INSTHUTO DE QUÍNICA Universidade de São Paulo 21273

1 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR OLFATÓRIO M93 EM SISTEMAS HETERÓLOGOS

Guilherme Louzada Silva Meira

Dissertação de Mestrado submetida ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Orientadora: Bettina Malnic

São Paulo

05 de novembro de 2004



30100010502

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Meira, Guilherme Louzada Silva M514a Análise da expressão do receptor olfatório M93 em sistemas heterólogos / Guilherme Louzada Silva Meira. -- São Paulo, 2004. 68p.

> Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador : Malnic, Bettina

> 1. Receptores : Biologia molecular I. T. II. Malnic, Bettina, orientador.

574.88 CDD

BIBLIOTECA INSTITUTO DE QUÍMICA Universidade de São Paulo

"Análise da expressão do receptor olfativo M93 em sistemas heterólogos"

GUILHERME LOUZA SILVA MEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. BETTINA MALNIC IQ – USP (Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ALEXANDER HENNING ULRICH

Prof. Dr. LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITTO ICB - USP

> SÃO PAULO 13 DE DEZEMBRO DE 2004.

Aos meus pais, Luiz e Nelma, pelo amor, carinho e pela dedicação a ensinar e preparar os filhos para o caminho chamado vida

Aos meus irmãos, Felipe e Leonardo, por todos os anos que compartilhamos, pelo crescimento e amadurecimento, pelas alegrias e tristezas que vivemos juntos.

Aos meus avós, Altamira e Mucio, pelas conversas, carinho, pela preocupação constante com seus netos, pelos lanches e por me acolher em sua casa nos jogos do Flamengo no Maracanã.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Bettina Malnic, pela coragem em me receber para começar esse árduo trabalho chamado mestrado, pela orientação, dedicação, paciência no ensino das técnicas utilizadas no laboratório, pelas correções minuciosas dos relatórios, resumo e desta dissertação, pelos conselhos e ensinamentos e pela amizade.

Aos meus amigos do laboratório, pessoas com quem passo ou passei a maior parte do dia, durante esses dois anos espetaculares: Adriana, Ana, Carina, Daniel, Edson, Jussara, Luiz, Pedro. Obrigado pela simpatia ao me receberem, pela paciência nos primeiros meses, pelas incontáveis ajudas, pelas discussões sobre ciência e pesquisa, pelas histórias, piadas, risadas, pela amizade...

Ao Prof. Bayardo Baptista Torres e Prof. Edson Rodrigues pelas dúvidas tiradas antes de prestar a prova de ingresso na bioquímica.

Aos Professores Robert Ivan Schumacher, Shaker Chuck Farah e Frederico José Gueiros Filho pelas críticas e sugestões feitas no exame de qualificação.

Aos meus companheiros de casa, Carina e Júlio, pela boa convivência, conversas, companhia e amizade.

Ao pessoal do laboratório da Prof. Alícia Juliana Kowaltowski, pela companhia, histórias e bolos de aniversário.

Aos meus antigos amigos, pessoas que eu não vejo mais no cotidiano mas que a amizade fixou suas raízes. Meus amigos de faculdade, meus amigos de São José dos Campos.

As pessoas que se tornaram minhas amigas nesses dois anos, pela companhia, convivência, pelo almoço e pelas novas festas. Meus amigos da USP, principalmente a galera daqui do departamento.

Enfim, a todas as pessoas de bom coração com quem convivi durante esses dois árduos e maravilhosos anos.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo apoio financeiro.

BIBLIOTECA INSTITUTUCA

ÍNDICE

ABRI	EVIAÇÕES
ABST	`RACT
RESU	MO
INTR	ODUÇÃO
1.1-	Sistema olfatório
1.2-	Receptores olfatórios (ORs)
1.3-	Expressão de ORs em sistemas heterólogos
1.4-	Interações realizadas pelos ORs e outros GPCRs
OBJE	TIVOS
MATI	ERIAIS
1)	Plasmídeos pUGs
2)	Linhagens de levedura com marcadores de localização celular
3)	Vetores utilizados para o sistema de duplo híbrido em levedura
4)	Linhagens de levedura utilizadas para o sistema de duplo híbrido
5)	Meios utilizados para o crescimento de leveduras
MÉTO	DDOS
I) Con	strução de vetores para expressão do OR M93 em levedura
1)	Construção dos plasmídeos
2)	Transformação dos plasmídeos (pUG23 e pUG34) em levedura
3)	Crescimento e indução da linhagem de levedura EGY 48
4)	Crescimento da linhagem HHF2/YNL030W
5)	Microscopia de fluorescência
II) O s	istema de duplo híbrido em levedura
1)	Construção das iscas
2)	Caracterização das iscas
3)	Varredura utilizando o sistema de duplo-híbrido
4)	Sequenciamento e identificação dos insertos
III) Hi	bridação <i>in situ</i>
1)	Preparação das sondas
2)	Preparação das lâminas do epitélio olfatório (OE) de camundongo
3)	Ensaio de hibridação in situ

RESULTADOS	38
(I) Construção dos vetores para expressão do OR M93 em levedura	38
1) Construção dos vetores (pUGs)	38
2) Crescimento e análise dos vetores construídos em levedura	41
3) Análise da sublocalização do ORM93 expresso em levedura	4 1
(II) Varredura da biblioteca de OE de camundongo	42
1) Construção e caracterização das iscas	42
2) Varredura da biblioteca	45
3) Análise dos clones obtidos	49
4) Análise das proteínas identificadas	52
5) Hibridação in situ	52
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CURRICULUM VITAE	69
	γ^{*}

ABREVIAÇÕES

- AMPc = adenosina monofosfato cíclica
- Amp = ampicilina
- BSA = albumina de soro bovina
- CIP = fosfatase alcalina de intestino bovino
- cfu= unidade de formação de colônias
- DO = densidade óptica
- EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético
- FACS = sorteamento de células ativadas pela fluorescência
- $GABA_BR1 = receptor 1$ para ácido γ aminobutirico
- $GABA_BR2 =$ receptor 2 para ácido γ aminobutirico
- GDP = guanosina bifosfato
- GFP = proteína fluorescente verde
- GPCRs= receptores acoplados à proteína G
- GRKs = quinases de receptores acoplados a proteína G
- GTP = guanosina trifosfato
- HEK 293 = linhagem de células embrionárias de rim humano
- H4 = proteína histona 4
- YFP = proteína fluorescente amarela
- mGLUR5 = receptores metabotrópicos de glutamato
- MHC = complexo principal de histocompatibilidade
- OB = bulbo olfatório
- OC = córtex olfatório
- OE = epitélio olfatório
- OR = receptor olfatório
- PBS= tampão de fosfato salino
- PCR = reação em cadeia da polimerase
- RE= retículo endoplasmático
- SSC = solução estoque
- T1Rs e T2Rs = receptores gustativos
- V2R = receptores de feromônio
- β -AR = receptores β adrenérgicos

ABSTRACT

The mammalian olfactory system can discriminate thousands of odorants present in the environment. Approximately 1000 different olfactory receptors (ORs) are expressed in the olfactory epithelium (OE) of the nose. The ORs detect odorants and transmit the resulting signals to the olfactory bulb (OB) of the brain. ORs belong to the G-proteincoupled receptor (GPCR) super family and have seven putative transmembrane domains. For unknown reasons, the ORs are retained in the endoplasmatic reticulum when expressed in heterologous mammalian cell lines. Probably accessory proteins are required for the sorting of the ORs to the cell surface. In the present work, we used the OR M93 to study the mechanisms of OR expression. Our goals were to (1) construct an expression vector for OR M93 in fusion with GFP in yeast and (2) to identify proteins expressed in the mouse OE that interact with ORs. The analysis by fluorescence microscopy suggested that OR M93 in fusion with GFP was retained in the endoplasmic reticulum (ER) of yeast. We used the yeast two-hybrid system to screen a mouse OE cDNA library with a bait corresponding to the N-terminal region of the OR M93. Four potential candidates were identified: HLA-B associated transcript 3 (BAT-3/Scythe), transmembrane 4 superfamily (CD82 member), transmembrane 4 superfamily (TSPN-3 member) and syndecan (SDC2). In situ hybridization analysis suggests that OAP-1 protein represents the best candidate for interaction with OR M93. We suggest the OAP-1 protein could be an accessory protein required for the sorting of the ORs to the cell surface in heterologous cell lines.

RESUMO

BIBLIOTECA INSTITUTO DE QUÍMICA

O sistema olfatório de mamífero pode discriminar milhares de odores presentes no meio ambiente. Aproximadamente 1000 diferentes receptores olfatórios (ORs) são expressos no epitélio olfatório (OE) do nariz. Os ORs detectam os odores e transmitem os sinais resultantes para o bulbo olfatório (OB) no cérebro. Os ORs pertencem a super família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) e apresentam sete domínios transmembrânicos putativos. Por razões desconhecidas, os ORs são retidos no retículo endoplasmático quando expressos em linhagens de células de mamíferos heterólogas. Provavelmente, proteínas acessórias sejam requeridas para o endereçamento dos ORs para a superfície celular. No presente estudo, utilizamos o OR M93 para estudar os mecanismos de expressão de um OR. A dissertação teve como objetivos específicos: (1) construção de um vetor para expressão do OR M93 em fusão com GFP em levedura e análise de sua localização celular; (2) identificar proteínas expressas no epitélio olfatório de camundongo que interajam com os ORs. A análise por microscopia de fluorescência revelou que a expressão do OR M93 fusionado a GFP demonstrou um padrão de fluorescência que sugere a retenção do OR M93 no retículo endoplasmático. Nós utilizamos o sistema de duplo híbrido em levedura para varrer uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo com uma isca correspondente à região Nterminal do OR M93. Quatro proteínas candidatas foram identificadas: HLA-B associado ao transcrito 3 (BAT-3/ Scythe), superfamília transmembrana 4 (membro CD82), superfamília transmembrana 4 (membro OAP-1) e sindecan (membro SDC2) ("GenBank accession numbers": BC026647, D14883, BC043072 e BC047144). A análise da hibridação in situ destas proteínas, revelou que a proteína OAP-1 é a melhor candidata a interação com OR M93. Dessa maneira, nós indicamos a proteína OAP-1 como possível proteína candidata a auxiliar o OR a ser expresso de maneira funcional em sistemas heterólogos.

INTRODUÇÃO:

1.1 Sistema Olfatório

Para a maioria dos mamíferos o sentido principal é o olfato. O olfato informa aos organismos sobre os compostos químicos presentes no meio ambiente. O sistema olfatório pode detectar e distinguir um vasto número de substâncias químicas voláteis denominadas odores. Muitos animais utilizam esse sentido para identificar uma presa, um predador, ou um companheiro apto à reprodução (Axel, 1995).

A discriminação de odores pelo sistema olfatório ocorre em estruturas anatômicas distintas através das quais a informação sensorial é progressivamente processada: o epitélio olfatório, onde os neurônios olfatórios detectam as moléculas odorantes; o bulbo olfatório do cérebro, o local que recebe a transmissão dos sinais; e estruturas superiores do cérebro, como o córtex piriforme que recebe a informação do bulbo olfatório e a transfere a outras regiões do cérebro (Fig. 1).



Fig. 1: Representação esquemática do sistema olfatório de camundongo. OE= epitélio olfatório; OB= bulbo olfatório; OC= córtex olfatório.

O epitélio olfatório é composto por neurônios olfatórios, células de suporte e células basais. Os neurônios olfatórios são bipolares, têm tempo de vida estimado em cerca de 30-60 dias e são repostos continuamente pelas células basais do epitélio. Do seu pólo apical estende-se um único dendrito que contêm cílios em sua extremidade, do seu pólo basal é projetado um único axônio que atravessa a placa cribiforme, formando sinapses com os neurônios do bulbo olfatório, chamados de células mitrais. Glomérulos são regiões de sinapse entre os axônios dos neurônios olfatórios e os dendritos das células mitrais.

Os odores entram pela cavidade nasal e são dissolvidos no muco, sendo detectado pelos receptores olfatórios (ORs) expressos nos cílios dos neurônios olfatórios. A ligação do odor ao OR causa uma cascata de eventos que geram sinais elétricos que através dos axônios são transmitidos às células mitrais do bulbo olfatório (Buck, 1996). Do bulbo olfatório esses sinais são levados a diferentes regiões do cérebro. Por fim, a informação chega às áreas mais elevadas do córtex cerebral, relacionadas com a percepção consciente do odor e ao sistema límbico, envolvido com as respostas emocionais (Buck, 2000).

1.2 Receptores Olfatórios (ORs)

Uma grande família gênica que codifica para aproximadamente 1000 receptores olfatórios (ORs), expressos nos cílios dos neurônios olfatórios, foi identificada em camundongos (Buck e Axel, 1991). Os genes que codificam para ORs constituem a maior família gênica em mamíferos, distribuídos por quase todos os cromossomos (Zozulya *et al.*, 2001; Zhang & Firestein, 2002; Malnic *et al.*, 2004; Godfrey *et al*; 2004). Os ORs fazem parte da superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Buck & Axel, 1991), portanto apresentam sete hélices transmembrânicas putativas, uma região amino-terminal e três alças voltadas para o meio extracelular, além de um domínio carboxi-terminal e três alças citoplasmáticas (Firestein, 2001; Mombaerts, 2001) (Fig. 2).



