**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Título da tese:

**Ric-8B, um provável GEF para G α olf,
promove expressão funcional de
receptores olfatórios.**

Autor: Luiz Eduardo Cabral von Dannecker

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof^a. Dra. Bettina Malnic

SÃO PAULO

Data do depósito do trabalho na SPG: 30 de Junho de 2006.

Ao meu irmão, Raphael.

“Uma técnica comum no estudo de receptores é a produção de mutações pontuais e posterior análise das alterações. No caso dos receptores olfatórios nós já temos 1200 mutações selecionadas por milhões de anos de evolução. O experimento está pronto; nós só devemos aprender a ler esses dados.”

(Stuart Firestein, Columbia University, New York)

Agradecimentos

Agradeço a prof^a. Bettina Malnic pela eficiente orientação do meu trabalho durante todos esses anos e a Adriana Mercadante pelo incentivo e companheirismo durante todo o trajeto.

Agradeço também aos amigos que trabalharam comigo, ao Daniel, a Jussara, ao Guilherme, a Marcela, ao Pedro, a Érica e ao Edson pelas sugestões e pela agradável convivência.

A FAPESP pelo financiamento da minha bolsa e do projeto.

Agradeço também ao Nescau por ter deixado a vida mais leve.

E a Flávia por ter acreditado, como eu, que tudo iria dar certo.

Abreviaturas

β 2AR: receptor beta-adrenérgico, subtipo 2

aa: aminoácido

AMPc: 3'-5' adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina 5'-trifosfato

BC: células basais (epitélio olfatório)

CA3: região CA3 do hipocampo

cDNA: DNA complementar

Ce: cerebelo

CNGc: canal ativado por nucleotídeos cíclicos

CTP: citidina 5'-trifosfato

d: 2'-desoxirribo-

D1R: receptor de dopamina, subtipo 1

DEMEM: meio de cultura de células proposto por Eagle e modificado por Dulbecco

DEPC: dietilpirocarbonato

Dg: giro dentado

DIG: digoxigenina

DNA-AD: domínio de ativação do DNA

DNA-BD: domínio de ligação ao DNA

dNTP: Mistura de dATP, dGTP, dCTP e dTTP

D.O.: densidade ótica

EDTA: tetra-acetato de etilenodiamino dissódico

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDP: guanosina 5'-bifosfato

GEF: fator trocador de GTP

GFP: proteína verde fluorescente

GPCR: receptor acoplado à proteína G

GTP: guanosina 5'-trifosfato

HEK-293: linhagem celular de rim humano embrionário

HEK-293T: linhagem celular de rim humano embrionário que expressa o antígeno T

His: histidina

Kb: quilobase

Leu: leucina

Na: *nucleus accumbens*

NBT/BCIP: nitro-azul cloreto de tetrazolium/sal de p-toluidine 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato

OMP: proteína marcadora de epitélio olfatório

ON: neurônios olfatórios maduros (epitélio olfatório)

OR : receptor olfatório

Ot: tubérculo olfatório

pb: pares de base

PBS: tampão salino de fosfato

Pc: córtex piriforme

PCR: reação em cadeia da DNA polimerase

Reep: proteína que promove a melhora da expressão de receptores

Ric: resistente a inibidores de colinesterase

Rho: peptídeo correspondente aos primeiros 20aa do receptor de rodopsina bovina

RNAm: RNA mensageiro

RTP: proteína transportadora de receptor

RT-PCR: ensaio de transcrição reversa seguido de reação em cadeia da DNA polimerase

SC: células suporte (epitélio olfatório)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SSC: tampão salino contendo cloreto de sódio e citrato de sódio

SSPE: tampão salino contendo cloreto de sódio, dihidrogenofosfato de sódio e EDTA.

St: *striatum*

TE: tampão Tris/EDTA

tRNA: RNA transportador

Trp: triptofano

TTP: timidina 5'-trifosfato

Ura: uracila

UTP: uridina 5'-trifosfato

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

YPD: peptona de levedura/dextrose

Índice

(1) RESUMO.....	8
(2) SUMMARY	9
(3) INTRODUÇÃO.....	10
(3-A) O SISTEMA OLFATÓRIO	10
(3-B) A TRANSDUÇÃO DE SINAL NO SISTEMA OLFATÓRIO.....	12
(3-C) A NECESSIDADE DE UM SISTEMA HETERÓLOGO PARA EXPRESSÃO DE ORs	14
(3-D) INTRODUÇÃO A RIC-8.....	19
(4) OBJETIVOS	21
(5) MATERIAL & MÉTODOS.....	23
(5-A) SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA	23
(5-B) VARREDURA DA BIBLIOTECA DE EPITÉLIO OLFATÓRIO COM A ISCA G α OLF	27
(5-C) ANÁLISE DAS COLÔNIAS LEU+ OBTIDAS NA VARREDURA.....	30
(5-D) ENSAIO DE INTERAÇÃO CRUZADA.....	33
(5-E) <i>NORTHERN BLOT</i>	35
(5-F) RT-PCR	36
(5-G) HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	37
(5-H) CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO	39
(5-I) ENSAIO PARA DETECÇÃO DE AMPc EM CÉLULAS HEK-293 ou HEK-293T	40
(5-J) ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	42
(5-L) ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
(6) RESULTADOS:.....	44
IDENTIFICAÇÃO DE UM PROVÁVEL GEF PARA A VIA DE TRANSDUÇÃO DE ODORES	
(6-A) RESULTADO DA VARREDURA DA BIBLIOTECA UTILIZANDO G α OLF COMO ISCA.....	44
(6-A-I) RIC-8B INTERAGE COM G α OLF EM SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO	48
(6-B) DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE RIC-8B.....	50
(6-B-I) <i>NORTHERN BLOT</i>	50
(6-B-II) RT-PCR.....	52
(6-B-III) DETERMINAÇÃO DAS FORMAS DE RIC-8B NO EPITÉLIO OLFATÓRIO	52
(6-C) HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	54
(6-C-I) A EXPRESSÃO DE RIC-8B E G α OLF ESTÁ CO-LOCALIZADA NO EPITÉLIO OLFATÓRIO	55
(6-C-II) A EXPRESSÃO DE RIC-8B E G α OLF ESTÁ CO-LOCALIZADA NO CÉREBRO.....	57
(6-D) RIC-8B PROPICIA O ACÚMULO DE AMPc NA PRESENÇA DE G α OLF	60
RIC-8B PROMOVE EXPRESSÃO FUNCIONAL DE ORs	
(6-E) RIC-8B PROMOVE EXPRESSÃO FUNCIONAL DO MOR-EG	63
(6-F) RIC-8B PROMOVE EXPRESSÃO FUNCIONAL DO MOR-I7.....	66
(6-G) RIC-8B PROMOVE EXPRESSÃO FUNCIONAL DE RHO-S6.....	68
(6-H) RIC-8B PROMOVE ACÚMULO DE G α OLF NA PERIFERIA CELULAR	70
(7) DISCUSSÃO	71
(8) CONCLUSÕES.....	82
(9) REFERÊNCIAS.....	83
(10) ANEXO-I: PUBLICAÇÕES.....	89

(1) Resumo

Os odores são detectados por uma grande família de receptores olfatórios (ORs) que são expressos nos neurônios olfatórios localizados no nariz. Os ORs ativados por um determinado odor acoplam-se à proteína $G\alpha_{olf}$ que irá promover a ativação da adenilil ciclase III, resultando na produção de AMPc. O aumento da concentração de AMPc irá ativar canais iônicos dependentes de AMPc, tendo como consequência a despolarização do neurônio olfatório. A informação desencadeada pela ativação de determinados ORs é então transmitida para regiões específicas do cérebro promovendo a percepção do odor.

A determinação da especificidade dos ORs para diferentes odores irá contribuir para o entendimento de como os odores são discriminados pelo sistema olfatório, entretanto, poucos ORs tiveram seus ligantes definidos devido a dificuldade de expressão funcional de ORs em sistema heterólogo.

Em nosso trabalho, utilizamos o sistema de duplo-híbrido em levedura a fim de determinar potenciais novos reguladores para $G\alpha_{olf}$. Deste experimento, identificamos que Ric-8B (Ric, abreviatura de *Resistant to Inhibitors of Cholinesterase*), um provável GEF (*GTP Exchange Factor*), é capaz de interagir com $G\alpha_{olf}$. Assim como $G\alpha_{olf}$, Ric-8B é predominantemente expresso nos neurônios olfatórios maduros e em regiões específicas do cérebro. A restrita co-localização de $G\alpha_{olf}$ e Ric-8B fortemente indica que Ric-8B é uma proteína que participa da via de transdução de sinal de $G\alpha_{olf}$. Através de nossos ensaios, utilizando células HEK-293, foi possível mostrar que Ric-8B é capaz de potencializar a atividade de $G\alpha_{olf}$, tendo como consequência o aumento da produção de AMPc em sistema heterólogo.

Por fim, nós mostramos que Ric-8B é capaz de promover a expressão funcional de ORs em sistema heterólogo. Nossos resultados demonstram que a expressão de Ric-8B é capaz de aumentar o acúmulo de $G\alpha_{olf}$ na periferia de células HEK-293T, indicando que Ric-8B promove a expressão funcional de ORs provavelmente através da melhora da eficiência do acoplamento dos ORs com $G\alpha_{olf}$. Nossos resultados demonstram que o uso de Ric-8B em um sistema em larga escala irá permitir a expressão funcional de diversos ORs, permitindo a identificação de seus respectivos ligantes. Tal análise irá contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de percepção dos odores.

(2) Summary

Odorants are detected by a large family of odorant receptors (ORs) expressed in the olfactory neurons in the nose. The activated receptors couple to an olfactory-specific G-protein ($G_{\alpha olf}$), which activates adenylyl cyclase III to produce cAMP. Increased cAMP levels activate cyclic nucleotide-gated channels, causing cell membrane depolarization. The information provided by the odorant receptors is transmitted to specific regions of the brain leading to odorant perception.

The determination of the odorant specificities of the different ORs will contribute to the understanding of how odorants are discriminated by the olfactory system. However, only a few ORs have been linked to odorants they recognized to date because ORs are not efficiently expressed in heterologous cells since they are poorly expressed on the cell surface.

Here we used yeast two-hybrid to search for potential regulators for $G_{\alpha olf}$. We found that Ric-8B (for Resistant to Inhibitors of Cholinesterase), a putative GTP exchange factor, is able to interact with $G_{\alpha olf}$. Like $G_{\alpha olf}$, Ric-8B is predominantly expressed in the mature olfactory sensory neurons and also in a few regions in the brain. The highly restricted and colocalized expression patterns of Ric-8B and $G_{\alpha olf}$ strongly indicate that Ric-8B is a functional partner for $G_{\alpha olf}$. We show that Ric-8B is able to potentiate $G_{\alpha olf}$ -dependent cAMP accumulation in human embryonic kidney 293 cells and therefore may be an important component for odorant signal transduction.

Finally, we show that Ric-8B promotes efficient heterologous expression of ORs. Our results show that Ric-8B enhances accumulation of $G_{\alpha olf}$ at the cell cortex, indicating that it promotes functional OR expression probably by improving the efficiency of OR coupling to $G_{\alpha olf}$. Our results demonstrate that the employment of Ric-8B in a high-throughput system will allow the functional screening of the OR family members and thereby provide further insight into the mechanisms of odor perception.

(3) Introdução

(3-A) O sistema olfatório

O sistema olfatório de vertebrados é capaz de detectar e identificar com precisão uma grande variedade de odores presentes em pequenas concentrações no ambiente. Estima-se que o homem seja capaz de identificar cerca de 10.000 diferentes odores (Firestein, 2004).

O início da detecção ocorre nos cílios dos neurônios olfatórios maduros, que estão localizados no nariz, através da ligação do odor a uma família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), identificada e denominada como a família dos receptores olfatórios (ORs) (Buck e Axel, 1991).

Estudos sugerem a existência de aproximados 1000 genes que codificam para diferentes ORs em camundongo (Godfrey *et al.*, 2004) e aproximados 350 genes no homem (Malnic *et al.*, 2004), formando assim a maior família de genes identificada no genoma de mamíferos, correspondendo a 1-3 % do genoma.

Os ORs são bastantes diversificados em relação as suas sequências de aminoácidos, identidade de sequência de aminoácidos na faixa de 34%-99%, o que possibilita o reconhecimento e a discriminação de uma grande variedade de odores. Regiões de grande variabilidade são encontradas nos domínios transmembrana III, IV e V da estrutura dos ORs, sugerindo serem essas as regiões importantes para a ligação com os odores (Buck e Axel, 1991).

Estudos demonstraram que um mesmo OR pode ser estimulado por diferentes odores, e que um mesmo odor pode interagir com diferentes ORs (Malnic *et al.*, 1999). Tais resultados demonstraram que os odores estimulam um certo número de ORs específicos, sendo este conjunto de receptores ativados que irá possibilitar tal identificação, formando o início do “código” para um dado odor.

A possibilidade de combinação de diferentes ORs para a detecção de um dado odor aumenta muito a capacidade de discriminação do sistema olfatório. Por exemplo, se considerarmos um repertório de 300 ORs e que em média um odor ative uma combinação de 10 ORs, teríamos pelo menos 10^{14} combinações diferentes de receptores (Firestein; 2004).

Por fim, ORs ativados por um dado odor irão promover a geração de potenciais de ação nos neurônios olfatórios, que se propagarão até o bulbo olfatório, onde ocorrerá o estímulo de um conjunto específico de glomérulos. O estímulo organizado e específico de um conjunto de glomérulos no bulbo, decorrente de um odor característico, seria o segundo passo para a formação do “código” para um dado odor. Esse “código” é então transmitido do bulbo para o córtex olfatório onde será distribuído para outras áreas do cérebro, podendo alcançar regiões superiores envolvidas com consciência, emoção e motivação (Buck, 1996).

Como o sistema olfatório é capaz de organizar tal “código” proveniente da combinação de alguns membros do repertório de 1.000 ORs?

As primeiras respostas para entender tal organização deste sistema foram obtidas através de ensaios de hibridização *in situ* em epitélio olfatório de camundongo e rato que indicaram que cada um dos 1000 ORs é expresso em apenas 0,1% dos neurônios olfatórios, sugerindo que cada neurônio expressa um único OR (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993). Essa hipótese foi posteriormente confirmada pela técnica de RT-PCR utilizando cDNA proveniente de apenas um neurônio olfatório (Malnic *et al.*, 1999).

Estudos utilizando camundongos transgênicos demonstraram que os axônios de todos os neurônios olfatórios que expressam um dado OR convergem para um mesmo “ponto” no bulbo olfatório (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Esse “ponto” é o glomérulo que é formado por um conglomerado de neuropilinas onde os axônios dos neurônios olfatórios fazem sinapse com os dendritos das células mitrais do bulbo, que por sua vez projetam seus axônios para várias regiões do cérebro (Firestein; 2001). Dessa forma, o bulbo olfatório possui um mapa organizado, representado pelo conjunto de aproximados 2.000 glomérulos, que mantém o “código” proveniente de um conjunto de ORs ativados por um dado odor.

Foi também demonstrado que os ORs não estão apenas envolvidos na ligação a odores, mas também no direcionamento dos axônios para glomérulos específicos no bulbo (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

Pouco se sabe a respeito de como o “código” para um dado odor é processado e organizado a partir do bulbo olfatório. No entanto, estudos recentes demonstraram a existência de um mapa olfatório no córtex pois odores com estruturas similares ativam combinações semelhantes de neurônios corticais. Assim, deve existir uma maneira lógica e organizada de mapeamento do “código” também no córtex (Zou *et al.*, 2005).

(3-B) A transdução de sinal no sistema olfatório

Como visto, a detecção de um odor no epitélio olfatório ocorre devido à estimulação de uma combinação específica de neurônios olfatórios, tendo cada um desses neurônios a expressão de um determinado OR. Tal detecção pode ser dividida em três fases distintas (Nakamura, 2000; Ronnett *et al.*, 2002):

1. Ligação do odor aos receptores olfatórios (ORs).
2. Ativação de proteína G ($G_{\alpha olf}$), promovendo aumento de AMPc via estimulação de adenilil ciclase III.
3. Ativação de canais CNGc (*Cyclic Nucleotide Gated channel*) que possuem sítios intracelulares de ligação para AMPc, promovendo a entrada de cátions como Ca^{+2} e Na^{+} e consequente despolarização dos neurônios olfatórios.

Camundongos *knock-out* para $G_{\alpha olf}$ (Belluscio *et al.*, 1998), adenilil ciclase III (Wong *et al.*, 2000) e o canal CNG expresso nos neurônios olfatórios (Brunet *et al.*, 1996) são anósmicos, ou seja, são incapazes de detectar odores. Essas deleções reforçaram o modelo de transdução proposto acima, tendo AMPc como o segundo mensageiro, enfraquecendo a possibilidade do envolvimento de outras vias de sinalização.

O esquema abaixo (Figura-1) ilustra esses eventos:

Figura-1. O modelo mais aceito atualmente propõe que a formação do complexo odor-receptor olfatório (OR) promove a estimulação da proteína G α_{olf} que por sua vez estimula a adenilil ciclase tipo III, formando AMPc nessa cascata de transdução de sinal. Esse aumento de AMPc intracelular permite a ativação dos canais CNGc (*Cyclic Nucleotide Gated channel*) possibilitando a entrada de cátions nos neurônios olfatórios e a consequente geração do potencial de ação nesse sistema. Esquema adaptado de Stryer *et al.* Biochemistry. 5th edition. W.H. Freeman and Company, 2002.

Além do papel dessas proteínas na transdução de sinal ativada por odores, também outras proteínas foram identificadas como componentes importantes na regulação dessa via. Como a produção de AMPc nos neurônios olfatórios é rápida e transiente (Breer *et al.*, 1990; Boekhoff *et al.*, 1992), o mecanismo de adaptação dos neurônios olfatórios foi investigado em vários trabalhos, o que promoveu a identificação de proteínas que agem no sentido de desligar a via (*down regulation*) em vários pontos diferentes. Assim, foram descritos vários mecanismos de desligamento da via como a fosforilação do OR (Boekhoff e Breer; 1992; Peppel *et al.*, 1997), inibição da adenilil ciclase III (Wei *et al.*, 1998; Sinnarajah *et al.*, 2001), estimulação da hidrólise de AMPc via ativação de fosfodiesterases (Borisy *et al.*, 1992) e regulação do canal CNGc (Chen e Yau, 1994; Kurahashi e Menini, 1997; Zufall e Leinders-Zufall, 2000; Munger *et al.*, 2001).

Interessante notar que para todos os componentes dessa cascata de sinalização foram descritos reguladores, exceto para a proteína G α_{olf} .

