

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

TIAGO JONAS DE ALMEIDA

Seleção de aptâmeros que se ligam ao receptor humano

para o gosto doce

Tese defendida

São Paulo

19/02/2014

TIAGO JONAS DE ALMEIDA

**Seleção de aptâmeros que se ligam ao receptor humano
para o gosto doce**

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

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Bettina Malnic

São Paulo

2014

Dedicatórias

A minha família, Chica, Giba, João, Drico e Peu

A Máira Nagai

AGRADECIMENTOS

Não consigo deixar de pensar agora, após todos esses anos de pesquisa, em um filme do cineasta francês Alain Resnais. Na verdade, são dois filmes, *Smoking* e *No smoking*. As cenas iniciais de ambos são idênticas, até o momento em que uma personagem oferece um cigarro à outra. Em *No smoking*, a oferta é recusada; em *Smoking*, o cigarro é aceito. A partir desse simples gesto os filmes se desenvolvem de maneira completamente diferente. Poderia dizer que esta tese é o resultado de gestos desse tipo. Foi um longo caminho pontuado por escolhas (este experimento ou este outro? Esta técnica ou esta outra?).

Gostaria de agradecer às seguintes pessoas que contribuíram para essas escolhas e para que eu conseguisse concluir este trabalho. São elas:

Prof(a). Dra. Bettina Malnic, que me acolheu em seu laboratório e me proporcionou as condições materiais para o desenvolvimento deste projeto. Trabalhar no laboratório da professora Bettina foi muito estimulante e enriquecedor. Devo a ela minha maturidade científica. Sou-lhe também muitíssimo grato pelo apoio que me deu quando tive de enfrentar problemas pessoais graves.

Morena Maricato, por quem tive um amor incomensurável, infinito, enquanto durou. Sem ela não teria vindo para São Paulo, não teria enfrentado com coragem as peças que a vida me pregou e teria sucumbido ao “grotesco dos acontecimentos cotidianos”. Com ela tudo foi leveza, serenidade e intensidade. O tempo que passamos juntos foi pura alegria.

Minha família, que nunca me deixou na mão e sempre me apoiou em todas as minhas decisões. É uma família extraordinária.

Meus melhores amigos, Ricardo Rodrigues, Débora Butruce e Luis Fernando, com quem dividi os momentos mais importantes de minha vida e compartilhei e compartilho muitas paixões, o cinema, a literatura, a política, a filosofia e a música. Sua vitalidade é contagiante, sem eles tudo seria um tédio. E Maissa Bakri, que se tornou uma grande amiga.

Meus não menos amigos, Roberto Evangelista, Júlia Evangelista e Cleriston Costa, por quem nutro uma amizade elementar. E William, que me acolheu em Londres.

Maíra Nagai, que foi meu Sol nesses últimos quatro anos. Sua generosidade foi imensa, seu amor, doce. Uma cientista de verdade (obstinada, inteligente e arguta) e uma mulher sofisticada, delicada e elegante que me ensinou a ser menos obtuso e a entender efetivamente a frase “*true love leaves no traces*”, de uma bela canção de Leonard Cohen.

Minhas companheiras de laboratório, Lúcia Armelin, Luciana Gutiyama e Daniela Gonzales, que tiveram a paciência de me introduzir no mundo da Biologia Molecular e com

quem desabafei nos momentos de estresse. Foram as pessoas mais prestativas que conheci. Seu apoio foi fundamental. E Jussara e Daniel, importantes nos primeiros meses de trabalho.

A técnica Érica Michelle, que sempre me ajudou quando precisei. Doçura maior não há.

Prof. Dr. Isaías Glezer, que dividiu comigo seu conhecimento, suas ideias, suas especulações, seu humor e sua amizade. Nada melhor que preparar reações conversando sobre os filmes de Hitchcock.

Prof. Dr. Henning Ulrich, que me deu sugestões preciosas a respeito da técnica SELEX. Seu laboratório sempre esteve de portas abertas para mim.

Prof. Wolfgang Meyerhof (*German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke*, Nuthetal, Alemanha), que cedeu os vetores de expressão.

Kátia Neves, Cléber Trujilo e Arthur Nery, orientandos do professor Henning, que me ajudaram na parte prática da técnica SELEX. E Talita Glaser, que se prontificou a me ajudar nos ensaios de cálcio.

Luci Navarro, que realizou um excelente serviço de sequenciamento de DNA.

Os funcionários da secretaria de pós-graduação e de Bioquímica, Milton, Emiliano, Paulo, Marcelo e Cibele, sempre dispostos a ajudar.

Meus vizinhos de laboratório, Ariel, Bruno, Fernanda, Felipe, Gustavo, Matheus, Paulo, Walquiria e as professoras Nadja e Alícia, com quem tive uma excelente convivência e dividi litros de café. E Prof. Ronaldo, grande conversador.

Mariana Duarte, que me ajudou com a ultracentrífuga.

André, Humberto e Raissa, orientandos do professor Isaías, e Débora (ex-IC do nosso laboratório), Artur e João, com quem tive conversas agradáveis e divertidas.

Os professores com quem fiz disciplinas (Frederico Gueiros, Carla Columbano, Regina Baldini, Guilherme Menegon, Sandro Marana e Mari Cleide), que ajudaram na minha formação.

Prof(a). Dra. Lúcia Aguiar (UFRJ), que me incentivou a fazer o doutorado na USP.

Todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meus novos parceiros de trabalho, pessoas leves que me incentivam bastante.

E Elô. Sou um sortudo por tê-la encontrado.

Agradeço também às seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

You must leave now, take what you need, you think will last
But whatever you wish to keep, you better grab it fast
Yonder stands your orphan with his gun
Crying like a fire in the sun
Look out the saints are comin' through
And it's all over now, Baby Blue
The highway is for gamblers, better use your sense
Take what you have gathered from coincidence
The empty-handed painter from your streets
Is drawing crazy patterns on your sheets
This sky, too, is folding under you
And it's all over now, Baby Blue
All your seasick sailors, they are rowing home
All your reindeer armies, are all going home
The lover who just walked out your door
Has taken all his blankets from the floor
The carpet, too, is moving under you
And it's all over now, Baby Blue
Leave your stepping stones behind, something calls for you
Forget the dead you've left, they will not follow you
The vagabond who's rapping at your door
Is standing in the clothes that you once wore
Strike another match, go start anew
And it's all over now, Baby Blue
(Bob Dylan, *It's all over now, Baby Blue*)

“Há alguns anos os cientistas vêm sendo objeto de censuras. São acusados de não possuírem coração nem consciência, de não se interessarem pelo resto da humanidade; e mesmo de serem indivíduos perigosos que não hesitam em descobrir e utilizar meios de destruição e de coerção terríveis. Exagera-se sua importância. A proporção de pessoas imbecis e sem caráter é uma constante presente em todas as amostras de uma população, sejam compostas por cientistas ou por agentes de seguro, por escritores ou por camponeses, por padres ou por políticos. E, apesar de Dr. Frankenstein e do Dr. Strangelove, as catástrofes da história têm sido fruto mais da atuação de padres e políticos que de cientistas.

Pois não é somente o lucro que faz que os homens se matem. É também o dogmatismo. Nada é mais perigoso do que a certeza de ter razão. Nada causa tanta destruição quanto à obsessão de uma verdade considerada absoluta. Todos os crimes da história são consequência de algum fanatismo. (...) Não são as ideias da ciência que engendram as paixões. São as paixões que utilizam a ciência para sustentar sua causa. A ciência não leva ao racismo e ao ódio. É o ódio que lança mão da ciência para justificar seu racismo. (...) No final deste século, é preciso que fique claro para cada pessoa que nenhum sistema explicará o mundo em todos os seus aspectos e detalhes. Ter ajudado na destruição da ideia de uma verdade intangível e eterna talvez seja uma das mais valiosas contribuições da metodologia científica.”

François Jacob, *A lógica da vida: uma história da hereditariedade*

Sumário

Lista de Siglas e Símbolos.....	9
Lista de Figuras.....	14
Lista de Tabelas.....	19
Resumo.....	20
Abstract.....	22
1. Introdução.....	25
1.1. GPCRs.....	25
1.1.1. GPCRs envolvidos na sensação química.....	26
1.2. A percepção do gosto.....	28
1.2.1. Receptores para o gosto doce.....	31
1.3. CD36, um receptor quimiossensorial?	35
1.4. Evolução sistemática de ligantes mediante enriquecimento exponencial ou SELEX.....	36
2. Objetivos.....	44
2.1. Objetivos gerais.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. Material e Métodos.....	46
3.1. Manutenção de células HEK293T.....	46
3.2. cDNAs e vetores de expressão.....	46
3.3. Transfecção.....	47
3.4. Imunofluorescência para detecção dos receptores hT1R2/hT1R3.....	47
3.5. Preparação de membrana de células HEK293T	48
3.6. Western Blot.....	49
3.7. Medidas da variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, por imageamento de cálcio.....	50
3.8. Expressão de hT1R2 e hT1R3 em células HEK 293T.....	51
3.8.1. Extração de RNA total de células HEK 293T.....	51
3.8.2. Transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).....	52
3.9. PCR: purificação e clonagem.....	53
3.9.1. Purificação de produtos de PCR.....	53
3.9.2. Clonagem de produtos de PCR.....	53
3.10. Bactérias competentes e minipreparação plasmidial.....	53
3.10.1. Preparação de bactérias competentes.....	53
3.10.2. Transformação de bactérias competentes.....	54
3.10.3. Minipreparação de DNA plasmidial.....	54
3.11. Reação de sequenciamento.....	55
3.12. SELEX.....	56
3.12.1. Biblioteca combinatória de DNA.....	56
3.12.2. Purificação da Biblioteca.....	56
3.12.3. Amplificação da biblioteca por reação em cadeia da polimerase sujeita a erro.....	57
3.12.4. Transcrição <i>in vitro</i> e purificação da biblioteca de RNA.....	58
3.12.5. Seleção de aptâmeros: incubação do resultado da transcrição <i>in vitro</i> com o alvo, preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce.....	59
3.12.6. Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR).....	61
3.12.7. Contrasseleção negativa para eliminar moléculas de RNA que se ligam de modo não específico à membrana de nitrocelulose.....	62
3.12.8. Contrasseleção negativa para eliminar moléculas de RNA que se ligam de modo não específico a proteínas presentes na preparação de membrana de células HEK293T que não expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce.....	62
3.13. Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX.....	63
3.14. Busca por motivos conservados na região randômica dos aptâmeros de RNA.....	63

3.15. Previsão da estrutura secundária dos aptâmeros de RNA.....	64
3.16. RT-PCR semiquantitativa.....	64
3.17. Transcrição para a produção de aptâmeros de RNA marcados com ATP [α - ³² P] e ensaio de <i>binding</i>	65
3.18. Ensaio de <i>gel-overlay</i>	68
3.19. Imunofluorescência para determinação da localização de CD36 em cortes frescos de epitélio olfatório.....	68
4. Resultados.....	71
4.1. Caracterização das células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce.....	71
4.2. Procedimento SELEX.....	77
4.3. Análise da eficácia de SELEX.....	83
4.4. Caracterização dos aptâmeros do ciclo 12.....	88
4.5. Imunofluorescência para determinação da localização de CD36 em cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo.....	99
5. Discussão.....	104
6. Conclusão.....	113
7. Referências bibliográficas.....	116
Anexos.....	130

Lista de Siglas e Símbolos

$[Ca^{2+}]_i$ – Concentração de cálcio livre intracelular.

°C – Grau centígrado.

μL – Microlitros.

x g – Força centrífuga relativa.

ATP – Do inglês *Adenosine 5'-Triphosphate*, adenosina 5'-trifosfato.

ATP [α - ^{32}P] – Adenosina 5'-trifosfato com o fósforo alfa substituído por seu isótopo radioativo P^{32} .

BLAST – Do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*, trata-se de uma ferramenta de alinhamento de sequências.

4-Br-A23187 – Do inglês *4-bromo-calcium ionophore A23187*, ionóforo A23187 de 4-bromo-cálcio.

BSA – Do inglês *Bovine Serum Albumin*, albumina de soro bovino.

CD36 – Do inglês *Cluster of Differentiation 36*, agregado de diferenciação 36.

cDNA – Do inglês *complementary Deoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico complementar.

cm² – Centímetros quadrados.

cpm – Contagens por minuto.

DAPI – Do inglês *4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*, dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole.

dATP – Do inglês *2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphate*, 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato.

dCTP – Do inglês *2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphate*, 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato.

dGTP – Do inglês *2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphate*, 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato.

DMEM – Do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, meio de cultura de célula.

DMSO – Dimetilssulfóxido.

DNA – Do inglês *Deoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico.

dNTP – Do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*, 2'-desoxinucleotídeo 5'-trifosfato.

DTT – Ditioneitol.

dTTP – Do inglês *2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate*, 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato.

EDTA – Do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilendiamino tetra-acético, agente quelante.

EGTA – Do inglês *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*, ácido tetracético de etileno glicol.

ENaC – Do inglês *Epithelial Sodium Channel*, canal de sódio epitelial.

E.P.M. – Erro padrão da média.

FBS – Do inglês *Fetal Bovine Serum*, soro fetal bovino.

2'-F-dCTP – Do inglês *2'-Fluoro-2'-deoxycytidine-5'-Triphosphate*, 2'-flúor-2'-desoxicidina-5'-trifosfato.

2'-F-dUTP – Do inglês *2'-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-Triphosphate*, 2'-flúor-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato.

Fluo-3AM – Indicador fluorescente cujo nome IUPAC em inglês é *4-(6-Acetoxy-methoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester*.

g – Grama.

GAPDH – Do inglês *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

GFP – Do inglês *Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde.

GMP/IMP – Do inglês *Guanosine Monophosphate* e *Inosine Monophosphate*, monofosfato de guanosina e de inosina.

GPCRs – Do inglês *G Protein-Coupled Receptors*, receptores acoplados a proteína G.

GPR 120 e o GPR 40 – Do inglês *G-Protein coupled Receptor 120* e *G-Protein coupled Receptor 40*, receptores acoplados à proteína G 120 e 40.

GTP – Do inglês *Guanosine 5'-Triphosphate*, guanosina 5'-trifosfato.

h – Hora.

HEK293T – Do inglês *Human Embryonic Kidney 293 cells with the SV40 T-antigen*, linhagem imortalizada de células de rim de embrião humano com antígeno T de SV40.