Fig. 2: Representação esquemática de um OR. Os resíduos mais conservados entre os diferentes membros da família de ORs são mostrados em vermelho.

Apesar dos ORs compartilharem motivos característicos, eles são bastante diversos entre si em relação as suas seqüências de aminoácidos. Essas características permitem aos ORs, a capacidade de reconhecer uma grande quantidade de odores diferentes.

Estudos de hibridação *in situ* revelaram que cada gene de OR é expresso em $\sim 1/1000$ dos neurônios olfatórios, sugerindo que cada neurônio deve expressar somente um único tipo de OR (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993). Esses resultados foram confirmados por RT-PCR em células únicas (Malnic *et al.*, 1999).

Esses mesmos estudos de hibridação *in situ*, demonstraram que o epitélio olfatório de camundongo é dividido em quatro zonas distintas de expressão de ORs. Os neurônios que expressam iguais ORs estão localizados em uma mesma zona. Porém, dentro de uma mesma zona considerada, esses neurônios estão randomicamente distribuídos (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993).

Estudos de projeção axonal dos neurônios olfatórios resultaram na descoberta de que os axônios dos neurônios que expressam o mesmo tipo de OR convergem para um ou dois glomérulos do bulbo olfatório (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996). Dessa maneira, embora os neurônios olfatórios que expressam um mesmo OR estejam randomicamente distribuídos no epitélio olfatório, seus axônios convergem para um ou poucos locais (glomérulos) do bulbo olfatório, permitindo a elaboração de um mapa topográfico sensorial onde cada um dos 1.000 ORs está representado (Buck, 1996) (Fig. 3).



Fig. 3: Representação esquemática da organização do sistema olfatório. No epitélio olfatório, cada OR pode ser expresso em uma dentre as quatro zonas existentes (zona I-IV). Os axônios dos neurônios de uma das zonas, que expressam o mesmo tipo de OR convergem em um mesmo glomérulo no bulbo olfatório. Os neurônios do bulbo fazem sinapses com neurônios de outras regiões do cérebro.

Os odores são compostos orgânicos voláteis presentes no meio ambiente. Os odores são responsáveis pela ativação dos ORs. Um odor não ativa somente um OR, ele ativa um conjunto de ORs. Entretanto cada odor ativa uma combinação única de ORs. Como conseqüência um grupo específico de glomérulos do bulbo olfatório será ativado. Logo, o sistema olfatório utiliza um mecanismo de codificação em que a combinação de determinados ORs ativados determinam a identidade de um odor (Malnic *et al.*, 1999).

1.3 Expressão de ORs em sistemas heterólogos:

Do ponto de vista farmacológico, a análise de um determinado GPCR em seu tecido nativo é complicada devido à presença de receptores similares. A expressão heteróloga permite a análise de um único tipo de receptor num sistema definido, sendo que em todos

7

U

យ

5

Ö

IT

C

os casos o receptor deve ser expresso de maneira funcional. Contudo, até o presente momento não há um sistema heterólogo universal que seja válido para a expressão funcional de todos os GPCRs (Tate & Grisshammer, 1996).

Os ORs são dificilmente expressos de maneira funcional em sistemas heterólogos (Gimelbrant, *et al.*, 2001; Mombaerts, 2004). A razão pela qual isto acontece não é conhecida. Há relatos na literatura de que eles ficam retidos no retículo endoplasmático (RE) e podem ser degradados via proteossoma ou por autofagia (Lu *et al.*, 2003), não chegando à membrana plasmática (Ivic *et al.* 2002). Acredita-se que possivelmente os ORs necessitam de auxílio de proteínas acessórias, como chaperonas, para serem corretamente endereçados à membrana plasmática. Entretanto, alguns poucos trabalhos conseguiram expressar um limitado número de OR de maneira funcional (Tabela I).

Receptor Olfatório	Odores	Referências Bibliográficas
I7 (rat)	heptanal	Zhao et al. (1998) Science 279: 237
ID3	carvone	Krautwurst et al. (1998) Cell 95: 917
IC6	citronela	Krautwurst et al. (1998) Cell 95: 917
IG7	limonene	Krautwurst et al. (1998) Cell 95: 917
S1-S86 (13 ORs)	odorantes alifáticos	Malnic et al. (1999) Cell 96: 713
MOR23	liral	Touhara <i>et al.</i> (1999) PNAS 96: 4040
hOR17-40	helional	Wetzel et al. (1999) J. Neurosci. 19: 742
mOR73	eugenol	Kajiya et al. (2001) J. Neurosci. 21: 6018
mOR74	etil-vanillina	Kajiya et al. (2001) J. Neurosci. 21: 6018
mOR912-93	2-heptanone	Gaillard et al. (2002) Eur. J.Neurosci.15: 409
M71	acetofenona	Bozza et al. (2002) J. Neurosci. 22: 3033
hOR17-4	bourgeonal	Spehr et al. (2003) Science 299: 2054
mOR-EG	eugenol	Kajiya <i>et al</i> (2001) J. Neurosci 21: 6018 Katada <i>et al</i> (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 305: 964
mOR-EV	etil vanillina	Kajiya et al (2001) J. Neurosci 21: 6018
U131	Ácido heptanóico	Murrell et al (1999) J. Neurosci 19: 8260

Tabela I: Resumo dos odores cognatos aos receptores olfatórios (ORs)

A investigação da interação ORs-ligantes é essencial para entender a base molecular do código olfatório. Entretanto o código olfatório ainda não foi decifrado. Os odores ligantes para cada membro da superfamília de OR, ainda não foram identificados. Os trabalhos realizados até então têm tido pouco sucesso por que o sistema prático tem suas limitações (Wetzel *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003;). Os neurônios olfatórios são dificilmente mantidos em cultura primária (Vargas, 1999), a transferência de genes mediada por vírus não é consistente com a produção funcional de OR expressos e a criação de animais geneticamente modificados para cada membro da superfamília de OR pode ser uma metodologia cara e de baixa escala (Bozza *et al.*, 2002). Portanto, a identificação de proteínas acessórias que interagem com ORs e auxiliam na sua expressão funcional em células heterólogas seria de extrema importância para o desenvolvimento da área.

A levedura também é um modelo muito usado para a expressão heteróloga de GPCRs (Paush, 1997; Sarramegna *et al.*, 2003). Logo seria interessante expressar o OR em leveduras e avaliar seu potencial como um sistema geral para a expressão funcional de ORs.

1.4 Interações realizadas pelos ORs e outros GPCRs:

Como mencionado acima, é possível que ORs interajam com proteínas específicas e que estas sejam importantes para a sua expressão funcional. A seguir apresentamos um resumo do que se conhece a respeito de proteínas que interagem com ORs, assim como com outros GPCRs em geral.

1.4.1 A interação entre a proteína G e o OR

A proteína G é composta por três subunidades: α , β e γ . Uma subunidade α especificamente expressa no epitélio olfatório foi identificada e denominada de G α olf (Jones & Reed, 1989).

Estudos utilizando camundongos "knock-out" para esse gene (Gαolf) revelaram que estes camundongos são anósmicos (incapacitados da detecção de odores), mostrando a

importância desta proteína na transdução do sinal nos neurônios olfatórios (Belluscio *et al.*, 1999).

Deste modo, um modelo proposto para a detecção do odor seria: o odor liga-se ao OR mudando a conformação deste para uma forma ativa que conseqüentemente ativa a proteína G (promovendo a troca de GDP por GTP) resultando na dissociação da subunidade G α olf das subunidades $\beta \in \gamma$. A subunidade G α olf livre estimula a adenilato ciclase III, provocando um aumento dos níveis de AMPc. Com isso, canais iônicos regulados por nucleotídeos são abertos, possibilitando a entrada de cátions (Na⁺ e Ca²⁺), levando à despolarização da membrana do neurônio e a conseqüente geração do potencial de ação (Brunet *et al.*, 1996; Belluscio, *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000; Ronnett & Moon, 2002).

Este processo permite que o sinal químico do odor detectado no epitélio olfatório possa ser convertido em um sinal elétrico transmitido para o bulbo olfatório, e este o transfere para outras regiões do cérebro onde a percepção biológica é construída.

1.4.2 Interação do OR com a proteína ODR4 de C. elegans:

O nematóide *C. elegans* contém por volta de 32 neurônios quimiosensoriais divididos em quatorze tipos. Dois tipos de neurônios quimiosensoriais, chamados de neurônios AWA e AWC, são similares aos neurônios olfatórios de mamíferos. Foram identificados mais de quarenta genes de diferentes famílias candidatos a receptores quimiosensoriais, estes receptores são semelhantes aos receptores olfatórios de mamíferos pois são GPCRs e são expressos preferencialmente nos neurônios quimiosensoriais (Troemel *et al.*, 1995). A proteína ODR-10 é um receptor olfatório que está presente nos cílios dos neurônios AWA e interage com o odor diacetil (Sengupta *et al.*, 1996). A proteína expressa pelo gene odr4 parece exercer papéis fundamentais no endereçamento, no enovelamento e estabilização da ODR-10 nos cílios dos neurônios AWA. A ODR-4 é uma proteína de membrana com cerca de quatrocentos e quarenta e cinco aminoácidos, localizada no corpo celular e dendrito dos neurônios quimiosensoriais (Dwyer, *et al.*, 1998). Embora nenhum gene homólogo ao odr4 tenha sido encontrada em mamíferos, é possível que os neurônios olfatórios dos mamíferos expressem proteínas com funções análogas a proteína do odr4. 1.4.3 – Interação do OR com os receptores β_2 -ARs (um GPCR):

Os receptores β -adrenérgicos são GPCRs, eles interagem e são ativados pelo hormônio epinefrina (adrenalina). Os receptores β -adrenérgicos (β -ARs) são divididos em três tipos β 1-, β 2- e β 3-. Os receptores adrenérgicos β 1 são encontrados predominantemente no coração, os receptores adrenérgicos β 2 são encontrados no sistema respiratório, e os receptores adrenérgico β 3 são encontrados no tecido adiposo (Skeberdis, 2004). Recentemente demonstrou-se que o receptor β_2 adrenérgico (β_2 -ARs) interage com o OR M71, aumentando significamente a expressão deste na superfície das células embrionárias de rim humano (HEK 293). Então, é sugerido que o OR M71 seja translocado para a membrana plasmática quando associado fisicamente ao β_2 -ARs (Hague, *et al.*, 2004).

1.4.4 - Interação de Proteínas com receptores GPCRs em geral:

Recentemente tem se demonstrado que outras proteínas, além de proteínas G, interagem com diferentes GPCRs (Brady & Limbird, 2002). Alguns exemplos destas interações são:

A) Dimerização:

O GABA_BR1 (receptor 1 para ácido γ - aminobutirico) nunca foi expresso de maneira funcional em células de mamíferos porque ele não trafegava corretamente para a superfície da célula. Dois grupos independentes identificaram um receptor com 35% de identidade com o GABA_BR1, e o denominaram de GABA_BR2. Em sistemas heterólogos, a expressão funcional do receptor para GABA_B na membrana plasmática do neurônio ocorre somente quando há coexpressão (heterodimerização) do GABA_BR1 e GABA_BR2. O GABA_BR2 não é uma molécula chaperona, mas parece ser um componente necessário para a formação de um receptor GABA_B funcional. É sugerido que o GABA_BR2 mascare o sinal/motivo de retenção no RE presente na extremidade C-terminal do GABA_BR1 (revisado em Brady & Limbird, 2002). Mais recentemente demonstrou-se que apenas heterodímeros de receptores gustativos (T1Rs e T2Rs) são funcionais (Nelson *et al.*, 2001).

B) Interação de GPCRs com moléculas chaperonas:

As chaperonas promovem o enovelamento correto da proteína, bem como a interação intra e intermolecular requerida para a proteína adquirir no RE uma conformação competente para exportação (Ellgaard & Helenius, 2001; Helenius & Aebi, 2001). Uma molécula chaperona que interage com GPCR, foi denominada de Nina A. Estudos bioquímicos e imunocitoquimicos indicaram que a ausência de Nina A causa redução de rodopsina nas células fotoreceptoras de *Drosophila melanogaster*. Nina A é constituída por duzentos e trinta e sete aminoácidos, tem o tamanho aproximado de 26 KDa, ela é expressa somente nos olhos e está localizada na membrana, ela apresentou mais de 40% de similaridade de seqüência com a proteína ciclofilina (CyP) (Schneuwly *et al.*, 1989; Shieh *et al.*, 1989). A CyP é uma isomerase peptidilprolil cis-trans, necessária *in vitro* para o reenovelamento de proteínas denaturadas ricas em prolinas (Fisher *et al.*, 1989). Dessa maneira, é sugerido que a Nina A estaria envolvida no controle pós-traducional, com o papel de enovelar corretamente a rodopsina promovendo a estabilização desta na membrana plasmática das células fotoreceptoras (Schneuwly *et al.*, 1989; Shieh *et al.*, 1989; Brady & Limbird, 2002).

Da mesma maneira, é possível que existam interações de proteínas chaperonas com os ORs, que sejam importantes para a estabilização do OR na membrana.

