5	RAB11 family interacting protein 5 (class I) (RAB11FIP5)
651	-1,69	2,20E-07	SEH1L	SEH1-like (S, cerevisiae) (SEH1L),
652	-2,38	2,22E-07	COLEC12	collectin sub-family member 12 (COLEC12)
653	-2,44	2,22E-07	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian) (MAFB)
654	-1,64	2,24E-07	CCDC18	coiled-coil domain containing 18 (CCDC18)
655	-1,85	2,30E-07	LRRC8A	leucine rich repeat containing 8 family, member A (LRRC8A)
656	-1,66	2,30E-07	CPSF3L	cleavage and polyadenylation specific factor 3-like (CPSF3L)
657	-1,60	2,30E-07	PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase
658	-1,74	2,34E-07	TFDP1	transcription factor Dp-1 (TFDP1)
659	1,76	2,35E-07	COMMD5	COMM domain containing 5 (COMMD5),
660	-1,74	2,36E-07	FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3 (FUBP3)
661	-1,65	2,39E-07	PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A (PIGA),
662	1,65	2,39E-07	HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase (HAGH), ,
663	-1,69	2,45E-07	DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa (DDB1)
664	-1,98	2,46E-07	IPO7	importin 7 (IPO7)
665	-1,71	2,50E-07	TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (TGFB1I1),
666	-1,75	2,53E-07	ZRANB2	zinc finger, RAN-binding domain containing 2 (ZRANB2),
667	1,73	2,55E-07	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa (CARHSP1),
668	1,99	2,60E-07	CSNK1D	casein kinase 1, delta (CSNK1D),
669	1,89	2,60E-07	EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked (EIF1AX)
670	-1,59	2,61E-07	PAPSS1	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1 (PAPSS1)
671	-1,62	2,65E-07	STK4	serine/threonine kinase 4 (STK4)
672	-1,70	2,70E-07	TSR2	TSR2, 20S rRNA accumulation, homolog (S, cerevisiae) (TSR2)
673	-2,06	2,70E-07	FLJ20444	PREDICTED: hypothetical protein FLJ20444, (FLJ20444)
674	1,80	2,70E-07	RWDD2A	RWD domain containing 2A (RWDD2A)
675	2,45	2,71E-07	C19ORF4	chromosome 19 open reading frame 4 (C19orf4)
676	-1,62	2,94E-07	LDHC	lactate dehydrogenase C (LDHC),
677	2,10	3,00E-07	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)
678	1,90	3,01E-07	PCDH18	protocadherin 18 (PCDH18)
679	1,57	3,01E-07	C9ORF91	chromosome 9 open reading frame 91 (C9orf91)
680	-1,78	3,01E-07	PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta (PI4K2B)
681	-1,75	3,14E-07	GLDN	gliomedin (GLDN)
682	2,20	3,18E-07	JAG2	jagged 2 (JAG2),
683	-1,65	3,19E-07	CEP192	centrosomal protein 192kDa (CEP192)
684	-1,65	3,20E-07	DNAJC24	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 24 (DNAJC24)
685	1,70	3,22E-07	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (SLC6A8)
686	1,79	3,24E-07	LZTS2	leucine zipper, putative tumor suppressor 2 (LZTS2)

687	1,76	3,24E-07	TYSND1	trypsin domain containing 1 (TYSND1),
688	1,94	3,26E-07	HOXC4	homeobox C4 (HOXC4),
689	-1,63	3,28E-07	TARDBP	TAR DNA binding protein (TARDBP)
690	-1,87	3,31E-07	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A (CORO2A),
691	1,84	3,34E-07	CHST3	carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3 (CHST3)
692	-1,64	3,36E-07	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3)
693	-1,69	3,49E-07	WDR19	WD repeat domain 19 (WDR19)
694	-2,11	3,49E-07	FTSJ1	FtsJ homolog 1 (E, coli) (FTSJ1),
695	2,16	3,55E-07	LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1 (LINGO1)
696	-1,73	3,57E-07	IGBP1	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1 (IGBP1)
697	-1,69	3,57E-07	SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1),
698	-1,61	3,58E-07	EDNRB	endothelin receptor type B (EDNRB),
699	-1,73	3,58E-07	ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like) (ARID1A),
700	-1,78	3,59E-07	RTN3	reticulon 3 (RTN3),
701	-1,69	3,62E-07	NUDT11	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11 (NUDT11)
702	-2,00	3,64E-07	PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 (PTPN2),
703	1,69	3,65E-07	FLJ36492	hypothetical protein FLJ36492 (FLJ36492)
704	1,83	3,70E-07	C10ORF72	chromosome 10 open reading frame 72 (C10orf72),
705	-1,70	3,72E-07	ALG8	asparagine-linked glycosylation 8, alpha-1,3-glucosyltransferase homolog
706	-1,86	3,73E-07	MKX	mohawk homeobox (MKX)
707	-1,52	3,75E-07	XPO7	exportin 7 (XPO7)
708	-1,74	3,77E-07	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2 (SLC35F2)
709	-1,66	3,77E-07	CYBASC3	cytochrome b, ascorbate dependent 3 (CYBASC3)
710	1,67	3,80E-07	ZNF16	zinc finger protein 16 (ZNF16),
711	2,22	3,80E-07	GABRB1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1 (GABRB1)
712	-1,79	3,86E-07	AKR1A1	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase) (AKR1A1),
713	1,70	3,86E-07	BRI3	brain protein I3 (BRI3)
714	-1,67	3,91E-07	NKX2-2	NK2 homeobox 2 (NKX2-2)
715	-1,80	3,91E-07	CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2 (CYP2J2)
716	-1,72	3,93E-07	FLJ38482	hypothetical protein FLJ38482 (FLJ38482)
717	1,75	3,95E-07	ATP6V0E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1 (ATP6V0E1)
718	1,67	4,11E-07	PPP2CB	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform (PPP2CB),
719	1,57	4,12E-07	ACO1	aconitase 1, soluble (ACO1)
720	2,01	4,22E-07	FAM129B	family with sequence similarity 129, member B (FAM129B),
721	-1,59	4,23E-07	PIGK	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K (PIGK)
722	-1,95	4,26E-07	HSD17B10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 (HSD17B10), ,
723	-1,71	4,26E-07	UQCC	ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone (UQCC), ,
724	-1,54	4,27E-07	C11ORF46	chromosome 11 open reading frame 46 (C11orf46)
725	-1,67	4,32E-07	KIF4A	kinesin family member 4A (KIF4A)
726	-1,76	4,33E-07	VPS36	vacuolar protein sorting 36 homolog (S, cerevisiae) (VPS36)
727	1,59	4,33E-07	C9ORF46	chromosome 9 open reading frame 46 (C9orf46)
728	3,39	4,34E-07	PTH1R	parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R)
729	-1,99	4,41E-07	STK36	serine/threonine kinase 36, fused homolog (Drosophila) (STK36)
730	-1,76	4,47E-07	DDB1	PREDICTED: damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa (DDB1)
731	-1,76	4,57E-07	RPS27L	ribosomal protein S27-like (RPS27L)
732	-1,97	4,59E-07	CNTNAP2	contactin associated protein-like 2 (CNTNAP2)
733	1,92	4,60E-07	TPM4	tropomyosin 4 (TPM4)
734	1,84	4,61E-07	ITGB1	integrin, beta 1
735	-1,73	4,63E-07	CHMP1B	chromatin modifying protein 1B (CHMP1B)
736	-1,68	4,68E-07	SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing (SORL1)
737	-1,71	4,69E-07	USP44	ubiquitin specific peptidase 44 (USP44),
738	-1,78	4,72E-07	CCNH	cyclin H (CCNH)
739	-2,18	4,75E-07	CHM	choroideremia (Rab escort protein 1) (CHM),

740	-1,81	4,78E-07	KLF12	Kruppel-like factor 12 (KLF12)
741	-1,80	4,82E-07	HS,326560	PREDICTED: LOC440151 (LOC440151), mRNA
742	1,91	4,83E-07	KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2 (KCNQ2),
743	1,84	4,88E-07	SAP30L	SAP30-like (SAP30L)
744	1,85	4,88E-07	FICD	FIC domain containing (FICD)
745	1,62	4,88E-07	RING1	ring finger protein 1 (RING1)
746	-1,69	4,91E-07	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3)
747	-1,66	4,91E-07	CDCA2	cell division cycle associated 2 (CDCA2)
748	1,63	4,91E-07	SGCE	sarcoglycan, epsilon (SGCE),
749	-1,61	4,94E-07	WBSCR22	Williams Beuren syndrome chromosome region 22 (WBSCR22)
750	-1,71	5,07E-07	ACADM	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain (ACADM),
751	-1,65	5,17E-07	FAM81A	family with sequence similarity 81, member A (FAM81A)
752	-1,99	5,20E-07	HERC5	hect domain and RLD 5 (HERC5)
753	-1,57	5,21E-07	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile) (PPT1)
754	-1,55	5,22E-07	RSBN1L	round spermatid basic protein 1-like (RSBN1L)
755	2,02	5,26E-07	ATF5	activating transcription factor 5 (ATF5)
756	-1,86	5,27E-07	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2 (BACE2), tv b
757	1,60	5,27E-07	ISL2	ISL LIM homeobox 2 (ISL2)
758	2,32	5,28E-07	TYSND1	trypsin domain containing 1 (TYSND1),
759	1,91	5,35E-07	RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family (RAB40B)
760	1,96	5,35E-07	HMGB1	high-mobility group box 1 (HMGB1)
761	-1,65	5,35E-07	CRYZ	crystallin, zeta (quinone reductase) (CRYZ)
762	1,67	5,35E-07	CD99L2	CD99 molecule-like 2 (CD99L2),
763	1,70	5,36E-07	FAM110B	family with sequence similarity 110, member B (FAM110B)
764	-1,90	5,37E-07	SUSD1	sushi domain containing 1 (SUSD1)
765	-1,61	5,54E-07	GSS	glutathione synthetase (GSS)
766	2,00	5,54E-07	NOTCH3	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)
767	-2,05	5,54E-07	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 (PARP14)
768	-2,23	5,71E-07	LAP3	leucine aminopeptidase 3 (LAP3)
769	-1,64	5,72E-07	PRMT3	protein arginine methyltransferase 3 (PRMT3)
770	1,81	5,76E-07	RHOC	ras homolog gene family, member C (RHOC),
771	1,60	5,89E-07	AATF	apoptosis antagonizing transcription factor (AATF)
772	-1,72	5,95E-07	C6ORF192	chromosome 6 open reading frame 192 (C6orf192)
773	-1,73	6,12E-07	GJA3	gap junction protein, alpha 3, 46kDa (GJA3)
774	-1,61	6,16E-07	IL17D	interleukin 17D (IL17D)
775	1,86	6,17E-07	C11ORF70	chromosome 11 open reading frame 70 (C11orf70)
776	-1,61	6,19E-07	TMEM80	transmembrane protein 80 (TMEM80),
777	-1,66	6,19E-07	IFI35	interferon-induced protein 35 (IFI35)
778	-1,86	6,39E-07	SUMF2	sulfatase modifying factor 2 (SUMF2),
779	-1,67	6,42E-07	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1 (AGTPBP1)
780	-1,67	6,42E-07	USP24	ubiquitin specific peptidase 24 (USP24)
781	-2,06	6,47E-07	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1 (SERPINI1)
782	-2,36	6,48E-07	CLK1	CDC-like kinase 1 (CLK1)
783	-1,78	6,59E-07	GRIPAP1	GRIP1 associated protein 1 (GRIPAP1),
784	1,88	6,61E-07	TRIM8	tripartite motif-containing 8 (TRIM8)
785	1,90	6,63E-07	HSPC159	galectin-related protein (HSPC159)
786	-2,13	6,64E-07	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B)
787	2,20	6,64E-07	IRS4	insulin receptor substrate 4 (IRS4)
788	1,83	6,65E-07	C6ORF153	chromosome 6 open reading frame 153 (C6orf153)
789	-1,54	6,66E-07	KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 (KLRG1)
790	1,66	6,66E-07	ZNF318	zinc finger protein 318 (ZNF318)
791	-3,62	6,72E-07	SH3BGRL	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like (SH3BGRL)
792	1,86	6,72E-07	SCARF2	scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2),

793	1,63	6,74E-07	C7ORF47	chromosome 7 open reading frame 47 (C7orf47)
794	1,70	6,76E-07	TRAPPC9	trafficking protein particle complex 9 (TRAPPC9)
795	-1,54	6,90E-07	CEPT1	choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1),
796	-1,68	6,93E-07	AGL	amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (AGL),
797	-2,20	6,95E-07	SUMF1	sulfatase modifying factor 1 (SUMF1)
798	-1,63	7,03E-07	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3),
799	-1,71	7,36E-07	ZSWIM5	zinc finger, SWIM-type containing 5 (ZSWIM5)
800	-1,51	7,42E-07	ENOPH1	enolase-phosphatase 1 (ENOPH1)
801	-1,53	7,44E-07	PRPF38A	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing A (PRPF38A)
802	1,85	7,45E-07	RHOC	ras homolog gene family, member C (RHOC),
803	-1,88	7,48E-07	TSC1	tuberous sclerosis 1 (TSC1),
804	-1,59	7,55E-07	COL24A1	collagen, type XXIV, alpha 1 (COL24A1)
805	1,95	7,66E-07	PCDH10	protocadherin 10 (PCDH10),
806	-2,32	7,70E-07	RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1 (RFTN1)
807	-1,60	7,70E-07	LOC646817	PREDICTED: similar to Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A)
808	1,78	7,72E-07	CHFR	checkpoint with forkhead and ring finger domains (CHFR)
809	1,76	7,84E-07	KIFC1	kinesin family member C1 (KIFC1)
810	1,58	7,87E-07	PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTS)
811	-1,61	7,88E-07	DDX56	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56 (DDX56)
812	-1,81	8,04E-07	GNL3L	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like (GNL3L)
813	-1,65	8,04E-07	GGCT	gamma-glutamyl cyclotransferase (GGCT)
814	1,94	8,21E-07	PDIA3P	protein disulfide isomerase family A, member 3 pseudogene (PDIA3P), non-coding RNA,
815	1,64	8,27E-07	C6ORF129	chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)
816	2,04	8,30E-07	ACTG1	actin, gamma 1 (ACTG1)
817	1,76	8,33E-07	CDC42EP1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1 (CDC42EP1),
818	-2,96	8,36E-07	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT)
819	-2,02	8,40E-07	DIDO1	death inducer-obliterator 1 (DIDO1),
820	1,65	8,42E-07	CERK	ceramide kinase (CERK),
821	-1,69	8,44E-07	RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1)
822	-1,68	8,44E-07	METTL7B	methyltransferase like 7B (METTL7B)
823	-1,53	8,47E-07	SUGT1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S, cerevisiae) (SUGT1)
824	1,75	8,47E-07	C19ORF12	chromosome 19 open reading frame 12 (C19orf12),
825	1,62	8,63E-07	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
826	1,57	8,73E-07	ALG9	asparagine-linked glycosylation 9, alpha-1,2-mannosyltransferase homolog
827	-1,62	8,73E-07	HDAC6	histone deacetylase 6 (HDAC6)
828	2,41	8,79E-07	VIM	vimentin (VIM)
829	-1,69	8,89E-07	STT3A	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (S, cerevisiae) (STT3A)
830	-1,66	8,94E-07	COPS8	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis) (COPS8),
831	1,72	8,95E-07	ARFGAP3	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3 (ARFGAP3)
832	-1,78	8,95E-07	ZNF828	zinc finger protein 828 (ZNF828)
833	1,93	8,97E-07	PRDM16	PR domain containing 16 (PRDM16),
834	-1,77	9,12E-07	PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit (PRKAB2)
835	-1,94	9,12E-07	HADH2	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II (HADH2),
836	-1,58	9,34E-07	VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIPR1)
837	-1,69	9,36E-07	TPP1	tripeptidyl peptidase I (TPP1)
838	-1,74	9,36E-07	UBA6	ubiquitin-like modifier activating enzyme 6 (UBA6)
839	1,76	9,37E-07	PTMS	parathymosin (PTMS)
840	1,77	9,51E-07	DGCR5	DiGeorge syndrome critical region gene 5 (non-protein coding) (DGCR5), non-coding RNA,
841	-1,61	9,80E-07	CLCN6	chloride channel 6 (CLCN6), tv ClC-6a
842	-2,46	9,90E-07	LAMA4	laminin, alpha 4 (LAMA4)
843	-1,70	9,96E-07	AGL	amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (AGL),
844	1,85	1,00E-06	NCK2	NCK adaptor protein 2 (NCK2),

845	-1,55	1,02E-06	INTS12	integrator complex subunit 12 (INTS12)
846	-1,63	1,03E-06	ACADL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain (ACADL),
847	2,03	1,03E-06	ZNF700	zinc finger protein 700 (ZNF700)
848	-1,62	1,03E-06	ABHD10	abhydrolase domain containing 10 (ABHD10)
849	-2,02	1,04E-06	PIM2	pim-2 oncogene (PIM2)
850	1,57	1,04E-06	CPNE3	copine III (CPNE3)
851	-1,90	1,06E-06	CLGN	calmegin (CLGN)
852	-1,84	1,07E-06	KLHDC9	kelch domain containing 9 (KLHDC9),
853	-1,88	1,07E-06	HS,383564	mRNA for KIAA0574 protein, partial cds
854	1,61	1,07E-06	ANXA6	annexin A6 (ANXA6),
855	-1,82	1,07E-06	KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal) (KLF5)
856	-1,76	1,08E-06	BCOR	BCL6 co-repressor (BCOR),
857	1,62	1,08E-06	DNCL1	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 1 (DNCL1)
858	-1,79	1,08E-06	PRKCH	protein kinase C, eta (PRKCH)
859	-1,97	1,10E-06	PROCR	protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR)
860	3,25	1,10E-06	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1)
861	1,96	1,11E-06	ZNF239	zinc finger protein 239 (ZNF239),
862	-1,61	1,11E-06	NHS	Nance-Horan syndrome (congenital cataracts and dental anomalies) (NHS),
863	-1,83	1,12E-06	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B),
864	-1,71	1,13E-06	ABHD3	abhydrolase domain containing 3 (ABHD3)
865	-1,97	1,15E-06	FOXRED1	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1 (FOXRED1)
866	-1,66	1,15E-06	PCCA	propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide (PCCA), ,
867	1,72	1,16E-06	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2 (NETO2)
868	-1,52	1,17E-06	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1 (PDHA1)
869	1,67	1,17E-06	TOP3A	topoisomerase (DNA) III alpha (TOP3A)
870	-1,85	1,18E-06	TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila) (TLE4)
871	-1,75	1,20E-06	DDX19B	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19B (DDX19B),
872	1,75	1,20E-06	GRM8	glutamate receptor, metabotropic 8 (GRM8)
873	-1,68	1,21E-06	LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing (LRBA)
874	-1,63	1,23E-06	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha (HNF4A),
875	-1,64	1,23E-06	SDCCAG3	serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3),
876	1,74	1,25E-06	HS,335413	Homo sapiens, clone IMAGE:5241654, mRNA
877	-1,56	1,25E-06	C2ORF25	chromosome 2 open reading frame 25 (C2orf25)
878	1,81	1,25E-06	CCNY	cyclin Y (CCNY),
879	-1,60	1,26E-06	PLRG1	pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis) (PLRG1)
880	2,37	1,29E-06	SOX21	SRY (sex determining region Y)-box 21 (SOX21)
881	1,64	1,29E-06	LSMD1	LSM domain containing 1 (LSMD1)
882	-1,62	1,31E-06	ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat) (ADARB1),
883	1,58	1,32E-06	ABCB9	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9 (ABCB9),
884	-1,55	1,32E-06	EIF3M	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M (EIF3M)
885	-1,61	1,32E-06	C4ORF29	chromosome 4 open reading frame 29 (C4orf29)
886	-1,66	1,32E-06	PCNT	pericentrin (PCNT)
887	-1,61	1,33E-06	C5	complement component 5 (C5)
888	-1,61	1,33E-06	C20ORF72	chromosome 20 open reading frame 72 (C20orf72)
889	-1,61	1,34E-06	TMED5	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5 (TMED5)
890	1,96	1,36E-06	GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1
891	-1,94	1,37E-06	C10ORF41	PREDICTED: chromosome 10 open reading frame 41 (C10orf41)
892	-1,92	1,37E-06	DEAF1	PREDICTED: deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila) (DEAF1)
893	-1,60	1,38E-06	C7ORF10	chromosome 7 open reading frame 10 (C7orf10)
894	1,74	1,38E-06	SFRS13B	splicing factor, arginine/serine-rich 13B (SFRS13B)
895	1,84	1,38E-06	UNC119	unc-119 homolog (C, elegans) (UNC119),
896	-1,61	1,39E-06	IGDCC4	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4 (IGDCC4)
897	1,91	1,39E-06	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2 (CSRP2)