(3-C) A necessidade de um sistema heterólogo para expressão de ORs

Conforme já discutido, a discriminação dos diferentes odores se deve ao fato dos mesmos ativarem uma combinação específica de ORs. Entretanto, pouco se sabe a respeito da especificidade destes ORs e mesmo quais são os seus odores ligantes. Apesar da existência de um grande repertório de ORs em camundongo, aproximados 1000 integrantes, somente 35 desses ORs tiveram alguns de seus ligantes determinados (Malnic *et al.*, 1999; Mombaerts, 2004; Saito *et al.*, 2004; Shirokova *et al.*, 2005; Abaffy *et al.*, 2006); a Tabela-1 resume todos os ORs de mamíferos que já tiveram ligantes determinados.

Tabela-1. ORs de mamíferos com ligantes determinados.

OR	Espécie	Ligantes determinados*	Referências
		*Pode haver outros ligantes, não mostrados na tabela.	
I-C6	Camundongo	Citronelal	Krautwurst <i>et al.</i> , 1998.
ID-3	Camundongo	Carvona	Krautwurst <i>et al.</i> , 1998.
I-G7	Camundongo	Limoneno	Krautwurst <i>et al.</i> , 1998.
MOR203-1	Camundongo	Ac. nonanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR-23	Camundongo	Liral	Touhara <i>et al.</i> , 1999 e Kajiya <i>et al.</i> , 2001.
MOR23-1	Camundongo	Ac. octanóico e nonanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR267-1	Camundongo	(-) citronelal	Shirokova <i>et al.</i> , 2005.
MOR31-4	Camundongo	Ac. heptanóico, octanóico e nonanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004
MOR31-6	Camundongo	Ac. isovalérico e pentanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004
MOR32-11	Camundongo	Ac. nonanóico e decanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR32-5	Camundongo	Ac. decanóico	Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR42-1	Camundongo	Ac. dicarboxílicos (10-12 carbonos)	Abaffy <i>et al.</i> , 2006.
MOR42-2	Camundongo	Ac. monocarboxílicos (7-10 carbonos)	Abaffy <i>et al.</i> , 2006.
MOR42-3	Camundongo	Ac. dicarboxílicos (8-10 carbonos) e monocarboxílicos (10-12 carbonos)	Abaffy <i>et al.</i> , 2006.
MOR-71	Camundongo	Acetofenona	Bozza <i>et al.</i> , 2002.
MOR912-93	Camundongo	2-Heptanona	Gaillard <i>et al.</i> , 2002.
MOR-EG	Camundongo	Eugenol	Kajiya <i>et al.</i> , 2001, Katada <i>et al.</i> , 2004 e Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR-EV	Camundongo	Etilvanilina	Kajiya <i>et al.</i> , 2001.
MOR-I7	Camundongo	Octanal e heptanal	Krautwurst <i>et al.</i> , 1998, Gaillard <i>et al.</i> , 2002 e Bozza <i>et al.</i> , 2002.
MOR-S1	Camundongo	Ac. heptanóico, bromo-octanóico entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S18	Camundongo	Ac. nonanóico, octanóico entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S19	Camundongo	Ac. nonanóico, nonanol entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S25	Camundongo	Hexanol e heptanol	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S3	Camundongo	Hexanol e heptanol	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S41	Camundongo	Ac. heptanóico, nonanol entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S46	Camundongo	Ac. nonanóico	Malnic <i>et al.</i> , 1999 e Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR-S50	Camundongo	Ac. nonanedióico	Malnic <i>et al.</i> , 1999 e Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR-S51	Camundongo	Ac. octanóico, nonanol entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S6	Camundongo	Ac. nonanedióico	Malnic <i>et al.</i> , 1999 e Saito <i>et al.</i> , 2004.
MOR-S79	Camundongo	Ac. heptanóico e nonanedióico	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S83	Camundongo	Ac. heptanóico, octanóico e nonanol	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S85	Camundongo	Ac. bromo-hexanóico, bromo-octanóico entre outros odores alifáticos	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
MOR-S86	Camundongo	Ac. nonanóico	Malnic <i>et al.</i> , 1999.
Olfr43	Camundongo	(-) citronelal	Shirokova <i>et al.</i> , 2005.
Olfr62	Camundongo	Coumarine e piperonal	Saito <i>et al.</i> , 2004.
OR17-4	Humano	Bourgeonal	Spehr <i>et al.</i> , 2003.
OR17-40	Humano	Helional	Wetzel <i>et al.</i> , 1999 e Levasseur <i>et al.</i> , 2003.
OR-I7	Rato	Octanal	Zhao <i>et al.</i> , 1998, Krautwurst <i>et al.</i> , 1998, Wetzel <i>et al.</i> , 1999 e Bozza <i>et al.</i> , 2002.
U131	Rato	Ácido heptanóico	Murrel <i>et al.</i> , 1999.

A razão principal para a existência de um pequeno número de ORs com ligantes conhecidos se deve ao fato de que a expressão funcional de ORs se mostrou muito difícil de ser estabelecida em sistemas heterólogos, pois os ORs não são expressos na membrana plasmática de células que não os próprios neurônios olfatórios; pois retidos em compartimentos intracelulares como o retículo endoplasmático (Lu *et al.*, 2003).

Devido a essa dificuldade, outras abordagens foram estabelecidas na tentativa de determinar os ligantes para os ORs. A primeira abordagem foi o uso de um adenovírus contendo uma construção do receptor ORI7, o que permitiu a expressão desse OR em diferentes neurônios no epitélio olfatório de rato *in vivo*. Como nessa construção proposta a expressão do OR estava coordenada com a expressão da proteína fluorescente GFP, foi possível identificar os neurônios olfatórios que expressavam o ORI7 e determinar a ativação desse OR frente a um painel de odores (Zhao *et al.*, 1998). Uma outra abordagem proposta foi a seleção de neurônios olfatórios que respondiam a um determinado odor e posterior determinação do OR que expressavam através da técnica de RT-PCR de célula única (Malnic *et al.*, 1999). Através desses experimentos foram identificados ligantes para 13 ORs diferentes, entretanto, esses métodos são extremamente trabalhosos e não podem ser utilizados para a determinação de ligantes de um grande número de ORs. Posto isso, o estabelecimento de um sistema heterólogo para a expressão funcional de ORs ainda continua sendo uma necessidade.

Alguns avanços ocorreram na tentativa de expressão funcional de ORs em sistemas heterólogos. Primeiro, foi demonstrado que a fusão da região N-terminal (20aa iniciais) da rodopsina bovina, ou do receptor de serotonina, com a região N-terminal do OR facilita a expressão de ORs na membrana (Krautwurst *et al.*, 1998; Wetzel *et al.*, 1999; Kajiya *et al.*, 2001). Os ORs contendo essa construção, ou a fusão com esse peptídeo Rho, foram co-transfectados com as subunidades G α 15 e G α 16, que por serem promíscuas acoplam-se a vários GPCRs e ativam a via da fosfolipase C. Como consequência da ativação desta via, ocorre o aumento da concentração de cálcio intracelular que é monitorada através do uso de agentes quelantes de cálcio. É importante ressaltar que recentemente foi demonstrado que

o acoplamento de ORs com proteínas G α promíscuas (como G α 15 e G α 16) pode ocasionar respostas inespecíficas dos ORs, ou seja, os ORs nessa circunstância podem responder a odores que não são seus ligantes reais (Shirokova *et al.*, 2005). Por esse motivo, o uso de proteínas da via endógena de transdução de sinal de odores, como G α olf, é necessário para a construção de um sistema heterólogo que represente de maneira mais fidedigna as respostas fisiológicas dos ORs.

Recentemente, Saito e colaboradores (Saito *et al.*, 2004) identificaram uma família de proteínas específicas de epitélio olfatório que promovem a expressão de diversos ORs na membrana de células HEK-293T, com o potencial de melhoramento da expressão funcional dos ORs em sistema heterólogo. Essas proteínas foram chamadas de RTP-1 e RTP-2 (*Receptor Transporter Proteins-1 e 2*) e REEP1 (*Receptor Expression Enhancing Protein-1*). Também foi demonstrado que a expressão do receptor β 2-adrenérgico (β 2AR) promove a expressão do receptor mOR-71 em células HEK-293 (Hague *et al.*, 2004). Tal resultado indicou que os ORs, assim como já demonstrado para vários GPCRs (conforme revisto em Prinster *et al.*, 2005), podem ser expressos como heterodímeros e dessa forma serem expressos em sistemas heterólogos. Em conjunto, esses resultados sugerem que é possível melhorar a expressão funcional de ORs através da co-expressão de proteínas acessórias que poderiam promover a expressão de ORs na membrana.

Na Figura-2 temos uma ilustração das diferentes estratégias adotadas para a expressão funcional de ORs em sistemas heterólogos.

Figura-2

Figura-2. Diferentes estratégias adotadas para a expressão funcional de ORs em sistemas heterólogos.

(a) Fusão da região N-terminal (20aa iniciais) da rodopsina bovina, peptídeo Rho, com a região N-terminal do OR, facilita a expressão de ORs em sistema heterólogo.

(b) Co-expressão do receptor β 2AR com ORs promove a expressão do mOR-71 em sistema heterólogo, indicando que, para a expressão funcional de alguns ORs, talvez seja necessário a formação de heterodímeros.

(c) Co-expressão das proteínas RTPs (*Receptor Transporter Proteins*) com ORs promove a expressão de diversos ORs em sistema heterólogo. Como as proteínas RTPs possuem um provável domínio transmembrana, essas estão representadas na membrana plasmática, apesar de tal localização ainda não ter sido determinada.

(3-D) Introdução a Ric-8

Os trabalhos pioneiros que identificaram Ric-8, publicados em conjunto no ano 2000, demonstraram o papel dessa proteína em *C. elegans* no processo de sinapse e embriogênese. Por esses dois aspectos, Ric-8 foi também designada como “Synembryn”, referindo-se diretamente a esses dois papéis: “Syn”, referindo-se à importância na sinapse (Miller *et al.*, 2000-a) e “Embryn”, referindo-se à importância de Ric-8 no processo de embriogênese (Miller *et al.*, 2000-b).

A abreviação Ric provém de “*Resistant to Inhibitors of Cholinesterase*” pois foi demonstrado que a falta de Ric-8 funcional em *C. elegans* o torna resistente a inibidores de acetilcolinesterase. No experimento proposto em Miller *et al.*, 2000-a, foi realizada uma varredura de uma biblioteca de mutantes de *C. elegans* com o objetivo de identificar genes importantes para a liberação do neurotransmissor acetilcolina. Para tal identificação, a biblioteca de mutantes foi exposta ao inibidor de acetilcolinesterase, aldicarb, sendo selecionados os mutantes resistentes ao acúmulo tóxico de acetilcolina na fenda sináptica. Esses mutantes resistentes ao aldicarb, resistência devido ao fato de que pouca acetilcolina foi liberada na fenda sináptica, foram selecionados e posteriormente foi determinada a mutação que esses continham. Dessa análise, identificou-se que mutantes resistentes ao aldicarb possuíam mutações em um gene ainda não descrito, que foi então denominado de Ric-8.

Dois trabalhos publicados em 2003, Tall *et al.*, 2003 e Klattenhoff *et al.*, 2003, utilizando a metodologia de duplo-híbrido em levedura, identificaram os correspondentes de Ric-8 em mamíferos (rato e homem, respectivamente) através da varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro utilizando como isca subunidades α da proteína G.

No trabalho de Tall *et al.*, 2003 foram utilizadas $G_{\alpha s}$ e $G_{\alpha o}$ como iscas na varredura, sendo identificadas duas formas de Ric-8 que foram denominadas Ric-8A e Ric-8B. O papel de GEF (*GTP Exchange Factor*) para Ric-8A foi demonstrado através de uma série de ensaios bioquímicos. Entretanto, o papel de GEF para Ric-8B na interação com G_{α} ainda não foi diretamente demonstrado.

Ric-8A e Ric-8B apresentam aproximadamente 40% de identidade ao longo da sequência de aminoácidos, apresentando 9 regiões bastante conservadas (regiões com 58%-90% de identidade de aminoácidos) denominadas “domínios de sinembrina” (Von Dannecker *et al.*, 2005). Dessa forma, é provável que Ric-8B também desempenhe papel de GEF.

No trabalho de Klattenhoff e colaboradores foi demonstrado, em linhagens celulares derivadas de neurônios, que Ric-8B humano é uma proteína citoplasmática que é translocada para a membrana plasmática em resposta à ação de agonistas como isoproterenol (via ativação do receptor beta-adrenérgico) e carbacol (via ativação de receptor nicotínico).

Em 2004 foram publicados três trabalhos mostrando a importância de Ric-8 no processo de embriogênese em *C. elegans*. Em resumo, estes mostram que Ric-8 é um provável GEF no sistema de *C. elegans* devido à interação preferencial de Ric-8 com $G_{\alpha o}$ no estado GDP ligado (Couwenbergs *et al.*, 2004) e pelo fato de Ric-8 estimular a formação de $G_{\alpha o}$ no estado GTP ligado (Hess *et al.*, 2004). Por fim, a determinação de Ric-8 como um GEF em sistema de *C. elegans* foi demonstrado por Afshar e colaboradores (2004).

Recentemente o trabalho de Schade e colaboradores (2005) demonstrou que o fenótipo resultante da falta de Ric-8 em *C. elegans* (paralisia) poderia ser revertido através da ativação de genes da via de transdução de sinal de $G_{\alpha s}$. Assim, os autores conseguiram demonstrar que Ric-8 pode estar atuando não apenas na via de $G_{\alpha o}$ e $G_{\alpha q}$, mas também na via de $G_{\alpha s}$.

Em 2006 foi identificado o correspondente de Ric-8 em *Drosophila* (David *et al.*, 2005; Hampoelz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Em concordância com o que havia sido estabelecido para Ric-8 em *C. elegans*, Ric-8 é importante no processo de embriogênese, sendo essencial para a correta divisão celular em *Drosophila*. Entretanto, nestes trabalhos foi demonstrado também que Ric-8 é essencial para o direcionamento da expressão de várias proteínas para a membrana plasmática de alguns tipos celulares de *Drosophila*. Dentre as proteínas investigadas foi demonstrado que a localização na membrana das proteínas $G_{\alpha i}$ e G_{β} depende da presença de Ric-8. Através dessas observações foi sugerido um novo papel de

proteína chaperona para Ric-8, importante para o arranjo correto dos componentes da proteína G heterotrimérica e consequente controle da expressão dessas proteínas na membrana (Matsuzaki, 2005).

Esses dados sobre a atividade de Ric-8 em *C. elegans* e *Drosophila* estão de acordo com nossos dados que mostram que Ric-8B melhora a expressão de G α olf na membrana de células HEK-293T e com a nossa hipótese de Ric-8B que é um provável GEF que atua na amplificação de sinal de G α olf em mamíferos.

(4) Objetivos

Conforme já apresentado, apesar da identificação do repertório de ORs de camundongo e do homem, ainda pouco se sabe quais são os ligantes desses receptores. Tal atraso se deve ao fato dos ORs não serem expressos na membrana plasmática em sistemas heterólogos, pois são retidos no retículo endoplasmático. Os poucos ligantes já determinados para ORs foram identificados através do uso de abordagens muito trabalhosas e não adequadas para a análise da especificidade de um grande número de ORs. Dessa forma, o estabelecimento de um sistema heterólogo em que seja possível expressar funcionalmente ORs continua sendo uma necessidade.

Tentativas de melhorar essa expressão, utilizando ORs em fusão com peptídeos ou mesmo co-expressando proteínas como o receptor β 2-adrenérgico ou RTPs e REEP-1, parecem ser estratégias válidas mas não suficientes para a expressão funcional de todos os integrantes da família dos ORs. Tal fato sugere que para a expressão funcional de ORs talvez seja necessária a presença de outras proteínas, específicas de epitélio olfatório, que devam complementar esta sinalização e que deverão estar representadas em um sistema heterólogo que vise a análise da especificidade de um grande número de ORs.

Posto isso, decidimos estudar esta questão através de uma abordagem inédita que se baseia na tentativa de melhora, não da expressão do receptor, mas

da função de G α olf. Alguns trabalhos já tinham demonstrado que apesar de G α olf apresentar alta identidade com G α s (88% de identidade na sequência aminoácidos), G α olf apresenta pouca atividade em sistema heterólogo se comparado com proteína G α s (Jones e Reed, 1989; Jones *et al.*, 1990). Mais recentemente, foi observado que a interação odor-OR é de duração extremamente curta e que um OR ativado possui uma baixa probabilidade de ativar uma molécula de G α olf (Bhandawat *et al.*, 2005). Em conjunto, esses trabalhos sugerem que devam existir proteínas, co-expressas com G α olf *in vivo*, que atuam em G α olf a fim de promover a melhor ativação do mesmo. Assim, se conseguirmos melhorar o acoplamento de G α olf com ORs ou melhorar a atividade G α olf em sistema heterólogo, poderíamos promover a expressão funcional de ORs. Nossa hipótese é que talvez apenas uma pequena parcela desses receptores consiga ir para a membrana plasmática, sendo possível, através da melhora do acoplamento com a proteína G α olf, ou melhora da atividade de G α olf, conseguir verificar sua ativação por odores específicos e assim determinar quais são os odores que se ligam a quais receptores.

Em nosso trabalho utilizamos o sistema de duplo-híbrido em levedura a fim de determinar potenciais novos reguladores para G α olf. Tais ligantes de G α olf poderão melhorar a função de G α olf em sistema heterólogo o que poderá ajudar na detecção da ativação de ORs e a descoberta de seus ligantes.

(5) Material & Métodos

(5-A) Sistema de duplo-híbrido em levedura

Em nosso trabalho utilizamos as cepas de levedura e os vetores contidos no sistema "DupLex-A™ - Yeast Two-Hybrid System" (OriGene). Uma descrição geral sobre esse sistema está resumida abaixo :

Figura-3. Esquema do sistema de duplo-híbrido em leveduras utilizado no projeto.

- A proteína utilizada como isca, em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), liga-se aos operadores Lex-A, mas não é capaz de ativar a transcrição do gene repórter sem o domínio de ativação (AD), que promove o recrutamento da RNA polimerase.
- Na ausência da construção da isca, o alvo, ("A") em fusão com AD, não se liga aos operadores e, portanto, não promove a transcrição do gene repórter.
- A transcrição do gene repórter é promovida somente se houver interação entre a construção da isca e a construção do alvo ("A"), pois assim os domínios DNA-BD e AD serão aproximados, possibilitando o recrutamento da RNA polimerase para o operador, com a consequente transcrição do gene repórter.