C) Interação de GPCR com proteínas contendo o domínio PDZ

PDZ são domínios modulares envolvidos em interações protéicas que desempenham papel importante na formação de complexos protéicos de sinalização ou de endereçamento de proteínas na célula (Sheng & Sala, 2001). A proteína Homer 1a e 1b contém domínios PDZ responsáveis pela ligação ao C-terminal dos receptores metabotrópicos de glutamato (Brakeman *et al.*, 1997). A expressão do mGLUR5 ocorre de maneira não funcional quando coexpressa com a proteína Homer 1b em sistemas heterólogos. Este resultado não é observado quando a mGLUR5 é coexpressa com o Homer 1a (Roche *et al.*, 1999). Dessa maneira, dependendo da proteína Homer expressa, podemos ter uma regulação positiva (endereçamento correto do mGLUR5 à membrana plasmática) ou negativa (retenção no RE).

D) Interação entre GPCRs e a β -arrestina:

A desensitização homóloga de GPCRs é geralmente mediada pela fosforilação do receptor por quinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs). O receptor fosforilado apresenta alta afinidade de ligação com as β -arrestinas. Estas se acoplam entre o receptor e a proteína G heterotrimérica, levando a diminuição drástica do sinal dos efetores da proteína G e o subseqüente recrutamento do maquinário endocítico dependente de clatrina, responsável pela internalização do GPCR (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Ferguson, 2001).

E) Interação entre as proteínas da família M10 e V2Rs (que são também GPCRs):

Os membros da família M10 pertencente à classe Ib do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), foram encontradas associadas a microglobulina- β 2 (β 2m) e aos receptores de feromônio da família V2R. Essa interação ocorre na superfície do dendrito do neurônio e parece exercer um papel essencial no tráfego e estabilização do V2R na membrana plasmática do dendrito do neurônio sensorial. (Loconto *et al.*, 2003).

Portanto, o número de proteínas descritas que interagem com GPCRs vem aumentando. A identificação e caracterização destas proteínas contribuirão para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelas funções dos diversos membros da superfamília de GPCRs.

Praticamente nenhuma proteína que interage com ORs de mamíferos foi identificada até hoje. Os ORs não tem motivos conservados (seqüências peptídeo sinal) envolvidos na exportação do RE (Zozylya *et al.*, 2001; Ma & January, 2002). Proteínas acessórias específicas são requeridas para auxiliar proteínas GPCRs ou não, a adquirir uma conformação competente para exportação do RE (Herrmann *et al.*, 1999). Acredita-se que uma chaperona específica olfatória ou um cofator regulador seja necessário para a maturação do receptor e seu correto tráfego para membrana plasmática. Então a identificação de novas proteínas que interajam com os ORs é de fundamental importância para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na função dos ORs.

OBJETIVOS

Os ORs não são expressos de maneira funcional em células heterólogas. A elaboração de métodos que permitam a expressão de ORs em sistemas heterólogos é de grande importância para o desenvolvimento da área. No presente estudo, utilizamos o OR M93 para estudar os mecanismos de expressão de um OR. A presente dissertação teve como objetivos específicos: a) construção de um vetor para expressão do OR M93 em *Saccharomyces cerevisiae* e análise de sua localização celular; b) identificar proteínas expressas no epitélio olfatório de camundongo que interagem com domínios específicos da extremidade amino terminal dos receptores olfatórios.

MATERIAIS

1) Plasmídeos pUGs:

Os vetores pUG23 e pUG34 foram cedidos gentilmente por Güildener U. & Hegemann J. H. do departamento de microbiologia da universidade de Düsseldorf, Alemanha (<u>http://mips.gsf.de/proj/yeast/info/tools/hegemann/gfp.html</u>). Ambos os vetores são regulados por promotores induzíveis na ausência de metionina e são selecionados em meio sem histidina. O plasmídeo pUG23 contém o gene yEGFP3 ("yeast enhanced" GFP 3) (Cormack *et al.*, 1997), que é responsável pela expressão do GFP ("green fluorescent protein" da água viva, *Aequorea Victoria*), localizado "downstream" do sítio múltiplo de clonagem. Entretanto, no pUG34, o gene está localizado "upstream" do sítio múltiplo de clonagem (Fig. 4).



Fig. 4: Mapa dos plasmídeos utilizados para expressão do OR M93 em levedura. A) pUG23. Este plasmídeo permite a expressão da proteína de interesse com uma fusão a GFP na sua extremidade C-terminal. B) pUG34. Este plasmídeo permite a expressão da proteína de interesse com uma fusão a GFP na sua extremidade N-terminal.

2) Linhagens de levedura com marcadores de localização celular:

Dentre as linhagens de levedura disponíveis (<u>http://depts.washington.edu/~yeastrc/fm_home 5.htm</u>), nós utilizamos a linhagem diplóide (Mat a/Mat α) HHF2/YNL030W, cedida gentilmente por Muller, Davis e Snydsman do departamento de bioquímica da universidade de Washington, Seattle, EUA. Esta linhagem contém o YFP ("yellow fluorescent protein") fusionado a proteína histona 4 (H4) residente no núcleo. A expressão da H4-YFP está sob o controle do promotor endógeno e a seleção da levedura é feita na ausência de histidina.

3) Vetores utilizados para o sistema de duplo híbrido em levedura :

a) pGilda - HIS3, CEN, Ap^{R} (usado para expressão da isca) (Fig. 5A):

Este plasmídeo possui o promotor GAL1 que permite a expressão da proteína de fusão LexA – isca ("bait") apenas quando a única fonte de carbono for galactose. A seqüência CEN (centrômero) mantém o plasmídeo em uma única cópia por célula. A seqüência do LexA é seguida pelo sítio múltiplo de clonagem que permite a inserção do fragmento de DNA de interesse para a produção da isca. A seqüência ARS permite a replicação do plasmídeo na levedura, enquanto o gene HIS3 é utilizado para seleção de levedura que o contenha. Para seleção em bactéria este plasmídeo possui o gene Amp^R enquanto a seqüência "col E1 ori" permite a replicação deste plasmídeo em bactéria.

b) pSH18-34 - URA3, 2um, Amp^R, 80ps. -LacZ (Fig. 5B):

Esse vetor expressa o gene repórter LacZ sob o controle de oito operadores Lex A. Contêm também o gene URA3 para seleção de levedura que o contenha. Para seleção em bactéria este plasmídeo possui o gene Amp^R enquanto a seqüência "pBR ori" permite a replicação deste plasmídeo em bactéria. c) *pJG4-5 - TRP1, 2µm* (usada para expressão da biblioteca) (Fig. 5C):

Este plasmídeo expressa o domínio de ativação B42, seguido do epítopo HA e antecedido por um sinal de localização nuclear (nucl. local. - B42 - HA tag), em fusão com as proteínas referentes à mensagem do cDNA do epitélio olfatório, denominadas alvo ("target"). Essa expressão está sob a regulação do promotor GAL1, induzível por galactose. Este possui a seqüência "2um ori" para a existência de grande número de cópias do plasmídeo na levedura e o gene TRP para seleção de levedura que o contenha. Para seleção em bactéria este plasmídeo possui o gene Amp^R enquanto a seqüência "pUC ori" permite a replicação deste plasmídeo em bactéria.



Fig. 5: Representação esquemática dos plasmídeos utilizados no ensaio do sistema de duplo híbrido: A) pGilda; B) pSH18-34; C) pJG4-5. Ver texto em "Materiais" para descrição dos plasmídeos.

d) Plasmídeos controles:

- pBait: expressa a proteína de fusão "LexA-bait" constitutivamente.

<u>- pTarget</u>: permite a expressão da proteína "B42-target", induzível por galactose. As proteínas "bait" e "target" interagem entre si, sendo um controle positivo de interação em ensaios de sistema de duplo híbrido em levedura.

4) Linhagens de levedura utilizadas para o sistema de duplo híbrido:

- a) EGY48 MATα *trp1 his3 ura3 leu2*:: 6 LexAop-LEU2A → Esta linhagem de levedura possui o gene repórter LEU2 integrado ao cromossomo, controlado por seis operadores LexA. Quando tal gene é expresso, essa levedura é capaz de crescer em meio sem leucina. Essa levedura foi transformada com o plasmídeo pJG4-5.
- b) RFY206 MATa trp1∆ ::hisG his3∆200 ura3-52 lys2∆201 leu2-3 → Esta linhagem foi transformada com os vetores pSH18-34 e o pGilda.

A linhagem RFY206 (MATa) e a EGY48 (MAT α) são capazes de se acasalar e formar células diplóides.

5) Meios utilizados para o crescimento de leveduras:

- a) YPD: Este meio contém uma mistura de peptona, extrato de levedura e glicose em ótimas proporções para o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*
- b) Glicose, -His, -Ura: Este meio contém como fonte de carbono a glicose, é um meio seletivo sem a presença do aminoácido histidina e da base nitrogenada uracila.
- c) Galactose/Rafinose, -His, -Ura, -Trp: Este meio contém como fonte de carbono a galactose e rafinose, é um meio seletivo sem a presença da base nitrogenada uracila e dos aminoácidos histidina, triptofano.
- d) Galactose/Rafinose, -His, -Ura, -Trp, -Leu: Este meio contém como fonte de carbono a galactose e rafinose, é um meio seletivo sem a presença da base nitrogenada uracila e dos aminoácidos histidina, triptofano e leucina.

- e) Glicose, -His, -Ura, -Trp, -Leu: Este meio contém como fonte de carbono a glicose,
 é um meio seletivo sem a presença da base nitrogenada uracila e dos aminoácidos histidina, triptofano e leucina.
- f) Galactose/Rafinose, -His, -Ura, -Trp, -Leu, + X-gal: Este meio contém como fonte de carbono a galactose e rafinose, contém também a substância X-gal que é substrato da enzima lacZ. É um meio seletivo sem a presença da base nitrogenada uracila e dos aminoácidos histidina, triptofano e leucina.
- g) Glicose, -His, -Ura, -Trp, -Leu, + X-gal: Este meio contém como fonte de carbono a glicose, contém também a substância X-gal que é substrato da enzima lacZ. É um meio seletivo sem a presença da base nitrogenada uracila e dos aminoácidos histidina, triptofano e leucina.
- h) Glicose, His, -Met: Este meio contém como fonte de carbono a glicose, é um meio seletivo sem a presença dos aminoácidos metionina e histidina.
- i) Glicose, His: Este meio contém como fonte de carbono a glicose, é um meio seletivo sem a presença do aminoácido histidina.

MÉTODOS

I) Construção de vetores para expressão dos OR M93 em leveduras:

1) Construção dos plasmídeos:

Os vetores pUG23 e pUG34 foram digeridos com 5µl da enzima de restrição BamHI (10U/ µl) (New England BioLabs) por 6 horas à 37°C. Foram purificados utilizando fenol/clorofórmio para a remoção das proteínas e precipitados com etanol e acetato de sódio. Seguiu-se então o tratamento dos vetores com "calf intestinal alkaline phosphatase" (CIP) (10U/µl) (New England BioLabs), enzima responsável pela remoção dos grupos fosfatos da extremidade 5'. Esse procedimento é necessário a fim de evitar o religamento das extremidades dos plasmídeos durante a reação com T4 DNA Ligase.

1.1) Construção do inserto (OR M93):

Foram construídos dois fragmentos referentes ao gene OR M93. Um dos fragmentos contém o códon de terminação enquanto que o outro não, dependendo de sua localização nos vetores em relação ao gene do GFP (o inserto para o pUG23 não tem "stop códon", o inserto para o pUG34 tem "stop códon", Fig. 4).

Para a obtenção dos insertos foi feito um PCR em um volume total de 25µl, utilizando os seguintes reagentes:

Tampão para Taq DNA polimerase 10X	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0.75 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
"Primer forward"(50µM)	0,25 µl
"Primer reverse"(50µM)	0,25 µl
Taq polimerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O destilada	19,5 µl
DNA genômico de camundongo (100ng)*	1,0 µl

* é importante lembrar que os genes ORs presentes no DNA genômico de camundongo, não apresentam íntron.

Os seguintes oligonucleotídeos sintéticos ("primers") referentes à fase aberta de leitura do gene OR M93 foram utilizados na reação de PCR:

a) Oligonucleotídeos utilizados na construção do OR M93 inserido no pUG23: m93A ("forward") 5'CGGGATCCCCCATGGCATACAGCAATCAGTC 3'

m93B ("reverse") 5'CGGGATCCTACATGAAACTTCTTTTTTG 3'

b) Oligonucleotídeos utilizados na construção do OR M93 inserido no pUG34 :

m93A ("forward") 5'CGGGATCCCCCATGGCATACAGCAATCAGTC 3' m93BL ("reverse") 5'CGGGGATCCTTATACATGAAACTTTTTTG 3'

Em negrito está representado o sítio da enzima de restrição BamHI localizado na extremidade 5' dos "primers".

As seguintes condições de ciclagem foram adotadas para as reações de PCR:

a) 95°C por 4 min -1 ciclo

b)

b.1) 96°C por 1min — desnaturação > ³⁵ ciclos

b.2) 52°C por 1min — anelamento

b.3) 72°C por 1min — extensão

c) 72°C por 10 min

d) 4°C temperatura constante ("soak temperature").