898	-1,66	1,40E-06	DSC3	desmocollin 3 (DSC3), tv Dsc3b
899	-1,97	1,40E-06	TGDS	TDP-glucose 4,6-dehydratase (TGDS)
900	1,72	1,40E-06	MOSC2	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2 (MOSC2)
901	-1,61	1,41E-06	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (SKP2),
902	2,13	1,42E-06	LINGO2	leucine rich repeat and Ig domain containing 2 (LINGO2)
903	1,67	1,44E-06	PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT), ,
904	2,28	1,45E-06	TCEAL3	transcription elongation factor A (SII)-like 3 (TCEAL3),
905	-1,84	1,46E-06	PIGB	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class B (PIGB)
906	-1,52	1,51E-06	PRDX6	peroxiredoxin 6 (PRDX6)
907	1,62	1,52E-06	C2ORF76	chromosome 2 open reading frame 76 (C2orf76)
908	-1,90	1,54E-06	NUP160	nucleoporin 160kDa (NUP160)
909	-1,64	1,55E-06	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1)
910	-1,57	1,56E-06	CREG1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1)
911	2,33	1,56E-06	ZNF25	zinc finger protein 25 (ZNF25)
912	1,58	1,56E-06	EMD	emerin (Emery-Dreifuss muscular dystrophy) (EMD)
913	-1,69	1,56E-06	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like (CPVL),
914	1,60	1,56E-06	GNA12	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12 (GNA12)
915	-2,14	1,56E-06	TMEM54	transmembrane protein 54 (TMEM54)
916	-1,64	1,56E-06	PCMTD2	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2 (PCMTD2)
917	-1,65	1,56E-06	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 (APLP2)
918	-2,08	1,56E-06	ADAP2	ArfGAP with dual PH domains 2 (ADAP2)
919	-1,89	1,57E-06	NME7	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) (NME7),
920	1,68	1,58E-06	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5)
921	-1,59	1,60E-06	DHX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 (DHX40)
922	-1,57	1,61E-06	CDC16	cell division cycle 16 homolog (S, cerevisiae) (CDC16),
923	3,55	1,61E-06	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)
924	-1,67	1,62E-06	MFSD10	major facilitator superfamily domain containing 10 (MFSD10)
925	1,89	1,63E-06	ZBTB45	zinc finger and BTB domain containing 45 (ZBTB45)
926	1,76	1,64E-06	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4),
927	1,97	1,65E-06	PDIA3P	protein disulfide isomerase family A, member 3 pseudogene (PDIA3P), non-coding RNA,
928	2,12	1,65E-06	TIGD5	tigger transposable element derived 5 (TIGD5)
929	1,53	1,66E-06	EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 3 (EIF4A3)
930	1,64	1,67E-06	P4HB	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB)
931	-1,73	1,67E-06	RNF113A	ring finger protein 113A (RNF113A)
932	-1,80	1,68E-06	C1ORF97	chromosome 1 open reading frame 97 (C1orf97)
933	-1,80	1,69E-06	CTSB	cathepsin B (CTSB),
934	-1,92	1,72E-06	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)
935	-1,71	1,72E-06	OCIAD1	OCIA domain containing 1 (OCIAD1)
936	1,64	1,73E-06	CCNY	cyclin Y (CCNY),
937	1,96	1,74E-06	ADM	adrenomedullin (ADM)
938	2,01	1,76E-06	HMGB1L1	high-mobility group box 1-like 1 (HMGB1L1)
939	1,73	1,78E-06	SLC39A3	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3 (SLC39A3),
940	1,62	1,79E-06	BUD31	BUD31 homolog (S, cerevisiae) (BUD31)
941	1,80	1,79E-06	ZNF536	zinc finger protein 536 (ZNF536)
942	-1,66	1,79E-06	CYCS	cytochrome c, somatic (CYCS),
943	1,66	1,81E-06	FRMD6	FERM domain containing 6 (FRMD6)
944	-1,57	1,83E-06	EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4,1-like 3 (EPB41L3)
945	-1,64	1,86E-06	INTS10	integrator complex subunit 10 (INTS10)
946	-1,58	1,86E-06	SH2D4A	SH2 domain containing 4A (SH2D4A)
947	-1,58	1,86E-06	NELF	nasal embryonic LHRH factor (NELF)
948	2,27	1,88E-06	NMNAT2	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT2),
949	-1,76	1,89E-06	ARG2	arginase, type II (ARG2),
950	-1,56	1,93E-06	CDC16	cell division cycle 16 homolog (S, cerevisiae) (CDC16),

951	1,72	1,94E-06	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (RIPK2)
952	1,57	1,94E-06	NCOA4	nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4)
953	-1,62	1,94E-06	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase (HIBCH), ,
954	-1,69	2,00E-06	MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase (MTRR),
955	-1,61	2,04E-06	DACH2	dachshund homolog 2 (Drosophila) (DACH2)
956	1,68	2,04E-06	ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21)
957	-1,69	2,12E-06	PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2), ,
958	-2,04	2,12E-06	GCA	grancalcin, EF-hand calcium binding protein (GCA)
959	-1,66	2,14E-06	EED	embryonic ectoderm development (EED),
960	-1,70	2,15E-06	BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
961	-1,71	2,16E-06	USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) (USP14),
962	-1,90	2,17E-06	ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (ARHGEF4),
963	1,70	2,18E-06	PPM1F	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing) (PPM1F)
964	1,56	2,20E-06	RAB34	RAB34, member RAS oncogene family (RAB34)
965	2,36	2,20E-06	RASIP1	Ras interacting protein 1 (RASIP1)
966	1,68	2,22E-06	YIPF3	Yip1 domain family, member 3 (YIPF3)
967	2,00	2,22E-06	ZNF502	zinc finger protein 502 (ZNF502)
968	-1,77	2,22E-06	UPF3A	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast) (UPF3A),
969	-1,84	2,24E-06	KRTDAP	keratinocyte differentiation-associated protein (KRTDAP)
970	-1,61	2,24E-06	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase (UGDH)
971	-1,74	2,26E-06	TMEM137	PREDICTED: transmembrane protein 137 (TMEM137), misc RNA,
972	-1,65	2,29E-06	PRDX4	peroxiredoxin 4 (PRDX4)
973	-1,67	2,29E-06	SPINK2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor) (SPINK2)
974	-1,67	2,31E-06	ALG8	asparagine-linked glycosylation 8, alpha-1,3-glucosyltransferase homolog
975	-1,57	2,34E-06	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S, cerevisiae) (MRE11A),
976	1,56	2,36E-06	GNB2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 (GNB2)
977	1,53	2,36E-06	GCHFR	GTP cyclohydrolase I feedback regulator (GCHFR)
978	-1,76	2,40E-06	ARID3B	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like) (ARID3B)
979	1,51	2,41E-06	MTDH	metadherin (MTDH)
980	-1,52	2,41E-06	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La) (SSB)
981	1,55	2,41E-06	C2ORF7	chromosome 2 open reading frame 7 (C2orf7)
982	2,03	2,44E-06	VCL	vinculin (VCL),
983	-1,70	2,46E-06	ZMYM1	zinc finger, MYM-type 1 (ZMYM1)
984	2,22	2,46E-06	FNDC1	fibronectin type III domain containing 1 (FNDC1)
985	-1,70	2,46E-06	LOC647346	PREDICTED: similar to Alcohol dehydrogenase class 3 chi chain
986	1,60	2,48E-06	ARF5	ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)
987	-1,64	2,49E-06	HSPC171	HSPC171 protein (HSPC171)
988	1,84	2,52E-06	RPUSD1	RNA pseudouridylate synthase domain containing 1 (RPUSD1)
989	1,68	2,53E-06	HMGA1	high mobility group AT-hook 1 (HMGA1),
990	1,63	2,53E-06	H2AFY2	H2A histone family, member Y2 (H2AFY2)
991	-1,78	2,53E-06	LOC440145	similar to RIKEN cDNA 2410129H14 (LOC440145)
992	-1,57	2,54E-06	FTSJ1	FtsJ homolog 1 (E, coli) (FTSJ1),
993	1,66	2,54E-06	RGS10	regulator of G-protein signaling 10 (RGS10),
994	-1,56	2,54E-06	POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit (POLD3)
995	-1,58	2,55E-06	MRPL50	mitochondrial ribosomal protein L50 (MRPL50),
996	2,16	2,56E-06	CYP4X1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1 (CYP4X1)
997	-1,74	2,58E-06	LETMD1	LETM1 domain containing 1 (LETMD1),
998	-1,62	2,60E-06	HECTD3	HECT domain containing 3 (HECTD3)
999	1,54	2,61E-06	EVL	Enah/Vasp-like (EVL)
1000	1,56	2,61E-06	C6ORF64	chromosome 6 open reading frame 64 (C6orf64)
1001	1,64	2,64E-06	SNX17	sorting nexin 17 (SNX17)
1002	-1,98	2,65E-06	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (S100A11)
1003	1,73	2,67E-06	PPP2CB	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform (PPP2CB),

1004	-1,68	2,71E-06	AASDHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase (AAS-DHPPT)
1005	-1,54	2,71E-06	ZNF770	zinc finger protein 770 (ZNF770)
1006	-1,61	2,75E-06	ELOVL6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids
1007	1,80	2,78E-06	GUK1	guanylate kinase 1 (GUK1)
1008	-1,71	2,78E-06	DAK	dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S, cerevisiae) (DAK)
1009	-1,98	2,78E-06	SLC6A15	solute carrier family 6, member 15 (SLC6A15),
1010	-1,58	2,78E-06	C12ORF24	chromosome 12 open reading frame 24 (C12orf24)
1011	-1,52	2,79E-06	LOC646567	PREDICTED: similar to HSPC307 (LOC646567)
1012	1,76	2,83E-06	LRFN3	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 3 (LRFN3)
1013	1,58	2,84E-06	MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like (MASTL)
1014	1,94	2,85E-06	NUP50	nucleoporin 50kDa (NUP50),
1015	1,54	2,86E-06	HDHD3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3 (HDHD3)
1016	-2,48	2,86E-06	HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk (HIST1H2BK)
1017	-1,57	2,87E-06	FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7 (FBXW7),
1018	-1,63	2,88E-06	AGPS	alkylglycerone phosphate synthase (AGPS)
1019	1,55	2,89E-06	HK1	hexokinase 1 (HK1), ,
1020	-1,55	2,90E-06	SKAP2	src kinase associated phosphoprotein 2 (SKAP2)
1021	-1,64	2,91E-06	ZDHHC18	zinc finger, DHHC-type containing 18 (ZDHHC18)
1022	-1,74	2,92E-06	ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat) (ADARB1),
1023	-1,51	2,92E-06	PSTK	phosphoseryl-tRNA kinase (PSTK)
1024	1,74	2,92E-06	NR2C2AP	nuclear receptor 2C2-associated protein (NR2C2AP)
1025	1,81	2,94E-06	REEP2	receptor accessory protein 2 (REEP2)
1026	1,93	2,94E-06	HS,531457	cDNA FLJ37595 fis, clone BRCOC2007864
1027	1,52	2,94E-06	ABCB6	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6 (ABCB6),
1028	-1,53	2,96E-06	C11ORF54	chromosome 11 open reading frame 54 (C11orf54)
1029	1,55	3,04E-06	LOC401218	PREDICTED: similar to CG31232-PA, isoform A (LOC401218)
1030	-1,62	3,05E-06	SLC44A3	solute carrier family 44, member 3 (SLC44A3)
1031	-1,53	3,05E-06	MPP6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6) (MPP6)
1032	-2,27	3,06E-06	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2),
1033	-1,53	3,08E-06	TBC1D15	TBC1 domain family, member 15 (TBC1D15)
1034	1,87	3,08E-06	ZYX	zyxin (ZYX),
1035	-1,55	3,08E-06	HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha (HLA-DOA)
1036	1,72	3,14E-06	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (TKT)
1037	1,58	3,14E-06	HYAL2	hyaluronoglucosaminidase 2 (HYAL2),
1038	1,79	3,14E-06	CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A (CLEC11A)
1039	-1,63	3,14E-06	CLCN3	chloride channel 3 (CLCN3), tv e
1040	-1,56	3,14E-06	ACSM3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3 (ACSM3),
1041	-1,56	3,16E-06	HS,25892	cDNA FLJ38860 fis, clone MESAN2011977
1042	1,69	3,18E-06	ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B (ARL5B)
1043	1,99	3,18E-06	JMJD1C	jumonji domain containing 1C (JMJD1C),
1044	1,65	3,20E-06	CD63	CD63 molecule (CD63),
1045	-1,80	3,20E-06	CPNE1	copine I (CPNE1), tv 8
1046	-1,62	3,20E-06	CEPT1	choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1),
1047	-1,71	3,21E-06	WDR77	WD repeat domain 77 (WDR77)
1048	-1,68	3,24E-06	CTPS2	CTP synthase II (CTPS2),
1049	1,57	3,33E-06	FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 (FLRT2)
1050	-1,62	3,34E-06	HPSE	heparanase (HPSE)
1051	1,73	3,36E-06	PCBP4	poly(rC) binding protein 4 (PCBP4),
1052	-1,71	3,37E-06	FAM149A	family with sequence similarity 149, member A (FAM149A),
1053	-1,52	3,37E-06	DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10 (DNAJC10)
1054	1,50	3,38E-06	RAB24	RAB24, member RAS oncogene family (RAB24),
1055	-1,95	3,38E-06	C20ORF177	chromosome 20 open reading frame 177 (C20orf177)
1056	1,79	3,39E-06	C3ORF14	chromosome 3 open reading frame 14 (C3orf14)

1057	-1,54	3,44E-06	OSTC	oligosaccharyltransferase complex subunit (OSTC)
1058	1,65	3,46E-06	ZNF672	zinc finger protein 672 (ZNF672)
1059	-1,53	3,47E-06	INTS5	integrator complex subunit 5 (INTS5)
1060	-1,67	3,47E-06	NME7	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) (NME7),
1061	-1,69	3,50E-06	NAAA	N-acylethanolamine acid amidase (NAAA),
1062	1,72	3,51E-06	TBX1	T-box 1 (TBX1), tv B
1063	2,21	3,52E-06	DUSP4	dual specificity phosphatase 4 (DUSP4),
1064	2,21	3,57E-06	ITPRIPL2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 2 (ITPRIPL2)
1065	1,63	3,58E-06	MTMR6	myotubularin related protein 6 (MTMR6)
1066	-1,65	3,58E-06	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta (DNMT3B),
1067	-1,52	3,58E-06	EED	embryonic ectoderm development (EED),
1068	-1,54	3,58E-06	C1ORF123	chromosome 1 open reading frame 123 (C1orf123)
1069	-1,58	3,59E-06	DLEU1	deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding) (DLEU1), non-coding RNA,
1070	-1,58	3,61E-06	MLLT6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
1071	-1,63	3,61E-06	RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa (RFC1)
1072	1,72	3,65E-06	C20ORF46	chromosome 20 open reading frame 46 (C20orf46)
1073	-1,50	3,67E-06	NR2E1	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 (NR2E1)
1074	1,73	3,72E-06	H1FX	H1 histone family, member X (H1FX)
1075	-1,55	3,80E-06	TMEM41B	transmembrane protein 41B (TMEM41B)
1076	-1,61	3,83E-06	PRPF19	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S, cerevisiae) (PRPF19)
1077	1,55	3,84E-06	GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) (GGH)
1078	-1,61	3,86E-06	GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1)
1079	2,15	3,90E-06	FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3),
1080	-1,69	3,91E-06	TRIM44	tripartite motif-containing 44 (TRIM44)
1081	2,12	3,91E-06	CRLF1	cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1)
1082	-1,60	3,92E-06	SLC25A37	solute carrier family 25, member 37 (SLC25A37),
1083	-1,53	3,93E-06	HS,31532	cDNA FLJ26784 fis, clone PRS04220
1084	1,51	3,95E-06	SIX3	sine oculis homeobox homolog 3 (Drosophila) (SIX3)
1085	-1,59	3,97E-06	BCS1L	BCS1-like (yeast) (BCS1L), ,
1086	-1,53	3,99E-06	ALS2CR4	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 4
1087	-1,63	3,99E-06	CCDC25	coiled-coil domain containing 25 (CCDC25)
1088	1,74	3,99E-06	SPATA2L	spermatogenesis associated 2-like (SPATA2L)
1089	-1,51	3,99E-06	NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma (NFYC)
1090	1,60	4,01E-06	SEPHS2	selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2)
1091	1,68	4,02E-06	CD99L2	CD99 molecule-like 2 (CD99L2),
1092	-1,50	4,02E-06	C2ORF25	chromosome 2 open reading frame 25 (C2orf25)
1093	-1,56	4,02E-06	MCEE	methylmalonyl CoA epimerase (MCEE)
1094	-1,74	4,02E-06	MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila) (MBNL2),
1095	1,81	4,02E-06	EIF2C2	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2 (EIF2C2)
1096	1,63	4,05E-06	CCNE1	cyclin E1 (CCNE1),
1097	1,52	4,05E-06	GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
1098	-1,56	4,05E-06	AASDHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase (AAS-DHPPT)
1099	-1,60	4,15E-06	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)
1100	1,62	4,18E-06	NPLOC4	nuclear protein localization 4 homolog (S, cerevisiae) (NPLOC4)
1101	-1,54	4,23E-06	SEH1L	SEH1-like (S, cerevisiae) (SEH1L),
1102	-1,60	4,23E-06	NUP35	nucleoporin 35kDa (NUP35)
1103	-1,59	4,24E-06	TCEA3	transcription elongation factor A (SII), 3 (TCEA3)
1104	1,75	4,35E-06	ENDOG	endonuclease G (ENDOG),
1105	2,07	4,35E-06	TMEM145	transmembrane protein 145 (TMEM145)
1106	-1,56	4,36E-06	CLPX	ClpX caseinolytic peptidase X homolog (E, coli) (CLPX)
1107	1,60	4,38E-06	AGPAT5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5
1108	-1,51	4,39E-06	SDCCAG3	serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3),
1109	-1,59	4,40E-06	FAM5C	family with sequence similarity 5, member C (FAM5C)

1110	-1,75	4,50E-06	DEAF1	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila) (DEAF1)
1111	-1,59	4,57E-06	F8A1	coagulation factor VIII-associated (intronic transcript) 1 (F8A1)
1112	-1,61	4,58E-06	DOLK	dolichol kinase (DOLK)
1113	-1,78	4,61E-06	FBXO4	F-box protein 4 (FBXO4),
1114	-1,98	4,63E-06	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B (PPAP2B),
1115	-1,61	4,73E-06	KRT222	keratin 222 (KRT222)
1116	-1,65	4,74E-06	ATG4C	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S, cerevisiae) (ATG4C), tv 7
1117	-1,88	4,75E-06	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian) (MAF),
1118	-1,54	4,76E-06	MARCH7	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7)
1119	-1,53	4,81E-06	DYNC1I2	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2 (DYNC1I2)
1120	1,60	4,83E-06	KIAA1274	KIAA1274 (KIAA1274)
1121	-1,67	4,85E-06	ELF2	E74-like factor 2 (ets domain transcription factor) (ELF2),
1122	-1,75	4,91E-06	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial) (GPD2), ,
1123	-1,63	4,91E-06	EIF2C3	eukaryotic translation initiation factor 2C, 3 (EIF2C3),
1124	1,61	4,98E-06	GPC4	glypican 4 (GPC4)
1125	1,83	5,00E-06	METRNL	meteorin, glial cell differentiation regulator-like (METRNL)
1126	-1,51	5,03E-06	KIAA1712	KIAA1712 (KIAA1712)
1127	1,57	5,03E-06	TFPT	TCF3 (E2A) fusion partner (in childhood Leukemia) (TFPT)
1128	-1,73	5,12E-06	EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2 (EFEMP2)
1129	1,54	5,12E-06	LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), tv LAMP2B
1130	1,61	5,12E-06	CBLN3	cerebellin 3 precursor (CBLN3)
1131	-1,73	5,12E-06	DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4)
1132	-1,61	5,14E-06	GALNT13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13
1133	-1,53	5,14E-06	MPI	mannose phosphate isomerase (MPI)
1134	-1,60	5,14E-06	RWDD2B	RWD domain containing 2B (RWDD2B)
1135	-1,64	5,14E-06	B3GALNT1	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group) (B3GALNT1),
1136	-1,51	5,16E-06	ZC3H15	zinc finger CCCH-type containing 15 (ZC3H15)
1137	-1,58	5,23E-06	DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 (DHRS3)
1138	-1,55	5,25E-06	STXBP3	syntaxin binding protein 3 (STXBP3)
1139	1,78	5,27E-06	PLXNA1	plexin A1 (PLXNA1)
1140	1,64	5,30E-06	LOC651816	PREDICTED: similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2S
1141	-1,59	5,30E-06	B3GNT6	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (B3GNT6)
1142	1,51	5,30E-06	CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1 (CISD1)
1143	-1,64	5,30E-06	EXOSC10	exosome component 10 (EXOSC10),
1144	-1,66	5,30E-06	INTS1	integrator complex subunit 1 (INTS1)
1145	-1,53	5,32E-06	SNORD73A	small nucleolar RNA, C/D box 73A (SNORD73A), small nucleolar RNA,
1146	-1,52	5,34E-06	SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing (SORL1)
1147	-1,68	5,37E-06	C17ORF68	PREDICTED: chromosome 17 open reading frame 68 (C17orf68)
1148	-1,54	5,37E-06	MEIS2	Meis homeobox 2 (MEIS2), tv g
1149	1,57	5,38E-06	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HGS)
1150	-1,58	5,44E-06	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor (PLAUR),
1151	1,78	5,46E-06	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (CEBPA)
1152	-1,63	5,48E-06	ADD3	adducin 3 (gamma) (ADD3),
1153	1,63	5,50E-06	DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2 (DNAJB2),
1154	-1,69	5,56E-06	TPP2	tripeptidyl peptidase II (TPP2)
1155	1,73	5,59E-06	CUTL1	cut-like 1, CCAAT displacement protein (Drosophila) (CUTL1),
1156	-1,64	5,59E-06	SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S, cerevisiae) (SKIV2L2)
1157	-1,67	5,59E-06	FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (FRAP1)
1158	-1,66	5,65E-06	SPINT2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2 (SPINT2)
1159	-1,63	5,67E-06	CCNO	cyclin O (CCNO)
1160	-1,58	5,67E-06	TRA2A	transformer 2 alpha homolog (Drosophila) (TRA2A)
1161	1,72	5,70E-06	ZNF32	zinc finger protein 32 (ZNF32),
1162	-2,36	5,75E-06	YPEL3	yippee-like 3 (Drosophila) (YPEL3),