HEPES – Do inglês *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid*, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico.

hT1R2 e hT1R3 – Do inglês *human Taste Receptor type 1 member 2* e *human Taste Receptor type 1 member 3*, receptores humanos para o gosto doce.

IC50 – Concentração do ligante não marcado que inibe em 50 % a ligação de um radioligante ao seu receptor.

IP₃R3 – Do inglês *Inositol Triphosphate Receptor type III*, receptor do tipo III de trifosfato de inositol.

K_d – Constante de dissociação; concentração de ligante necessário para ocupar 50% dos sítios de ligação de um receptor.

kDa – Quilodalton.

K_i – Constante de inibição.

KO – Do inglês *Knockout*, linhagem em que um gene é tornado inoperante.

LB – Luria Bertani, meio de cultura de bactéria.

M – Molar.

MEME – Do inglês *Multiple Em for Motif Elicitation*, programa online de busca de motivos conservados.

min – Minuto.

mg – Miligrama.

mL – Mililitro.

mM – Milimolar.

NCAM – Do inglês *Neural Cell Adhesion Molecule*, molécula de adesão à célula neural.

NDS – Do inglês *Normal Donkey Serum*, soro normal de burro.

ng – Nanograma.

nm – Nanômetro.

nM – Nanomolar.

NTP – Do inglês *Nucleotide Triphosphate*, nucleotídeo 5'-trifosfato.

ORs – Do inglês *Olfactory Receptors*, receptores olfatórios.

P³² – Isótopo radioativo do fósforo.

PBS – Do inglês *phosphate buffered saline*, tampão salino de fosfato.

pb – Pares de base nucleotídea.

PCR – Do inglês *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase.

PLC- β_2 – Do inglês *Phospholipase C- β_2* , fosfolipase C- β_2 .

PMSF – Do inglês *Phenylmethanesulfonyl fluoride*, fluoreto de fenilmetanosulfonila, inibidor de proteases.

P2Y1 – Receptor purinérgico P2Y acoplado a proteína G 1.

PVDF – Do inglês *Polyvinylidene Difluoride*, difluoreto de polivinilideno.

RM – Do inglês *Receptor Mosaics*, mosaicos de receptores.

RNA – Do inglês *Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico.

RPM – Rotações por minuto.

RT-PCR – Do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.

s – Segundo.

SDS – Do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecil sulfato de sódio.

SELEX – Do inglês *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial.

SNMP – Do inglês *Sensory Neuron Membrane Protein*, proteína sensória da neuromembrana.

SNP – Do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismo de nucleotídeo único.

TAARs – Do inglês *Trace Amine-Associated Receptors*, receptores associados a traços de amina.

TBE – Do inglês *Tris-Borate-EDTA buffer*, tampão de tris-borato-EDTA.

TBS-T – Do inglês *Tris-buffered saline Tween 0.03%*, solução salina tamponada com 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol contendo 0,03% Tween

TCLK – Do inglês *N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone*, tosil-L-lisina clorometil cetona.

T1R e T2R – Do inglês *Taste type-1 and type-2 Receptors*, receptores gustativos de tipo 1 e tipo 2.

TRCs – Do inglês *Taste Receptor Cell*, célula com receptores gustativos.

tRNA – RNA transportador.

TRPM5 – Do inglês *Transient Receptor Potential channel M5*, canal M5 de potencial transiente.

UV – Ultravioleta.

V – Volt.

v/v – Porcentagem em volume.

VFTM – Do inglês *Venus Flytrap Module*, domínio de ligação *venus-flytrap*.

VNO – Do inglês *Vomer nasal Organ*, órgão vomeronasal.

V1Rs e V2Rs – Do inglês *Vomer nasal type-1 and type-2 Receptors*, receptores vomeronasais de tipo 1 e tipo 2.

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo.

WT – Do inglês *Wild Type*, linhagem selvagem.

Lista de Figuras

- Figura 1.1. **Botão gustativo e anatomia do gosto.** (A) Laranja: células do tipo I; verde: células do Tipo II ou células receptoras (os diversos tons de verde correspondem às diversas subpopulações dedicadas aos estímulos doces, amargos e *umami*); vermelha: células do Tipo III ou pré-sinápticas; cinza: células do tipo IV ou basais; e azul: células perigemais. (B) Os botões gustativos na língua e no palato são enervados por três nervos aferentes: nervo glossofaríngeo, nervo petroso superficial superior e corda do tímpano (Adaptado de Yamolinsky *et al.*, 2009 e Behrens *et al.*, 2011). 30
- Figura 1.2. **Representação esquemática do heterodímero de hT1R2 e hT1R3.** (Adaptado de Cui *et al.*, 2006). 34
- Figura 1.3. (A) **Mecanismo de clivagem de RNA por transesterificação intramolecular.** A ligação fosfodiéster de RNA sofre ataque nucleofílico do oxigênio na posição 2' (1), o que resulta na formação de um complexo intermediário pentacoordenado (2) e na saída do oxianion na posição 5'. Essa reação produz fragmentos de RNA com 2', 3'-fosfato cíclico e hidroxila no terminal 5' (3 e 4) (Adaptado de Soukup and Breaker, 1999). (B) **Exemplos de pirimidina modificada.** Dois exemplos da base nitrogenada pirimidínica citosina com flúor (F) e com grupo amina (NH₂) na posição 2'. 38
- Figura 1.4. **Seleção *in vitro* de aptâmeros usando a tecnologia SELEX (um ciclo é exibido).** No início de cada processo SELEX, após síntese de segunda fita e amplificação, uma biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos consistindo em uma variedade de fragmentos de DNA dupla fita com sequências diferentes é usada como molde para transcrição *in vitro*. O procedimento SELEX é caracterizado pela repetição de passos sucessivos em que há seleção (ligação, partição e eluição), amplificação e condicionamento. Em geral, de 6 a 20 ciclos de SELEX são necessários para a seleção de aptâmeros específicos e altamente afins com o alvo. O último ciclo de SELEX é concluído após o passo de amplificação. O pool enriquecido de aptâmeros é clonado, e diversos aptâmeros individuais devem ser caracterizados (legenda adaptada de Stoltenburg *et al.*, 2007). 40
- Figura 3.1. **Biblioteca de DNA simples fita.** A sequência promotora T7 é mostrada em negrito vermelho. Sublinhadas estão as sequências que correspondem aos sítios de enzimas de restrição: AAGCTT (HindIII), AGTACT (ScaI) e GAATTC (EcoRI). N40 corresponde à sequência randômica de 40 nucleotídeos, em que os quatro desoxirribonucleotídios (desoxiadenosina trifosfato [A], desoxicitidina trifosfato [C], desoxitimidina trifosfato [T] e desoxiguanosina trifosfato [G]) foram incorporados com igual probabilidade. 56
- Figura 4.1. **Expressão de hT1R2/hT1R3 em células HEK293T.** (A) Detecção por *Western blot* do receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce 72

expresso em células HEK293T. O anticorpo anti-FLAG foi utilizado para detectar ambos hT1R2 e hT1R3. O *Western* com o anticorpo anti- α -tubulina constitui o controle interno. (B) Detecção por *Western blot* de hT1R3 em células HEK293T com o anticorpo primário anti-FLAG M2. (C) Detecção por *Western blot* de hT1R2 em células HEK293T com o anticorpo primário anti-FLAG M2. As células foram transfectadas com vetores de expressão contendo hT1R2 e hT1R3 (ou com cada vetor, individualmente), e as preparações de membrana foram purificadas. Aproximadamente 10 μ g de preparação de membrana foram utilizados. A revelação em (A) foi feita quimicamente, com revelador e fixador da Kodak (*Carestream® Kodak® Processing chemicals*); em (B) e (C), ela foi feita em um escâner *Typhoon Trio* (GE).

Figura 4.2. **Detecção por imunofluorescência do receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce expresso em células HEK293T.** 75

(A) As células foram transfectadas com os vetores contendo hTAS1R2 (A1), hTAS1R3 (A2) e com ambos os vetores de expressão (A3). Os núcleos foram corados com DAPI. A detecção das proteínas foi feita com o anticorpo primário anti-FLAG M2 e o anticorpo secundário *anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546* (B) Imunofluorescência para identificar a localização dos receptores. As células foram transfectadas com os vetores de expressão contendo hTAS1R2 e hTAS1R3 e imunomarcadas com os anticorpos anti-FLAG M2/*anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488* (B1) e anti-P2Y1/*anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546* (B2). B3 é a sobreposição das marcações de hT1R2/hT1R3 (verde) e de P2Y1 (vermelho). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio invertido Nikon TE 300.

Figura 4.3. **Variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, em células HEK 293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 e em células HEK 293T selvagens.** 76

Imagens representativas da variação de $[Ca^{2+}]_i$ seguida da estimulação das células HEK 293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 e células HEK 293T selvagens por 100 mM de solução de sacarose. Ao final de cada medida o inonóforo 4-Br-A23187 era adicionado para verificar a viabilidade celular e a resposta máxima. O experimento foi realizado três vezes.

Figura 4.4. **RT-PCR de RNA total de células HEK293T.** 77

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 1 μ g de RNA total extraído de células HEK293T. (A) Reações de amplificação feitas com *primers* desenhados para regiões específicas dos genes hTAS1R2 e hTAS1R3 (Jang *et al.*, 2007). As bandas da esquerda (tanto para hT1R2 como para hT1R2) correspondem a PCRs realizadas com DMSO 5%. As da direita (tanto para hT1R2 como para hT1R2) correspondem a PCRs realizadas sem DMSO 5%. O controle negativo foi feito sem a adição de RNA. (B) Controle positivo. Os vetores de expressão pcDNA5 FRT contendo as regiões codificadoras de hT1R2 e hT1R3 foram utilizados. Nos controles negativos, os vetores não foram adicionados à reação. (C) Controle interno. *Primers* específicos foram desenhados para amplificar parte do gene da enzima GAPDH. O controle negativo foi feito sem a adição de RNA. Os padrões de peso molecular (A, B e C) correspondem

a *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™).

- Figura 4.5. **Início do procedimento SELEX.** Em torno de 400 µg da biblioteca de DNA simples fita foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 8% e purificados (banda em 100 pb). O resultado dessa purificação foi submetido à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% (A). Para a amplificação, foi necessário buscar a ciclagem mais adequada. Após testes, verificou-se que, com 9 ciclos, se obteria um bom rendimento e não se observaria a formação de multímeros. O produto da amplificação da biblioteca por *error-prone* PCR também está em A. Uma alíquota desse material foi utilizada em uma transcrição *in vitro*, e o produto da transcrição, submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 8% (B). O padrão de peso molecular (A) corresponde a *FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific). Vê-se em (A) as bandas referentes a 200 pb, 100 pb e 50 pb. 79
- Figura 4.6. **Exemplo de teste de ciclagem (RT-PCR de aptâmeros de RNA selecionados) e produto da amplificação purificado.** (A) Quatro alíquotas de 5 µL da mistura reacional de RT-PCR foram submetidas a diferentes ciclagens de amplificação, e os produtos, à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. O exemplo refere-se a um teste de ciclagem feito para RT-PCR de aptâmeros selecionados no ciclo 4 de SELEX. (B) Após escolha da ciclagem e amplificação do material, a banda em 100pb foi purificada. Uma alíquota de 3 µL do resultado dessa purificação foi submetida novamente à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. Os dímeros de *primer* estão indicados no retângulo vermelho (A). O padrão de peso molecular (A) corresponde a *FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific) (bandas referentes a 200, 100, 50 e 20 pb). Em (B), o padrão de peso molecular corresponde a *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™) (bandas referentes a 400, 200, e 100 pb). 80
- Figura 4.7. **Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX.** A biblioteca de DNA simples fita foi purificada e amplificada por PCR sujeita a erro. O material de uma alíquota da PCR sujeita a erro foi clonado em pCRII (Invitrogen™), e 48 clones, sequenciados. Em (A), apenas as sequências randômicas desses clones são apresentadas. A randomicidade é medida pela distribuição dos motivos estruturais (B) e pela porcentagem de cada nucleotídeo nas sequências obtidas (C). A: desoxiadenosina monofosfato; G: desoxiguanosina monofosfato; C: desoxicitidina monofosfato; T: desoxitimidina monofosfato; e N: desoxinucleotídeos não identificados na reação de sequenciamento. 81
- Figura 4.8. **Esquema das etapas executadas no processo SELEX.** 82
- Figura 4.9. **Ensaio de ligação.** (A) Aptâmeros de RNA dos ciclos 7, 9 e 12 foram marcados com [α -³²P] ATP e incubados com 10 µg de proteína da preparação de membrana de células HEK293T que expressam os 84

receptores para o gosto doce (hT1R2/hT1R3). Após filtração dessa mistura e lavagem com tampão de seleção, a quantidade de aptâmeros radiomarcados que se ligaram ao alvo foi medida por contagem de cintilação (cpm). A ligação não específica para cada ciclo foi determinada na presença de excesso de aptâmeros de RNA não marcados do mesmo ciclo (competição homóloga) (A) ou na presença de 100 mM de sacarose (B). (C) Autorradiografia de gel de poliácridamida desnaturante 8% (transcrição radioativa *in vitro* de *pool* do ciclo 12). Os dados em (A) e (B) correspondem à intensidade média em cpm de medidas de radioatividade da ligação específica \pm E.P.M. de três experimentos independentes; * $p < 0,001$.

