UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DANIEL SHIKANAI KERR

**RIC-8B, uma GEF putativa do sistema olfatório,
interage com G α olf, G β 1 e G γ 13**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/10/2008

DANIEL SHIKANAI KERR

**RIC-8B, uma GEF putativa do sistema olfatório,
interage com G α olf, G β 1 e G γ 13**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
(Bioquímica).

Orientadora: Prof. Dra. Bettina Malnic

São Paulo

2008

Daniel Shikanai Kerr

RIC-8B, uma GEF putativa do sistema olfatório, interage com G α olf, G β 1 e G γ 13

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À Alice e Victor. Muito obrigado por esperarem.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família.

À minha orientadora Profa. Dra Bettina Malnic,

Aos meus colegas de laboratório, Luiz, Jussara, Adriana, Pedro, Marcela, Guilherme, Daniela, Lúcia, Isaias, Eduardo, Luciana e Thiago.

Aos técnicos Érica e Edson.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar meu doutorado.

À FAPESP e CAPES pelo financiamento.

RESUMO

Kerr, D.S. **RIC-8B, uma GEF putativa do sistema olfatório, interage com G α olf, G β 1 e G γ 13.** 2008. 86p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O sistema olfatório de mamíferos é capaz de detectar milhares de substâncias químicas diferentes, mesmo em baixas concentrações. Um odorante disperso no ar pode se ligar a um receptor olfatório (OR) iniciando o processo de detecção. Os ORs são membros da super família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Apesar de a via de transdução de sinal de odorantes estar bem descrita, pouco se sabe sobre os seus moduladores. Em 2005, nosso laboratório identificou RIC-8B como um possível fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF) que poderia amplificar a atividade da proteína G olfatória (Golf). No presente trabalho mostramos que RIC-8B é capaz de interagir com G γ 13. Procurando os outros componentes desse complexo identificamos G β 1 como sendo a subunidade G β mais expressa no epitélio olfatório. Além disso, RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13 encontram-se concentrados nos cílios dos neurônios olfatórios e se co-localizam nesse compartimento celular. Nossos experimentos de co-imunoprecipitação mostram que RIC-8B interage mais fortemente com G α olf, na presença de GDP do que na presença de GTP, como esperado para uma GEF. Curiosamente quando G β 1 e G γ 13 estão presentes, RIC-8B e G α olf co-imunoprecipitam igual, independente do nucleotídeo de guanina utilizado. Apesar de, na presença de G β 1 e G γ 13, não observarmos dissociação física de RIC-8B e G α olf com a mudança do estado de ativação, o efeito de RIC-8B na produção de AMPc não é afetada. Também mostramos que a quantidade de G α olf, G β 1 e G γ 13 presentes na membrana celular

aumenta quando estas são co-transfectadas com RIC-8B em células de mamíferos. Nossos resultados apontam para um papel duplo da RIC-8B. Primeiro, RIC-8B poderia funcionar como uma chaperona auxiliando na formação e transporte do complexo heterotrimérico, Golf, em neurônios olfatórios. Em segundo lugar, RIC-8B também atuaria como uma GEF sobre $G\alpha_{olf}$, aumentando a produção de AMPc e portanto amplificando a via de transdução de sinal de odorantes. Por fim, acreditamos que um possível papel para $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ nesse complexo seria funcionar como um andaime molecular, aproximando RIC-8B de seu alvo, $G\alpha_{olf}$, potencializando ainda mais a atividade de GEF.

Palavras chaves: GPCR, GEF, RIC-8B, sistema olfatório.

ABSTRACT

Kerr, D.S. **RIC-8B, a putative GEF of the olfactory system, interacts with G α olf, G β 1 e G γ 13.** 2008. 86p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The mammalian olfactory system detects small amounts of thousands of different chemical compounds. Odorant perception starts when an odorant in the air binds to an olfactory receptor (OR). ORs belong to the super family of G-protein coupled receptors (GPCRs). Even though the odorant signaling pathway is well known, little is known about its modulators. In 2005, our lab identified RIC-8B as a putative guanine nucleotide exchange factor (GEF) that is able to interact with the olfactory G-protein (Golf) and amplify its activity. Here we show that RIC-8B also interacts with G γ 13. We also found that G β 1 is the G β subunit that is predominantly expressed in the olfactory epithelium. Furthermore, RIC-8B, G α olf, G β 1 and G γ 13 are highly concentrated in the cilia of olfactory neurons and co-localize in this cellular compartment. We also show that RIC-8B interaction with G α olf is stronger in the presence of GDP than GTP, as expected for a GEF. Curiously, in the presence of G β 1 and G γ 13, RIC-8B and G α olf remain associated, in the presence of both GDP or GTP, probably through an indirect interaction via G β 1/G γ 13. We also showed that the amounts of G α olf, G β 1 and G γ 13 in the cell membrane increase if RIC-8B is co-transfected in the same cell. Our results suggest that RIC-8B plays two roles. First, it may act as a chaperone which assists in the assembly and trafficking of the G protein complex. Second, RIC-8B would also act as a GEF to increase G α olf dependent cAMP production and thereby amplify odorant signal transduction. Lastly, we believe

that G β 1 and G γ 13 may act as a scaffold to position RIC-8B close to its target, G α olf, further enhancing the GEF activity.

Keywords: GPCR, GEF, RIC-8B, olfactory system.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
1.1 – Sistema olfatório	11
1.2 – Receptor acoplado à proteína G (GPCR)	14
1.3 – RIC-8B	17
2 – OBJETIVO	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 – Duplo-híbrido	22
3.1.1 – Caracterização da isca	24
3.1.2 – Varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo	26
3.1.3 – Avaliação das mensagens obtidas	27
3.1.4 – Leveduras	28
3.1.5 – Vetores	28
3.2 – RT-PCR	30
3.3 – Hibridização <i>in situ</i>	30
3.4 – <i>Western Blot</i>	32
3.4.1 – SDS-PAGE Tris Glicina	33
3.4.2 – SDS-PAGE Tris Tricina	33
3.5 – Anticorpo contra RIC-8B	33
3.5.1 – Caracterização do anticorpo	34
3.5.2 – Purificação por afinidade	35
3.6 – Imunohistoquímica de epitélio olfatório	36
3.7 – Ensaio de <i>Pull down</i>	37
3.8 – Co-imunoprecipitação	38
3.9 – Preparação de Membranas de HEK293T	39
3.10 - Ensaio de medida de AMPc	40
4 – RESULTADOS	41
4.1 – Avaliação de possíveis interações de RIC-8B em neurônios olfatórios	41
4.1.1 – Construção das iscas	41
4.1.2 – Caracterização das iscas	41
4.1.3 – Varredura da biblioteca de epitélio olfatório com a isca Ric-8BΔ9	45

4.2 – Uma subunidade G β para os neurônios olfatórios	48
4.3 – Anticorpo contra-RIC-8B	49
4.4 – Localização de RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13	53
4.5 – Interações entre RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13	56
5 – DISCUSSÃO	62
BIBLIOGRAFIA	75
LISTA DE ANEXOS	82
ANEXO I: Súmula Curricular	83
ANEXO II: Publicações resultantes deste trabalho	86

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Sistema olfatório

A capacidade de perceber o ambiente é de extrema importância na sobrevivência dos seres vivos. Se considerarmos os sentidos ditos principais dos mamíferos, somos capazes de detectar radiação eletromagnética (visão), estímulos mecânicos no ar (audição) ou de contato (tato) e substâncias químicas diversas (olfato e paladar). Cada um desses sistemas possui características únicas que permitem codificar os estímulos externos. O sistema olfatório dos mamíferos é capaz de distinguir entre milhares de odorantes diferentes presentes em pequenas quantidades no ar. Para se ter uma idéia, estima-se que o homem, que é considerado como tendo um olfato ruim entre os mamíferos, seja capaz de perceber 10000 odores distintos.

O início da olfação ocorre no epitélio olfatório, localizado no recesso posterior da cavidade nasal. O epitélio olfatório é composto de três tipos celulares, neurônios sensoriais olfatórios, células de suporte e células basais, que dão origem a novos neurônios olfatórios. Um odorante disperso no ar entra em contato com receptores presentes nos neurônios sensoriais olfatórios levando a despolarização desse neurônio. O axônio do neurônio olfatório faz sinapse com neurônios do bulbo olfatório e dali saem projeções para regiões corticais e sub-corticais onde ocorrerá o processamento dessa informação pelo cérebro (Figura 1).

Os receptores olfatórios (OR) são responsáveis pela primeira interação de odorantes com a célula e pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que foi descrita por Buck e Axel (1991). Essa é uma das

maiores famílias de GPCRs conhecida hoje, com aproximadamente 1200 genes descritos em camundongos e 400 em humanos (Ache & Young, 2005; Godfrey *et al.*, 2004; Malnic *et al.*, 2004).

Estudos de hibridização *in situ* permitiram o mapeamento do epitélio olfatório de camundongo em quatro zonas distintas de expressão de ORs, sendo esta considerada a primeira organização do sistema olfatório (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993). Estes mesmos estudos estimaram que apenas 0.1% dos neurônios olfatórios expressavam um dado OR. Considerando os aproximadamente 1000 ORs diferentes para camundongos, esses resultados indicaram que cada neurônio olfatório deveria expressar um único tipo de OR. Essa hipótese foi confirmada utilizando RT-PCR de um único neurônio olfatório (Malnic *et al.*, 1999).

Os mecanismos que regulam a expressão de um único OR por neurônio olfatório ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que os genes dos ORs não sofrem rearranjo gênico (Eggen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Serizawa *et al.*, 2004). Para a expressão de alguns receptores são necessárias regiões cromossômicas reguladoras (Lomvardas *et al.*, 2006). Caso algum neurônio expresse um receptor não funcional, pode ocorrer a troca do mesmo, sendo que a atividade do receptor é importante para a sua manutenção (Shykind *et al.*, 2004).

Estudos da projeção axonal dos neurônios olfatórios resultaram na surpreendente descoberta de que neurônios que expressavam o mesmo OR, apesar de distribuídos ao acaso dentro de uma das quatro zonas do epitélio olfatório, sempre convergiam para um mesmo ponto no bulbo olfatório (Mombaerts *et al.*, 1996; Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994). Estes pontos são os glomérulos do bulbo olfatório, local onde ocorre a sinapse dos axônios dos neurônios olfatórios com outros neurônios chamados de células mitraes. A análise da localização desses

glomérulos mostrou que eles apresentam posições idênticas em indivíduos de uma mesma espécie, indicando que existe um mapa topográfico no bulbo olfatório, onde todos os ORs estão representados.

É interessante notar que os receptores olfatórios estão expressos tanto nos dendritos quanto nos axônios dos neurônios sensoriais olfatórios (Feinstein & Mombaerts, 2004). Mostrou-se também que a atividade de um receptor, bem como a quantidade de AMPc, são importantes para o direcionamento correto de um neurônio para o bulbo. Indicando que além do seu papel no reconhecimento de odorantes os ORs devem ter uma participação na determinação da organização descrita acima.

Um odorante pode se ligar a mais de um OR e um OR pode reconhecer odorantes diferentes (Malnic *et al.*, 1999), a somatória dessas interações, sua primeira integração no bulbo olfatório e por fim a interpretação dessa informação em regiões corticais é que resultará na resposta do organismo a um determinado cheiro. Pequenas modificações na estrutura molecular de um odorante ou mesmo na sua concentração podem alterar completamente a percepção do mesmo pelo organismo. Mas como ocorre a sinalização celular após a ligação odorante-receptor?

Para respondermos a essa pergunta primeiro temos que entender o que é um GPCR e como se dá a sinalização celular por esse receptor.

1.2 – Receptor acoplado à proteína G (GPCR)

Os GPCRs são uma grande família de proteínas de membrana formadas por uma única cadeia polipeptídica que atravessa sete vezes a membrana plasmática, alternando alças internas e externas entre cada domínio transmembranar. Esses

receptores possuem grande diversidade funcional e suas ações se dão pela ativação de proteínas G (G se refere à dependência de nucleotídeo de guanina).

As proteínas G são heterotrímeros, suas três subunidades são denominadas α ($G\alpha$), β ($G\beta$) e γ ($G\gamma$). As subunidades $G\beta$ e $G\gamma$ apresentam-se fortemente associadas de forma não covalente. Um mesmo dímero $G\beta\gamma$ pode se associar à diferentes subunidades $G\alpha$, por esse motivo a identidade de uma proteína G é dada por sua subunidade $G\alpha$.

Como é o processo de sinalização celular propriamente dito? Quando um ligante se liga ao GPCR este ativa a proteína G levando à troca de um GDP por um GTP na subunidade α , esse complexo $G\alpha$ -GTP se dissocia das subunidades $G\beta\gamma$ e se associa a um de diferentes efetadores para a produção de segundos mensageiros. Em seguida, a subunidade $G\alpha$ hidrolisa o GTP a GDP, se desativando e reassociando com $G\beta\gamma$.

Alguns mecanismos efetadores conhecidos dessa via são, a associação da $G\alpha$ com adenilil ciclase aumentando ($G\alpha_s$) ou diminuindo ($G\alpha_i$) a produção de AMPc e com fosfolipase C produzindo inositol-1,4,5-trisfosfato e diacilglicerol ($G\alpha_q$). Diferentes subunidades $G\alpha$, suas funções conhecidas e sua localização celular estão resumidas na Tabela 1.

A via descrita acima ainda pode ser modulada por outros mecanismos. Por exemplo, muitas GPCR quinases respondem ao segundo mensageiro gerado, fosforilando e levando a dessensibilização do receptor (Kozasa,2004). A inativação pela hidrólise de GTP é facilitada por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que aumentam a capacidade hidrolítica da subunidade α (Ishii &Kurachi,2003). A ativação de proteína G pela troca de GDP por GTP pode ser estimulada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) (Cherfils &Chardin,1999).

Tabela 1. Características das subunidades G α de mamíferos

Subunidade G α	Tamanho (kD)	Efeitos	Distribuição
Classe Gs			
G α_s (short-long)	45;52	↑ Adenilil ciclase e regulação de canais de Ca ²⁺	Ubíqua
G α_{olf}			Neurônios olfatórios
Classe Gi			
G α_i 1-3	40-41	↓ Adenilil ciclase	Ubíqua
G α_o 1-2	39	Canais de Ca ²⁺	Neural e endócrina
G α_i 1-2	39-40	↑ cGMP-fosfodiesterase	Retina
G α_{gust}	41	↑ cGMP-fosfodiesterase	Papilas gustativas
G α_z	41	↓ Adenilil ciclase; ↓ canais de K ⁺ ; crescimento celular	Neural e plaquetas
Classe Gq			
G α_q	41-43	↑ Fosfolipase C β	Ubíqua
G α_{11}			Ubíqua
G α_{14}			Fígado, pulmão, rins
G α_{15}			Células do sangue
G α_{16}			
Classe Gα_{12}			
G α_{12}	44	Na ⁺ , crescimento celular	Ubíqua
G α_{13}			

Adaptado de (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999)

O epitélio olfatório possui uma proteína G característica (G $_{olf}$). Quando ocorre a ligação do odorante aos receptores olfatórios, essa G $_{olf}$ é ativada. A subunidade α (G $_{\alpha_{olf}}$) ligada a GTP por sua vez ativará a adenilil ciclase III produzindo AMPc. O aumento de AMPc leva à abertura de canais iônicos dependentes de AMPc, proporcionando a entrada de Ca²⁺ e Na⁺ na célula e conseqüente formação de um potencial de ação (Figura 2).

Em experimento anterior a $G\alpha_{olf}$ foi utilizada para estudar os mecanismos envolvidos nessa via de sinalização intracelular. Procurando por proteínas que interagissem com a $G\alpha_{olf}$ utilizamos a mesma como isca para a técnica do duplo híbrido, que explicaremos em detalhe adiante. Encontramos nessa busca uma proteína muito interessante, a RIC-8B (Von Dannecker *et al.*,2005).

1.3 – RIC-8B

Miller e colaboradores (1999) identificaram diversos mutantes de *C. elegans* que eram resistentes aos efeitos tóxicos de inibidores da colinesterase. Essa busca tinha por objetivo localizar proteínas que modulassem a transmissão sináptica. As proteínas encontradas dessa maneira foram denominadas de Resistentes a Inibidores de Colinesterase (RIC) e entre elas estava a RIC-8.

No ano seguinte o mesmo grupo publicou dois trabalhos tendo como tema principal a RIC-8, demonstrando o possível papel desta proteína no processo da transmissão sináptica (Miller *et al.*,2000) e embriogênese (Miller & Rand,2000) em *C.elegans*. Por estes dois aspectos, RIC-8 foi também designada como *Synembryn*.

No primeiro trabalho RIC-8 foi localizada por imunohistoquímica no citoplasma de neurônios (Miller *et al.*,2000). Além disso, a análise do fenótipo de mutantes com perda, ou redução, de função para RIC-8 indicavam sua participação na liberação de acetilcolina por uma via envolvendo $G\alpha_o$ e $G\alpha_q$. A interação de RIC-8 com $G\alpha$ foi mostrada também como sendo essencial para a determinação do plano de clivagem em embriões de *C.elegans* (Afshar *et al.*,2004).

Homólogos da RIC-8 foram identificados em mamíferos utilizando a metodologia de duplo-híbrido. Tall e colaboradores (2003) utilizaram $G\alpha_s$ e $G\alpha_o$ como iscas na varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro de rato. Duas isoformas de RIC-8 foram identificadas e denominadas RIC-8A e RIC-8B. Nesse mesmo trabalho mostrou-se que a RIC-8A interage com diferentes tipos de $G\alpha$ e parece atuar como uma GEF: a RIC-8A estimula troca de GDP por GTP na subunidade α aumentando a ativação da proteína G. Este processo se dá em várias etapas. Primeiro a RIC-8A se liga a um complexo $G\alpha$ -GDP, o GDP se dissocia formando $G\alpha$ -RIC-8A. Este intermediário é rapidamente desfeito pela ligação de GTP à $G\alpha$. Esse mecanismo parece ser bastante conservado nas GEFs (Cherfils & Chardin,1999).

O mecanismo de interação da RIC-8B com $G\alpha$ ainda não foi determinado. Entretanto espera-se que tenha função semelhante à RIC-8A, pois, apesar da identidade na sequência de aminoácido entre estas duas proteínas ser de aproximados 44%, elas apresentam domínios bastante conservados ao longo de sua sequência, domínios estes anotados como “domínios de sinembrina” e conservados em diferentes organismos (Von Dannecker *et al.*,2005).

Homólogos da RIC-8B já foram identificados em humanos também. Klattenhoff e colaboradores (2003) utilizaram uma $G\alpha_{s\text{short}}$ como isca para a técnica

do duplo híbrido, na varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano. Além de identificar uma RIC-8B humana o trabalho também mostrou que, apesar de ser uma proteína citoplasmática, a RIC-8B pode ser translocada para a membrana plasmática em resposta à estimulação de $G\alpha_s$ e $G\alpha_q$.

Nosso laboratório identificou a RIC-8B no epitélio olfatório de camundongos (Von Dannecker *et al.*,2005). Procurando por proteínas envolvidas na transdução de sinal em neurônios olfatórios, a $G\alpha_{olf}$ foi utilizada como isca para a técnica de duplo híbrido em uma biblioteca de epitélio olfatório de camundongo. Foram encontradas duas isoformas da RIC-8B. O sequenciamento das duas isoformas mostrou que elas diferiam entre si somente pela presença do exon 9, denominamos o produto de *splicing* alternativo (sem o exon 9) de RIC-8B Δ 9.