A seguir encontram-se algumas informações sobre estes materiais e sobre os controles que realizamos durante a construção do nosso sistema:

- Leveduras (linhagens):

- EGY48 - MAT α

Essa linhagem de levedura possui o gene repórter LEU2 integrado ao genoma, controlado por seis operadores Lex-A. Quando tal gene é expresso, essa levedura

é capaz de crescer em meio sem leucina. As leveduras da linhagem EGY48 são transformadas com as construções contidas no plasmídeo pJG4-5 que vão expressar proteínas em fusão com o domínio de ativação da transcrição, DNA-AD, formando assim os “alvos”.

- RFY206 – MATa

Nessa linhagem são inseridos os vetores com as construções subclonadas em vetor pGilda e o vetor contendo o gene repórter Lac-Z. As leveduras da linhagem RFY206 vão expressar proteínas em fusão com o domínio de ligação ao DNA, DNA-BD, formando assim as “iscas”.

A linhagem RFY206 (MATa) e a EGY48 (MAT α) são capazes de se acasalar e formar células diplóides. As leveduras MATa produzem o feromônio “fator a” enquanto as leveduras MAT α produzem o feromônio “fator α ”. A linhagem MATa possui receptor na membrana que reconhece “fator α ” enquanto a linhagem MAT α possui receptor para o “fator a”. Dessa forma é possível reconhecer o tipo acasalante oposto e promover o estabelecimento do ciclo celular em G1, possibilitando as mudanças necessárias que permitam a fusão celular e nuclear e a consequente formação do diplóide.

- Vetores:

- Repórter

pSH18-34 - URA3, 2um, 8ops.-lac-Z (expressa o gene repórter Lac-Z)

Esse plasmídeo contém oito pontos de ligação para Lex-A na região promotora. Esse possui a sequência “2um ori” para a existência de grande número de cópias do plasmídeo na levedura e o gene URA3 para seleção de levedura que o contenha.

- Para a construção das iscas

pGilda - HIS3, CEN

Esse plasmídeo possui o promotor GAL1 que permite a expressão da proteína de fusão Lex-A-isca apenas quando a única fonte de carbono for galactose. A

sequência CEN (centrômero) mantém o plasmídeo em uma única cópia por célula. A sequência do Lex-A é seguida pelo sítio múltiplo de clonagem que permite a inserção do fragmento de DNA de interesse para a produção da isca. O gene HIS3 é utilizado para seleção de levedura que o contenha.

- Para construção dos alvos

pJG4-5 - TRP1, 2 μ m

Esse plasmídeo expressa o domínio de ativação B42, seguido do epítipo HA e antecedido por um sinal de localização nuclear (na seguinte sequência, sinal de localização nuclear-B42-HA) em fusão com a proteína em estudo. Essa expressão está sob a regulação do promotor GAL1, indutível por galactose. Esse possui a sequência “2 μ m ori” para a existência de grande número de cópias do plasmídeo na levedura e o gene TRP para seleção de levedura que o contenha.

- Plasmídeos controle

pBait : expressa a proteína de fusão “Lex-A-bait” constitutivamente.

pTarget : expressa a proteína “B42-target” indutível por galactose. As proteínas “bait” e “target” interagem entre si, sendo um controle positivo de interação em ensaios de duplo-híbrido.

- *Construção das iscas e dos alvos*

A transformação dos plasmídeos descritos acima, nas diferentes linhagens de levedura, foi realizada através do método de acetato de lítio, como descrito em Burke *et al.*, 2000. Na transformação de levedura pelo método de acetato de lítio, uma colônia de levedura é transferida para um tubo *eppendorf* estéril contendo 100ng de plasmídeo (construção a ser transformada) e 10 μ L de DNA carregador (10 μ g/ μ L, Clontech). Adiciona-se então 0.5mL da solução 0.1M acetato de lítio/10mM Tris-HCl/1mM EDTA contendo 40% de polietilenoglicol de peso molecular 3350 (Sigma). Tal preparação é incubada durante dois dias a temperatura ambiente, para então ser realizado o choque térmico a 42°C por 15 minutos. A preparação é imediatamente centrifugada por 10 segundos para a

retirada da solução de acetato de lítio, sendo o precipitado ressuspensionado em 200µL de água estéril para plaqueamento em meio seletivo apropriado para a seleção dos clones que contêm a construção.

A linhagem EGY48 foi transformada com as construções clonadas no vetor pJG4-5 para formação dos alvos enquanto a linhagem RFY206, previamente transformada com pSH18-34 (o repórter Lac-Z), foi transformada com as construções clonadas no vetor pGilda para formação das iscas.

- *Caracterização das iscas*

A fim de melhor caracterizar as iscas construídas para esse projeto sempre realizamos o ensaio de auto-ativação e o ensaio de expressão, descritos a seguir. Para a caracterização dos alvos realizamos somente a análise da expressão das proteínas de fusão.

- *Ensaio de auto-ativação*

Verificamos através desse ensaio se as iscas propostas promovem ativação do gene repórter Lac-Z sem a existência de interação com o alvo. Para tal, as leveduras RFY206, contendo o plasmídeo repórter Lac-Z e o plasmídeo pGilda (contendo as diferentes construções propostas no projeto), foram plaqueadas em meio seletivo (-Ura -His); contendo galactose como fonte de açúcar e o composto X-gal. Em meio de galactose a isca será expressa, via promotor GAL-1, e o potencial de auto-ativação da construção poderá ser verificado através da coloração azul das colônias (devido à transformação de X-gal pelo produto do gene lac-Z, a proteína β -galactosidase) após 3-4 dias à 30°C. A inexistência de coloração azul das colônias após a incubação descrita significa que a construção da isca proposta não possui atividade de auto-ativação e que a mesma pode ser utilizada para ensaios de duplo-híbrido.

- *Ensaio de expressão*

Os extratos de levedura para análise da expressão das proteínas do duplo-híbrido (iscas e alvos) foram preparados da seguinte maneira: colônias isoladas

transformadas com as construções das iscas e dos alvos foram crescidas na temperatura de 30°C por 16 horas, em meio seletivo adequado de glicose. Após esse período, as culturas saturadas foram diluídas para uma D.O.₆₀₀=1,0 e lavadas com meio seletivo contendo galactose (para retirada de glicose) e crescidas nesse meio por 16 horas na temperatura de 30°C (meio para a indução da expressão das proteínas de duplo-híbrido). Essas células foram, então, centrifugadas por 3 minutos a 13.000Xg e ressuspensas em 2X tampão de amostra Laemmli (62mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 40% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e 200 mM de 2-mercaptoetanol). As amostras foram submetidas ao tratamento a 100°C por 7 minutos antes de serem aplicadas no gel de poliacrilamida 10%. O gel foi realizado segundo Laemmli e colaboradores (1970) e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando a técnica de *Western-blot*. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas, foi então “bloqueada” com leite Molico 5% durante 2 horas, tratada com anticorpo primário [anticorpo anti-Lex-A (Clontech) para análise das iscas e anti-HA (Clontech) para análise dos alvos] em solução de leite Molico 5% durante duas horas. Após essa incubação, a membrana foi lavada 3X com PBS e tratada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (em solução de leite Molico 5%) do sistema *ECL Western blotting analysis system* (GE Health Care) durante 1 hora, para então ser novamente lavada 3X com PBS e revelada com a solução reveladora contendo luminol do mesmo sistema. Após esse processo, as membranas foram expostas a um filme radiográfico sensível.

(5-B) Varredura da biblioteca de epitélio olfatório com a isca Gαolf*

*(baseada em Golemis *et al.*, 1999)

Para a realização do ensaio de varredura, a biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo foi transformada na linhagem de levedura que contém o repórter LEU2 (EGY-48). Esse gene repórter, quando expresso, permite o crescimento das células em meio com ausência de leucina. Esta biblioteca, construída e caracterizada pela Prof^a. Dra. Adriana Mercadante (atualmente na Universidade Federal do Paraná, Curitiba) é uma biblioteca construída a partir de

RNA poli A⁺, purificado a partir de 1g de tecido olfatório de camundongo, utilizando-se oligodT. Alguns controles foram realizados a fim de determinar a qualidade da biblioteca :

(a) Preparações de plasmídeo em pequena escala (de algumas colônias de leveduras transformadas) e digestão com enzimas de restrição para verificar tamanho dos insertos e porcentagem de plasmídeos pJG4-5 vazios;

(b) Sequenciamento de alguns insertos para checar a existência de redundância nas mensagens clonadas;

(c) PCR para amplificar mensagens de baixa abundância nas preparações de cDNAs de epitélio olfatório sintetizados e, assim, verificar a representatividade da biblioteca para mensagens pouco representadas.

A isca G α olf foi expressa em uma outra linhagem, a RFY206 que contém o plasmídeo repórter Lac-Z (pSH18-34). A isca G α olf foi inicialmente plaqueada em meio seletivo (-His-Ura) contendo glicose, sendo uma colônia coletada, após quatro dias de crescimento à 30°C, para realização do inóculo dessas colônias em 20mL de meio líquido de glicose -His-Ura. As leveduras foram então crescidas sob agitação à 30°C durante o período de 24 horas. Essa cultura saturada de levedura foi então diluída para a D.O.₆₀₀ de 0,2 em 30mL de meio líquido Glicose/-His-Ura. O crescimento dessa cultura foi monitorado até a determinação da D.O.₆₀₀ igual a 1,0. A cultura foi então centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos/1500Xg e ressuspendida de maneira suave para o volume final de 1mL de água deionizada estéril.

Como a biblioteca utilizada no projeto possui o tamanho aproximado de 2×10^6 (número de clones independentes de levedura), teríamos que utilizar ao menos 2×10^6 clones da isca G α olf para termos a varredura total da biblioteca. Entretanto, é sabido que apenas 10% das leveduras irão efetivamente realizar o acasalamento para a formação de diplóides. Para contornar tal limitação, coloca-se dez vezes mais leveduras da isca e da biblioteca a fim de obter a varredura completa. No nosso ensaio, resolvemos varrer a biblioteca cinco vezes e por isso utilizamos cinquenta vezes mais da isca G α olf (10^8 clones da isca) para a varredura de 10^8 clones da biblioteca.

A mistura da isca com a biblioteca foi realizada delicadamente em tubos do tipo *ependorf* sendo essas células submetidas à centrifugação à temperatura ambiente (5 minutos/1500Xg) e posterior ressuspensão em 100µL de meio líquido completo YPD (Extrato de levedura/peptona/dextrose). Esse material ressuspenso foi então plaqueado em meio sólido de YPD e incubado na estufa durante 14 horas à 30°C. Como controle, realizamos em paralelo o acasalamento da isca G α olf com uma biblioteca vazia, ou seja, leveduras EGY48 que continham o plasmídeo pJG4-5 sem nenhum inserto.

Após essa etapa, a massa de leveduras que cresceu na placa YPD foi cuidadosamente raspada, sendo essas células transferidas para 100mL de meio líquido indutor seletivo -His-Ura-Trp contendo galactose. Essas células foram então incubadas com agitação a 30°C pelo período de 6 horas para a expressão das proteínas de fusão.

As células foram então centrifugadas à temperatura ambiente durante 5 minutos/1500g e ressuspendidas em 30mL de água deionizada estéril. O processo de centrifugação foi novamente realizado e as células foram então finalmente ressuspendidas para volume final de 5mL de água deionizada estéril. A D.O.₆₀₀ foi determinada e as suspensões de leveduras, referentes ao resultado de acasalamento de G α olf com a biblioteca e de acasalamento de G α olf com a biblioteca vazia (controle), foram diluídas para 10⁸ células/mL. Utilizando essa diluição, plaqueamos o resultado do acasalamento de G α olf com a biblioteca em 20 placas seletivas -His-Ura-Trp-Leu contendo galactose. Outras 20 placas seletivas dessas foram utilizadas para o plaqueamento de uma suspensão diluída 10X do resultado do acasalamento de G α olf com a biblioteca.

Como controle, uma placa seletiva -His-Ura-Trp-Leu, contendo galactose, foi utilizada para plaquear o acasalamento de G α olf com a biblioteca vazia. A atividade do gene repórter LEU2 foi determinada através do monitoramento do crescimento das leveduras nesse meio seletivo durante o período de 7 dias.

(5-C) Análise das colônias Leu+ obtidas na varredura

- *Verificação da atividade do repórter Lac-Z e dependência de galactose*

Todas as colônias (diplóides) que cresceram em meio seletivo indutor (Galactose/ -Ura- His -Trp -Leu) eram possíveis candidatas a apresentar alguma proteína da biblioteca que poderia estar interagindo com G α olf, e por isso foram repassadas para placas contendo o meio seletivo para diplóides (sem indução) SD-Glicose/-Ura-His-Trp com o objetivo de “desligar” o gene repórter LEU2 para, então, verificar novamente essa atividade, bem como a atividade do gene repórter Lac-Z. Para tal, após 40 horas de crescimento dessas leveduras no meio sem indução descrito acima, as mesmas foram replicadas para as seguintes placas seletivas:

- (a) Glicose/ -Ura -His -Trp -Leu
- (b) Galactose/ -Ura -His -Trp -Leu
- (c) Glicose/ -Ura -His -Trp + X-gal
- (d) Galactose/ -Ura -His -Trp + X-gal

Após 1-4 dias a 30°C, o crescimento dessas colônias nas placas (a) e (b), atividade do gene repórter LEU-2, e o desenvolvimento da cor azul nas placas (c) e (d), atividade do gene repórter Lac-Z, foram monitorados. As colônias que apresentaram coloração azul apenas na placa (d) e crescimento somente na placa (b) foram selecionadas para as análises posteriores.

- *PCR das colônias de levedura selecionadas e digestão com Hae III e Hinf I*

Após o ensaio acima descrito, as colônias que cresceram nas placas (b) e não (a), e tornaram-se azuis nas placas (d) e não (c) foram selecionadas para a análise da mensagem de epitélio olfatório que possuíam. Cada uma dessas colônias foi colocada em 50 μ L de água formando suspensões que foram posteriormente incubadas a 95°C por 15 minutos a fim de promover a lise das leveduras. A lise permite a liberação dos plasmídeos (incluindo o pJG4-5, detentor da mensagem de epitélio olfatório da biblioteca, que possui a sequência da proteína que interage com G α olf) que serão utilizados como “molde” na reação de

PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) utilizando *primers* específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5. Para a reação de PCR de volume total de 50 μ L, utilizou-se o volume de 5 μ L da suspensão de leveduras, tendo a reação as seguintes condições de ciclagem:

Os produtos de PCR foram então digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III e *Hinf* I e os padrões de digestão foram analisados em gel de agarose 2,5% para descartar as leveduras que possuíam insertos com o mesmo padrão de restrição.

- *Isolamento do plasmídeo pJG4-5 contendo o inserto da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo (possível ligante de G α olf)*

A purificação de plasmídeos das leveduras diplóides contendo os insertos correspondentes aos possíveis ligantes de G α olf foi realizada utilizando-se o sistema “*Yeastmaker Yeast Plasmid Isolation Kit*” (Clontech). As preparações de plasmídeos purificadas foram transformadas em bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Através de reação de PCR, utilizando suspensão de colônias de bactérias como molde (*colony* PCR) e *primers* específicos para o vetor pJG4-5, foi possível selecionar as colônias de bactéria que possuíam esses insertos. A purificação desse vetor, presente nessas colônias de bactéria, foi então realizada utilizando o sistema “*PerfectPrep plasmid purification kit*” (Eppendorf). Os plasmídeos purificados foram então utilizados para o sequenciamento dos insertos contidos no mesmo, candidatos a serem ligantes de G α olf .

- *Sequenciamento dos insertos e análise das sequências*

A reação de sequenciamento dos possíveis ligantes de G α olf foram realizadas com o Sistema *BigDye Terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação foi realizada com 2 μ L do plasmídeo purificado e um *primer* que anela na região 5' do sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5. A reação de PCR foi feita segundo um programa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto, polimerização a 72°C por 2 minutos e finalizado por incubação a 72°C por 10 minutos. Após a reação de PCR, os produtos obtidos foram purificados mediante precipitação com etanol. Para isso, a cada uma das reações, contidas em placas de 96 poços (Fisher Scientific International Inc.), foram adicionados 25 μ L de etanol absoluto, 1 μ g de glicogênio e 1 μ L de acetato de sódio (3M, pH 5,2). A reação foi incubada em gelo por 15 minutos, seguindo-se de centrifugação a 25°C, 4.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, para retirada do sobrenadante, foram realizados dois pulsos com a placa de 96 poços invertida e, então, adicionados 50 μ L de etanol absoluto a cada uma das reações; seguido de centrifugação a 4.000 rpm (25°C, 30 minutos). Dois pulsos com a placa de 96 poços invertida foram novamente realizados, para retirada do sobrenadante, e a placa contendo os produtos de PCR purificados foi deixada aberta, por aproximadamente uma hora, para permitir a evaporação do etanol residual. As reações de sequenciamento purificadas e secas foram, então, enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA no IQUSP (SSDNA), que utiliza o equipamento ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Posteriormente, a identidade dessas sequências foi obtida com o uso da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

(5-D) Ensaio de interação cruzada*

*(baseado em Finley e Brent, 1994)

Colônias EGY48, obtidas da transformação com acetato de lítio (Burke *et al.*, 2000), com o vetor pJG4-5 contendo a região codificadora completa de Ric-8B ou Ric-8BΔ9 (“Alvos”) foram estricadas em meio seletivo de glicose formando linhas na vertical (ver Figura-4). O mesmo procedimento descrito acima foi realizado com a linhagem RFY206 para a transformação das diferentes “Isclas” (sequência codificadora completa de Gαolf e de mutantes de Gαolf em vetor pGilda), sendo os clones obtidos dessas transformações plaqueados em seus meios seletivos adequados de glicose. Entretanto, as linhas aqui foram estricadas na horizontal. Após 48 horas de crescimento a 30°C, obtivemos uma massa considerável de células, suficiente para realização da transferência. Cada uma das duas placas foi, então, pressionada sobre um mesmo veludo (próprio para réplicas) de forma que as linhas das diferentes placas fiquem perpendiculares entre si. Replicaram-se então as leveduras do veludo para uma placa com meio rico e completo (YPD) para crescimento dos diplóides formados no cruzamento das duas linhas. A fim de selecionar os diplóides, após crescimento por 24 horas a 30°C em meio YPD, foram feitas réplicas da placa YPD para as seguintes quatro placas: (1) Galactose –His-Ura-Trp +X-gal, (2) Glicose –His-Ura-Trp +X-gal, (3) Galactose –His-Ura-Trp-Leu e (4) Glicose –His-Ura-Trp-Leu.