- Figura 4.10. **RT-PCR semiquantitativa.** Cerca de 1 pmol dos ciclos 7 (A), 9 (B) e 12 (C) de SELEX foram incubados por 40 minutos com células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e que não expressam hT1R2/hT1R3. Após esse tempo, as células foram lavadas com tampão PBS e lisadas com SDS (1%) e citrato de sódio (100mM). Os aptâmeros ligados foram extraídos, precipitados e solubilizados em água livre de RNase. Alíquotas de 5 μ L foram submetidas a transcrição reversa, a várias ciclagens de PCR. O experimento foi realizado três vezes. 86
- Figura 4.11. **Saturação e ligação competitiva.** (A) 10 ug de proteína da preparação de membrana de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com várias concentrações de aptâmeros radiomarcados do ciclo 12. A ligação não específica foi determinada na presença de 250 mM de sacarose. $K_d = 9,731 \pm 4,231$ nM. (B) Células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com aptâmeros radiomarcados do ciclo 12 (1,2 nM) na presença de várias concentrações de ligante não marcado (0-700 mM de sacarose) em um volume total de 50 μ L de tampão de seleção. $K_i = 83,37$ mM (Intervalo de Confiança de 95 %: 8,4 mM a 827,1 mM). Cada ponto representa a intensidade média em cpm das medidas de radioatividade da ligação específica \pm E.P.M. de três experimentos independentes. 89
- Figura 4.12. **Representações em WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) das expressões regulares de cada classe.** O tamanho da letra significa uma maior ou menor probabilidade de se encontrar um determinado nucleotídeo em uma posição específica do motivo. 90
- Figura 4.13. **Ligação total de aptâmeros selecionados.** Aptâmeros do ciclo 12 de cada classe foram selecionados com base em sua similaridade com a expressão regular (ou seja, com a sequência consenso). Células HEK293T que expressam e células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com esses aptâmeros marcados (1 nM) num volume total de 50 μ L de tampão de seleção (PBS). As células foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com SDS 1 % e 100 mM de citrato de sódio, e a radioatividade ligada, medida. Os dados correspondem à intensidade média em cpm das medidas de radioatividade da ligação total \pm E.P.M. de dois experimentos independentes; * $p < 0,005$ e ** $p < 0,05$. 95

- Figura 4.14. **Ensaio de gel-overlay e Western blot.** As preparações de membrana (cerca de 10 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, e as proteínas separadas foram transferidas para membranas de PVDF. Essas membranas foram incubadas com os aptâmeros radiomarcados, selecionados do ciclo 12 (A). O controle interno do *Western blot* foi feito com α -tubulina (B). O controle positivo (C) é semelhante ao *Western* mostrado na Figura 4.1, em que foi utilizado anti-FLAG. O sinal "+" refere-se a preparações de membrana que expressam hT1R2/hT1R3; o sinal "-", a preparações de membrana de células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3; a seta verde, à banda de α -tubulina; a seta vermelha, à banda azul clara do peso molecular que corresponde à 100 kDa; e "L" é o padrão de proteínas *Protein Spectra™ Multicolor Broad Range* (Fermentas). 97
- Figura 4.15. **Previsão do algoritmo Mfold sobre a estrutura dos aptâmeros de RNA.** (A) Aptâmeros Classe 2 (9 e 46). (B) Aptâmeros Classe 3 (19 e 85). As ilustrações representam previsões de estruturas com menor energia livre. A localização dos motivos consensos nos aptâmeros é mostrada em amarelo. 99
- Figura 4.16. **Imunofluorescência com marcação dupla de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo knockout (KO) e selvagem (WT).** Primeira coluna, marcação com anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal e anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG* para cortes de camundongos WT e KO. Segunda coluna, marcação com anticorpo primário monoclonal anti-CD36 *mouse* e anticorpo secundário *Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG* para cortes de camundongos WT e KO. Terceira coluna, sobreposição (merge). 101
- Figura 4.17. **Controles da imunofluorescência.** Primeira linha, imunofluorescência de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo selvagem (WT), conforme Figura 4.16, porém sem anticorpo primário monoclonal anti-CD36 *mouse*. Segunda linha, imunofluorescência de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo selvagem (WT), conforme Figura 4.16, porém sem anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal. 102

Lista de Tabelas

Tabela 3.1.	Proporção RNA (μg) / Proteína (μg) em cada ciclo.	60
Tabela 4.1.	Lista de aptâmeros com motivo Classe 1. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde, na região randômica do aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos – em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências – que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).	91
Tabela 4.2.	Lista de aptâmeros com motivo Classe 2. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos – em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências – que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).	92
Tabela 4.3.	Lista de aptâmeros com motivo Classe 3. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos – em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências – que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).	93
Tabela 4.4.	Aptâmeros selecionados do Ciclo 12. As três classes contêm dez ou mais aptâmeros diferentes. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda refere-se ao logotipo da sequência conservada; a terceira indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).	94

Resumo

(Almeida, TJ) **Identificação de aptâmeros que se ligam ao Receptor Humano T1R2/T1R3 para o Gosto Doce.** 2013. 128 p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foi demonstrado que o gosto doce é transduzido por receptores acoplados a proteína G classe III (GPCRs), T1R2 e T1R3. Essas proteínas exibem longas extremidades amino-terminais que formam um domínio de ligação globular extracelular. Elas são expressas em células associadas ao gosto (células epiteliais que constituem os botões gustativos nas papilas gustativas), que respondem a moléculas associadas ao gosto doce. Quando T1R2 e T1R3 são co-expressas em células heterólogas, elas respondem, como heterômeros, a uma série de açúcares, alguns D-aminoácidos, edulcorantes artificiais e proteínas doces. Foi também demonstrado que o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce apresenta múltiplos sítios de ligação. Para melhor compreender a estrutura desse receptor e responder à pergunta de como um único quimiorreceptor pode ser responsivo a uma variedade de ligantes, foi utilizada a abordagem denominada evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) para isolar, a partir de uma biblioteca combinatória de oligonucleotídeos, aptâmeros de RNA resistentes a nuclease que se ligam ao receptor humano para o gosto doce com alta afinidade. Após um enriquecimento de doze ciclos do *pool* original de RNA contendo em torno de 10^{13} sequências diferentes (contra preparações de membrana de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3) e outros ciclos de contrasseleção negativa (para eliminar moléculas de RNA que se ligam de forma inespecífica à membrana de nitrocelulose e a outras proteínas diferentes do alvo, ou seja, proteínas de membrana de células HEK293T selvagem), realizou-se a transcrição reversa do RNA seguida de amplificação por PCR e sequenciamento. Aptâmeros do ciclo 12 com sequências consenso foram selecionados, e a ligação de alguns

deles com hT1R2/hT1R3 foi então avaliada. Cinco desses aptâmeros mostram claramente uma maior afinidade por células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3.

Como segunda parte desta tese, estudamos outro receptor, denominado CD36, que, como o receptor T1R2/T1R3, é expresso na língua. Estudos indicam que ele age como receptor gustativo de gordura. Neste trabalho, verificamos que essa proteína é expressa em uma subpopulação de neurônios olfatórios presentes no epitélio olfatório, indicando que ela pode ter também uma função olfatória, ainda não caracterizada.

Palavras-chave: receptor para o gosto doce, hT1R2/hT1R3, aptâmeros, SELEX, CD36.

Abstract

(Almeida, T.J.) **Screening for Aptamers that Bind to the Human Sweet Taste Receptor (hT1R2/hT1R3)**. 2013. 128 p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

It has been shown that sweet taste is transduced by the Class III G Protein–Coupled Receptors (GPCRs) T1R2 and T1R3, which show long N-termini that form a globular extracellular ligand-binding domain. These receptors are expressed in the taste cells (epithelial cells that constitute the taste buds in taste papillae) that respond to sweet tastants, and when T1R2 and T1R3 are coexpressed in heterologous cells, they respond, as heteromers, to a series of sugars, some D-amino acids, artificial sweeteners and sweet proteins. It has also been demonstrated that the sweet taste receptor has multiple binding sites. In order to better understand the structure of this receptor and answer the question of how a single chemoreceptor can respond to a variety of ligands, we used the combinatorial oligonucleotide library screening approach, denominated Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), to isolate nuclease-resistant RNA aptamers that bind to the human sweet taste receptor with high affinity. Following a twelve round enrichment of the previous random RNA pool containing around 10^{13} different sequences (against membrane preparations of hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells) and negative counterselection cycles (to eliminate RNA molecules that bind nonspecifically to the nitrocellulose membrane and to proteins other than the target, that is, HEK293T cells membrane proteins), the RNA was reverse-transcribed for DNA sequencing. Aptamers from cycle 12 with consensus sequences were selected, and the binding of some of them to the human sweet taste receptor was then evaluated. Five out of the aptamers clearly show greater affinity for hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells than for hT1R2/hT1R3-non-expressing HEK293T cells.

In this thesis we have also analyzed another receptor, denominated CD36, which is also expressed in the tongue. Studies indicate that it acts as a receptor for fat. In this work, we found that CD36 is expressed in a subset of the olfactory neurons localized in the olfactory epithelium, indicating that it may also have an as yet uncharacterized olfactory function.

Keywords: Sweet taste receptor, hT1R2/hT1R3, aptamers, SELEX, CD36.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. GPCRs

Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) pertencem a uma superfamília de receptores e estão envolvidos em um grande número de funções biológicas em células de todo o corpo (Bockaert and Pin, 1999; Lefkowitz, 2000). Eles apresentam uma estrutura comum, com sete domínios transmembrana conectados por três laços intra e extracelulares alternantes, uma região amino-terminal extracelular e uma região carboxi-terminal intracelular. As regiões extracelulares e, em alguns casos, as regiões transmembrana (Temussi, 2009) interagem com os ligantes, enquanto as regiões intracelulares participam principalmente da sinalização (Rios *et al.*, 2001). Estas se acoplam a um entre possíveis tipos de proteína G, que por sua vez ativará seus efetadores específicos gerando uma resposta celular apropriada (Lefkowitz, 2000). Com base em similaridade de sequência, GPCRs podem ser classificados em três grandes famílias. A Família A é a maior e caracteriza-se pela presença de aproximadamente 20 resíduos muito conservados, localizados principalmente nas regiões transmembrana. A Família B caracteriza-se pela presença de um grande domínio amino-terminal extracelular que contém seis resíduos bem conservados de cisteína, além de 20 resíduos muito conservados nas regiões transmembrana. A Família C caracteriza-se pela presença de um domínio amino-terminal extracelular muito grande que contém em torno de 20 resíduos de cisteína muito conservados, além de 20 resíduos também conservados nas regiões transmembrana (Rios *et al.*, 2001).

Estima-se que o número de GPCRs para ligantes endógenos (como peptídeos, neurotransmissores, nucleotídeos ou lipídeos) seja por volta de 367 no homem e 392 no camundongo (Vassilatis *et al.*, 2003). Alguns têm a capacidade de interagir para formar

homo/heterodímeros/oligômeros, e há casos em que pontes dissulfeto intermoleculares participam da formação do complexo (Romano *et al.*, 1996; Cvejic and Devi, 1997; Bai *et al.*, 1998; Jordan and Devi, 1999; Robbins *et al.*, 1999). Desde 1982 já se sugere que agregados de mais de dois receptores – os mosaicos de receptores (RM), em que cada receptor representa uma única tessela no mosaico – poderiam existir na membrana plasmática mediante interação alostérica. Foi proposto que um RM funciona como uma unidade integrada com propriedades singulares de sinalização que seriam moduladas por interações entre os receptores (Vilardaga *et al.*, 2010). Aparentemente, as consequências funcionais desses agregados ou homo/heterodímeros/oligômeros vão de maturação e transporte de proteínas para a membrana plasmática, diferenças nas vias de sinalização e internalização até efeitos farmacológicos como alterações na afinidade dos ligantes e cooperatividade positiva e negativa de ligação (Maggio *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010). Ademais, a estrutura organizacional desses receptores pode ser fundamental para os mecanismos de ligação e ativação de proteínas G (Milligan, 2007; Vilardaga *et al.*, 2010). É interessante notar que agonistas que se ligam especificamente a um determinado heterômero foram descobertos, portanto a hetero-oligomerização pode levar a formação de receptores novos, funcionalmente distintos, aumentando sua diversidade (Waldhoer *et al.*, 2005; Park and Palczewski, 2005).

1.1.1. GPCRs envolvidos na sensação química

Todos os organismos são capazes de detectar um grande número de estímulos químicos presentes no meio ambiente com uma grande precisão. Além dos GPCRs endógenos, existem os GPCRs quimiossensoriais, que são ativados por sinais químicos externos, como odorantes, feromônios e moléculas associadas ao gosto. A primeira família de GPCRs desse tipo foi identificada em 1991 e corresponde à família de receptores olfatórios

(ORs), que são expressos nos neurônios do epitélio olfatório localizados na cavidade nasal (Buck e Axel, 1991). ORs são responsáveis pela detecção e discriminação de odorantes. Estima-se que existam aproximadamente 1000 ORs funcionais no camundongo (Godfrey *et al.*, 2004; Niimura and Nei, 2005; Young *et al.*, 2002) e por volta de 350 ORs funcionais no homem (Glusman *et al.*, 2001; Malnic *et al.*, 2004; Niimura and Nei, 2003; Zozulya *et al.*, 2001).

Em seguida, duas famílias de GPCRs (denominadas V1Rs e V2Rs) que são expressas nos neurônios do órgão vomeronasal (VNO) foram identificadas (Dulac and Axel, 1995; Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). V1Rs e V2Rs são responsáveis pela detecção de feromônios. Enquanto os camundongos apresentam 165 V1Rs e 61 V2Rs, o homem praticamente não possui esses tipos de receptor. Na realidade, no homem, o órgão de Jacobson – que corresponderia ao órgão vomeronasal dos camundongos – é vestigial e não parece ser funcional.

Mais recentemente pesquisadores identificaram duas famílias de GPCRs expressas nas células gustativas da língua, as famílias T1R e T2R (Gilbertson *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2001; Chandrashekar *et al.*, 2006). A família dos T2R – cujos receptores interagem com moléculas associadas ao gosto amargo – é maior que a dos T1R – cujos receptores interagem com moléculas associadas aos gostos doce e *umami* (Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002). *Umami* é provocado pelo monoglutamato de sódio ou aspartato e significa “gosto delicioso” em japonês.

Mais ou menos na mesma época da identificação das famílias T1R e T2R, uma pequena família de GPCRs constituída por 15 membros nos camundongos e seis membros no homem foi identificada (Liberles and Buck, 2006). Esses receptores, denominados TAARs (Receptores associados a traços de amina), não se relacionam com ORs, mas são expressos

em neurônios do epitélio olfatório. No caso dos camundongos, descobriu-se que os TAARs interagem com aminas voláteis presentes na urina que estão implicadas na comunicação social e, portanto, podem ter a função de detectar feromônios.