Ensaio de hibridização *in situ* mostraram que a RIC-8B é expressa no epitélio olfatório e em algumas regiões do cérebro de maneira co-localizada com $G\alpha_{olf}$. É interessante notar que a RIC-8B parece interagir com $G\alpha_s$ (Tall *et al.*,2003), mas nossos resultados de hibridização *in situ* mostram uma forte co-localização com $G\alpha_{olf}$. Enquanto RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ estão expressos nos neurônios sensoriais maduros do epitélio olfatório, estriado (*caudate-putamen*), núcleo acumbens, tubérculo olfatório e córtex piriforme, $G\alpha_s$ foi localizada nas células basais do epitélio olfatório e está ausente nas regiões cerebrais onde $G\alpha_{olf}$ é expressa.

Os estudos até o presente momento apontam para duas possíveis funções da RIC-8B. Primeiro, assim como RIC-8A, RIC-8B atuaria como uma GEF. RIC-8B apresenta semelhança de sequência e domínios com RIC-8A, que já foi demonstrada como GEF. Além disso, foi mostrado que em sistema heterólogo a presença de RIC-8B pode amplificar a produção de AMPc mediada por $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker *et al.*,2005). Um segundo possível papel é o de auxiliar no direcionamento das

proteínas da transdução de sinal para a membrana da célula. Já foi visto que a co-transfecção com RIC-8B aumenta a quantidade de $G\alpha_{olf}$ na membrana de células HEK293T (Von Dannecker *et al.*, 2006). Homólogos de RIC-8B são importantes no direcionamento de subunidades da proteína G em *Drosophila* e *C. elegans*.

2 – OBJETIVO

Tivemos por objetivo nesse trabalho, aprofundar o conhecimento do papel de RIC-8B no epitélio olfatório de camundongos. Para tanto, decidimos avaliar e caracterizar as interações de RIC-8B com outras proteínas do sistema olfatório. Também procuramos identificar o padrão de expressão de cada proteína, dando suporte a possíveis atuações de RIC-8B *in vivo*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Duplo-híbrido

Utilizamos o sistema de duplo híbrido em leveduras para avaliar interações das duas isoformas da RIC-8B com outras proteínas. Uma grande vantagem deste sistema é a possibilidade de poder detectar interações protéicas *in vivo* e, portanto, as proteínas podem ser testadas em conformações semelhantes às suas conformações nativas. Merece atenção também a grande sensibilidade deste método, permitindo detectar interações protéicas de Kd menores que 10^{-6} M (Golemis et al.,1996).

Esta tecnologia está baseada em estudos das propriedades dos fatores de transcrição de eucariotos. Observou-se que estes fatores são compostos de dois domínios independentes, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação. Esses domínios podem ser separados, no entanto, para que o fator de transcrição apresente atividade é necessário que os dois estejam próximos na altura do promotor do gene de interesse. Baseando-se nesses fatos uma nova tecnologia para o estudo da interação proteína-proteína foi desenvolvida (Fields & Sternglanz, 1994).

A Figura 3 mostra uma representação esquemática do princípio da técnica:

O sistema de duplo híbrido que foi utilizado, “DupLEX-A™” (OriGene Technologies, Inc., <http://www.origene.com>), fornece alguns vetores para a clonagem de proteínas de potencial interesse, sendo que a co-expressão destas no núcleo da levedura nos informa sobre uma possível interação entre as mesmas. Em nosso trabalho, utilizamos uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo construída pela Dra. Adriana Mercadante em nosso laboratório. Nesta biblioteca, os cDNAs foram clonados no vetor pJG4-5 e transformadas na cepa de levedura EGY48.

A proteína a ser usada como isca é clonada no vetor pGilda e transformada na cepa de levedura RFY206. As cepas EGY48 e RFY206 são capazes de se juntar e formar diplóides, possibilitando avaliar a interação entre as proteínas.

É importante avaliar a adequação da isca escolhida antes de realizar a varredura da biblioteca, para tanto 3 ensaios para a caracterização da isca são feitos, expressão, repressão e auto-ativação. Em resumo, é preciso saber se a isca

construída está sendo expressa, se é capaz de se translocar para o núcleo da levedura e se ela por si só não é capaz de ativar o gene repórter.

3.1.1 – Caracterização da isca

Expressão

Colônias isoladas de RFY206 contendo a isca no pGilda são crescidas por 16h a 30°C no meio seletivo (SD-glicose - ura -his). Essas culturas saturadas são então diluídas no mesmo tipo de meio a uma DO_{600} (densidade óptica a 600 nm) de aproximadamente 0,1 e crescidas novamente até DO_{600} de 0,4 – 0,6. As culturas contendo as iscas em pGilda e culturas contendo somente pGilda, após atingirem a DO_{600} de 0,4-0,6; são lavadas com o meio seletivo contendo galactose e crescidas nesse mesmo meio por 6h a 30°C para a indução da isca. Culturas não induzidas são feitas em paralelo, crescidas nas mesmas condições no meio com glicose. Depois essas células são centrifugadas por 3 min a 13000Xg e ressuspensas em 2X de tampão de amostra Laemmli. Todos os extratos são estocados a -70°C quando não usados imediatamente.

Os extratos de levedura (20 μ l) são ressuspensos em tampão de amostra (50mM Tris pH 6,8; 2%SDS, 10% glicerol, 10mM DTT, azul de bromofenol), fervidos por 10min e submetidos a separação por eletroforese em SDS-PAGE 8% e posterior transferência para membrana de nitrocelulose. A membrana é bloqueada com 5% de leite desnatado (Molico) diluído em TBST (20mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl e 0,05% de Tween 20) por 1 hora. Em seguida, é realizada a incubação com o anticorpo policlonal anti-LexA (Invitrogen) na diluição 1:5000, por 2 horas. Após 3 lavagens com TBST, é feita a incubação com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluído 1:10000 em TBST, por 1 hora. A reação é revelada com a

solução reveladora do *ECL Western blotting analysis system* (Amersham) e as membranas expostas a um filme radiográfico.

Repressão

RFY206 contendo o vetor pJK101 é transformada com o vetor isca e plaqueada em meio seletivo (SD-galactose –ura –his), a mesma levedura, sem transformar com a isca, é plaqueada em meio seletivo adequado (SD-galactose –ura) como controle da repressão. A diminuição do azul na placa contendo RFY206+pJK101+isca é indicativo de que a proteína está translocando para o núcleo.

Auto-ativação

Placas contendo os meios seletivos SD-glicose -ura –his e SD-galactose/rafinose -ura –his com X-Gal (80 µg/ml) e 1X tampão BU são usadas para repassar colônias da cepa RFY206 contendo os seguintes plasmídeos:

- pSH18-34 + pSH17-4 (controle positivo)
- pSH18-34 + pGilda com seqüência de interesse (isca)
- pSH18-34 + pRHFM1 (controle negativo)
- pSH18-34 + pGilda sem isca

As colônias foram colocadas a 30°C e o crescimento e aparecimento da cor azul foi acompanhado por 4 dias. O aparecimento de cor azul nas colônias contendo o vetor isca indica que a isca está sendo capaz de ativar a expressão do gene repórter.

3.1.2 – Varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo

Levedura RFY206 contendo pSH18-34 e a isca inserida no vetor pGilda é plaqueada em meio SD-glicose –his –ura. Após quatro dias de crescimento, a 30°C, três colônias são coletadas, inoculadas em 20ml de meio líquido SD-glicose –his –ura e incubadas a 30°C, sob agitação, por 24 horas. Esta cultura saturada é então diluída para a DO₆₀₀ de 0,2 em 30ml de meio líquido de mesma composição e o crescimento é monitorado até DO₆₀₀ igual a 1,0. A cultura é então centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos, 1500xg e ressuspendidas de maneira suave, com água deionizada estéril, para o volume final de 1ml.

A mistura da isca com a biblioteca é realizada delicadamente em tubos do tipo Eppendorf, seguida de centrifugação à temperatura ambiente (5minutos/1500xg) e posterior ressuspensão em 100µl de meio líquido completo YPD. A ressuspensão é plaqueada em meio sólido de YPD e incubada por 14 horas a 30°C. Como controle, realizamos em paralelo o *mating* da isca com uma biblioteca vazia, ou seja, leveduras EGY48 que continham o plasmídeo pJG4-5 sem nenhum inserto.

A massa de leveduras que cresceu na placa YPD é cuidadosamente raspada e estas células são transferidas para 100ml de meio líquido indutor seletivo SD-galactose/rafinose –his –ura -trp. Essas células são incubadas no agitador a 30°C por 6 horas para a expressão das proteínas de fusão. A seguir são centrifugadas à temperatura ambiente durante 5 minutos, 1500xg e ressuspendidas em 30ml de água deionizada estéril. Repete-se a centrifugação e as células são finalmente ressuspendidas para o volume final de 5mL de água deionizada estéril.

Mede-se a DO_{600} e as suspensões de leveduras são diluídas para 10^8 células/ml e plaqueadas em 20 placas seletivas SD-galactose/rafinose –his –ura –trp –leu.

Como controle, o *mating* da isca com a biblioteca vazia é plaqueado em uma placa SD-galactose/rafinose –his –ura –trp –leu.

A atividade do gene repórter LEU2 é determinada através do monitoramento do crescimento das leveduras neste meio seletivo por 5 dias. As colônias que cresceram no meio seletivo são repassadas para placas SD-glicose/ –ura-his –trp, com o objetivo de “desligar” a indução. Após 40 horas de crescimento destas leveduras no meio descrito acima, as mesmas são replicadas para placas SD-galactose/rafinose -ura -his -trp + X-gal, para o monitoramento da atividade do gene repórter lacZ. Após 1-3 dias a 30°C a atividade da transcrição do gene repórter lacZ nas colônias é monitorada pelo desenvolvimento da cor azul.

3.1.3 – Avaliação das mensagens obtidas

As colônias que apresentam coloração azul são colocadas em 50µl de água e incubadas a 95°C por 15 minutos a fim de lisar as leveduras e liberar os plasmídeos que serão utilizados como “molde” na reação de PCR, utilizando primers específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5. Para a reação de PCR de volume total de 25µl utilizou-se o volume de 5µl da suspensão de leveduras e demais componentes apresentados nos métodos acima. Foram feitos 2 ciclos iniciais com 4 min de desnaturação (95°C), 1 min de hibridização (50°C) e 3 min de alongação (72°C); seguidos de 40 ciclos de amplificação com 30s de desnaturação, 30s de hibridização e 30s de alongação acrescidos de 1s a cada ciclo; e, finalmente, 10min para a alongação final à 68°C. Este programa de PCR foi otimizado pela Dra.

Adriana Mercadante para a amplificação utilizando diretamente extrato das colônias de leveduras.

Os produtos de PCR são também digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III e *Hinf* I e os padrões de digestão analisados em gel de agarose 2,5% a fim de descartar as leveduras que possuam insertos com o mesmo padrão de restrição no vetor pJG4-5 e conseqüentemente carreguem mensagens semelhantes.

As seqüências dos possíveis ligantes da isca, com padrões distintos de digestão é determinada por sequenciamento automático, a partir de produto de PCR purificado em gel de agarose com o sistema *Perfectprep Gel Cleanup Kit*TM (Eppendorf). Posteriormente, a identidade destas mensagens foi obtida com o uso da ferramenta *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.1.4 – Leveduras

EGY48 - MAT α trp1 his3 ura3 leu2:: 6 LexAop-LEU2. Essa cepa possui o gene repórter LEU2 integrado ao cromossomo e sob o controle de 6 operadores LexA. Quando o gene LEU2 é expresso, essa levedura é capaz de crescer em meio desprovido de leucina.

A biblioteca de cDNA foi clonada no vetor pJG4-5 e transformada na cepa RFY206 (MATa *trp1 Δ ::hisG his3 Δ 200 ura3-52 lys2 Δ 201 leu2-3*)

3.1.5 – Vetores

-Repórter:

pSH18-34 – URA3, 2 μ m, Ap^R, 8 ops.-lacZ

-Isca:

pGilda – HIS3, CEN, Ap^R

Possui o promotor GAL1 que permite a expressão da proteína de fusão LexA-isca apenas quando a única fonte de carbono for a galactose. A sequência CEN mantém o plasmídeo em uma única cópia por célula.

-Biblioteca:

pJG4-5 – TRP1, 2 μ m, Ap^R

Expressa o domínio de ativação B42, seguido do epítopo HA, em fusão com proteínas da biblioteca de cDNA. Essa expressão é regulada pelo promotor GAL1.

-Controles:

pRHFM1 – HIS3, 2 μ m, Ap^R

Possui promotor ADH que expressa constitutivamente a fusão LexA-homeodomínio da proteína bicóide. É usado como controle positivo no ensaio de repressão e como controle negativo no ensaio de auto-ativação.

pSH17-4 – HIS3, 2 μ m, Ap^R

Possui o promotor ADH que expressa constitutivamente a fusão LexA-domínio de ativação de GAL4. É usado como controle positivo no ensaio de auto-ativação.

pJK101 – URA3, 2 μ m, Ap^R, GAL1-2 ops.-lacZ

Usado no ensaio de repressão. Tem um operador LexA inserido no promotor GAL1. Na presença de galactose o promotor GAL1 leva a expressão de lacZ, no entanto se alguma proteína se ligar no operador LexA a expressão de lacZ deve ser reduzida.

3.2 – RT-PCR

Para a preparação do cDNA, partimos de 1µg de RNA total diluído em 12,5µl de água tratada com DEPC ao qual é adicionado 1µl de oligo dT (20µM). Essa mistura é aquecida por 2 min (70°C) e resfriada rapidamente em gelo.

Adicionamos então 4,0µl do tampão de reação 5 X; 1,0µl dNTP (10µM cada); 0,5µl RNaseOUT (400U/µl) e 1,0µl Transcriptase reversa (Superscript II) (200U/µl – 200U/µg de RNA). Incubamos a 42°C por 1 h e aquecemos (94°C) por 5min. O volume é ajustado para 100µl com água tratada com DEPC. A amostra pode ser aliquoteada e depois armazenada a -70°C.

Para um volume final de 25µl de reação de PCR utilizamos: 2,5µl tampão da enzima 10X; 0,75µl MgCl₂ (50mM); 0,5µl dNTP (10mM); 0,6µl *primer forward* (20µM); 0,6µl *primer reverse* (20µM); 0,25µl Taq Polimerase (5U/µl), 2,5µl de cDNA e H₂O completando o volume para 25µl. A amplificação é feita seguindo especificação da enzima. Ciclagens diferentes foram utilizadas para cada experimento e estão descritas em detalhes no local apropriado.

3.3 – Hibridização *In situ*

A hibridização *in situ* foi adaptada de Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser (1993). Dissecamos o nariz de camundongos de 3 semanas e congelamos em Tissue-tek OCT e preparamos com um criostato secções de 12-20µm das turbinadas em lâminas de vidro. As lâminas são secadas e fixadas por 10 min com 4% paraformaldeído diluído em PBS e a seguir lavadas 3 vezes de 5min em PBS. As lâminas foram então imersas em solução contendo 7ml de trietanolamina em 600ml de água estéril mantendo agitação leve. Em seguida gotejou-se 1,5 ml de anidrido acético na solução e incubou-se por 10 minutos para acetilar os tecidos. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Foi adicionado a

cada lâmina 500µl de solução de hibridização (50% de formamida; 5XSSC; 5X Denhardt's e 250 µg/ml de "bakers yeast RNA") em câmara úmida por 2 horas a 72°C. As sondas (200 ng/ml) foram misturadas com 500 µl de solução de hibridização, aquecidas por 5 minutos a 85°C e adicionadas às lâminas incubando em câmara úmida até o dia seguinte.

As lâminas são lavadas em 5XSSC a 72°C por 10 minutos, 2 vezes em 0,2XSSC a 72°C por 30 minutos e uma vez em 0,2XSSC a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir incubamos a 37°C em solução de 20 µg/ml de RNase, 10mM de Tris, 400mM de NaCl por 30 minutos para eliminação de sondas não hibridizadas.

A detecção imunológica foi feita com o kit "DIG Wash and Block Buffer Set" (Roche Diagnostics). Os slides foram lavados em 1X "washing buffer" (10X ácido maléico com 3% Tween) por 5 minutos; em 1X "blocking reagent" (10% Blocking reagent em tampão de ácido maléico) em tampão 1X ácido maléico por 1 hora à temperatura ambiente; em 1X "blocking reagent" em tampão 1X ácido maléico contendo anticorpo anti-digoxigenina (Roche Diagnostics) na diluição de 1:5000 por 1 hora. Os slides foram lavados 3 vezes de 20 minutos cada com 1X "washing buffer". Os slides foram incubados por 5 minutos em tampão de detecção (100mM Tris pH 9,5 + 100mM NaCl) e, a seguir, em solução de detecção preparada com 10 ml de 1X "detection buffer" + 2,4 mg de levamisole + 50 mM MgCl₂ + 200 µl de NBT/BCIP (Roche Diagnostics).

A reação foi interrompida em solução 10 mM Tris pH 8,0 + 1 mM EDTA duas vezes por 5 minutos. Após lavagem com água destilada por 5 minutos os slides foram contra-corados com Hoescht (10 µg/ml em PBS) por 5 minutos. Finalmente os

slides foram lavados com água destilada cobertos com gelvatol e cada lâmina foi coberta com uma lamínula .

3.4 – Western Blot

Para a maioria dos *Western blots* utilizamos o protocolo de SDS-PAGE Tris-Glicina. Entretanto para visualizar proteínas menores, como a Gy13, foi necessário utilizar um protocolo de SDS-PAGE Tris-Tricina. Ambos os protocolos são detalhados abaixo.

Independente do protocolo utilizado para a eletroforese, preparamos as amostras diluindo os extratos protéicos em tampão de amostra (concentrações finais Tris 50mM pH6.8, 10% Glicerol, 2% SDS, DTT 100mM, azul de bromofenol) e aquecendo 95°C por 10min.

A transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF é feita em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 200mM, 20% metanol) por 2h, 100V, 4°C.

Bloqueamos então a membrana com TBS, 5% Tween (TBST) acrescido de 5% de leite em pó Molico desnatado por 1h e deixamos incubando a noite toda com o anticorpo, ou soro, diluído na solução de bloqueio. No dia seguinte a membrana é lavada 3 vezes com TBST por 5min e deixada para incubar por 45min no anticorpo secundário diluído em TBST + 5% leite em pó Molico. Seguem-se a incubação mais 3 lavagens de 5min em TBST, então adicionamos o substrato (ECL plus Amersham), expomos um filme à membrana por 5min e revelamos o filme.

3.4.1 – SDS-PAGE Tris Glicina

Preparamos o gel de separação (acrilamida/bis-acrilamida 8%, Tris 250mM pH 8.8, 0,1% SDS, APS e TEMED) e o gel de empilhamento (acrilamida/bis-acrilamida 6%, Tris 125mM pH 6.8, 0,15% SDS, APS e TEMED). Aplicamos as amostras e a separação é feita em tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 250mM, SDS 0,1%; pH 8,3), 70-120V até que a frente de corrida saia do gel.

3.4.2 – SDS-PAGE Tris Tricina

Preparamos o gel de separação (acrilamida/bis-acrilamida 12,5%, Tris 750mM pH 8.45, 0,075% SDS, 10% Glicerol, APS e TEMED) e o gel de empilhamento (acrilamida/bis-acrilamida 6%, Tris 750mM pH 8.45, 0,075% SDS, APS e TEMED). Preparamos a cuba, com o tampão do cátodo (Tris 100mM, Tricina 100mM, 0,1% SDS) na parte onde as amostras são aplicadas e o tampão do ânodo (Tris 0,2M pH 8,9) na outra parte. A separação ocorre por 1h a 30V, depois até a frente de corrida sair do gel a 80-120V.

3.5 – Anticorpo contra RIC-8B

Primeiro comparamos a sequência da RIC-8B com a RIC-8A de camundongos, para escolher um epítopo específico para a nossa proteína de interesse, encontramos o fragmento, TAQEAATLDELPSDKTTEKDTALKNS, específico da RIC-8B. Para confirmar a especificidade do epítopo escolhido obtivemos as sequências da proteína RIC-8B de outras espécies (rato e humano) e comparamos todas utilizando o software clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), adicionamos também nessa comparação a RIC-8B Δ 9. O epítopo com algumas pequenas diferenças está presente nas sequências de RIC-8B de diferentes espécies, mas não RIC-8A.