1163	-1,69	5,75E-06	MAN1B1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1 (MAN1B1)
1164	-1,62	5,76E-06	LOC93622	PREDICTED: hypothetical protein BC006130 (LOC93622), misc RNA,
1165	-1,62	5,84E-06	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1 (MKNK1),
1166	-1,58	5,87E-06	NUDT6	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6 (NUDT6),
1167	-1,61	5,88E-06	UGT8	UDP glycosyltransferase 8 (UDP-galactose ceramide galactosyltransferase) (UGT8)
1168	1,81	5,91E-06	PMM1	phosphomannomutase 1 (PMM1)
1169	-1,52	5,93E-06	TXNDC14	thioredoxin domain containing 14 (TXNDC14)
1170	-1,56	5,95E-06	CCBL2	cysteine conjugate-beta lyase 2 (CCBL2),
1171	-1,55	5,96E-06	TMEM50A	transmembrane protein 50A (TMEM50A)
1172	-1,53	5,96E-06	MFSD8	major facilitator superfamily domain containing 8 (MFSD8)
1173	1,51	5,96E-06	RNF14	ring finger protein 14 (RNF14),
1174	1,63	5,96E-06	LOC731049	PREDICTED: similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2S
1175	-2,83	5,96E-06	NHLH2	nescient helix loop helix 2 (NHLH2)
1176	-1,64	5,97E-06	IARS	isoleucyl-tRNA synthetase (IARS), tv short
1177	-1,62	5,97E-06	AGTRAP	angiotensin II receptor-associated protein (AGTRAP),
1178	-1,60	5,99E-06	TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa (TAF12)
1179	-1,52	5,99E-06	KLHL8	kelch-like 8 (Drosophila) (KLHL8)
1180	1,81	6,08E-06	HS,434957	Homo sapiens, clone IMAGE:3618365, mRNA
1181	1,61	6,18E-06	SIX2	SIX homeobox 2 (SIX2)
1182	-1,54	6,19E-06	TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2 (TM9SF2)
1183	1,56	6,22E-06	TGFBRAP1	transforming growth factor, beta receptor associated protein 1 (TGFBRAP1)
1184	-1,80	6,23E-06	SLC10A4	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4 (SLC10A4)
1185	1,67	6,26E-06	PPP2R5D	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', delta isoform (PPP2R5D),
1186	-1,68	6,29E-06	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS)
1187	-1,51	6,34E-06	RCC2	regulator of chromosome condensation 2 (RCC2)
1188	-1,58	6,34E-06	RWDD4A	RWD domain containing 4A (RWDD4A)
1189	1,71	6,34E-06	GRINA	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1
1190	1,73	6,36E-06	ERICH1	glutamate-rich 1 (ERICH1)
1191	1,63	6,37E-06	CERK	ceramide kinase (CERK),
1192	-1,54	6,37E-06	AGTRAP	angiotensin II receptor-associated protein (AGTRAP),
1193	1,52	6,39E-06	RNF14	ring finger protein 14 (RNF14),
1194	1,60	6,41E-06	SMOX	spermine oxidase (SMOX),
1195	2,31	6,45E-06	C1QL4	complement component 1, q subcomponent-like 4 (C1QL4)
1196	-1,64	6,58E-06	EXOSC10	exosome component 10 (EXOSC10),
1197	-1,51	6,64E-06	GAP43	growth associated protein 43 (GAP43)
1198	-1,73	6,70E-06	SORD	sorbitol dehydrogenase (SORD)
1199	1,64	6,71E-06	C12ORF32	chromosome 12 open reading frame 32 (C12orf32)
1200	-1,72	6,72E-06	MYO1B	myosin IB (MYO1B)
1201	-1,53	6,73E-06	ACSM3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3 (ACSM3),
1202	-1,70	6,73E-06	HDGF	hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like) (HDGF)
1203	-1,52	6,76E-06	PRMT10	protein arginine methyltransferase 10 (putative) (PRMT10)
1204	-1,60	6,76E-06	APOO	apolipoprotein O (APOO)
1205	1,56	6,76E-06	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3 (MSRB3),
1206	-1,61	6,76E-06	TMEM60	transmembrane protein 60 (TMEM60)
1207	-1,84	6,76E-06	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30 (IFI30)
1208	1,63	6,77E-06	NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa (NCBP2),
1209	-1,68	6,78E-06	SNX12	sorting nexin 12 (SNX12)
1210	-1,54	6,92E-06	AAMP	angio-associated, migratory cell protein (AAMP)
1211	1,82	6,92E-06	SIVA	CD27-binding (Siva) protein (SIVA),
1212	1,58	6,94E-06	AP1M1	adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit (AP1M1)
1213	1,51	7,00E-06	CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide (CYBA)
1214	1,58	7,05E-06	CXORF40B	chromosome X open reading frame 40B (CXorf40B)
1215	1,64	7,11E-06	FN3KRP	fructosamine-3-kinase-related protein (FN3KRP)

1216	-1,80	7,15E-06	MRPL20	mitochondrial ribosomal protein L20 (MRPL20),
1217	1,59	7,16E-06	C20ORF7	chromosome 20 open reading frame 7 (C20orf7),
1218	-3,33	7,16E-06	GAL	galanin prepropeptide (GAL)
1219	-1,51	7,22E-06	ALPK1	alpha-kinase 1 (ALPK1)
1220	-1,56	7,22E-06	TBC1D19	TBC1 domain family, member 19 (TBC1D19)
1221	1,82	7,26E-06	PPARD	peroxisome proliferative activated receptor, delta (PPARD),
1222	1,61	7,31E-06	DSEL	dermatan sulfate epimerase-like (DSEL)
1223	-1,64	7,31E-06	SNAP23	synaptosomal-associated protein, 23kDa (SNAP23),
1224	1,57	7,32E-06	NFIC	nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor) (NFIC),
1225	1,66	7,37E-06	TSPAN17	tetraspanin 17 (TSPAN17),
1226	-1,59	7,40E-06	MCCC1	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha) (MCCC1),
1227	-1,53	7,47E-06	NPAL3	NIPA-like domain containing 3 (NPAL3)
1228	1,52	7,47E-06	INHBB	inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide) (INHBB)
1229	-1,64	7,50E-06	ITPRIPL1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 1 (ITPRIPL1),
1230	-1,51	7,50E-06	CNOT7	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7 (CNOT7),
1231	1,88	7,53E-06	IRF8	interferon regulatory factor 8 (IRF8)
1232	-1,52	7,67E-06	RPA3	replication protein A3, 14kDa (RPA3)
1233	1,66	7,70E-06	AES	amino-terminal enhancer of split (AES),
1234	-1,61	7,72E-06	TUBGCP4	tubulin, gamma complex associated protein 4 (TUBGCP4)
1235	-1,95	7,73E-06	SYNM	synemin, intermediate filament protein (SYNM), tv B
1236	-1,59	7,85E-06	TPP2	tripeptidyl peptidase II (TPP2)
1237	1,63	7,85E-06	ZNF511	zinc finger protein 511 (ZNF511)
1238	-1,68	7,86E-06	C9ORF125	chromosome 9 open reading frame 125 (C9orf125)
1239	-1,66	7,94E-06	CMBL	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas) (CMBL)
1240	1,83	8,03E-06	THOC4	THO complex 4 (THOC4)
1241	1,53	8,03E-06	KIAA1600	KIAA1600 (KIAA1600)
1242	-2,01	8,06E-06	CBS	cystathionine-beta-synthase (CBS)
1243	-1,55	8,08E-06	C4ORF14	chromosome 4 open reading frame 14 (C4orf14)
1244	1,66	8,09E-06	RNF8	ring finger protein 8 (RNF8),
1245	-1,58	8,12E-06	NDUFB11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17,3kDa (NDUFB11)
1246	1,51	8,26E-06	SEC61A2	Sec61 alpha 2 subunit (S, cerevisiae) (SEC61A2)
1247	1,89	8,31E-06	SLC25A10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10
1248	-1,58	8,38E-06	CNN2	calponin 2 (CNN2),
1249	-1,60	8,41E-06	GALK2	galactokinase 2 (GALK2),
1250	-1,51	8,52E-06	ZZZ3	zinc finger, ZZ-type containing 3 (ZZZ3)
1251	-1,67	8,52E-06	ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 (ASCC3),
1252	-1,83	8,60E-06	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B),
1253	-1,62	8,64E-06	CPSF3L	cleavage and polyadenylation specific factor 3-like (CPSF3L)
1254	1,59	8,66E-06	CYB5R3	cytochrome b5 reductase 3 (CYB5R3), tv S
1255	-1,58	8,67E-06	HISPPD2A	histidine acid phosphatase domain containing 2A (HISPPD2A),
1256	-1,52	8,68E-06	RNPC2	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2 (RNPC2),
1257	1,59	8,73E-06	VPS37B	vacuolar protein sorting 37 homolog B (S, cerevisiae) (VPS37B)
1258	-1,57	8,78E-06	RPAP2	RNA polymerase II associated protein 2 (RPAP2)
1259	-1,78	8,79E-06	ATP6V0D1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1 (ATP6V0D1)
1260	-1,64	8,83E-06	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)
1261	1,83	8,88E-06	RALGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS),
1262	1,85	8,90E-06	DYNC1I1	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1 (DYNC1I1)
1263	1,63	8,98E-06	DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1 (DYNLL1),
1264	1,58	8,98E-06	PFKP	phosphofructokinase, platelet (PFKP)
1265	1,57	9,02E-06	FRS3	fibroblast growth factor receptor substrate 3 (FRS3)
1266	1,69	9,03E-06	ZNF586	zinc finger protein 586 (ZNF586)
1267	-1,52	9,05E-06	ILK	integrin-linked kinase (ILK),
1268	-1,52	9,09E-06	SH3D19	SH3 domain containing 19 (SH3D19)

1269	1,60	9,16E-06	SIX5	SIX homeobox 5 (SIX5)
1270	1,59	9,21E-06	ATP6V0E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1 (ATP6V0E1)
1271	-1,65	9,23E-06	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S, cerevisiae) (MRE11A),
1272	1,65	9,23E-06	ALKBH6	alkB, alkylation repair homolog 6 (E, coli) (ALKBH6),
1273	1,63	9,31E-06	KCTD15	potassium channel tetramerisation domain containing 15 (KCTD15)
1274	-1,51	9,44E-06	PEX19	peroxisomal biogenesis factor 19 (PEX19)
1275	-1,59	9,44E-06	GHDC	GH3 domain containing (GHDC)
1276	-1,62	9,44E-06	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding (E2F5),
1277	1,83	9,44E-06	C9ORF116	chromosome 9 open reading frame 116 (C9orf116),
1278	1,93	9,51E-06	C9ORF116	chromosome 9 open reading frame 116 (C9orf116),
1279	-1,77	9,61E-06	PQBP1	polyglutamine binding protein 1 (PQBP1),
1280	-1,64	9,61E-06	DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 (DNAJC12),
1281	1,77	9,61E-06	SLC38A10	solute carrier family 38, member 10 (SLC38A10),
1282	-1,65	9,74E-06	FNBP4	formin binding protein 4 (FNBP4)
1283	2,14	9,81E-06	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 (TACC1)
1284	-1,64	9,86E-06	GLMN	glomulin, FKBP associated protein (GLMN)
1285	-1,58	9,99E-06	ATAD3A	ATPase family, AAA domain containing 3A (ATAD3A)
1286	-1,58	9,99E-06	MTA2	metastasis associated 1 family, member 2 (MTA2)
1287	-1,63	9,99E-06	VPS11	vacuolar protein sorting 11 homolog (S, cerevisiae) (VPS11)
1288	1,53	1,00E-05	ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta) (ADAM19)
1289	1,62	1,03E-05	IFFO1	intermediate filament family orphan 1 (IFFO1),
1290	-1,62	1,03E-05	CLK2	PREDICTED: CDC-like kinase 2, (CLK2)
1291	-1,67	1,06E-05	MGC18216	PREDICTED: hypothetical protein MGC18216 (MGC18216)
1292	1,58	1,06E-05	FHOD3	formin homology 2 domain containing 3 (FHOD3)
1293	1,61	1,06E-05	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3 (LTBP3)
1294	-1,50	1,06E-05	HESX1	HESX homeobox 1 (HESX1)
1295	1,68	1,08E-05	CTGLF3	centaurin, gamma-like family, member 3 (CTGLF3)
1296	-1,61	1,08E-05	PRSS23	protease, serine, 23 (PRSS23)
1297	1,63	1,09E-05	C16ORF80	chromosome 16 open reading frame 80 (C16orf80)
1298	-1,68	1,10E-05	CYORF15A	chromosome Y open reading frame 15A (CYorf15A)
1299	-1,57	1,10E-05	MMP23B	matrix metallopeptidase 23B (MMP23B)
1300	-1,53	1,11E-05	C9ORF103	chromosome 9 open reading frame 103 (C9orf103)
1301	-1,56	1,13E-05	NARG2	NMDA receptor regulated 2 (NARG2),
1302	-1,63	1,13E-05	LIAS	lipoic acid synthetase (LIAS), ,
1303	1,57	1,14E-05	MTMR9	myotubularin related protein 9 (MTMR9)
1304	1,81	1,14E-05	TESC	tescalcin (TESC)
1305	1,50	1,14E-05	TTC28	PREDICTED: tetratricopeptide repeat domain 28 (TTC28)
1306	1,51	1,14E-05	PSAP	prosaposin (PSAP),
1307	1,74	1,15E-05	LOC441150	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 2310039H08 (LOC441150)
1308	-1,52	1,15E-05	MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3 (MAGI3),
1309	-1,64	1,15E-05	EXTL2	exostoses (multiple)-like 2 (EXTL2),
1310	-1,84	1,16E-05	MANSC1	MANSC domain containing 1 (MANSC1)
1311	-1,66	1,16E-05	NCKAP5	NCK-associated protein 5 (NCKAP5),
1312	-1,83	1,16E-05	CACNA1H	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit (CACNA1H),
1313	-1,61	1,16E-05	FERMT1	fermitin family homolog 1 (Drosophila) (FERMT1)
1314	-1,51	1,17E-05	YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 (YES1)
1315	-1,69	1,21E-05	GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase
1316	-2,70	1,21E-05	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa (TAF15)
1317	1,63	1,21E-05	ZYX	zyxin (ZYX),
1318	-1,64	1,22E-05	COMMD9	COMM domain containing 9 (COMMD9)
1319	1,51	1,24E-05	CYTSA	cytospin A (CYTSA)
1320	-1,97	1,25E-05	KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6) (KPNA5)
1321	-1,59	1,25E-05	ZNF330	zinc finger protein 330 (ZNF330)

1322	-1,63	1,26E-05	GSPT2	G1 to S phase transition 2 (GSPT2)
1323	-1,75	1,27E-05	STYXL1	serine/threonine/tyrosine interacting-like 1 (STYXL1)
1324	-1,54	1,30E-05	SPCS3	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S, cerevisiae) (SPCS3)
1325	1,66	1,33E-05	EIF4ENIF1	eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1 (EIF4ENIF1)
1326	-1,57	1,35E-05	FANCL	Fanconi anemia, complementation group L (FANCL)
1327	4,51	1,36E-05	ZCCHC12	zinc finger, CCHC domain containing 12 (ZCCHC12)
1328	1,83	1,36E-05	SPG3A	spastic paraplegia 3A (autosomal dominant) (SPG3A),
1329	2,32	1,36E-05	SMPX	small muscle protein, X-linked (SMPX)
1330	1,52	1,37E-05	ZNF416	zinc finger protein 416 (ZNF416)
1331	1,76	1,38E-05	WDR21A	WD repeat domain 21A (WDR21A),
1332	-1,52	1,39E-05	RIC8A	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog A (C, elegans) (RIC8A)
1333	1,66	1,39E-05	DIRC2	disrupted in renal carcinoma 2 (DIRC2)
1334	-1,68	1,39E-05	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (SLC1A3)
1335	1,51	1,42E-05	C19ORF50	chromosome 19 open reading frame 50 (C19orf50)
1336	1,59	1,43E-05	C14ORF78	PREDICTED: chromosome 14 open reading frame 78 (C14orf78)
1337	1,73	1,43E-05	LMNA	lamin A/C (LMNA),
1338	1,87	1,44E-05	AFF3	AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3),
1339	1,52	1,44E-05	ZNF318	zinc finger protein 318 (ZNF318)
1340	2,05	1,45E-05	FBLN1	fibulin 1 (FBLN1), tv A
1341	-1,53	1,45E-05	CCS	copper chaperone for superoxide dismutase (CCS)
1342	-1,59	1,46E-05	UQCC	ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone (UQCC), ,
1343	-1,53	1,47E-05	CYP20A1	cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1 (CYP20A1)
1344	1,70	1,48E-05	JMJD1C	jumonji domain containing 1C (JMJD1C),
1345	1,97	1,48E-05	BRI3BP	BRI3 binding protein (BRI3BP)
1346	-1,67	1,49E-05	HRSP12	heat-responsive protein 12 (HRSP12)
1347	-1,60	1,52E-05	CC2D2A	coiled-coil and C2 domain containing 2A (CC2D2A)
1348	-1,66	1,52E-05	MAP7	microtubule-associated protein 7 (MAP7)
1349	-1,54	1,52E-05	DCPS	decapping enzyme, scavenger (DCPS)
1350	-1,57	1,52E-05	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2),
1351	-1,66	1,52E-05	MAGED1	melanoma antigen family D, 1 (MAGED1),
1352	1,63	1,52E-05	PRR5	proline rich 5 (renal) (PRR5),
1353	-1,74	1,53E-05	PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform (PPP3R1)
1354	2,03	1,54E-05	HPS6	Hermansky-Pudlak syndrome 6 (HPS6)
1355	-1,65	1,55E-05	DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 (DNAJC12),
1356	1,60	1,55E-05	PSMC4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4 (PSMC4),
1357	1,65	1,55E-05	RUNX1	runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene) (RUNX1),
1358	1,67	1,57E-05	IL12A	interleukin 12A
1359	1,51	1,57E-05	CDC25B	cell division cycle 25 homolog B (S, pombe) (CDC25B),
1360	1,59	1,59E-05	C16ORF61	chromosome 16 open reading frame 61 (C16orf61)
1361	1,55	1,64E-05	ZNF185	zinc finger protein 185 (LIM domain) (ZNF185)
1362	-1,52	1,66E-05	FAM117B	family with sequence similarity 117, member B (FAM117B)
1363	-1,57	1,67E-05	VCX3A	variable charge, X-linked 3A (VCX3A)
1364	1,60	1,68E-05	STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 (STEAP1)
1365	-1,73	1,69E-05	SCRN1	secernin 1 (SCRN1)
1366	-2,12	1,70E-05	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, Subfamily a, member 1
1367	3,56	1,71E-05	STC1	stanniocalcin 1 (STC1)
1368	1,58	1,73E-05	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa (SNAP25),
1369	-1,58	1,75E-05	FASTKD1	FAST kinase domains 1 (FASTKD1)
1370	-1,76	1,76E-05	LYPD6B	LY6/PLAUR domain containing 6B (LYPD6B)
1371	1,50	1,76E-05	NANP	N-acetylneuraminic acid phosphatase (NANP)
1372	-1,63	1,76E-05	PET112L	PET112-like (yeast) (PET112L)
1373	-1,80	1,76E-05	ZFYVE26	zinc finger, FYVE domain containing 26 (ZFYVE26)
1374	-2,25	1,77E-05	SYK	spleen tyrosine kinase (SYK)

1375	-2,09	1,78E-05	BAI3	brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3)
1376	1,54	1,78E-05	KLF11	PREDICTED: Kruppel-like factor 11 (KLF11)
1377	-1,64	1,79E-05	TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A3
1378	1,86	1,80E-05	HMGB1L1	high-mobility group box 1-like 1 (HMGB1L1)
1379	1,52	1,80E-05	EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B (EIF1B)
1380	-1,55	1,81E-05	NMD3	NMD3 homolog (S, cerevisiae) (NMD3)
1381	-1,59	1,81E-05	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B (PPAP2B),
1382	-1,90	1,82E-05	ZIC2	Zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila) (ZIC2)
1383	-1,52	1,82E-05	C20ORF111	chromosome 20 open reading frame 111 (C20orf111)
1384	1,53	1,82E-05	EVI5L	ecotropic viral integration site 5-like (EVI5L)
1385	-1,51	1,85E-05	RPL9	ribosomal protein L9 (RPL9),
1386	-1,61	1,85E-05	C11ORF61	chromosome 11 open reading frame 61 (C11orf61)
1387	-1,52	1,85E-05	PLIN2	perilipin 2 (PLIN2)
1388	-1,53	1,85E-05	EI24	etoposide induced 2,4 mRNA (EI24),
1389	-2,16	1,89E-05	HOPX	HOP homeobox (HOPX),
1390	1,64	1,89E-05	CENPA	centromere protein A (CENPA),
1391	-1,63	1,92E-05	FAM71E1	family with sequence similarity 71, member E1 (FAM71E1)
1392	-1,53	1,92E-05	ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3),
1393	-1,71	1,94E-05	LAMB1	laminin, beta 1 (LAMB1)
1394	2,05	1,96E-05	RAB36	RAB36, member RAS oncogene family (RAB36)
1395	-1,56	1,97E-05	UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1 (UBR1)
1396	1,82	1,99E-05	SIVA	CD27-binding (Siva) protein (SIVA),
1397	-1,57	2,00E-05	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2),
1398	1,60	2,00E-05	PSPC1	paraspeckle component 1 (PSPC1), tv beta, transcribed RNA,
1399	-1,61	2,04E-05	ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5 (ARMCX5)
1400	-1,51	2,06E-05	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1 (PLAGL1),
1401	1,53	2,07E-05	CLPTM1	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 (CLPTM1)
1402	1,68	2,08E-05	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (TNFRSF1A)
1403	-1,55	2,11E-05	KDM4D	lysine (K)-specific demethylase 4D (KDM4D)
1404	-1,56	2,11E-05	CYCSL1	cytochrome c, somatic-like 1 (CYCSL1) on chromosome 6,
1405	-1,50	2,12E-05	FAM13A	family with sequence similarity 13, member A (FAM13A),
1406	1,60	2,13E-05	STXBP6	syntaxin binding protein 6 (amisyn) (STXBP6)
1407	-1,83	2,15E-05	SPATA18	spermatogenesis associated 18 homolog (rat) (SPATA18)
1408	-1,57	2,15E-05	OSBP	oxysterol binding protein (OSBP)
1409	1,52	2,18E-05	PPP4R4	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4 (PPP4R4),
1410	1,53	2,18E-05	VWA5A	von Willebrand factor A domain containing 5A (VWA5A),
1411	-1,72	2,18E-05	CROP	cisplatin resistance-associated overexpressed protein (CROP),
1412	-1,59	2,18E-05	BLCAP	bladder cancer associated protein (BLCAP)
1413	-1,57	2,21E-05	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE)
1414	1,63	2,21E-05	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B (WNT5B),
1415	-1,62	2,22E-05	LOC728758	hCG1789710 (LOC728758)
1416	-1,55	2,23E-05	TJP1	tight junction protein 1 (zona occludens 1) (TJP1),
1417	-2,54	2,23E-05	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1),
1418	1,99	2,27E-05	FAM174A	family with sequence similarity 174, member A (FAM174A)
1419	1,65	2,27E-05	JAG2	jagged 2 (JAG2),
1420	1,76	2,27E-05	PRR5	proline rich 5 (renal) (PRR5),
1421	1,79	2,28E-05	GPR137C	G protein-coupled receptor 137C (GPR137C)
1422	1,56	2,30E-05	STAG1	stromal antigen 1 (STAG1)
1423	1,56	2,31E-05	BAI1	PREDICTED: brain-specific angiogenesis inhibitor 1, (BAI1)
1424	1,71	2,34E-05	ATP6V0E2	ATPase, H+ transporting V0 subunit e2 (ATP6V0E2),
1425	1,55	2,37E-05	LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2 (LYSMD2)
1426	-1,58	2,42E-05	CHN1	chimerin (chimaerin) 1 (CHN1),
1427	1,51	2,43E-05	FAM174B	family with sequence similarity 174, member B (FAM174B)