1.2. A percepção do gosto

A sensação de gosto é iniciada nas papilas gustativas, que estão distribuídas na cavidade oral, mais especificamente na língua e no palato. Três tipos de papilas gustativas estão envolvidos nesse processo: as circunvaladas, localizadas no meio da parte posterior da língua, as foliáceas, localizadas nas laterais posteriores da língua, e as fungiformes, localizadas em boa parte da região anterior da língua (Hoon *et al.*, 1999; Gilbertson *et al.*, 2000; Lindermann, 2001; Matsunami and Montmayeur, 2002). (Existe uma quarta papila, mas ela está associada à detecção da textura da comida apenas). Cada papila contém um ou mais “botões” gustativos, e cada botão, por sua vez, contém em torno de 100 células com receptores gustativos ou TRCs (Mombaerts, 2004). Essas células são classificadas como de Tipo I, II, III e basais. Algumas vezes, denominam-se as basais, que são não polarizadas e indiferenciadas, de Tipo IV (Chaudhari and Roper, 2010). As de Tipo I são abundantes nos botões gustativos. Elas têm um formato alongado e, supostamente, estão envolvidas na terminação da transmissão sináptica e na restrição à disseminação de transmissores, papel exercido pelas células da glia no sistema nervoso central. Possuem também microvilosidades apicais que se estendem até o poro gustativo, uma depressão no epitélio onde as moléculas ligadas ao gosto entram em contato com seus receptores. Evidências recentes sugerem que um subconjunto de células de Tipo I expressam o canal de sódio epitelial (ENaC), que pode estar envolvido na transdução do salgado. Portanto, essas células têm um papel ativo na percepção do gosto (Vandenbeuch *et al.*, 2008; Behrens *et al.*, 2011). As de Tipo II são encontradas na

parte apical dos botões gustativos e nem sempre se estendem até a parte basal. Possuem diversas microvilosidades que se estendem até os poros gustativos. Receptores nas células de Tipo II (também chamadas de células receptoras) detectam as moléculas, relacionadas a algum gosto, que compõem um determinado alimento ou líquido. Diversos estudos têm demonstrado que elas expressam, de uma maneira mutuamente excludente, os receptores gustativos envolvidos na percepção do gosto doce, amargo, *umami*, formando, portanto, três subconjuntos funcionais. Todos os três tipos de células receptoras expressam as mesmas proteínas intracelulares de sinalização, incluindo as subunidades de proteína G α -gustducina, β_1 ou β_3 e γ_{13} , fosfolipase C- β_2 (PLC- β_2), o receptor do tipo III de trifosfato de inositol (IP₃R3), bem como o canal M5 de potencial transiente (TRPM5), a panexina I e diversas conexinas; as duas últimas são proteínas que formam hemicanais (Chandrashekar *et al.*, 2006; Roper and Chaudhari, 2010; Behrens *et al.*, 2011). Curiosamente, essas células não formam sinapses estruturalmente identificáveis. Ao contrário, fibras nervosas, provavelmente aferentes gustativos, estão justapostas a essas células. A transmissão de sinais para os aferentes sensoriais ou outras células (talvez as de Tipo III) nos botões gustativos deve acontecer por mecanismos não convencionais, isto é, sem o envolvimento de vesículas sinápticas (Roper and Chaudhari, 2010; Behrens *et al.*, 2011). As células de Tipo III têm apenas uma microvilosidade longa e fina que se estende até o poro gustativo. Apenas elas formam sinapses convencionais, portanto apresentam especialização pré-sináptica e expressam proteínas sinápticas. Elas expressam uma série de genes de tipo neuronal como NCAM, uma molécula de adesão localizada na superfície da célula, enzimas para a síntese de pelo menos dois neurotransmissores e canais de cálcio normalmente associados à liberação de neurotransmissores. As células de Tipo IV ou basais não possuem elongações que cheguem ao poro gustativo. Elas expressam a proteína que sinaliza o desenvolvimento, *sonic hedgehog*,

o que indica que têm um papel de precursoras de outras células presentes nos botões gustativos (Miura *et al.*, 2003; Behrens *et al.*, 2011).

Sinais de gosto do palato e dos botões localizados nas fungiformes são transmitidos para neurônios no gânglio geniculado via nervo petroso superficial superior e corda do tímpano, respectivamente. Já as circunvaladas e as foliáceas formam conexões nervosas principalmente por meio do nervo glossofaríngeo, composto de fibras que partem do gânglio petroso (Yamolinsky *et al.*, 2009). A Figura 1.1 a seguir ilustra o botão gustativo com os tipos de célula e, de uma forma simplificada, a anatomia do gosto.

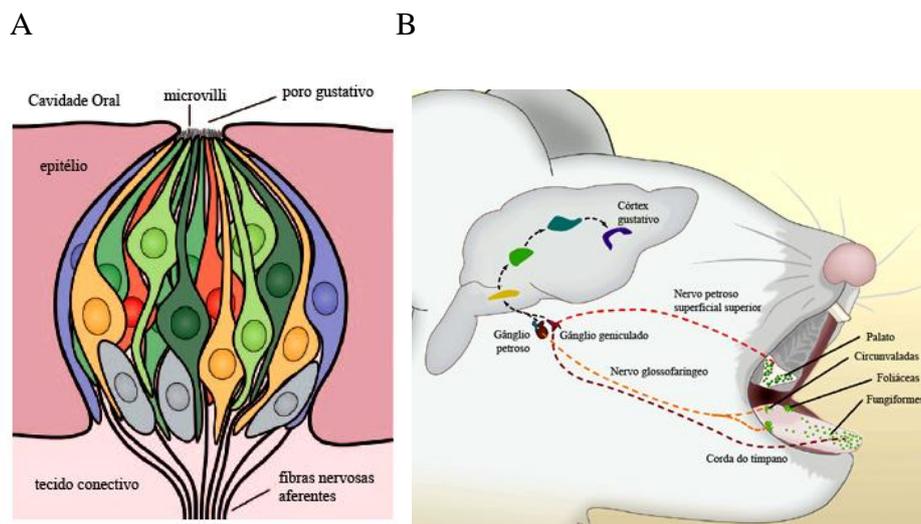


Figura 1.1. Botão gustativo e anatomia do gosto. (A) Laranja: células do tipo I; verde: células do Tipo II ou células receptoras (os diversos tons de verde correspondem às diversas subpopulações dedicadas aos estímulos doces, amargos e *umami*); vermelha: células do Tipo III ou pré-sinápticas; cinza: células do tipo IV ou basais; e azul: células perigemais. (B) Os botões gustativos na língua e no palato são enervados por três nervos aferentes: nervo glossofaríngeo, nervo petroso superficial superior e corda do tímpano (Adaptado de Yamolinsky *et al.*, 2009 e Behrens *et al.*, 2011).

1.2.1. Receptores para o gosto doce

Em homens e camundongos, a detecção de moléculas associadas ao gosto doce e *umami* é realizada por três receptores que pertencem à Família C de GPCRs: T1R1, T1R2 e T1R3.

Foi mediante sequenciamento em larga escala de uma biblioteca de cDNA obtida de tecido gustativo de ratos que se identificou o receptor T1R1. Tomando essa sequência como base, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* degenerados permitiu a identificação do receptor T1R2. O terceiro gene foi identificado depois, no banco de dados de DNA humano, e sua existência, confirmada por meio de mapeamento genético e ensaios de complementação (Li *et al.*, 2002). Diversos grupos de pesquisa procuraram simultaneamente por supostos genes receptores no *locus sac*, localizado na parte distal do cromossomo 4 do camundongo (Max *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Já se sabia que, em camundongos, o *sac* determinava a sensibilidade ao doce (Fuller, 1974). Diferentes linhagens possuíam diferentes sensibilidades à sacarina e outros compostos associados ao gosto doce, e o alelo dominante *sac* estava ligado a uma maior sensibilidade a esse gosto. Essa busca, feita por esses grupos de pesquisa, resultou na identificação do gene T1R3 no segmento cromossômico envolvendo o *sac* (Max *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Quando o perfil de expressão de T1R3 no tecido gustativo foi analisado, observou-se que o RNA mensageiro de T1R3 colocalizava com o de T1R1 ou de T1R2 nos mesmos subconjuntos de células, ao passo que uma pequena proporção dessas células expressava apenas T1R3 (Nelson *et al.*, 2001). Essa observação, bem como o fato de que outros GPCRs da Classe C formam dímeros (Romano *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 1998; Milligan *et al.*, 2003; Milligan, 2007), fez pesquisadores expressar combinações de T1Rs em linhagens de células

heterólogas. Os resultados desses estudos de expressão demonstraram que T1R2 e T1R3, quando co-expressos em células heterólogas, formam heterômeros, constituem os receptores para o gosto doce e são responsivos, servindo-se das longas regiões amino-terminais extracelulares, a uma série de açúcares (sacarose, frutose, maltose, glicose), alguns D-aminoácidos, adoçantes artificiais (aspartame, sacarina, ciclamato, acesulfame-K) e proteínas doces (monelina, taumatina, curculina) (Nelson *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). T1R1 e T1R3 respondem ao estímulo *umami*, particularmente à combinação de L-glutamato e GMP/IMP, compostos que acumulam em muitas comidas após hidrólise de proteínas e NTPs (Nelson *et al.*, 2002). Contudo, respostas fisiológicas robustas e preferência comportamental por alimentos com sabor *umami* persistem em camundongos *knockout* para T1R3, sugerindo que receptores gustativos adicionais podem contribuir para a detecção de *umami* (Damak *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm mostrado que os T1Rs ocorrem não só nos botões gustativos, mas também em uma variedade de tecidos, tais como pâncreas, cérebro e células epiteliais da via respiratória (Kinnamon, 2011; Henquin, 2012). Em todos os casos, esses receptores detectam compostos similares utilizando efetores de sinalização semelhantes, entretanto produzem efeitos muito diferentes.

Como ligantes tão diferentes podem ativar um mesmo receptor (T1R2/T1R3) para gerar a sensação de doce? A diversidade química dos compostos associados ao gosto doce, que diferem bastante em sua estrutura, desafia o entendimento de como é a natureza molecular do receptor. O estudo da relação estrutura/atividade poderia gerar modelos que permitiriam uma previsão do que podem ser os sítios ativos. Como até o momento nenhum modelo conseguiu explicar a “doçura” dessa variedade de compostos, muitos pesquisadores foram levados a crer na existência de diversos receptores que responderiam a diferentes classes de adoçantes (Temussi, 2006). No início de 2011, Yee e colaboradores apresentaram

evidências de que a percepção do gosto doce em camundongos, particularmente com relação aos açúcares, pode não ser mediada apenas por T1R2 e T1R3 (Yee *et al.*, 2011). Entretanto, o fato é que o dímero T1R2/T1R3, em células heterólogas, é ativado por todos os compostos comprovadamente associados ao gosto doce (açúcares e adoçantes não-calóricos). Além disso, camundongos *knockout* para T1R2 e T1R3 são totalmente incapazes de reconhecer substâncias doces (Zhao *et al.*, 2003), apesar de camundongos *knockout* apenas para T1R2 apresentarem uma capacidade residual de detectá-las em concentrações muito altas (Damak *et al.*, 2003). Possivelmente, T1R3 atua como receptor de baixa afinidade, embora a relevância biológica em camundongos normais seja incerta (Damak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Scott, 2005).

A estrutura desses receptores ainda não foi esclarecida com resolução atômica, porém, por meio de diversas abordagens (modelagem molecular, medidas biofísicas e bioquímicas, expressão em células heterólogas), chegou-se ao entendimento de diversos aspectos de sua estrutura, função e modo de interação com os ligantes (Xu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Winning *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2005). Como dito anteriormente, T1R2 e T1R3 são GPCRs de classe C, o que significa que ambos possuem um ectodomínio amino-terminal muito grande. Nele, encontra-se o domínio de ligação *venus-flytrap* (VFTM), provável sítio ortostérico de ligação de vários ativadores do receptor. Um domínio rico em cisteína conecta o amino-terminal ao heptahelicóide, que é comum a todo GPCR (Temussi *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2001). Os modelos do receptor para o gosto doce baseiam-se em sequências homólogas de outros receptores que foram cristalizados e que tiveram sua estrutura determinada com resolução atômica (Cui *et al.*, 2006). Alguns experimentos confirmaram a existência de diversos sítios de ligação nesse receptor. Apesar de todos eles não serem ainda conhecidos com precisão, já se sabe que a interação com ligantes não envolve participação apenas do grande domínio extracelular (de T1R2 e/ou T1R3), mas

também das regiões transmembrana (Xu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Temussi, 2009; Yamolinsky *et al.*, 2009) e do domínio rico em cisteína (Jiang *et al.*, 2004). A Figura 1.2 a seguir mostra uma representação esquemática do heterodímero de hT1R2 e hT1R3.

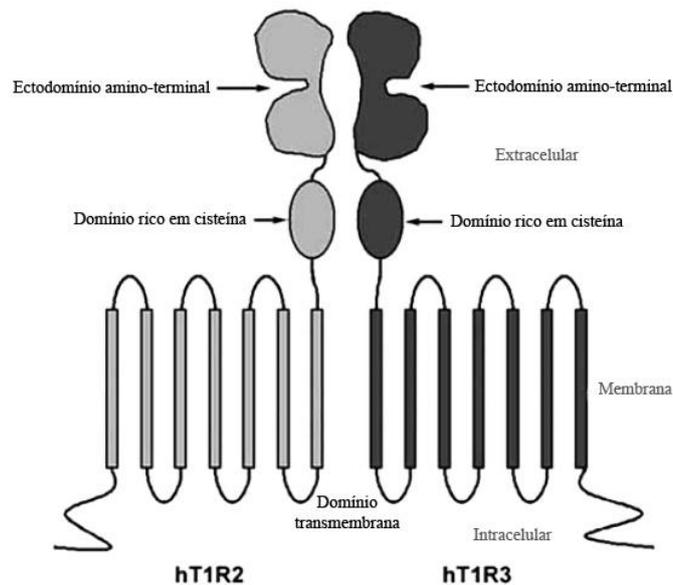


Figura 1.2. Representação esquemática do heterodímero de hT1R2 e hT1R3. (Adaptado de Cui *et al.*, 2006).

É interessante notar também que os receptores diferem entre as espécies (Liu *et al.*, 2012). A família *Felidae* (gatos, tigres, leões etc.), por exemplo, que é indiferente ao doce, não possui o gene T1R2 funcional, por causa de pseudogeneização (Li *et al.*, 2005). Homens e ratos apresentam diferenças na capacidade de detectar algumas substâncias doces. Ratos, por exemplo, não sentem o gosto de aspartame ou monelina. Essa diferença na capacidade de detecção se deve a diferenças entre as sequências de aminoácidos dos receptores T1R2 e T1R3 (Xu *et al.*, 2004; Winning *et al.*, 2005). Coletivamente, esses dados parecem levar à conclusão de que as propriedades bioquímicas da proteína receptora influenciam a capacidade de detectar uma substância. Em contraste, na espécie humana, parece não haver diferenças individuais de sensibilidade ao doce. Contudo, dois artigos publicados recentemente (Servant

et al., 2010; Zhang *et al.*, 2010) parecem apontar para a existência de moduladores alostéricos positivos desses receptores, que intensificam o gosto doce. Ademais, Fuchan *et al.* (2009) demonstraram que dois SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), localizados na região promotora de T1R3, afetam a sensibilidade à sacarose. Assim, níveis alterados de RNA mensageiro ou do polipeptídeo de T1R3 – não só propriedades bioquímicas modificadas do próprio receptor – parecem também explicar as diferenças observadas com relação à percepção do doce.