Escolhemos a sequência do peptídeo com a ajuda de um programa on-line (<http://www.changbioscience.com/abie/abie.html>). O programa faz o gráfico de hidrofiliidade e permite a exclusão de determinados resíduos, fornecendo então opções de peptídeos dentro da sequência fornecida que devem pertencer ao exterior da proteína (alta hidrofiliidade).

O peptídeo escolhido (ELPSDKTTEKDTAL) foi enviado para uma empresa especializada (Bethyl - <http://www.bethyl.com/>) para a confecção do anticorpo. Dois coelhos foram imunizados com o peptídeo, o soro imune coletado, testado por Elisa e enviado para nosso laboratório quando se obteve um bom título.

3.5.1 – Caracterização do anticorpo

Uma vez de posse do soro dos coelhos imunizados, precisávamos avaliar se o anticorpo era capaz de reconhecer a proteína RIC-8B.

Para tanto preparamos membranas de PVDF por *Western blot* com extrato de células HEK293T transfectadas com pCDNA3.1(-) contendo a sequência da RIC-8B em fusão com FLAG e células não transfectadas; 10µg de proteína por amostra. Detectamos as proteínas de interesse com o soro anti-RIC-8B (1:500) e anticorpo anti-FLAG (1:5000); anticorpos secundários utilizados foram IgG conjugados com HRP, anti-coelho (1:5000, Amersham) e anti-camundongo (1:5000, Amersham). O soro foi capaz de detectar nossa proteína de interesse no extrato de proteína recombinante.

Para utilizar o anticorpo anti-RIC-8B em extrato de epitélio olfatório ou de cílios de neurônios olfatórios, foi necessária uma etapa de purificação por afinidade (descrita abaixo). O anti-RIC-8B purificado por afinidade (1:50) foi capaz de detectar a RIC-8B em 15µg de extrato de cílios de neurônios olfatórios.

3.5.2 – Purificação por afinidade

Clonamos a RIC-8B no plasmídeo pGEX-2T (Amersham), onde ela é expressa em fusão com GST (glutathione S-transferase) e transformamos bactérias DH5 α com ele. Fizemos um pré-inóculo dessas bactérias transformadas durante a noite, todas as incubações antes de lisar as bactérias são realizadas em 37°C sob agitação. No dia seguinte esse inóculo saturado é diluído em 2 litros de meio LB contendo ampicilina (50 μ g/ml) e são deixados até alcançar DO entre 0,6 e 0,8. Nesse ponto adicionamos IPTG (0,5mM) para induzir a produção da proteína GST-RIC-8B e incubamos por mais 2 horas. As bactérias são coletadas por centrifugação (4000xg, 20min, 4°C), ressuspensas em um tampão de lise contendo lisozima (1 mg/ml) e incubadas por meia hora no gelo com agitação a cada 5 min. Depois disso são sonicadas, 6 vezes por 15s.

Centrifugamos mais uma vez (4000xg, 20min, 4°C) para separar a fração solúvel do resto, adicionamos Glutathione-Sepharose e deixamos a noite toda sob agitação a 4°C. No dia seguinte a proteína ligada a Glutathione-Sepharose é coletada por centrifugação (1000xg, 5min, 4°C) e lavada três vezes em tampão. A presença da proteína é quantificada num gel de acrilamida corado com Coomassie comparando a proteína final com alíquotas coletadas antes e depois da indução e diferentes quantidades de albumina.

Preparamos então uma membrana contendo a proteína GST-RIC-8B em grande quantidade. A proteína forma uma faixa na membrana que pode ser facilmente visualizada corando-se com Ponceau. Essa faixa é cortada e tratada com tampão de eluição (Glicina 100mM pH 2,5) por 10 min para remover qualquer resíduo que não esteja bem fixado a membrana. Lavamos com TBS duas vezes, e

bloqueamos a membrana com TBST + 5% molico por 1h, depois deixamos a membrana incubando com o soro imune (1:10) a noite toda. No dia seguinte a membrana é lavada duas vezes com TBS e duas vezes com PBS, 5min cada lavagem e é colocada por 10 min em 500µl do tampão de eluição, com agitações ocasionais. O tampão de eluição é recuperado e neutralizado com 50µl de Tris 1M pH 8.

3.6 – Imunohistoquímica de epitélio olfatório

Dissecamos as turbinadas de 3 camundongos C57BL/6J de 6 à 8 semanas de idade. As turbinadas são lavadas em 50ml de PBS, fixadas em 4% paraformaldeído por 2h e incubadas em sacarose 30% a noite toda, 4°C, antes de congelar para crioproteção. O paraformaldeído e a sacarose foram diluídos em PBS.

Antes de congelar colocamos as turbinadas em OCT por 15 min para que esse entre bem no tecido e ofereça suporte durante o seccionamento em criostato. As turbinadas são congeladas em álcool com gelo seco e podem ser armazenadas a -80°C até serem utilizadas.

Preparamos secções de 12-20µm das turbinadas em lâminas de vidro. Elas podem ser armazenadas no -80°C antes do uso ou utilizadas imediatamente após o corte.

As lâminas são colocadas em etanol 95% por 1 min para mais uma etapa de fixação, lavadas 3 vezes por 5 min em PBS. Incubamos por 1h em solução de bloqueio (PBS contendo 10% soro fetal bovino, 2% albumina, 0.25% TritonX-100) e adicionamos os anticorpos diluídos em solução de bloqueio a cada lâmina, deixando a noite toda em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados foram: goat anti-

G γ 13 (1:50; Santa Cruz), rabbit anti-G α olf (1:100, Santa Cruz) e rabbit anti-RIC-8B (1:50).

No dia seguinte as lâminas são lavadas 3 vezes em PBS e incubamos 2h no escuro com os respectivos anticorpos secundários, diluídos em solução de bloqueio. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa546-anti-goat, Alexa488-anti-rabbit (Invitrogen) ambos diluídos 500 vezes.

Depois da incubação com os anticorpos secundários são feitas mais 3 lavagens com PBS e as lâminas são montadas com 90% glicerol. A visualização é primeiro feita em microscópio de fluorescência e as imagens foram obtidas com o microscópio confocal LSM 510 META (Carl Zeiss).

3.7 – Ensaio de *Pull down*

Transfectamos 10⁶ células HEK293T com vetores codificando para G β 1 e G γ 13 em fusão com o marcador Flag e G α olf em fusão com marcador Myc. 24h após a transfecção lavamos duas vezes com PBS e preparamos o extrato dessas células em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 100 mM Lactose) adicionado de inibidores de protease (Sigma). A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford. Ric-8B em fusão com glutathione-S-transferase (GST) foi produzida em bactéria *E. coli* BL21 usando o vetor pGEX 2T (Amersham Biosciences) contendo a seqüência para Ric-8B. Para diminuir ligações inespecíficas incubamos 1300 μ g de extrato celular com 200 μ l de Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) por 1h. Separamos 50 μ l dessa amostra como extrato inicial (*input*). O restante do extrato inicial foi separado em 2 amostras contendo 600 μ g de proteína. Ambas amostras foram incubadas por 2h, 4°C, sob agitação leve; Adicionamos 20 μ g of GST-Ric-8B

imobilizada em Glutathione Sepharose 4B à uma alíquota. A outra recebeu um volume igual de 50% Glutathione Sepharose 4B em tampão de lise. As amostras foram lavadas uma vez com tampão de lise e duas vezes com 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25mM Lactose. Os complexos recuperados foram separados usando 12%/18% SDS-PAGE seguido por *Western blot* usando os anticorpos anti-FLAG (1:10000, Sigma, cat # F3165) ou anti-myc (1:2000, Invitrogen).

3.8 – Co-imunoprecipitação

Preparamos extrato de células HEK293T transfectadas com pCDNA3.1(-) contendo FLAG-RIC-8B, pCDNA3.1(-) contendo Gγ13, pCDNA3.1(-) contendo Gβ1 e pExchange4b contendo MYC-Gαolf.

Os extratos são quantificados pelo método de Bradford, diluídos com tampão de lise para preparar 1ml de solução 1μg/μl de proteína e separados em duas alíquotas de 500μl. Para cada alíquota adicionamos GDP ou GTPγS para concentração final de 100μM e deixamos incubando por 1h no gelo. Durante esse intervalo preparamos a proteína-G-Sepharose (50% em tampão de lise) segundo indicações do fabricante. Ao final da incubação adicionamos 50μl de proteína-G-Sepharose e deixamos por 1h, 4°C sob agitação. Essa etapa visa remover qualquer proteína que ligue inespecificamente a proteína-G-Sepharose. Depois da incubação centrifugamos (12000xg, 1min, 4°C), separamos o sobrenadante, coletamos 30μl de cada um (input) e adicionamos o anticorpo anti-MYC (10μg) em cada preparação. Deixamos por mais 1h, 4°C, sob agitação, adicionamos mais 50μl de proteína-G-Sepharose e incubamos por mais 1h nas mesmas condições. Coletamos então a proteína-G-Sepharose por centrifugação (12000xg, 1min, 4°C), realizamos uma

lavagem com 1ml de tampão de lise e uma lavagem com 1ml de Tris 50mM pH 8. Para liberar as proteínas da proteína-G-Sepharose, adicionamos 50µl de tampão de amostra (o mesmo utilizado no protocolo de *Western Blot* acima) e aquecemos a mistura por 10min, 95°C. Centrifugamos mais uma vez (12000xg, 1min) e coletamos o sobrenadante.

Preparamos membranas de PVDF com essas amostras por *Western blot* e detectamos as proteínas com anticorpo anti-FLAG (1:5000; Invitrogen) e anti-mouse-HRP (1:5000; Amersham). Para avaliar se a mesma quantidade de amostra foi carregada no gel, utilizamos o anti-MYC (1:2000; Invitrogen) na mesma membrana.

3.9 – Preparação de Membranas de HEK293T

Células HEK293T foram transfectadas com combinações de vetores codificando para mOR-EG, FLAG-RIC-8B, FLAG-Gγ13, FLAG-Gβ1 e MYC-Gαolf. As células foram lavadas 3 vezes com 1mM PMSF em PBS e desgrudadas da garrafa com PBS, 1mM PMSF, 2mM EDTA, passadas para tubos cônicos de 15ml e lavadas mais duas vezes com PBS, 1mM PMSF. Depois disso adicionamos 1ml de tampão de lise (250mM sucrose, 20mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1X cocktail de inibidores de proteases-SIGMA) e sonicamos a preparação 3 vezes por 1 min à 30% de amplitude.

Centrifugamos por 5min a 600xg e recuperamos o sobrenadante. O precipitado é ressuspendido em 1ml de tampão de lise e repetimos o procedimento de sonicação. Os dois sobrenadantes são recuperados, acrescentamos NaCl e MgSO₄ para concentrações finais de 100mM e 50µg/ml respectivamente e a preparação é centrifugada por 1h 100.000xg. O pellet é ressuspendido em tampão B (20mM HEPES pH 7,4; 1mM EDTA) e a centrifugação é repetida.

O precipitado final é ressuspendido em 400µl de tampão B, aliquotado e armazenado a -80°C. As preparações de membrana foram avaliadas por *Western Blot*, como descrito acima.

3.10 – Ensaio de medida de AMPc

A quantificação de AMPc foi feita como descrito por Von Dannecker e colaboradores (2006). Cultivamos células HEK293T em uma placa de 96 poços até atingirem 70-80% de confluência. Essas células foram transfectadas com diferentes combinações de vetores codificando para a síntese de mOR-EG, mOR-I7, RIC-8B, RIC-8BΔ9, Gγ13, Gβ1 e Gαolf. Foi utilizado 100ng de cada vetor, exceto Gγ13, Gβ1 para os quais utilizamos 10ng dos respectivos plasmídeos. 48 horas após a transfecção, iniciamos a indução por 10min com os respectivos agonistas (300µM de eugenol, mOR-EG; ou de heptanal, mOR-I7). AMPc foi medido utilizando o sistema *cAMP Enzymeimmunoassay* (Amersham Bioscience). Resumidamente, após a estimulação as células são lisadas e parte do lisado é transferido para uma placa de 96 poços fornecida com o sistema. Os poços desta placa estão recobertos de anticorpos anti-IgG de coelho. Adicionamos uma solução contendo um anticorpo anti-AMPc e AMPc conjugado com peroxidase de raiz forte (HRP). O AMPc presente nas nossas amostras compete com o AMPc-HRP na ligação com o anticorpo. Após diversas lavagens adicionamos um substrato colorimétrico da HRP. Quanto mais substrato for clivado, mais AMPc-HRP se ligou ao anticorpo, portanto menos AMPc estava presente na nossa amostra. Uma curva padrão com quantidades conhecidas de AMPc é feita em paralelo para permitir a quantificação das amostras.

4 – RESULTADOS

4.1 – Avaliação de possíveis interações de RIC-8B em camundongos

4.1.1 – Construção das iscas

RIC-8B foi identificada no epitélio olfatório em um ensaio de duplo híbrido tendo como isca G α olf contra uma biblioteca de epitélio olfatório. Para localizar possíveis interações da RIC-8B decidimos usar o mesmo ensaio utilizando agora a RIC-8B como isca.

Inicialmente clonamos RIC-8B e RIC-8B Δ 9 no vetor pGilda, para servirem de isca para a técnica de duplo-híbrido. As construções foram seqüenciadas para avaliar mutações e a fusão do inserto com o plasmídeo, para que a transcrição ocorra corretamente. Esse vetor foi inserido em leveduras RFY206 que já possuíam o plasmídeo pSH18-34 através do método de transformação com acetato de lítio, como descrito em "Yeast Protocols Handbook" (Clontech - www.clontech.com). As leveduras transformadas foram então plaqueadas em meio seletivo (SD-glicose –ura –his) e incubadas por 4 dias a 30°C, até o surgimento de colônias isoladas com 2-3mm de diâmetro. É importante ressaltar que as cepas RFY206 e EGY48 são incapazes de sintetizar uracila e histidina, portanto somente as leveduras RFY206 transformadas com pSH18-34 (expressa enzima da via de biossíntese de uracila) e pGilda (expressa enzima da via de biossíntese de histidina) serão capazes de crescer nesse meio.

4.1.2 – Caracterização das iscas

Três características são avaliadas para considerarmos que uma isca é adequada ao ensaio de duplo híbrido. Primeiro é necessário verificar se a proteína está sendo expressa, depois se ela é capaz de ir para o núcleo da levedura e por

último se, uma vez no núcleo, se a isca por si só não é capaz de ativar os genes repórteres.

Expressão das iscas

A expressão das iscas RIC-8B e RIC-8B- Δ 9, foi avaliada por *Western blot*, como descrito acima. Como pode ser visto na Figura 4, identificamos forte expressão das proteínas de fusão (LexA) quando houve indução das iscas, em meio de galactose, com a presença de bandas no tamanho esperado: Ric-8B com 81kd e Ric-8B Δ 9 com 76kd.

Figura-4. Ensaio de expressão das iscas Ric-8B e Ric-8B Δ 9. *Western Blot* utilizando anticorpo para proteína Lex-A. (+) com indução com galactose, (-) sem indução. PM=peso molecular em kD

Repressão

No ensaio de repressão, em que é possível verificar se a isca possui a capacidade de entrada no núcleo da levedura (através do monitoramento da intensidade da expressão do gene que codifica para β -galactosidase) verificamos

que as construções de Ric-8B e Ric-8B Δ 9 conseguem entrar no núcleo da levedura (dados não mostrados).

Auto-ativação

Durante a caracterização da isca verificamos que as duas isoformas foram capazes de auto-ativar o gene repórter, sendo que a auto-ativação proporcionada pela RIC-8B foi consideravelmente mais forte que da forma sem o exon 9. Dado que a RIC-8B Δ 9 teve uma auto-ativação menos acentuada poderia ser utilizada para a varredura, desde que tomados certos cuidados.

Uma vez que há auto-ativação esperávamos obter um grande número de falsos positivos quando as colônias fossem testadas para o gene LEU2. Para contornar esse problema pretendíamos selecionar no ensaio do gene repórter lacZ as colônias que apresentassem uma ativação (vista pela coloração azul) maior que um controle de auto-ativação, selecionando assim interações mais fortes que a auto-ativação da isca.

Primeiro precisávamos ter certeza que seria possível identificar as interações mais fortes. Para isso realizamos o *mating* entre as iscas Ric-8B e Ric-8B Δ 9 com as construções de G α olf que já sabíamos que não interagem com essas isoformas de Ric-8B (N-terminal, Domínio α HD) e a isca C-terminal de G α olf que apresenta forte interação com Ric-8B e Ric-8B Δ 9 (Von Dannecker *et al.*, 2005). Dessa forma seria possível verificar se a tonalidade de azul de uma interação forte, Ric-8B Δ 9 e C-terminal de G α olf, seria mais forte do que o azul apresentado pela auto-ativação, Ric-8B Δ 9 e N-terminal ou domínio α HD de G α olf.

Figura 5 – Avaliação da intensidade da autoativação da Ric-8B e Ric-8BΔ9, pela interação com fragmentos de Gαolf.

Na Figura 5, podemos observar que a coloração azul do diplóide contendo a isca Ric-8BΔ9 e o alvo C-terminal de Gαolf (interação verdadeira) é mais forte do que o azul apresentado pelo diplóide Ric-8BΔ9 e N-terminal de Gαolf ou domínio αHD de Gαolf (falsos positivos). Isso nos indica que é possível discriminar, através da análise da ativação do gene repórter lac-Z, as interações com potenciais ligantes de Ric-8BΔ9. Entretanto, é importante destacar que somente as interações mais fortes, acima da tonalidade de azul da auto-ativação de Ric-8BΔ9, poderão ser discriminadas.

Este mesmo ensaio foi realizado em paralelo com a isca RIC-8B e, como era esperado pelo seu forte caráter de auto-ativação, a coloração azul se desenvolveu independente da existência de interação com as construções de Gαolf, inclusive apresentando forte cor azul quando RIC-8B é testado contra a levedura com plasmídeo pJG4-5 vazio.

Com esse resultado demos continuidade a varredura da biblioteca utilizando a isca RIC-8BΔ9, sabendo que ao selecionar somente aqueles que apresentem ativação do gene repórter lacZ maior que a auto-ativação da isca, estaremos minimizando a chance de falsos positivos.

4.1.3 – Varredura da biblioteca de epitélio olfatório com a isca Ric-8BΔ9

A varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório utilizando Ric-8BΔ9 como isca foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos. A varredura da biblioteca resultou em aproximadamente 70000 clones. O controle realizado com uma biblioteca vazia nos forneceu o mesmo número de clones, o que indica que muitos dos clones obtidos no ensaio se devem a auto-ativação da isca, não a interações verdadeiras.

Em vista disso, selecionamos 1000 colônias de levedura para o ensaio da atividade do gene repórter lacZ. Desse ensaio somente 39 colônias apresentaram coloração azul mais forte do que a apresentada pela auto-ativação. Esse índice de sucesso, aproximadamente 4%, era esperado pela similaridade entre o número de colônias obtidas na varredura da biblioteca e do controle.