Após 2-3 dias a 30°C, o crescimento e o desenvolvimento da cor azul dos diplóides (cruzamento entre as linhas de “Alvos”x”Isclas”) foram monitorados. Havendo interação entre isclas e alvos haverá aparecimento de colônias azuladas na placa (1) mas não em (2), e crescimento de colônias na placa (3) mas não em (4). A Figura-4 esquematiza o ensaio descrito, identificando a presença de uma interação através de um círculo vermelho.

Figura-4

Figura-4. Esquema ilustrativo do ensaio de interação cruzada. A presença de uma interação entre isca e alvo está indicada através de um círculo vermelho.

(5-E) Northern blot

RNA total de vários tecidos de camundongo (C57BL/6J) foram extraídos utilizando TRIzol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (10µg) foram fracionadas em gel de paraformaldeído e transferidas para membrana de nylon Hybond N+ (GE Health Care) segundo descrito em Maniatis *et al.*, 1989.

- *Reação para síntese de sonda radioativa*

Para a síntese das sondas radioativas, utilizamos o sistema “*Random Primers DNA Labeling System*” (Life Technologies). Os moldes para confecção das sondas de Ric-8B e GAPDH foram obtidos a partir de reação de PCR utilizando *primers* específicos para amplificação da região codificadora de cada uma das sequências. Com o objetivo de se obter uma única banda de PCR, os produtos de PCR foram purificados a partir de gel de agarose (1%) utilizando o sistema “*Perfectprep Gel Cleanup Kit*” (Eppendorf). Para a reação da sonda foram utilizados 100ng do molde em uma reação contendo *primers* randômicos (hexâmeros), o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I e os 4 nucleotídeos (sendo dCTP marcado radioativamente com fósforo 32) em volume final de reação de 50µL; conforme recomendação do fabricante. As sondas foram purificadas através de processo de precipitação utilizando 3µL de NaCl (5N), 1µL de tRNA de levedura (10µg/µL) e 120µL de etanol absoluto. As sondas foram centrifugadas por 6 minutos, o sobrenadante retirado, e o precipitado ressuspendido em 50µL de tampão TE. A contagem radioativa foi determinada, para cada uma das sondas, para verificar a eficiência de incorporação do nucleotídeo radioativo nos fragmentos de DNA sintetizados.

- *Hibridização da membrana*

A membrana contendo os RNAs totais foi pré-hibridizada a 37°C durante o período da noite com solução de hibridização (6XSSPE, 5X solução de Denhardt,

0.1mg/mL de DNA fragmentado de esperma de salmão, 0.5% SDS e 50% formamida). Após esse período, a solução de hibridização foi trocada por nova sendo, então, adicionada a sonda radioativa (previamente desnaturada por aquecimento a 100°C durante 5 minutos). A hibridização foi realizada a 37°C durante a noite. No outro dia, a membrana foi lavada duas vezes a 65°C por 40 minutos com solução de lavagem (0.1% SDS, 0,5XSSPE). Após lavagem, a membrana foi analisada utilizando o equipamento *Storm 840 Phosphorimager* (GE Heath Care).

(5-F) RT-PCR

RNA total de diferentes tecidos de camundongo da linhagem C57BL/6J foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Para a síntese de cDNA foram utilizados 1µg de RNA total de cada tecido e 100ng de *primer* oligo(dT) em 13,5µL de água tratada com DEPC. Essa solução foi incubada por 2 minutos a 70°C e rapidamente resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4µL de 5X tampão da enzima *Superscript II* (Invitrogen), 1µL de mistura de dNTPs (10mM cada), 20U de inibidor de RNase (*RNaseOUT*, Invitrogen) e 200U da enzima transcriptase reversa *Superscript II* (Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 60 minutos sendo, logo em seguida, incubada por 5 minutos a 95°C. O produto da reação foi então diluído para o volume final de 100µL com água tratada com DEPC resfriada em gelo. As reações de RT-PCR foram realizadas em volume final de 25µL utilizando para cada reação 5µL de cDNA, 0.2mM dNTP, 1.5mM de MgCl₂, 0.5µM de cada *primer* ("forward" e reverso) e 1.25U de taq polimerase "*Platinum Taq DNA polymerase*" (Invitrogen). As reações foram aquecidas por 2 minutos a 95°C, seguindo as seguintes ciclagens: 25 ciclagens (Ric-8B) ou 30 ciclagens (Gαolf e GAPDH); fase de desnaturação (95°C por 45 segundos); fase de anelamento dos *primers* no molde, 58°C para Ric-8B, 57°C para Gαolf ou 55°C para GAPDH por 45 segundos; e fase de extensão a 72°C por 1 minuto. A fase de extensão final foi realizada para todas as reações a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel

de agarose (1.5%) corado com brometo de etídeo. Os *primers* utilizados no ensaio estão mostrados abaixo:

primer Ric-8B (amplificação da região carboxi-terminal)

Fow: AAGCTGGTTCGTCTCATGAC

Rev: GTCTGTGTCCGAGCTGGTC

primer G α olf (amplificação da região codificadora)

Fow: ATGGGGTGTGGGCAACAG

Rev: TCACAAGAGTTCGTACTGCTTG

primer GAPDH (amplificação da região codificadora)

Fow: GGCACAGTCAAGGCCGAG

Rev: GGGAGATGCTCAGTGTGG

(5-G) Hibridização *in situ*

- *Preparo de sondas sense e antisense de RNA*

As sequências codificadoras de G α olf, G α s e de Ric-8B foram clonadas em plasmídeo PCR II (Invitrogen), sendo esses linearizados com uso de enzimas de restrição adequadas. A purificação das digestões foi realizada com o kit “*Rapid PCR purification System*” (GIBCO-Life Technologies), conforme instruções do fabricante, utilizando água livre de RNase.

As sondas de RNA marcadas com digoxigenina foram feitas utilizando reagentes de Roche Diagnostics nas seguintes condições livre de RNase :

13 μ L de DNA molde ou volume suficiente para 1 μ g de plasmídeo linearizado

2 μ L de 10X tampão de transcrição*

*(0.4M Tris-HCl (pH=8.0), 60mM MgCl₂, 100mM ditiotreitol e 20mM de espermidina)

2 μ L de mistura 10X concentrada de DIG-mix

(10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6,5 mM UTP e 3,5 mM DIG-11-UTP)

2 μ L de SP6 ou T7 RNA polimerase (20 U/ μ L)

1 μ L de inibidor de RNase

Incubação a 37°C por 2 horas

A seguir, as sondas foram purificadas usando colunas “*Quick spin G-50*” (Roche Diagnostics) conforme instruções do fabricante. Para a quantificação das sondas, 2µl das sondas foram aplicados em gel de agarose 1,5%. Ao RNA eluído, acrescentamos 20µl de formamida, sendo as sondas estocadas a –80°C.

- *Preparação das lâminas de epitélio olfatório e de cérebro de camundongo*

Os narizes de camundongo da linhagem C57BL/6J de 3 semanas de idade e cérebros de animais de mais de 3 semanas de idade foram dissecados, embebidos em “*OCT compound Tissue-Tek*” (Sakura) e congelados à –80°C.

Os cortes com espessura média de 16µm de narizes e cérebros foram realizados em criostato (MICRON) a –20°C e coletados em lâminas de vidro “*SectionLock Slides*” (Polyscience) que foram estocadas a –80°C.

- *Ensaio de Hibridização in situ**

* adaptado de Schaeren-Wiemers, 1993.

Em condição livre de RNase, as lâminas foram secas e fixadas por 10 minutos em solução recém preparada de paraformaldeído 4% em 1XPBS. As lâminas foram lavadas 3 vezes, por um período de 5 minutos, em 1XPBS. Essas, então, foram imersas em solução contendo 7mL de trietanolamina em 600mL de água estéril, mantendo-se agitação leve. Em seguida, 1,5mL de anidrido acético foi acrescentado na solução onde as lâminas estavam imersas, incubando por 10 minutos, para acetilação dos tecido. As lâminas foram novamente lavadas (3 vezes) com 1XPBS por 5 minutos cada. O volume de 500µL de solução de hibridização; previamente preparada com 50% de formamida, 5XSSC, 5X solução de Denhardt e 250µg/mL de “*bakers yeast RNA*”; foi então adicionada às lâminas. Essas foram incubadas em placas de Petri umidificadas com 5XSSC por 2 horas a 72°C. As sondas foram aquecidas por 5 minutos a 85°C e adicionadas às lâminas, incubando-as nas placas de Petri a 72°C durante aproximadas 16 horas. Após a hibridização das sondas com o RNA do tecido, as lâminas foram lavadas em

5XSSC a 72°C por 10 minutos. A seguir, essas foram lavadas em 0,2XSSC a 72°C por 30 minutos (2 vezes) e uma vez em 0,2XSSC, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Por fim, as lâminas foram incubadas a 37°C em solução de 20µg/mL de RNase, contendo 10mM de Tris e 400mM de NaCl por 30 minutos.

A detecção imunológica foi realizada com o kit “*DIG Wash and Block Buffer Set*” (Roche Diagnostics). As lâminas foram incubadas em 1X tampão de lavagem (10X ácido maléico com 3% Tween) por 5 minutos e em 1X reagente bloqueador (10% reagente bloqueador em tampão de ácido maleico) em tampão 1X ácido maleico, por 1 hora à temperatura ambiente; em 1X reagente bloqueador em tampão 1X ácido maleico contendo anticorpo anti-digoxigenina (Roche Diagnostics) na diluição de 1:5000 por 1 hora. As lâminas foram lavadas 3 vezes por 20 minutos com 1X tampão de lavagem. Após essa etapa, as lâminas foram incubadas por 5 minutos em tampão de detecção (100mM Tris pH 9,5 + 100mM NaCl). Por fim, as lâminas foram incubadas em solução de detecção preparada com 10mL de 1X reagente bloqueador + 2,4mg de levamisol + 200µL do substrato NBT/BCIP (Roche Diagnostics).

O desenvolvimento de coloração púrpura nos tecidos foi monitorada durante o período de 1,5 hora para os ensaios realizados no epitélio olfatório e aproximadas 12 horas para os ensaios utilizando cérebro de camundongo.

A reação foi interrompida com solução 10mM Tris pH=8,0 + 1mM EDTA, duas vezes por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e coradas com Hoechst (10µg/mL em PBS) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, sendo os slides montados com o uso de Gelvatol (álcool polivinílico e glicerol em solução 0,14M NaCl, 0,01M KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH=7,2).

(5-H) Construção dos vetores para expressão em células de mamífero

Foram sintetizados *primers* específicos para a amplificação por PCR, a partir de cDNA de epitélio olfatório ou de cérebro de camundongo, das sequências correspondentes à fase aberta de leitura de Ric-8B, Ric-8BΔ9, Gαolf, D1R e RTP-

1. Os fragmentos de DNA amplificados foram subclonados no vetor de expressão pCDNA 3.1 (Invitrogen). Para a clonagem de Ric-8B e Ric-8B Δ 9 foi utilizado um pCDNA3.1 modificado, sendo adicionado nesse vetor uma sequência do epítipo FLAG (pCDNA3/5'; Xu *et al.*, 1998) que será expresso no N-terminal da proteína de interesse.

Para a clonagem dos ORs foram sintetizados *primers* específicos para a amplificação por PCR, a partir de DNA genômico de camundongo, das sequências correspondentes à fase aberta de leitura dos receptores olfatórios mOR-EG, mOR-17 e mOR-S6. Os fragmentos de DNA amplificados foram subclonados no vetor de expressão pCDNA 3.1 (Invitrogen).

Os plasmídeos foram então amplificados em *E.coli* DH5 α e isolados. A manutenção da fase aberta de leitura e a sequência dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento automático. O vetor de expressão contendo o inserto correspondente ao receptor β_2 AR foi gentilmente cedido pelo Dr. Steve Liberles e pela Dra. Linda Buck (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA). O vetor de expressão contendo o receptor Rho-OREG foi gentilmente cedido pelo Dr. Kazushige Touhara (The University of Tokyo, Chiba, Japan) e a construção contendo RhoS6 foi gentilmente cedida pelo Dr. Hiroaki Matsunami (Duke University Medical Center, Research Drive, Durham, USA).

(5-I) Ensaio para detecção de AMPc em células HEK-293 ou HEK-293T

Células HEK-293 ou HEK-293T foram mantidas em meio DMEM (*"Dulbecco's modified Eagle's medium"*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 μ g/mL penicilina/estreptomicina em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células (0,5 X 10⁵) foram então plaqueadas em poços, de uma placa de 96 poços, por 16-20 horas e transfectadas com 100ng de cada um dos plasmídeos indicados nas figuras de maneira transiente com Lipofectamina (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Nos ensaios utilizando o receptor β_2 AR e D1R, após 3 horas da transfecção, adicionou-se ao meio os agonistas, isoproterenol (10 μ M) ou

dopamina (10 μ M) e, após 40 horas, procedeu-se o ensaio para a quantificação de AMPc. Experimentos com menores tempos de estimulação (10, 30 e 120 minutos) produziram resultados semelhantes. Nos ensaios para estimulação dos ORs, após aproximadas 40 horas da transfecção, adicionou-se ao meio o odor correspondente (300 μ M, ou menores concentrações, conforme indicado nas figuras) por 10 minutos. A determinação de AMPc intracelular foi realizada com a utilização do sistema “cAMP Direct Biotrak™ EIA” (GE Health Care), de acordo com as instruções do fabricante. Após a realização do estímulo, as células foram imediatamente lisadas com 200 μ L de tampão de lise [0.05M de tampão acetato (pH=5.8) contendo 0.25% de brometo de dodeciltrimetilamônio e 0.02% de albumina bovina] e incubadas por 10 minutos a 37°C; 100 μ L desse lisado foram transferidos para os poços do kit. Foram adicionados, então, 100 μ L do anticorpo anti-AMPc produzido em coelho, sendo os poços incubados durante 2 horas à temperatura de 4°C. Após essa etapa, foi adicionado 50 μ L de AMPc conjugado com peroxidase, sendo os poços incubados durante 1 hora à temperatura de 4°C. Após esse período, os poços foram lavados 4X com tampão de lavagem (0.01M tampão fosfato, pH=7.5; contendo 0.05% de Tween 20) e imediatamente foi adicionado 150 μ L de (Tetrametilbenzidina, TMB), substrato da peroxidase. A coloração azul produzida pela quebra do substrato foi monitorada durante 45 minutos e a reação foi interrompida com 100 μ L de ácido sulfúrico (1M). A leitura da absorbância foi realizada em até 20 minutos da adição de ácido sulfúrico, no leitor de placa Synergy HT (BioTek), no comprimento de onda de 450nm. Em paralelo a esse ensaio, foi sempre realizada uma curva padrão de AMPc a fim de correlacionar os valores de absorbância medidos com quantidades de AMPc. Um esquema ilustrativo da estratégia utilizada pelo sistema “cAMP Direct Biotrak™ EIA” (GE Health Care) para a determinação de AMPc está mostrado na Figura-5.

Figura-5

Figura-5. Funcionamento do sistema “cAMP Direct Biotrak™ EIA” (GE Health Care). Esse sistema de detecção de AMPc é baseado na competição entre o AMPc intracelular produzido pelas células no experimento, devido ao estímulo de receptores, por exemplo, e moléculas de AMPc conjugadas com peroxidase, que são adicionadas durante o ensaio. Quanto mais AMPc é produzido pelas células no experimento, menos AMPc conjugado com peroxidase irá se ligar nos poços (ligação no anticorpo anti-AMPc de coelho que, por sua vez, está ligado ao poço via ligação ao anticorpo anti-IgG de coelho; previamente ligado nos poços). Com menor AMPc conjugado com peroxidase ligado, teremos uma menor quebra do substrato TMB (Tetrametilbenzidina) e consequente menor coloração produzida.

(5-J) Ensaio de imunofluorescência

Células HEK-293T foram plaqueadas em lâminas do tipo *Lab-Tek*, conforme descrito no protocolo da transfecção realizada nos ensaios de AMPc, transfectadas com Lipofectamina; e fixadas com 3,7% de paraformaldeído em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. As células fixadas foram permeabilizadas com 0,01% de Triton X-100 e tampão de bloqueio (5% de soro de cavalo, 2% BSA em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram, então, incubadas com uma diluição de 2X do tampão de bloqueio contendo os anticorpos anti-FLAG (Sigma, para a marcação de Ric-8B e Ric-8BΔ9) na diluição

de 1:500 ou o anticorpo anti-G α olf (K-19, sc-385, Santa Cruz, para a marcação de G α olf) na diluição de 1:80 por 2 horas. Como anticorpos secundários, utilizamos os anticorpos Alexa-fluor 568 (anti-camundongo) ou Alexa-fluor 488 (anti-coelho), ambos da Molecular Probes (Invitrogen) para a visualização de anti-FLAG e anti-G α olf, respectivamente. A incubação dos anticorpos secundários foi realizada durante 1 hora à temperatura ambiente. As células foram coradas com 0,1mg/mL de Hoechst para a visualização do núcleo. As imagens das células fluorescentes foram obtidas no microscópio de fluorescência Nikon TE300.

(5-L) Análise estatística

A análise estatística utilizada nesse trabalho foi realizada com o auxílio do programa GRAPHPAD PRISM versão 4.0 (GraphPad). Os dados foram analisados utilizando o teste *t* de Student, bimodal e não pareado. As diferenças com significância estatística foram estabelecidas tendo $P < 0.05$. O valor *P* para as diferentes comparações estão indicados com asteriscos nas figuras em que esse teste foi aplicado.

(6) Resultados:

Identificação de um provável GEF para a via de transdução de odores.

(6-A) Resultado da varredura da biblioteca de epitélio olfatório utilizando G α olf como isca.

Com o objetivo de identificar potenciais novos reguladores para G α olf, construímos a isca G α olf para a varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo. Basicamente, este ensaio consiste no acasalamento da linhagem de levedura RFY206, que expressa a isca G α olf, com as leveduras da linhagem EGY48 que expressam diferentes mensagens da biblioteca. Após a realização do acasalamento, esses diplóides foram plaqueados em meio seletivo, para a indução das proteínas do duplo-híbrido, e a atividade do gene repórter LEU2 foi monitorada através do crescimento dos diplóides nesse meio durante o período de 7 dias (ver detalhes em “Material & Métodos”).

Dessa análise, foram selecionadas 170 colônias candidatas a conterem ligantes de G α olf. A maior parte dessa população de colônias teve crescimento rápido, formando colônias por volta do terceiro dia, enquanto outra parte da população selecionada teve seu crescimento identificado somente após o quinto dia. Isso poderia estar refletindo a presença de interações fracas e fortes com a isca G α olf.

O primeiro passo para analisar esses diplóides foi confirmar a atividade do gene repórter LEU2 e a atividade do outro gene repórter, o repórter Lac-Z. O primeiro critério que utilizamos para o descarte de falsos positivos foi o de selecionar somente os clones que tivessem atividade para os dois genes repórteres testados. Após esse controle, selecionamos 82 colônias que apresentavam a atividade esperada para os dois genes repórteres.