1.3. CD36, um receptor quimiossensorial?

Ainda não se sabe se existem outros tipos de receptores ou GPCRs quimiossensoriais. Por exemplo, haveria um receptor associado à percepção de gordura?

CD36 (agregado de diferenciação 36) é uma glicoproteína que foi identificada pela primeira vez em plaquetas humanas. As sequências codificantes dos homólogos de CD36 foram obtidas de cDNAs clonados de camundongo e boi (Zhang *et al.*, 2003). Trata-se de uma molécula que é expressa em uma variedade de células e tecidos. Atua fundamentalmente como um receptor *scavenger* de classe B, ligando-se a lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, fosfolipídios aniônicos e fosfolipídios em superfícies de células em apoptose (Zhang *et al.*, 2003). Uma expressão significativa do CD36 foi verificada nas papilas gustativas, mais especificamente nas papilas circunvaladas. Gaillard e colaboradores sugeriram então que CD36 seria um receptor gustativo para a detecção de ácidos graxos de cadeia longa (Gaillard *et al.*, 2008). Entretanto, há controvérsias sobre o papel dessa molécula na percepção de gordura. Recentemente, foi descoberto em camundongos outros sensores gustativos plausíveis, o GPR 120 e o GPR 40, revelando que o mecanismo associado à

detecção oral de gordura é mais complexo do que se as evidências iniciais apontavam (Cartoni *et al.*, 2010; Degrace-Passilly and Besnard, 2012).

Verificou-se, também recentemente, em drosófila que a proteína sensória da neuromembrana (SNMP), equivalente ao CD36 de mamíferos, é absolutamente necessária para a detecção de acetato de 11-cis-vacênila (um feromônio derivado de ácido graxo) por receptores olfatórios (Benton *et al.*, 2007). Portanto, o CD36 pode também ser importante para a detecção de lipídeos por receptores olfatórios de mamíferos (Martin *et al.*, 2011). Recentemente, a equipe do prof. Dr. Isaías Glezer (UNIFESP) verificou por hibridização *in situ* que há expressão de CD36 no epitélio olfatório de camundongos. Resta saber se o CD36 é de fato um receptor quimiossensorial.

1.4. Evolução sistemática de ligantes mediante enriquecimento exponencial ou SELEX

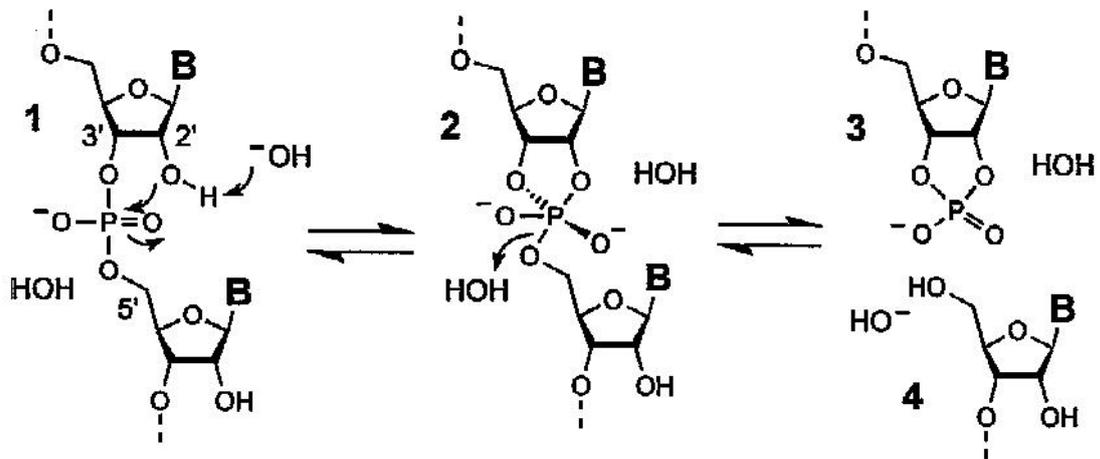
A evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (ou SELEX), como o próprio nome expressa, é um método de evolução direcionada ou engenharia evolucionária *in vitro*. Sua introdução data de 1990 (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). SELEX é um poderoso instrumento para a seleção de oligonucleotídeos com funcionalidades específicas, os chamados aptâmeros, isto é, oligômeros de ácido nucleico de fita simples (DNA ou RNA) com estruturas secundárias e terciárias complexas e especificidade de ligação bastante diversa. O termo deriva do latim *aptus*, que significa “ajuste”, e do grego *meros*, que significa partícula (Stoltenburg *et al.*, 2007). A evolução sistemática pode ser feita com aptâmeros de DNA ou RNA, cabe ao pesquisador escolher, pesando as vantagens e desvantagens de cada método (Ulrich, 2006).

O procedimento SELEX padrão com aptâmeros de RNA – adotado aqui – tem início na síntese química de uma biblioteca combinatória de até 10^{15} oligonucleotídeos diferentes de

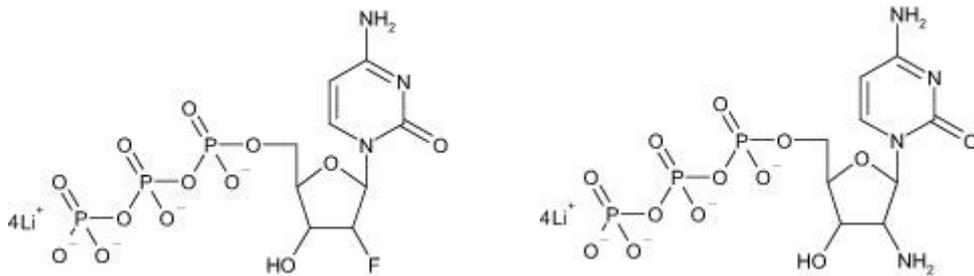
DNA de fita simples. Estes devem possuir uma região interna com 15-75 bases randômicas flanqueadas por sequências constantes, uma delas com um sítio promotor T7. *Primers* complementares aos sítios constantes são projetados para a síntese da dupla fita e amplificação por PCR do *pool* de DNA (P22, 5'-ACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGT-3', e P40, 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCAACTGCCATCTA-3'). A amplificação inicial da biblioteca de DNA dupla fita é feita por PCR sujeita a erro com o intuito de aumentar a diversidade da sequência randômica. Nessa reação, as concentrações de purinas e pirimidinas estão desbalanceadas, e os cloretos de magnésio e manganês são adicionados à reação, pois, em alta concentração, esses compostos causam a diminuição da fidelidade da enzima e aumentam os erros de cópia. O *pool* de RNA é gerado mediante transcrição *in vitro* da fita molde do DNA dupla fita com a enzima T7 RNA Polimerase (Ulrich, 2006).

Sabe-se que o RNA tem uma instabilidade química inerente. Em condições fisiológicas, a ligação fosfodiéster sofre uma clivagem espontânea por meio de reações intramoleculares de transesterificação. Ademais, muitas ribonucleases e ribozimas aceleram essa clivagem do RNA. O mecanismo dessa reação consiste no ataque nucleofílico do oxigênio na posição 2' ao centro fosfórico adjacente. No RNA, o oxigênio nucleofílico do grupo hidroxila na posição 2' fica próximo à ligação fosfodiéster, sendo então a causa da diminuição substancial da estabilidade do RNA em comparação com o DNA (Figura 1.3A; Soukup and Breaker, 1999). Para aumentar a estabilidade do RNA, nucleotídeos modificados, compatíveis com as etapas enzimáticas do procedimento de seleção *in vitro*, podem ser produzidos. A modificação mais proeminente é a derivatização da posição 2' da ribose. Os nucleotídeos 2'-flúor- e 2'-amino-2'-deoxi pirimidina trifosfatos, por exemplo, têm sido utilizados com frequência na seleção de aptâmeros de RNA resistentes a nucleases (Figura 1.3B; Soukup and Breaker, 1999; Mayer, 2009).

A



B



2'-Fluór-2'-deoxicitidina-5'-Trifosfato

2'-amino-2'-deoxicitidina-5'-Trifosfato

Figura 1.3. (A) Mecanismo de clivagem de RNA por transesterificação intramolecular. A ligação fosfodiéster de RNA sofre ataque nucleofílico do oxigênio na posição 2' (1), o que resulta na formação de um complexo intermediário pentacoordenado (2) e na saída do oxianion na posição 5'. Essa reação produz fragmentos de RNA com 2', 3'-fosfato cíclico e hidroxila no terminal 5' (3 e 4) (Adaptado de Soukup and Breaker, 1999). **(B) Exemplos de pirimidina modificada.** Dois exemplos da base nitrogenada pirimidínica citosina com flúor (F) e com grupo amina (NH_2) na posição 2'.

A seleção dos aptâmeros se dá por repetidos ciclos, que em linhas gerais são realizados da seguinte maneira: 1) incubação da biblioteca com o alvo (receptores de

membrana, pequenas moléculas orgânicas, fatores de crescimento, hormônios, anticorpos etc; Ulrich *et al.*, 1998, 2004; Homann and Göringer, 1999; Ellington and Szostak, 1990; Binkley *et al.*, 1995; Nieuwlandt *et al.*, 1995; Hamm, 1996; Lee and Sullenger, 1997; Huang *et al.*, 2007; Esposito *et al.*, 2011; para uma tabela com diversos exemplos de alvos e revisões sobre o tema, ver Stoltenburg *et al.*, 2007; Mairal *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2011) em um tampão de seleção específico; 2) recuperação das moléculas que se ligam ao alvo; 3) realização de uma transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), no caso de SELEX com aptâmeros de RNA, ou apenas PCR, no caso de SELEX com aptâmeros de DNA; e 4) incubação do resultado de PCR ou RT-PCR somado a nova transcrição *in vitro* com o alvo, iniciando um novo ciclo. Ensaios de ligação (*binding*) com aptâmeros marcados com P³² possibilitam o acompanhamento da eficiência da seleção. No final do processo, cujo número de ciclos não se sabe de antemão, o *pool* de aptâmeros selecionados é clonado e sequenciado. Aptâmeros representativos são escolhidos com base em similaridades de sequência, e as estruturas de RNA com motivos consenso são previstas por meio de considerações termodinâmicas (Zuker, 2003). Faz-se então uma caracterização mais detalhada dessas moléculas por meio de ensaios de ligação (*binding*) e ensaios funcionais, como o de medida da concentração de cálcio intracelular. Experimentos de mutação e truncamento são realizados com o objetivo de se chegar a uma região mínima da sequência do aptâmero que seja responsável pela ligação com o alvo. Pode-se então submeter parte do *pool* selecionado a modificações pós-SELEX (por exemplo, incorporação de aldeídos para aumentar a diversidade química das bibliotecas de RNA) (Ulrich *et al.*, 2005; Ulrich, 2005; Bugaut *et al.*, 2006; Stoltenburg *et al.*, 2007). A Figura 1.4 resume todo o processo.

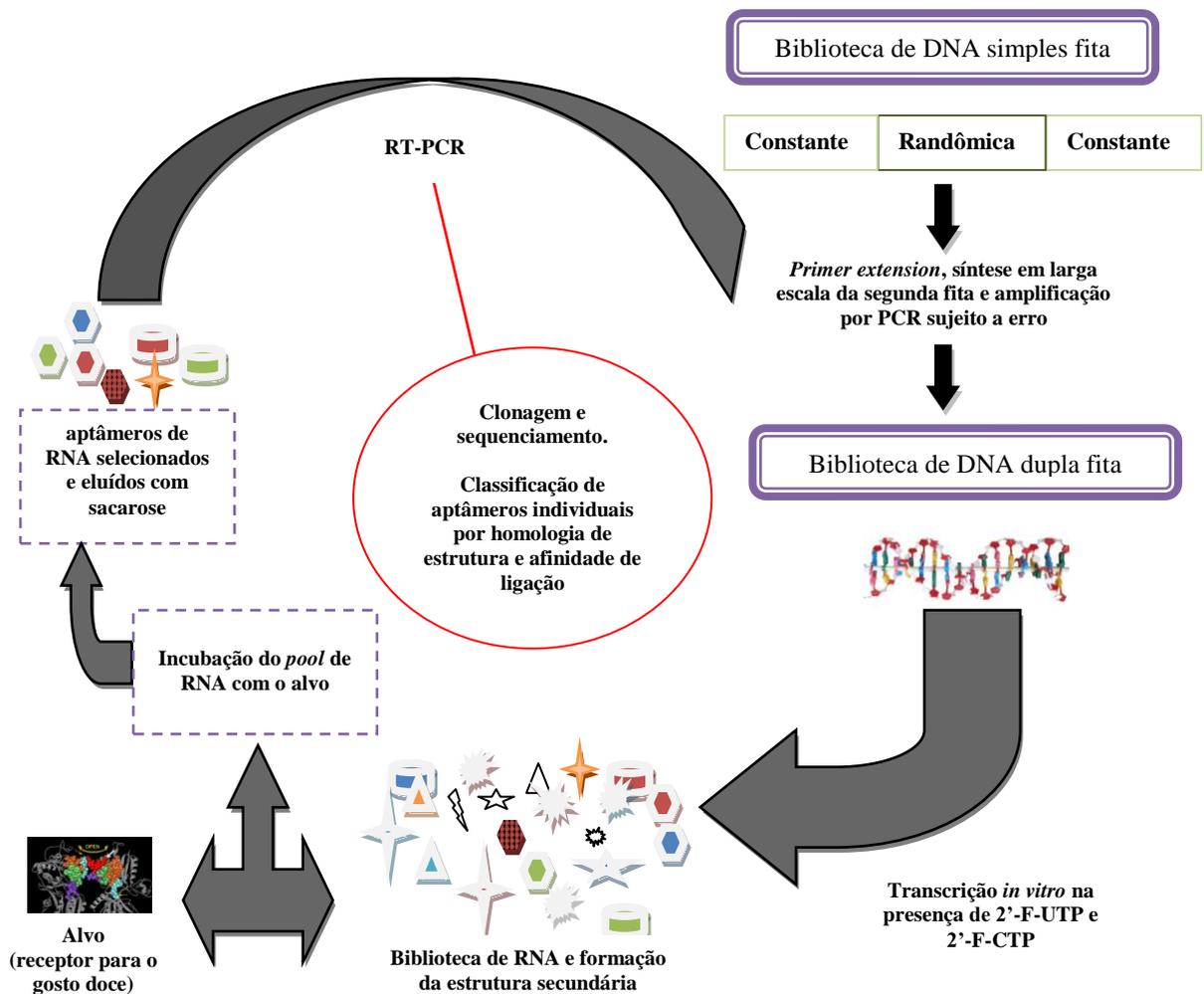


Figura 1.4. Seleção *in vitro* de aptâmeros usando a tecnologia SELEX (um ciclo é exibido). No início de cada processo SELEX, após síntese de segunda fita e amplificação, uma biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos consistindo em uma variedade de fragmentos de DNA dupla fita com sequências diferentes é usada como molde para transcrição *in vitro*. O procedimento SELEX é caracterizado pela repetição de passos sucessivos em que há seleção (ligação, partição e eluição), amplificação e condicionamento. Em geral, de 6 a 20 ciclos de SELEX são necessários para a seleção de aptâmeros específicos e altamente afins com o alvo. O último ciclo de SELEX é concluído após o passo de amplificação. O pool enriquecido de aptâmeros é clonado, e diversos aptâmeros individuais devem ser caracterizados (legenda adaptada de Stoltenburg *et al.*, 2007).