Essas colônias foram então submetidas à reação de PCR para a determinação da mensagem que continham. Cinco colônias não apresentaram amplificação por PCR. Os produtos de PCR das outras 34 foram purificados e digeridos com enzimas de restrição para exclusão de repetições, como descrito no Material e Métodos. O sequenciamento das mensagens revelou três clones de potencial interesse: as proteínas Gγ8 e Gγ13 e a proteína Gαs. A interação entre a proteína Gαs e Ric-8BΔ9 já havia sido determinada por Tall e colaboradores em 2003, o que nos informa que a nossa varredura foi capaz de selecionar interações

verdadeiras. O restante dos clones analisados, sequências de pouco interesse, desconhecidas (sem anotação no NCBI), fora de fase e falsos positivos estão descritos na Tabela 2, que apresenta um resumo dos resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 2 – Resumo do ensaio de varredura

Biblioteca utilizada	cDNA epitélio olfatório (camundongo)
Tamanho da biblioteca (Número de clones independentes de levedura)	$1,95 \times 10^6$
“Isca” utilizada	Ric-8B Δ 9
Nº de clones varridos	10^7
Nº de clones LEU2 + (Biblioteca)	~70000
Nº de clones LEU2 + (Controle)	~70000
Nº de clones LEU2 + da Biblioteca selecionados para análise do repórter lacZ	1000
Nº clones lacZ+ com coloração azul mais forte do que apresentado pela isca Ric-8B Δ 9 sozinha	39
Nº clones analisados	39
Nº clones que apresentaram banda na reação de PCR	34
(a) Sequências identificadas com potencial interesse:	G γ 8, G γ 13 e G α s.
(b) Outras sequências identificadas:	Odorant binding protein-1a; Hepatoma-derived growth factor (Hdgf) e Ribosomal protein-27.
(b) Sequências desconhecidas:	4 clones
(c) Sequências fora de fase:	9 clones
(d) Sequências “Falso-positivo”*: <i>*(Heat Shock Proteins e Zinc finger)</i>	15 clones

Com base nos resultados desta varredura selecionamos 2 candidatos de interesse que podem ser potenciais ligantes inéditos de RIC-8B Δ 9: G γ 8 e G γ 13. A expressão de G γ 8 parece ser restrita aos neurônios olfatórios não maduros (Ryba

& Tirindelli, 1995), porém nesses neurônios não identificamos forte expressão de $G\alpha_{olf}$ e Ric-8B (Von Dannecker *et al.*, 2005). Por outro lado, a proteína $G\gamma_{13}$ está presente nos cílios dos neurônios olfatórios (Kulaga *et al.*, 2004) co-localizando com $G\alpha_{olf}$.

Para descartar a possibilidade que esses resultados fossem também falsos positivos realizamos um ensaio trocando os vetores. Clonamos as seqüências completas das $G\gamma_8$ e $G\gamma_{13}$ no vetor pGilda e da RIC-8B e RIC-8B Δ 9 no vetor pJG4-5 e realizamos um ensaio de interação (*mating*). Ambos os vetores foram caracterizados seguindo os ensaios de repressão e expressão, a auto-ativação foi avaliada no próprio ensaio de *mating*. A confirmação da interação entre RIC-8B e RIC-8B Δ 9 com $G\gamma_8$ e $G\gamma_{13}$ pode ser observada na Figura 6.

Mostramos anteriormente (Von Dannecker *et al.*,2005) que RIC-8B também é expressa no cérebro, principalmente na região do estriado. A subunidade $G\gamma$ encontrada nessa região é a $G\gamma 7$. Nesse ensaio mostramos também que RIC-8B é capaz de interagir com a $G\gamma 7$ (Figura 6).

4.2 – Uma subunidade $G\beta$ para os neurônios olfatórios

O modelo clássico de ativação das proteínas G pressupõe que $G\beta$ e $G\gamma$ formam um dímero indissociável com o qual $G\alpha$ interage. Quando a proteína G é ativada ocorre a troca de GDP por GTP na subunidade $G\alpha$ seguida pela dissociação desta do dímero $G\beta\gamma$. Consideramos um passo seguinte importante determinar qual subunidade $G\beta$ é expressa no epitélio olfatório.

Já foi visto que a $G\gamma 13$ é capaz de associar-se com as 5 subunidades $G\beta$ conhecidas (Blake *et al.*,2001). Utilizamos um RT-PCR de epitélio olfatório para avaliar a expressão dessas 5 subunidades. Como podemos ver na Figura 7, a subunidade $G\beta 1$ é a que se encontra expressa em maior quantidade nessa região.

Figura 7 – $G\beta 1$ é a subunidade $G\beta$ predominante do epitélio olfatório. Resultado de RT-PCR de epitélio olfatório, utilizando primers específicos para $G\gamma 13$, RIC-8B, $G\alpha_{olf}$ e as diferentes $G\beta$.

Para confirmar esse resultado fizemos uma hibridização *in situ* utilizando sondas específicas para as 5 subunidades G β conhecidas. Somente G β 1 apresenta uma expressão significativa na camada correspondente aos corpos celulares de neurônios olfatórios maduros. A expressão de G β 1 observada na Figura 8 é comparável com o padrão encontrado para RIC-8B e G α olf (Von Dannecker *et al.*,2005).

4.3 – Anticorpo anti-RIC-8B

O nosso passo seguinte foi avaliar a localização subcelular das proteínas RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13. Apesar de muitos dos nossos resultados apontarem para o envolvimento dessas proteínas em neurônios olfatórios ainda nos faltava analisar a expressão protéica delas. G α olf, G β 1 e G γ 13 possuem anticorpo comercial disponível. Entretanto para RIC-8B foi necessário desenvolver um.

Primeiro fizemos o alinhamento da RIC-8B com a RIC-8A para escolher uma região específica que poderia servir como epítopo para um anticorpo específico (Figura 9 em **negrito**). Também comparamos a especificidade dessa região com as RIC-8B de diferentes espécies e com o produto de *splicing* alternativo RIC-8B Δ 9.

Como podemos ver na Figura 9, essa região (em negrito) está presente nas RIC-8B de camundongo, rato e hunama e não possui região correspondente na RIC-8A, sendo um candidato interessante.

Utilizamos um programa on-line para ajudar na escolha do peptídeo (<http://www.changbioscience.com/abie/abie.html>). Basicamente o programa faz um gráfico de hidrofiliidade e permite a exclusão de determinados resíduos, fornecendo então opções de peptídeos dentro da sequência fornecida que devem pertencer ao exterior da proteína (com alta hidrofiliidade).

Dentre as opções escolhemos a sequência ELPSDKTTEKDTAL (Figura 9 sublinhado) e encomendamos o anticorpo de uma empresa especializada (Bethyl).

Caracterização do anticorpo.

Uma vez de posse do soro dos coelhos imunizados, precisávamos avaliar se o anticorpo era capaz de reconhecer a proteína RIC-8B. Para tanto preparamos extrato de células HEK293T transfectadas com pCDNA3.1(-) contendo a sequência da RIC-8B ou RIC-8B Δ 9 em fusão com FLAG e células não transfectadas. Fizemos *Western Blot* com esses extratos e detectamos RIC-8B recombinante utilizando o soro imune ou anticorpo contra a proteína FLAG (Figura 10). Podemos ver que não é identificada nenhuma banda no extrato de células não transfectadas (3 e 6), portanto as bandas vistas nos outros extratos não se devem a interações inespecíficas. As proteínas detectadas com o soro imune anti-RIC-8B (1 e 2) são equivalentes às detectadas com o anticorpo anti-FLAG (4 e 5), portanto correspondem as proteínas FLAG-RIC-8B ou FLAG-RIC-8B Δ 9. Por fim, existe uma diferença de tamanho entre as bandas detectadas nos extratos transfectados com RIC-8B (2 e 5) e RIC-8B Δ 9 (1 e 4), correspondente a falta do exon 9 nesta.

Camundongo_Ric8bD9	MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYS DKHRRATFFKESADEDKRKKLCGIFKVLVKEVPT	60
Rato_Ric8b	MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYS DKHRRATFFKESADEDKRKKLCGIFKVLVKEVPT	60
Camundongo_Ric8b	MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYS DKHRRATFFKESADEDKRKKLCGIFKVLVKEVPT	60
Homen_Ric8B	MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYS DKHRRATFFKESADEDKRKKLCGIFKVLVKEVPT	60
Camundongo_Ric8A	MEPRADAVALTEEDAVTEALRSFNRESQSFTFDDAQQEDRKRLAKLLSVSLEQLGSP	60
	* : . . . : * * * : . : * * * : . : * : * : * : * : * : * : . .	
Camundongo_Ric8bD9	TCQVSCLEVLRLILSRDKKILVPVTTKENMQILLRLAKLHESDDSLKVSSEFFVIVESLKC	120
Rato_Ric8b	TCQVPCLEVLRLILSRDKKILAPVTTTEENMQILLRLAKLHESDDSLKVSSEFFVIVESLKC	120
Camundongo_Ric8b	TCQVSCLEVLRLILSRDKKILVPVTTKENMQILLRLAKLHESDDSLKVSSEFFVIVESLKC	120
Homen_Ric8B	TCQVSCLEVLRLILSRDKKILVPVTTKENMQILLRLAKLHESDDSLKVSSEFFVIVESLKC	120
Camundongo_Ric8A	KHRVTWLQTIRILSRDRSCLDSFASRQSLHALACADITVSEEPFQSPDMDVLLESCLK	120
	. : * . * : * * * * : . * . : . : : : * * : . : : : : : * : * * * *	
Camundongo_Ric8bD9	LCNIVFNSQMAQQLSLELNLAAKLCNLRKCKDRKFINDIKCFDLRLFLVLSLHTDIRS	180
Rato_Ric8b	LCNIVFNSQVAQQLSLELNLAAKLCNLRKCKDRKFINDIKCFDLRLFLVLSLHTDIRS	180
Camundongo_Ric8b	LCNIVFNSQMAQQLSLELNLAAKLCNLRKCKDRKFINDIKCFDLRLFLVLSLHTDIRS	180
Homen_Ric8B	LCNIVFNSQMAQQLSLELNLAAKLCNLRKCKDRKFINDIKCFDLRLFLVLSLHTDIRS	180
Camundongo_Ric8A	LCNVLVSPTAQLMAAEARLVLAERYGLYKRKSPYHEVQFDFLRLFLTLALTDRVRQ	180
	*** : * : * * * : * . : . : * : . : * : . : : : * * * * : * : * : *	
Camundongo_Ric8bD9	QLRYELQGLPLLTQILESAFSIKWTDYESAIDHNGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVD	240
Rato_Ric8b	QLRYELQGLPLLTQILESAFSIKWTDYESAIDHSGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVD	240
Camundongo_Ric8b	QLRYELQGLPLLTQILESAFSIKWTDYESAIDHNGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVD	240
Homen_Ric8B	QLRYELQGLPLLTQILESAFSIKWTDYESAIDHNGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVD	240
Camundongo_Ric8A	QLFQELHGVRLLTDALELTLGVAPK-----ENPPVMLPAQETERAMEILKVLFINTFD	233
	* * * : * : * * * : * : . : . : . : . : . : . : * * * * : * * * * * *	
Camundongo_Ric8bD9	SWKVHK-ESDSHQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICP	299
Rato_Ric8b	SWKVHK-ESDSHQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICP	299
Camundongo_Ric8b	SWKVHK-ESDSHQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICP	299
Homen_Ric8B	SWKVHK-ESDSHQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICP	299
Camundongo_Ric8A	SVKREVDEEDAALYRYLGTLLRHCVMEVA-AGDRTEEFHGHTVNLGNLPLKCLDVLALL	292
	* * . * : * : * : * : . : . : * * * : * : * * * : * : * : * * * : .	
Camundongo_Ric8bD9	LTHEETAQEAATLDELPSDKTTEKDTALKNSMTVYNGMNMEDIAHVLLNFMKRIKDGSSY	359
Rato_Ric8b	LTHEETAQEAATLDELPGDKTTEKDTALKNSAMVYNGMNMEDIAHVLLNFMKRIKDGSSY	359
Camundongo_Ric8b	LTHEETAQEAATLDELPSDKTTEKDTALKNSMTVYNGMNMEDIAHVLLNFMKRIKDGSSY	359
Homen_Ric8B	LTHEETAQEAATLDELPSDKTTEKDTALKNSMTVYNGMNMEDIAHVLLNFMKRIKDGSSY	359
Camundongo_Ric8A	LTHEG-----SLEFMGVNMDVISALLAFLEKRLHQTHRL	326
	* * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Camundongo_Ric8bD9	REGLTPVLSLITECSRAHRNIRKFLKQVLPPLRDVTNRPEVGSTVRNKLVRMLTHVDLG	419
Rato_Ric8b	REGLTPVLSLITECSRAHRNIRKFLKQVLPPLRDVTNRPEVGSTVRNKLVRMLTHVDLG	419
Camundongo_Ric8b	REGLTPVLSLITECSRAHRNIRKFLKQVLPPLRDVTNRPEVGSTVRNKLVRMLTHVDLG	419
Homen_Ric8B	REGLTPVLSLITECSRAHRNIRKFLKQVLPPLRDVTNRPEVGSTVRNKLVRMLTHVDLG	419
Camundongo_Ric8A	KECVAPLVNLVTECARMHPAPKFLKAQVLPPLRDVTREPEVGLLNRNKLVRMLTHLTD	386
	* : * : * : * : * : * : *	
Camundongo_Ric8bD9	VKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYNAGLLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTTDEEYK	479
Rato_Ric8b	VKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYNAGLLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTTDEEYK	479
Camundongo_Ric8b	VKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYNAGLLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTTDEEYK	479
Homen_Ric8B	VKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYNAGLLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTTDEEYK	479
Camundongo_Ric8A	VKRVAEEFLFVLCSESVPRIKYTGYNAGLLAARGLMAGGRPEGQYSEDEDTTDEEYR	446
	* : * : * * * * * . * : *	
Camundongo_Ric8bD9	NAKP-----KEELLKPMGLKPGD--	497
Rato_Ric8b	NAKP-----KEELLKPMGLKPGD--	497
Camundongo_Ric8b	NAKPINILITGHLEEMPMPNIDEMTEEQKEYEAMKLVNMLDKLSREELLKPMGLKPGD--	537
Homen_Ric8B	NAKPINILITG-----HLEEMPMPNIDEMTEEQ	508
Camundongo_Ric8A	EKASINPVTG-----RVEEKPPNPEMGMEETEEQ	475
	* * . . . : * : * : . : * : * : . : . : . : . : . : . : . : . : . : .	
Camundongo_Ric8bD9	-----TITPLEEALSQYSVIEET-----SSDTD----	520
Rato_Ric8b	-----TITPLEEALSQYSVIEET-----SSDTD----	520
Camundongo_Ric8b	-----TITPLEEALSQYSVIEET-----SSDTD----	560
Homen_Ric8B	EYEAAMKLVNMLDKLSRADVDKL-----HQDGG----	536
Camundongo_Ric8A	EHEAMKLVNMFDKLSRHRIQPMGMSPRGHILTSIQDAMCTEMGQLSSDPSPDP	530
	. : . : * : * : . : * : * : . : . : . : . : . : . : . : . : .	

Figura 10 – Soro anti-RIC-8B é capaz de identificar RIC-8B recombinante. Western blot de extratos celulares contendo RIC-8B (2 e 5) e RIC-8B Δ 9 (1 e 4) em fusão com FLAG, ou células não transformadas (3 e 6). Detecção feita com Soro anti-RIC-8B (1,2 e 3) ou anticorpo anti-FLAG (4,5 e 6)

Tentamos então detectar a presença da RIC-8B em extrato total de epitélio olfatório e em extrato de cílios de neurônios olfatórios. Como podemos ver na Figura 11, o soro (Serum) se mostrou inespecífico, reagindo com várias bandas em ambos extratos utilizados. Para aumentar a especificidade do soro, realizamos a purificação por afinidade do mesmo. Primeiro preparamos membranas de PVDF contendo grandes quantidade de proteína RIC-8B recombinante. Essas membranas foram então incubadas com o soro imune diluído para que o anticorpo contra RIC-8B se ligasse. O anticorpo então foi eluído com um tampão ácido e o ácido imediatamente neutralizado.

Utilizamos esse anticorpo purificado contra membranas de PVDF contendo extrato de cílios de neurônios olfatórios e de epitélio olfatório. A Figura 11 (AP – *affinity purified*) mostra uma única banda predominante no extrato de cílios de neurônios olfatórios após a purificação por afinidade do soro.

Figura 11 – Anti-RIC-8B purificado por afinidade (AP) tem maior especificidade do que o soro imune (Serum) para detecção de RIC-8B em extrato de cílio de epitélio olfatório.

4.4 – Localização subcelular de RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13

Fizemos outro *Western blot*, com preparação de cílios de neurônios olfatórios ou epitélio olfatório total, utilizando nosso anticorpo anti-RIC-8B e os anticorpos comerciais que reconhecem G α olf, G β 1 e G γ 13. Mostramos aqui que as 4 proteínas se encontram em maior concentração no extrato ciliar do que no extrato de epitélio olfatório total (Figura 12).

Figura 12 – $G\alpha_{olf}$, $G\beta_1$, $G\gamma_{13}$ e RIC-8B estão concentrados na fração ciliar dos neurônios olfatórios. Utilizamos anticorpos específicos para cada uma das proteínas mencionadas para imuno-deteção em membranas, preparadas com quantidades equivalentes de extrato total de epitélio olfatório (OE), ou extrato enriquecido em cílios dos neurônios olfatórios (cilia).

Utilizando os mesmos anticorpos visualizamos por imunohistoquímica essas proteínas em secções do epitélio olfatório de camundongos. Já é conhecido que $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$ (Figura 13A) estão presentes nos cílios dos neurônios olfatórios, aqui mostramos que RIC-8B (Figura 13B) e $G\beta_1$ (Figura 13C) não só apresentam uma marcação mais pronunciada na camada ciliar, como também co-localizam com $G\gamma_{13}$ (Figura 13 B e C Merge).

Figura 13 – RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ estão presentes na camada ciliar do epitélio olfatório. Secções coronais de epitélio olfatório de camundongo foram marcadas com anticorpos para (A) $G\alpha_{olf}$, $G\gamma 13$ e visão esquemática do epitélio olfatório; adaptado de Sulz & Bacigalupo (2006). (B) RIC-8B e $G\gamma 13$. (C) $G\beta 1$ e $G\gamma 13$. No esquema, CC-Camada Ciliar, S-Células de suporte, OSN-Neurônios olfatórios, B-Camada basal.

Esses resultados mostram que RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ estão presentes no mesmo compartimento celular, os cílios dos neurônios olfatórios, compartimento esse onde se localizam os receptores olfatórios e onde se dá o início do processo de detecção de odorantes. É interessante notar que RIC-8B, além de se localizar na camada ciliar, apresentava em alguns pontos marcação concentrada nos dendritos, nas protuberâncias dendríticas e nos corpos celulares dos neurônios olfatórios (Figura 14).

Figura 14 –Imunohistoquímica para RIC-8B com secções de epitélio olfatório de camundongo mostram marcação nas protuberâncias dendríticas (A) e dendritos (B)

4.5 – Interações entre RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13

Uma vez que as proteínas estudadas foram localizadas nos cílios dos neurônios olfatórios, nosso passo seguinte foi tentar identificar como elas interagem entre si.

Primeiramente, decidimos avaliar a interação de RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13 por um método diferente do duplo híbrido. Para isso preparamos um extrato de células HEK293T transfectadas para a expressão de G α olf, G β 1 e G γ 13. Utilizando o método do *pull-down*, recuperamos desse extrato as proteínas que interagem com RIC-8B recombinante. Como podemos ver na Figura 15, G α olf, G β 1 e G γ 13 foram

recuperadas do extrato pela RIC-8B recombinante, o que indica a formação de um complexo entre essas proteínas.

Uma vez que RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ são capazes de interagir entre si resolvemos avaliar a natureza dessas interações. Resultados de nosso laboratório apontam que a RIC-8B é uma provável GEF do epitélio olfatório (Von Dannecker *et al.*, 2005). Uma GEF é capaz de se ligar à proteína $G\alpha$, quando essa se encontra associada a GDP, e estimular a troca do GDP por GTP, aumentando sua atividade.