Esses insertos (produtos amplificados) possuem sítios BamHI em ambas as extremidades, permitindo a subclonagem desses produtos de PCR nos sítios BamHI -BamHI dos respectivos vetores pUG23 e pUG34.

1.2) Subclonagem dos fragmentos de PCR em plasmídeos:

Para facilitar a subclonagem dos fragmentos de PCR nos vetores pUG23 e pUG34, os dois fragmentos referentes ao inserto OR M93 foram primeiramente subclonados no vetor "TA cloning dual promotor" (pCR[®] II – "Invitrogen") (Fig. 6). Os plasmídeos recombinantes resultantes foram então digeridos com BamHI, os insertos foram purificados e ligados aos vetores pUG23 e pUG34.



Fig. 6: (A) Esquema do vetor PCRII, o produto de PCR (inserto) ("PCR product") é inserido entre os sítios de restrição EcoRI. (B) A inserção do produto de PCR no vetor, deve-se a presença de resíduos de adenina em suas extremidades 3'.

a) Subclonagem no pCR[®] II: Os fragmentos de PCR purificados foram subclonados no vetor pCR[®] II, seguindo o protocolo abaixo:

Para um volume total de 5µl de reação de ligação:

tampão de ligação 10 X 0,5	μl
vetor pCR® II (25 ng/µl) 1,0	μl
T4 DNA ligase (400 U/µl) 0,5	μl
água destilada 2,0	μl

A reação de ligação foi mantida em banho a 16°C por 12 horas.

Foi feita a precipitação (concentração do DNA e a retirada dos sais) da ligação resultante que foi posteriormente transformada em bactérias *E. coli* da cepa DH5 α por eletroporação, utilizando-se 20 µL de bactéria competente e 1,0 µL do produto da reação de ligação. Foram selecionadas duas colônias brancas em uma placa de meio LB-agar contendo x-gal e inoculadas em 3,0 mL de LB com ampicilina (50 µg/mL) a 37°C, com agitação durante 12 horas. Após o tempo de crescimento, os plasmídeos foram purificados ("QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN"). Esses plasmídeos foram então digeridos com BamHI. As condições de reação foram as seguintes:

pCRII subclonado com o OR M93	50 µl
tampão BamHI 10X	10 µl
BamHI (20U/µl)	5 µl
BSA(albumina de soro bovina) 100X	1 µl
H ₂ O destilada	34 µl
volume total	100 µl
Incubação por 6-7 horas a 37ºC.	

Em seguida foi feita a gel-purificação da banda correspondente ao inserto, utilizando-se o "kit ConcertTM Gel Extraction Systems" da "GIBCO-Life Technologies", conforme instruções do fabricante. A quantificação dos produtos foi feita através da análise em gel de agarose para a ligação dos insertos nos vetores pUG23 e pUG34.

b) Subclonagem no pUG23 e pUG34: Os fragmentos de PCR purificados foram subclonados nos vetores pUG23 e pUG34, de acordo com o seguinte protocolo:

Para um volume total de 5µl de reação de ligação:

produto de PCR fresco (2 ng/µl)	1,0 µl
tampão de ligação 10 X	0,5 µl
vetor pUG23 ou pUG34 (50 ng/µl)	1,0 µl
T4 DNA ligase (400 U/µl)	0,5 µl
água destilada	2,0 µl

A reação de ligação foi mantida em banho a 16°C por 12 horas.

BIBLIOTECA INSTITUTO DE QUÍMICA

O produto da ligação inserto-vetor foi então precipitado para realizar a transformação em bactérias eletrocompetentes da cepa DH5α. Após transformação dessas bactérias, algumas colônias foram selecionadas por "Colony-PCR" (reação de PCR utilizando bactérias como "molde" e os mesmos "primers" já indicados anteriormente para a identificação de colônias que contêm o plasmídeo com o inserto desejado). Destas colônias foram purificados os plasmídeos (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN) que posteriormente foram digeridos com a enzima BamHI (New England BioLabs) a 37°C/2horas para verificação dos fragmentos desejados.

Os plasmídeos dos clones obtidos foram seqüenciados através de seqüenciamento automático, com o uso de mistura de reações "BigDye" (Applied Biosystems), para se verificar a seqüência dos fragmentos subclonados, a fusão correta do gene subclonado com o GFP e o direcionamento dos fragmentos visto que as extremidades são BamHI-BamHI.

2) Transformação dos plasmídeos (pUG23 e pUG34) em levedura:

Os plasmídeos pUG23 e pUG34 contendo o ORM93 fusionado ao gene que expressa a proteína GFP foram transformadas em leveduras da linhagem haplóide EGY48 (Matα), através do método "lazy bones" (Burke *et al.*, 2000), cujo protocolo é descrito a seguir:

- Selecionar uma colônia (2-3 mm de diâmetro) e transferir para um tubo "Eppendorf" de 1,5mL;
- (2) Adicionar 10 μL de DNA carreador (DNA de esperma de salmão, YEASTMAKER Carrier DNA – Clontech) (100 μg) e 1 μL de DNA plasmidial (produto da "miniprep"). O DNA carreador deve ser previamente fervido por 20 min e logo em seguida colocado no gelo. O DNA plasmidial deve ser diluído em água destilada na razão de 1:10.
- (3) Adicionar 0,5 mL de solução "PLATE" e vortexar. Solução "PLATE": polietileno glicol (PEG) 40%, 0,1 M acetato de lítio (LiAc) e Tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA).

- (4) Incubar de 12 horas à 4 dias a temperatura ambiente.
- (5) Aplicar o choque térmico (42°C por 15 minutos).
- (6) Centrifugar por 10 segundos a 16000 xg. Remover cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender o pellet com bastante cuidado em 200 μL de água estéril.
- (7) Plaquear todo o volume em placas seletivas.

3) Crescimento e indução da linhagem de levedura EGY48:

As colônias de leveduras contendo o pUG23 e pUG34 subclonados foram crescidas e induzidas, segundo a metodologia (Reynolds & Lundblad, 1999) descrita a seguir:

- (1) Inocular uma única colônia em 5 ml de meio liquido seletivo de glicose: -Histidina, crescê-la no shaker à 30°C "overnight".
- (2) Inocular 50 μL da cultura "overnight" em 5 ml de meio liquido indutor de glicose: -Metionina, crescer durante aproximadamente 5h-7h até a DO_{600nm}=0.5-1.0
- 4) Crescimento da linhagem HHF2/YNL030W:

A linhagem de levedura HHF2/YNL030W foi crescida seguindo o protocolo a seguir (Reynolds & Lundblad, 1999):

- Inocular uma única colônia em 5 ml de meio liquido YPD, crescê-la com agitação à 30°C por 12 horas.
- (2) Inocular 50 μL da cultura "overnight" em 5 ml de meio liquido YPD, crescer durante aproximadamente 5h-7h até a DO_{600nm}=2.0

5) Microscopia de fluorescência:

Células vivas referentes às colônias EGY48 e HHF2/YNL030W, foram observadas ao microscópio de fluorescência (Diaphot TE 300-Nikon) com a objetiva de 100x com o uso do óleo de imersão. As imagens das células expressando diferentes construções foram feitas sob as mesmas condições. A fluorescência do GFP e do YFP foram visualizados com o uso de filtro de 480nm. As imagens foram adquiridas com o uso da câmera digital (Roper Scientific).

II) O sistema de duplo híbrido em levedura

A análise do duplo híbrido é baseada no fato de que muitos reguladores de transcrição de eucariotos são compostos de domínios separados e funcionalmente independentes. Estes reguladores geralmente contêm um domínio de ligação ao DNA (DNA-BD) que se liga a uma seqüência promotora específica e um domínio de ativação (AD) que direciona o complexo da RNA polimerase II para transcrever o gene localizado "downstream" do sítio de ligação ao DNA. Se o DNA-BD e AD forem aproximados fisicamente na região promotora, a função da ativação da transcrição será restaurada (Fields & Sternglanz, 1994).

No sistema de duplo híbrido DupLex-A ("DupLEX-ATM", OriGene Technologies, Inc., www.origene.com), o DNA-BD é representado pela proteína Lex A procariótica. O AD é um peptídeo de *E. coli* (B42) com 88 aa, que ativa a transcrição da levedura. Dois diferentes vetores de clonagem foram usados para gerar a fusão destes domínios com os genes codificantes de proteínas candidatas a interagirem uma com a outra, as proteínas híbridas recombinantes são coexpressas em levedura. A interação entre a proteína isca (fusionada ao DNA-BD) e a proteína alvo (fusionada a AD) cria um novo ativador de transcrição com afinidade de ligação para operadores Lex A. Se as duas proteínas híbridas não interagirem entre si, os genes repórteres não serão transcritos. (Fig. 7).


Fig. 7 : Diagrama esquemático do sistema de duplo-híbrido em leveduras

- A) A proteína utilizada como isca em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), liga-se aos operadores LexA, mas não é capaz de ativar a transcrição do gene repórter sem o domínio de ativação (AD).
- B) Não há interação entre a proteína isca e a proteína alvo (X). Os domínios de ligação e ativação não são aproximados, não havendo transcrição dos genes repórteres.
- C) A transcrição do gene repórter é ativada somente se houver interação entre a isca e o alvo (Y), pois assim os domínios DNA-BD e AD serão aproximados reconstituindo um fator de transcrição.
- 1) Construção das iscas ("baits"):

As seqüências de nucleotídeos que codificam para os domínios específicos do OR escolhido (M93) foram amplificadas, através de PCR, a partir de DNA genômico de camundongo (os genes codificadores de ORs não possuem introns e, portanto, podem ser diretamente amplificados a partir de DNA genômico) e inseridos no sítio de clonagem do vetor pGilda (OriGene). As iscas construídas foram: (NH₃ + Li1) que contém desde a região do N-terminal até o final do "loop" interno 1; o outro (Li1 + Tm2) contém desde o início do "loop" interno 1 até metade do domínio transmembrana 2 (ver esquema em

resultados, na tabela II). Estas regiões foram escolhidas, pois apresentam seqüências com alta identidade entre um grande número de membros da família de ORs.

A construção, a transformação (das iscas na linhagem de leveduras RFY206) e a caracterização das iscas foram feitas pela aluna de iniciação científica Ana Luiza Zaccaro e a etapa de caracterização foi acompanhada por mim.

2) Caracterização das Iscas:

2.1) Ensaio de Autoativação:

Este ensaio tem como objetivo determinar se as iscas construídas ativam por si só o gene repórter LacZ (como descrito em Ausubel *et al.*, 1999 e manual do sistema "Duplex-A[™] - yeast two-hibrid system" Origene).

2.2) Ensaio de Repressão:

Este teste tem como objetivo determinar se a isca que está sendo expressa na levedura tem a capacidade de entrar no núcleo da célula e se ligar aos operadores LexA (como descrito em Ausubel *et al.*, 1999 e manual do sistema "Duplex-ATM - yeast two-hibrid system" Origene).

2.3) Western Blot:

Realizamos o ensaio de expressão para verificar se as iscas estavam sendo expressas em sistema de levedura. Extratos protéicos de RFY 206 transformadas com os plasmídeos das duas iscas foram obtidos e submetidos a um SDS-PAGE 13%, e bloqueadas com 5 % de leite desnatado (Molico). Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a presença da proteína de fusão foi detectada com o anticorpo anti-LexA ("Invitrogen"). A reação foi revelada com a solução reveladora do sistema ECL "Western blotting analysis system" ("Amersham") e as membranas foram expostas a um filme radiográfico.

3) Varredura utilizando o sistema duplo-híbrido:

Para varrer uma mesma biblioteca com várias iscas diferentes é recomendado que seja feito o acasalamento da cepa de levedura que expressa a isca com a cepa prétransformada com a biblioteca de cDNA (Ausubel *et al.*, 1999). Essa abordagem permite várias varreduras, com diferentes iscas, de uma biblioteca transformada uma única vez com alta eficiência na levedura e assim economizar tempo e material nesse passo da transformação, que normalmente é crítico e limitante.

Oito colônias isoladas de leveduras da cepa RFY206 que contém o gene repórter LacZ no vetor pSH18-34 e o vetor pGilda com a isca (NH₃ + Li1) expressa em fusão com LexA, foram transferidas para um Erlenmeyer de 250 mL estéril com 20 mL de meio líquido seletivo glicose –ura –his e incubadas a 30°C sob agitação constante (240 rpm) por 16 horas. A densidade ótica (DO) da cultura saturada foi medida no comprimento de onda de 600nm. A cultura foi diluída para a DO_{600nm} de 0,2 com meio líquido seletivo glicose – ura –his e incubada a 30°C, sob agitação (240 rpm) até atingir a DO_{600nm} de 1,0. Trinta ml da cultura na DO_{600nm} 1,0 foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL e centrifugados a 1500Xg por 5 minutos na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" de leveduras foi ressuspendido suavemente para um volume final de 1000 μ L com água deionizada estéril. Espera-se que neste passo tenhamos a concentração aproximada de 10⁹ células/mL.