A especificidade dos aptâmeros com relação ao alvo, assumindo que este seja uma proteína, depende da sequência de bases desses aptâmeros. Interações específicas baseiam-se em pontes de hidrogênio e interações de Van-der Waals, enquanto as não específicas podem ocorrer em virtude das interações eletrostáticas. Assim, como a biblioteca inicial de aptâmeros consiste em sequências fortuitas, a maioria delas irá interagir de modo não específico com o alvo. Por isso, múltiplos ciclos de seleção são necessários para eliminar “ruídos”, ou seja, ligações não específicas (Djordjevic, 2007). Outros procedimentos podem ser feitos para aumentar a especificidade, como adotar uma razão aptâmero/alvo crescente com o número de ciclos, modificar as condições de lavagem e ligação (composição do tampão, volume, tempo) ou realizar uma contrasseleção para eliminar aptâmeros que se liguem ao aparato usado na seleção e a moléculas diferentes do alvo.

O procedimento descrito acima e apresentado de forma resumida na Figura 1.4 é o denominado SELEX clássico (Djordjevic, 2007). Recentemente a técnica foi desdobrada, e métodos novos e sofisticados para a seleção de aptâmeros foram desenvolvidos (Mairal *et al.*, 2008; Mayer, 2009; Ulrich and Wrenger, 2009). O número crescente de estudos envolvendo o uso de aptâmeros é indicativo da sua aceitação como ferramenta para pesquisa básica e aplicações médicas. É interessante notar que o número de publicações e citações envolvendo o tema cresceu continuamente a partir de 2002, apesar de ter havido uma queda em 2013 (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=aptamers>). Os aptâmeros e o processo de sua seleção apresentam diversas vantagens. Os selecionados possuem alta afinidade (K_d na faixa de nanomolar e picomolar) e são bastante específicos, chegam a se equiparar aos anticorpos monoclonais; podem readquirir sua conformação original após aquecimento desnaturante; aparentemente não são imunogênicos (Bouchard *et al.*, 2010); e são relativamente pequenos – podendo portanto acessar regiões “escondidas” de uma proteína ou epitopos aparentemente inacessíveis – e fáceis de sintetizar (Stoltenburg *et al.*, 2007). Além disso, SELEX é aplicável

a diversos tipos de alvo e é um processo feito *in vitro* (não requer uso de animais). A principal desvantagem do método de seleção é que não se pode prever o sucesso da seleção. Como os parâmetros inerentes aos aptâmeros, como afinidade e especificidade, podem ser afetados durante o procedimento, não é possível avaliar se o alvo é adequado para a seleção ou dizer de antemão que aptâmeros serão, com efeito, selecionados (Mayer, 2009). Posto isso, conclui-se que não se pode desenvolver um protocolo padrão de SELEX. As condições de seleção devem ser sempre adaptadas às circunstâncias (tipo de alvo, tipo de aptâmero desejado, aplicação etc.; Stoltenburg *et al.*, 2007; Mayer, 2009). Há ainda a dificuldade de se reduzir as ligações inespecíficas e o fato de que a síntese enzimática não resulta em altas concentrações de aptâmeros, tornando o processo de purificação um dos complicadores.

Entretanto, trata-se de uma tecnologia que vem encontrando cada vez mais aplicações em diversas áreas. Um dos grandes desafios atuais é padronizar algo que não parece ser passível de padronizações, ou seja, desenvolver “kits de SELEX” que possibilitariam a pesquisadores ou técnicos a realização de seleções *in vitro* (Mayer, 2009).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- ✓ Utilizar a técnica SELEX para selecionar aptâmeros de RNA que se liguem especificamente ao receptor humano para o gosto doce (hT1R2/hT1R3).
- ✓ Identificar onde a proteína CD36 está localizada no epitélio olfatório de camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar as células HEK293T que expressam o receptor humano para o gosto doce (hT1R2/hT1R3).
- ✓ Realizar ciclos de seleção *in vitro* para obtenção dos aptâmeros e caracterizar os selecionados.
- ✓ Utilizar aptâmeros marcados com ATP [α - 32 P] em ensaios de *binding* para verificar a eficácia da técnica.
- ✓ Verificar se os aptâmeros selecionados apresentam atividade em células HEK293T que expressam o receptor humano para o gosto doce (hT1R2/hT1R3).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção de células HEK293T

Células HEK293T (linhagem imortalizada de células de rim de embrião humano, ATCC®) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² contendo meio DMEM (Vitrocell®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Vitrocell®), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em um incubador umidificado a 37 °C e CO₂ 5%. A manutenção seguiu o seguinte protocolo: aproximadamente 48 horas após a semeadura, o meio era retirado; as células eram então lavadas com 2 mL de tampão fosfato salino 1X, PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7,4), e retiradas da garrafa com 500 µL de tripsina (Tripsina/EDTA 1:250 (p/v)). Em seguida, adicionávamos 7 mL de meio DMEM, e a suspensão era centrifugada por 10 min a 200 g. O meio era retirado, e as células, ressuspensas em 4 mL de DMEM com 10% de FBS. Essas células eram então divididas em 4 novas garrafas (1 mL/garrafa) de 25 cm², cada uma contendo 5 mL de meio DMEM com 10% de FBS (para se ter uma confluência de 25%).

3.2. cDNAs e vetores de expressão

O vetor de expressão pcDNA3.1(-) contendo o cDNA correspondente ao gene Gα15 foi previamente construído em nosso laboratório (Von Dannecker, 2005).

Os vetores de expressão pcDNA5 FRT contendo as regiões codificadoras de hT1R2 e hT1R3 etiquetadas com epítopos FLAG nas extremidades C terminais foram cedidos pelo Prof. Wolfgang Meyerhof (*German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Alemanha*).

3.3. Transfecção

Em torno de 4×10^6 células HEK293T foram plaqueadas em garrafas P75 e mantidas nas condições de cultura detalhadas no item anterior por tempo o suficiente para que chegassem a uma confluência de 75%. Em seguida, o meio foi retirado, e as garrafas, lavadas cuidadosamente com PBS 1X. As células foram então transfectadas com 36 μg de DNA plasmidial total (em algumas garrafas, utilizamos os vetores de expressão contendo os genes hTAS1R2, hTAS1R3 e Ga15; em outras, utilizamos apenas o vetor de expressão contendo o gene de Ga15) e 60 μL de *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen) por garrafa. Para isso, o DNA plasmidial foi diluído em DMEM sem antibióticos; em seguida, adicionou-se a essa solução lipofectamina diluída em DMEM sem antibióticos na concentração de 5% (v/v). A solução de DNA plasmidial e lipofectamina foi incubada por 20 min à temperatura ambiente e adicionada lentamente a cada garrafa. As garrafas foram mantidas por 3 h a 37 °C e CO₂ 5%. Após esse período, completou-se a mistura com DMEM contendo 10% de FBS, e nova incubação se seguiu (24 h). Com o objetivo de verificar a eficácia da transfecção, as células de uma garrafa/experimento foram transfectadas com o vetor pRR24, portador do gene GFP.

3.4. Imunofluorescência para detecção dos receptores hT1R2/hT1R3

Células HEK293T foram plaqueadas em uma lâmina de vidro com 8 poços (Lab-Tek[®], Naperville, IL) – previamente tratada com 0,01 % de L-poli-lisina (SIGMA) – e mantidas por 16-20 h em condições de cultura padrão (sem antibióticos). Elas foram então transfectadas com 300 ng de DNA total por poço, utilizando o protocolo descrito no item anterior (com os devidos ajustes). Após 48h, foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min a 4 °C. As células foram permeadas com Triton X-100 0,01 % por 5 min e lavadas com PBS 1X. Depois

de incubação com solução de bloqueio (5 % de soro de cavalo e 2 % de albumina de soro bovino em PBS 1X), foram incubadas por 2 h a 4 °C com o anticorpo primário anti-FLAG M2 (Sigma) diluído em PBS 1X contendo 2,5 % de soro de cavalo e 1 % de albumina de soro bovino (1:2000). Após três lavagens de 5 min com 500 µL de PBS 1X, as células foram incubadas por 1 h a 4 °C com o anticorpo secundário *anti-mouse IgG Alexa- Fluor 546* diluído em PBS 1X contendo 2,5 % de soro de cavalo e 1 % de albumina de soro bovino (1:2000). Em seguida, depois de mais três lavagens de 5 min, foram incubadas com 0,1 mg/mL de Hoechst por 5 min à temperatura ambiente. A lâmina foi então lavada com 500 µL de água destilada e montada com glicerol 90%.

Para colocalização dos receptores hT1R2/hT1R3 e do receptor purinérgico P2Y1 (uma proteína de membrana endógena), os anticorpos primários foram anti-FLAG M2 (Sigma), diluído 1:2000, e *Goat polyclonal Anti-P2Y1* (Santa Cruz), diluído 1:500, e os secundários, *anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546* e *anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488*, ambos diluídos 1:300.

O material foi analisado ao microscópio invertido Nikon TE300.

3.5. Preparação de membrana de células HEK293T

Aproximadamente 24 h após transfecção (ver item 3.3.), o meio DMEM foi substituído por DMEM com baixo conteúdo de glicose (Vitrocell[®]) contendo 10% de FBS dializado (com conteúdo de glicose inferior a 5 mg/dL, Vitrocell[®]). Em seguida (48 h após a transfecção), as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1X contendo 1 mM PMSF, e o sobrenadante, descartado (essa operação foi repetida duas vezes). As células foram suspensas em 5 mL de PBS 1X contendo 2 mM EDTA e 1 mM PMSF, e a suspensão, transferida para tubos cônicos de 15 mL e centrifugada a 200 g por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e as células, suspensas em 5 ml de PBS 1X contendo 1mM

PMSF e submetidas a nova centrifugação. Repetiu-se esse processo outra vez para assegurar a completa eliminação de proteínas do meio de cultura. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM TCLK; 2,8 µg/mL de aprotinina; e coquetel de inibidores de proteases, Sigma-Aldrich®). A partir dessa etapa, todo o procedimento foi realizado no gelo. A suspensão foi submetida, por um minuto, a pulsos sônicos de 30% de intensidade. Repetiu-se essa operação outras duas vezes (com um minuto de intervalo entre cada pulso), e a destruição celular foi verificada mediante o exame de uma alíquota de 10 µL do lisado ao microscópio. O lisado foi centrifugado a 600 x g (4 °C) por 10 min, e o sobrenadante, recuperado em um tubo limpo. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise, sonicado e centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante foi armazenado no mesmo tubo que o sobrenadante proveniente da primeira centrifugação. Descartou-se o *pellet*. Adicionou-se NaCl e MgSO₄, em concentrações finais de 100 mM e 50 µg/mL, respectivamente, ao sobrenadante. A suspensão foi então centrifugada a 100000 x g por 1 h a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet*, ressuspenso em 2 mL de tampão B (20 mM HEPES e 1 mM EDTA pH 7,4). Nova centrifugação, nas mesmas condições, se seguiu. O *pellet* foi coletado com 400 µL de tampão B a 4°C, e alíquotas de 50µl foram congeladas a -80°C. O conteúdo proteico foi determinado mediante reagente de Bradford (Bio-Rad).

3.6. Western Blot

As preparações de membranas (aproximadamente 10 µg) foram misturadas com tampão de amostra (50 mM de TrisHCL pH 6,8; 100 mM de DTT, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 10 %) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (8 % de poliacrilamida no gel de resolução e 4 % de poliacrilamida no gel de empilhamento). As

proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) e coradas com 0,1 % de Ponceau. A membrana foi lavada 3-4 vezes com água MilliQ e, em seguida, bloqueada *overnight* a 4 °C com 5 % de leite desnatado em TBS-T. Seguiu-se então incubação por 2 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-FLAG M2 (Sigma), diluído 1:10000 em solução de bloqueio. Após lavagem da membrana por 5 min com TBS-T (quatro vezes), ela foi incubada por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase *AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L)* (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), diluído 1:4000 em TBS-T. Depois de lavá-la novamente com TBS-T (quatro vezes), o sistema *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences) foi utilizado para detecção da proteína. O anticorpo anti- α -tubulina *rabbit* monoclonal (Abcam) foi utilizado como controle interno.