Para avaliar as interações da RIC-8B com os estados ativado (ligado à GTP) e inativado (ligado à GDP) da $G\alpha_{olf}$ fizemos um extrato de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos que codificavam para a produção de RIC-8B em fusão com FLAG e $G\alpha_{olf}$ em fusão com MYC. Esse extrato foi incubado com excesso de GDP ou $GTP\gamma S$, um análogo não hidrolisável do GTP, por uma hora. Na sequência foi realizada a co-imunoprecipitação utilizando anticorpo contra MYC e o produto da co-imunoprecipitação foi analisado por *Western blot* e detecção com

anticorpo anti-FLAG. Como podemos ver na Figura 16 (esquerda), RIC-8B interage mais fortemente com $G\alpha_{olf}$ na presença de GDP do que $GTP\gamma S$. Esse resultado reforça a hipótese que RIC-8B é uma GEF, interagindo mais com $G\alpha_{olf}$ no estado inativo (ligada com GDP) que no estado ativado (ligada com GTP).

Repetimos o experimento de co-imunoprecipitação, transfectando as células

com plasmídeos que codificam para $G\beta 1$ e $G\gamma 13$, além dos descritos acima. Curiosamente, nessa condição, a quantidade de RIC-8B que co-imunoprecipitou com $G\alpha_{olf}$ independeu de GDP ou $GTP\gamma S$ (Figura 16, direita).

Esses resultados parecem indicar que no nosso modelo o dímero $G\beta 1\gamma 13$ mantém a $G\alpha_{olf}$ ligada à RIC-8B durante a ativação da proteína G, uma vez que $G\alpha_{olf}$ e RIC-8B interagem com menor intensidade na presença de $GTP\gamma S$, porém na presença das subunidades $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ co-imunoprecipitam igualmente, independente do estado de ativação.

Quando presente em grandes quantidades o dímero $G\beta\gamma$ é capaz de inibir a atividade da $G\alpha$ correspondente em alguns modelos (Chidiac & Ross, 1999; Katada *et al.*, 1984). Em seguida avaliamos se $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ alteravam a geração de AMPc via $G\alpha_{olf}$, modulada por RIC-8B. Fizemos a medida de AMPc em células transfectadas com plasmídeos codificando para um receptor olfatório (MOR-EG ou MOR-I7), $G\alpha_{olf}$, RIC-8B, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$. A presença de $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ não alterou a geração de AMPc nesse modelo, apesar de estabilizar a interação de RIC-8B com $G\alpha_{olf}$ nos experimentos de co-imunoprecipitação (Figura 17, marcado como “+RIC-8B” e “+RIC-8B+ $\beta_1\gamma_{13}$ ”). Podemos ver também que a presença de RIC-8B é necessária para a produção de AMPc (Figura 17, “+ $\beta_1\gamma_{13}$ ”). Por fim, uma vez que utilizamos o variante de *splicing* alternativo RIC-8B $\Delta 9$ como isca no ensaio de duplo híbrido que revelou a interação entre RIC-8B e $G\gamma 13$, decidimos avaliar seu efeito na produção de AMPc nesse modelo, entretanto a sua presença não provoca alterações nos níveis observados (Figura 17, “RIC-8B $\Delta 9$ + $\beta_1\gamma_{13}$ ”).

Figura 17 – $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ não interferem no aumento da produção de AMPc via $G\alpha_{olf}$ modulado por RIC-8B. Quantificamos o AMPc em células HEK293T transfectadas com vetores codificando para mOR-EG (A) ou mOR-I7 (B), $G\alpha_{olf}$ e as diferentes combinações indicadas no gráfico, foram incubadas com agonista (eugenol ou heptanal; em cinza) ou veículo (em branco).

Outra possibilidade que exploramos anteriormente é que RIC-8B auxilie no transporte de proteínas para a membrana celular (Von Dannecker *et al.*, 2006). Uma vez que RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ interagem formando um complexo funcional decidimos avaliar se RIC-8B interfere no transporte do heterotrímero para a membrana celular.

Para avaliar se a presença do heterotrímero altera o transporte de RIC-8B para a membrana preparamos extratos de membrana de células HEK293T transfectadas para a expressão de mOR-EG e RIC-8B. Comparamos a RIC-8B presente nesse extrato com a RIC-8B presente na preparação de membranas de

células que foram transfectadas para a produção de mOR-EG, RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$. O painel esquerdo da Figura 18 mostra que o heterotrîmero não afeta o direcionamento de RIC-8B para a membrana.

Avaliamos então se RIC-8B altera o transporte do heterotrîmero para a membrana celular. Comparamos a presença de $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ em preparações de membrana contendo estes, mOR-EG e tendo RIC-8B ou não. Podemos observar no painel esquerdo da Figura 18 que a presença de RIC-8B aumenta a quantidade de todos os componentes do heterotrîmero no extrato de membrana celular.

Figura 18 – RIC-8B auxilia no transporte de $G\alpha_{olf}$, $G\beta 1$ e $G\gamma 13$ para a membrana plasmática. Membranas preparadas com quantidades iguais de proteína de extrato de membrana de células HEK293T, expressando as proteínas indicadas na figura. Imunodeteção com anticorpos anti-FLAG e anti-myc.

5 – DISCUSSÃO

O sistema olfatório é responsável pela detecção de milhares de diferentes substâncias químicas dispersas no ar que podem ser de interesse para o organismo, como o cheiro de comida, de um predador ou de um companheiro. O início desse processo se dá no epitélio olfatório, no recesso posterior da cavidade nasal. O epitélio olfatório é composto por milhões de neurônios olfatórios, células de suporte e células basais (Figura 13A, esquema). Neurônios sensoriais olfatórios têm uma vida média de 45 dias e são constantemente repostos pelas células tronco da camada basal do epitélio olfatório.

Em mamíferos cada um desses neurônios sensoriais olfatórios expressam somente um dos vários receptores olfatórios presentes no repertório do animal. É impressionante que os axônios dos neurônios sensoriais olfatórios que expressam um mesmo receptor convergem para o mesmo ponto no bulbo olfatório (glomérulo) onde farão sinapse com neurônios mitrais, os quais integrarão esses impulsos levando para diferentes áreas corticais e límbicas.

A atividade e funcionalidade do receptor estão relacionadas a todos esses mecanismos. A atividade de um neurônio olfatório parece afetar o tempo de vida do mesmo (Watt *et al.*, 2004). Caso o neurônio sensorial olfatório expresse um receptor não funcional pode ocorrer a troca do receptor que está sendo expresso (Shykind *et al.*, 2004). O receptor expresso e a quantidade de AMPc endógeno, afetam diretamente o direcionamento do axônio para o glomérulo correto no bulbo.

Como se dá a ativação do neurônio olfatório? Quando um odorante que está disperso no ar se liga ao receptor, ocorre a ativação da proteína Golf. Esta ativação corresponde a troca de GDP por GTP na subunidade $G_{\alpha\text{olf}}$ que por sua vez estimula a produção de AMPc pela adenilil ciclase III. O aumento nos níveis de AMPc abrem

canais ativados por nucleotídeo cíclico, aumentando os níveis internos de Na^+ e Ca^{2+} , podendo levar a despolarização do neurônio e formação de um potencial de ação (Firestein,2001;Mombaerts,2004;Ronnelt & Moon,2002). Apesar de se conhecer bem os mecanismos da ativação do neurônio olfatório, pouco se sabe sobre a modulação dos mesmos.

A troca de GDP por GTP na subunidade $G\alpha$ e a hidrólise de GTP são pontos chave de regulação na atividade das proteínas G heterotriméricas. Estes processos podem ser regulados por proteínas ativadoras de GTPase (GAP) ou por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEF).

GAPs estimulam a capacidade hidrolítica da subunidade $G\alpha$, aumentando o retorno para o estado inativo, ligado a GDP. Por isso GAPs são consideradas reguladoras negativas da atividade de proteínas G. Algumas possíveis GAPs têm expressão no sistema olfatório, mas aparentemente não estão envolvidas na regulação da atividade de $G\alpha_{olf}$ (Norlin & Berghard,2001;Salim *et al.*,2003;Sinnarajah *et al.*,2001).

GEFs por sua vez estimulam a saída de GDP e entrada de GTP da subunidade $G\alpha$, agindo dessa forma como um regulador positivo da atividade de proteínas G. A interação entre RIC-8B e $G\alpha_{olf}$, bem como seu possível papel como uma GEF do sistema olfatório foram descritas por Von Dannecker (2005). Procurando por outras proteínas envolvidas nessa via de transdução de sinal utilizamos a RIC-8B Δ 9, uma variante de *splicing* alternativo da RIC-8B, num ensaio de duplo híbrido com uma biblioteca de epitélio olfatório. Como resultado desse ensaio identificamos a interação da RIC-8B Δ 9 com $G\gamma$ 13 e $G\gamma$ 8 (Tabela 2 e Figura 6).

G γ 13 e G γ 8 são ambas expressas no epitélio olfatório. G γ 8 apresenta expressão nos neurônios imaturos (Tirindelli & Ryba, 1996) enquanto G γ 13 é fortemente expresso na camada ciliar do epitélio olfatório de camundongos (Kulaga *et al.*, 2004; McEwen *et al.*, 2007).

Escolhemos RIC-8B Δ 9 como isca do ensaio, pois RIC-8B apresentou uma forte auto-ativação. Precisávamos então confirmar as interações observadas. Já foi mostrado também que RIC-8B co-localiza-se com G α olf na região dos gânglios basais no sistema nervoso central (Von Dannecker *et al.*, 2005). Uma vez que G γ 7 é a subunidade G γ presente nessa região e é capaz de interagir com G α olf (Schwindinger *et al.*, 2003), achamos interessante ver se esta também era capaz de interagir com RIC-8B.

Nosso ensaio de interação mostrou que tanto RIC-8B Δ 9, quanto RIC-8B são capazes de interagir com G γ 13, G γ 8 e G γ 7. Entretanto, somente RIC-8B interage com G α olf (Figura 6), como mostrado anteriormente.

O modelo clássico de ativação das proteínas G pressupõe que G β e G γ formam um dímero indissociável com o qual G α interage. Portanto era interessante determinar a subunidade G β presente nos neurônios olfatórios, para obter um modelo mais próximo da situação real. Já foi visto que G γ 13 é capaz de se associar com as 5 subunidades G β conhecidas (Blake *et al.*, 2001). Comparando os níveis de expressão das diferentes G β s conhecidas por RT-PCR de epitélio olfatório, observamos que a G β 1 está presente em maior quantidade nesse tecido (Figura 7). Nossos resultados de hibridização *in situ* (Figura 8) confirmam essa observação e mostram que G β 1 possui um padrão semelhante ao observado para RIC-8B e G α olf (Von Dannecker *et al.*, 2005). Blake e colaboradores (2001) mostraram que G γ 13 e

G β 1 co-imunoprecipitam e são capazes de ativar fosfolipase C em sistemas heterólogos. Além disso, a proteína G γ 13 é a mais divergente das subunidades G γ e foi identificada nas papilas gustativas co-expressando com G β 3 e G β 1 (Huang *et al.*,1999). Tudo isso parece apontar que G β 1 é realmente a subunidade G β do epitélio olfatório.

Sabe-se que G α olf (Jones & Reed,1989) e G γ 13 (Kulaga *et al.*,2004;McEwen *et al.*,2007) possuem forte expressão na camada ciliar do epitélio olfatório. Precisávamos avaliar se esse padrão era seguido por RIC-8B e G β 1. Para tanto, obtivemos e caracterizamos um anticorpo específico para RIC-8B (Figuras 9,10 e 11). Adquirimos também, anticorpos comerciais para G α olf, G β 1 e G γ 13. Fizemos a detecção de RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13 em extrato de cílios de neurônios olfatórios e epitélio olfatório total. As membranas foram preparadas com quantidades iguais de ambos os extratos e observamos que as três proteínas encontram-se concentradas nos cílios dos neurônios olfatórios (Figura 12).

Nossos experimentos de imunohistoquímica confirmaram a expressão de RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13 na camada ciliar do epitélio olfatório (Figura 13). Além disso, mostramos também que RIC-8B, G β 1 e G γ 13 se co-localizam nesse compartimento celular (Figura 13 B e C). Conseguimos assim confirmar que RIC-8B e G β 1 estão localizadas no mesmo compartimento celular que G α olf e G γ 13 e portanto as interações observadas anteriormente entre essas proteínas devem ter relevância biológica.

Uma vez que a isca utilizada para o ensaio de duplo híbrido apresentou auto-ativação, era importante que confirmássemos as interações observadas por um segundo método. Além disso, apesar de termos mostrado a presença de G β 1 no epitélio olfatório, faltava mostrar que ela fazia parte do complexo protéico. Portanto,

realizamos um experimento de *pull down* utilizando RIC-8B recombinante e um extrato de células HEK293T transfectadas para a produção de $G\alpha_{olf}$, $G\beta_1$ e $G\gamma_{13}$. Mostramos com esse ensaio que RIC-8B, $G\alpha_{olf}$, $G\beta_1$ e $G\gamma_{13}$ são capazes de interagir entre si, formando um complexo (Figura 15).

Os dados obtidos até agora nos permitem algumas considerações sobre como se dão essas interações do ponto de vista estrutural. As estruturas terciárias para a RIC-8B ou o heterotrímero que estamos estudando, ainda não foram resolvidas. Entretanto existem dados estruturais de outras proteínas G. A primeira estrutura de $G\alpha$ obtida foi da $G\alpha_{t1}$ (Noel *et al.*,1993), mas bons cristais do heterotrímero só foram obtidos para $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ (Wall *et al.*,1995; PDB:1GP2) e com quimeras da subunidade $G\alpha_{i1}/t1\beta_1\gamma_2$ (Lambright *et al.*,1996; PDB: 1GOT).

Temos indicado na estrutura de $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ (Figura 19) os sítios de miristoilação (no extremo N-terminal) e de ligação com o GPCR (no extremo C-terminal) da subunidade $G\alpha$ e de isoprenilação da subunidade $G\gamma$ (no extremo C-terminal) (Milligan &Kostenis,2006).

Figura 19 – Estrutura do heterotrímero $G\alpha i\beta 1\gamma 2$. $G\beta 1$ (azul), $G\gamma 2$ (roxo) e $G\alpha i$ (outras cores). Em vermelho, extremo C-terminal da $G\alpha i$ de sequência semelhante ao fragmento $G\alpha olf(352-381)$; em laranja, porção N-terminal da $G\alpha i$ de seqüências semelhantes aos fragmentos $G\alpha olf(1-42)$ e $G\alpha olf(72-188)$; em verde, restante da $G\alpha i$, aproximadamente a metade C-terminal da proteína.

Sabemos dos nossos resultados anteriores que a $G\alpha olf$ deve interagir com a região C-terminal da RIC-8B, pois na ausência do exon 9 da RIC-8B (RIC-8B Δ 9) essa interação não ocorre. Resultados anteriores do nosso laboratório apontaram como diferentes regiões da $G\alpha olf$ interagem com a RIC-8B (Tabela 3). Fazendo o alinhamento da $G\alpha olf$ e $G\alpha i$ encontramos as regiões correspondentes na $G\alpha i$ e estas estão indicadas na Figura 19. Em vermelho temos a região equivalente à $G\alpha olf(352-381)$, que interage fortemente com a RIC-8B sendo inclusive capaz de interagir com a RIC-8B Δ 9 também. Em laranja estão as regiões correspondentes à

G α olf(1-42) e G α olf(72-188) que não interagem com RIC-8B. Em verde o restante da G α i.

Tabela 3 – Interação da RIC-8B e RIC8B Δ 9 com fragmentos da G α olf.

Dados adaptados de Von Dannecker et al, 2005.

	G α olf(1-42)	G α olf(72-188)	G α olf(352-381),
RIC-8B	Não	Não	Sim
RIC8BΔ9	Não	Não	Sim

Em um complexo protéico semelhante ao apresentado, RIC-8B iria se inserir, interagindo tanto com G α olf e G γ 13. Uma vez que G γ 13 interage igualmente com RIC-8B e RIC-8B Δ 9 (Figura 6) podemos supor que esta interação independe do exon 9, podendo ocorrer em uma região diferente da utilizada por G α olf.

É curioso notar que o fragmento correspondente ao G α olf(352-381), em vermelho na Figura 19, está localizado na parte da G α exterior ao heterotrímero e afastada de G γ . Entretanto, não temos informações sobre a estrutura da RIC-8B sendo impossível considerar como ela estaria inserida nesse complexo. Além disso, a G α i1 é composta por 354 aminoácidos, enquanto que a G α olf, 381, podendo a estrutura, ou pelo menos o posicionamento de alguns segmentos, ser bastante diferente. É claro que apenas com a determinação empírica da estrutura de um complexo contendo o heterotrímero (G α olf β 1 γ 13) e RIC-8B poderíamos obter um resultado conclusivo a respeito de como estas 4 proteínas interagem entre si.

Nosso passo seguinte foi tentar identificar como se dão as interações entre RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13. Como comentado anteriormente, resultados do nosso

laboratório (Von Dannecker *et al.*,2005) sugeriram que a RIC-8B é uma provável GEF para $G\alpha_{olf}$. Algumas evidências suportam essa hipótese. Primeiro, RIC-8A foi caracterizada como uma GEF (Tall *et al.*,2003); apesar de RIC-8B e RIC-8A terem apenas 44% de semelhança na sequência de aminoácidos, ambas possuem diversos domínios conservados e é possível que tenham funções semelhantes. Segundo, RIC-8B é capaz de aumentar a produção de AMPc dependente de $G\alpha_{olf}$ em um modelo heterólogo (Von Dannecker *et al.*,2005).

Uma GEF se liga na proteína $G\alpha$ no estado inativo (ligada a GDP) e estimula a troca de GDP por GTP aumentando a atividade desta. Realizamos a co-imunoprecipitação da RIC-8B e $G\alpha_{olf}$, na presença de GDP ou GTP γ S, um análogo não hidrolisável do GTP. Verificamos que a RIC-8B interage mais intensamente com $G\alpha_{olf}$ na presença de GDP (Figura 16), resultado condizente com o esperado para uma GEF.

Repetimos o experimento de co-imunoprecipitação para RIC-8B e $G\alpha_{olf}$, mas agora na presença de $G\gamma 13$ e $G\beta 1$. Curiosamente, RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ permaneceram associados, independente da incubação com GDP ou GTP γ S. Isso indica que apesar de RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ interagirem entre si com menor intensidade quando $G\alpha_{olf}$ se encontra ativa (ligada a GTP), na presença de $G\gamma 13$ e $G\beta 1$ essas 4 proteínas formam um complexo cuja integridade independe do estado de ativação.

É importante notar que na presença de $G\gamma 13$ e $G\beta 1$ o complexo formado por RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ continua funcional como mostramos nos nossos resultados de medida de AMPc (Figura 17).

Já que a interação da RIC-8B com o heterotrímero independe do estado de ativação da $G\alpha$ lf como mostrado nos nossos resultados de co-imunoprecipitação, acreditamos que ela deve se manter ligada constantemente com $G\gamma$ 13 e sua interação com $G\alpha$ lf dependa do estado de ativação da proteína G. Propomos um modelo para essa via que está exposto na Figura 20. Neste modelo, as subunidades

$G\alpha$ e $G\beta\gamma$ não se dissociam completamente no estado ativado (presença de GTP). Alguns autores apontam que a ativação de algumas proteínas G não depende necessariamente da dissociação física das suas subunidades (Levitzki & Klein, 2002; Rebois *et al.*, 1997).