Em seguida, realizamos a reação de PCR a partir das 82 colônias selecionadas para analisar as mensagens contidas no vetor da biblioteca, utilizando *primers* específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem desse vetor. Os produtos de PCR obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição

Hae III e *Hinf* I para análise do perfil de digestão desses produtos em gel de agarose. Das 82 colônias de levedura testadas, tivemos 6 distintos perfis de digestão. Colônias de levedura correspondentes a cada um desses perfis foram, então, selecionadas para a realização da extração, purificação e sequenciamento de seus plasmídeos para, assim, realizar a determinação dos possíveis ligantes de G α olf. A ferramenta “BLAST” (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) nos permitiu identificar estas sequências, potenciais ligantes de G α olf, que foram: Ric-8B (64 clones), uma variante de Ric-8B que não apresentava o éxon 9, Ric-8B Δ 9 (10 clones); e prováveis falsos positivos: fragmentos da proteína de choque térmico Hsp40 (3 clones) e fragmentos diferentes de proteínas dedos de zinco (5 clones). Uma observação importante nessa etapa foi que as colônias contendo a interação G α olf e Ric-8B apresentaram coloração azul forte (maior atividade do repórter Lac-Z, sugerindo uma interação mais forte) enquanto as colônias contendo a interação G α olf e Ric-8B Δ 9 apresentaram coloração muito menos azulada (sugerindo uma interação mais fraca). O resumo da varredura realizada está organizado na Tabela-2.

Tabela-2: Resumo do ensaio de varredura.

Biblioteca utilizada	cDNA epitélio olfatório (camundongo)
Tamanho da biblioteca (Número de clones independentes de levedura)	1,95 x10 ⁶
Isca utilizada	G α olf
Nº de clones varridos	10 ⁷
Nº de clones LEU2 +	170
Nº clones LEU2+ e LacZ+ (positivos para os dois repórteres)	82
Nº clones analisados	82
Sequências identificadas	Ric-8B (64 clones) Ric-8B Δ 9 (10 clones) Hsp40 (3 clones) <i>Zinc finger</i> (5 clones)

Ric-8B codifica para uma proteína de 560 aminoácidos. A análise dessa sequência não mostrou a presença de nenhum domínio conservado, tampouco qualquer informação sobre a função dessa proteína. Entretanto, Ric-8B possui 40% de identidade com a sequência de aminoácidos de Ric-8A; que teve sua função determinada por Tall e colaboradores (2003) como sendo de um GEF (*GTP Exchange Factor*) para algumas subunidades de proteína G α . Interessante notar que o alinhamento das sequências disponíveis de Ric-8 de várias espécies revelam a presença de 9 regiões conservadas. Essas regiões, chamadas de “assinaturas de sinembrina”, apresentam 58-90% de identidade de aminoácido entre Ric-8A e Ric-8B (Von Dannecker *et al.*, 2005). Sendo assim, como Ric-8A, talvez Ric-8B tenha também um papel de GEF, entretanto tal papel ainda necessita ser diretamente demonstrado. Essas informações estão resumidas na Figura-6, que mostra o alinhamento entre as sequências de aminoácidos de Ric-8A e Ric-8B e as assinaturas de sinembrina mencionadas. Observe que a região do éxon 9, ausente na variante Ric-8B Δ 9, compreende duas dessas regiões conservadas.

Figura-6

Figura-6. Análise da sequência de Ric-8B.

(a) Alinhamento da sequência de aminoácidos de Ric-8B e Ric-8A de camundongo. As sequências sombreadas indicam áreas de identidade de aminoácidos. As nove “assinaturas de sinembrina” estão sublinhadas em cinza. A região correspondente ao éxon 9 está sublinhada em preto. As sequências foram alinhadas no programa ClustalW (EBI), <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, e o alinhamento obtido editado utilizando o programa CHROMA (<http://www.lg.ndirect.co.uk/chroma>).

(b) Representação esquemática do gene que codifica para Ric-8B. Os éxons estão representados como caixas pretas e os íntrons estão representados como linhas (Os íntrons não estão representados em escala). O cDNA que codifica para Ric-8B possui os 10 éxons representados. A forma variante de Ric-8B, que não contém o éxon 9, Ric-8BΔ9, está indicada abaixo.

(6-A-I) Ric-8B interage com G α olf em sistema de duplo-híbrido

Os clones de Ric-8B e Ric-8B Δ 9 obtidos na varredura não eram clones contendo apenas a região codificadora, pois esses possuíam uma região 5' não traduzida de 21-57pb (acima do ATG inicial da sequência codificadora) que estava também sendo traduzida para formação da proteína de fusão do duplo-híbrido. Dessa forma, a fim de avaliar a interação com G α olf, sem a interferência desse acréscimo, clonamos a sequência codificadora de Ric-8B e Ric-8B Δ 9.

As seguintes construções de mutantes de G α olf foram acrescentadas a esse ensaio na tentativa de identificar possíveis regiões importantes de G α olf na interação com as isoformas de Ric-8B: G α olf (1-42aa), referente a região N-terminal que representa uma região importante para interação de G α com o receptor e com o dímero G $\beta\gamma$ (Lambright *et al.*, 1996), G α olf (72-188aa) representando o domínio de α hélices presente nas proteínas G α heterotriméricas (Rens-Domiano *et al.*, 1995) e G α olf (352-381aa) que consiste da região carboxi-terminal que representa uma região de G α que interage com o receptor (Hamm *et al.*, 1988; Masters *et al.*, 1988; Conkling *et al.*, 1993; Dratz *et al.*, 1993; Rasenick *et al.*, 1994; Lambright *et al.*, 1996).

Conforme podemos observar na Figura-7, Ric-8B interage com G α olf inteiro, e com a região carboxi-terminal de G α olf, enquanto Ric-8B Δ 9 somente interage com a região carboxi-terminal de G α olf; não apresentando interação com G α olf inteiro. Isso nos leva a concluir que Ric-8B realmente interage com G α olf em sistema de duplo-híbrido e que essa interação é dependente da presença do éxon 9, visto que a interação Ric-8B Δ 9 com G α olf inteiro não é observada.

Figura-7

Figura-7. Ric-8B interage com Gαolf em sistema de duplo-híbrido.

Ensaio de interação cruzada utilizando iscas expressando Gαolf inteiro (1-381aa) e diferentes regiões de Gαolf e alvos expressando Ric-8B e Ric-8BΔ9. Identificamos interação das duas isoformas de Ric-8B com a porção carboxi-terminal de Gαolf (352-381aa), entretanto, com Gαolf inteira, somente observamos interação com Ric-8B. Interação pBait(B) x pTarget(T): controle positivo do ensaio, utilizando proteínas controle que sabidamente interagem em sistema de duplo-híbrido. Mostramos aqui somente o resultado do gene repórter Lac-Z (coloração azul das leveduras), entretanto, realizamos em paralelo o mesmo ensaio com o gene repórter LEU2, que apresentou os mesmo padrão de resultados visto para o gene repórter Lac-Z.

(6-B) Determinação do perfil de expressão de Ric-8B

Para a determinação do perfil de expressão de Ric-8B em diferentes tecidos de camundongo, realizamos os ensaios de *Northern blot* e RT-PCR.

(6-B-I) *Northern blot*

Realizamos o ensaio de *Northern blot* com o objetivo de determinar a expressão de Ric-8B em diferentes tecidos de camundongo. RNA total de 10 diferentes tecidos de camundongo foi extraído, fracionado, transferido para uma membrana de nylon e hibridizado contra sondas radioativas de Ric-8B e GAPDH.

O uso da sonda GAPDH foi necessário para mostrar que quantidades equivalentes de RNA total estavam presentes em cada canaleta da membrana. Conforme podemos visualizar na Figura-8, detectamos sinal (duas bandas de aproximados 2 e 3 kb, indicadas com setas na Figura-8) apenas no epitélio olfatório. Uma banda menor e menos nítida pôde ser observada na canaleta correspondente ao músculo esquelético.

Figura-8

Figura-8. Ric-8B possui expressão predominante no epitélio olfatório.

Experimento de *Northern blot*. RNA total de 10 tecidos de camundongo estão representados nas seguintes canaletas: (1) epitélio olfatório, (2) olho, (3) cérebro, (4) músculo esquelético, (5) coração, (6) rim, (7) fígado, (8) pulmão, (9) testículo, (10) timo. A sonda preparada contra Ric-8B foi hibridizada em condições estridentes. Hibridização com a sonda GAPDH indica que quantidades equivalentes de RNA total estão disponíveis para hibridização em todas as canaletas. Os pesos moleculares estão em quilobases (kb).

(6-B-II) RT-PCR

Para a determinação da expressão de Ric-8B, também utilizamos o método de RT-PCR para os mesmos tecidos analisados no ensaio de *Northern blot*. De acordo com esse método, foi possível detectar níveis menores de expressão também no olho, cérebro, músculo esquelético e coração [Figura-9(a)]. Nesse ensaio também determinamos a expressão de $G\alpha_{olf}$ nesses mesmos tecidos, podendo detectar a expressão de $G\alpha_{olf}$ no epitélio olfatório e cérebro e em menor quantidade no olho. Com base nesses dados é possível dizer que a expressão de Ric-8B ocorre preferencialmente no epitélio olfatório e, em menor grau, no cérebro, olho e músculo.

O ensaio de RT-PCR foi também realizado com GAPDH a fim de mostrar que qualidade e quantidades equivalentes de cDNA foram utilizadas para cada um dos tecidos testados.

(6-B-III) Determinação das formas de Ric-8B no epitélio olfatório

Como identificamos duas variantes de *splicing* alternativo para Ric-8B na varredura da biblioteca de epitélio olfatório, realizada com a isca $G\alpha_{olf}$, realizamos um ensaio de RT-PCR semi-quantitativo utilizando *primers* que amplificam a região carboxi-terminal de Ric-8B (onde está situado o éxon 9), ver Figura-9(c), a fim de verificar a expressão das duas formas de Ric-8B no epitélio olfatório.

Por diferença de tamanho dos produtos amplificados, foi possível identificar a presença de cada uma das formas, verificando a intensidade de cada uma das bandas em diferentes ciclagens de PCR. Na Figura-9(b), observamos intensidades iguais da banda maior (462pb), referente a Ric-8B, e da banda menor (342pb), referente a Ric-8B Δ 9, em todas as ciclagens testadas.

Portanto nossos resultados indicam que as duas formas de Ric-8B são expressas em quantidades equivalentes no epitélio olfatório.

Figura-9

Figura-9. Ensaio de RT-PCR.

(a) Determinação do perfil de expressão de Ric-8B em diferentes tecidos de camundongo através da técnica de RT-PCR. Nas canaletas de 1-10 estão representados os produtos de PCR obtidos a partir dos cDNAs dos seguintes tecidos: (1) epitélio olfatório, (2) olho, (3) cérebro, (4) músculo esquelético, (5) coração, (6) rim, (7) fígado, (8) pulmão, (9) testículo e (10) timo. Através desse ensaio, observamos a expressão de Ric-8B preferencialmente no epitélio olfatório. A banda superior (462pb) corresponde à forma de Ric-8B que apresenta o éxon 9, enquanto a banda inferior (342pb) corresponde à forma de Ric-8B que não apresenta o éxon 9, Ric-8BΔ9; veja esquema no item (c). Quando utilizamos os *primers* para Gαolf, observamos expressão preferencial de Gαolf no epitélio olfatório, mas também observamos sinal no cérebro e no olho. Qualidade equivalente de cDNA foi utilizado no ensaio, como podemos observar através do sinal para GAPDH. Os pesos mostrados nessa figura estão em quilobases (kb). PM=peso molecular.

(b) Determinação das diferentes formas de Ric-8B presentes no epitélio olfatório. O ensaio de RT-PCR, utilizando cDNA de epitélio olfatório de camundongo, foi utilizado para determinar semi-quantitativamente as duas formas de Ric-8B identificadas no ensaio de varredura de duplo-híbrido. Realizando diferentes ciclos de PCR (20, 25, 30 e 35 ciclos), foi possível determinar a presença de quantidades equivalentes das duas formas de Ric-8B no epitélio olfatório. A banda superior de 462pb corresponde à forma de Ric-8B que apresenta o éxon 9, enquanto que a banda inferior (342pb) corresponde à forma de Ric-8B que não apresenta o éxon 9 (Ric-8BΔ9).

(c) Esquema dos *primers* desenhados para a região carboxi-terminal de Ric-8B. O esquema mostra a região codificadora e a organização dos éxons do transcrito Ric-8B. O éxon 9, ausente na forma Ric-8BΔ9, está indicado com asterisco. Os *primers* ("forward"/reverso) estão representados como setas, em vermelho.

(6-C) Hibridização *in situ*

Como utilizamos uma biblioteca de epitélio olfatório, que compreende vários tipos celulares (veja desenho em Figura-10, abaixo), o primeiro passo para confirmar a interação entre $G\alpha_{olf}$ e Ric-8B foi verificar se Ric-8B é mesmo expresso no epitélio olfatório e se essa expressão está co-localizada com a expressão de $G\alpha_{olf}$ nos neurônios olfatórios maduros.

Figura-10. Desenho esquemático da organização dos tipos celulares presentes no epitélio olfatório. Desenho adaptado de Eggan et al., 2004.

Como descrito em “Introdução a Ric-8, item (3-D)”, foi demonstrado por Tall e colaboradores (2003) que Ric-8B interage com $G\alpha_s$ em sistema de duplo-híbrido em levedura. Como $G\alpha_s$ apresenta uma alta identidade, na sua sequência de aminoácidos, com $G\alpha_{olf}$, 88% de identidade (Jones e Reed, 1989), seria possível que Ric-8B interagisse com $G\alpha_s$ e não com $G\alpha_{olf}$ no epitélio olfatório. Como $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$ possuem perfis de expressão diferentes no epitélio olfatório, os neurônios olfatórios maduros expressam apenas $G\alpha_{olf}$ e nos imaturos há predominância de $G\alpha_s$ (Menco *et al.*, 1994), seria possível, através da determinação da expressão de Ric-8B, definir qual seria o real alvo biológico de Ric-8B. Dessa forma, resolvemos utilizar a técnica de hibridização *in situ* para determinar tal perfil de expressão.

(6-C-I) A expressão de Ric-8B e G α olf está co-localizada no epitélio olfatório

Realizando a técnica de hibridização *in situ* em epitélio olfatório de camundongo, conseguimos identificar forte expressão de Ric-8B na camada correspondente aos neurônios olfatórios maduros, co-localizando com a expressão de G α olf (Figura-11). Identificamos forte marcação de Ric-8B em toda a região do epitélio olfatório onde estão os neurônios olfatórios maduros, sendo esse perfil semelhante ao de G α olf [Figura-11(a) e (b)]. Entretanto, esse perfil de expressão é diferente para G α s, expresso nas células basais; neurônios não maduros [Figura-11(c)]. Para um maior aumento veja Figura-11(g-i). Assim como G α olf, Ric-8B não é expresso no órgão vomeronasal (Berghard *et al.*, 1996), [Figura-11(j) e (k)]. O ensaio de hibridização com a sonda OMP (*olfactory marker protein*), Figura-11(l), representa um controle positivo em nosso experimento pois essa mensagem está presente tanto no órgão vomeronasal [marcação de duas estruturas em forma de meia lua na região inferior da Figura-11(l)] como no epitélio olfatório, região superior; mesma marcação vista para G α olf [Figura-11(k)] e Ric-8B [Figura-11(j)]. Como controle do ensaio de hibridização, utilizamos a sonda sense de Ric-8B, G α olf e G α s e não verificamos presença de sinal em nenhum desses casos [Figura-11(d-f)].

Com base nesses resultados é possível concluir que o gene Ric-8B é expresso nos neurônios olfatórios maduros em toda a extensão do epitélio olfatório e que seu perfil de expressão é o mesmo apresentado por G α olf.

Figura-11

Figura-11. A expressão de Ric-8B e $G\alpha_{olf}$ está co-localizada no epitélio olfatório.

Comparação do perfil de expressão de Ric-8B, $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$ no epitélio olfatório de camundongo através de ensaio de hibridização *in situ*. Cortes coronais da cavidade nasal (a-f) foram hibridizados com sondas marcadas com digoxigenina específicas contra Ric-8B (a), $G\alpha_{olf}$ (b) e $G\alpha_s$ (c). As sondas controle correspondentes (sondas sense) estão representadas em (d), (e) e (f). Em (g-i) temos um aumento das regiões marcadas em (a-c), mostrando a marcação nos tipos celulares do epitélio olfatório. As sondas contra Ric-8B (g) e $G\alpha_{olf}$ (h) marcam a camada de neurônios olfatórios maduros (ON), mas não a camada de células suporte (SC) e a camada de células basais (BC). Entretanto, a sonda contra $G\alpha_s$ (i) marca somente a camada de células basais (BC). (j-l) Cortes coronais da cavidade nasal onde temos representado o epitélio olfatório acima e o órgão vomeronasal abaixo (duas estruturas com formato de meia lua). Sondas contra Ric-8B (j) e $G\alpha_{olf}$ (k) marcam somente o epitélio olfatório e não o órgão vomeronasal, enquanto sonda contra OMP (l) marca esses dois órgãos.

(6-C-II) A expressão de Ric-8B e G α olf está co-localizada no cérebro

Partindo do princípio de que Ric-8B é importante para o desempenho do papel de G α olf e não necessariamente de G α s, resolvemos identificar a presença de Ric-8B no cérebro de camundongo. Trabalhos anteriores mostraram que, apesar da expressão cerebral de G α s ser ubíqua, existem regiões cerebrais em que existe forte expressão de G α olf e fraca expressão de G α s: *striatum (caudate-putamen)*, *nucleus accumbens* e tubérculo olfatório (Belluscio *et al.*, 1998), (Zhuang *et al.*, 2000). Dessa forma, mostrar a presença de expressão Ric-8B nas regiões em que somente G α olf é abundantemente expressa seria mais um indicativo de que o papel de Ric-8B está correlacionado com G α olf e não necessariamente com G α s.