1428	1,54	2,46E-05	CSGALNACT2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (CSGALNACT2)
1429	-2,01	2,46E-05	ACP6	acid phosphatase 6, lysophosphatidic (ACP6)
1430	1,51	2,46E-05	RHBDL1	rhomboid, veinlet-like 1 (Drosophila) (RHBDL1)
1431	1,51	2,46E-05	LSM8	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S, cerevisiae) (LSM8)
1432	-1,61	2,46E-05	GTF2H1	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa (GTF2H1)
1433	-1,52	2,46E-05	LPIN2	lipin 2 (LPIN2)
1434	-1,61	2,47E-05	RND2	Rho family GTPase 2 (RND2)
1435	-1,57	2,47E-05	CTSA	cathepsin A (CTSA),
1436	-1,51	2,49E-05	KIAA0090	KIAA0090 (KIAA0090)
1437	-1,55	2,52E-05	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2 (SLC35F2)
1438	-1,61	2,52E-05	SIK3	SIK family kinase 3 (SIK3)
1439	1,78	2,52E-05	BEGAIN	brain-enriched guanylate kinase-associated homolog (rat) (BEGAIN)
1440	-1,53	2,56E-05	ABCA11	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 11 (pseudogene)
1441	-1,59	2,56E-05	NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component (S, cerevisiae) (NDC80)
1442	-1,60	2,57E-05	SVEP1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
1443	1,93	2,58E-05	RAI1	retinoic acid induced 1 (RAI1)
1444	-1,59	2,59E-05	BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A2 (BTN3A2)
1445	1,54	2,66E-05	C6ORF1	chromosome 6 open reading frame 1 (C6orf1),
1446	1,64	2,67E-05	GRAMD4	GRAM domain containing 4 (GRAMD4)
1447	1,55	2,71E-05	EMX2	empty spiracles homeobox 2 (EMX2)
1448	1,59	2,72E-05	CARD10	caspase recruitment domain family, member 10 (CARD10)
1449	1,76	2,78E-05	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1),
1450	1,73	2,79E-05	BAD	BCL2-antagonist of cell death (BAD),
1451	1,66	2,81E-05	ALG1L	asparagine-linked glycosylation 1-like (ALG1L)
1452	-1,60	2,82E-05	PLEKHA9	pleckstrin homology domain containing, family A member 9
1453	1,61	2,83E-05	ASPSCR1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1 (ASPSCR1)
1454	1,73	2,86E-05	LOC648399	PREDICTED: similar to Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor
1455	-1,55	2,86E-05	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta (DNMT3B),
1456	-1,53	2,86E-05	ASB6	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6 (ASB6),
1457	1,61	2,87E-05	MYL5	myosin, light chain 5, regulatory (MYL5)
1458	1,50	2,88E-05	CNPY3	canopy 3 homolog (zebrafish) (CNPY3)
1459	-1,69	2,89E-05	MCOLN3	mucolipin 3 (MCOLN3)
1460	2,08	2,90E-05	ZNF323	zinc finger protein 323 (ZNF323),
1461	-1,51	2,91E-05	SNX19	sorting nexin 19 (SNX19)
1462	1,60	2,96E-05	CCDC50	coiled-coil domain containing 50 (CCDC50),
1463	1,67	2,96E-05	HS,567759	cDNA FLJ38153 fis, clone DFNES1000083
1464	-1,54	2,96E-05	WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2 (WIPI2),
1465	1,56	2,98E-05	FRMD6	FERM domain containing 6 (FRMD6),
1466	-1,60	3,00E-05	SEMA4D	sema domain, (semaphorin) 4D
1467	1,61	3,02E-05	ZNF74	zinc finger protein 74 (ZNF74),
1468	-1,50	3,02E-05	DSCR3	Down syndrome critical region gene 3 (DSCR3)
1469	-1,59	3,02E-05	ATP9A	ATPase, class II, type 9A (ATP9A)
1470	3,35	3,03E-05	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3),
1471	-1,61	3,04E-05	MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila) (MBNL2),
1472	1,64	3,12E-05	LOC646786	PREDICTED: similar to Afadin (AF-6 protein) (LOC646786)
1473	1,63	3,14E-05	NKD2	naked cuticle homolog 2 (Drosophila) (NKD2)
1474	-1,52	3,15E-05	RNF20	ring finger protein 20 (RNF20)
1475	1,86	3,15E-05	TMEM173	transmembrane protein 173 (TMEM173),
1476	-1,64	3,16E-05	TP53BP1	tumor protein p53 binding protein 1 (TP53BP1)
1477	1,60	3,17E-05	SRP19	signal recognition particle 19kDa (SRP19)
1478	-1,83	3,23E-05	NDRG4	NDRG family member 4 (NDRG4)
1479	-1,55	3,23E-05	ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4 (ATP2B4),
1480	2,04	3,23E-05	C1QTNF6	C1q and tumor necrosis factor related protein 6 (C1QTNF6),

1481	-1,73	3,23E-05	ZRANB2	zinc finger, RAN-binding domain containing 2 (ZRANB2),
1482	1,59	3,23E-05	NME1-NME2	NME1-NME2 readthrough (NME1-NME2)
1483	1,55	3,25E-05	NFIA	nuclear factor I/A (NFIA)
1484	1,69	3,26E-05	PLXDC2	plexin domain containing 2 (PLXDC2)
1485	1,74	3,26E-05	KIAA1279	KIAA1279 (KIAA1279)
1486	1,66	3,27E-05	METRNL	PREDICTED: meteorin, glial cell differentiation regulator-like (METRNL)
1487	-1,53	3,28E-05	LRRC16	leucine rich repeat containing 16 (LRRC16)
1488	-1,55	3,34E-05	RPL6	ribosomal protein L6 (RPL6),
1489	-1,51	3,35E-05	CYBRD1	cytochrome b reductase 1 (CYBRD1)
1490	1,77	3,35E-05	KCNJ4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (KCNJ4),
1491	-1,80	3,39E-05	SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A)
1492	1,59	3,40E-05	HOXB2	homeobox B2 (HOXB2)
1493	-1,50	3,41E-05	TUT1	terminal uridylyl transferase 1, U6 snRNA-specific (TUT1)
1494	-1,59	3,41E-05	C1ORF97	chromosome 1 open reading frame 97 (C1orf97)
1495	1,54	3,43E-05	SLC35B4	solute carrier family 35, member B4 (SLC35B4)
1496	-1,64	3,47E-05	ING1	inhibitor of growth family, member 1 (ING1),
1497	-1,57	3,51E-05	NT5DC1	5'-nucleotidase domain containing 1 (NT5DC1)
1498	-1,63	3,54E-05	COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb (COX7B),
1499	1,53	3,55E-05	ZC3H3	zinc finger CCCH-type containing 3 (ZC3H3)
1500	1,59	3,55E-05	ALG13	asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S, cerevisiae) (ALG13)
1501	-1,53	3,56E-05	HS,283402	cDNA clone IMAGE:5272804
1502	-1,64	3,59E-05	C11ORF61	chromosome 11 open reading frame 61 (C11orf61)
1503	-1,67	3,59E-05	SRPX	sushi-repeat-containing protein, X-linked (SRPX)
1504	-1,51	3,59E-05	C4ORF16	chromosome 4 open reading frame 16 (C4orf16)
1505	1,68	3,60E-05	ANKRD16	ankyrin repeat domain 16 (ANKRD16),
1506	1,64	3,62E-05	SULT1A2	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2 (SULT1A2),
1507	-1,51	3,63E-05	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (ITPR1),
1508	1,57	3,66E-05	CENPA	centromere protein A (CENPA),
1509	1,78	3,68E-05	FLNA	filamin A, alpha (actin binding protein 280) (FLNA)
1510	1,52	3,69E-05	AP3D1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit (AP3D1),
1511	1,56	3,74E-05	FAM190B	family with sequence similarity 190, member B (FAM190B)
1512	1,55	3,75E-05	PLEKHG3	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3
1513	-1,52	3,76E-05	POLR2G	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G (POLR2G)
1514	1,63	3,81E-05	CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3 (CMTM3),
1515	1,63	3,89E-05	CYB561D2	cytochrome b-561 domain containing 2 (CYB561D2)
1516	-1,51	3,90E-05	FAM13A	family with sequence similarity 13, member A (FAM13A),
1517	1,51	3,90E-05	MAP3K2	PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (MAP3K2)
1518	-1,65	3,91E-05	MYL12A	myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric (MYL12A)
1519	-1,51	3,94E-05	NUP214	nucleoporin 214kDa (NUP214)
1520	-1,55	3,94E-05	OMA1	OMA1 homolog, zinc metallopeptidase (S, cerevisiae) (OMA1)
1521	1,58	4,00E-05	LRP10	low density lipoprotein receptor-related protein 10 (LRP10)
1522	-1,58	4,01E-05	PLS1	plastin 1 (I isoform) (PLS1)
1523	1,53	4,02E-05	RNF130	ring finger protein 130 (RNF130)
1524	-2,09	4,03E-05	ZNF503	zinc finger protein 503 (ZNF503)
1525	1,55	4,04E-05	DAZAP2	DAZ associated protein 2 (DAZAP2)
1526	1,66	4,09E-05	TSC22D1	TSC22 domain family, member 1 (TSC22D1),
1527	-1,53	4,13E-05	VWCE	von Willebrand factor C and EGF domains (VWCE)
1528	-1,51	4,14E-05	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1),
1529	-1,51	4,14E-05	PUM1	pumilio homolog 1 (Drosophila) (PUM1),
1530	1,50	4,14E-05	CENPN	centromere protein N (CENPN)
1531	-1,57	4,14E-05	ERMAP	erythroblast membrane-associated protein (Scianna blood group) (ERMAP),
1532	-1,59	4,14E-05	RAB33B	RAB33B, member RAS oncogene family (RAB33B)
1533	1,67	4,23E-05	CSNK1D	casein kinase 1, delta (CSNK1D),

1534	-2,19	4,23E-05	MATK	megakaryocyte-associated tyrosine kinase (MATK),
1535	-1,72	4,30E-05	PPP2R2A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform (PPP2R2A)
1536	-1,59	4,39E-05	PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2 (PTBP2)
1537	1,60	4,46E-05	ZNF329	zinc finger protein 329 (ZNF329)
1538	-1,78	4,46E-05	CSTF3	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa (CSTF3),
1539	1,59	4,47E-05	SAMM50	sorting and assembly machinery component 50 homolog (S, cerevisiae) (SAMM50)
1540	1,68	4,48E-05	DYNLL2	dynein, light chain, LC8-type 2 (DYNLL2)
1541	-1,52	4,51E-05	HS,444329	mRNA; cDNA DKFZp686H20120 (from clone DKFZp686H20120)
1542	1,59	4,62E-05	OSBP2	oxysterol binding protein 2 (OSBP2),
1543	-1,91	4,63E-05	UBR4	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4 (UBR4)
1544	1,67	4,67E-05	PGBD5	piggyBac transposable element derived 5 (PGBD5)
1545	-1,56	4,78E-05	HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL), , transcribed RNA,
1546	2,96	4,81E-05	SHISA2	shisa homolog 2 (Xenopus laevis) (SHISA2)
1547	1,60	4,82E-05	PAFAH1B3	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kDa (PAFAH1B3)
1548	1,57	4,87E-05	AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3 (AGAP3),
1549	1,71	4,88E-05	C19ORF10	chromosome 19 open reading frame 10 (C19orf10)
1550	1,50	4,89E-05	APPL1	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1
1551	-1,64	4,91E-05	RAD1	RAD1 homolog (S, pombe) (RAD1),
1552	1,62	4,92E-05	OAT	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy) (OAT),
1553	-1,65	4,94E-05	CABC1	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex homolog (S, pombe) (CABC1),
1554	1,77	4,94E-05	MEX3D	mex-3 homolog D (C, elegans) (MEX3D),
1555	1,54	4,94E-05	RFNG	PREDICTED: radical fringe homolog (Drosophila) (RFNG)
1556	1,62	4,99E-05	RARA	retinoic acid receptor, alpha (RARA),
1557	1,54	5,08E-05	TMEM115	transmembrane protein 115 (TMEM115)
1558	-1,53	5,09E-05	NUDT11	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11 (NUDT11)
1559	1,60	5,09E-05	UBE2Q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2 (UBE2Q2)
1560	-1,53	5,17E-05	KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10 (KBTBD10)
1561	-1,62	5,24E-05	MAGED1	melanoma antigen family D, 1 (MAGED1),
1562	1,52	5,27E-05	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2),
1563	-1,53	5,30E-05	RSAD1	radical S-adenosyl methionine domain containing 1 (RSAD1)
1564	-1,53	5,30E-05	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6),
1565	-1,52	5,30E-05	PDDC1	Parkinson disease 7 domain containing 1 (PDDC1)
1566	1,86	5,31E-05	ATP6V1B1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1 (ATP6V1B1)
1567	-1,78	5,37E-05	CYP4V2	cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2 (CYP4V2)
1568	1,60	5,42E-05	HOXA3	homeobox A3 (HOXA3),
1569	-1,51	5,48E-05	INTS1	PREDICTED: integrator complex subunit 1, 1 (INTS1)
1570	1,73	5,49E-05	PPP2R2D	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta isoform (PPP2R2D),
1571	1,75	5,49E-05	ALG1L	asparagine-linked glycosylation 1-like (ALG1L)
1572	1,51	5,49E-05	SYDE1	synapse defective 1, Rho GTPase, homolog 1 (C, elegans) (SYDE1)
1573	1,55	5,55E-05	CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7 (CMTM7),
1574	1,55	5,58E-05	TAPBP	TAP binding protein (tapasin) (TAPBP),
1575	2,18	5,59E-05	SMAD6	SMAD family member 6 (SMAD6),
1576	-1,54	5,60E-05	ZNF451	zinc finger protein 451 (ZNF451),
1577	-1,79	5,61E-05	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1),
1578	-1,56	5,68E-05	PDPR	PREDICTED: pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit (PDPR)
1579	1,65	5,75E-05	NFIB	nuclear factor I/B (NFIB)
1580	-1,56	5,87E-05	HELLS	helicase, lymphoid-specific (HELLS)
1581	1,51	5,98E-05	NPC2	Niemann-Pick disease, type C2 (NPC2)
1582	1,67	6,01E-05	ULK2	unc-51-like kinase 2 (C, elegans) (ULK2)
1583	1,64	6,17E-05	TCTEX1D2	Tctex1 domain containing 2 (TCTEX1D2)
1584	-1,65	6,19E-05	LOC649555	PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 4E
1585	1,51	6,22E-05	DEGS1	degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase (Drosophila) (DEGS1),
1586	1,72	6,24E-05	ZNF682	zinc finger protein 682 (ZNF682),

1587	2,33	6,26E-05	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) (FEZ1),
1588	1,56	6,33E-05	STAG1	stromal antigen 1 (STAG1)
1589	-1,56	6,39E-05	DUT	deoxyuridine triphosphatase (DUT), ,
1590	-1,57	6,40E-05	MGC3032	PREDICTED: hypothetical protein MGC3032, (MGC3032)
1591	1,58	6,50E-05	NCOA1	nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1),
1592	1,76	6,56E-05	AVPI1	arginine vasopressin-induced 1 (AVPI1)
1593	1,62	6,61E-05	RNF6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6 (RNF6),
1594	1,51	6,66E-05	RNF144	ring finger protein 144 (RNF144)
1595	-1,51	6,66E-05	TFCP2L1	transcription factor CP2-like 1 (TFCP2L1)
1596	-1,60	6,77E-05	SH3GL2	SH3-domain GRB2-like 2 (SH3GL2)
1597	-1,92	6,78E-05	CLK1	CDC-like kinase 1 (CLK1),
1598	1,57	6,78E-05	ZNF580	zinc finger protein 580 (ZNF580),
1599	1,51	6,78E-05	PLEKHF1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1
1600	-1,52	6,78E-05	ANKRD43	ankyrin repeat domain 43 (ANKRD43)
1601	-1,59	6,90E-05	ENAH	enabled homolog (Drosophila) (ENAH),
1602	-1,53	6,98E-05	NUDT6	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6 (NUDT6),
1603	-1,52	7,00E-05	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase (TNIK)
1604	1,62	7,05E-05	NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa (NCBP2),
1605	1,74	7,12E-05	EMP3	epithelial membrane protein 3 (EMP3)
1606	1,55	7,28E-05	TSPAN33	tetraspanin 33 (TSPAN33)
1607	-1,61	7,33E-05	SCG5	secretogranin V (7B2 protein) (SCG5)
1608	1,51	7,38E-05	YIPF4	Yip1 domain family, member 4 (YIPF4)
1609	2,26	7,43E-05	FLJ35767	FLJ35767 protein (FLJ35767)
1610	1,60	7,43E-05	PHLPP2	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2 (PHLPP2)
1611	-1,59	7,50E-05	ANKRD17	ankyrin repeat domain 17 (ANKRD17),
1612	-1,76	7,50E-05	AVEN	apoptosis, caspase activation inhibitor (AVEN)
1613	1,54	7,53E-05	UNC84B	unc-84 homolog B (C, elegans) (UNC84B)
1614	-1,85	7,53E-05	FADS1	fatty acid desaturase 1 (FADS1)
1615	-1,52	7,59E-05	TIGD2	tigger transposable element derived 2 (TIGD2)
1616	-1,65	7,65E-05	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2 (PSMA2)
1617	1,57	7,75E-05	ZFAND3	zinc finger, AN1-type domain 3 (ZFAND3)
1618	1,64	7,79E-05	WBP5	WW domain binding protein 5 (WBP5),
1619	1,57	7,82E-05	MOBK1B	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast) (MOBK1B)
1620	-1,54	7,83E-05	RP2	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive) (RP2)
1621	-1,50	7,83E-05	PPIE	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E) (PPIE),
1622	-1,51	7,90E-05	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2),
1623	1,50	7,93E-05	RDBP	RD RNA binding protein (RDBP)
1624	-1,64	7,94E-05	ABCA3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3 (ABCA3)
1625	-1,54	7,99E-05	FAM184A	family with sequence similarity 184, member A (FAM184A),
1626	1,59	8,10E-05	Sep-03	septin 3 (SEPT3), tv B
1627	-1,72	8,15E-05	ANP32C	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member C (ANP32C)
1628	1,53	8,18E-05	LOC205251	PREDICTED: misc_RNA (LOC205251), miscRNA,
1629	-1,51	8,19E-05	CEP152	centrosomal protein 152kDa (CEP152)
1630	1,55	8,39E-05	CCDC137	coiled-coil domain containing 137 (CCDC137)
1631	1,87	8,51E-05	FILIP1	filamin A interacting protein 1 (FILIP1)
1632	1,51	8,61E-05	KLF11	PREDICTED: Kruppel-like factor 11 (KLF11)
1633	1,76	8,76E-05	EFNA1	ephrin-A1 (EFNA1),
1634	1,51	8,86E-05	AXIN2	axin 2 (conductin, axil) (AXIN2)
1635	1,78	8,87E-05	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate (ALDOA),
1636	1,57	8,89E-05	ZNF700	zinc finger protein 700 (ZNF700)
1637	-1,51	8,89E-05	PCDH20	protocadherin 20 (PCDH20)
1638	1,68	8,89E-05	POLR2J	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13,3kDa (POLR2J)
1639	-1,64	8,91E-05	KIAA0367	KIAA0367 (KIAA0367)

1640	1,50	8,93E-05	PSMC4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4 (PSMC4),
1641	1,54	8,96E-05	C14ORF37	chromosome 14 open reading frame 37 (C14orf37)
1642	-1,55	9,07E-05	HHLA3	HERV-H LTR-associating 3 (HHLA3),
1643	-1,55	9,14E-05	MRPL39	mitochondrial ribosomal protein L39 (MRPL39), ,
1644	-1,97	9,14E-05	CXADR	coxsackie virus and adenovirus receptor (CXADR)
1645	-1,51	9,16E-05	C10ORF33	chromosome 10 open reading frame 33 (C10orf33)
1646	1,56	9,52E-05	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4 (GNG4),
1647	1,66	9,58E-05	RAGE	renal tumor antigen (RAGE)
1648	-1,61	9,60E-05	HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD),
1649	1,58	9,66E-05	ZMYM5	zinc finger, MYM-type 5 (ZMYM5),
1650	1,52	9,75E-05	PAK2	PREDICTED: p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 (PAK2)
1651	1,60	9,77E-05	ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain (ACADVL), ,
1652	1,81	9,88E-05	NCALD	neurocalcin delta (NCALD)
1653	-1,64	9,95E-05	EYA4	eyes absent homolog 4 (Drosophila) (EYA4),
1654	2,95	1,00E-04	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3),
1655	-1,53	1,00E-04	CD97	CD97 molecule (CD97),
1656	-1,58	1,01E-04	ACADM	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain (ACADM),
1657	-1,52	1,03E-04	EXOSC5	exosome component 5 (EXOSC5)
1658	-1,52	1,03E-04	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa (STAT2)
1659	-1,71	1,03E-04	ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1) (ISL1)
1660	-1,53	1,04E-04	DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4)
1661	1,79	1,06E-04	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1),
1662	1,55	1,06E-04	TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2 (TCEA2),
1663	-1,61	1,07E-04	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa (IGFBP2)
1664	2,16	1,07E-04	NBPF20	neuroblastoma breakpoint family, member 20 (NBPF20)
1665	1,59	1,08E-04	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog (LYN)
1666	1,53	1,08E-04	MAGEF1	melanoma antigen family F, 1 (MAGEF1)
1667	-1,77	1,08E-04	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1 (SERPINI1)
1668	1,59	1,10E-04	AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (AP1S2)
1669	-1,51	1,10E-04	LRRN2	leucine rich repeat neuronal 2 (LRRN2),
1670	-1,58	1,13E-04	HDLBP	high density lipoprotein binding protein (HDLBP),
1671	-1,50	1,15E-04	MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B),
1672	-1,72	1,18E-04	LOC401010	PREDICTED: hypothetical LOC401010 (LOC401010), misc RNA,
1673	1,75	1,19E-04	PEG10	PREDICTED: paternally expressed 10 (PEG10)
1674	1,57	1,20E-04	C6ORF47	chromosome 6 open reading frame 47 (C6orf47)
1675	-1,50	1,21E-04	BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B (BAZ2B)
1676	-1,52	1,22E-04	NUPL2	nucleoporin like 2 (NUPL2)
1677	1,56	1,23E-04	JUND	jun D proto-oncogene (JUND)
1678	1,64	1,25E-04	HOXC9	homeobox C9 (HOXC9)
1679	-1,56	1,25E-04	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2),
1680	-1,73	1,26E-04	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8 (SLC39A8),
1681	-1,56	1,26E-04	KIAA1370	KIAA1370 (KIAA1370)
1682	1,74	1,26E-04	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (NR2F2)
1683	-1,63	1,26E-04	MYO5C	myosin VC (MYO5C)
1684	1,53	1,26E-04	DPP7	dipeptidyl-peptidase 7 (DPP7)
1685	1,65	1,27E-04	PSCD1	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1(cytohesin 1) (PSCD1),
1686	1,58	1,28E-04	SCARA3	scavenger receptor class A, member 3 (SCARA3),
1687	-1,52	1,31E-04	RPAP1	RNA polymerase II associated protein 1 (RPAP1)
1688	1,60	1,34E-04	CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta (CAMKK2),
1689	1,55	1,34E-04	CCDC46	coiled-coil domain containing 46 (CCDC46),
1690	1,54	1,34E-04	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7),
1691	1,62	1,35E-04	RNASET2	ribonuclease T2 (RNASET2)
1692	-1,54	1,36E-04	FAM129A	family with sequence similarity 129, member A (FAM129A),