3.7. Medidas da variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, por imageamento de cálcio

Para monitoramento da variação de $[Ca^{2+}]_i$ livre, células HEK293T foram transfectadas com os vetores de expressão contendo os genes hTAS1R2, hTAS1R3 e G α 15 conforme descrito (com os devidos ajustes para placas de 12 poços, 3,66 cm² de área de crescimento; TPP®). Antes de iniciar as medidas, as células foram incubadas a 37 °C por 1 h com 5 μ M de Fluo-3 AM, DMSO 0,5 % e surfactante plurônico F-127 0,1 % em meio DMEM-*Low glucose*. Após esse período, elas foram lavadas e mantidas em meio extracelular (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂ e 10 mM de HEPES, com pH ajustado para 7,4) por 10 min para garantir a completa desesterificação do fluoróforo. A captação das imagens de variação de $[Ca^{2+}]_i$ (ou seja, o imageamento de $[Ca^{2+}]_i$) foi realizada com um microscópio invertido ECLIPSE-TiS (Nikon, Melville, NY) equipado com uma

câmera de 14 bit, alta resolução, CCD CoolSNAP HQ2 (Photometrics, Tucson, AZ). O software NIS-Element (Nikon) foi utilizado para as análises das imagens, que foram adquiridas a cada segundo. O Fluo-3AM foi excitado por uma lâmpada de Xenon a 488 nm e a emissão de fluorescência foi detectada usando-se um filtro *band pass* (515-530 nm). No final de cada experimento, adicionou-se às células 5 μM de ionóforo de Ca^{2+} (4-Br-A23187) para a determinação da fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$), seguido de 10 mM de EGTA para a determinação da fluorescência mínima ($F_{\text{mín}}$). Os dados do imageamento foram obtidos a 20-25 °C.

3.8. Expressão de hT1R2 e hT1R3 em células HEK 293T

3.8. 1. Extração de RNA total de células HEK 293T

A extração de RNA total de células HEK293T foi feita segundo protocolo de TRIZOL[®] *Reagent* (Invitrogen) com algumas modificações: para eliminar contaminação por DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I (New England Biolabs[®] inc.). Adicionou-se 1 U de enzima para cada 5 μg de RNA, e a reação foi incubada por 10 min a 37 °C. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% (corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A reação foi desativada mediante aquecimento a 75 °C por 10 min. Após nova extração e precipitação (conforme protocolo de TRIZOL[®]), avaliamos a qualidade do RNA usando *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.8.2. Transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR)

Foi utilizado 1 µg de RNA total de células HEK293T como molde para a síntese de cDNA. Inicialmente, essa quantidade de RNA foi aquecida com 20 mM de Oligo (dT)₂₀ (Invitrogen™) a 70 °C por 2 min e depois colocada no gelo. A essa mistura foram adicionados, para um volume final de 20 µL, dNTPs (concentração final de 0,5 mM), 20 U *RNAseOUT*TM (inibidor de ribonuclease; Invitrogen™), *first-strand buffer* (tampão fornecido com a enzima transcriptase reversa; concentração final de 1X) e 200 U de *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™). Após a reação transcorrer por 1 h a 42 °C, a enzima foi aquecida a 95 °C por 5 min, e o produto, diluído cem vezes.

Para o PCR (volume final de 25 µL), a mistura reacional consistiu em 2,5 µL do produto diluído da transcrição reversa, 1X de tampão de *Taq* polimerase, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,6 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™). Utilizamos 40 ciclos nessa reação e temperatura de anelamento de 60 °C. As sequências dos primers foram (Jang *et al.*, 2007): hT1r2 *forward* 5'-TGTGTTCCAAGAGGTGCCAGTCAG-3'; hT1r2 *reverse* 5'-CATGTATGCCACCAGCAGCAGTG-3'; hT1r3 *forward* 5'-TGACAACCAGAAGCCCCGTGTCC-3'; hT1r3 *reverse* 5'-GGTGAACGAACAGCCCCAAAGC-3'; hGAPDH *forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCG GAGTC-3'; e hGAPDH *reverse* 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'. Os produtos amplificados têm, respectivamente, 368 pb, 308 pb e 226 pb.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, e as bandas correspondentes, purificadas e clonadas em pCRII (Invitrogen™). Os transcritos de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como controle interno do PCR, ou seja, como normalizadores das variações de concentração de cDNA.

3.9. PCR: purificação e clonagem

3.9.1. Purificação de produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR, submetidos à eletroforese em gel de agarose, foi feita com *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences), segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

3.9.2. Clonagem de produtos de PCR

A clonagem dos fragmentos de DNA amplificados por PCR e purificados foi feita com *TA Cloning® Kit with pCR™II Vector* (Invitrogen™), segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

3.10. Bactérias competentes e minipreparação plasmidial

3.10.1. Preparação de bactérias competentes

Uma pequena alíquota foi retirada de um estoque de bactérias *Escherichia coli* DH5 α (a -80 °C), plaqueada em LB ágar (triptona 1 %, extrato de levedura 1 %, cloreto de sódio 0,5 % e ágar bacteriológico 1,5 % com pH ajustado para 7,5) e mantida a 37 °C por 16 h. Uma colônia foi selecionada, inoculada em 3 mL de meio LB e incubada sob agitação nessas condições. Após esse período, adicionou-se uma alíquota de 1 mL dessa cultura a 100 mL de meio LB, e essa mistura foi mantida a 37 °C, sob agitação, até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,8. Em seguida, as bactérias foram coletadas por centrifugação (1000 x g

por 10 min a 4 °C). O sedimento celular foi suspenso em 40 mL de CaCl₂ 0,1 M e mantido em gelo por 1 h. Após nova centrifugação, as células foram suspensas em 1 mL de CaCl₂ 1 M. Alíquotas foram tiradas e estocadas a -80 °C em glicerol (concentração final de 25 % v/v).

3.10.2. Transformação de bactérias competentes

Aproximadamente 5 µL da reação de ligação (entre 5 e 10 µg) foram adicionados a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 100 µL de bactérias DH5α competentes. Essa mistura foi mantida por 30 min no gelo. Em seguida, foi submetida a um choque térmico de 42 °C por 1 min e 30 s e transferida novamente para o gelo. Após 3 min, adicionou-se 1 mL de LB, e o material foi incubado, sob agitação, a 37 °C por 1h. Seguiu-se centrifugação a 13000 x g por 10 s e descarte do sobrenadante. As bactérias foram suspensas em aproximadamente 100 µL de LB e aplicadas em placas LB ágar contendo 80 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase) e 1 µg/mL de ampicilina. As placas LB ágar foram incubadas *overnight* a 37 °C. Colônias brancas, contendo o inserto de DNA desejado, foram selecionadas, inoculadas em 3 mL de LB com ampicilina (1 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37 °C.

3.10.3. Minipreparação de DNA plasmidial

A purificação dos plasmídeos das bactérias selecionadas foi feita com o *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA plasmidial foi quantificado – e sua pureza, verificada (relação 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm) – em um *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.11. Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). A mistura reacional consistiu em 100-200 ng de DNA plasmidial purificado, 1 pmol de *Primer* M13 (5'-GGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), 2 μ L de *Big Dye*, 3 μ L de Tampão *Big Dye* para sequenciamento 5X e água MilliQ para um volume final de 15 μ L. O programa de ciclagem utilizado foi: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 45 s, 50 °C por 45 s, 60 °C por 4 min e 72 °C por 10 min. Para a precipitação, preparou-se uma mistura com 23 μ L de etanol absoluto, 1 μ L de glicogênio (1mg/mL) e 1 μ L de acetato de sódio 3M pH 7,4. Essa mistura foi colocada em cada tubo e homogeneizada. Os tubos foram mantidos no gelo por 15 min, cobertos com papel alumínio, e, em seguida, submetidos à centrifugação por 40 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Dois pulsos de 1000 rpm com tubos invertidos sobre papel toalha foram aplicados. Adicionaram-se 50 μ L de etanol 70% gelado a cada tubo. Nova centrifugação do material se seguiu, desta vez a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado. Aplicaram-se novamente dois pulsos. Permitiu-se então que o líquido restante evaporasse à temperatura ambiente por 1h, mantendo todos os tubos cobertos com papel alumínio. As amostras foram enviadas para o Serviço de Sequenciamento de DNA – SSDNA, do Departamento de Bioquímica – IQUSP, e sequenciadas no equipamento ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

3.12. SELEX

Nos procedimentos a seguir, utilizamos os mesmos protocolos indicados em Ulrich *et al.* (2005), com algumas modificações.

3.12.1. Biblioteca combinatória de DNA

A biblioteca de DNA simples fita, constituído de duas regiões constantes – que contêm sequência promotora T7 para transcrição *in vitro* e sítios de enzimas de restrição – flanqueando uma sequência randômica de 40 bases, foi sintetizada pela *Operon Biotechnologies Inc.* (escala de 1 µmol; Figura 3.1).

5'-ACCGAGTCCAGAAAGCTTGTAGTACT-(N40)-GCCTAGATGGCAGTTGAATTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

Figura 3.1. Biblioteca de DNA simples fita. A sequência promotora T7 é mostrada em negrito vermelho. Sublinhadas estão as sequências que correspondem aos sítios de enzimas de restrição: AAGCTT (HindIII), AGTACT (ScaI) e GAATTC (EcoRI). N40 corresponde à sequência randômica de 40 nucleotídeos, em que os quatro desoxirribonucleotídeos (desoxiadenosina trifosfato [A], desoxicidina trifosfato [C], desoxitimidina trifosfato [T] e desoxiguanosina trifosfato [G]) foram incorporados com igual probabilidade.

3.12.2. Purificação da Biblioteca

A biblioteca de DNA simples fita foi purificada em gel de poliacrilamida desnaturante: em torno de 400 µg desse material, previamente aquecido a 65 °C por 10 min na presença de tampão de corrida (20 % de glicerol, 1 mg/mL de bromofenol *blue*, 1 mg/mL de xileno cianol), foram aplicados em um gel de poliacrilamida 8 % desnaturante. Para a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, ver Ellington and Pollard (1998). Após

eletroforese (130 V/cm^2 por aproximadamente 2 h), o DNA foi visualizado por incubação em brometo de etídeo, e a banda de interesse, cortada do gel com um bisturi e reduzida a pedaços menores. Esses fragmentos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e pesados. Em seguida, adicionou-se duas vezes o peso em volume de TBE (98 mM de base tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). O material foi incubado à temperatura ambiente *overnight* em uma placa rotatória. Após esse tempo, o tampão contendo o DNA eluído foi transferido para outro tubo e nova incubação dos pedaços de gel de policacrilamida com o mesmo volume de TBE se seguiu. Esses volumes foram reunidos, e os fragmentos de gel, submetidos à luz UV para que se pudesse verificar a completa eluição do DNA. Este foi purificado por extração em álcool iso-amilico/fenol/clorofórmio e precipitação com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 %. A quantificação e a verificação da pureza (relação 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm) foram feitas em um *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.12.3. Amplificação da biblioteca por reação em cadeia da polimerase sujeita a erro

Na reação em cadeia da polimerase sujeita a erro (*error-prone PCR*), as concentrações de purinas e pirimidinas são diversas, e altas concentrações de cloretos de magnésio e manganês são incluídas na reação para diminuir a fidelidade da enzima e aumentar os erros na cópia da fita (Ulrich *et al.*, 2005). O objetivo dessa etapa é aumentar a diversidade da sequência randômica da biblioteca de aptâmeros. A reação foi feita exatamente como indicado em Ulrich *et al.* (2005): 360 pmol da biblioteca simples fita, 330 μM de dGTP, 330 μM de dATP, 830 μM de dTTP, 830 μM de dCTP, 1X de tampão *Taq* DNA polimerase, 0,5 mM de MnCl_2 , 7 mM de MgCl_2 , 4500 pmol do *primer* P40 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCAACTGCCATCTA-3') e 145 U de *Taq* DNA

polimerase para um volume final de 3,2 mL. Essa mistura reacional foi dividida em 32 tubos e submetida ao seguinte programa: 1 ciclo de 94 °C por 2 min, 55 °C por 5 min e 72 °C por 30 min. Em seguida, 150 pmol de *primer* P22 (5'-ACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGT-3') foram adicionados a mistura reacional em cada tubo. Após alguns testes, a temperatura de anelamento e o número de ciclagens considerados ideais foram 9 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min.

Uma alíquota dessa reação foi retirada e aplicada em gel de poliacrilamida não desnaturante 8 %. Após constatar banda na altura de 100 pb, o produto da reação (oligonucleotídeos, ou aptâmeros, de DNA dupla fita) foi purificado por extração com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio e precipitação com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 %. A quantificação e a verificação da pureza (relação 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm) foram feitas em um *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.12.4. Transcrição *in vitro* e purificação da biblioteca de RNA

O protocolo para a preparação da biblioteca de RNA modificado (ou biblioteca de aptâmeros de RNA), resistente à nuclease, foi conforme indicado em Ulrich *et al.* (2005), com algumas modificações. A biblioteca de DNA dupla fita foi transcrita na presença de pirimidinas modificadas (2'-Fluoro-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato e 2'-Fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato; TriLink Biotechnologies). A mistura reacional consistiu em 1-3 nmol de DNA dupla fita (dependendo do ciclo de SELEX; nos ciclos iniciais utilizou-se uma maior quantidade da biblioteca), 0,5 mM de ATP, 0,5 mM de GTP, 1,5 mM de 2'-F-dUTP, 1,5 mM de 2'-F-dCTP, 1X de Tampão T7 RNA polimerase e 200 U de T7 RNA polimerase em um volume final de 200 µL. A incubação foi de 16h a 37 °C.

A qualidade da transcrição foi verificada mediante corrida de uma alíquota de 10 μL da reação (previamente tratada com 1U de DNase I [Ambion] por 15 min a 37 °C) em gel de poliacrilamida desnaturante 8%. Antes da corrida, o gel foi pré-aquecido a aproximadamente 60 °C para garantir que as moléculas de RNA permanecessem desnaturadas após tratamento com tampão de amostra contendo formamida. Depois da confirmação da pureza da biblioteca de RNA (visualização de uma única banda de 82 pb), o restante da reação foi tratado com DNase I (1U/ μL) nas mesmas condições descritas. Em seguida, o material foi purificado (extração com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio), e os aptâmeros, precipitados (com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 %). O transcrito foi então solubilizado em 100 μL de água livre de RNase e quantificado em *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Uma alíquota de aproximadamente 0,5 μg dessa biblioteca de RNA foi usada em novo gel de poliacrilamida desnaturante 8 % para que se pudesse avaliar a integridade do transcrito.