Para testar essa hipótese, utilizamos novamente a técnica de hibridização *in situ* para determinar a expressão desses genes em cérebro de camundongo. Para a melhor visualização das regiões cerebrais em que identificamos marcação para as sondas, resolvemos realizar o ensaio utilizando cortes sagitais e coronais de cérebro de camundongo. Na Figura-12 disponibilizamos uma ilustração representando as diferentes estruturas cerebrais que serão analisadas, ilustração baseada em Paxinos e Watson, 1998. Através desses ensaios, determinamos que Ric-8B é expresso nas regiões que apresentam forte expressão de G α olf, *striatum (caudate-putamen)*, *nucleus accumbens* e tubérculo olfatório [Figura-12(a), (c), (g) e (h)] ficando claro que G α olf e não G α s deve ser o alvo biológico para Ric-8B. Ric-8B é também expresso no córtex piriforme, giro dentato e hipocampo (região CA3), que são regiões onde há conjunta expressão de G α olf e G α s, ficando difícil determinar qual seria o real alvo biológico de Ric-8B nessas regiões. Interessante notar que em todas as regiões onde há expressão de G α olf também há expressão de Ric-8B. A única exceção são as células de Purkinje no cerebelo em que detectamos sinal para G α olf mas não para Ric-8B. Como controle do experimento, utilizamos a sonda sense de Ric-8B, G α olf e G α s e não verificamos presença de sinal no cérebro de camundongo [Figura-12(b), (d) e (f)].

Figura-12

Figura-12. A expressão de Ric-8B e Gαolf está co-localizada no cérebro.

Comparação do perfil de expressão de Ric-8B, Gαolf e Gαs no cérebro de camundongo através de ensaio de hibridização *in situ*. Cortes sagitais do cérebro (a-f) foram hibridizados com sondas marcadas com digoxigenina específicas contra Ric-8B (a), Gαolf (c) e Gαs (e). As sondas controle correspondentes (sondas sense) estão representadas em (b), (d) e (f). Cortes coronais do cérebro (g-i) foram hibridizados com sondas marcadas com digoxigenina contra Ric-8B (g), Gαolf (h) e Gαs (i). Ric-8B é expresso em regiões onde há forte expressão de Gαolf. A ilustração das regiões cerebrais foi adaptada de Paxinos & Watson, 1998. Legenda: Ce (cerebelo), Dg (giro dentato), CA3 (região CA3 do hipocampo), Ot (tubérculo olfatório), Pc (córtex piriforme), St (striatum), Na (nucleus accumbens).

Através dos resultados do ensaio da hibridização *in situ* no cérebro de camundongo foi possível reforçar os resultados observados no epitélio olfatório e construir com maior solidez a hipótese de que Ric-8B é um ligante de G α olf *in vivo*, visto que o perfil de expressão de Ric-8B acompanha o perfil de G α olf e não de G α s em várias estruturas cerebrais.

O resumo dos resultados obtidos com os ensaios de hibridização *in situ* no epitélio olfatório e cérebro de camundongo estão resumidos a seguir, na Tabela-3.

Tabela-3. Resumo do padrão de expressão de Ric-8B no epitélio olfatório e cérebro e a correlação com a expressão de G α olf e G α s.

Regiões em que a expressão de Ric-8B foi identificada:	Expressão de G α olf na região indicada*.	Expressão de G α s na região indicada*.
Camada de neurônios olfatórios maduros (Epitélio olfatório)	Forte	Não observada
<i>Striatum (caudate-putamen)</i> (Cérebro)	Forte	Não observada**
<i>Nucleus accumbens</i> (Cérebro)	Forte	Não observada**
Tubérculo olfatório (Cérebro)	Forte	Não observada
Córtex piriforme (Cérebro)	Forte	Forte
Giro dentato (Cérebro)	Forte	Forte
Hipocampo (CA3) (Cérebro)	Forte	Forte

* O perfil de expressão de G α olf e G α s nas regiões indicadas na tabela está de acordo com os dados da literatura (Belluscio *et al.*, 1998; Zhuang *et al.*, 2000).

** Na região do *striatum (caudate putamen)* e *nucleus accumbens* verificamos sinal para G α s em uma população minoritária de neurônios.

(6-D) Ric-8B propicia o acúmulo de AMPc na presença de G α olf

Com o objetivo de verificar se Ric-8B e Ric-8B Δ 9 são capazes de potencializar a atividade de G α olf em sistema heterólogo, transfectamos células HEK-293 com os vetores de expressão para G α olf e o receptor β_2 -adrenérgico (β_2 AR) ou D1R (receptor de dopamina, subtipo 1), na presença e na ausência de Ric-8B. Nesses ensaios, a produção de AMPc pelas células foi medida em cada caso.

Nos ensaios realizados com o β_2 AR foi visto que esse receptor sozinho ou co-expresso com G α olf é capaz de aumentar os níveis de AMPc em relação as células não transfectadas. Nesse caso, houve uma produção de AMPc de 5 a 7 vezes maior que o controle (células não transfectadas), Figura-13(a). Como essa atividade de β_2 AR independe da presença de G α olf, esses resultados indicam que β_2 AR está acoplando provavelmente com o G α s endógeno das células HEK-293. Essas observações também são consistentes com observações anteriores que mostraram que a co-transfecção de β_2 AR com G α olf não promove melhora em relação à expressão de β_2 AR sozinho, sugerindo que G α olf não é adequadamente ativado por receptores em sistemas heterólogos (Jones e Reed, 1989; Jones *et al.*, 1990).

A co-expressão de Ric-8B, G α olf e β_2 AR foi capaz de induzir o nível mais alto de acúmulo de AMPc, na presença de isoproterenol; acúmulo de aproximadamente 15 vezes em relação ao controle. Essa amplificação é dependente da ativação do receptor, já que o mesmo efeito não pôde ser observado na ausência do agonista (isoproterenol) e na ausência de β_2 AR (quando G α olf foi co-transfectada apenas com Ric-8B). Esse efeito também é dependente de G α olf, pois esse efeito não foi detectado nas células transfectadas somente com Ric-8B e β_2 AR.

A proteína Ric-8B Δ 9, a variante de *splicing* alternativo de Ric-8B que não contém o éxon 9, não mostrou o mesmo efeito de amplificação do sinal de AMPc dependente de G α olf. Na presença de isoproterenol, os níveis de AMPc nas

células que co-expressavam $G\alpha_{olf}$, β_2AR e Ric-8B Δ 9 foram semelhantes aos das células co-transfectadas somente com $G\alpha_{olf}$ e β_2AR [Figura-13(a)]. É importante ressaltar que os níveis de expressão de Ric-8B e Ric-8B Δ 9 nas células HEK-293 foram determinados pela Prof^a. Dra. Adriana Mercadante através de *Western blot* e esses eram similares.

Os mesmos resultados descritos acima, para o receptor β_2AR , também foram obtidos para o receptor de dopamina D1R [Figura-13(b)]. Entretanto, como podemos comparar na Figura-13, entre (a) e (b), D1R não acopla tão bem à via endógena de $G\alpha_s$ presente na célula HEK-293, como o β_2AR , deixando a interpretação dos dados mais nítida. Diferente do experimento anterior, o acúmulo de AMPc na presença de D1R sozinho e D1R mais $G\alpha_{olf}$ é menor do que a verificada para β_2AR sozinho e β_2AR mais $G\alpha_{olf}$. Com base nesses dois ensaios é possível concluir que Ric-8B é capaz de potencializar a atividade de $G\alpha_{olf}$, levando ao acúmulo de AMPc, e que tal acúmulo é dependente da ativação do receptor e da co-expressão da isoforma de Ric-8B que possui o éxon 9.

Conforme descrito em “Material e Métodos”, realizamos os ensaios acima descritos com a adição dos agonistas (isoproterenol ou dopamina) nas células logo após a etapa de transfecção, sendo o ensaio de detecção de AMPc realizado após 40 horas. Dessa forma, o ensaio representou a atividade de modulação de Ric-8B na via de $G\alpha_{olf}$ em um modelo de estimulação crônica. Com o objetivo de mostrar o papel de Ric-8B em tempos menores, mais representativos da possível função de Ric-8B *in vivo*, repetimos o ensaio de estimulação com D1R em diferentes tempos [Figura-13(c)] e verificamos que Ric-8B é capaz de amplificar essa via em todos os tempos testados (10min, 30min e 120min), sendo essa estimulação equivalente à estimulação vista em 40 horas (produção de AMPc na presença de Ric-8B entre 2,5 e 5 vezes maior do que na ausência de Ric-8B); apesar da quantidade maior de AMPc produzido nos tempos menores.

Figura-13

Figura-13. Amplificação de AMPc na via de G α olf por Ric-8B.

(a) A produção de AMPc foi medida em células HEK-293 transfectadas com G α olf, β 2AR, Ric-8B e Ric-8B Δ 9, conforme indicado na figura. A ativação foi medida na ausência (coluna branca) e na presença de 10 μ M de isoproterenol (coluna preta). Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. O acúmulo de AMPc é apresentado em picomols/milhões de células. (-) Células não transfectadas (controle).

(b) Experimento realizado como descrito em (a), exceto pelo fato de que as células foram transfectadas com D1R ao invés de β 2AR e de que a estimulação foi realizada com dopamina (10 μ M).

(c) Células foram co-transfectadas com G α olf e D1R (colunas brancas) ou G α olf e D1R e Ric-8B (colunas pretas). A medida de AMPc foi medida após a estimulação de dopamina (10 μ M) nos períodos de tempo indicados; (-) indica que não foi adicionada dopamina. O resultado é apresentado como uma média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Ric-8B promove a expressão funcional de ORs

Com o objetivo de demonstrar o papel de Ric-8B na amplificação de sinal via receptores olfatórios (ORs), transfectamos células HEK-293T com os vetores de expressão para $G\alpha_{olf}$, Ric-8B e para os receptores olfatórios mOR-EG, mOR-I7 e mOR-S6. Os ORs mOR-EG e mOR-S6 também foram clonados em fusão com o peptídeo Rho (região N-terminal da rodopsina bovina, 20aa iniciais) que já foi demonstrado ter a capacidade de aumentar a expressão de ORs na membrana plasmática de células HEK-293 (Krautwurst *et al.*, 1998). Essas novas construções de ORs também foram testadas nesses experimentos e serão designadas como RhoOR-EG e RhoS6.

Para fins comparativos, também transfectamos HEK-293T com $G\alpha_{olf}$ e ORs adicionando a proteína RTP-1, que recentemente foi demonstrado ser capaz de direcionar a expressão funcional de diversos receptores olfatórios para a membrana de HEK-293T (Saito *et al.*, 2004). Em um último caso, transfectamos as células com $G\alpha_{olf}$, ORs, Ric-8B e RTP1 a fim de analisar o comportamento desse sistema com Ric-8B e RTP1 juntas. A produção de AMPc pelas células foi medida em cada caso, na ausência ou presença do odor correspondente (300 μ M).

(6-E) Ric-8B promove expressão funcional do mOR-EG

O primeiro experimento foi realizado utilizando o receptor olfatório de camundongo que responde ao odor eugenol (mOR-EG). Esse receptor foi primeiramente identificado utilizando a técnica de RT-PCR a partir de célula única de neurônios olfatórios que respondiam ao odor eugenol (Kajiya *et al.*, 2001). No gráfico mostrado na Figura-14(a), verificamos que não é possível detectar a estimulação desse receptor nas células transfectadas somente com $G\alpha_{olf}$ e mOR-EG. Entretanto, nas células transfectadas com $G\alpha_{olf}$ e RhoOR-EG é possível verificar o estímulo do RhoOR-EG com o odor eugenol, via aumento de AMPc gerado no sistema. Tal diferença de resposta entre esses experimentos está em concordância com os dados de Katada e colaboradores (2004) que mostraram

que a presença da fusão do peptídeo Rho no N-terminal do mOR-EG promove o aumento da expressão desse receptor na membrana de células HEK-293.

A fim de verificar o papel de Ric-8B nesse sistema, transfectamos células com G α olf e mOR-EG acrescidas de Ric-8B e verificamos que o receptor mOR-EG, com a presença de Ric-8B, é expresso funcionalmente. Observe que a co-transfecção de G α olf e mOR-EG e RTP-1 não promove expressão funcional de mOR-EG, e o sistema contendo G α olf, mOR-EG e RTP-1, acrescido de Ric-8B, também não promove a expressão funcional de tal receptor [Figura-14(a)]. Desses dados foi possível concluir que a presença de Ric-8B, G α olf e mOR-EG é capaz de gerar um sistema de expressão funcional para o receptor olfatório mOR-EG em que é possível determinar o estímulo desse receptor ao odor eugenol sem que seja necessário o uso da construção com a fusão do peptídeo Rho, RhoOR-EG.

A fim de demonstrar a importância do uso de um sistema independente do uso da fusão de ORs com o peptídeo Rho, mostramos na Figura-14(b) que apesar de RhoOR-EG responder ao odor eugenol e vanilina (Saito *et al.*, 2004; Kajiya *et al.*, 2001), o mOR-EG responde somente ao odor eugenol e não responde ao odor vanilina. Esses dados sugerem que essa modificação no N-terminal do OR eugenol está causando alterações na especificidade deste OR e que a ligação do odor vanilina a esse receptor talvez possa ser um artefato devido a fusão com o peptídeo Rho.

A fim de avaliar alterações na especificidade do sistema utilizando Ric-8B, testamos a ativação do mOR-EG contra um painel de odores com diferentes estruturas. Conforme podemos concluir pela Figura-14(b), o sistema proposto para a expressão funcional de mOR-EG é específico, pois somente responde ao odor eugenol e não ao painel de odores testado (8 odores diferentes).

Figura-14

(a)

(b)

Figura-14. Amplificação da produção de AMPc na via de transdução de sinal do receptor olfatório que responde ao composto eugenol, mOR-EG.

(a) A produção de AMPc foi medida em células HEK-293T co-transfectadas com Gαolf, Ric-8B, mOR-EG, RhoOR-EG e RTP1, conforme indicado na figura. A ativação foi medida na ausência (coluna branca) e na presença de 300μM do odor eugenol (coluna cinza). Esses dados estão expressos como médias de três experimentos independentes. O desvio padrão está indicado no gráfico (Média +/- desvio padrão). O acúmulo de AMPc é apresentado em fentomols/milhão de células. (**, P< 0.007)

(b) A produção de AMPc foi medida em células HEK-293T co-transfectadas com Gαolf, Ric-8B e mOR-EG ou RhoOR-EG, conforme indicado na legenda da figura. A ativação por odor foi realizada na presença de 300μM do odor especificado no gráfico. Esses dados estão expressos como médias de três experimentos independentes. O desvio padrão está indicado no gráfico (Média +/- desvio padrão). (-) Células não transfectadas (controle). O acúmulo de AMPc é apresentado em fentomols/milhão de células. (**, P< 0.009, comparado com a transfecção com as mesmas construções, mas sem adição de odor).

(6-F) Ric-8B promove expressão funcional do mOR-I7

Em um segundo experimento, resolvemos testar em nosso sistema outros receptores olfatórios que já tiveram seus ligantes determinados. Testamos então o receptor mOR-I7 que teve seu ligante, o composto heptanal, determinado em sistema *in vivo* (Zhao *et al.*, 1998). O experimento foi realizado de maneira semelhante ao do mOR-EG. Na Figura-15 podemos observar que não conseguimos detectar resposta ao heptanal nas células co-transfectadas com G α olf e mOR-I7, e com G α olf, mOR-I7 e RTP-1. Entretanto, nas células co-transfectadas com G α olf, mOR-I7 e Ric-8B é possível a detecção de resposta do receptor mOR-I7 ao odor heptanal. No último caso testado, células transfectadas com G α olf, mOR-I7, Ric-8B acrescida de RTP-1, parece haver uma tendência de melhora no sistema, entretanto, observando a variação entre os três experimentos realizados, essa melhora não é estatisticamente significativa ($P < 0.05$). Dessa forma podemos concluir que nosso sistema não só está funcionando para o mOR-EG, mas também para outros ORs como demonstrado para o mOR-I7.

Figura-15

Figura-15. Amplificação da produção de AMPc na via de transdução de sinal do receptor olfatório que responde ao composto heptanal, mOR-I7.

A produção de AMPc foi medida em células HEK-293T co-transfectadas com Gαolf, Ric-8B, mOR-I7 e RTP1, conforme indicado na figura. A ativação foi medida na ausência (coluna branca) e na presença de 300μM do odor heptanal (coluna cinza). Esses dados estão expressos como médias de três experimentos independentes. O desvio padrão está indicado no gráfico (Média +/- desvio padrão). O acúmulo de AMPc é apresentado em fentomols/milhões de células. (*, P= 0.0288; **, P= 0.0035).

(6-G) Ric-8B promove expressão funcional de RhoS6

Em seguida, testamos o sistema para outro OR, o mORS6 que teve também o seu ligante determinado *in vivo*, o ácido nonanedióico (Malnic *et al.*, 1999). Os mesmos experimentos descritos para mOR-EG e mOR-I7 foram realizados para avaliar a expressão funcional desse receptor. Em experimentos anteriores, dados não mostrados, tentamos expressar este OR na presença de G α olf/Ric-8B, G α olf/RTP-1 e G α olf/Ric-8B/RTP-1. Em todas essas condições testadas não foi possível detectar estímulo desse receptor na presença do ligante ácido nonanedióico. Talvez esse receptor seja mais retido no retículo endoplasmático do que os outros receptores testados e por isso não foi possível detectar sua estimulação. A fim de contornar a expressão deficiente desse OR, realizamos os mesmos experimentos utilizando o OR-S6 em fusão com o peptídeo Rho, Figura-16(a). Nesses experimentos só foi possível detectar resposta ao ligante ácido nonanedióico em células transfectadas com RhoS6, acrescidas de G α olf, Ric-8B e RTP-1. Nesse caso a resposta significativa ao odor só foi possível ser detectada em um sistema em que o OR é expresso com Rho e na presença de Ric-8B e RTP-1. Isso mostra que para a expressão funcional de alguns ORs talvez seja necessário, além da presença de Ric-8B, o uso de OR com a fusão com o peptídeo Rho e a presença de RTP-1.

Na Figura-16(b) mostramos uma curva dose resposta com diferentes concentrações de odor para a condição em que detectamos a resposta do receptor olfatório RhoS6. Dessa forma, apesar de pequena a resposta obtida nesses ensaios, essa parece ser real visto que é sensível a diferentes concentrações de odor.

Figura-16

Figura-16. Amplificação da produção de AMPc na via de transdução de sinal do receptor olfatório que responde ao composto ácido nonanedióico, RhoS6.

(a) A produção de AMPc foi medida em células HEK-293T co-transfectadas com Gαolf, Ric-8B, RhoS6 e RTP1, conforme indicado na figura. A ativação foi medida na ausência (coluna branca) e na presença de 300μM do odor ácido nonanedióico (coluna cinza). Esses dados estão expressos como médias de três experimentos independentes. O desvio padrão está indicado no gráfico (Média +/- desvio padrão). O acúmulo de AMPc é apresentado em fentomols/milhão de células. (*, P=0.0219)

(b) A produção de AMPc foi medida em células HEK-293T co-transfectadas com Gαolf, Ric-8B e RhoS6 frente a diferentes concentrações do odor ácido nonanedióico (indicado na figura). Esses dados estão expressos como médias de dois experimentos independentes. O acúmulo de AMPc é apresentado em fentomols/milhão de células.