1693	1,52	1,37E-04	ELAVL1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R) (ELAVL1)
1694	-2,17	1,39E-04	HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD),
1695	1,51	1,39E-04	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin) (CENPF)
1696	1,55	1,40E-04	FAM158A	family with sequence similarity 158, member A (FAM158A)
1697	2,07	1,40E-04	LARP6	La ribonucleoprotein domain family, member 6 (LARP6),
1698	1,54	1,41E-04	MPDU1	mannose-P-dolichol utilization defect 1 (MPDU1)
1699	1,59	1,42E-04	OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1)
1700	1,66	1,43E-04	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1 (SLCO3A1)
1701	1,51	1,44E-04	TSC22D1	TSC22 domain family, member 1 (TSC22D1),
1702	1,70	1,45E-04	ZNF664	zinc finger protein 664 (ZNF664)
1703	1,57	1,46E-04	WDR33	WD repeat domain 33 (WDR33),
1704	1,50	1,47E-04	HS,10862	cDNA: FLJ23313 fis, clone HEP11919
1705	-1,61	1,48E-04	WASPIP	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein (WASPIP)
1706	1,56	1,52E-04	HOXD11	homeobox D11 (HOXD11)
1707	1,53	1,52E-04	LOC644615	PREDICTED: similar to Ras-related protein Rab-13 (LOC644615)
1708	1,53	1,55E-04	MFSD5	major facilitator superfamily domain containing 5 (MFSD5)
1709	-1,50	1,56E-04	ZMYM6	zinc finger, MYM-type 6 (ZMYM6)
1710	-1,54	1,57E-04	METTL7A	methyltransferase like 7A (METTL7A)
1711	-1,55	1,58E-04	SLC12A4	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4 (SLC12A4)
1712	-1,64	1,60E-04	EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)
1713	1,57	1,61E-04	SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
1714	1,59	1,61E-04	AMT	aminomethyltransferase (AMT)
1715	-1,58	1,62E-04	GBA	glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase) (GBA),
1716	1,76	1,63E-04	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (BNIP3),
1717	-1,69	1,63E-04	CCNH	cyclin H (CCNH)
1718	-2,02	1,63E-04	MCOLN3	mucolipin 3 (MCOLN3)
1719	1,65	1,64E-04	CRELD2	cysteine-rich with EGF-like domains 2 (CRELD2)
1720	1,85	1,65E-04	GNB1L	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1-like (GNB1L)
1721	1,52	1,66E-04	UNG	uracil-DNA glycosylase (UNG), ,
1722	1,56	1,66E-04	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2 (LONRF2)
1723	-1,76	1,67E-04	PLEKHG4	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4
1724	-1,61	1,69E-04	MAP7	microtubule-associated protein 7 (MAP7)
1725	1,57	1,70E-04	C19ORF12	chromosome 19 open reading frame 12 (C19orf12),
1726	1,62	1,70E-04	PALM	paralemmin (PALM),
1727	-1,53	1,74E-04	ZNF280D	zinc finger protein 280D (ZNF280D),
1728	1,60	1,74E-04	CENPH	centromere protein H (CENPH)
1729	-1,60	1,74E-04	DFNA5	deafness, autosomal dominant 5 (DFNA5),
1730	1,55	1,74E-04	ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) (ITGA5)
1731	1,62	1,76E-04	HS,370359	mRNA; cDNA DKFZp686F09166 (from clone DKFZp686F09166)
1732	-2,02	1,83E-04	SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila) (SPRY2)
1733	1,70	1,84E-04	NR2F6	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6 (NR2F6)
1734	-1,52	1,85E-04	SLAMF7	SLAM family member 7 (SLAMF7)
1735	-1,54	1,87E-04	PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13
1736	1,53	1,89E-04	NARF	nuclear prelamin A recognition factor (NARF),
1737	-1,53	1,89E-04	RERE	arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats (RERE),
1738	2,06	1,90E-04	DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (DDR2),
1739	1,68	1,90E-04	MLLT11	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
1740	-1,59	1,94E-04	GPN2	GPN-loop GTPase 2 (GPN2)
1741	1,50	1,95E-04	KCTD13	potassium channel tetramerisation domain containing 13 (KCTD13)
1742	-1,50	1,96E-04	LOC644935	PREDICTED: similar to E74-like factor 2 (ets domain transcription factor) isoform 1
1743	-1,50	1,97E-04	PCF11	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S, cerevisiae) (PCF11)
1744	-1,61	1,99E-04	TUBB6	PREDICTED: tubulin, beta 6 (TUBB6)
1745	-1,59	2,00E-04	NRG4	neuregulin 4 (NRG4)

1746	2,41	2,02E-04	WNT3A	wingless-type MMTV integration site family, member 3A (WNT3A)
1747	1,72	2,05E-04	FCGRT	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha (FCGRT),
1748	-1,57	2,05E-04	CUL9	cullin 9 (CUL9)
1749	1,60	2,05E-04	CCND2	cyclin D2 (CCND2)
1750	-1,50	2,05E-04	NUP155	nucleoporin 155kDa (NUP155),
1751	-1,57	2,08E-04	TPD52L2	tumor protein D52-like 2 (TPD52L2),
1752	1,53	2,09E-04	NRP1	neuropilin 1 (NRP1),
1753	-1,53	2,15E-04	HMBS	hydroxymethylbilane synthase (HMBS),
1754	-1,56	2,15E-04	KCNG3	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 3 (KCNG3),
1755	1,58	2,16E-04	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for (FCAR), tv 9
1756	1,66	2,18E-04	HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2 (HEY2)
1757	-1,54	2,21E-04	CSTF3	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa (CSTF3),
1758	1,79	2,22E-04	FAM162A	family with sequence similarity 162, member A (FAM162A)
1759	6,30	2,23E-04	KRTAP19-1	keratin associated protein 19-1 (KRTAP19-1)
1760	1,65	2,26E-04	PHF21B	PHD finger protein 21B (PHF21B)
1761	-1,61	2,31E-04	ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5 (ARL6IP5)
1762	-1,64	2,33E-04	IRF7	interferon regulatory factor 7 (IRF7), tv b
1763	1,60	2,36E-04	C9ORF127	chromosome 9 open reading frame 127 (C9orf127)
1764	1,52	2,40E-04	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1 (PAXIP1)
1765	1,53	2,40E-04	Sep-03	septin 3 (SEPT3), tv B
1766	1,56	2,43E-04	SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 (SHANK3)
1767	2,65	2,46E-04	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)
1768	-1,60	2,46E-04	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1),
1769	1,53	2,47E-04	RORA	RAR-related orphan receptor A (RORA),
1770	1,57	2,47E-04	YDJC	YdjC homolog (bacterial) (YDJC)
1771	-1,51	2,47E-04	DUT	deoxyuridine triphosphatase (DUT), ,
1772	-1,56	2,49E-04	C1ORF163	chromosome 1 open reading frame 163 (C1orf163)
1773	3,08	2,54E-04	ANXA1	annexin A1 (ANXA1)
1774	1,67	2,56E-04	KIAA1949	KIAA1949 (KIAA1949)
1775	-1,53	2,58E-04	FRMD4A	FERM domain containing 4A (FRMD4A)
1776	1,50	2,61E-04	SVIL	supervillin (SVIL),
1777	1,55	2,61E-04	UFSP1	UFM1-specific peptidase 1 (non-functional) (UFSP1)
1778	1,56	2,64E-04	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2
1779	1,63	2,64E-04	ITPRIP	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein (ITPRIP)
1780	1,58	2,65E-04	WBP5	WW domain binding protein 5 (WBP5),
1781	1,51	2,66E-04	CD276	CD276 molecule (CD276), XM_945872 XM_945874
1782	2,18	2,67E-04	RHOB	ras homolog gene family, member B (RHOB)
1783	-1,51	2,67E-04	POLG2	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit (POLG2)
1784	-1,56	2,68E-04	MRPL20	mitochondrial ribosomal protein L20 (MRPL20),
1785	1,69	2,69E-04	ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (ANG),
1786	1,71	2,73E-04	FNDC1	fibronectin type III domain containing 1 (FNDC1)
1787	-1,50	2,75E-04	HES6	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) (HES6)
1788	-1,50	2,76E-04	GSTM3	glutathione S-transferase M3 (brain) (GSTM3)
1789	1,86	2,79E-04	ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (ANG),
1790	1,50	2,90E-04	LOC284988	PREDICTED: hypothetical LOC284988 (LOC284988)
1791	-2,54	2,93E-04	EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (EEF1A2)
1792	-2,48	2,99E-04	QPCT	glutaminyl-peptide cyclotransferase (QPCT)
1793	-1,51	3,01E-04	LEO1	Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S, cerevisiae) (LEO1)
1794	1,60	3,01E-04	MGC42367	similar to 2010300C02Rik protein (MGC42367)
1795	1,60	3,02E-04	AZIN1	antizyme inhibitor 1 (AZIN1),
1796	1,52	3,11E-04	KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1 (KCNK1)
1797	1,53	3,12E-04	FBXW4	F-box and WD repeat domain containing 4 (FBXW4)
1798	1,68	3,16E-04	C1ORF54	chromosome 1 open reading frame 54 (C1orf54)

1799	-1,53	3,21E-04	KIAA1370	KIAA1370 (KIAA1370)
1800	1,53	3,21E-04	C5ORF13	chromosome 5 open reading frame 13 (C5orf13)
1801	-1,57	3,25E-04	WRB	tryptophan rich basic protein (WRB)
1802	1,54	3,31E-04	FAM101B	family with sequence similarity 101, member B (FAM101B)
1803	2,17	3,31E-04	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B)
1804	1,58	3,35E-04	THOC4	PREDICTED: THO complex 4 (THOC4)
1805	-1,74	3,36E-04	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein (FCGBP)
1806	-1,98	3,42E-04	CLK1	CDC-like kinase 1 (CLK1)
1807	1,50	3,45E-04	CADM4	cell adhesion molecule 4 (CADM4)
1808	-1,59	3,49E-04	STAMBPL1	STAM binding protein-like 1 (STAMBPL1)
1809	1,59	3,53E-04	PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog (C, elegans) (PARD3)
1810	1,56	3,57E-04	RAB13	RAB13, member RAS oncogene family (RAB13)
1811	-1,52	3,73E-04	MLF1IP	MLF1 interacting protein (MLF1IP)
1812	1,83	3,77E-04	KIF1A	kinesin family member 1A (KIF1A)
1813	1,95	3,77E-04	DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1)
1814	-1,52	3,79E-04	DCUN1D3	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3 (S, cerevisiae)
1815	1,67	3,85E-04	TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 (TNFRSF25), 0
1816	-1,52	3,85E-04	OBFC2A	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A (OBFC2A)
1817	-1,53	3,86E-04	TSC1	tuberous sclerosis 1 (TSC1),
1818	-1,52	3,88E-04	PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 (PNPT1)
1819	-2,21	3,92E-04	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (ALDH5A1), ,
1820	1,56	3,94E-04	GATA2	GATA binding protein 2 (GATA2)
1821	1,61	4,03E-04	DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (Xenopus laevis) (DACT3)
1822	1,51	4,10E-04	CXORF40A	chromosome X open reading frame 40A (CXorf40A)
1823	1,67	4,15E-04	ARPC3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa (ARPC3)
1824	1,50	4,26E-04	MSRB2	methionine sulfoxide reductase B2 (MSRB2)
1825	-1,51	4,44E-04	C7ORF44	chromosome 7 open reading frame 44 (C7orf44)
1826	1,83	4,53E-04	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (GLIPR1)
1827	-1,63	4,60E-04	VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2) (VAMP2)
1828	1,63	4,62E-04	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16 (IFI16)
1829	-1,50	4,65E-04	USP48	ubiquitin specific peptidase 48 (USP48),
1830	1,78	4,79E-04	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) (FEZ1),
1831	-1,52	4,81E-04	NUDT10	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10 (NUDT10)
1832	2,54	4,86E-04	ATF3	activating transcription factor 3 (ATF3),
1833	1,51	4,88E-04	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3)
1834	-1,52	4,88E-04	PRRT3	proline-rich transmembrane protein 3 (PRRT3)
1835	-1,57	4,91E-04	NFE2L3	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 (NFE2L3)
1836	4,54	5,02E-04	LOX	lysyl oxidase (LOX)
1837	-1,51	5,14E-04	CSNK1G1	casein kinase 1, gamma 1 (CSNK1G1)
1838	1,58	5,27E-04	MIF4GD	MIF4G domain containing (MIF4GD)
1839	1,50	5,29E-04	WTIP	PREDICTED: Wilms tumor 1 interacting protein (WTIP)
1840	1,51	5,32E-04	LOC642897	PREDICTED: misc_RNA (LOC642897), miscRNA,
1841	1,52	5,39E-04	CCND2	cyclin D2 (CCND2)
1842	1,53	5,47E-04	MAP1B	microtubule-associated protein 1B (MAP1B)
1843	1,54	5,49E-04	ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1 (ZKSCAN1)
1844	1,59	5,51E-04	C10ORF65	chromosome 10 open reading frame 65 (C10orf65)
1845	-1,58	5,74E-04	PLS1	plastin 1 (I isoform) (PLS1)
1846	1,76	5,76E-04	JUN	jun oncogene (JUN)
1847	1,58	5,81E-04	GPR162	G protein-coupled receptor 162 (GPR162), tv A-2
1848	-1,51	5,83E-04	EFCAB4A	EF-hand calcium binding domain 4A (EFCAB4A)
1849	-1,50	6,01E-04	EDA2R	ectodysplasin A2 receptor (EDA2R)
1850	-1,52	6,08E-04	UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1 (UBE1),
1851	1,52	6,18E-04	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2 (FOXRED2)

1852	-1,53	6,27E-04	FAM86C	family with sequence similarity 86, member C (FAM86C),
1853	-1,51	6,27E-04	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1 (TGIF1),
1854	1,55	6,29E-04	GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) (GGH)
1855	1,52	6,34E-04	PTK7	PTK7 protein tyrosine kinase 7 (PTK7), tv PTK7-4
1856	-1,53	6,35E-04	FAM84B	family with sequence similarity 84, member B (FAM84B)
1857	-1,56	6,83E-04	CSTF3	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa (CSTF3),
1858	1,54	6,84E-04	P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2),
1859	-1,53	6,94E-04	BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide (BCKDHA)
1860	1,51	7,04E-04	AKAP8L	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like (AKAP8L)
1861	-1,69	7,07E-04	TMOD1	tropomodulin 1 (TMOD1)
1862	1,85	7,10E-04	BSN	bassoon (presynaptic cytomatrix protein) (BSN)
1863	-1,50	7,21E-04	UBE4A	ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast) (UBE4A)
1864	-1,52	7,47E-04	LOC645968	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein)
1865	1,51	7,56E-04	PGAM1	phosphoglycerate mutase 1 (brain) (PGAM1)
1866	-2,26	7,66E-04	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (CXCL16)
1867	1,53	7,68E-04	SLC26A6	solute carrier family 26, member 6 (SLC26A6),
1868	-1,55	7,78E-04	F11R	F11 receptor (F11R),
1869	1,63	7,98E-04	PRAC	prostate cancer susceptibility candidate (PRAC)
1870	-1,51	8,15E-04	ZNF330	zinc finger protein 330 (ZNF330)
1871	1,51	8,37E-04	SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, Subfamily d, member 3
1872	1,53	8,39E-04	ZNF385D	zinc finger protein 385D (ZNF385D)
1873	1,52	8,46E-04	LOC441763	PREDICTED: hypothetical LOC441763 (LOC441763)
1874	1,71	8,66E-04	PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1)
1875	1,70	8,68E-04	P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2),
1876	-1,83	8,96E-04	PYGL	phosphorylase, glycogen, liver (PYGL)
1877	-1,51	9,01E-04	WDR27	WD repeat domain 27 (WDR27)
1878	1,57	9,10E-04	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4 (RNASE4),
1879	-1,55	9,61E-04	LRDD	leucine-rich repeats and death domain containing (LRDD),
1880	1,56	9,79E-04	RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog (RRAS)
1881	-2,03	9,83E-04	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa (TAF15),
1882	-1,51	9,87E-04	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3,3B) (H3F3B)
1883	1,54	9,93E-04	SRXN1	sulfiredoxin 1 homolog (S, cerevisiae) (SRXN1)
1884	1,53	1,01E-03	SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 (SHANK3)
1885	-2,28	1,03E-03	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)
1886	1,56	1,03E-03	C3ORF52	chromosome 3 open reading frame 52 (C3orf52)
1887	-1,77	1,04E-03	STXBP2	syntaxin binding protein 2 (STXBP2)
1888	4,18	1,05E-03	KRTAP19-6	keratin associated protein 19-6 (KRTAP19-6)
1889	-1,96	1,05E-03	MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E, coli) (MLH1)
1890	1,53	1,07E-03	CNTNAP1	contactin associated protein 1 (CNTNAP1)
1891	1,54	1,09E-03	C19ORF73	chromosome 19 open reading frame 73 (C19orf73)
1892	-1,64	1,09E-03	LOC723972	hepatopoietin PCn127 (LOC723972), non-coding RNA,
1893	1,53	1,10E-03	GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon (GABRE)
1894	-1,59	1,11E-03	ANP32A	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A (ANP32A)
1895	1,55	1,15E-03	C17ORF70	chromosome 17 open reading frame 70 (C17orf70)
1896	-1,52	1,16E-03	AHI1	Abelson helper integration site 1 (AHI1)
1897	1,85	1,17E-03	P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2),
1898	-1,71	1,18E-03	NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)
1899	1,56	1,18E-03	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1)
1900	1,60	1,22E-03	HS,543887	AGENCOURT_14535501 NIH_MGC_191 cDNA clone IMAGE:30415823 5, mRNA sequence
1901	-1,59	1,23E-03	ASB13	ankyrin repeat and SOCS box-containing 13 (ASB13)
1902	-1,59	1,25E-03	PIGW	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W (PIGW)
1903	1,56	1,26E-03	PNCK	pregnancy upregulated non-ubiquitously expressed CaM kinase (PNCK)

1904	-1,64	1,28E-03	SLC25A13	solute carrier family 25, member 13 (citrin) (SLC25A13)
1905	1,81	1,29E-03	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)
1906	-1,58	1,30E-03	PRIM1	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) (PRIM1)
1907	-1,57	1,36E-03	SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK)
1908	1,53	1,38E-03	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) (IFITM1)
1909	-1,53	1,40E-03	BEX2	brain expressed X-linked 2 (BEX2)
1910	1,93	1,43E-03	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2),
1911	1,55	1,50E-03	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4 (RNASE4),
1912	1,53	1,50E-03	C6ORF66	chromosome 6 open reading frame 66 (C6orf66)
1913	1,63	1,50E-03	FLJ35220	hypothetical protein FLJ35220 (FLJ35220)
1914	1,67	1,51E-03	CHD5	chromodomain helicase DNA binding protein 5 (CHD5)
1915	1,51	1,52E-03	SEMA3E	sema domain, (semaphorin) 3E (SEMA3E)
1916	1,94	1,55E-03	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible (GBP2)
1917	1,56	1,56E-03	FMN2	formin 2 (FMN2)
1918	-1,52	1,57E-03	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG)
1919	1,71	1,65E-03	FAM57A	family with sequence similarity 57, member A (FAM57A)
1920	-2,27	1,68E-03	APP	amyloid beta (A4) precursor protein (APP),
1921	1,59	1,70E-03	C6ORF204	chromosome 6 open reading frame 204 (C6orf204),
1922	-1,72	1,70E-03	SSH3	slingshot homolog 3 (Drosophila) (SSH3)
1923	1,59	1,71E-03	HTRA1	HtrA serine peptidase 1 (HTRA1)
1924	1,58	1,74E-03	TATDN3	TatD DNase domain containing 3 (TATDN3),
1925	1,64	1,75E-03	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)
1926	1,56	1,85E-03	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2),
1927	-1,60	2,02E-03	ASS1	argininosuccinate synthetase 1 (ASS1),
1928	1,56	2,05E-03	ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like) (ARID4B),
1929	1,55	2,16E-03	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3 (LRRN3),
1930	2,03	2,23E-03	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A)
1931	1,55	2,24E-03	BTG3	BTG family, member 3 (BTG3)
1932	1,53	2,25E-03	ZNF256	zinc finger protein 256 (ZNF256)
1933	1,50	2,33E-03	CLDN15	claudin 15 (CLDN15)
1934	-1,52	2,36E-03	HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse) (HSD17B6)
1935	-1,59	2,52E-03	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d
1936	1,56	2,54E-03	ZNF800	zinc finger protein 800 (ZNF800)
1937	-2,18	2,64E-03	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa (HTATIP2)
1938	1,72	2,65E-03	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
1939	1,50	2,68E-03	UPP1	uridine phosphorylase 1 (UPP1),
1940	1,75	2,88E-03	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8)
1941	1,55	2,92E-03	TNMD	tenomodulin (TNMD)
1942	-1,56	2,94E-03	TCF12	transcription factor 12 (TCF12),
1943	-1,52	2,97E-03	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8 (SLC39A8),
1944	1,61	3,00E-03	SCARNA9	small Cajal body-specific RNA 9 (SCARNA9), guide RNA,
1945	1,50	3,10E-03	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1 (SDF2L1)
1946	1,96	3,11E-03	H1F0	H1 histone family, member 0 (H1F0)
1947	-1,50	3,22E-03	H2AFJ	H2A histone family, member J (H2AFJ),
1948	-1,56	3,22E-03	TSPAN13	tetraspanin 13 (TSPAN13)
1949	1,51	3,48E-03	CACNB3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit (CACNB3)
1950	-1,86	3,49E-03	CALCB	calcitonin-related polypeptide beta (CALCB)
1951	-1,51	3,53E-03	TRAF3IP2	TRAF3 interacting protein 2 (TRAF3IP2),
1952	1,60	3,55E-03	NRN1	neuritin 1 (NRN1)
1953	1,53	3,57E-03	CIRBP	cold inducible RNA binding protein (CIRBP)
1954	1,54	3,63E-03	MAP6D1	MAP6 domain containing 1 (MAP6D1)
1955	1,51	3,79E-03	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1
1956	1,52	3,95E-03	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK),