A formação desse complexo protéico funcional poderia permitir que $G\gamma$ 13 e $G\beta$ 1 atuem de forma a manter RIC-8B e $G\alpha$ lf próximas potencializando a atividade

de GEF da RIC-8B. Alguns membros da família de proteínas denominadas reguladores da sinalização por proteína G (RGS) atuam como moduladoras negativas de proteínas $G\alpha$. Essas RGS, que atuam como GAPs, apresentam domínios protéicos semelhantes a subunidades $G\gamma$ que permitem sua interação com a subunidade $G\beta 5$ (Jones *et al.*,2004). É sugerido que a interação de uma RGS com a subunidade $G\beta$ a manteria próxima da proteína $G\alpha$ potencializando sua ação reguladora. É interessante notar que tanto GAPs quanto GEFs podem interagir com diferentes membros da proteína G heterotrimérica permitindo uma maior proximidade e conseqüentemente maior controle sobre a ativação da $G\alpha$ envolvida.

Nossos resultados apontam fortemente que $G\gamma 13$ e $G\beta 1$ são as subunidades $\beta\gamma$ da proteína Golf e que favoreceriam a regulação de $G\alpha_{olf}$ pela RIC-8B, mantendo-as próximas, mesmo quando $G\alpha_{olf}$ está ativa. Entretanto, outros papéis para $G\gamma 13$ e $G\beta 1$ no neurônio olfatório ainda são uma incógnita. Sabe-se que $G\gamma 13$ e $G\beta 1$ são capazes de interagir entre si e ativar a fosfolipase C (Blake *et al.*,2001). A ativação de fosfolipase C, conseqüente produção de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) e ativação de canais, parecem ser importantes na transdução de sinal em neurônios gustativos (Huang *et al.*,1999) e em neurônios do órgão vomeronasal (Rünnenburger *et al.*,2002).

Inicialmente se acreditava que a produção de IP3 pudesse ser necessária para a ativação de alguns receptores olfatórios (Schandar *et al.*,1998). Entretanto, uma vez que camundongos *knock out* para componentes da via de AMPc não respondem a qualquer classe de odorante (Belluscio *et al.*,1998;Wong *et al.*,2000), é improvável que a via de IP3 seja relevante na detecção de odorantes. Apesar disso não está descartado que a via de IP3 atue sobre outros alvos nos neurônios olfatórios (Spehr *et al.*,2002).

Também não excluimos aqui a possibilidade que outras proteínas participem da via de sinalização em neurônio olfatório e o complexo apresentado pode ser maior ainda *in vivo* do que o observado aqui. Por exemplo, já foi visto que G γ 13 pode interagir com proteínas que possuem um domínio PDZ, o qual está presente em proteínas de sinapse (PSD95) e proteínas envolvidas no direcionamento e dobramento de outras proteínas (Li *et al.*,2006). Também já foi mostrado que a subunidade G β 5 pode interagir com proteínas que possuem um domínio GGL (G-*gamma like*) ao invés de com uma subunidade G γ tradicional e há indícios que talvez essa seja sua forma funcional *in vivo* (Jones *et al.*,2004). São vários trabalhos que vem mostrando a clássica via de ativação de proteínas G cada vez mais complexa e com mais membros que somente o tradicional heterotrímero.

Outro papel possível para RIC-8B é o de chaperona. Foi mostrado anteriormente que a co-expressão com RIC-8B aumenta a translocação de G α olf para a membrana de células HEK293T (Von Dannecker *et al.*,2006). Mostramos aqui que a presença de RIC-8B aumenta consideravelmente a quantidade de G α olf, G γ 13 e G β 1 na membrana de células HEK293T (Figura 18). O fato de RIC-8B, G α olf, G γ 13 e G β 1 formarem um complexo (Figura 15) reforça a idéia de que RIC-8B atue auxiliando na formação e transporte desse complexo para a membrana. Já foi mostrado que, em *Drosophila*, a proteína homóloga a RIC-8B é necessária para a translocação de G α i e G β 13F para a membrana celular (Hampoelz *et al.*,2005). Em *C. elegans*, a homóloga de RIC-8B é necessária para a determinação correta do plano de clivagem do embrião, essa função parece estar associada com interações de RIC-8 e subunidades da proteína G, bem como a capacidade de RIC-8 de direcionar essas subunidades ao local correto do embrião (Afshar *et al.*,2004). Recentemente foi mostrado que a proteína CEP290, localizada nas protuberâncias

dendríticas dos neurônios olfatórios, é necessária para o transporte correto de G α olf e G γ 13 para os cílios dos neurônios olfatórios (McEwen *et al.*, 2007). Além disso, McEwen (et al., 2007) mostrou que RPGR^{ORF15}, uma provável GEF, interage com CEP290 e sugere que ela pode regular o transporte do corpo basal para os cílios dos neurônios olfatórios. Nossos resultados de imunohistoquímica mostram a presença de RIC-8B nas protuberâncias dendríticas e dendritos dos neurônios olfatórios (Figura 14), isto, bem como a possível necessidade de uma GEF para o transporte celular em alguns pontos da célula ajuda a sustentar o papel de RIC-8B como uma chaperona.

Nossos resultados reforçam a hipótese de que RIC-8B é uma GEF atuando sobre G α olf. A maioria das GEFs interagem com proteínas G monoméricas como as GTPases da família das Ras (Cherfils & Chardin, 1999). Mostramos aqui que RIC-8B é capaz de interagir tanto com G α olf quanto G γ 13, o que a tornaria o primeiro exemplo de uma GEF capaz de interagir com uma proteína G heterotrimérica. Além disso, identificamos G β 1 como a subunidade β dos neurônios sensoriais olfatórios e mostramos que RIC-8B, G α olf, G β 1 e G γ 13 formam um complexo protéico funcional. RIC-8B atuaria auxiliando na formação e direcionamento de Golf para os cílios (Figura 21A) e, em contrapartida, G β 1 e G γ 13 manteriam RIC-8B próxima de G α olf, independente do seu estado de ativação. Acredita-se que a ativação de Golf pelos receptores olfatórios não é muito eficaz (Bhandawat *et al.*, 2005), entretanto o sistema olfatório detecta odorantes em baixíssimas concentrações. É possível que RIC-8B faça parte da maquinaria celular necessária para amplificar os sinais externos e permitir a sinalização pelos neurônios olfatórios (Figura 21B).

Figura 21 – Possíveis papéis para RIC-8B nos neurônios olfatórios. A – RIC-8B pode atuar como uma GEF para $G\alpha_{olf}$, e seria mantida próxima de seu alvo por interações com $G\gamma_{13}$ e $G\beta_1$. B – RIC-8B auxiliaria no transporte do heterotrímero Golf até os cílios dos neurônios olfatórios.

BIBLIOGRAFIA

- Ache BW & Young JM. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* (2005) **48**: pp. 417-430.
- Afshar K, Willard FS, Colombo K, Johnston CA, McCudden CR, Siderovski DP & Gönczy P. Ric-8 is required for gpr-1/2-dependent galpha function during asymmetric division of *c. elegans* embryos. *Cell* (2004) **119**: pp. 219-230.
- Belluscio L, Gold GH, Nemes A & Axel R. Mice deficient in g(olf) are anosmic. *Neuron* (1998) **20**: pp. 69-81.
- Bhandawat V, Reisert J & Yau K. Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science* (2005) **308**: pp. 1931-1934.
- Blake BL, Wing MR, Zhou JY, Lei Q, Hillmann JR, Behe CI, Morris RA, Harden TK, Bayliss DA, Miller RJ & Siderovski DP. G beta association and effector interaction selectivities of the divergent g gamma subunit g gamma(13). *J. Biol. Chem.* (2001) **276**: pp. 49267-49274.
- Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* (1991) **65**(1):pp. 175-187.
- Cherfils J & Chardin P. Gefs: structural basis for their activation of small gtp-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* (1999) **24**: pp. 306-311.
- Chidiac P & Ross EM. Phospholipase c-beta1 directly accelerates gtp hydrolysis by galphaq and acceleration is inhibited by gbeta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**: pp. 19639-19643.
- Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R & Jaenisch R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* (2004) **428**: pp. 44-49.

Feinstein P & Mombaerts P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* (2004) **117**: pp. 817-831.

Fields S & Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* (1994) **10**: pp. 286-292.

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

Godfrey PA, Malnic B & Buck LB. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2004) **101**: pp. 2156-2161.

Hampoelez B, Hoeller O, Bowman SK, Dunican D & Knoblich JA. Drosophila *ric-8* is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric g proteins. *Nat. Cell Biol.* (2005) **7**: pp. 1099-1105.

Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M & Margolskee RF. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates ip3 responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* (1999) **2**: pp. 1055-1062.

Ishii M & Kurachi Y. Physiological actions of regulators of g-protein signaling (rgs) proteins. *Life Sci.* (2003) **74**: pp. 163-171.

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

Jones MB, Siderovski DP & Hooks SB. The g betagamma dimer as a novel source of selectivity in g-protein signaling: ggl-ing at convention. *Mol. Interv.* (2004) **4**: pp. 200-214.

Katada T, Northup JK, Bokoch GM, Ui M & Gilman AG. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. subunit dissociation

and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J. Biol. Chem.* (1984) **259**: pp. 3578-3585.

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

Kozasa T. The structure of grk2-g beta gamma complex: intimate association of g-protein signaling modules. *Trends Pharmacol. Sci.* (2004) **25**: pp. 61-63.

Kulaga HM, Leitch CC, Eichers ER, Badano JL, Lesemann A, Hoskins BE, Lupski JR, Beales PL, Reed RR & Katsanis N. Loss of bbs proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat. Genet.* (2004) **36**: pp. 994-998.

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

Levitzki A & Klein S. G-protein subunit dissociation is not an integral part of g-protein action. *Chembiochem* (2002) **3**: pp. 815-818.

Li J, Ishii T, Feinstein P & Mombaerts P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature* (2004) **428**: pp. 393-399.

Li Z, Benard O & Margolskee RF. Ggamma13 interacts with pdz domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* (2006) **281**: pp. 11066-11073.

Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J & Axel R. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* (2006) **126**: pp. 403-413.

Malnic B, Godfrey PA & Buck LB. The human olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2004) **101**: pp. 2584-2589.

Malnic B, Hirono J, Sato T & Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* (1999) **96**: pp. 713-723.

McEwen DP, Koenekoop RK, Khanna H, Jenkins PM, Lopez I, Swaroop A & Martens JR. Hypomorphic *cep290/nphp6* mutations result in anosmia caused by the selective loss of g proteins in cilia of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2007) **104**: pp. 15917-15922.

Miller KG & Rand JB. A role for *ric-8* (synembryn) and *goa-1* (g(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *caenorhabditis elegans*. *Genetics* (2000) **156**: pp. 1649-1660.

Miller KG, Emerson MD & Rand JB. Galpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the gqalpha pathway in *c. elegans*. *Neuron* (1999) **24**: pp. 323-333.

Miller KG, Emerson MD, McManus JR & Rand JB. Ric-8 (synembryn): a novel conserved protein that is required for g(q)alpha signaling in the *c. elegans* nervous system. *Neuron* (2000) **27**: pp. 289-299.

Milligan G & Kostenis E. Heterotrimeric g-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* (2006) **147 Suppl 1**: p. S46-55.

Mombaerts P. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr. Opin. Neurobiol.* (2004) **14**: pp. 31-36.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J & Axel R. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* (1996) **87**: pp. 675-686.

Noel JP, Hamm HE & Sigler PB. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* (1993) **366**: pp. 654-663.

Norlin EM & Berghard A. Spatially restricted expression of regulators of G-protein signaling in primary olfactory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* (2001) **17**: pp. 872-882.

Rebois RV, Warner DR & Basi NS. Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins?. *Cell. Signal.* (1997) **9**: pp. 141-151.

Ressler KJ, Sullivan SL & Buck LB. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* (1993) **73**: pp. 597-609.

Ressler KJ, Sullivan SL & Buck LB. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* (1994) **79**: pp. 1245-1255.

Ronnett GV & Moon C. G proteins and olfactory signal transduction. *Annu. Rev. Physiol.* (2002) **64**: pp. 189-222.

Ryba NJ & Tirindelli R. A novel GTP-binding protein γ -subunit, γ 8, is expressed during neurogenesis in the olfactory and vomeronasal neuroepithelia. *J. Biol. Chem.* (1995) **270**: pp. 6757-6767.

Rünnenburger K, Breer H & Boekhoff I. Selective G protein $\beta\gamma$ -subunit compositions mediate phospholipase C activation in the vomeronasal organ. *Eur. J. Cell Biol.* (2002) **81**: pp. 539-547.

Salim S, Sinnarajah S, Kehrl JH & Dessauer CW. Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J. Biol. Chem.* (2003) **278**: pp. 15842-15849.

Schandrar M, Laugwitz KL, Boekhoff I, Kroner C, Gudermann T, Schultz G & Breer H. Odorants selectively activate distinct g protein subtypes in olfactory cilia. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**: pp. 16669-16677.

Schwindinger WF, Betz KS, Giger KE, Sabol A, Bronson SK & Robishaw JD. Loss of g protein gamma 7 alters behavior and reduces striatal alpha(olf) level and camp production. *J. Biol. Chem.* (2003) **278**: pp. 6575-6579.

Serizawa S, Miyamichi K & Sakano H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet.* (2004) **20**: pp. 648-653.

Shykind BM, Rohani SC, O'Donnell S, Nemes A, Mendelsohn M, Sun Y, Axel R & Barnea G. Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* (2004) **117**: pp. 801-815.

Sinnarajah S, Dessauer CW, Srikumar D, Chen J, Yuen J, Yilma S, Dennis JC, Morrison EE, Vodyanoy V & Kehrl JH. Rgs2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase iii. *Nature* (2001) **409**: pp. 1051-1055.

Spehr M, Wetzel CH, Hatt H & Ache BW. 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron* (2002) **33**: pp. 731-739.

Sulz L, Bacigalupo J. Role of nitric oxide during neurogenesis in the olfactory epithelium. *Biol Res.* (2006) **39**:589-99.

Tall GG, Krumins AM & Gilman AG. Mammalian ric-8a (synembryn) is a heterotrimeric galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* (2003) **278**: pp. 8356-8362.

Tirindelli R & Ryba NJ. The g-protein gamma-subunit g gamma 8 is expressed in the developing axons of olfactory and vomeronasal neurons. *Eur. J. Neurosci.* (1996) **8**: pp. 2388-2398.

Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA & Conn PM. Structure-activity relationships of g protein-coupled receptors. *Arch. Med. Res.* (1999) **30**: pp. 420-435.

Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vossall LB & Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* (1994) **79**: pp. 981-991.

Vassar R, Ngai J & Axel R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* (1993) **74**: pp. 309-318.

Von Dannecker LEC, Mercadante AF & Malnic B. Ric-8b, an olfactory putative gtp exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific g-protein α olf. *J. Neurosci.* (2005) **25**: pp. 3793-3800.

Von Dannecker LEC, Mercadante AF & Malnic B. Ric-8b promotes functional expression of odorant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2006) **103**: pp. 9310-9314.

Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG & Sprang SR. The structure of the g protein heterotrimer $g_i \alpha 1 \beta 1 \gamma 2$. *Cell* (1995) **83**: pp. 1047-1058.

Watt WC, Sakano H, Lee Z, Reusch JE, Trinh K & Storm DR. Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via mapk and creb. *Neuron* (2004) **41**: pp. 955-967.

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

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Súmula curricular

ANEXO II: Publicação resultante deste trabalho

Kerr DS, Von Dannecker LE, Davalos M, Michaloski JS, Malnic B. Ric-8B interacts with Galphaolf and Ggamma13 and co-localizes with Galphaolf, Gbeta1 and Ggamma13 in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol Cell Neurosci. 2008; 38(3):341-8.

ANEXO I

Súmula curricular

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Daniel Shikanai Kerr

Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 6 de setembro de 1978.

EDUCAÇÃO

Julho 2004 – Atual

Doutorado em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bettina Malnic

Projeto de Pesquisa: Caracterização da Proteína RIC-8B

Instituição: Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP)

2002 – 2004

Mestrado em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo

Projeto de Pesquisa: Papel da angiotensina na formação da memória

Instituição: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

1999-2001

Estágio de Iniciação Científica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Rejane Fior Chadi

Projeto de Pesquisa: Alterações neuroquímicas no hipocampo de ratos experimentalmente hipertensos

Instituição: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP)

1998-2001

Bacharelado em Ciências Moleculares

Instituição: Curso de Ciências Moleculares, Universidade de São Paulo (USP)

BOLSAS RECEBIDAS

Doutorado

Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de 2005 a 2009.

Mestrado

Bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de 2002 a 2004.

Iniciação Científica

Bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de 1998 a 2001.

PUBLICAÇÕES

Malnic B, **Kerr DS**. Using GEFs to Deorphanize Odorant Receptors. Chem Senses. 2008 Sep 26. doi:10.1093/chemse/bjn058

Kerr DS, Von Dannecker LE, Davalos M, Michaloski JS, Malnic B. Ric-8B interacts with Galphaolf and Ggamma13 and co-localizes with Galphaolf, Gbeta1 and Ggamma13 in the cilia of olfactory sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2008; 38(3):341-8.

Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, **Kerr DS**, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*. 2006; 50(2):308-13.

Bonini JS, Cammarota M, **Kerr DS**, Bevilaqua LR, Izquierdo I. Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005; 80(1):63-7.

Kerr DS, Bevilaqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Köhler CA, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;179(3):529-35.

Bonini JS, Rodrigues L, **Kerr DS**, Bevilaqua LR, Cammarota M, Izquierdo I. AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behav Pharmacol*. 2003;14(2):161-6.

Bevilaqua LR, **Kerr DS**, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*. 2003; 17(4):897-902.

Cammarota M, Bevilaqua LR, **Kerr D**, Medina JH, Izquierdo I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci*. 2003; 23(3):737-41.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Viola H, **Kerr DS**, Reichmann B, Teixeira V, Bulla M, Izquierdo I, Medina JH. Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol*. 2000; 22(3):259-67. Review.

ANEXO II

Publicação resultante deste trabalho:

Ric-8B interacts with Galphaolf and Ggamma13 and co-localizes with Galphaolf, Gbeta1 and Ggamma13 in the cilia of olfactory sensory neurons.

Ric-8B interacts with $G\alpha_{olf}$ and $G\gamma_{13}$ and co-localizes with $G\alpha_{olf}$, $G\beta_1$ and $G\gamma_{13}$ in the cilia of olfactory sensory neurons

Daniel S. Kerr, Luiz Eduardo C. Von Dannecker, Marcela Davalos, Jussara S. Michaloski, and Bettina Malnic*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CEP 05508-000, São Paulo, Brazil

Received 17 January 2008; revised 12 March 2008; accepted 17 March 2008
Available online 1 April 2008

Olfactory sensory neurons are able to detect odorants with high sensitivity and specificity. We have demonstrated that Ric-8B, a guanine nucleotide exchange factor (GEF), interacts with $G\alpha_{olf}$ and enhances odorant receptor signaling. Here we show that Ric-8B also interacts with $G\gamma_{13}$, a divergent member of the $G\gamma$ subunit family which has been implicated in taste signal transduction, and is abundantly expressed in the cilia of olfactory sensory neurons. We show that $G\beta_1$ is the predominant $G\beta$ subunit expressed in the olfactory sensory neurons. Ric-8B and $G\beta_1$, like $G\alpha_{olf}$ and $G\gamma_{13}$, are enriched in the cilia of olfactory sensory neurons. We also show that Ric-8B interacts with $G\alpha_{olf}$ in a nucleotide dependent manner, consistent with the role as a GEF. Our results constitute the first example of a GEF protein that interacts with two different olfactory G protein subunits and further implicate Ric-8B as a regulator of odorant signal transduction.
© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Olfactory neurons; Odorant receptors; Ric-8B; Synembryn; $G\gamma_{13}$; Guanine nucleotide exchange factor; G proteins; GEF; $G\beta_1$; $G\alpha_{olf}$

Introduction

Odorant signaling must be tightly regulated to allow animals to respond properly to the environmental chemical cues. Olfactory signal transduction is initiated at the cilia of olfactory sensory neurons by the binding of odorants to odorant receptors (ORs), which belong to a large family of G protein coupled receptors (Buck and Axel, 1991). Odorant binding to ORs leads to the activation of the associated heterotrimeric G protein, Golf. Once

activated, $G\alpha_{olf}$ exchanges GDP for GTP, the GTP-bound $G\alpha_{olf}$ subunit dissociates from the $G\beta/\gamma$ complex and activates adenylyl cyclase III, leading to increased intracellular levels of cAMP and opening of cyclic nucleotide gated channels. The resulting influx of Na^+ and Ca^{2+} ions ultimately leads to the generation of an action potential in the olfactory neuron axon (Firestein, 2001; Ronnett and Moon, 2002; Mombaerts, 2004).