(6-H) Ric-8B promove acúmulo de G α olf na periferia celular

Como mostramos que G α olf interage diretamente com Ric-8B, realizamos ensaios de imunofluorescência com o objetivo de determinar se G α olf e Ric-8B estão co-localizados nas células HEK-293T e se a presença de Ric-8B altera a localização celular de G α olf.

Estes experimentos mostraram que G α olf e Ric-8B estão co-localizados na periferia celular [Figura-17(e-g)] e que a co-expressão de Ric-8B aumenta em duas vezes o número de células que apresentam forte sinal para G α olf na região periférica da célula, ao contrário do padrão fraco e difuso apresentado para a marcação de G α olf em células que não expressam Ric-8B [Figura-17(a-d e h-j)]. A co-expressão de G α olf com a forma de *splicing* alternativo de Ric-8B (Ric-8B Δ 9, que não interage com G α olf em sistema de duplo-híbrido) não promove o aumento do número de células com forte marcação para G α olf na periferia celular [Figura-17(h)].

Esses dados estão em concordância com relatos recentes que demonstraram que a Ric-8 em *Drosophila* está envolvida na localização de proteínas G heterotriméricas na membrana (David *et al.*, 2005; Hampoelz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Dessa forma, Ric-8B deve possibilitar a expressão funcional de ORs através da melhora da expressão heteróloga de G α olf na periferia celular, o que poderá estar promovendo uma consequente melhora de acoplamento entre G α olf e ORs.

Figura-17

Figura-17. Localização celular de Gαolf e Ric-8B através do ensaio de imunofluorescência.

Células HEK-293T foram transfectadas com os vetores de expressão para Gαolf (a) ou para Gαolf e Ric-8B (b-d). As células foram permeabilizadas e tratadas com anticorpo anti-Gαolf (a e b) ou anti-FLAG (c) para visualização de Ric-8B. A sobreposição das imagens (b e c) é mostrada em (d). As células co-expressando Gαolf e Ric-8B, e marcadas com anti-Gαolf (e) e anti-FLAG (f), apresentam co-localização de Gαolf e Ric-8B na periferia da célula (g); sobreposição de (e) e (f). (h-j) Células representativas transfectadas somente com Gαolf (i) e com Gαolf mais Ric-8B (j) e marcadas com anticorpo anti-Gαolf. A porcentagem de células com intenso sinal para Gαolf (% células verdes), como as células mostradas em (j), foi determinada nas transfecções contendo apenas Gαolf e na situação em que co-transfectamos Gαolf e Ric-8B ou Ric-8BΔ9. Como controle, contamos as células com marcação para Ric-8B e Ric-8BΔ9 (% de células vermelhas). 700 células foram contadas, em cada um dos três experimentos independentes, realizados em duplicata. Esses resultados estão mostrados no gráfico (h) (***, $P < 0.0001$). O núcleo das células foi corado com o marcador Hoechst, em azul.

(7) Discussão

Em nosso trabalho, utilizamos o sistema de duplo-híbrido em levedura a fim de determinar potenciais novos reguladores para G α olf. Tais ligantes de G α olf poderiam melhorar a função de G α olf em sistema heterólogo, o que poderia ajudar na expressão funcional de ORs e a consequente descoberta de seus ligantes. Com esse objetivo, construímos a isca de G α olf para varrer uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo.

Obtivemos no ensaio de varredura apenas duas candidatas a apresentar interação real com G α olf: Ric-8B e Ric-8B Δ 9 (64 e 10 clones respectivamente, de um total de 170 colônias obtidas no ensaio de varredura). Conforme relatado, grande parte das colônias foi descartada por não apresentar atividade para os dois genes repórteres, ou descartada por apresentar sequências de pouco interesse, como as sequências que codificam para proteínas com domínios “dedo de zinco” (*zinc finger*) e proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*) que são comuns falsos positivos em varreduras utilizando duplo-híbrido. Entretanto, é importante ressaltar que apesar das proteínas de choque térmico serem sempre indicadas como comuns falsos positivos, encontradas em varreduras com diversas iscas, é possível que a interação entre G α olf/Hsp40 seja real, visto que existe pelo menos um trabalho que mostra a importância da interação da proteína de choque térmico Hsp90 na atividade de G α 12 (Vaiskunaite *et al.*, 2001).

Para confirmar a interação entre G α olf e Ric-8B em sistema de duplo-híbrido, clonamos as isoformas de Ric-8B em vetor pJG4-5 e verificamos a interação dessas construções com a construção de G α olf, e de mutantes de G α olf, na tentativa de identificar possíveis regiões importantes de G α olf na interação com as isoformas de Ric-8B.

Como resultado, verificamos a interação entre Ric-8B e G α olf e entre Ric-8B e a região carboxi-terminal de G α olf (G α olf 352-381), enquanto Ric-8B Δ 9 somente apresentou interação com a região carboxi-terminal de G α olf, não apresentando interação com G α olf inteiro. Essa diferença no padrão de interação

nos permite construir a hipótese de que o éxon de número 9 parece desempenhar importante papel no estabelecimento da interação entre Ric-8B e G α olf.

Interessante notar que o mutante de G α olf (G α olf 352-381), com o qual as isoformas de Ric-8B apresentaram interação, corresponde a região de proteína G α envolvida na interação com GPCRs (Hamm *et al.*, 1988; Masters *et al.*, 1988; Conkling *et al.*, 1993; Dratz *et al.*, 1993; Rasenick *et al.*, 1994), sugerindo que essas interações possam ser mutuamente exclusivas.

O processo de *splicing* alternativo, antes considerado como um evento raro e restrito, tem se estabelecido como um importante mecanismo de regulação gênica, com especial importância na regulação de genes neuronais (Lee e Irizarry, 2003). Análise de bancos de sequências de fragmentos de RNAm, bancos de EST (*expressed sequence tags*), permitiram sustentar a proposta de que 40-60% dos genes humanos possuem RNAm produto do processo de *splicing* alternativo (Modrek and Lee, 2002). A análise da função desses genes que sofrem o processo de *splicing* alternativo permitiu também estabelecer que a maioria desses genes está mais relacionada à sinalização celular, tais como genes que codificam receptores e proteínas envolvidas na transdução de sinal, do que relacionado com funções metabólicas ou de síntese (Modrek et al, 2001). Outros trabalhos mostraram também que os tecidos em que mais ocorre o processo de *splicing* alternativo são os tecidos de origem nervosa como cérebro e retina (Xu *et al.*, 2002). Assim estabelecido, a descoberta da isoforma de Ric-8B pode ser mais um exemplo dessa tendência, visto que se trata de uma proteína encontrada em neurônios e que possui possível papel na cascata de transdução de sinal de G α olf. Além disso, caso a diferença de interação observada no ensaio de interação cruzada entre G α olf e as isoformas de Ric-8B reflita o que ocorre *in vivo*, seria de especial interesse o estudo do papel funcional das duas isoformas na via de transdução de sinal de odores.

Com o objetivo de determinar o perfil de expressão de Ric-8B em vários tecidos de camundongo, realizamos o ensaio de *Northern blot* e RT-PCR. Os resultados do ensaio de *Northern blot* indicam a presença de sinal para Ric-8B (duas bandas de aproximados 2 e 3 kb) apenas no epitélio olfatório. De acordo

com nossos ensaios de hibridização *in situ*, sabíamos da presença de Ric-8B no cérebro, entretanto em todos os três *Northern blots* que realizamos não foi possível detectar tal sinal. A explicação para tal fato é que Ric-8B possui expressão restrita a algumas regiões do cérebro sendo o RNAm de Ric-8B pouco representado na preparação de cérebro total que utilizamos para o experimento. Caso tivéssemos testado preparações das partes do cérebro em que vimos expressão de Ric-8B, como o *striatum*, por exemplo, talvez fosse possível verificar sinal para Ric-8B em *Northern blot*.

Posto isso, uma técnica mais sensível, como RT-PCR, foi uma alternativa para complementar a determinação do perfil de expressão de Ric-8B. Nesse ensaio, identificamos sinal em outros tecidos como cérebro (conforme esperado), olho, músculo esquelético e coração.

O primeiro cDNA completo referente à Ric-8B de camundongo, depositado no banco de sequências do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), foi proveniente do tecido retina (*Acession number*:BC051080). Aqui também não vimos expressão no olho através do *Northern blot*, talvez pelo mesmo motivo que não vimos para o cérebro, pois se tivéssemos utilizado somente RNA total de retina, ao invés de olho inteiro, poderíamos ter verificado tal expressão. Para o tecido muscular, seja esquelético ou cardíaco, vimos sinal por RT-PCR, entretanto, por *Northern blot*, somente verificamos uma banda fraca, de tamanho abaixo do esperado, no músculo esquelético.

A expressão de G α olf foi determinada por RT-PCR e a presença de sinal, à parte do epitélio olfatório, foi apenas detectada no cérebro (conforme esperado pelos nossos resultados de hibridização *in situ* e pelos trabalhos de Belluscio *et al.*, 1998 e Zhuang *et al.*, 2000) e no olho. Segundo outros dados de hibridização *in situ* (Zigman *et al.*, 1993), parece haver presença de G α olf também na retina.

Interessante notar que em todos os tecidos em que detectamos a presença de G α olf também detectamos a presença de Ric-8B, o que poderia indicar que essa interação seja importante para o funcionamento de G α olf *in vivo*.

Como identificamos duas variantes de *splicing* alternativo para Ric-8B no experimento de varredura realizado com a isca G α olf, realizamos um ensaio de

RT-PCR semi-quantitativo a fim de verificar a predominância de expressão de uma das formas de Ric-8B no epitélio olfatório. Entretanto, em todos os pontos observados nesse experimento, a expressão das duas formas parece ser equivalente (bandas de mesma intensidade de sinal).

É importante salientar que as duas bandas amplificadas possuem tamanhos semelhantes (Ric-8B/462pb e Ric-8B Δ 9/342pb) não havendo preferência da amplificação da forma menor. É também importante notar que os pontos referentes às ciclagens 20 e 25 estão antes do ponto de saturação (ciclagem 30) e, portanto, se as bandas possuem mesma intensidade nesses pontos é indicativo de que as duas formas possuam níveis equivalentes de expressão no epitélio olfatório.

O primeiro experimento para confirmar a interação identificada no ensaio de duplo-híbrido em levedura, interação G α olf/Ric-8B, foi verificar se Ric-8B está sendo expressa no epitélio olfatório, na mesma região onde G α olf está abundantemente expressa: a região dos neurônios olfatórios maduros. Através de nossos ensaios, identificamos forte expressão de Ric-8B somente na camada de neurônios maduros, co-localizando com o perfil de expressão de G α olf.

Para reforçar a hipótese de que Ric-8B possui um papel correlacionado com G α olf e não com G α s, resolvemos determinar a expressão de Ric-8B no cérebro, pois em certas regiões cerebrais já havia sido determinada uma diferença no perfil de expressão das proteínas G estimulatórias, existindo regiões em que havia forte expressão de G α olf e fraca expressão de G α s (Belluscio *et al.*, 1998; Zhuang *et al.*, 2000). As regiões com esse padrão de expressão foram determinadas como sendo as seguintes: *striatum*, *nucleus accumbens* e tubérculo olfatório. A identificação da expressão de G α olf no cérebro permitiu analisar a importância do mesmo fora do sistema olfatório, tendo vários trabalhos (Zhuang *et al.*, 2000; Kull *et al.*, 2000; Corvol *et al.*, 2001) demonstrado que G α olf, e não G α s (como se pensava anteriormente), é importante para a ativação da via do AMPc no *striatum*, acoplado-se aos receptores de dopamina (subtipo D1R) e adenosina (subtipo A2a).

Conforme podemos concluir através da análise da Tabela-3, a maior parte das regiões cerebrais onde Ric-8B teve sua presença determinada possui também forte expressão de $G\alpha_{olf}$ e fraca expressão de $G\alpha_s$ (*striatum*, *nucleus accumbens* e tubérculo olfatório). Entretanto, a expressão de Ric-8B também foi identificada em regiões onde foi determinada forte expressão de $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$, como o giro dentado e o hipocampo. À exceção das células de Purkinje no cerebelo, em todas as regiões em que Ric-8B foi determinada, tivemos a determinação conjunta de $G\alpha_{olf}$, reforçando a hipótese do papel de Ric-8B na atividade de $G\alpha_{olf}$ *in vivo*. Apesar dessa exceção, os dados obtidos indicam fortemente que Ric-8B deve desempenhar papel importante na função da proteína $G\alpha_{olf}$ e, caso esse for mesmo de um GEF (*GTP Exchange Factor*), Ric-8B poderá modular a atividade de $G\alpha_{olf}$, e consequentemente a via de AMPc no epitélio olfatório e em várias regiões do cérebro. No *striatum*, por exemplo, o controle da via de AMPc, mediada por receptores de adenosina e dopamina, poderia ser um potencial alvo para o tratamento de psicoses e da doença de Parkinson via modulação da via do receptor (A2a) e do receptor D1; no *nucleus accumbens*, tal controle poderia ser utilizado para o tratamento e recuperação de dependentes químicos (Corvol *et al.*, 2001). Dessa forma, a identificação de moduladores que atuem nessas vias poderá ser de grande importância para o tratamento de tais doenças. O entendimento do papel das isoformas de Ric-8B, que parecem interagir com $G\alpha_{olf}$ de maneira diferenciada, também será de grande importância nesse possível mecanismo de modulação.

Com o objetivo de verificar se Ric-8B e Ric-8B Δ 9 são capazes de regular a atividade de $G\alpha_{olf}$ em sistema heterólogo, transfectamos células HEK-293 com os vetores de expressão para $G\alpha_{olf}$ e o receptor β_2 -adrenérgico (β_2 AR) ou D1R (receptor D1 de dopamina), na presença e na ausência de Ric-8B.

A escolha do receptor β_2 -adrenérgico está fundamentada em dados da literatura que mostram que $G\alpha_{olf}$ é capaz de acoplar ao receptor β_2 -adrenérgico em sistema heterólogo (Jones e Reed, 1989; Liu *et al.*, 2001).

O acoplamento de D1R com $G\alpha_{olf}$ no *striatum* também já está bem estabelecido (Hérve *et al.*, 1993; Zhuang *et al.*, 2000; Hervé *et al.*, 2001). Como Ric-8B é expresso nas mesmas regiões do cérebro em que D1R e $G\alpha_{olf}$ são expressos, é bastante sugestivo que essa proteína esteja envolvida na regulação da sinalização mediada por dopamina.

Através dos resultados de amplificação observados nos experimentos de expressão heteróloga de Ric-8B, conseguimos determinar o efeito de Ric-8B na via de amplificação de $G\alpha_{olf}$ por estimulação de receptor (β_2AR ou D1R). Essa atividade de Ric-8B é dependente da prévia estimulação do receptor e da presença de $G\alpha_{olf}$. Interessante notar que o efeito de Ric-8B é apenas observado quando o éxon 9 está presente, mostrando uma diferença funcional das duas variantes de *splicing* alternativo presentes em quantidades equivalentes no epitélio olfatório.

Um dos controles realizados foi determinar a expressão dessas duas formas de Ric-8B em HEK-293 por *Western blot* (dados não mostrados). Através desse ensaio, foi possível determinar a expressão equivalente das duas variantes e por isso a falta de amplificação observada nos ensaio com Ric-8B Δ 9 não foi devido a uma menor expressão dessa proteína no sistema heterólogo.

Esses dados reforçam a idéia de que Ric-8B é um provável GEF (*GTP Exchange Factor*) para $G\alpha_{olf}$, podendo propor o seguinte modelo: a partir da estimulação do receptor, haverá a dissociação de $G\alpha_{olf}$ “ativo” (GTP-ligado) da proteína G heterotrimérica. Através da atividade GTPásica intrínseca, $G\alpha_{olf}$ irá hidrolisar esse GTP, formando $G\alpha_{olf}$ “desligado” (GDP-ligado). Nesse momento, Ric-8B poderia se ligar à $G\alpha_{olf}$, promover a saída de GDP e consequente entrada de GTP, reativando o mesmo através da formação de $G\alpha_{olf}$ GTP-ligado. Esse mecanismo suplementar de ativação de $G\alpha_{olf}$ poderá promover o aumento da estimulação de efetores de $G\alpha_{olf}$, como a adenilil ciclase, provocando um consequente aumento de AMPc no sistema. Apesar de nossos dados suportarem tal modelo, a atividade de GEF para Ric-8B ainda precisa ser determinada por métodos bioquímicos.

Conforme já discutido, ainda não existe um sistema eficaz para expressão funcional de receptores olfatórios (ORs). Esta incapacidade de expressão funcional de ORs em sistema heterólogo reflete o pequeno número de ORs que tiveram seus ligantes determinados. Esses poucos exemplos, em torno de 35 ORs, de um repertório de 1000 ORs diferentes em camundongo, foram determinados através de ensaios *in vivo* ou utilizando sistemas heterólogos que se mostraram insuficientes para a expressão de um grande número de ORs, conforme apresentado em “Introdução, item (3-C)”. Recentemente, Saito e colaboradores propuseram um sistema em HEK293-T utilizando as proteínas RTPs. Essas proteínas, por promoverem a expressão de diversos ORs na membrana, foram indicadas com uma solução para a deficiente expressão de ORs em sistemas heterólogos.

Entretanto, de acordo com nossos dados, o uso das proteínas RTPs parece não ser suficiente para a detecção de aumento de AMPc para os ORs que testamos. O que estamos propondo com os nossos dados é a necessidade da amplificação do sinal de G α olf, via Ric-8B (Von Dannecker *et al.*, 2005), para a expressão funcional de ORs. O uso de Ric-8B pode ser necessário devido ao fato de que talvez os odores se liguem de maneira fraca e transiente aos ORs e que esse tipo de ligação gere o estímulo de um número pequeno de moléculas de G α olf. Essa hipótese está de acordo com Bhandawat e colaboradores (2005) que recentemente demonstraram que a estimulação de ORs é incapaz de promover ativação de um número grande de moléculas de G α olf. Dessa maneira, o uso de Ric-8B, através de amplificação do sinal de G α olf em sistema heterólogo, poderá permitir a expressão funcional receptores olfatórios através da melhora da atividade de G α olf ou mesmo pela melhora do acoplamento de G α olf com ORs.