1957	1,50	4,18E-03	ZNF608	zinc finger protein 608 (ZNF608)
1958	-1,69	4,33E-03	FZD6	frizzled homolog 6 (Drosophila) (FZD6)
1959	1,63	4,60E-03	ASNS	asparagine synthetase (ASNS),
1960	1,54	5,05E-03	JPH3	junctophilin 3 (JPH3)
1961	1,52	5,17E-03	AFF4	AF4/FMR2 family, member 4 (AFF4)
1962	-1,60	5,19E-03	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK)
1963	-2,14	5,23E-03	APP	amyloid beta (A4) precursor protein (APP),
1964	1,98	5,40E-03	SERTAD1	SERTA domain containing 1 (SERTAD1)
1965	-1,55	5,44E-03	TCF12	transcription factor 12 (TCF12),
1966	1,61	5,74E-03	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma (CEBPG)
1967	-1,81	5,93E-03	ASS1	argininosuccinate synthetase 1 (ASS1),
1968	-1,87	6,20E-03	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) (UCHL1)
1969	1,90	6,40E-03	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A (TNFRSF12A)
1970	1,61	6,41E-03	CHAC1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E, coli) (CHAC1)
1971	1,69	6,51E-03	PSG4	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (PSG4),
1972	-1,52	7,01E-03	NPTX2	neuronal pentraxin II (NPTX2)
1973	-1,52	7,11E-03	CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7 (CHCHD7),
1974	1,59	7,33E-03	CHMP6	PREDICTED: chromatin modifying protein 6 (CHMP6)
1975	-1,51	7,40E-03	DHDH	dihydrodiol dehydrogenase (dimeric) (DHDH)
1976	1,60	8,33E-03	RUNX3	runt-related transcription factor 3 (RUNX3),
1977	1,57	8,82E-03	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB)
1978	1,53	9,02E-03	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1)
1979	1,66	9,37E-03	XBP1	X-box binding protein 1 (XBP1),
1980	-1,51	9,69E-03	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (TFPI),
1981	-1,61	9,70E-03	ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor) (ELF4)
1982	-1,58	1,01E-02	C7ORF53	chromosome 7 open reading frame 53 (C7orf53)
1983	1,63	1,10E-02	TMEM22	transmembrane protein 22 (TMEM22),
1984	1,80	1,11E-02	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)
1985	3,21	1,17E-02	EGR1	early growth response 1 (EGR1)
1986	1,66	1,62E-02	ZNF467	zinc finger protein 467 (ZNF467)
1987	-1,65	1,66E-02	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (ALDH5A1), ,
1988	1,50	2,21E-02	SQLE	squalene epoxidase (SQLE)
1989	1,65	2,60E-02	KIAA1683	KIAA1683 (KIAA1683)
1990	1,52	2,71E-02	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa (ISG20)
1991	1,80	3,19E-02	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2)
1992	1,63	3,39E-02	DNAH17	dynein, axonemal, heavy polypeptide 17 (DNAH17)
1993	1,58	3,56E-02	KRTAP20-2	keratin associated protein 20-2 (KRTAP20-2)
1994	1,99	4,74E-02	ETV5	ets variant gene 5 (ets-related molecule) (ETV5)
1995	1,51	4,78E-02	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family (RAB26)

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados entre clones P2X7-WT y HEK293 parentales. Se muestran los 1995 genes diferencialmente expresados en el contraste de clones P2X7-WT versus HEK293 parentales. Los genes están ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**). **FC** (Fold change): Veces de cambio en la expresión génica con respecto a HEK293 parentales.

Orden	FC	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)	Función molecular (GO)	Proceso Biológico (GO)
1	2,14	0,00004	OSTN	osteocrin	Hormone activity	ossification
2	1,96	0,00045	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	Oxidoreductase activity	DNA replication
3	1,81	0,00075	IPO7	Importin 7	small GTPase regulator activity	protein import into nucleus
4	-1,57	0,00135	MESP1	mesoderm posterior 1 homolog	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity	neurogenesis
5	-1,74	0,00135	HOXA6	homeobox A6	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity	embryonic skeletal system morphogenesis
6	1,55	0,00135	ADIPOR1	adiponectin receptor 1	hormone binding	fatty acid oxidation
7	1,58	0,00146	YOD1	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog	ubiquitin-specific protease activity	endoplasmic reticulum unfolded Protein response
8	1,57	0,00146	ITGB1BP1	integrin beta 1 binding protein 1	integrin binding	integrin-mediated signaling pathway
9	-1,50	0,00261	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase activity	carbohydrate metabolic process
10	-1,63	0,00280	RPS29	ribosomal protein S29	structural constituent of ribosome	translation
11	1,55	0,00280	BCOR	BCL6 co-repressor	transcription corepressor activity	negative regulation of transcription From RNA polymerase II promoter
12	-1,60	0,00355	SNUPN	Snurportin 1	RNA cap binding	protein import into nucleus
13	1,56	0,00383	STX3	Syntaxin 3	SNAP receptor activity	neurotransmitter transport
14	-1,87	0,00383	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1	identical protein binding	meiosis
15	1,74	0,00396	GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	extracellular ligand-gated ion channel	gamma-aminobutyric acid signaling pathway
16	1,55	0,00549	RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	guanyl-nucleotide exchange factor activity	small GTPase mediated signal transduction
17	1,50	0,00671	SCML1	sex comb on midleg-like 1	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity	anatomical structure morphogenesis
18	1,51	0,00733	DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	ATP-dependent RNA helicase activity	positive regulation of translation
19	-1,55	0,00733	ALG1L	asparagine-linked glycosylation 1-like	transferase activity	ND
20	1,52	0,00825	SMARCD3	SWI/SNF related, actin dependent Regulator of chromatin, subfamily d, member 3	ligand-dependent nuclear receptor binding	chromatin remodeling
21	-1,59	0,00826	CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IkappaB kinase activity	inflammatory response
22	1,58	0,00861	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2	flavin adenine dinucleotide binding	ER-associated ubiquitin-dependent Protein catabolic process
23	-1,53	0,00903	CA12	carbonic anhydrase XII	carbonate dehydratase activity	bicarbonate transport
24	-1,64	0,01019	SYNM	synemin, intermediate filament protein	structural constituent of cytoskeleton	intermediate filament cytoskeleton organization
25	2,21	0,01019	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	DNA binding	positive regulation of transcription
26	-1,66	0,01019	LOC728635	PREDICTED: similar to peroxisomal short-chain Alcohol dehydrogenase, transcript variant 1	ND	ND

(Continuación)

Orden	FC	Valor P	Gen (símbolo)	Gen (definición)	Función molecular (GO)	Proceso Biológico (GO)
27	-1,63	0,01019	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	aspartic-type endopeptidase activity	negative regulation of amyloid precursor Protein biosynthetic process
28	-1,58	0,01090	SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1	unfolded protein binding	response to unfolded protein
29	-1,79	0,01115	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+]	retinoic acid metabolic process
30	1,56	0,01130	IRS2	insulin receptor substrate 2	insulin receptor binding	cellular response to insulin stimulus
31	1,94	0,01137	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	aldo-keto reductase (NADP) activity	oxidation-reduction process
32	-1,80	0,01336	ZNF503	zinc finger protein 503	nucleic acid binding	regulation of transcription
33	-1,52	0,01336	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	tricarboxylic acid cycle
34	-1,57	0,01336	ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	fatty-acyl-CoA binding	branched-chain amino acid catabolic process
35	-2,02	0,01424	MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2	guanine/thymine mispair binding	mismatch repair
36	-1,77	0,01512	NRG1	Neuregulin 1	receptor binding	embryo development
37	-1,58	0,01588	APBB3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3	protein binding	ND
38	-1,51	0,01725	TMEM5	transmembrane protein 5	ND	ND
39	1,64	0,01741	RCAN1	regulator of calcineurin 1	sequence-specific DNA binding Transcription factor activity	calcium-mediated signaling
40	-3,39	0,01842	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	peptide antigen binding	immune response
41	-1,74	0,01842	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	nucleotidyltransferase activity	sulfate assimilation
42	-1,51	0,01933	GPR137C	G protein-coupled receptor 137C	ND	ND
43	-1,60	0,01982	ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)	DNA binding	regulation of gene expression By genetic imprinting
44	-1,54	0,02001	LOC133993	PREDICTED: hypothetical LOC133993, Transcript variant 2	ND	ND
45	-1,60	0,02095	FBLN5	Fibulin 5	integrin binding	regulation of cell growth
46	-1,90	0,02501	ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	inositol 1,4,5 trisphosphate binding	activation of phospholipase C activity
47	-1,57	0,02821	SLC22A17	solute carrier family 22, member 17	transmembrane transporter activity	ion transport
48	1,74	0,02842	TRIB1	tribbles homolog 1	protein kinase inhibitor activity	negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity
49	-2,11	0,03288	TRIB3	tribbles homolog 3	protein kinase inhibitor activity	negative regulation of protein kinase activity
50	-1,99	0,03465	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	chemokine activity	positive regulation of cell migration
51	1,55	0,03470	MGC61598	PREDICTED: similar to ankyrin-repeat protein Nrarp	ND	ND
52	-1,51	0,04101	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II	hormone binding	sex differentiation
53	-2,05	0,04427	ZNF22	zinc finger protein 22	zinc ion binding	transcription

Tabla 2. Genes con expresión diferencial entre clones P2X7-WT y clones P2X7-WT/Gln460Arg. Se muestran los genes diferencialmente expresados en el contraste de clones P2X7-WT/Gln460Arg versus clones P2X7-WT. Los genes están ordenados de acuerdo a valor estadístico decreciente (**Valor P**). **FC**: (fold change), veces de cambio en la expresión génica de clones P2X7-WT/Gln460Arg con respecto a clones P2X7-WT. **Función molecular**: Se muestra el término de la base de datos Gene Ontology más frecuente para cada gen. **Proceso biológico**: Se muestra el término de la base de datos Gene Ontology más frecuente para cada gen. **ND**: Función molecular o proceso biológico no determinado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fava M & Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* 28(2):335-341.
2. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, & Walters EE (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry* 62(6):593-602.
3. de Kloet ER, Joels M, & Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience* 6(6):463-475.
4. Lang UE & Borgwardt S (2013) Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 31(6):761-777.
5. Fournier JC, Keener MT, Almeida J, Kronhaus DM, & Phillips ML (2013) Amygdala and whole-brain activity to emotional faces distinguishes major depressive disorder and bipolar disorder. *Bipolar disorders*.
6. Villanueva R (2013) Neurobiology of major depressive disorder. *Neural plasticity* 2013:873278.
7. Wainwright SR & Galea LA (2013) The neural plasticity theory of depression: assessing the roles of adult neurogenesis and PSA-NCAM within the hippocampus. *Neural plasticity* 2013:805497.
8. Kenneson A, Funderburk JS, & Maisto SA (2013) Risk factors for secondary substance use disorders in people with childhood and adolescent-onset bipolar disorder: opportunities for prevention. *Comprehensive psychiatry* 54(5):439-446.
9. Kessler RC, Angermeyer M, Anthony JC, R DEG, Demyttenaere K, Gasquet I, G DEG, Gluzman S, Gureje O, Haro JM, Kawakami N, Karam A, Levinson D, Medina Mora ME, Oakley Browne MA, Posada-Villa J, Stein DJ, Adley Tsang CH, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Berglund P, Gruber MJ, Petukhova M, Chatterji S, & Ustun TB (2007) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry* 6(3):168-176.
10. Blazer DG, Kessler RC, McGonagle KA, & Swartz MS (1994) The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. *The American journal of psychiatry* 151(7):979-986.
11. Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annual review of psychology* 48:191-214.

12. Greenberg PE, Stiglin LE, Finkelstein SN, & Berndt ER (1993) The economic burden of depression in 1990. *The Journal of clinical psychiatry* 54(11):405-418.
13. Piccinelli M & Wilkinson G (1994) Outcome of depression in psychiatric settings. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 164(3):297-304.
14. Harris EC & Barraclough B (1998) Excess mortality of mental disorder. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 173:11-53.
15. Murray CJ & Lopez AD (1996) Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274(5288):740-743.
16. Cole JO (1964) Therapeutic Efficacy of Antidepressant Drugs. A Review. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 190:448-455.
17. Davis JM (1965) Efficacy of tranquilizing and antidepressant drugs. *Archives of general psychiatry* 13(6):552-572.
18. Muller N & Schwarz MJ (2007) The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Molecular psychiatry* 12(11):988-1000.
19. Watkins JC & Jane DE (2006) The glutamate story. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1:S100-108.
20. Evans RH, Francis AA, Hunt K, Oakes DJ, & Watkins JC (1979) Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. *British journal of pharmacology* 67(4):591-603.
21. Verkhratsky A & Kirchhoff F (2007) Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. *Journal of anatomy* 210(6):651-660.
22. Mathew SJ, Keegan K, & Smith L (2005) Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 27(3):243-248.
23. Malenka RC & Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285(5435):1870-1874.
24. Kim JS, Schmid-Burgk W, Claus D, & Kornhuber HH (1982) Increased serum glutamate in depressed patients. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 232(4):299-304.
25. Altamura CA, Mauri MC, Ferrara A, Moro AR, D'Andrea G, & Zamberlan F (1993) Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. *The American journal of psychiatry* 150(11):1731-1733.
26. Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR, Jr., & Kawahara R (2006)

Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 30(6):1155-1158.

27. Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, & Pettegrew JW (2000) Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biological psychiatry* 47(7):586-593.
28. Francis PT, Poynton A, Lowe SL, Najlerahim A, Bridges PK, Bartlett JR, Procter AW, Bruton CJ, & Bowen DM (1989) Brain amino acid concentrations and Ca2+-dependent release in intractable depression assessed antemortem. *Brain research* 494(2):315-324.
29. Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, & Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Archives of general psychiatry* 61(7):705-713.
30. Yuksel C & Ongur D (2010) Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biological psychiatry* 68(9):785-794.
31. Gorman JM & Docherty JP (2010) A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 22(3):256-264.
32. Pittenger C & Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(1):88-109.
33. Lee LJ, Lo FS, & Erzurumlu RS (2005) NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(9):2304-2311.
34. Ongur D, Haddad S, Prescot AP, Jensen JE, Siburian R, Cohen BM, Renshaw PF, & Smoller JW (2011) Relationship between genetic variation in the glutaminase gene GLS1 and brain glutamine/glutamate ratio measured in vivo. *Biological psychiatry* 70(2):169-174.
35. Rajkowska G (2000) Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits? *Progress in brain research* 126:397-412.
36. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, & Everall I (2001) Reduced glial cell

density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of general psychiatry* 58(6):545-553.

37. Campbell S & MacQueen G (2006) An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Current opinion in psychiatry* 19(1):25-33.
38. Duman RS (2002) Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 17 Suppl 3:306-310.
39. Callaghan CK & Kelly AM (2013) Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. *Neurobiology of learning and memory* 104:39-48.
40. Jiang C & Salton SR (2013) The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder. *Translational neuroscience* 4(1):46-58.
41. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, & Post RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(3 Pt 1):1768-1777.
42. Dwivedi Y (2009) Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatric disease and treatment* 5:433-449.
43. Lee BH & Kim YK (2010) The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry investigation* 7(4):231-235.
44. Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, & Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *The American journal of psychiatry* 169(11):1194-1202.
45. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, & Aubry JM (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry research* 109(2):143-148.
46. Lee Y, Lim SW, Kim SY, Chung JW, Kim J, Myung W, Song J, Kim S, Carroll BJ, & Kim DK (2013) Association between the BDNF Val66Met Polymorphism and Chronicity of Depression. *Psychiatry investigation* 10(1):56-61.
47. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, & Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological psychiatry* 50(4):260-265.
48. Lang UE, Bajbouj M, Gallinat J, & Hellweg R (2006) Brain-derived neurotrophic

factor serum concentrations in depressive patients during vagus nerve stimulation and repetitive transcranial magnetic stimulation. *Psychopharmacology* 187(1):56-59.

49. Heim C & Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological psychiatry* 49(12):1023-1039.
50. Holsboer F & Ising M (2008) Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *European journal of pharmacology* 583(2-3):350-357.
51. Landgraf R (2006) The involvement of the vasopressin system in stress-related disorders. *CNS & neurological disorders drug targets* 5(2):167-179.
52. Pepin MC, Pothier F, & Barden N (1992) Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature* 355(6362):725-728.
53. Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, & Vale WW (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14(5 Pt 1):2579-2584.
54. Lu A, Steiner MA, Whittle N, Vogl AM, Walser SM, Ableitner M, Refojo D, Ekker M, Rubenstein JL, Stalla GK, Singewald N, Holsboer F, Wotjak CT, Wurst W, & Deussing JM (2008) Conditional CRH overexpressing mice: an animal model for stress-elicited pathologies and treatments that target the central CRH system. *Molecular psychiatry* 13(11):989.
55. Strohle A & Holsboer F (2003) Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3:S207-214.
56. Harlow BL, Wise LA, Otto MW, Soares CN, & Cohen LS (2003) Depression and its influence on reproductive endocrine and menstrual cycle markers associated with perimenopause: the Harvard Study of Moods and Cycles. *Archives of general psychiatry* 60(1):29-36.
57. Young EA & Korszun A (2002) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in mood disorders. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 31(1):63-78.
58. Arzt E & Holsboer F (2006) CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Trends in pharmacological sciences* 27(10):531-538.
59. Reul JM & Holsboer F (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current opinion in pharmacology* 2(1):23-33.

60. Refojo D, Echenique C, Muller MB, Reul JM, Deussing JM, Wurst W, Sillaber I, Paez-Pereda M, Holsboer F, & Arzt E (2005) Corticotropin-releasing hormone activates ERK1/2 MAPK in specific brain areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(17):6183-6188.

61. Silberstein S, Vogl AM, Refojo D, Senin SA, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM, & Arzt E (2009) Amygdaloid pERK1/2 in corticotropin-releasing hormone overexpressing mice under basal and acute stress conditions. *Neuroscience* 159(2):610-617.

62. Muller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kuhn R, Reul JM, Holsboer F, & Wurst W (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature neuroscience* 6(10):1100-1107.

63. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, & Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226(4680):1342-1344.

64. Holsboer F, Von Bardeleben U, Gerken A, Stalla GK, & Muller OA (1984) Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. *The New England journal of medicine* 311(17):1127.

65. Rush AJ, Giles DE, Schlesser MA, Orsulak PJ, Parker CR, Jr., Weissenburger JE, Crowley GT, Khatami M, & Vasavada N (1996) The dexamethasone suppression test in patients with mood disorders. *The Journal of clinical psychiatry* 57(10):470-484.

66. Sher L, Oquendo MA, Burke AK, Cooper TB, & Mann JJ (2013) Combined dexamethasone suppression-corticotrophin-releasing hormone stimulation test in medication-free major depression and healthy volunteers. *Journal of affective disorders* 151(3):1108-1112.

67. Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Kunzel HE, Pfennig A, Uhr M, & Holsboer F (2007) Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biological psychiatry* 62(1):47-54.

68. Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 23(5):477-501.

69. McEwen BS (2004) Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis

and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032:1-7.

70. Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, Zunszain PA, Horowitz M, Molteni R, Luoni A, Calabrese F, Tansey K, Gennarelli M, Thuret S, Price J, Uher R, Riva MA, & Pariante CM (2013) Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(21):8708-8713.
71. Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, & Holsboer F (1997) Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 138(1):101-106.
72. Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Archives of general psychiatry* 57(10):925-935.
73. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, & Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34(1):13-25.
74. Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Niyaz M, Kudo M, & Kunugi H (2008) Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 22(3):546-558.
75. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
76. Dinarello CA (2010) Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 140(6):935-950.
77. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, & Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270(5234):286-290.
78. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, & Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54(4):541-552.
79. Hayden MS & Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132(3):344-362.
80. Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, & Chrousos GP (2005) Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation* 12(5):255-269.
81. Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, & Stalla GK (1999)

Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Frontiers in neuroendocrinology* 20(1):71-95.

82. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, & Dinarello CA (1986) Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233(4764):652-654.
83. Besedovsky HO & del Rey A (1992) Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Frontiers in neuroendocrinology* 13(1):61-94.
84. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, & Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience* 9(1):46-56.
85. Skinner RA, Gibson RM, Rothwell NJ, Pinteaux E, & Penny JI (2009) Transport of interleukin-1 across cerebromicrovascular endothelial cells. *British journal of pharmacology* 156(7):1115-1123.
86. Gutierrez EG, Banks WA, & Kastin AJ (1993) Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of neuroimmunology* 47(2):169-176.
87. Jones KA & Thomsen C (2013) The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Molecular and cellular neurosciences* 53:52-62.
88. Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, & Besedovsky H (1997) Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of neuroscience research* 48(4):287-298.
89. Laye S, Parnet P, Goujon E, & Dantzer R (1994) Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain research. Molecular brain research* 27(1):157-162.
90. Kovalovsky D, Refojo D, Holsboer F, & Arzt E (2000) Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *Journal of neuroimmunology* 109(1):23-29.
91. De Bosscher K & Haegeman G (2009) Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 23(3):281-291.
92. Liberman AC, Druker J, Refojo D, Holsboer F, & Arzt E (2009) Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(5):1558-1571.