A biblioteca de cDNA (construída pela Dr. Adriana F. Mercadante) de epitélio olfatório subclonados no pJG4-5 inseridos na cepa EGY48 (que contém o repórter LEU2) possui o tamanho aproximado de 2 X 10^6 (número de clones independentes). Para termos uma varredura total da biblioteca teríamos que utilizar ao menos 2 X 10^6 clones da isca (NH₃ + Li1). Entretanto, sabe-se que apenas 10% das leveduras irão efetivamente realizar o acasalamento (as cepas RFY206 e EGY48 haplóides se juntam para formar diplóides). Para obter uma varredura completa, utiliza-se 10 vezes mais leveduras RFY206 com isca e da

biblioteca. Resolvemos varrer a biblioteca cinco vezes e por isso utilizamos cinqüenta vezes mais da RFY206 com a isca $NH_3 + Li1$ para a varredura de 10^8 clones da biblioteca.

Duzentos microlitros (2.10^8 cfu) da levedura RFY206 com a isca NH₃ + Li1 foram delicadamente misturados a 50 µL (10^8 cfu) da levedura EGY48 com a biblioteca em tubo Eppendorf. A mesma quantidade da levedura RFY206 com a isca foi misturada com um controle (biblioteca vazia, ou seja, leveduras EGY48 que continham o plasmídeo pJG4-5 sem nenhum inserto). As misturas foram centrifugadas a 1500Xg por 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspendidas em 100 µL de meio líquido YPD. Esta suspensão de leveduras foi então plaqueada em meio sólido de YPD e incubada a 30°C por 15 horas.

As leveduras que cresceram foram raspadas da placa YPD utilizando 1 mL de meio líquido indutor galactose/rafinose -his -ura -trp com leucina. O conteúdo líquido da raspagem foi transferido para Elenmeyer de 1000 mL estéril contendo 100 mL de meio líquido galactose/rafinose -- his -- ura -- trp com leucina. A cultura líquida foi induzida por 6 horas a 30°C sob agitação constante (240 rpm) para a expressão das proteínas de fusão. Após o período de indução, 30 mL da cultura foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL e centrifugados a 1500Xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O pellet de leveduras foi ressuspendido em 30 mL de água deionizada estéril e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O "pellet" foi ressuspendido para um volume final de 5 mL de água deionizada estéril. A DO_{600nm} de uma alíquota diluída 100X foi determinada e as suspensões de leveduras, referentes ao "mating" da isca NH₃ + Li1 com a biblioteca e ao mating da isca NH₃ + Li1 com a biblioteca vazia (controle), foram diluídas para 10⁸ células/mL. Utilizando esta diluição foram plaqueados 100 µL em 20 placas seletivas galactose/rafinose -his -ura -trp -leu para o acasalamento da isca NH₃ + Li1 com a biblioteca. Outras 20 placas seletivas semelhantes às anteriores foram utilizadas para o plaqueamento de uma suspensão diluída 10X do acasalamento da isca NH3 + Li1 com a biblioteca. Como controle, uma placa galactose/rafinose -his -ura -trp -leu foi utilizada para plaquear o acasalamento da isca NH3 + Li1 com a biblioteca vazia. A atividade do gene repórter Leu foi determinada através do monitoramento do crescimento das leveduras neste meio seletivo durante o período de dois dias.

3.1) Análise das colônias Leu+ obtidas na varredura:

• Verificação do repórter Lac-Z e dependência de galactose:

Durante a varredura, todas as colônias (diplóides) que cresceram em meio seletivo indutor (galactose/rafinose -ura -his -trp) sem leucina (possíveis candidatas de apresentarem interações entre a isca e alguma proteína da biblioteca) foram repassadas para placas contendo meio seletivo (-ura -his -trp) com glicose e com leucina. Após 40 horas, essas leveduras foram replicadas para as seguintes placas:

-glicose -ura -his -trp -leu

-galactose/rafinose -ura -his -trp -leu

-glicose -ura -his -trp + X-gal

-galactose/rafinose -ura -his -trp + X-gal

Durante 1-4 dias a 30°C, o crescimento e o desenvolvimento da cor azul destas colônias foram monitorados.

3.2) PCR das colônias candidatas e digestão com Hae III e Hinf I:

As colônias selecionadas após o teste para verificar a dependência da interação por galactose foram isoladas e colocadas, cada uma, em 50 µl de água destilada, deionizada. Estas suspensões foram então incubadas a 95°C por 15 minutos e posteriormente, 5 µl delas foram usados como molde em uma reação de PCR. Nesta reação, óligos específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5 foram usados para amplificar os insertos, são eles:

- pJG4-5 fus ("forward") 5'TCATGAAATTGAAGCGGATG 3'

-pJG4-5 ("reverse") 5'GCCGACAACCTTGATTG3'

As condições da PCR encontram-se a seguir:



Os produtos de PCR foram então duplamente digeridos com as enzimas de restrição Hae III e Hinf I e os padrões de digestão foram analisados em gel de agarose 1,5%.

4) Seqüênciamento e identificação dos insertos:

Foi feita uma gel-purificação das bandas correspondentes aos insertos (produtos do PCR acima), utilizando-se o "kit ConcertTM Gel Extraction Systems da GIBCO-Life Technologies". As bandas purificadas foram utilizadas para o seqüênciamento dos insertos (candidatos a ligantes das iscas). As seqüências dos possíveis ligantes das iscas foram realizadas através de seqüenciamento automático, com o uso do reagente "BigDye" (Applied Biosystems). Posteriormente, as identidades destas seqüências foram obtidas com a ajuda do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

III) Hibridação in situ

1) Preparação das sondas:

A sequência codificadora das proteínas identificadas no sistema de duplo híbrido, foram subclonadas no plasmídeo PCR II (Invitrogen). Este vetor apresenta sítios promotores para a SP6 e T7 RNA polimerases (ver Fig. 6). O produto da ligação insertovetor foi então precipitado (concentração do DNA e a retirada dos sais) para realizar a transformação de bactérias eletrocompetentes da cepa DH5α. Destas colônias foram purificados os plasmídeos (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). Os plasmídeos dos clones obtidos foram seqüenciados através de seqüênciamento automático, com o uso do "BigDye" (Applied Biosystems), para verificar o direcionamento dos fragmentos subclonados. Desta maneira podemos saber qual das RNAs polimerases (SP6 ou T7) devemos utilizar para a síntese da sonda anti-sense ou sense.

Sabendo o direcionamento do inserto no vetor PCR II, estes plasmídeos foram então linearizados com enzimas de restrição Not I ou KpnI. A purificação das digestões foi realizada com o kit "Rapid PCR purification System" (GIBCO-Life Technologies), eluindo com água livre de RNAse (tratada com DEPC).

As sondas de RNA marcadas com digoxigenina foram feitas utilizando-se reagentes (Roche) nas seguintes condições livres de RNAse :

Até 13 microlitros de DNA molde ou volume suficiente para 1μg de plasmídeo linearizado
 Adicionar 2 μl de 10X tampão de transcrição
 Adicionar 2 μl de mistura 10X concentrada de DIG RNA marcado
 (10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP)
 Adicionar 2 μl de SP6 ou T7 RNA polimerase (20 U/μl)

Adicionar 1 µl de inibidor de RNAse

Incubação a 37°C por 2 horas

Posteriomente, as sondas foram precipitadas seguindo o protocolo:

(b) Adicionar 2 μ l de LiCl (4M)

(c) Adicionar 50 μ l de etanol (gelado)

(d) Deixar por 30 minutos a -80°C

(e) Centrifugar à 16000xg por 15 min à 4°C

(f) Secar o pellet a temperatura ambiente por 5 min

(g) Ressuspender em 15 µl de H₂O ("RNAse free")

Para a quantificação das sondas, 2 μ l das sondas foram aplicados em gel de agarose 1,5%. Ao RNA eluído acrescentamos 20 μ l de formamida e estocamos as sondas a -80°C.

2) Preparação das lâminas do epitélio olfatório de camundongo.

Os narizes de camundongos da linhagem C57BL6, de 3 semanas de idade, foram dissecados e embebidos em "OCT compound Tissue-Tek®" (Sakura®) e congelados à - 80°C.

Os cortes foram obtidos com espessura média de 16 μ m de narizes e realizados em criostato (MICROM) a -20°C e coletados em lâminas de vidro "SectionLockTM Slides" da Polyscience,Inc que foram estocadas a -80°C.

3) Ensaio de Hibridação "in situ" (adaptado de Schaeren-Wiemers, 1993):

Em condições livres de RNAse, as lâminas foram secas e fixadas por 10 minutos em solução recém preparada de paraformaldeído 4% em 1X PBS (tampão de fosfato salino). As lâminas foram lavadas 3 vezes, por um período de 5 minutos, em 1X PBS. Estas, então, foram imersas em solução contendo 7 ml de trietanolamina em 600 ml de água estéril mantendo agitação leve. Em seguida, 1,5 ml de anidrido acético foi acrescentado na solução onde as lâminas estavam imersas, incubando por 10 minutos para acetilar o tecido. As lâminas foram novamente lavadas (3 vezes) com 1X PBS por 5 minutos cada. O volume de 500µl de solução de hibridação previamente preparada com 50% de formamida; 5X SSC (solução estoque); 5 X Denhardt's e 250 µg/ml de "bakers yeast RNA" foi então adicionada às lâminas. Estas ficaram incubadas em placas de Petri umidificadas com 5X SSC por 2 horas a 72°C. As sondas foram aquecidas por 5 minutos a 85°C para linearização e adicionadas às lâminas, incubando-as nas placas de Petri a 72°C por 12 horas.

Após a hibridação das sondas com o RNA do tecido, as lâminas foram lavadas em 5X SSC a 72°C por 10 minutos (a partir deste momento, as condições não precisam mais ser livre de RNAse). A seguir, estas foram lavadas em 0,2X SSC a 72°C por 30 minutos (2 vezes) e uma vez em 0,2X SSC a temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, as lâminas foram incubadas a 37°C em solução de 20 μ g/ml de RNAse +10mM de Tris + 400mM de NaCl por 30 minutos.

A detecção imunológica foi realizada com o sistema "DIG Wash and Block Buffer Set" (Roche Diagnostics). As lâminas foram incubadas em 1X tampão de lavagem (10X ácido maléico com 3% Tween) por 5 minutos; 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 acoplado a enzima fosfatase alcalina (Roche Diagnostics) na diluição de 1:5000 por 1 hora. As lâminas foram lavadas 3 vezes por 20 minutos com 1X tampão de lavagem. Após isto, as lâminas foram incubadas por 5 minutos em tampão de detecção (100mM Tris pH 9,5 + 100mM NaCl). Por fim, as lâminas foram incubadas em solução de detecção preparada com 10 ml de 1X tampão de detecção + 2,4 mg de levamisole + 200 µl de NBT/BCIP (Roche Diagnostics).

O desenvolvimento de coloração púrpura nos tecidos foi monitorado durante o período de 12 horas.

A reação foi interrompida em solução10 mM Tris pH 8,0 + 1 mM EDTA duas vezes por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos sendo os slides montados com o uso de Gelvatol (álcool polivinílico e glicerol em solução 0.14M NaCl, $0.01M \text{ KH}_2PO_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.2).

RESULTADOS

(I) Construção dos vetores para expressão do OR M93 em levedura

1) Construção dos vetores (pUGs):

Utilizando a metodologia de PCR, foram obtidos dois fragmentos referentes ao gene OR M93 (Fig. 8). No pUG23 o gene OR M93 foi inserido a "upstream" do gene _YEGFP3 enquanto que no pUG34 o gene OR M93 foi inserido a "dowstream" do gene _YEGFP3 (Fig. 9 e 10).



BIBLIOTECA INSTITUTO DE QUÍMICA Universidade de São Paulo

Fig. 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR a partir de DNA genômico de camundongo, utilizando "primers" específicos para a região de leitura do gene. L= low DNA mass ladder da Life Techologies; 1= OR M93 sem stop códon; 2= OR M93 com stop códon; 3= controle negativo.



Fig. 9: A) Mapa esquemático do pUG23. A seta indica o local onde o fragmento correspondente ao gene OR M93 foi inserido no vetor. B) Representação do GFP fusionado a extremidade carboxi terminal do OR M93. O tamanho predito do OR M93 é de 30 kd e o do GFP é também de 30 kd.



Fig. 10: A) Mapa esquemático do pUG34. A seta indica o local onde o fragmento correspondente ao gene OR M93 foi inserido no vetor. B) Representação do GFP fusionado a extremidade amino terminal do OR M93.

O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5α. Colônias contendo os plasmídeos de interesse foram selecionadas através de "Colony-PCR". Foram purificados os plasmídeos de oito colônias positivas para o "Colony-PCR". As amostras 1A, 2A, 3A (contêm a construção OR M93-pUG23) foram digeridas com BamHI num período de 2h a 37°C (Fig. 11). As amostras 2B, 3B, 4B, 5B, 6B (contêm a construção OR M93-pUG34) também foram digeridas com BamHI num período de 2h a 37°C (Fig. 12).