Para testar tal hipótese, utilizamos Ric-8B no intuito de expressar funcionalmente três receptores olfatórios com ligantes conhecidos: mOR-EG, mOR-I7 e RhoS6. Para esses receptores, mostramos as condições de um sistema para detectar a resposta desses receptores aos seus respectivos ligantes. No caso do mOR-EG, mostramos que o uso de Ric-8B permite a expressão funcional do mesmo sem a necessidade do uso da fusão com o peptídeo Rho, um artifício

que permite o aumento de expressão do mOR-EG na membrana (Katada *et al.*, 2004). Mostramos também, que apesar do receptor RhoOR-EG responder ao odor eugenol e vanilina, o receptor mOR-EG responde somente ao odor eugenol e não responde ao odor vanilina. Esses dados demonstram que essa modificação no N-terminal do OR eugenol (peptídeo Rho) está causando alterações na especificidade do OR testado, e que a ligação do odor vanilina a esse receptor talvez possa ser um artefato devido a fusão com Rho. Nesse caso, é possível que *in vivo* o mOR-EG só responda ao eugenol e não a vanilina. Dessa forma, reforçamos a necessidade da expressão de ORs independente do uso da fusão dos ORs com o peptídeo Rho e, nesse caso, a co-expressão de Ric-8B e G α olf se mostrou essencial para compor tal sistema.

Testamos também o OR mOR-I7, que responde ao composto heptanal, com experimentos semelhantes aos realizados com mOR-EG. Os dados que obtivemos foram equivalentes aos que obtivemos para o mOR-EG. Foi possível detectar resposta ao composto heptanal apenas nas células co-transfectadas com G α olf, Ric-8B e mOR-I7 e não em um sistema co-transfectado com RTP-1 na ausência de Ric-8B. Dessa forma, podemos concluir que nosso sistema não só está funcionando para o mOR-EG mas também para outros ORs, como demonstrado para o mOR-I7.

Em um terceiro experimento, em que testamos a expressão funcional do OR-S6, não conseguimos estabelecer um sistema independente do uso de Rho. Talvez esse receptor seja mais retido no retículo endoplasmático do que os outros receptores testados ou que seu ligante, o ácido nonanedióico, se ligue de maneira mais fraca ao seu receptor. Nesses experimentos só foi possível detectar resposta ao receptor olfatório S-6 em células co-transfectadas com RhoS6, acrescidas de G α olf, Ric-8B e RTP-1. Apesar da pequena resposta obtida nesses ensaios, esta parece ser real visto que é sensível a diferentes concentrações de odores.

Apesar da necessidade de testar a funcionalidade desse sistema para um número maior de ORs, podemos concluir que para a composição de um sistema para expressão heteróloga de ORs em larga escala teremos que co-expressar G α olf e Ric-8B. Para alguns receptores, que se comportarem tal qual OR-S6,

talvez seja necessário o uso de Rho com acréscimo de co-expressão de RTPs (Von Dannecker *et al.*, 2006).

Interessante notar que RTP-1 só demonstrou função na expressão funcional de OR nesse último experimento, expressão de mOR-S6 em fusão com o peptídeo Rho. Como no trabalho original, onde os RTPs foram primeiramente clonados e a função de promover a expressão heteróloga de ORs foi determinada (Saito *et al.*, 2004), foram testados somente ORs em fusão com o peptídeo Rho, nossos dados permitem sugerir que as proteínas RTPs necessitam de Rho para promoverem a expressão de ORs. Conclusão semelhante foi recentemente reportada (Abaffy *et al.*, 2006), demonstrando que a expressão funcional de ORs, via co-expressão de RTPs, somente é realizada se o OR contiver o peptídeo Rho. Entretanto, como mostramos para o mOR-EG, o uso de Rho pode ocasionar mudanças indesejadas de especificidade.

Como mostramos que G α olf interage diretamente com Ric-8B, realizamos ensaios de imunofluorescência em sistema heterólogo e determinamos que G α olf e Ric-8B estão co-localizados na periferia de células HEK-293T. Determinamos também que a presença de Ric-8B, e não de Ric8B Δ 9 (forma que não interage com G α olf), aumenta em duas vezes o número de células que apresentam forte sinal para G α olf na região periférica, ao invés da expressão fraca e difusa observada nas células transfectadas apenas com G α olf.

Recentemente foi demonstrado que a proteína Ric-8 de *Drosophila* é importante para a expressão da subunidade G α e G β na membrana de células de inseto (David *et al.*, 2005, Hampoelz *et al.*, 2005). Nestes trabalhos, foi proposto que Ric-8 de *Drosophila* está funcionando como proteína chaperona, sendo essencial para a expressão dessas subunidades de proteína G na membrana plasmática. Desses resultados é possível entender melhor o papel de Ric-8B na melhora da expressão funcional de ORs que verificamos em nosso sistema heterólogo e sugerir a possibilidade de que Ric-8B, uma proteína que interage com G α olf, esteja promovendo a amplificação do acúmulo de AMPc devido a uma melhor expressão heteróloga de G α olf promovida por Ric-8B. Essa atuação de

Ric-8B não exclui o provável papel de GEF de Ric-8B, sendo possível que Ric-8B potencialize o sinal de $G\alpha_{olf}$ via esses dois mecanismos.

Assim, nossos resultados demonstram fortemente que o uso de Ric-8B em um sistema para a expressão de ORs em larga escala irá possibilitar a expressão funcional de diversos ORs, permitindo a identificação de seus respectivos ligantes. Tal análise irá contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de percepção dos odores.

(8) Conclusões

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto podem ser resumidos nas seguintes conclusões:

- Entre Ric-8B e Ric-8A existem 9 regiões com identidade de aminoácido de 58-90%. Tal fato indica que Ric-8B possa ter a mesma atividade de GEF proposta para Ric-8A.
- Ric-8B é uma proteína que interage com $G\alpha_{olf}$ em sistema de duplo-híbrido, sendo essa interação dependente da presença do éxon 9.
- Através de ensaios de *Northern blot* e RT-PCR determinamos que Ric-8B, assim como $G\alpha_{olf}$, é preferencialmente expressa no epitélio olfatório. As duas isoformas encontradas para Ric-8B parecem ser expressas em quantidades semelhantes no epitélio olfatório.
- Através de ensaios de hibridização *in situ*, determinamos que o perfil de expressão de $G\alpha_{olf}$ e de Ric-8B é semelhante, sendo ambos expressos no epitélio olfatório, nos neurônios olfatórios maduros, e em algumas regiões específicas do cérebro. Tais resultados indicam fortemente que Ric-8B participa da via de transdução de $G\alpha_{olf}$ e não de $G\alpha_s$, como inicialmente proposto por Tall *et al.*, 2003.
- Em sistema heterólogo, Ric-8B é capaz de promover aumento de AMPc dependente da presença de $G\alpha_{olf}$ e da prévia ativação do receptor. Tal resultado é compatível com a hipótese de que Ric-8B é um GEF para a via de transdução de odores.
- Ric-8B é capaz de promover a expressão funcional de receptores olfatórios. Para alguns ORs essa expressão pode ser independente do uso da proteína RTP-1 e do uso da construção de OR em fusão com o peptídeo Rho.
- Ric-8B é capaz de melhorar a expressão de $G\alpha_{olf}$ na periferia celular em sistema heterólogo. Tal fato sugere que a promoção da expressão funcional de ORs é devido a melhora do acoplamento de $G\alpha_{olf}$ com ORs. Tal hipótese não exclui a possibilidade de que Ric-8B seja um GEF, podendo estar ocorrendo a expressão funcional de ORs devido a esses dois mecanismos.
- Por fim, nossos resultados demonstraram que o uso de Ric-8B em um sistema para a expressão de ORs em larga escala irá possibilitar a expressão funcional de diversos ORs, permitindo a identificação de seus respectivos ligantes.

(9) Referências

- Abaffy T, Matsunami H, Luetje CW. (2006) Functional analysis of a mammalian odorant receptor subfamily. *J Neurochem.* 97(5):1506-18.
- Afshar K, Willard FS, Colombo K, Siderovski DP, Gonczy P. (2005) Cortical localization of the G α protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development.* (20):4449-59.
- Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20: 69-81.
- Berghard A, Buck LB, Liman ER (1996) Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2365-2369.
- Bhandawat V, Reisert J, Yau KW. (2005) Elementary response of olfactory receptor neurons to odors. *Science.* 308(5730):1931-4.
- Boekhoff I, Breer H (1992) Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 471-474.
- Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H (1990) Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odors. *EMBO J* 9: 2453-2458.
- Borisy F, Ronnet G, Cunningham A, Juilfs D, Beavo J, Snyder S (1992) Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 12: 915-923.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci.* 22(8):3033-43.
- Breer H, Boekhoff I, Tareilus E (1990) Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 345: 65-68.
- Brunet LJ, Gold GH, Ngai J (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17: 681-693.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
- Buck LB (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci.* 19:517-44.
- Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. *Methods in Yeasts Genetics.* 2000 edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York), 2000.
- Chen TY, Yau KW (1994) Direct modulation by Ca²⁺-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* 368: 545-548.
- Corvol JC, Studler JM, Schonn JS, Girault JA, Herve D. (2001) G α (olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem.* 2001 Mar;76(5):1585-8.
- Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq α to that of Gi α . *Nature.* 363(6426):274-6.

Couwenbergs C, Spilker AC, Gotta M. (2004) Control of embryonic spindle positioning and Galphai activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr Biol.* 14(20):1871-6.

David NB, Martin CA, Segalen M, Rosenfeld F, Schweisguth F, Bellaiche Y. (2005) *Drosophila* Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol.* (11):1083-90.

Dratz EA, Furstenau JE, Lambert CG, Thireault DL, Rarick H, Schepers T, Pakhlevaniants S, Hamm HE. (1993) NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide. *Nature.* 363(6426):276-81

Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R, Jaenisch R. (2004) Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature.* 428(6978):44-9.

Finley Jr and R Brent (1994) Interaction Mating Reveals Binary and Ternary Connections Between *Drosophila* Cell Cycle Regulators *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 12980-12984.

Firestein S (2001) How the olfactory system makes scents of scents. *Nature* 413: 211-218.

Firestein S (2004) A code in the nose. *Sci STKE.* 2004(227):15.

Gaillard I, Rouquier S, Pin JP, Mollard P, Richard S, Barnabe C, Demaille J, Giorgi D (2002) A single olfactory receptor specifically binds a set of odorant molecules. *Eur J Neurosci.* 15(3):409-18.

Godfrey PA, Malnic B, Buck LB (2004) The mouse olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):2156-61.

Golemis E, Serebriiskii I, Finley R, Kolonin M, Gyuris J, Brent R (1999) Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. In: *Current protocols in molecular biology*, pp 20.1.1-20.1.40. New York: Wiley.

Hague C, Uberti MA, Chen Z, Bush CF, Jones SV, Ressler KJ, Hall RA, Minneman KP. (2004) Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(37):13672-6.

Hamm HE, Deretic D, Arendt A, Hargrave PA, Koenig B, Hofmann KP. (1988) Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science.* 241(4867):832-5.

Hampoelz B, Hoeller O, Bowman SK, Dunican D, Knoblich JA. (2005) *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol.* (11):1099-105.

Hervé D, Le Moine C, Corvol JC, Belluscio L, Ledent C, Fienberg AA, Jaber M, Studler JM, Girault JA (2001) G_{olf} levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J Neurosci* 21: 4390-4399.

Hervé D, Lévi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin J-P, Glowinski J, Girault JA (1993) G_{olf} and G_s in rat basal ganglia: possible involvement of G_{olf} in the coupling of dopamine D_1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* 13: 2237-2248.

Hess HA, Roper JC, Grill SW, Koelle MR. (2004) RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*. *Cell.* 119(2):209-18.

Jones DT, Masters SB, Bourne HR, Reed RR (1990) Biochemical characterization of three stimulatory GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 265: 2671-2676.

Jones DT, Reed RR (1989) Golf: an olfactory neuron-specific G-protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244: 790-795.

Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, Touhara K. (2001) Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci.* 21(16):6018-25.

Katada S, Tanaka M, Touhara K. (2004) Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor. *J Neurochem.* 90(6):1453-63.

Klattenhoff C, Montecino M, Soto X, Guzmán L, Romo X, García MLA, Mellstrom B, Naranjo JR, Hinrichs MV, Olate J (2003) Human brain synembryon interacts with Gs and Gq and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J Cell Physiol* 195: 151-157.

Krautwurst D, Yau KW, Reed RR. (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell.*95(7):917-26.

Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB (2000) Adenosine A_{2A} receptors are colocalized with and activate G_{olf} in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58: 771-777.

Kurahashi T, Menini A (1997) Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 385: 725-729.

Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. (1970) Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol.*49(1):99-113.

Lambright, DG, Sondek, J, Bohm, A, Skiba, NP, Hamm HE, Singler PB. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* (379):311-319.

Lee CJ, Irizarry K. (2003) Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation. *Biol Psychiatry.* 54(8):771-6.

Levasseur G, Persuy MA, Grebert D, Remy JJ, Salesse R, Pajot-Augy E (2003) Ligand-specific dose-response of heterologously expressed olfactory receptors. *Eur J Biochem.* 270(13):2905-12

Liu H-Y, Wenzel-Seifert K, Seifert R (2001) The olfactory G-protein G_{olf} possesses a lower GDP-affinity and deactivates more rapidly than G_sshort: consequences for receptor-coupling and adenylyl cyclase activation. *J Neurochem* 78: 325-338.

Lu M, Echeverri F, Moyer BD. (2003) Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic.* 4(6):416-33.

Malnic B, Godfrey PA, Buck LB (2004) The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101(8):2584-9.

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell.*96(5):713-23.

Maniatis, T., *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Pag (7.49). 2° edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Masters SB, Sullivan KA, Miller RT, Beiderman B, Lopez NG, Ramachandran J, Bourne HR. (1988) Carboxyl terminal domain of Gs alpha specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. *Science*. 241(4864):448-51.

Matsuzaki F. (2005) Drosophila G-protein signalling: intricate roles for Ric-8? *Nat Cell Biol*. (11):1047-9.

Menco BP, Tekula FD, Farbman AI, Danho W. R. (1994) Developmental expression of G-proteins and adenylyl cyclase in peripheral olfactory systems. Light microscopic and freeze-substitution electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurocytol*.(11):708-27.

Miller KG, Emerson MD, McManus JR, Rand JB (2000-a) RIC-8 (Synembrin): a novel conserved protein that is required for Gq signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 27: 289-299.

Miller KG, Rand JB (2000-b) A role for RIC-8 (Synembrin) and GOA-1 (Go in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156: 1649-1660.

Modrek B, Lee C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*. (1):13-9.

Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*. 29(13):2850-9

Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5: 263-278.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 87(4):675-86.

Munger SD, Lane AP, Zhong H, Leinders-Zufall T, Yau KW, Zufall F, Reed RR (2001) Central role of the CNG4 channel subunit in Ca^{2+} -calmodulin-dependent odor adaptation. *Science* 294: 2172-2175.

Murrell JR, Hunter DD (1999) An olfactory sensory neuron line, odora, properly targets olfactory proteins and responds to odorants. *J Neurosci*.19(19):8260-70.

Nakamura T (2000) Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.126:17-32.

Paxinos, G., Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. 4 edition, Academic Press (San Diego), 1998.

Peppel K, Boekhoff I, McDonald P, Breer H, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1997) G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J Biol Chem*. 272(41):25425-8.

Prinster SC, Hague C, Hall RA (2005) Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*. 57(3):289-98.

Rasenick MM, Watanabe M, Lazarevic MB, Hatta S, Hamm HE. (1994) Synthetic peptides as probes for G protein function. Carboxyl-terminal G alpha s peptides mimic Gs and evoke high affinity agonist binding to beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 269(34):21519-25.

Rens-Domiano S, Hamm HE. (1995) Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*.1059-66.

- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*. 73(3):597-609.
- Ronnett GV, Moon C (2002) G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol*. 64:189-222.
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*. 119(5):679-91.
- Schade MA, Reynolds NK, Dollins CM, Miller KG. (2004) Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans* ric-8 (synembryn) mutants activate the G alpha(s) pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. *Genetics*. 169(2):631-49.
- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and culture cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100: 431-440.
- Shirokova E, Schmiedeberg K, Bedner P, Niessen H, Willecke K, Raguse JD, Meyerhof W, Krautwurst D. (2005) Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem*. 280(12):11807-15.
- Sinnarajah S, Dessauer CW, Srikumar D, Chen J, Yuen J, Yilma S, Dennis JC, Morrison EE, Vodyanoy V, Kehrl JH (2001) RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409: 1051-1055.
- Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H (2003) Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 299(5615):2054-8.
- Tall GG, Krumins AM, Gilman AG (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278: 8356-8362.
- Touhara K, Sengoku S, Inaki K, Tsuboi A, Hirono J, Sato T, Sakano H, Haga T (1999) Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(7):4040-5.
- Vaiskunaite R, Kozasa T, Voyno-Yasenetskaya TA. (2001) Interaction between the G alpha subunit of heterotrimeric G(12) protein and Hsp90 is required for G alpha(12) signaling. *J Biol Chem*. 276(49):46088-93.
- Vassar R, Ngai J, Axel R (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*. 74(2):309-18.
- Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. *J Neurosci*. 25(15):3793-800.
- Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. (2006) Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(24):9310-14.
- Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*. 93(1):47-60.
- Wang H, Ng KH, Qian H, Siderovski DP, Chia W, Yu F. (2005) Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol*. (11):1091-8.

Wei J, Zhao AZ, Chan GCK, Baker LP, Impey S, Beavo JA, Storm DR (1998) Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21: 495-504.

Wetzel CH, Oles M, Wellerdieck C, Kuczkowiak M, Gisselmann G, Hatt H. (1999) Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci.* 19(17):7426-33.

Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GCK, Lowe G, Gaggar A, Xia Z, Gold GH, Storm DR (2000) Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27: 487-497.

Xu L, Gonzalez-Agosti C, Beauchamp R, Pinney D, Sterner C, Ramesh V (1998) Analysis of molecular domains of epitope-tagged merlin isoforms in Cos-7 cells and primary rat Schwann cells. *Exp Cell Res.* 238(1):231-40.

Xu Q, Modrek B, Lee C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30(17):3754-66.

Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, Firestein S. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science.* 279(5348):237-42.

Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) G_{olf} mediates dopamine D₁ receptor signaling. *J Neurosci* 20: RC91(1-5).

Zigman JM, Westermarck GT, LaMendola J, Boel E, Steiner DF. (1993) Human G(olf) alpha: complementary deoxyribonucleic acid structure and expression in pancreatic islets and other tissues outside the olfactory neuroepithelium and central nervous system. *Endocrinology.* 133(6):2508-14.

Zou Z, Li F, Buck LB (2005) Odor maps in the olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(21):7724-9.

Zufall F, Leinders-Zufall T (2000) The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses* 25: 473-481

(10) Anexo-I: Publicações

#1

Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f. J Neurosci.25(15):3793-800.

#2

Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. (2006) Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(24):9310-14.