93. Liberman AC, Refojo D, Druker J, Toscano M, Rein T, Holsboer F, & Arzt E (2007) The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(4):1177-1188.

94. Besedovsky HO & del Rey A (2006) Regulating inflammation by glucocorticoids. *Nature immunology* 7(6):537.

95. Anisman H, Merali Z, Poulter MO, & Hayley S (2005) Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Current pharmaceutical design* 11(8):963-972.

96. Miller AH, Maletic V, & Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry* 65(9):732-741.

97. Raison CL, Capuron L, & Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in immunology* 27(1):24-31.

98. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, & Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Molecular psychiatry* 13(7):717-728.

99. Koo JW & Duman RS (2008) IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(2):751-756.

100. O'Brien SM, Scott LV, & Dinan TG (2004) Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Human psychopharmacology* 19(6):397-403.

101. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, & Lanctot KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry* 67(5):446-457.

102. Liu Y, Ho RC, & Mak A (2012) Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *Journal of affective disorders* 139(3):230-239.

103. Sukoff Rizzo SJ, Neal SJ, Hughes ZA, Beyna M, Rosenzweig-Lipson S, Moss SJ, & Brandon NJ (2012) Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key

contributor of depressive-like phenotypes. *Translational psychiatry* 2:e199.

104. Shelton RC & Miller AH (2010) Eating ourselves to death (and despair): the contribution of adiposity and inflammation to depression. *Progress in neurobiology* 91(4):275-299.

105. Anisman H, Poulter MO, Gandhi R, Merali Z, & Hayley S (2007) Interferon-alpha effects are exaggerated when administered on a psychosocial stressor backdrop: cytokine, corticosterone and brain monoamine variations. *Journal of neuroimmunology* 186(1-2):45-53.

106. de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, & Lustman PJ (2001) Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine* 63(4):619-630.

107. Halaris A (2009) Comorbidity between depression and cardiovascular disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 28(2):92-99.

108. Johnson AK & Grippo AJ (2006) Sadness and broken hearts: neurohumoral mechanisms and co-morbidity of ischemic heart disease and psychological depression. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 57 Suppl 11:5-29.

109. Godha D, Shi L, & Mavronicolas H (2010) Association between tendency towards depression and severity of rheumatoid arthritis from a national representative sample: the Medical Expenditure Panel Survey. *Current medical research and opinion* 26(7):1685-1690.

110. Volterra A & Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews. Neuroscience* 6(8):626-640.

111. Seifert G, Schilling K, & Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature reviews. Neuroscience* 7(3):194-206.

112. Rajkowska G (2003) Depression: what we can learn from postmortem studies. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 9(4):273-284.

113. Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263(5154):1768-1771.

114. Rajkowska G & Miguel-Hidalgo JJ (2007) Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS & neurological disorders drug targets* 6(3):219-233.

115. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, & Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276(5319):1699-1702.

116. Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, & Goldman-Rakic PS (2001) An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4):1964-1969.

117. Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, & Sutcliffe JG (1996) The 5HT5A serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17(4):317-326.

118. Steinhauser C, Jabs R, & Kettenmann H (1994) Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4(1):19-35.

119. Verkhratsky A, Orkand RK, & Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiological reviews* 78(1):99-141.

120. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, & Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature neuroscience* 7(6):613-620.

121. Minelli A, DeBiasi S, Brecha NC, Zuccarello LV, & Conti F (1996) GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(19):6255-6264.

122. Bal N, Figueras G, Vilaro MT, Sunol C, & Artigas F (1997) Antidepressant drugs inhibit a glial 5-hydroxytryptamine transporter in rat brain. *The European journal of neuroscience* 9(8):1728-1738.

123. Takeda H, Inazu M, & Matsumiya T (2002) Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 366(6):620-623.

124. Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, & Ronnback L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-

junction communication. *Neurochemistry international* 37(2-3):317-329.

125. Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, & Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15(3):711-720.
126. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, & Pandey GN (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of general psychiatry* 60(8):804-815.
127. Sullivan PF, Neale MC, & Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *The American journal of psychiatry* 157(10):1552-1562.
128. Barnett JH & Smoller JW (2009) The genetics of bipolar disorder. *Neuroscience* 164(1):331-343.
129. Bosker FJ, Hartman CA, Nolte IM, Prins BP, Terpstra P, Posthuma D, van Veen T, Willemsen G, DeRijk RH, de Geus EJ, Hoogendijk WJ, Sullivan PF, Penninx BW, Boomsma DI, Snieder H, & Nolen WA (2011) Poor replication of candidate genes for major depressive disorder using genome-wide association data. *Molecular psychiatry* 16(5):516-532.
130. Uher R (2009) The role of genetic variation in the causation of mental illness: an evolution-informed framework. *Molecular psychiatry* 14(12):1072-1082.
131. van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW, & Holsboer F (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biological psychiatry* 59(8):681-688.
132. Fan M, Liu B, Jiang T, Jiang X, Zhao H, & Zhang J (2010) Meta-analysis of the association between the monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Psychiatric genetics* 20(1):1-7.
133. Yoon HK & Kim YK (2010) Association between glycogen synthase kinase-3beta gene polymorphisms and major depression and suicidal behavior in a Korean population. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 34(2):331-334.
134. Tsunoka T, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Okumura T, Inada T, Ozaki N, & Iwata N (2009) Association analysis of

group II metabotropic glutamate receptor genes (GRM2 and GRM3) with mood disorders and fluvoxamine response in a Japanese population. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33(5):875-879.

135. Horstmann S, Lucae S, Menke A, Hennings JM, Ising M, Roeske D, Muller-Myhsok B, Holsboer F, & Binder EB (2010) Polymorphisms in GRIK4, HTR2A, and FKBP5 show interactive effects in predicting remission to antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35(3):727-740.

136. Licinio J, Dong C, & Wong ML (2009) Novel sequence variations in the brain-derived neurotrophic factor gene and association with major depression and antidepressant treatment response. *Archives of general psychiatry* 66(5):488-497.

137. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Kunzel HE, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Brunner J, Modell S, Baghai T, Deiml T, Zill P, Bondy B, Rupprecht R, Messer T, Kohnlein O, Dabitz H, Bruckl T, Muller N, Pfister H, Lieb R, Mueller JC, Lohmussaar E, Strom TM, Bettecken T, Meitinger T, Uhr M, Rein T, Holsboer F, & Muller-Myhsok B (2004) Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nature genetics* 36(12):1319-1325.

138. Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, & Domschke K (2008) Association of the COMT val158met variant with antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(4):924-932.

139. Binder EB, Owens MJ, Liu W, Deveau TC, Rush AJ, Trivedi MH, Fava M, Bradley B, Ressler KJ, & Nemeroff CB (2010) Association of polymorphisms in genes regulating the corticotropin-releasing factor system with antidepressant treatment response. *Archives of general psychiatry* 67(4):369-379.

140. Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagne B, Laprise C, Bouchard G, Plante M, Gobeil L, Shink E, Weissenbach J, & Barden N (1999) Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. *American journal of medical genetics* 88(5):567-587.

141. Shink E, Harvey M, Tremblay M, Gagne B, Belleau P, Raymond C, Labbe M, Dube MP, Lafreniere RG, & Barden N (2005) Analysis of microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms in candidate genes for susceptibility to bipolar affective disorder in the chromosome 12Q24.31 region. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 135B(1):50-58.

142. Barden N, Harvey M, Gagne B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, Labbe M, Villeneuve A, Rochette D, Bordeleau L, Stadler H, Holsboer F, & Muller-Myhsok B (2006) Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B(4):374-382.

143. Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of physiology* 145(3):494-504.

144. Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacological reviews* 24(3):509-581.

145. Khakh BS & North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442(7102):527-532.

146. Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87(2):659-797.

147. Burnstock G & Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General pharmacology* 16(5):433-440.

148. Ralevic V & Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50(3):413-492.

149. Ribeiro JA, Sebastiao AM, & de Mendonca A (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in neurobiology* 68(6):377-392.

150. de Mendonca A & Ribeiro JA (1994) Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62(2):385-390.

151. de Mendonca A, Sebastiao AM, & Ribeiro JA (2000) Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain research. Brain research reviews* 33(2-3):258-274.

152. Burnashev N (1998) Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell calcium* 24(5-6):325-332.

153. North RA & Barnard EA (1997) Nucleotide receptors. *Current opinion in neurobiology* 7(3):346-357.

154. Currie KP & Fox AP (1996) ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca2+ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16(5):1027-1036.

155. Abbracchio MP & Ceruti S (2006) Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic signalling* 2(4):595-604.

156. Jacobson KA, Jarvis MF, & Williams M (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Journal of medicinal chemistry* 45(19):4057-4093.

157. Lazarowski ER, Boucher RC, & Harden TK (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology* 64(4):785-795.

158. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362(4-5):299-309.

159. Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, & Murdock PR (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochimica et biophysica acta* 1521(1-3):107-119.

160. Moran-Jimenez MJ & Matute C (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain research. Molecular brain research* 78(1-2):50-58.

161. Lechner SG & Boehm S (2004) Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic signalling* 1(1):31-41.

162. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, & Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews* 53(1):107-118.

163. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82(4):1013-1067.

164. Khakh BS (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature reviews. Neuroscience* 2(3):165-174.

165. Boehm S (1999) ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

Neuroscience 19(2):737-746.

166. Evans RJ, Derkach V, & Surprenant A (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357(6378):503-505.
167. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, & Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(2):520-528.
168. Falzoni S, Munerati M, Ferrari D, Spisani S, Moretti S, & Di Virgilio F (1995) The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *The Journal of clinical investigation* 95(3):1207-1216.
169. Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *The Biochemical journal* 233(2):309-319.
170. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, & Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272(5262):735-738.
171. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, & Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *The Journal of biological chemistry* 272(9):5482-5486.
172. Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, & Humphrey PP (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS letters* 439(1-2):26-30.
173. Paukert M, Hidayat S, & Grunder S (2002) The P2X(7) receptor from Xenopus laevis: formation of a large pore in Xenopus oocytes. *FEBS letters* 513(2-3):253-258.
174. Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, & Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36(9):1277-1283.
175. Sperlagh B, Szabo G, Erdelyi F, Baranyi M, & Vizi ES (2003) Homo- and heteroexchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system. *British journal of pharmacology* 139(3):623-633.
176. Papp L, Balazsa T, Kofalvi A, Erdelyi F, Szabo G, Vizi ES, & Sperlagh B (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310(3):973-980.
177. Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, & Deuchars J (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic

terminals in the central and peripheral nervous systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(18):7143-7152.

178. Franke H, Grosche J, Schadlich H, Krugel U, Allgaier C, & Illes P (2001) P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108(3):421-429.

179. Franke H, Gunther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R, Faber-Zuschratter H, Schneider D, & Illes P (2004) P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63(7):686-699.

180. Allgaier C, Reinhardt R, Schadlich H, Rubini P, Bauer S, Reichenbach A, & Illes P (2004) Somatic and axonal effects of ATP via P2X2 but not P2X7 receptors in rat thoracolumbar sympathetic neurones. *Journal of neurochemistry* 90(2):359-367.

181. Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, & Noguchi K (2005) Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *The Journal of comparative neurology* 481(4):377-390.

182. Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Giraldez L, Hervas C, Gomez-Villafuertes R, Sen RP, Gualix J, & Pintor J (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochemical research* 28(10):1597-1605.

183. Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, & Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(4):1320-1328.

184. Anderson CM & Nedergaard M (2006) Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends in neurosciences* 29(5):257-262.

185. Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, & Surprenant A (2004) Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(28):6307-6314.

186. Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, & Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology* 78(6):327-346.

187. Ireland MF, Noakes PG, & Bellingham MC (2004) P2X7-like receptor subunits enhance excitatory synaptic transmission at central synapses by presynaptic mechanisms. *Neuroscience* 128(2):269-280.

188. Papp L, Vizi ES, & Sperlagh B (2004) Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice. *Neuroreport* 15(15):2387-2391.

189. Sperlagh B, Kofalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, & Vizi ES (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 81(6):1196-1211.

190. Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, & Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of biological chemistry* 280(11):10759-10765.

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

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

193. King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, & Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in Xenopus oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(13):4871-4877.

194. Torres GE, Egan TM, & Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* 274(10):6653-6659.

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

196. Casas-Pruneda G, Reyes JP, Perez-Flores G, Perez-Cornejo P, & Arreola J (2009) Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *The Journal of physiology* 587(Pt 12):2887-2901.

197. Guo C, Masin M, Qureshi OS, & Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* 72(6):1447-1456.

198. Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochemical and biophysical research communications* 377(3):803-808.

199. Virginio C, Church D, North RA, & Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36(9):1285-1294.

200. Virginio C, MacKenzie A, North RA, & Surprenant A (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *The Journal of physiology* 519 Pt 2:335-346.

201. Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, & Haag F (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 169(8):4108-4112.

202. Wiley JS, Chen JR, Snook MS, Gargett CE, & Jamieson GP (1996) Transduction mechanisms of P2Z purinoceptors. *Ciba Foundation symposium* 198:149-160; discussion 160-145.

203. Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, & van Biesen T (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European journal of pharmacology* 376(1-2):127-138.

204. Cockcroft S & Gomperts BD (1980) The ATP4- receptor of rat mast cells. *The Biochemical journal* 188(3):789-798.

205. Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, & Surprenant A (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Molecular pharmacology* 58(1):82-88.

206. Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, & Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* 20(22):6347-6358.

207. Potucek YD, Crain JM, & Watters JJ (2006) Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochemistry international* 49(2):204-214.

208. Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, & Weisman GA (2003) Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 284(2):C571-581.

209. Skaper SD, Debetto P, & Giusti P (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(2):337-345.

210. Thomas GM & Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience* 5(3):173-183.

211. Spérlagh B & Vizi SE (1996) Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Seminars in Neuroscience* 8(4):175-186.

212. Sperlagh B, Erdelyi F, Szabo G, & Vizi ES (2000) Local regulation of [(3)H]-noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P(2X)-receptors located on axon terminals. *British journal of pharmacology* 131(8):1775-1783.

213. Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, & Nedergaard M (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature medicine* 10(8):821-827.

214. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, & Verderio C (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *The Journal of biological chemistry* 278(2):1354-1362.

215. Verderio C & Matteoli M (2001) ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J Immunol* 166(10):6383-6391.

216. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, & Di Virgilio F (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of experimental medicine* 185(3):579-582.

217. Sperlagh B, Baranyi M, Hasko G, & Vizi ES (2004) Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. *Journal of neuroimmunology* 151(1-2):33-39.

218. Hervas C, Perez-Sen R, & Miras-Portugal MT (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochemical pharmacology* 70(5):770-785.

219. Wang CM, Chang YY, Kuo JS, & Sun SH (2002) Activation of P2X(7) receptors induced [(3)H]GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl(-)/HCO(3)(-)-dependent mechanism. *Glia* 37(1):8-18.

220. Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, & Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature neuroscience* 8(8):1078-1086.

221. Fields RD & Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience* 7(6):423-436.

222. Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, &

Abbracchio MP (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43(3):218-203.

223. Walter L, Dinh T, & Stella N (2004) ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(37):8068-8074.

224. Murakami K, Nakamura Y, & Yoneda Y (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117(1):37-42.

225. Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, & MacVicar BA (2001) P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(18):7135-7142.

226. Sun SH, Lin LB, Hung AC, & Kuo JS (1999) ATP-stimulated Ca2+ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *Journal of neurochemistry* 73(1):334-343.

227. Wang CM, Chang YY, & Sun SH (2003) Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cellular signalling* 15(12):1129-1137.

228. Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, & Neary JT (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *British journal of pharmacology* 141(7):1106-1117.

229. John GR, Simpson JE, Woodroofe MN, Lee SC, & Brosnan CF (2001) Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(12):4134-4142.

230. Sanz JM & Di Virgilio F (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* 164(9):4893-4898.

231. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, & Nakata Y (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(1):1-7.

232. Rampe D, Wang L, & Ringheim GE (2004) P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *Journal of neuroimmunology* 147(1-2):56-61.

233. Ferrari D, Stroh C, & Schulze-Osthoff K (1999) P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *The Journal of biological chemistry* 274(19):13205-13210.

234. Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, & Schulze-Osthoff K (1997) Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *The Journal of cell biology* 139(7):1635-1643.

235. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Buell G, & Di Virgilio F (1997) ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology* 36(9):1295-1301.

236. Gavala ML, Hill LM, Lenertz LY, Karta MR, & Bertics PJ (2010) Activation of the transcription factor FosB/activating protein-1 (AP-1) is a prominent downstream signal of the extracellular nucleotide receptor P2RX7 in monocytic and osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry* 285(44):34288-34298.

237. Gavala ML, Pfeiffer ZA, & Bertics PJ (2008) The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *Journal of leukocyte biology* 84(4):1159-1171.

238. Lenertz LY, Gavala ML, Hill LM, & Bertics PJ (2009) Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking. *Purinergic signalling* 5(2):175-187.

239. Hill LM, Gavala ML, Lenertz LY, & Bertics PJ (2010) Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. *J Immunol* 185(5):3028-3034.

240. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, & Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *The Journal of biological chemistry* 276(1):125-132.

241. Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, & Bertics PJ (1998) Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *The Journal of biological chemistry* 273(42):27170-27175.

242. Wei W, Ryu JK, Choi HB, & McLarnon JG (2008) Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer letters* 260(1-2):79-87.

243. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, & Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(6):1685-1693.

244. Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, & Inoue K (2009) Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *Journal of neurochemistry* 108(1):115-125.

245. Aga M, Watters JJ, Pfeiffer ZA, Wiepz GJ, Sommer JA, & Bertics PJ (2004) Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages. *American journal of physiology. Cell physiology* 286(4):C923-930.

246. Friedle SA, Brautigam VM, Nikodemova M, Wright ML, & Watters JJ (2011) The P2X7-Egr pathway regulates nucleotide-dependent inflammatory gene expression in microglia. *Glia* 59(1):1-13.

247. Stefano L, Rossler OG, Griesemer D, Hoth M, & Thiel G (2007) P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *Journal of cellular physiology* 213(1):36-44.

248. Lenertz LY, Gavala ML, Zhu Y, & Bertics PJ (2011) Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunologic research* 50(1):22-38.

249. Mancini M & Toker A (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 9(11):810-820.

250. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, & Rao A (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca2+ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell calcium* 42(2):145-156.

251. Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D, Rizzuto R, & Di Virgilio F (2009) Expression of the P2X7 receptor increases the Ca2+ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284(15):10120-10128.

252. Nguyen T & Di Giovanni S (2008) NFAT signaling in neural development and axon growth. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26(2):141-145.

253. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, & Williams RS (2000) A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* 275(12):8719-8725.

254. Ermak G, Morgan TE, & Davies KJ (2001) Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 276(42):38787-38794.

255. Mitchell AN, Jayakumar L, Koleilat I, Qian J, Sheehan C, Bhoiwala D, Hushmendy SF, Heuring JM, & Crawford DR (2007) Brain expression of the calcineurin inhibitor RCAN1 (Adapt78). *Archives of biochemistry and biophysics* 467(2):185-192.

256. Serrano-Perez MC, Martin ED, Vaquero CF, Azcoitia I, Calvo S, Cano E, & Tranque P (2011) Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: identification of a subpopulation of reactive astrocytes. *Glia* 59(1):94-107.

257. Porta S, Serra SA, Huch M, Valverde MA, Llorens F, Estivill X, Arbones ML, & Marti E (2007) RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Human molecular genetics* 16(9):1039-1050.

258. Ryeom S, Greenwald RJ, Sharpe AH, & McKeon F (2003) The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. *Nature immunology* 4(9):874-881.

259. Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, & Davies KJ (1997) Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* 342(1):6-12.

260. Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez-Riba M, Estivill X, & de la Luna S (2000) DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human molecular genetics* 9(11):1681-1690.

261. Ma H, Xiong H, Liu T, Zhang L, Godzik A, & Zhang Z (2004) Aggregate formation and synaptic abnormality induced by DSCR1. *Journal of neurochemistry* 88(6):1485-1496.

262. Hoeffer CA, Wong H, Cain P, Levenga J, Cowansage KK, Choi Y, Davy C, Majmundar N, McMillan DR, Rothermel BA, & Klann E (2013) Regulator of calcineurin 1 modulates expression of innate anxiety and anxiogenic responses to selective serotonin reuptake inhibitor treatment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33(43):16930-16944.

263. Hayden MS & Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* 18(18):2195-2224.

264. Bonizzi G & Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25(6):280-288.

265. Memet S (2006) NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochemical pharmacology* 72(9):1180-1195.

266. Romano A, Freudenthal R, Merlo E, & Routtenberg A (2006) Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *The European journal of neuroscience* 24(6):1507-1516.

267. Gutierrez H & Davies AM (2011) Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB. *Trends in neurosciences* 34(6):316-325.

268. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, & Duman RS (2010) Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(6):2669-2674.

269. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(1):49-62.

270. Sanchez-Ponce D, Tapia M, Munoz A, & Garrido JJ (2008) New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Molecular and cellular neurosciences* 37(4):832-844.

271. Schultz C, Konig HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, Prehn JH, Kogel D, & Deller T (2006) Coincident enrichment of phosphorylated IkappaBalpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Molecular and cellular neurosciences* 33(1):68-80.

272. Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF, Krishnan V, Reyes CM, Han MH, Ables JL, Eisch AJ, Dietz DM, Ferguson D, Neve RL, Greengard P, Kim Y, Morrison JH, & Russo SJ (2011) IkappaB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *The Journal of neuroscience :*

the official journal of the Society for Neuroscience 31(1):314-321.