Fig. 11 : Produto de digestão (BamHI) dos clones contendo as construções demonstradas na figura 9. H= "high DNA mass ladder da Life Technologies"; 1A,2A,3A=OR M93+pUG23. ND= pUG23 não digerido



Fig. 12 : Produto de digestão (BamHI) dos clones contendo as construções apresentadas na figura 10. H= "high DNA mass ladder da Life Technologies"; 2B= OR M93 + pUG34; 3-8B= idem ao anterior

Todas as amostras submetidas à digestão liberaram o inserto correspondente ao OR M93. Os clones 1A e 2B foram seqüênciados para a confirmação da seqüência do gene OR M93 e da fusão deste com o GFP. Apenas a seqüência do clone 2B se mostrou correta enquanto que o clone 1A apresentou uma mutação em sua seqüência resultando na troca do aminoácido fenilalanina por uma leucina. Apesar da troca de um aminoácido, o clone 1A mostrou-se corretamente fusionado ao GFP e então foi utilizado nos ensaios posteriores. 2) Crescimento e análise dos vetores construídos (pUGs) em levedura.

Os clones 1A e 2B que contêm respectivamente o pUG23 fusionado corretamente ao OR M93 e ao GFP e o pUG34 fusionado corretamente ao OR M93 e ao GFP foram transformados na linhagem de levedura haplóide EGY48. Essas colônias de levedura foram induzidas em meio sem metionina, para a expressão da proteína OR M93 fusionado ao GFP, e analisadas por microscopia de fluorescência (Fig. 13).

3) Análise da sublocalização do OR M93 expresso em levedura.

As colônias de leveduras HHF2/YNL030W foram crescidas segundo o protocolo descrito anteriormente (Reynolds & Lundblad, 1999). Elas expressam uma proteína de localização nuclear em fusão com YFP, demonstrando um padrão de fluorescência nuclear. Para o esclarecimento da sublocalização do OR M93 em leveduras, na (Fig. 14) pode ser visto o padrão de fluorescência de leveduras que expressam proteínas de conhecida localização subcelular.



Fig. 13: Análise por microscopia de fluorescência das colônias EGY-48. A,B,C= EGY 48 transformada com o vetor pUG23. A= luz transmitida. B= EGY48 expressando o OR M93 em fusão com o GFP; C= EGY 48 expressando somente GFP. D,E,F= EGY 48 transformada com o vetor pUG34. D= luz transmitida. E= EGY48 expressando o OR M93 em fusão com o GFP. F= EGY 48 expressando somente GFP.



¹ Du, Y., Pypaert, M., Novick, P., Ferro-Novick, S. Aux1p/Swa2p is required for cortical endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. <u>Mol Biol Cell</u>. 12(9):2614-2628, 2001.

² Proszynski, T. J., Simons, K., Bagnat M. O-Glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. <u>Mol Biol Cell.</u> 15(4):1533-43, 2003

Fig. 14: Comparação dos padrões de fluorescência. A= EGY48 transformada com o vetor pUG23, expressando o OR M93 em fusão com o GFP. B= EGY48 transformada com o vetor pUG34, expressando o OR M93 em fusão com o GFP; C= HHF2/YNL030W expressando Histona 4 em fusão com YFP. D,E= Fotos retiradas das referências 1 e 2, respectivamente. D= Linhagem de levedura SFNY1054 expressando Hmg1p-GFP (proteína marcadora de retículo endoplasmático cortical e perinuclear); E= Linhagem de levedura MBQ38 expressando Mid2p-GFP (proteína marcadora de membrana plasmática).

(II) Varredura da biblioteca de epitélio olfatório de camundongo:

1) Construção e caracterização das iscas:

As iscas construídas pela aluna de iniciação científica Ana Luiza foram: (NH₃ + Li1) que contém desde a região do N-terminal do OR M93 até o final do "loop" interno 1; a outra (Li1 + Tm2) contém desde o início do "loop" interno 1 até metade do domínio

transmembrana 2 deste mesmo receptor. Estas regiões foram escolhidas, pois apresentam seqüências com alta identidade entre um grande número de membros da família de ORs. Também sabe-se que a região N-terminal é importante para o endereçamento de proteínas para a membrana. Apesar de ORs não apresentarem sequência peptídeo sinal, eles podem apresentar outro tipo de sequências na região N-terminal importantes para seu endereçamento para a superfície da celula.

Testes foram realizados para averiguar a expressão correta das diferentes iscas (como descrito por Ausubel *et al.*, 1999 e manual do kit "DupLex-ATM, yeast two-hybrid system", OriGene, www.origene.com); Vários controles foram feitos para verificar se, após a transformação em leveduras, as iscas que foram construídas: não estão auto-ativando a transcrição dos genes repórteres (ensaio de autoativação), estão indo para o núcleo e se ligando aos operadores LexA (ensaio de repressão) e se estão realmente sendo expressas (ensaio de western blot). A tabela II mostra os resultados destes testes realizados.

Tabela II: Caracterização funcional das iscas construídas. (A) Representação esquemática do ensaio de autoativação. Nesse ensaio a isca não deve ser capaz por si só de ativar a transcrição dos genes repórteres. Se a isca ativar a transcrição do gene repórter será descartada; (B) Representação esquemática do ensaio de repressão. Para a isca ser funcional, deve ser capaz de entrar no núcleo da levedura e de se ligar ao sítio promotor para Lex A (ops) e esse complexo impedir o recrutamento da RNA polimerase, não havendo a transcrição do gene repórter; (C) Ensaio de Western blot. A isca deve ser expressa de maneira estável em levedura e somente na presença de galactose. O anticorpo anti-LexA foi utilizado para a detecção das iscas, o pGilda (sem isca) foi utilizado como controle positivo.

INSTITUTO DE QUÍMICA Universidade de São Paulo

	(A)	(B)	(C)	
Iscas- OR M93	Auto- ativação	Localização nuclear	Western Blot	
TAA-		+	+	
Isca NH ₃ + Lil Isca Lil+ Tm2	_	?	_	



A isca NH₃ + Li1 está sendo expressa de maneira funcional enquanto que a isca Li1 + Tm2 não foi detectada no ensaio de Western Blot. Dessa maneira, utilizamos somente a isca funcional na varredura da biblioteca.

2) Varredura da biblioteca:

A isca NH₃ + Li1 foi transformada na linhagem de levedura RFY206 Mat a. Os cDNAs alvos oriundos da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo (construída com óligos dT em nosso laboratório pela Dr. Adriana F. Mercadante) foram subclonados no vetor pJG4-5 e transformados na linhagem de levedura EGY 48 Mat α . As duas linhagens opostas foram acasaladas seguindo o protocolo descrito em Ausubel *et al.*, 1999 (Fig. 15).



Fig. 15: Análise do acasalamento. A linhagem RFY206 contendo o vetor isca (proteína isca) e o gene repórter LacZ foi acasalada com a linhagem de levedura EGY48 contendo o vetor alvo e o gene repórter de leucina (LEU). Os diplóides resultantes foram plaqueados em meio sem Leucina (- Leu) para a seleção dos alvos capazes de interagir com a isca. As colônias que cresceram em meio sem Leu foram então plaqueadas em meio seletivo para se checar a ativação dos repórteres (Leu e LacZ) de maneira dependente de galactose.

Dessa maneira, a varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo com a isca funcional foi realizada para a identificação das proteínas alvo que interajam com a isca. A tabela III resume alguns dados sobre essa varredura.

Tamanho da biblioteca (número de clones independentes)	1,95. 10 ⁶ cfu	
Número de clones varridos (número de clones da biblioteca analisados)	10 ⁷ cfu	
Diplóides Obtidos	9.10 ⁵	
Clones analisados (clones Leu+)	94	
Clones que expressaram os dois genes repórteres (Leu+ e Lac-z)	14	

Tabela III: Resultados obtidos na varredura

Foram obtidos 94 clones capazes de crescer em meio sem leucina (clones Leu+). Todos eles foram isolados e testados em diferentes meios para se checar a ativação do outro gene repórter (Lac-Z) e a dependência da interação por galactose. Com esse teste foi possível detectar as colônias falso-positivas, pois elas se comportam da seguinte maneira: elas crescem em meio indutor (galactose), seletivo para os diplóides (-ura, -his, -trp) e seletivo para interações (meio sem leucina). Porém elas também cresceram nesse mesmo meio, porém contendo glicose como fonte de carbono, ou seja, o seu crescimento no meio sem leucina não é dependente da expressão da isca e nem da proteína da biblioteca (ambas só são expressas na presença de galactose). Essa mesma colônia também fica branca na placa gal/raf –ura, -his –trp (com x-gal), indicando que o gene repórter lacZ não está sendo ativado.

Já as colônias positivas (Leu+ e LacZ) são exemplos de clones que devem ser analisados, pois podem conter um candidato de verdadeiro ligante da isca em questão. Esse tipo de colônia cresce em meio indutor (com galactose) sem leucina; não cresce nesse mesmo meio com glicose; ela só fica com a coloração azul quando o meio contendo x-gal contém também galactose e não glicose.

Das noventa e quatro colônias Leu+ obtidas, quatorze apresentaram a ativação dos dois genes repórteres analisados dependente de galactose (Fig. 16). É importante mencionar que a intensidade da cor azul observada na placa gal/raf (+ X-gal) -ura, -his, - trp variou muito nas diferentes colônias (indicando provavelmente diferentes intensidades de interação).



Fig. 16: Análise do repórter lacZ. Dos noventa e quatro clones positivos para o repórter de leucina, apenas quatorze clones foram positivos para o repórter lacZ. Ou seja, eles apresentaram coloração azul devido à ação da β -galactosidase expressa na presença de galactose (A) mas não na presença de glicose (coloração branca) (B).

Em seguida, analisamos com maior detalhe as quatorze colônias candidatas (a maioria azul forte) para se ter uma idéia do que havíamos obtido. É importante ressaltar que o clone 10 apresentou cor azul em ensaios anteriores, mas não quando repetimos o ensaio (Fig. 16)

4) Análise dos Clones Obtidos:

Os quatorze clones foram então usados em uma PCR para a amplificação dos insertos contidos no vetor pJG4-5. O PCR identificou os insertos correspondentes às proteínas que interagiram com a isca (Fig. 17).

Como pode ser visto, muitas delas apresentaram o mesmo tamanho (~1200pb) e outras, possuíram peso molecular diferente. Alguns clones não apresentaram produtos de PCR (Fig. 17, linha 5) ou pequenas quantidades deste (Fig. 17, linhas 6 e 8). Entretanto em reações de PCRs posteriores, os clones 6 e 8 apresentaram quantidades suficientes de produto amplificado para uma gel extração, embora o clone 5 por razão desconhecida não apresentara produto amplificado.

Com o objetivo de se determinar se as bandas de mesmo tamanho apresentavam a mesma seqüência, realizou-se uma digestão com as enzimas de restrição Hae III e Hinf I, ambas reconhecedoras de sítios de quatro pares de base.

A análise da dupla-digestão (Fig. 18) indica que apesar de algumas colônias apresentarem produtos amplificados de tamanhos semelhantes, estes não possuem o mesmo padrão de clivagem. Desse modo é sugerido que os clones apresentam diferentes insertos referente aos genes subclonados da biblioteca.





Fig. 17: Eletroforese dos produtos amplificados por PCR com "primers" específicos para a região de leitura do gene. L= low DNA mass ladder da Life Techologies; (-) controle negativo= água; (+) controle positivo = pJG4-5 vazio (sem a biblioteca).



Fig. 18 : Mostra o produto da dupla digestão (Hae III e Hinf I) dos genes alvo anteriormente amplificados. L= low DNA mass ladder

Treze clones foram seqüenciados e as seqüências foram analisadas utilizando-se a ferramenta BLAST (disponível na página do NCBI, <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) para se determinar a identidade dos possíveis ligantes da região N-terminal do OR M93, bem como para verificar se a fusão está em fase com a proteína lexA.

As proteínas identificadas estão demonstradas na tabela IV.



5) Análise das proteínas identificadas:

Quatro proteínas identificadas no sistema de duplo híbrido foram selecionadas como prováveis candidatas a interação com a isca NH₃-Li1. O sequenciamento e posterior análise por BLAST, possibilitaram a identificação dos clones que expressaram cDNAs referentes a mesma proteína. Foram então selecionados os clones 8, 9, 11, 13 correspondentes às proteínas: *Mus musculus* HLA-B associado ao transcrito 3 (BAT-3/ Scythe), *Mus musculus* superfamília transmembrana 4 (membro CD82), *Mus musculus* superfamília transmembrana 4 (membro CD82), *Mus musculus* superfamília transmembrana 4 (membro OAP-1) e *Mus musculus* sindecan (membro SDC2) (GenBank accession numbers: BC026647, D14883, BC043072 e BC047144); para os ensaios de Hibridação "in situ".

6) Hibridação "in situ":

Com a finalidade de se verificar o padrão de expressão das proteínas identificadas, realizamos hibridizações "in situ" no epitélio olfatório (OE) de camundongo de três semanas de idade. Assim, cortes coronais deste epitélio (16 μ m) foram hibridizados com sondas de RNA "sense" e "antisense" marcadas com digoxigenina 11-UTP, preparadas a partir de clones contendo fragmentos de DNA correspondentes às quatro proteínas identificadas (Fig 19).



Fig. 19: Hibridação *in situ* da cavidade nasal (OE) de camundongo da linhagem CBL57 com três semanas de vida, utilizando sondas sense e antisense referentes às proteínas identificadas no sistema de duplo híbrido. Controle positivo= OMP.