Even though the major odorant signaling pathway components are already well known, not much is known about how the pathway is regulated. A key point of regulation in G protein-mediated signaling is the inter-conversion between the active GTP-bound and inactive GDP-bound states of the $G\alpha$ subunit, which can be controlled by regulatory proteins like GTPase Activating Proteins (GAPs) or Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs). GAPs catalyze the formation of the GDP-bound (OFF) state of the $G\alpha$ subunit, and therefore are considered to work as negative regulators of GPCR signaling. It has been previously shown that some members of the regulators of G protein signaling (RGS) family, which act as GAPs, are expressed in the olfactory sensory neurons, however, to date, no RGS was shown to be directly involved in the regulation of $G\alpha_{olf}$ (Norlin and Berghard, 2001; Sinnarajah et al., 2001). Actually, many of the known RGS proteins show GAP activity towards Gai/o or Gaq subunits, but few have been shown to be active towards $G\alpha_s$ like subunits (Willars, 2006).

GEFs have the opposite regulatory effect: they stimulate formation of the GTP-bound (ON) state of the $G\alpha$ subunit, and therefore are considered to work as positive regulators of GPCR signaling. We have previously described that Ric-8B, a putative GEF that is specifically expressed in olfactory sensory neurons, interacts with $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker et al., 2005) and amplifies OR signaling through $G\alpha_{olf}$ in HEK293T cells (Von Dannecker et al., 2006). These results indicate that Ric-8B plays an important role in the regulation of odorant signal transduction in olfactory sensory neurons.

Here we investigated the mechanisms of Ric-8B function. We show that Ric-8B, besides interacting with $G\alpha_{olf}$, also interacts with $G\gamma_{13}$. We also show that $G\beta_1$ is the $G\beta$ subunit which is predominantly expressed in the mature olfactory sensory neurons

Abbreviations: GEF, guanine nucleotide exchange factor; GPCRs, G protein coupled receptors; OR, odorant receptor; VNO, vomeronasal organ; Ric-8B, resistance to inhibitors of cholinesterase 8B; RGS, regulator of G protein signaling; GAP, GTPase activating protein; OMP, olfactory marker protein.

* Corresponding author. Fax: +55 11 38155579.

E-mail address: bmalnic@iq.usp.br (B. Malnic).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

and that the G β 1 protein is localized to the cilia of olfactory sensory neurons. Pull-down experiments indicate that Gaolf, G β 1 and G γ 13 are able to form a complex together with Ric-8B. Using antibodies raised against a Ric-8B peptide we show that the Ric-8B protein is enriched in the dendrites and cilia of olfactory sensory neurons. Our results show that Ric-8B assists in trafficking of these G protein subunits to the plasma membrane. Finally, we show that the interaction between Ric-8B and GDP-bound Gaolf is stronger than the interaction between Ric-8B and GTP-bound Gaolf, and that in the presence of G γ 13/G β 1, Ric-8B remains associated with Gaolf both in the ON and OFF states.

Results

Ric-8B interacts with G γ subunits

To identify new binding partners for Ric-8B a yeast-two-hybrid olfactory epithelium cDNA library was screened using Ric-8B Δ 9 as bait. A group of isolated clones encoded the G protein γ subunits G γ 13 and G γ 8. To determine whether these interactions are specific we used directed yeast-two-hybrid assays to test for Ric-8B and Ric-8B Δ 9 interactions with G γ 13, G γ 7 and G γ 8. As shown in Fig. 1, both Ric-8B and Ric-8B Δ 9 interact with the three G γ subunits, but only Ric-8B is able to interact with Gaolf, as previously demonstrated (Von Dannecker et al., 2005). These results indicate that the Ric-8B proteins are able to specifically interact with different G γ subunits, probably through a conserved structure shared by these proteins. The G γ 7 and G γ 8 subunits are however not expressed in mature olfactory sensory neurons, where Ric-8B and Gaolf are highly expressed. G γ 7 is widely expressed and abundant in the brain, mostly in the striatum, where it was shown to be associated with Gaolf function (Watson et al., 1994; Betty et al., 1998; Schwindiger et al., 2003). Ric-8B and Gaolf are also expressed in the striatum, but at lower levels than in the olfactory epithelium (Belluscio et al., 1998; Von Dannecker et al., 2005). G γ 8 is expressed only in immature olfactory sensory neurons (Ryba and Tirindelli, 1995). The G γ 13 protein, on the other hand, was detected in mature olfactory sensory neurons (Kulaga et al., 2004; Lin et al., 2007) and therefore, is more likely to be the binding partner for Ric-8B in these neurons.

Fig. 1. Ric-8B interacts with G γ subunits. A. Bait strains expressing full-length G γ 7, G γ 8, G γ 13 and Gaolf were mated with target strains expressing full-length Ric-8B Δ 9 and Ric-8B. X-gal was used to score positive interactions. pBait, which constitutively expresses a LexA bait fusion protein that interacts with the fusion protein from pTarget, was used as a positive control.

Fig. 2. Expression of G γ 13 in the olfactory system. A. Coronal sections through the olfactory epithelium from P21 mice were hybridized with antisense digoxigenin-labeled probes specific for G γ 13 and Ric-8B. B. G γ 13 and OMP probes hybridize to mature olfactory sensory neurons in the olfactory epithelium. C. Coronal sections through the mouse VNO were hybridized with antisense digoxigenin-labeled probes for G γ 13 or OMP. D. Magnified figures from regions of Fig. 2C. G γ 13 positive neurons are localized to the upper region of the epithelium, while OMP positive neurons are distributed over both the apical and basal regions of the epithelium.

G γ 13 expression in the olfactory system

We next explored the patterns of G γ 13 gene expression in the olfactory epithelium. *In situ* hybridization experiments were performed using digoxigenin-labeled probes and olfactory epithelium tissue sections from P21 mice. A strong hybridization signal for G γ 13 was detected in the olfactory epithelium, comparable to the intensities of signals obtained for Ric-8B (Fig. 2A). G γ 13 is expressed in mature olfactory sensory neurons located in the broad central area of the epithelium, but not in the basal layer that contains immature neurons (Fig. 2B).

We also examined whether G γ 13 is expressed in the vomeronasal organ (VNO). As shown in Fig. 2C, the G γ 13 probe hybridized to neurons in the vomeronasal epithelium. Interestingly, the hybridization signal was detected only in neurons located in the apical region of the epithelium, where Gai2 and V1R pheromone receptors are normally expressed (Dulac and Axel, 1995; Berghard and Buck, 1996), and not in neurons located in the basal region, where Gao and V2R pheromone receptors are expressed (Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997) (Fig. 2D). The olfactory marker protein (OMP) probe which hybridizes to all mature neurons in both regions of the vomeronasal epithelium, was used as a control (Fig. 2D). It is important to note, however, that unlike G γ 13, Gaolf and Ric-8B are not expressed in the VNO (Berghard and Buck, 1996; Von Dannecker et al., 2005), suggesting that G γ 13 plays a different role in this organ.

G β 1 is the major G protein β subunit expressed in the olfactory epithelium

G γ subunits are normally strongly associated with a particular G β subunit. We next determined which one of the five known G β subunit types (G β 1–G β 5) is predominantly expressed in the olfactory

epithelium, and therefore more likely to constitute the functional β subunit in olfactory neurons. RT-PCR analysis revealed that the G β 1 subunit is expressed in the olfactory epithelium at levels comparable to the levels of G γ 13, Ric-8B and G α olf expression, while the remaining four G β subunits are expressed at much lower levels (Fig. 3A). The expression of the G β subunits in the olfactory epithelium was also analyzed by *in situ* hybridization. The G β 1 probe strongly hybridized to mature olfactory sensory neurons all over the epithelium, while the G β 2–5 probes produced weak hybridization signals (Fig. 3B). These results indicate that the G β 1 subunit is the predominant G β subunit in olfactory sensory neurons and may form heterotrimers with G α olf and G γ 13. Accordingly, it has been demonstrated that G γ 13 is able to form a stable dimer with G β 1 subunits (Blake et al., 2001).

To determine the interactions between G α olf, G β 1, G γ 13 and Ric-8B we used the GST-pull-down assay. Recombinant Ric-8B fused to GST was bound to Glutathione–Sepharose and incubated with a protein extract prepared from HEK293T cells expressing G α olf, G β 1, and G γ 13. As shown in Fig. 3C, the three G protein subunits were retained by the immobilized GST-Ric-8B, indicating that G α olf, G β 1, G γ 13 can associate with each other and with Ric-8B.

Fig. 3. G β 1 is the major G β subunit expressed in the olfactory sensory neurons. A. RT-PCR analysis of G β 1– β 5 gene expression in the olfactory epithelium. Expression of the G γ 13, Ric-8B and G α olf genes was also analyzed. Expected sizes for G β 1–5 are respectively 1023 bp; 322 bp; 360 bp; 383 bp and 1062 bp. B. Coronal sections through the mouse olfactory epithelium were hybridized with antisense digoxigenin-labeled probes specific for G β 1–5. The lower panels show amplified regions from the respective upper panels. C. Binding of G α olf/G β 1/G γ 13 to Ric-8B was analyzed by GST-pull-down assay. HEK293T cells expressing myc-G α olf, FLAG-G β 1 and FLAG-G γ 13 were lysed and probed for interaction with immobilized Ric-8B fused to GST (+) or with a negative control of Glutathione–Sepharose beads only (–). Proteins bound to the GST-Ric-8B Glutathione–Sepharose or beads alone were detected by Western blot using anti-FLAG or anti-myc.

Fig. 4. Ric-8B enhances plasma membrane localization of G protein subunits. Equivalent amounts of membrane protein extracts prepared from HEK293T cells that had been transfected as indicated with mOR-EG, myc-G α olf, FLAG-Ric-8B, FLAG-G β 1 and FLAG-G γ 13 expression vectors were analyzed by immunoblot using anti-myc (for detection of G α olf) or anti-FLAG (for detection of Ric-8B, G β 1 and G γ 13). See text for details. The blots were normalized for protein loading by reprobing with the P2Y1 antibody (Santa Cruz, # sc-15203), which recognizes the P2Y1 purinergic receptor which is endogenously expressed in the plasma membrane of HEK293T cells (not shown).

Ric-8B enhances plasma membrane localization of G protein subunits

Since Ric-8B interacts with G protein subunits, which are normally localized to the cell membrane, we analyzed whether membrane localization of Ric-8B in HEK293T cells is enhanced when the G α olf, G β 1 and G γ 13 subunits are coexpressed in the same cells. To do this, membrane protein extracts were prepared from HEK293T cells expressing the different proteins and analyzed in Western blot experiments. The amounts of Ric-8B in membrane protein extracts prepared from cells expressing the olfactory receptor mOR-EG and Ric-8B alone, or mOR-EG, Ric-8B plus the three G protein subunits were basically the same (Fig. 4, left panel), indicating that Ric-8B is targeted to the membrane independently of the presence of the G protein subunits. We then analyzed whether membrane localization of G α olf, G β 1 and G γ 13 is enhanced when Ric-8B is coexpressed in the same cells. The amounts of G α olf, G β 1 and G γ 13 in the membrane protein extract prepared from cells expressing mOR-EG, Ric-8B plus the three G protein subunits is higher than in membrane protein extracts prepared from cells expressing mOR-EG plus the three G protein subunits and no Ric-8B (Fig. 4, right panel). These results are in agreement with previous immunofluorescence experiments which showed that Ric-8B enhances accumulation of G α olf in the cell periphery of HEK293T cells (Von Dannecker et al., 2006).

Ric-8B interacts with G α olf in a guanine nucleotide dependent manner

To examine the interactions between G α olf and Ric-8B in the inactive and active states we performed coimmunoprecipitation using extracts prepared from HEK293T cells expressing Ric-8B and G α olf, in the presence of excess GDP or GTP γ S, the non-hydrolyzable analog of GTP. Ric-8B interacts strongly with G α olf when GDP has been added in excess, but interacts poorly with G α olf when GTP γ S has been added in excess (Fig. 5). This result is consistent with the role of Ric-8B as a GEF (Tall et al., 2003).

Fig. 5. Interactions between Gαolf and Ric-8B in the ON and OFF states. Extracts prepared from HEK293T cells expressing FLAG-Ric-8B and myc-Gαolf or from cells expressing FLAG-Ric-8B, myc-Gαolf, Gβ1 and Gγ13 were incubated in the presence of excess GDP or GTPγS, as indicated. Gαolf was immunoprecipitated from the extracts using anti-myc and Ric-8B that coimmunoprecipitated with Gαolf was detected by immunoblotting using anti-FLAG. Immunoreactivities were normalized to the corresponding amount of immunoprecipitated Gαolf, which was detected using anti-myc. The graph shows the amount of Ric-8B bound to GDP-Gαolf divided by the amount of Ric-8B bound to GTPγS-Gαolf (ratio) in both situations.

When we performed the same experiment, but now using extracts from cells transfected with Ric-8B, Gαolf, Gβ1 and Gγ13, we observed that equivalent amounts of Ric-8B were coimmunoprecipitated with Gαolf, independently of the presence of GDP or GTPγS (Fig. 5). These results indicate that in the presence of Gβ1 and Gγ13, Ric-8B is kept in close proximity to its substrate, Gαolf, irrespective of the type of nucleotide that is bound to Gαolf. Importantly, Ric-8B retains its ability to amplify signal transduction through ORs when coexpressed with Gαolf, and Gβ1 and

Fig. 6. Ric-8B protein is enriched in the cilia of olfactory sensory neurons. Immunoblot analysis of protein extracts prepared from whole olfactory epithelium (OE) or purified olfactory cilia (cilia) using antibodies against α-Gαolf, α-Gβ1, α-Gγ13 and α-Ric-8B, as indicated. The molecular masses are given in kDa. Bands corresponding to Gαolf, Gβ1, Gγ13 and Ric-8B can be visualized in the cilia extracts.

Gγ13 in HEK293T cells (Supplementary Fig. 1), indicating that the interaction with Gβ1/Gγ13 does not block Ric-8B's activity.

Ric-8B and Gβ1 are localized to the cilia of olfactory sensory neurons

It is well known that Gαolf and Gγ13 are localized to the cilia of olfactory sensory neurons (Jones and Reed, 1989; Belluscio et al., 1998; Kulaga et al., 2004; McEwen et al., 2007). To determine the subcellular localization of the Ric-8B protein a polyclonal antiserum was raised against a Ric-8B peptide. Ric-8B antibodies were affinity purified and characterized (see Supplementary Fig. 2). We first used the Ric-8B antibodies to determine whether Ric-8B is present in olfactory cilia, together with Gαolf and Gγ13. Western blot experiments were performed where total olfactory epithelium protein extracts were compared with the equivalent amounts of ciliary protein extracts for the presence of Ric-8B, Gβ1, Gαolf and Gγ13 (Fig. 6). As expected, the Gαolf and Gγ13 proteins are

Fig. 7. Confocal images of olfactory epithelium sections immunostained with antibodies against Gαolf (A), Ric-8B (B–E), Gγ13 (F, H) or Gβ1 (I). A and B. High-magnification images showing Gαolf (A) and Ric-8B (B) labeling in the ciliary layer (CL) of the olfactory epithelium. C. Intense Ric-8B labeling can be seen in the dendritic knobs of the olfactory sensory neurons (arrows). D. Ric-8B immunostaining is also detected in the olfactory dendrites (open arrow). E–G. Sections which were double labeled with Ric-8B (red, E) and Gγ13 (green, F) antibodies show that Ric-8B and Gγ13 co-localize at the ciliary layer (G, merge). H–J. Sections which were double labeled with Gγ13 (green, H) and Gβ1 (red, I) antibodies show that Gβ1 and Gγ13 co-localize at the ciliary layer (J, merge). Cell nuclei are stained with DAPI (blue).

concentrated in the ciliary extracts. The purified Ric-8B antibody detected a single band only in the olfactory cilia preparation, indicating that Ric-8B is also concentrated in the ciliary extracts. In addition, we found that G β 1 is also concentrated in the cilia.

We next analyzed the spatial distribution of the Ric-8B protein on sections cut through the mouse olfactory epithelium. Immunostaining with the Ric-8B antibody yielded specific staining in the mature olfactory sensory neurons, with a strong labeling of the apical processes (Figs. 7B–D). Ric-8B staining co-localizes with that of G γ 13 staining, in the ciliary layer (Figs. 7E–G). We also checked the localization of G β 1 in the olfactory epithelium. G β 1 staining was observed in the ciliary layer and co-localizes with that of G γ 13 (Figs. 7H–J). Altogether, these results show that Ric-8B is present in the cilia of olfactory sensory neurons, together with G α olf, G γ 13 and G β 1.

Discussion

A GEF for a heterotrimeric G protein

To date, most of the known GEFs were shown to act on monomeric G proteins (Siderovski and Willard, 2005). The fact that Ric-8B is able to interact with two different types of G protein subunits (G α olf and G γ 13) strongly indicates that this GEF is involved in the regulation of a heterotrimeric G protein. Ric-8B displays a stronger interaction with G α olf in the presence of GDP than in the presence of GTP (Fig. 5), which is consistent with the role of a GEF: Ric-8B would bind to GDP-bound G α olf and catalyze the exchange of GDP for GTP. What are the consequences of Ric-8B binding to both G α olf and G γ 13? Once GTP is bound to G α olf, Ric-8B would be released from the complex. One possibility is that Ric-8B is kept in proximity to G α olf through its nucleotide independent interaction with G γ 13, resulting in a maximized efficiency in the regulation of G α olf by Ric-8B.

Interestingly, some members of the RGS family, which act as GAPs on G α subunits, have a G γ -like domain (GGL), through which they associate with G β 5 subunits. It has been suggested that by interacting with a G β subunit, these RGS proteins can be conveniently positioned to regulate G protein activity (Jones et al., 2004). Therefore, it is possible that both GAPs and GEFs can be positioned in proximity to their G α targets, through interaction with another subunit in the heterotrimeric complex.

Another possibility is that Ric-8B also works as a ‘chaperone’ like protein that assists in the assembly and membrane targeting of the heterotrimeric G protein complex. Consistent with this possibility, we show here that Ric-8B promotes increased accumulation of the G protein subunits in the plasma membrane of HEK293T cells (Fig. 4). Also, the fact that Ric-8B interacts with both a G α and a G γ subunit supports the idea that Ric-8B could work as an assembly factor that assists G α binding to G β / γ subunits. Coincidentally, it has been shown that the *Drosophila* Ric-8 is involved in membrane localization of G α and G β subunits (Hampoele et al., 2005). Interestingly, it was recently demonstrated that both G α olf and G γ 13 interact with CEP290, a protein localized to dendritic knobs in olfactory sensory neurons (McEwen et al., 2007). In mice carrying hypomorphic mutations in CEP290, G α olf and G γ 13 show defective ciliary localization, indicating that CEP290 plays an important role in the ciliary transport of these G protein subunits. It was also demonstrated that a putative GEF, RPGR^{ORF15}, interacts with CEP290 and may regulate the cargo transport from basal bodies to the cilia (McEwen et al., 2007). It is

therefore possible, that Ric-8B plays a similar role to promote G α olf and G γ 13 entry into the olfactory cilia.