273. Wen AY, Sakamoto KM, & Miller LS (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185(11):6413-6419.
274. Breuillaud L, Rossetti C, Meylan EM, Merinat C, Halfon O, Magistretti PJ, & Cardinaux JR (2012) Deletion of CREB-regulated transcription coactivator 1 induces pathological aggression, depression-related behaviors, and neuroplasticity genes dysregulation in mice. *Biological psychiatry* 72(7):528-536.
275. Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 41(16):2449-2461.
276. Budagian V, Bulanova E, Brovko L, Orinska Z, Fayad R, Paus R, & Bulfone-Paus S (2003) Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 278(3):1549-1560.
277. Nestler EJ, Barrot M, & Self DW (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20):11042-11046.
278. McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, & Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain research. Molecular brain research* 132(2):146-154.
279. Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, & Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13(5):1235-1244.
280. Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, & Chiamulera C (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275(5296):83-86.
281. Brown JR, Ye H, Bronson RT, Dikkes P, & Greenberg ME (1996) A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* 86(2):297-309.
282. Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, & Nestler EJ (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(19):10397-10402.
283. Ame JC, Spenlehauer C, & de Murcia G (2004) The PARP superfamily. *BioEssays :*

news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 26(8):882-893.

284. Otto H, Reche PA, Bazan F, Dittmar K, Haag F, & Koch-Nolte F (2005) In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC genomics* 6:139.

285. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, & Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* 342 (Pt 2):249-268.

286. Zhang Y, Wang J, Ding M, & Yu Y (2013) Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nature methods* 10(10):981-984.

287. Rouleau M, Aubin RA, & Poirier GG (2004) Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *Journal of cell science* 117(Pt 6):815-825.

288. Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, Fey M, & Hottiger MO (2009) Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic acids research* 37(11):3723-3738.

289. Hassa PO & Hottiger MO (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:3046-3082.

290. Benjamin RC & Gill DM (1980) Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 255(21):10502-10508.

291. Kraus WL & Hottiger MO (2013) PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Molecular aspects of medicine*.

292. Kraus WL & Lis JT (2003) PARP goes transcription. *Cell* 113(6):677-683.

293. Mendoza-Alvarez H & Alvarez-Gonzalez R (2001) Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. *The Journal of biological chemistry* 276(39):36425-36430.

294. Kraus WL (2008) Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current opinion in cell biology* 20(3):294-302.

295. Ji Y & Tulin AV (2010) The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation. *Current opinion in genetics & development* 20(5):512-518.

296. Krishnakumar R & Kraus WL (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell* 39(1):8-24.

297. Huletsky A, de Murcia G, Muller S, Hengartner M, Menard L, Lamarre D, & Poirier GG (1989) The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *The Journal of biological chemistry* 264(15):8878-8886.

298. Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, & Mandel P (1982) Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(11):3423-3427.

299. Kim MY, Mauro S, Gevry N, Lis JT, & Kraus WL (2004) NAD+-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119(6):803-814.

300. Wacker DA, Ruhl DD, Balagamwala EH, Hope KM, Zhang T, & Kraus WL (2007) The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Molecular and cellular biology* 27(21):7475-7485.

301. Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, & Kraus WL (2008) Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 319(5864):819-821.

302. Slattery E, Dignam JD, Matsui T, & Roeder RG (1983) Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 258(9):5955-5959.

303. Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, & Hottiger MO (2003) Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *The Journal of biological chemistry* 278(46):45145-45153.

304. Hassa PO, Haenni SS, Buerki C, Meier NI, Lane WS, Owen H, Gersbach M, Imhof R, & Hottiger MO (2005) Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* 280(49):40450-40464.

305. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, & Rosenfeld MG (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312(5781):1798-1802.

306. Pavri R, Lewis B, Kim TK, Dilworth FJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, de Murcia G, Evans R, Chambon P, & Reinberg D (2005) PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Molecular cell* 18(1):83-96.

307. Attwood JT, Yung RL, & Richardson BC (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59(2):241-257.

308. Caiafa P & Zampieri M (2005) DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *Journal of cellular biochemistry* 94(2):257-265.

309. Caiafa P, Guastafierro T, & Zampieri M (2009) Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(3):672-678.

310. Reale A, Matteis GD, Galleazzi G, Zampieri M, & Caiafa P (2005) Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24(1):13-19.

311. Cuzzocrea S (2005) Shock, inflammation and PARP. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 52(1):72-82.

312. Nossa CW, Jain P, Tamilselvam B, Gupta VR, Chen LF, Schreiber V, Desnoyers S, & Blanke SR (2009) Activation of the abundant nuclear factor poly(ADP-ribose) polymerase-1 by Helicobacter pylori. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47):19998-20003.

313. Ha HC (2004) Defective transcription factor activation for proinflammatory gene expression in poly(ADP-ribose) polymerase 1-deficient glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14):5087-5092.

314. Mabley JG, Suarez-Pinzon WL, Hasko G, Salzman AL, Rabinovitch A, Kun E, & Szabo C (2001) Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase by gene disruption or inhibition with 5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone protects mice from multiple-low-dose-streptozotocin-induced diabetes. *British journal of pharmacology* 133(6):909-919.

315. Chiarugi A & Moskowitz MA (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *Journal of neurochemistry* 85(2):306-317.

316. Ha HC, Hester LD, & Snyder SH (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(5):3270-3275.

317. Lee JH, Park SY, Shin HK, Kim CD, Lee WS, & Hong KW (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition by cilostazol is implicated in the neuroprotective effect against focal cerebral ischemic infarct in rat. *Brain research* 1152:182-190.
318. Moroni F (2008) Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Current opinion in pharmacology* 8(1):96-103.
319. Nakajima H, Nagaso H, Kakui N, Ishikawa M, Hiranuma T, & Hoshiko S (2004) Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *The Journal of biological chemistry* 279(41):42774-42786.
320. Weltin D, Picard V, Aupeix K, Varin M, Oth D, Marchal J, Dufour P, & Bischoff P (1995) Immunosuppressive activities of 6(5H)-phenanthridinone, a new poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor. *International journal of immunopharmacology* 17(4):265-271.
321. Hassa PO & Hottiger MO (1999) A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biological chemistry* 380(7-8):953-959.
322. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, & de Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *The EMBO journal* 18(16):4446-4454.
323. Zingarelli B, Hake PW, Burroughs TJ, Piraino G, O'Connor M, & Denenberg A (2004) Activator protein-1 signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis. *Immunology* 113(4):509-517.
324. Olabisi OA, Soto-Nieves N, Nieves E, Yang TT, Yang X, Yu RY, Suk HY, Macian F, & Chow CW (2008) Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation. *Molecular and cellular biology* 28(9):2860-2871.
325. Valdor R, Schreiber V, Saenz L, Martinez T, Munoz-Suano A, Dominguez-Villar M, Ramirez P, Parrilla P, Aguado E, Garcia-Cozar F, & Yelamos J (2008) Regulation of NFAT by poly(ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Molecular immunology* 45(7):1863-1871.
326. Bai P, Canto C, Oudart H, Brunyanszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia

J, & Auwerx J (2011) PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell metabolism* 13(4):461-468.

327. Cohen-Armon M, Visochek L, Katzoff A, Levitan D, Susswein AJ, Klein R, Valbrun M, & Schwartz JH (2004) Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science* 304(5678):1820-1822.

328. Kauppinen TM & Swanson RA (2007) The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145(4):1267-1272.

329. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, & Dawson VL (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature medicine* 3(10):1089-1095.

330. Alano CC, Garnier P, Ying W, Higashi Y, Kauppinen TM, & Swanson RA (2010) NAD+ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(8):2967-2978.

331. Tang KS, Suh SW, Alano CC, Shao Z, Hunt WT, Swanson RA, & Anderson CM (2010) Astrocytic poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation leads to bioenergetic depletion and inhibition of glutamate uptake capacity. *Glia* 58(4):446-457.

332. Scott GS, Hake P, Kean RB, Virag L, Szabo C, & Hooper DC (2001) Role of poly(ADP-ribose) synthetase activation in the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 117(1-2):78-86.

333. Love S, Barber R, & Wilcock GK (1999) Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 122 (Pt 2):247-253.

334. Abeti R, Abramov AY, & Duchen MR (2011) Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 6):1658-1672.

335. Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petrou S, & Wiley JS (2004) An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry* 279(30):31287-31295.

336. Suadicani SO, Iglesias R, Spray DC, & Scemes E (2009) Point mutation in the mouse P2X7 receptor affects intercellular calcium waves in astrocytes. *ASN neuro* 1(1).

337. Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden JA, &

Wiley JS (2001) A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry* 276(14):11135-11142.

338. Wiley JS, Dao-Ung LP, Li C, Shemon AN, Gu BJ, Smart ML, Fuller SJ, Barden JA, Petrou S, & Sluyter R (2003) An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry* 278(19):17108-17113.

339. Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P, Cuneo A, Castoldi G, Baricordi OR, & Di Virgilio F (2005) A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175(1):82-89.

340. Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA, Surprenant A, & Jiang LH (2010) Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *Journal of psychiatric research* 44(6):347-355.

341. Xiao J, Sun L, Yan H, Jiao W, Miao Q, Feng W, Wu X, Gu Y, Jiao A, Guo Y, Peng X, & Shen A (2010) Metaanalysis of P2X7 gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility. *FEMS immunology and medical microbiology* 60(2):165-170.

342. Nino-Moreno P, Portales-Perez D, Hernandez-Castro B, Portales-Cervantes L, Flores-Meraz V, Baranda L, Gomez-Gomez A, Acuna-Alonzo V, Granados J, & Gonzalez-Amaro R (2007) P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical and experimental immunology* 148(3):469-477.

343. Tekin D, Kayaalti Z, Dalgic N, Cakir E, Soylemezoglu T, Isin Kutlubay B, & Aydin Kilic B (2010) Polymorphism in the p2x7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. *The Pediatric infectious disease journal* 29(8):779-782.

344. Boldt W, Klapperstuck M, Buttner C, Sadtler S, Schmalzing G, & Markwardt F (2003) Glu496Ala polymorphism of human P2X7 receptor does not affect its electrophysiological phenotype. *American journal of physiology. Cell physiology* 284(3):C749-756.

345. Sluyter R, Shemon AN, & Wiley JS (2004) Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *J Immunol* 172(6):3399-3405.

346. Abkevich V, Camp NJ, Hensel CH, Neff CD, Russell DL, Hughes DC, Plenk AM, Lowry MR, Richards RL, Carter C, Frech GC, Stone S, Rowe K, Chau CA, Cortado K, Hunt A, Luce K, O'Neil G, Poarch J, Potter J, Poulsen GH, Saxton H, Bernat-Sestak M, Thompson V, Gutin A, Skolnick MH, Shattuck D, & Cannon-Albright L (2003) Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2. *American journal of human genetics* 73(6):1271-1281.

347. Curtis D, Kalsi G, Brynjolfsson J, McInnis M, O'Neill J, Smyth C, Moloney E, Murphy P, McQuillin A, Petursson H, & Gurling H (2003) Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. *Psychiatric genetics* 13(2):77-84.

348. Degn B, Lundorf MD, Wang A, Vang M, Mors O, Kruse TA, & Ewald H (2001) Further evidence for a bipolar risk gene on chromosome 12q24 suggested by investigation of haplotype sharing and allelic association in patients from the Faroe Islands. *Molecular psychiatry* 6(4):450-455.

349. Ewald H, Degn B, Mors O, & Kruse TA (1998) Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatric genetics* 8(3):131-140.

350. Shink E, Morissette J, Sherrington R, & Barden N (2005) A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. *Molecular psychiatry* 10(6):545-552.

351. Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, & Nemoda Z (2009) Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 150B(2):295-299.

352. Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, & Muller-Myhsok B (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Human molecular genetics* 15(16):2438-2445.

353. McQuillin A, Bass NJ, Choudhury K, Puri V, Kosmin M, Lawrence J, Curtis D, & Gurling HM (2009) Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is

associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders. *Molecular psychiatry* 14(6):614-620.

354. Soronen P, Mantere O, Melartin T, Suominen K, Vuorilehto M, Rytsala H, Arvilommi P, Holma I, Holma M, Jylha P, Valtonen HM, Haukka J, Isometsa E, & Paunio T (2011) P2RX7 gene is associated consistently with mood disorders and predicts clinical outcome in three clinical cohorts. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156B(4):435-447.

355. Nagy G, Ronai Z, Somogyi A, Sasvari-Szekely M, Rahman OA, Mate A, Varga T, & Nemoda Z (2008) P2RX7 Gln460Arg polymorphism is associated with depression among diabetic patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32(8):1884-1888.

356. Halmai Z, Dome P, Vereczkei A, Abdul-Rahman O, Szekely A, Gonda X, Faludi G, Sasvari-Szekely M, & Nemoda Z (2013) Associations between depression severity and purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms. *Journal of affective disorders* 150(1):104-109.

357. Backlund L, Lavebratt C, Frisen L, Nikamo P, Hukic Sudic D, Traskman-Bendz L, Landen M, Edman G, Vawter MP, Osby U, & Schalling M (2012) P2RX7: expression responds to sleep deprivation and associates with rapid cycling in bipolar disorder type 1. *PloS one* 7(8):e43057.

358. Green EK, Grozeva D, Raybould R, Elvidge G, Macgregor S, Craig I, Farmer A, McGuffin P, Forty L, Jones L, Jones I, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, & Craddock N (2009) P2RX7: A bipolar and unipolar disorder candidate susceptibility gene? *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 150B(8):1063-1069.

359. Grigoroiu-Serbanescu M, Herms S, Muhleisen TW, Georgi A, Diaconu CC, Strohmaier J, Czerski P, Hauser J, Leszczynska-Rodziewicz A, Jamra RA, Babadjanova G, Tiganov A, Krasnov V, Kapiletti S, Neagu AI, Vollmer J, Breuer R, Rietschel M, Nothen MM, Cichon S, & Propping P (2009) Variation in P2RX7 candidate gene (rs2230912) is not associated with bipolar I disorder and unipolar major depression in four European samples. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society*

of Psychiatric Genetics 150B(7):1017-1021.

360. Viikki M, Kampman O, Anttila S, Illi A, Setala-Soikkeli E, Huuhka M, Mononen N, Lehtimaki T, & Leinonen E (2011) P2RX7 polymorphisms Gln460Arg and His155Tyr are not associated with major depressive disorder or remission after SSRI or ECT. *Neuroscience letters* 493(3):127-130.
361. Lavebratt C, Aberg E, Sjoholm LK, & Forsell Y (2010) Variations in FKBP5 and BDNF genes are suggestively associated with depression in a Swedish population-based cohort. *Journal of affective disorders* 125(1-3):249-255.
362. Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York) 3rd Ed.
363. Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7(6):1513-1523.
364. Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162(1):156-159.
365. Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3(6):1101-1108.
366. Kang TH & Kim KT (2006) Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nature cell biology* 8(8):863-869.
367. Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J, Linsley PS, Aronin N, Xu Z, & Zamore PD (2006) Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS genetics* 2(9):e140.
368. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, & Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199-208.
369. Feige JN, Sage D, Wahli W, Desvergne B, & Gelman L (2005) PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microscopy research and technique* 68(1):51-58.
370. Xia Z & Liu Y (2001) Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophysical journal* 81(4):2395-2402.
371. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, & Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1:S96-104.
372. Wettenhall JM & Smyth GK (2004) limmaGUI: a graphical user interface for linear

modeling of microarray data. *Bioinformatics* 20(18):3705-3706.

373. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3:Article3.

374. Smyth GK, Michaud J, & Scott HS (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21(9):2067-2075.

375. Hercher C, Turecki G, & Mechawar N (2009) Through the looking glass: examining neuroanatomical evidence for cellular alterations in major depression. *Journal of psychiatric research* 43(11):947-961.

376. Illes P, Verkhratsky A, Burnstock G, & Franke H (2012) P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 18(5):422-438.

377. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, & Jarvis MF (2009) Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* 157(7):1203-1214.

378. Young MT, Pelegrin P, & Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Molecular pharmacology* 71(1):92-100.

379. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, & Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* 20(1):87-90.

380. Piston DW & Kremers GJ (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences* 32(9):407-414.

381. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, & Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature biotechnology* 22(4):445-449.

382. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, & Tsien RY (2006) Ca2+ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chemistry & biology* 13(5):521-530.

383. Young MT, Fisher JA, Fountain SJ, Ford RC, North RA, & Khakh BS (2008) Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *The Journal of biological chemistry* 283(38):26241-26251.

384. Jares-Erijman EA & Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature biotechnology* 21(11):1387-1395.

385. Armitage R (2007) Sleep and circadian rhythms in mood disorders. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum* (433):104-115.

386. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, & Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311(5762):864-868.

387. Hartmann J, Wagner KV, Dedic N, Marinescu D, Scharf SH, Wang XD, Deussing JM, Hausch F, Rein T, Schmidt U, Holsboer F, Muller MB, & Schmidt MV (2012) Fkbp52 heterozygosity alters behavioral, endocrine and neurogenetic parameters under basal and chronic stress conditions in mice. *Psychoneuroendocrinology* 37(12):2009-2021.

388. Berton O & Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature reviews. Neuroscience* 7(2):137-151.

389. Nestler EJ & Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 13(10):1161-1169.

390. Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, & Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89(1):73-82.

391. Wiese S, Pei G, Karch C, Troppmair J, Holtmann B, Rapp UR, & Sendtner M (2001) Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nature neuroscience* 4(2):137-142.

392. Bonfiglio JJ, Inda C, Senin S, Maccarrone G, Refojo D, Giacomini D, Turck CW, Holsboer F, Arzt E, & Silberstein S (2013) B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells. *Mol Endocrinol* 27(3):491-510.

393. Bonfiglio JJ, Maccarrone G, Rewerts C, Holsboer F, Arzt E, Turck CW, & Silberstein S (2011) Characterization of the B-Raf interactome in mouse hippocampal neuronal cells. *Journal of proteomics* 74(2):186-198.

394. Wen LT, Caldwell CC, & Knowles AF (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase activation and changes in Bax protein expression associated with extracellular ATP-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293-P2X7 cells. *Molecular pharmacology* 63(3):706-713.

395. Provenzano M & Mocellin S (2007) Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Advances in experimental medicine and biology* 593:66-73.

396. Caspi A & Moffitt TE (2006) Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience* 7(7):583-590.

397. North RA & Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40:563-580.

398. Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L, & Gorodeski GI (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 281(25):17228-17237.

399. Masin M, Young C, Lim K, Barnes SJ, Xu XJ, Marschall V, Brutkowski W, Mooney ER, Gorecki DC, & Murrell-Lagnado R (2012) Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts. *British journal of pharmacology* 165(4):978-993.

400. Raouf R, Chakfe Y, Blais D, Speelman A, Boue-Grabot E, Henderson D, & Seguela P (2004) Selective knock-down of P2X7 ATP receptor function by dominant-negative subunits. *Molecular pharmacology* 65(3):646-654.

401. Marquez-Klaka B, Rettinger J, & Nicke A (2009) Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *European biophysics journal : EBJ* 38(3):329-338.

402. Denlinger LC, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, & Bertics PJ (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167(4):1871-1876.

403. Costa-Junior HM, Sarmento Vieira F, & Coutinho-Silva R (2011) C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic signalling* 7(1):7-19.

404. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, & Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460(7255):592-598.

405. Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485(7397):207-212.

406. Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, & Baldwin SA (2013) Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in

Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Frontiers in pharmacology* 4:55.

407. Basso AM, Bratcher NA, Harris RR, Jarvis MF, Decker MW, & Rueter LE (2009) Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research* 198(1):83-90.

408. Boucher AA, Arnold JC, Hunt GE, Spiro A, Spencer J, Brown C, McGregor IS, Bennett MR, & Kassiou M (2011) Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience* 189:170-177.

409. Csolle C, Ando RD, Kittel A, Goloncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Nemeth T, Mocsai A, & Sperlagh B (2013) The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 16(1):213-233.

410. Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, & Miras-Portugal MT (2005) Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS letters* 579(17):3783-3788.

411. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH,

Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kaspryzk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S & Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.

412. Aston C, Jiang L, & Sokolov BP (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 10(3):309-322.

413. Crisafulli C, Shim DS, Andrisano C, Pae CU, Chiesa A, Han C, Patkar AA, Lee SJ, Serretti A, & De Ronchi D (2012) Case-control association study of 14 variants of CREB1, CREBBP and CREM on diagnosis and treatment outcome in major depressive disorder and bipolar disorder. *Psychiatry research* 198(1):39-46.

414. Perlis RH, Purcell S, Fagerness J, Cusin C, Yamaki L, Fava M, & Smoller JW (2007) Clinical and genetic dissection of anger expression and CREB1 polymorphisms in major depressive disorder. *Biological psychiatry* 62(5):536-540.

415. Hines RM, Davies PA, Moss SJ, & Maguire J (2012) Functional regulation of

GABAA receptors in nervous system pathologies. *Current opinion in neurobiology* 22(3):552-558.

416. Lydiard RB (2003) The role of GABA in anxiety disorders. *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 3:21-27.

417. Craddock N, Jones L, Jones IR, Kirov G, Green EK, Grozeva D, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere ML, Vukcevic D, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Russell E, Norton N, Breen G, St Clair D, Collier DA, Young AH, Ferrier IN, Farmer A, McGuffin P, Holmans PA, Donnelly P, Owen MJ, & O'Donovan MC (2010) Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype. *Molecular psychiatry* 15(2):146-153.

418. Luscher B, Shen Q, & Sahir N (2011) The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 16(4):383-406.

419. Kalueff AV & Nutt DJ (2007) Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and anxiety* 24(7):495-517.

420. Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, Marek G, Epperson CN, Goddard A, & Mason GF (2002) Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Molecular psychiatry* 7 Suppl 1:S71-80.

421. Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, & Birchmeier C (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124(18):3575-3586.

422. Mei L & Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience* 9(6):437-452.

423. Walker RM, Christoforou A, Thomson PA, McGhee KA, Maclean A, Muhleisen TW, Strohmaier J, Nieratschker V, Nothen MM, Rietschel M, Cichon S, Morris SW, Jilani O, Stclair D, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ, & Evans KL (2010) Association analysis of Neuregulin 1 candidate regions in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience letters* 478(1):9-13.

424. Georgieva L, Dimitrova A, Ivanov D, Nikolov I, Williams NM, Grozeva D, Zaharieva I, Toncheva D, Owen MJ, Kirov G, & O'Donovan MC (2008) Support for neuregulin 1 as a susceptibility gene for bipolar disorder and schizophrenia. *Biological psychiatry* 64(5):419-427.

425. Thomson PA, Christoforou A, Morris SW, Adie E, Pickard BS, Porteous DJ, Muir WJ,

Blackwood DH, & Evans KL (2007) Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population. *Molecular psychiatry* 12(1):94-104.

426. Malkesman O, Scattoni ML, Paredes D, Tragon T, Pearson B, Shaltiel G, Chen G, Crawley JN, & Manji HK (2010) The female urine sniffing test: a novel approach for assessing reward-seeking behavior in rodents. *Biological psychiatry* 67(9):864-871.