Na Fig 19, pode-se ver o padrão de marcação para cada uma das sondas no OE: a SDC2 apresenta uma fraca marcação no epitélio. As proteínas BAT-3/Scythe e OAP-1 possuem sinais positivos nos neurônios olfatórios, sendo que esta última apresenta marcação mais especifica aos neurônios olfatórios maduros. A CD82 apresenta marcação em vários tipos celulares do epitélio, inclusive nos neurônios olfatórios. Nenhum sinal foi detectado com as sondas de RNA "sense" (usadas como controle negativo), exceto a sonda sense referente à proteína SDC2. A sonda "sense" referente a proteína CD82 não apresentou material suficiente para a hibridação "in situ". A proteína OMP foi utilizada como controle positivo, pois ela é uma proteína expressa somente nos neurônios olfatório maduros.

53

DISCUSSÃO

Está claramente relatada na literatura a dificuldade em se expressar o OR de maneira funcional em sistemas heterólogos (McClintock & Sammeta, 2003). A retenção do OR no RE parece ser a principal causa da falha no tráfego deste para a membrana plasmática (Gimelbrant *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003). A razão pela qual os ORs não são expressos de modo funcional em sistemas heterólogos ainda não é conhecida.

As seqüências KDEL, KKXX e RKR quando fusionadas a proteínas de membrana causam retenção destas no R.E. (Zerangue et al., 1999). Estes sinais são característicos de proteínas retidas no R.E. (Teasdale & Jackson, 1996). Estas següências não foram encontradas no OR M93. É relatado na literatura que proteínas acessórias específicas são requeridas para auxiliar proteínas GPCRs ou não GPCRs, a adquirir uma conformação competente para exportação do RE (Herrmann et al., 1999). Por esse lado, acredita-se que uma chaperona específica olfatória ou um cofator regulador seja necessário para a maturação do receptor e seu correto tráfego para membrana plasmática. Entretanto, foi sugerido também a hipótese de que a falha da expressão funcional do OR em sistemas heterólogos pode ser ocasionada pela ausência de uma enzima de glicosilação específica que adiciona determinados açúcares ao OR (Katada et al., 2004). Sabe-se que a correta glicosilação de proteínas no RE e Golgi é necessária para seu endereçamento para a membrana plasmática ou secreção externa. Apesar desta hipótese não ser descartada, ainda não foram identificadas na literatura tais enzimas específicas para a expressão funcional de outros GPCRs. Então a identificação de novas proteínas que interajam com os ORs é de fundamental importância para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no enderecamento dos ORs à membrana.

Neste trabalho investigamos a expressão do OR M93 a fim de estabelecer sua localização subcelular em levedura. O tráfego intracelular e a localização das proteínas podem ser eficientemente visualizados pela fusão de um polipeptídeo ao GFP (Niedenthal *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1999). Nós utilizamos como modelo as leveduras, pois elas apresentam tempo de geração curto (~2h), são de fácil manipulação genética e fazem as modificações pós-traducionais que são essenciais para a funcionalidade das proteínas de mamíferos (Sarramegna *et al.*, 2003).

Para analisar a localização subcelular do OR através da fusão com GFP, as colônias de levedura da linhagem EGY48 contendo o pUG23 ou o pUG34 subclonados com o OR M93, foram induzidas na ausência de metionina, pois o promotor MET25 (presente nos pUGs) é induzível na ausência de metionina (Mumberg et al., 1994). O GFP pode ser fusionado na extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína de interesse permitindo a geração de proteínas fusionadas no qual a sua localização subcelular pode ser detectada pela microscópica de fluorescência em células vivas de leveduras (Niedenthal et al., 1996). Utilizando o microscópio de fluorescência, foi visto que a expressão do OR M93 fusionado a GFP, tanto na extremidade N-terminal (pUG34) quanto na extremidade C-terminal (pUG23), revelou um padrão de fluorescência semelhante ao observado na expressão de proteínas marcadoras de RE cortical e perinuclear em levedura (Fig. 14). O reticulo endoplasmático pode ser divido em cortical e perinuclear, o cortical é constituído de tubulos interconectados próximos a membrana e o perinuclear consiste de conexões tubulares em volta do envelope nuclear (Du et al., 2001). O padrão de fluorescência visto para o OR M93 assemelha-se ao do RE perinuclear. Esse resultado é interessante pois os ORs não tem motivos conservados (seqüências peptídeo sinal) envolvidos na exportação do RE (Zozylya et al., 2001; Ma & January, 2002). Então os mecanismos moleculares envolvidos na translocação da cadeia nascente da proteína OR para o RE ainda permanecem desconhecidos.

Portanto quando expressos em leveduras, os ORs também parecem ficar retidos no RE, assim como ocorre quando eles são expressos em células de mamíferos (Gimelbrant *et al.*, 1999; Gimelbrant *et al.*, 2001). Pajot-Augy *et al.* (2003) conseguiram expressar o OR 17 de maneira funcional em leveduras, isto é, foi possível obter a ativação deste receptor com o odor esperado (heptanal, ver tabela I). Entretanto, os autores não demonstraram a expressão do OR na membrana plasmática da levedura. Não mostraram também, se este sistema é funcional para outros ORs. Logo a provável retenção do OR M93 no RE parece impossibilitar um modelo em alta escala em levedura para a análise da interação entre os ORs e seus odores cognatos. Esse problema seria contornado com a identificação de proteínas que possam endereçar o OR corretamente à membrana plasmática.

A adição de uma seqüência de rodopsina (os primeiros vinte aminoácidos) no Nterminal, auxilia os ORs a serem expressos funcionalmente em células heterólogas (Krautwurst *et al.*, 1998; Wetzel *et al.*, 1999; Kajiya *et al.*, 2001). Mutações no sítio de glicosilação na extremidade N-terminal do mOR-EG fusionado a rodopsina, impede a translocação deste OR para a membrana (Katada *et al.*, 2004). A rodopsina é um GPCR encontrado em células fotoreceptoras e expressa de maneira eficiente em sistemas heterólogos. Mutações sítios dirigidas em aminoácidos constituintes da extremidade N-terminal e loop externo II da rodopsina provocam uma grande retenção desta no RE em células heterólogas (Sung *et al.*, 1991). Então, a extremidade N-terminal pode também ser importante para a translocação do OR para membrana plasmática.

Com o intuito de identificar proteínas ligantes ao OR M93, nós realizamos a varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo, através do sistema de duplo híbrido em leveduras. A isca utilizada na varredura foi a NH₃-Li1, já que ela foi à única que se mostrou funcional: não ativa os genes repórteres, vai para o núcleo e é produzida corretamente. A isca Li1 + Tm2 foi descartada, pois ela não está sendo expressa na levedura (Tabela II).

Através da varredura ("screening") da biblioteca de epitélio olfatório com a isca NH₃-Li1 obtivemos quatorze prováveis proteínas ligantes deste domínio em questão, pois observamos o crescimento de 14 clones nas placas Gal/Raff/CM –His -Ura -Trp -Leu e coloração azul destas, nas placas Gal/Raff/X-gal/CM –His -Ura -Trp (colônias positivas para os dois genes repórteres). Com o sequenciamento e a análise por BLAST dos clones obtidos no sistema de duplo híbrido, foram identificadas quatro prováveis proteínas diferentes ligantes do domínio (NH₃-Li1) do OR M93.

Os falso-positivos (ver tabela IV) são proteínas que geralmente são identificadas em compartimentos celulares distintos do objeto estudado, no caso o OR. Como por exemplo, as proteínas repressoras de fatores de transcrição e proteínas ligadoras de DNA, que se encontram no núcleo e não na membrana plasmática, onde se localizam os ORs.

Conhecendo a identidade das candidatas e as funções a elas atribuídas (Tabela IV) foi possível analisar se suas interações com ORs faziam sentido. Contudo, a confirmação destas interações através de outros métodos e a investigação de seus reais significados biológicos precisam ser realizadas. Desta forma, um primeiro passo para essa confirmação e melhor caracterização das interações obtidas foi a realização de uma hibridação "in situ" em cortes do epitélio olfatório, com as sondas correspondentes às quatro proteínas

identificadas. Como mostra a Figura 19, caracterizamos o padrão de expressão de quatro proteínas candidatas a interagir com o OR M93, são elas: SDC2, BAT-3/Scythe, OAP-1, CD82. Todas as proteínas, com exceção da SDC2, apresentaram marcação ao longo de todo epitélio, inclusive nos neurônios olfatórios maduros, que são as células nas quais os ORs são expressos. Contudo a análise por BLAST demonstrou que ESTs correspondentes a essas candidatas não são exclusivamente expressas no sistema olfatório (Tabela IV), dessa maneira essas proteínas provavelmente não são específicas de sistema olfatório.

A SDC2 apresenta uma marcação muito fraca no epitélio olfatório (OE) enquanto que a marcação "sense" da sonda apresenta marcação em vários tipos celulares do epitélio, inclusive nos neurônios olfatórios. Uma hipótese levantada para tal fato, é a possível presença de domínios conservados na sonda sense o que ocasionaria marcações de vários tipo celulares. As proteínas sindecans são proteoglicanos de superfície celular e pertencem a uma família composta de quatro membros. É relatado na literatura que as sindecans estão relacionadas à função de adesão celular e sinalização. Elas estão expressas em vários tecidos, incluindo o cérebro (Beauvais & Rapraeger, 2004). A sindecan dois (SDC2) parece exercer um papel crítico na maturação de neurônios pós-sinápticos do hipocampo (Beauvais & Rapraeger, 2004). Entretanto a pouca marcação da SDC2 no OE revela a baixa probabilidade de interação com o OR M93.

A proteína BAT-3/Scythe apresenta marcação específica aos neurônios olfatórios. O gene que codifica a proteína BAT-3/Scythe foi identificado no cromossomo seis humano, dentro do complexo de histocompatibilidade (MHC) (Banerji *et al.*, 1990). Essa proteína é rica em prolina e contém dois sinais de localização nuclear (NLS) no carboxi-terminal (Manchen *et al.*, 2001). O papel dessa proteína como reguladora de apoptose é sugerida na literatura, mas essa regulação ainda não é inteiramente compreendida (Wu *et al.*, 2004). O fato desta proteína apresentar dois NLS, sugerindo sua localização nuclear, parece descartar a possibilidade de interação com o OR M93, pois este se localiza na membrana plasmática dos neurônios olfatórios.

Dois membros da família tetraspaninas foram encontrados no sistema de duplo híbrido. Essa família contém quatro domínios transmembranas, possui 32 membros que exercem diversas funções e são expressos em vários tecidos (Hemler, 2003). As proteínas da família tetraspaninas são caracterizadas por conter quatro α hélices transmembrânicas e duas alças extracelulares (Fig. 20).



Extraído de Yunta, M., Lazo, P. A. Cell Signal. 15(6):559-64, 2003.

Fig. 20: Representação da estrutura consensual da proteína da família tetraspanina. Os resíduos indicados pela porcentagem dentro do circulo, são conservados na maioria das proteínas tetraspaninas e contribuem para a identificação desta família. EC= loops extracelulares 1 e 2. A extremidade amino terminal e carboxi terminal estão localizadas no citoplasma.

As tetraspaninas interagem com diferentes tipos de proteínas, como: as integrinas, receptores de membrana (por exemplo, receptores de fatores de crescimento), moléculas envolvidas na transdução de sinais, moléculas do complexo MHC; ou elas podem interagir com outras proteínas tetraspaninas. Essas interações podem formar complexos multimoleculares na superfície celular chamado de "tetraspanin web". É sugerido que esse complexo possa auxiliar na organização de proteínas na membrana plasmática (Yunta & Lazo., 2003; Le Naour *et al.*, 2004). O membro OAP-1 está expresso em diversos tecidos, no cérebro ele está presente nos oligodendrócitos (células da glia) como um dos componentes da mielina. É sugerido que o complexo OAP-1, OSP/Claudin-11 e a integrina β estejam envolvidos na regulação da proliferação e migração dos oligodendrócitos

(Tiwari-Woodruff et al., 2004). Na literatura foi descrita a interação entre a proteína da família M10 pertencente à classe Ib do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), a microglobulina-\beta2 (\beta2m) e os receptores de feromônio da família V2R (um GPCR), na superfície do dendrito do neurônio. Essa interação parece exercer um papel essencial no tráfego e estabilização do V2R à membrana plasmática do dendrito do neurônio sensorial (Loconto et al., 2003). Sendo assim, como apresenta quatro domínios transmembrânicos e possivelmente localiza-se na membrana dos neurônios, e por ter apresentado uma marcação mais especifica aos neurônios olfatórios maduros, a proteína OAP-1 é uma forte candidata em estar envolvida no endereçamento celular e estabilização dos ORs na membrana plasmática. Será interessante verificar se a OAP-1 está presente nos cílios dos neurônios olfatórios juntamente com os ORs. A proteína CD82 foi outro membro da família tetraspaninas identificado no ensaio do sistema de duplo-híbrido em levedura. Esse membro está envolvido com a função de adesão celular e é sugerido que ele tenha um papel na supressão de metástases. Esse membro apresenta intensa marcação em todos os tipos celulares presentes no epitélio olfatório (OE): células de suporte, neurônios olfatórios maduros e imaturos. Por ter sido encontrado em vários tipos celulares do OE, pode ser que a CD82 possa estar envolvido numa função mais geral do que no endereçamento correto do OR.