G γ 13 subunit and chemical sensing

G γ 13 is expressed in taste cells, olfactory and vomeronasal neurons, and must therefore play important roles in chemical sensing. Signaling through G β γ subunits frequently involves activation of the downstream effector phospholipase C (PLC). Different studies indicate that signal transduction in both taste cells and vomeronasal neurons involves the PLC pathway. Tastants bind to the taste receptors T1Rs or T2Rs, activate G α gustducin leading to the release of the G β γ subunits, activation of PLC- β 2 (McLaughlin et al., 1992; Huang et al., 1999; Zhang et al., 2003), generation of the second messengers inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) and activation of the transient receptor potential channel TRPM5 (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003). Similarly, in apical vomeronasal neurons, pheromones bind to the pheromone receptors V1Rs, activate G α i2 (Berghard et al., 1996) leading to the activation of PLC (Holy et al., 2000; Lucas et al., 2003), generation of IP3 and DAG and activation of the transient receptor potential channel TRP2, which is specifically expressed in VNO neurons (Liman et al., 1999).

The involvement of PLC in odorant signal transduction is less clear. Initially, it was believed that two separate types of intracellular signaling pathways could be activated by different classes of odorants: the cAMP pathway and the IP3 pathway (Huque and Bruch, 1986; Sklar et al., 1986; Boekhoff et al., 1990; Ronnett et al., 1993). However, since mice that are knock-out for components of the cAMP pathway do not respond to odorants of any class (Brunet et al., 1996; Belluscio et al., 1998; Wong et al., 2000), it is unlikely that the IP3 pathway plays a primary role in odorant signal transduction. Thus, it seems that olfactory transduction is exclusively mediated by the cAMP pathway, although it is possible that the IP3 pathway plays a modulatory role (Spehr et al., 2002), or is involved in signaling in different types of cells in the olfactory epithelium (Gold, 1999; Elsaesser et al., 2005; Liberles and Buck, 2006; Lin et al., 2007).

The present results strongly indicate that G γ 13 and G β 1 subunits are likely to constitute the β / γ subunits in the Golf protein, and that one possible role played by G γ 13 in olfactory sensory neurons is to couple Ric-8B to G α olf, the G protein subunit on which this regulator must act, permitting efficient regulation of the signaling pathway. Whether there are additional downstream targets or functions for G γ 13 in the olfactory sensory neurons remains to be determined.

Possible roles played by Ric-8B in odorant signal transduction

The exact roles played by Ric-8B in olfactory sensory neurons remain unknown. Altogether, our results suggest two possible roles for Ric-8B *in vivo*. First, Ric-8B could act as an assembly factor that assists in the formation and membrane trafficking of the Golf protein complex. Consistent with this hypothesis, Ric-8B protein is not only abundant in the apical processes, but was also detected in the cell bodies and dendrites of the olfactory sensory neurons (Fig. 7). Interestingly, it has been recently demonstrated that coexpression of Ric-8B/G α olf with RTP1S (Receptor Transporting Protein 1 Short) in HEK293T cells results in an additional higher level of OR cell-surface expression than when RTP1S is expressed alone (Zhuang and Matsunami, 2007). Altogether, these results raise the possibility

that a preassembled complex containing OR, RTP1S, Golf and Ric-8B is more efficiently targeted to the cell surface than the isolated components of the complex.

Another possible role for Ric-8B is that it would act as a GEF on Gaolf to amplify odorant signal transduction through odorant receptors, as was shown to be the case *in vitro* (Von Dannecker et al., 2006). What would be the consequences of having an amplifying mechanism for olfactory signaling? It is believed that ORs are low affinity receptors (Bhandawat et al., 2005). However, it is well known that some odorants can be detected at very low concentrations, raising the possibility that proteins in the transduction machinery, like Ric-8B, can amplify weak signals elicited by odorant binding to ORs, and are ultimately responsible for the remarkable sensitivity of the olfactory sensory neurons.

Experimental methods

Yeast experiments

Yeast-two-hybrid screening was performed as previously described (Von Dannecker et al., 2005). The coding region of Ric-8BΔ9 (accession number AY940667) was used as bait to screen a mouse olfactory cDNA library, because the Ric-8B bait exhibited autoactivation of the reporters. Yeast interaction mating tests were performed as described (Von Dannecker et al., 2005).

In situ hybridization

In situ hybridization was performed according to Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser (1993) as previously described (Von Dannecker et al., 2005). Sections were hybridized with digoxigenin-labeled cRNA probes prepared from mouse Ric-8B and Gaolf (Von Dannecker et al., 2005), Gγ13 (full-length sequence, accession number AY029485), OMP and Gβ cDNAs (obtained as described in the RT-PCR section).

RT-PCR

RT-PCR experiments were performed as described by Von Dannecker et al. (2005) with 25 thermal cycles of 95 °C for 45 s, 57 °C for 45 s and 72 °C for 1 min. PCR products were analyzed in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide. The Gaolf and Ric-8B primers are the same ones used in Von Dannecker et al. (2005). The additional following primers were used: Gγ13 forward: ATGGAGGAGTGGGATGTGCC; Gγ13 reverse: TCATAGGATGGTGCACCTTGCC; β1 forward: ATGAGTGAACCTTGAC-CAGCTG; β1 reverse: TTAGTTCCAGATCTTGAGGAAG; β2 forward: CTCAAGATCTGGAACCTAACCCTC; β2 reverse: AAGCCAGCCCCCTG-GAGTTTC; β3 forward: GAGGCTAGAGGAAGAGGTGG; β3 reverse: GAAGCCAGGAGACTAGGAGC; β4 forward: ACCCTCTACCTTCTATTGTCAG; β4 reverse: GCACATAATCTACAGCATCACTT; β5 forward: ATGGCAACCGATGGGCTGC; β5 reverse: TTATGCCCAAACCTTAGG GTG.

Cell membrane preparation

For construction of the myc-tagged Gaolf construct, the full-length cDNA corresponding to mouse Gaolf was subcloned into the EcoRI/XhoI sites of the pExchange 4B expression vector (Stratagene), and for the construction of the FLAG-tagged Gγ13 and Gβ1 constructs, the full-length sequence corresponding to mouse Gγ13 or Gβ1 were respectively subcloned into the BamHI/XhoI and BamHI sites of pcDNA3.5F (Xu et al., 1998). 5×10^6 HEK-293T cells were transiently transfected with the expression vectors using Lipofectamine (Invitrogen) as previously described (Von Dannecker et al., 2005). 48 h later, partially purified

membranes were prepared by cell sonication and ultracentrifugation. Cells were washed three times with 5 ml PBS containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and then collected with 5 ml PBS containing 2 mM EDTA and 1 mM PMSF in 15 ml conical tubes. After centrifugation for 5 min at $200 \times g$ at room temperature, cells were washed twice with 5 ml PBS containing 1 mM PMSF. The pellet was then resuspended with 1 ml of cold lysis buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2.8 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, $1 \times$ protease inhibitor cocktail from SIGMA) and cells were sonicated three times during 1 min on ice. The lysate was then centrifuged for 10 min at $600 \times g$ and 4 °C to remove cell debris. The supernatant was reserved on ice and the pellet was sonicated again following the same procedure. Both supernatants were pooled and added to 100 mM NaCl and 50 μg/ml of MgSO₄. The suspension was then centrifuged for 1 h at $100000 \times g$ at 4 °C. The pellet was then washed with 2 ml of cold resuspension buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) and centrifuged again. The resulting pellet was resuspended with 300 μl of cold resuspension buffer, aliquoted and stored at –80 °C. Protein content was determined by Bradford analysis.

Immunoprecipitation

The cDNAs corresponding to the full-length sequence of mouse Gβ1 and Gγ13 were respectively subcloned into the BamHI or XhoI sites of pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen). 10^6 HEK293T cells were transfected with constructs for FLAG-Ric-8B and myc-tagged Gaolf with or without Gβ1 and Gγ13 expressing constructs as previously described (Von Dannecker et al., 2005). The amounts of DNA transfected were 4 μg for the myc-Gaolf and FLAG-Ric-8B constructs and 400 ng for the Gβ1 and Gγ13 constructs. Cells were lysed in 20 mM Tris–HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, $1 \times$ protease inhibitor cocktail (Sigma). For each transfection, equal amounts of cell lysates were incubated for 1 h with either 100 μM of GDP or with 100 μM of GTPγS. Lysates were then subjected to immunoprecipitation with anti-myc (5 μg, Sigma, M4439) for 1 h at 4 °C and the immunocomplexes were bound to protein G Sepharose (50 μl, Amersham Biosciences) for 1 h at 4 °C. Bound complexes were washed 3 times with lysis buffer, $1 \times$ with 50 mM Tris pH8.0 and subjected to immunoblotting using anti-FLAG (1:5000, Sigma, F3165) or anti-myc (1:2000).

Tissue culture cAMP detection

Cell transfection and cAMP detection were performed exactly as previously described (Von Dannecker et al., 2006), except that cells were transfected with 10 ng/well of vectors expressing Gβ1 and Gγ13 (and 100 ng of vectors expressing all the other constructs).

Olfactory cilia preparation

Olfactory cilia were prepared using the calcium shock method as previously described (Washburn et al., 2002). Briefly, olfactory turbinates were dissected from twenty C57BL/6J mice and washed three times in HBSS[–] solution (Invitrogen, Grand Island, NY) at 4 °C. The tissue was then incubated in 10 ml of HBSS[–] added with CaCl₂ to a final concentration of 10 mM and gently agitated for 20 min at 4 °C. The deciliated tissue was removed by centrifugation at $7700 \times g$ for 5 min and the supernatant containing the cilia was centrifuged at $27,000 \times g$ for 20 min. The cilia pellet was resuspended in 200 μl of TME buffer (10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 3 mM MgCl₂, 2 mM EDTA) containing 5% glycerol, aliquoted and stored at –70 °C.

Ric-8B antibody and Western blot

Equal amounts (15 μg) of whole olfactory epithelium or cilia protein extracts were separated using 8% SDS-PAGE followed by Western blot analysis according to standard procedures. For the separation of the small Gγ13

protein we used 12.5% Tricine–SDS–PAGE (Schagger and von Jagow, 1987). A rabbit polyclonal antibody against the Ric-8B peptide ELPSDKTTEKDTAL was ordered from Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX). Recombinant GST–Ric-8B protein was produced using the pGEX 2T vector (Amersham Biosciences) containing the Ric-8B cDNA and *E. coli* BL21 cells. For affinity purification, the antiserum was incubated with recombinant GST–Ric-8B protein immobilized on nitrocellulose. The bound antibodies were eluted with 100 mM glycine–HCl pH 2.5 for 5 min and immediately neutralized with 1 volume of 1 M Tris–HCl pH 8.0. The affinity purified Ric-8B antibody (0.15 µg/µl) was used at a 1:500 dilution. The Gaolf and Gγ13 antibodies (Santa Cruz, sc385 and sc26782) were respectively used at 1:300 and 1:500 dilutions.

Pull-down assay

10⁶ HEK293T cells were transfected with constructs for myc-tagged Gaolf, FLAG-tagged Gβ1 and FLAG-tagged Gγ13. 24 h after transfection cells were washed twice with PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 100 mM lactose) containing 1× protease inhibitor cocktail (Sigma). Total protein content was estimated by Bradford. 1300 µg of extract was pre-cleared with 200 µl of Glutathione–Sephacrose 4B in lysis buffer for 1 h. A 50 µl sample was saved and used as input. The pre-cleared extract was aliquoted in two samples containing 600 µg of protein each. Both samples were incubated for 2 h at 4 °C under gentle agitation, one of them was added with 20 µg of recombinant GST–Ric-8B immobilized in Glutathione–Sephacrose, the other one (negative control) was added with an equal volume of 50% Glutathione–Sephacrose. Samples were washed once with lysis buffer and 2 times with 20 mM Tris–HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25 mM lactose. Recovered proteins were separated using 12%/18% SDS–PAGE followed by Western blot analysis using anti-FLAG (1:5000) or anti-myc (1:2000).

Immunohistochemistry

Olfactory turbinates from 3 week old mice were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h, washed in PBS and equilibrated in 30% sucrose overnight at 4 °C. The tissue was embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) and 16–20 µm coronal sections were cut on a cryostat. Sections were air-dried, fixed in 95% ethanol for 1 min, washed 3 times with PBS, incubated in blocking solution (2% normal fetal bovine serum, 2% albumin and 0.25% Triton X-100 in PBS) for 1 h, and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in blocking solution. Primary Ric-8B antibodies, rabbit anti-Gaolf, goat anti-Gγ13 and rabbit anti-Gβ1 (Santa Cruz, sc-379) were used, respectively at 1:50, 1:100, 1:50 and 1:50. Sections were washed three times in PBS, and incubated with the secondary antibodies (1:500, goat Alexa488–anti-rabbit, donkey Alexa488 anti-goat or donkey Alexa594 anti-rabbit, Molecular Probes, Invitrogen) in blocking solution for 2 h at room temperature, washed (the first washing solution contained 0.2 µg/ml DAPI) and mounted in 90% glycerol and 1 mg/ml *p*-phenylenediamine in PBS pH 8.6. The staining was analyzed using a LSM 510 META confocal laser scanning microscope from Carl Zeiss.

Acknowledgments

We would like to thank Jean-Pierre Montmayeur and Isaías Glezer for critically reading the manuscript. We are also grateful to Adriana Matsukuma for help with the acquisition of confocal microscope images. We would also like to thank Erica Bandeira and Edson Alves Gomes for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mcn.2008.03.006.

References

- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., Axel, R., 1998. Mice deficient in G (olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69–81.
- Berghard, A., Buck, L., 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for Gα_o, Gα_{i2}, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J. Neurosci.* 16, 909–918.
- Berghard, A., Buck, L.B., Liman, E.R., 1996. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2365–2369.
- Betty, M., Harnish, S., Rhodes, K., Cockett, M., 1998. Distribution of heterotrimeric G-protein β and γ subunits in the rat brain. *Neuroscience* 85, 475–486.
- Bhandawat, V., Reisert, J., Yau, K.W., 2005. Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science* 308, 1931–1934.
- Blake, B., Wing, M., Zhou, J., Lei, Q., Hillmann, J., Behe, C., Morris, R., Harden, T., Bayliss, D., Miller, R., Siderovski, D., 2001. Gb association and effector interaction selectivities of the divergent Gg subunit Gg13. *J. Biol. Chem.* 276, 49267–49274.
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., Breer, H., 1990. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* 9, 2453–2458.
- Brunet, L.J., Gold, G.H., 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.
- Dulac, C., Axel, R., 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195–206.
- Elsaesser, R., Montani, G., Tirindelli, R., Paysan, J., 2005. Phosphatidylinositol signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2692–2700.
- Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218.
- Gold, G., 1999. Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 857–871.
- Hampelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., Knoblich, J.A., 2005. *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* 7, 1099–1105.
- Herrada, G., Dulac, C., 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90, 763–773.
- Holy, T., Dulac, C., Meister, M., 2000. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science* 289, 1569–1572.
- Huang, L., Shanker, Y., Dubauskaite, J., Zheng, J., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A., Max, M., Margolskee, R., 1999. Gγ13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* 2, 1055–1062.
- Huque, T., Bruch, R., 1986. Odorant and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in the olfactory cilia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 37–42.
- Jones, D.T., Reed, R.R., 1989. Golf: an olfactory neuron-specific G-protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790–795.
- Jones, M., Siderovski, D., Hooks, S., 2004. The Gβγ13 dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. *Mol. Interv.* 4, 200–214.
- Kulaga, H., Leitch, C., Eichers, E., Badano, J., Lesemann, A., Hoskins, B., Lupski, J., Beales, P., Reed, R., Katsanis, N., 2004. Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat. Genet.* 36, 994–998.
- Liberles, S., Buck, L., 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442, 645–650.
- Liman, E.R., Corey, D.P., Dulac, C., 1999. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5791–5796.
- Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S., Restrepo, D., 2007. Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5)

- are involved in sensing semiochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2471–2476.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2003. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in *TRPC2* mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551–561.
- Matsunami, H., Buck, L., 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90, 775–784.
- McEwen, D., Koenekoop, R., Khanna, H., Jenkins, P., Lopez, I., Swaroop, A., Martens, J., 2007. Hypomorphic CEP290/NPHP6 mutations result in anosmia caused by the selective loss of G proteins in cilia of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15917–15922.
- McLaughlin, S., McKinnon, P., Margolskee, R., 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 563–569.
- Mombaerts, P., 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat. Rev., Neurosci.* 5, 263–278.
- Norlin, M., Berghard, A., 2001. Spatially restricted expression of regulators of G-protein signaling in primary olfactory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 872–882.
- Perez, C., Huang, L., Rong, M., Kozak, J., Preuss, A., Zhang, H., Max, M., Margolskee, R., 2002. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat. Neurosci.* 5, 1169–1176.
- Ronnett, G.V., Moon, C., 2002. G proteins and olfactory signal transduction. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 189–222.
- Ronnett, G.V., Cho, H., Lester, L.D., Wood, S., Snyder, S., 1993. Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures. *J. Neurosci.* 13, 1751–1758.
- Ryba, N.J., Tirindelli, R., 1995. A novel GTP-binding protein $\gamma\gamma$ -subunit, $\text{G}\gamma 8$, is expressed during neurogenesis in the olfactory and vomeronasal epithelia. *J. Biol. Chem.* 270, 6757–6767.
- Ryba, N.J., Tirindelli, R., 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19, 371–379.
- Schaeren-Wiemers, N., Gerfin-Moser, A., 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100, 431–440.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine–sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schwindiger, W., Betz, K., Giger, K., Sabol, A., Brinson, S., Robishaw, J., 2003. Loss of G protein $\gamma\gamma 7$ alters behavior and reduces striatal $\alpha(\text{olf})$ level and cAMP production. *J. Biol. Chem.* 278, 6575–6579.
- Siderovski, D., Willard, F., 2005. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 51–66.
- Sinnarajah, S., Dessauer, C.W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J.C., Morrison, E.E., Vodyanoy, V., Kehrl, J.H., 2001. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409, 1051–1055.
- Sklar, P.B., Anholt, R.R.H., Snyder, S.H., 1986. The odorant-sensitive adenylyl cyclase of olfactory receptor cells: differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* 261, 15538–15543.
- Spehr, M., Wetzel, C., Hatt, H., Ache, B., 2002. 3-Phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron* 33, 731–739.
- Tall, G.G., Krumins, A.M., Gilman, A.G., 2003. Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric $\text{G}\alpha$ protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278, 8356–8362.
- Von Dannecker, L., Mercadante, A., Malnic, B., 2005. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein $\text{G}\alpha\text{olf}$. *J. Neurosci.* 25, 3793–3800.
- Von Dannecker, L., Mercadante, A., Malnic, B., 2006. Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9310–9314.
- Washburn, K., Turner, T., Talamo, B., 2002. Comparison of mechanical agitation and calcium shock methods for preparation of a membrane fraction enriched in olfactory cilia. *Chem. Senses* 27, 635–642.
- Watson, J., Coulter, P.N., Margulies, J., de Lecea, L., Danielson, P., Erlander, M., Sutcliffe, J., 1994. G protein $\gamma 7$ subunit is selectively expressed in medium-sized neurons and dendrites of the rat neostriatum. *J. Neurosci. Res.* 39, 108–116.
- Willars, G., 2006. Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 363–376.
- Wong, S.T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G.C.K., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G.H., Storm, D.R., 2000. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487–497.
- Xu, L., Gonzales-Agosti, C., Beauchamp, R., Pinney, D., Steenen, 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, 240–321.
- Zhang, Y., Hoon, M., Chandrashekar, J., Mueller, K., Cook, B., Wu, D., Zuker, C., Ryba, N., 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293–301.
- Zhuang, H., Matsunami, H., 2007. Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 15284–15293.