Os dois membros encontrados no ensaio do sistema de duplo híbrido em levedura (OAP-1 e CD82) por pertencerem a família de proteínas tetraspaninas são candidatos a interação com o OR M93, pois estão envolvidos na função de adesão celular e formam complexos denominados de "tetraspanin web" que podem estabilizar proteínas na membrana plasmática.

Vale comentar que intensidades variáveis de marcação foram obtidas na hibridação "in situ" com as diferentes sondas. Isso pode corresponder diretamente ao nível de expressão dos mRNAs das proteínas identificadas, mas também pode ser devido à variações na eficiência de hibridação das diferentes sondas.

O conhecimento de novas proteínas que auxiliem no correto dobramento ou endereçamento do OR à membrana, trarão valiosas informações para o estabelecimento de um sistema funcional de expressão heteróloga dos ORs, possibilitando assim, a elucidação

do código olfatório, ou seja, o conhecimento de todos os odores cognatos aos ~1000 ORs existentes.

CONCLUSÕES

1) Tanto a expressão do OR fusionado a GFP na extremidade N-terminal (pUG34) como na extremidade C-terminal (pUG23) em levedura, apresentaram um padrão de fluorescência semelhante ao observado na expressão de proteínas marcadoras de RE cortical. Então, este trabalho sugere que a expressão dos ORs ocorre de maneira não funcional em levedura. A levedura pode ser utilizada como um modelo para se desenvolver um sistema heterólogo para ORs, por exemplo através do seguinte protocolo: a) co-expressar uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo com o OR M93 fusionado a GFP em sua extremidade N-terminal; b) analisar a sublocalização do OR nessas leveduras, utilizando um anticorpo anti-GFP e FACS; c) isolar as leveduras que apresentarem marcação do anticorpo, sugerindo a presença do OR M93 na membrana plasmática; d) identificar e analisar a proteína candidata a auxiliar o correto endereçamento do OR à membrana.

2) A varredura da biblioteca de epitélio olfatório com a isca NH₃-Li1, utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura, identificou quatro prováveis proteínas diferentes ligantes dos domínios: N-terminal, transmembrana 1 e loop interno 1 do OR M93.

3) A análise através da técnica de hibridação in situ resultou na indicação da proteína OAP-1 como possível candidata em estar envolvida no endereçamento celular e estabilização do OR na membrana plasmática.

4) Proteínas que interagem com ORs identificadas através do método de duplo híbrido poderão ser analisados quanto a sua capacidade de auxiliar no endereçamento funcional de ORs para a membrana tanto em levedura quanto em células de mamíferos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.), vol.3, un. 20.1, 1999.
- Axel, R. The molecular logic of smell, Scientific American. 273: 154-159, 1995.
- Banerji J., Sands J., Strominger, J. L., Spies, T. A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. <u>Proc Natl Acad Sci USA</u>. 87(6):2374-8, 1990.
- Beauvais, D. M., Rapraeger, A. C. Sindecans in tumor cell adhesion and signaling. <u>Reprod Biol</u> <u>Endocrinol</u>. 2(1):3, 2004.
- Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R. e Dulac, C. A map of pherormone receptor activation in the mammalian brain, <u>Cell</u> 97: 209-220, 1999.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. J Neurosci. 22: 3033-3043, 2002.
- Brady, A. E. & Limbird, L. E. G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction, <u>Cell Signal</u> 14: 297-309, 2002.
- Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., Huganir, R. L, Worley, P.
 F. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. <u>Nature</u>. 386(6622):284-8, 1997.

- Brunet, L. J., Gold, G. H., Ngai, J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. <u>Neuron</u>. 17(4):681-93, 1996.
- Buck, L. B. Information coding in the vertebrate olfactory system, <u>Annu Rev Neurosci</u> 19: 517-544, 1996.
- Buck, L. B. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals, <u>Cell</u> 100: 611-618, 2000.
- Buck, L. e Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, <u>Cell.</u> 65: 175-187, 1991.

Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. Methods in Yeast Genetics – A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, edição 2000.

- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., Brown, A. J. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in Candida albicans. <u>Microbiology</u>, 143 (Pt 2):303-11, 1997.
- Dwyer, N. D., Troemel, E. R., Sengupta, P., Bargmann C. I. Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein, <u>Cell</u>. 93: 455-466, 1998.
- Du, Y., Pypaert, M., Novick, P., Ferro-Novick, S. Aux1p/Swa2p is required for cortical endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. <u>Mol Biol Cell</u>. 12(9):2614-2628, 2001.

Ellgaard, L., Helenius, A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. <u>Curr</u> <u>Opin Cell Biol</u>. 13: 431-437, 2001.

Ferguson S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. <u>Pharmacol Rev</u>. 53(1):1-24, 2001.

- Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. <u>Trends</u> <u>Genet.</u> 10(8):286-92, 1994.
- Firestein, S. How the olfactory system makes sense of scents. <u>Nature</u>; 413(6852):211-8. Review. 2001. BIBLIOTEC/
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F. X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. <u>Nature</u>. 337(6206):476-8, 1989.
- Gimelbrant A. A., Stoss T. D., Landers T. M., McClintock T. S. Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells. J Neurochem. 72(6):2301-11, 1999.
- Gimelbrant A. A., Haley S. L., McClintock T. S. Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. J Biol Chem. 276(10):7285-90, 2001.
- Godfrey P. A., Malnic B., Buck L. B. The mouse olfactory receptor gene family. <u>Proc Natl Acad</u> Sci U S A. 101(7):2156-61, 2004.
- Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Bush, C. F., Jones, S. V., Ressler, K. J., Hall, R. A., Minneman, K. P. Olfactory receptor surface expression is driven by association with the β₂-adrenergic receptor. PNAS. 101(37):13672-13676, 2004.
- Helenius, A., Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. Science. 291: 2364-2369, 2001.
- Hemler M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. Annu Rev Cell Dev Biol. 19:397-422, 2003.
- Herrmann, J. M., Malkus, P., Schekman, R. Out of the ER outfitters, escorts and guides. <u>Trends</u> <u>Cell Biol</u>. 9: 5-7, 1999.
- Ivic L, Zhang C, Zhang X, Yoon SO, Firestein S. Intracellular trafficking of a tagged and functional mammalian olfactory receptor. <u>J Neurobiol</u>. 50: 56-68, 2002.

Universidade de São Paul

- Jones, D. T., Reed, R. R. Golf: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. <u>Science</u>. 244: 790-795, 1989.
- Kajiya K., Inaki K., Tanaka M., Haga T., Kataoka H., Touhara K. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. J Neurosci; 21(16):6018-25. 2001.

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

- Krautwurst D., Yau K.W., e Reed R.R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. <u>Cell</u>; 95: 917-926, 1998.
- Le Naour, F., Charrin, S., Labas, V., Le Caer, J. P, Boucheix, C., Rubinstein, E. Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. <u>Cancer Immunol Immunother</u>. 53(3):148-52, 2004.
- Loconto J., Papes F., Chang E., Stowers L., Jones E. P., Takada T., Kumanovics A., Fischer Lindahl K., Dulac C. Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. <u>Cell</u>. 112(5):607-18, 2003.
- Lu M., Echeverri F., Moyer B. D. Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory g-protein coupled receptors. <u>Traffic</u>. 4(6):416-33, 2003.
- Luttrell L. M., Lefkowitz R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of Gprotein-coupled receptor signals. J Cell Sci. 115(Pt 3):455-65, 2002
- Ma, D., January, L. Y. ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. <u>Curr Opin Neurobiol</u>. 12: 287-292, 2002.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. <u>Cell</u>. 96: 713-723, 1999.
- Malnic B., Godfrey P. A., Buck L. B. The human olfactory receptor gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(8):2584-9, 2004.
- Manchen S. T. & Hubberstey A. V. Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis. Biochem Biophys <u>Res Commun</u>. 287(5):1075-82, 2001.
- McClintock, T. S., Sammeta, N. Trafficking prerogatives of olfactory receptors. <u>Neuroreport</u>. 14(12):1547-52, 2003.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., Axel, R. Visualizing an olfactory sensory map. <u>Cell</u>. 87(4):675-86, 1996.
- Mombaerts, P. How smell develops. Nat Neurosci; Suppl:1192-8. Review, 2001.
- Mombaerts, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. <u>Nat Rev Neurosci</u>. 5(4):263-78. Review, 2004.
- Mumberg, D., Muller, R., Funk, M. Regulatable promoters of Saccharomyces cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. <u>Nucleic Acids</u> <u>Res</u>. 22(25):5767-8, 1994.
- Nelson, G., Hoon M. A., Chandrashekar, J., Zhang Y., Ryba, N. J. P., Zuker, C. S. Mammalian Sweet Taste Receptors. <u>Cell</u>. 106: 381-390, 2001.
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J. H. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. <u>Yeast</u>. 12(8):773-86, 1996.
- Pajot-Augy E, Crowe M, Levasseur G, Salesse R, Connerton I. Engineered yeasts as reporter systems for odorant detection. J Recept Signal Transduct Res. 23(2-3):155-71, 2003.
- Pausch M. H. G-protein-coupled receptors in Saccharomyces cerevisiae: high-throughput screening assays for drug discovery. Trends Biotechnol. 15(12):487-94, 1997.

- Reynolds, A., Lundblad, V., <u>Current Protocols in Molecular Biology</u> (John Wiley & Sons, Inc.). Unit: 13.6. page 13.28, 1999.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L. e Buck, L. B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium, Cell. 73: 597-609, 1993.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., Buck, L. B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. <u>Cell</u>. 79(7):1245-55, 1994.
- Roche, K. W., Tu, J. C., Petralia, R. S., Xiao, B., Wenthold, R. J., Worley, P. F. Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. J Biol Chem. 274(36):25953-7, 1999.
- Ronnett, G. V., Moon, C. G proteins and olfactory signal transduction. <u>Annu Rev Physiol</u>. 64: 189-222, 2002.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., Milon, A. Heterologous expression of G-proteincoupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. <u>Cell Mol Life Sci. 60(8):1529-46</u>, 2003.
- Schaeren-Wiemers, N., Gerfin-Moser, A. A single protocol to detect transcriptions of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigeninlabelled cRNA probes, Histochemistry 100: 431-440, 1993.
- Schneuwly, S., Shortridge, R. D., Larrivee, D. C., Ono, T., Ozaki, M., Pak, W. L. Drosophila ninaA gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A. 86(14):5390-4, 1989.</u>
- Sengupta, P., Chou, J. H., Bargmann, C. I. odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. <u>Cell</u>. 84(6):899-909, 1996.
- Sheng, M., Sala, C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. <u>Annu Rev</u> <u>Neurosci.</u> 24: 1-29, 2001.

- Shieh, B. H., Stamnes, M. A., Seavello, S., Harris, G. L., Zuker, C. S. The ninaA gene required for visual transduction in Drosophila encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein. <u>Nature</u>. 338(6210):67-70, 1989.
- Skeberdis, V. A. Structure and function of beta3-adrenergic receptors. <u>Medicina (Kaunas)</u>. 40(5):407-13, 2004.
- Sung, C. H., Schneider, B. G., Agarwal, N., Papermaster, D. S., Nathans, J. Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>. 88(19):8840-4, 1991.
- Tate, G. C., Grisshammer, R. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. <u>Trends</u> <u>Biotechnol.14(11):426-30, 1996.</u>
- Teasdale, R. D. & Jackson, M. R. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u>. 12:27-54, 1996.
- Tiwari-Woodruff, S. K., Buznikov, A. G., Vu T. Q., Micevych, P. E., Chen, K., Kornblum, H. I., Bronstein, J. M. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. <u>J Cell</u> <u>Biol</u>. 153(2):295-305, 2001.
- Troemel, E. R., Chou, J. H., Dwyer, N. D., Colbert, H. A., Bargmann, C. I. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in C. elegans. <u>Cell</u>. 83(2):207-18, 1995.
- Vargas, G., Lucero, M. T. A method for maintaining odor-responsive adult rat olfactory receptor neurons in short-term culture. <u>Chem Senses</u>. 24: 211-216, 1999.
- Vassar, R., Ngai, J. e Axel, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. <u>Cell</u> 74: 309-318, 1993.

- Vassar, R., Chão, S. K., Sitcheran, R., Nunez, J. M., Vosshall, L. B., Axel, R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. <u>Cell</u>. 79(6):981-91, 1994.
- Zozulya. S., Echeverri, F., Nguyen, T. The human olfactory receptor repertoire. <u>Genome Biol</u>. 2: 18.11-18.18.12, 2001
- Zhang, X., Firestein, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. <u>Nat Neurosci</u>. 5: 124-133, 2002.
- Walker D., Htun H., Hager G. L., Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFPtagged steroid/nuclear receptors in living cells. <u>Methods</u>. 19(3):386-93, 1999
- Wetzel, C. H., Oles, M., Wellerdieck, C., Kuczkowiak, M., Gisselmann G., Hatt H. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and Xenopus Laevis oocytes. J Neurosci; 19(17):7426-7433. 1999.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., Storm,
 D. R. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. Neuron. 27(3):487-97, 2000.
- Wu, Y. H., Shih, S. F., Lin, J. Y. Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3. <u>J Biol Chem</u>. 279(18):19264-75, 2004.
- Yunta, M., Lazo, P. A. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. <u>Cell Signal</u>. 15(6):559-64, 2003.

1