3.12.5. Seleção de aptâmeros: incubação do resultado da transcrição *in vitro* com o alvo, preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce

Inicialmente, o transcrito (aptâmeros de RNA) foi aquecido a 65 °C por 15 min e depois mantido à temperatura ambiente por 15 min, etapa importante para garantir que as moléculas de RNA adquirissem sua conformação secundária estável (Ulrich *et al.*, 2005). A biblioteca de aptâmeros, a preparação de membrana e aproximadamente 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA transportador de levedura (competidor para reduzir ligações inespecíficas dos aptâmeros) foram incubados – em uma proporção em massa crescente ao longo do processo de seleção (ver Tabela 3.1) – em PBS 1X por 40 min à temperatura ambiente. Em seguida, essa solução

foi filtrada com membrana de nitrocelulose (*Trans-Blot Transfer Medium*, Bio-Rad). Os híbridos RNA-membrana-receptores retidos no filtro de nitrocelulose foram lavados com 400 μ L de PBS 1X (o número de lavagens e o volume utilizado também variou de acordo com o ciclo de SELEX) para a remoção dos RNAs que se ligaram fracamente à preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce. A membrana de nitrocelulose com os híbridos foi então incubada em uma solução de sacarose 200 mM por 40 min à temperatura ambiente. O sobrenadante com os aptâmeros deslocados pela sacarose foi purificado (extração com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio), os aptâmeros, precipitados (com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 %), e o material resultante, solubilizado em 50 μ L de água livre de RNase e quantificado em *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Tabela 3.1. Proporção RNA (μ g) / Proteína (μ g) em cada ciclo*

Ciclo	Proporção em massa	Número de lavagens/volume (μ L)
1	0,05	4/100
2,3 e 4	0,12	4/100
5	0,16	4/100
6	0,18	4/100
7	0,18	5/200
8	0,35	5/200
9	0,50	6/200
10	0,70**	6/200
11	0,70**	6/400
12	0,70**	6/400

*Valores aproximados, já que o conteúdo proteico da preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce foi estimado por ensaio de Bradford (Bio-Rad).

**Com o intuito de aumentar ainda mais a “estringência” do processo seletivo, além de aumentar a proporção RNA/proteína, adicionamos ao tampão de seleção (PBS) pequena quantidade de sacarose (concentração final 5mM).

3.12.6. Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR)

A reação de transcrição reversa foi feita segundo protocolo da empresa fornecedora da enzima *reverse transcriptase* (Life Sciences, Inc.), com algumas modificações. A mistura reacional – aproximadamente 200-250 ng de RNA pós-seleção, 100 pmol de *primer* P22 (5'-ACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGT-3') e 9 µL de água livre de RNase – foi incubada por 10 min a 70 °C e, em seguida, mantida no gelo por 10 min. A esse material foram adicionados 50U de AMV *Reverse Transcriptase* (Life Sciences, Inc.), 5 µL de tampão AMV 10X, 1 µL de dNTP 10 mM e água livre de RNase para um volume final de 50 µL, e essa mistura foi incubada por 50 min a 42 °C. Para a PCR, a cada 25 µL do produto da transcrição reversa foram adicionados 1 µL de dNTP 10 mM, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 5 µL de tampão de *Taq* DNA polimerase 10X, 100 pmol de *primer* P40 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCAACTGCCATCTA-3'), 5U de *Taq* polimerase e água livre de RNase para um volume final de 50 µL. O programa utilizado consistiu em: 94 °C por 5 min, x ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 s e 72 °C por 10 min. Em todas as RT-PCRs realizadas, foi necessário verificar o número adequado de ciclos para evitar o surgimento de bandas inespecíficas. A padronização de ciclos foi feita da seguinte maneira: quatro alíquotas de 5 µL foram retiradas da mistura reacional de PCR, e uma reação teste de amplificação foi feita com ciclagens diferentes para cada alíquota (por exemplo, 6, 9, 12 e 15 ciclos). Em seguida, aplicaram-se tais amostras em gel de poliacrilamida 8%, e a ciclagem que resultou em uma banda clara de 100 pares de base foi usada na PCR.

3.12.7. Contrasseleção negativa para eliminar moléculas de RNA que se ligam de modo não específico à membrana de nitrocelulose

Uma solução de 300 μL de PBS 1X contendo 50 μg de aptâmeros de RNA foi aquecida a 65 °C por 10 min e depois mantida à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, ela foi filtrada com membrana de nitrocelulose. Após lavagem com 400 μL de tampão PBS 1X, a membrana foi descartada. Ao filtrado (solução contendo aptâmeros que não se ligam a membrana de nitrocelulose) foi adicionado acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 80 % para a precipitação. Os aptâmeros precipitados foram solubilizados em 50 μL de água livre de RNase e quantificados em *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Esse material “contrasselecionado” foi utilizado em ciclo posterior de SELEX com a preparação de membrana contendo o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce.

3.12.8. Contrasseleção negativa para eliminar moléculas de RNA que se ligam de modo não específico a proteínas presentes na preparação de membrana de células HEK293T que não expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce

Uma solução de 300 μL de PBS 1X contendo 1 nmol de RNA foi aquecida a 65 °C por 10 min e depois mantida à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionou-se a essa solução aproximadamente 40 μg de proteína da preparação de membrana de células HEK293T que não expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce. A mistura aptâmeros de RNA/proteína foi incubada à temperatura ambiente por 40 min e filtrada com membrana de nitrocelulose. Após lavagem com 400 μL de tampão PBS 1X, a membrana foi descartada. O filtrado (solução contendo aptâmeros que não se ligam a proteínas presentes na preparação de membrana) foi purificado (extração com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio),

e precipitação com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 % se seguiu. Os aptâmeros foram solubilizados em 50 µL de água livre de RNase e quantificados em *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Esse material “contrasselecionado” foi utilizado para RT-PCR e novo ciclo de seleção.

3.13. Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX

A região randômica de 40 nucleotídeos deve conter aproximadamente 25 % de cada base. Os motivos estruturais – tais como AA, AC, AG e AT – devem estar igualmente distribuídos (Ulrich *et al.*, 2005). Para avaliar a randomicidade da biblioteca, o material de uma alíquota da PCR sujeita a erro foi clonado, e 48 clones, sequenciados.

3.14. Busca por motivos conservados na região randômica dos aptâmeros de RNA

Para verificar a presença de sequências conservadas nos aptâmeros selecionados após os ciclos de enriquecimento, uma alíquota do produto de PCR do ciclo 12 foi clonada no vetor pCR II (Invitrogen). Confirmou-se a presença de inserto mediante digestão de DNA plasmidial com a enzima de restrição *Sca I* (New England Biolabs inc), de acordo com as instruções do fabricante. Foram sequenciados 105 clones (ver item 3.11.).

As regiões randômicas das sequências individuais obtidas foram submetidas ao programa MEME (http://meme.sdsc.edu/meme4_6_0/cgi-bin/meme.cgi). Os seguintes parâmetros foram adotados:

- Distribuição de ocorrências de motivos: **Qualquer número de repetições/Zero ou uma por sequência**
- Quantidade de sequências: **105**

- Mínimo tamanho do motivo: **6**
- Máximo tamanho do motivo: **10**

O programa MEME analisa apenas sequências de DNA e proteína, portanto, para realizar a busca por motivos conservados, todas as bases Us tiveram de ser alteradas para Ts.

3.15. Previsão da estrutura secundária dos aptâmeros de RNA

A estrutura secundária dos aptâmeros de RNA selecionados do ciclo 12 foi prevista pelo *software* Mfold. O programa foi utilizado nas configurações padrão, listadas na *homepage* do *RNA Institute at University at Albany, State University of New York*. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>.

3.16. RT-PCR semiquantitativa

Células HEK293T foram cultivadas em uma placa de 96 poços, mantidas em condições de cultura padrão até atingirem 75 % de confluência e, em seguida, transfectadas segundo protocolo descrito anteriormente (com os devidos ajustes; ver item 3.3.). Após 48 h, células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas por 40 min com 1 pmol (1 pmol/poço) de aptâmeros de RNA dos ciclos 7, 9 e 12 em 50 µL PBS 1X. (Antes dessa incubação, a solução de aptâmeros em PBS foi aquecida a 65 °C por 10 min e depois mantida à temperatura ambiente por 10 min). Em seguida, foram lavadas com 50 µL de PBS 1X (duas vezes) e lisadas com SDS 1 % e 100 mM de citrato de sódio. Realizou-se uma extração com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio, e os aptâmeros que se ligaram às células foram precipitados (com acetato de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80 %). O material resultante foi solubilizado em 50 µL de água livre de RNase.

Executaram-se então reações de RT-PCR em diversas ciclagens, nas condições descritas anteriormente (ver item 3.12.6.), com alíquotas de 5 µL de cada amostra obtida (aptâmeros de RNA dos ciclos 5, 7, 9 e 12 que se ligaram a células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e a células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3). Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8 %, e o resultado, analisado.

3.17. Transcrição para a produção de aptâmeros de RNA marcados com ATP [α - 32 P] e ensaio de *binding*

A afinidade dos *pools* de RNA de diferentes ciclos foi medida por meio de ensaios de competição e saturação (nesse caso, apenas o ciclo 12 foi utilizado). O protocolo do ensaio de competição apresentado em Ulrich *et al.* (2005) foi seguido rigorosamente. Já a afinidade de alguns aptâmeros selecionados do ciclo 12 foi determinada comparando-se a ligação total com células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e a com células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3.

Primeiramente, foi feita a transcrição para gerar o *pool* de aptâmeros de RNA marcados com 32 P. A mistura reacional consistiu em 10 a 30 pmol de cada *pool* de DNA (ciclos 7, 9 e 12 de SELEX), 0,2 mM de GTP, 0,6 mM de 2'-F-dCTP, 0,6 mM de 2'-F-dUTP, 10 µM de ATP, 50 µCi de ATP [α - 32 P] (Perkin Elmer Inc.), tampão T7 RNA polimerase 1X e 100 U de T7 RNA polimerase e água livre de RNase para um volume final de 25 µL. A incubação foi de 1 h a 37 °C. Em seguida, o produto da transcrição foi tratado por 10 min com 2 U de DNase livre de RNase. Para interromper a reação, EDTA foi adicionado (concentração final de 2,5 mM), e a mistura, aquecida por 10 min a 65 °C. Retirou-se uma alíquota de 2 µL de cada produto reacional para análise; 1µL foi diluído 10X em água livre de RNase e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e 1µL foi diluído 10X em

água livre de RNase e usado para a determinação da atividade específica. O gel foi exposto a uma chapa de *phosphor imaging* (Fujifilm), e essa chapa, digitalizada no escâner *Typhoon Trio* (GE). A atividade específica foi determinada mediante contagem de cintilação de uma alíquota de 1 μL . Com base na contagem obtida, estimou-se a quantidade de RNA sintetizado, levando-se em conta que cada quarto nucleotídeo incorporado corresponde ao ATP. Os aptâmeros de RNA marcados com ATP [α - ^{32}P] foram purificados com uma microcoluna Bio-Spin[®] S-30 de cromatografia (Biorad), segundo instruções do fabricante.

Antes de proceder com o ensaio de competição, as membranas de nitrocelulose (as mesmas utilizadas nos ciclos de SELEX) foram incubadas por 1 h em PBS 1X. As reações de ligação continham uma mistura de 10 μg de proteína (como dito anteriormente, o conteúdo proteico das preparações de membrana de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foi estimado por ensaio de Bradford), aproximadamente 1 nM de RNA marcado (ciclos 7, 9 e 12) e 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tRNA de levedura (como competidor não específico) em um volume total de 100 μL de PBS 1X. A fração de ligação não específica foi determinada na presença de um excesso de RNA não marcado (≈ 10 vezes) e de 100 mM de sacarose. A ligação específica foi determinada subtraindo-se a ligação inespecífica da ligação total. Para determinar a fração que se liga inespecificamente à membrana de nitrocelulose, 1 nM de RNA marcado e 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tRNA de levedura foram incubados em 100 μL de PBS 1X. Todas as reações de ligação foram realizadas à temperatura ambiente e duraram 40 min. Essas reações foram filtradas em uma unidade de filtração com as membranas de nitrocelulose previamente incubadas em PBS 1X. Depois da filtração, os filtros foram lavados com 400 μL de PBS 1X e, em seguida, transferidos para frascos contendo 2 ml de fluido de cintilação. A radioatividade ligada ao filtro foi medida por contagem de cintilação (cpm).

A medida da ligação inespecífica com a membrana de nitrocelulose foi feita uma única vez, pois nos interessava ter apenas uma estimativa da quantidade de RNA [^{32}P] que se ligava a essa membrana.

Para o ensaio de saturação, a ligação do *pool* 12 a várias concentrações (1-8 nM) com as preparações de membrana de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 (10 μg de proteína) foi medida. A fração de ligação não específica foi determinada na presença de um excesso de sacarose (250 mM), e a específica, como mencionado anteriormente.

Como dito, a afinidade de alguns aptâmeros selecionados do ciclo 12 foi medida comparando-se a ligação total com células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e a com células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3. Para a amplificação dos aptâmeros clonados no vetor pCR II foram usados: 50 ng do plasmídeo, 0,2 μM de cada *primer* (P40 e P22), 0,2 μM dos dNTPs, 2,5 μM de MgCl_2 , tampão de *Taq* polimerase 1X, 5U de *Taq* DNA polimerase e água livre de RNase para um volume final de 50 μL . As condições das reações de PCR foram como descrito (ver item 3.12.6.; utilizaram-se 15 ciclos). Após corrida em gel de agarose 2% e purificação (ver item 3.9.1.), esses aptâmeros de DNA amplificados foram usados em reações de transcrição para a produção de aptâmeros de RNA marcados com ATP [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$], conforme descrito anteriormente para os *pools* de SELEX.

As células HEK293T foram cultivadas em placas de 96 poços e transfectadas tal como descrito anteriormente (com ajustes; ver item 3.3.). Quarenta e oito horas após a transfecção, elas foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 40 min à temperatura ambiente com 1 nM de aptâmeros marcados em um volume total de 50 μL de PBS 1X. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 50 μL de PBS 1X e incubadas por 30 min com SDS 1 % e 100 mM de citrato de sódio. As células lisadas de cada poço foram transferidas para frascos contendo 2 ml de fluido de cintilação. A radioatividade ligada às células foi medida por contagem de cintilação.

Para a experiência de ligação competitiva, células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas por 40 min à temperatura ambiente com 1,2 nM de aptâmeros marcados do ciclo 12 na presença de várias concentrações de ligante não marcado (0-700 mM de sacarose) em um volume total de 50 µL de PBS 1X. O restante do procedimento é igual ao descrito para a determinação da afinidade de aptâmeros individuais.

3.18. Ensaio de *gel-overlay*

O procedimento é praticamente o mesmo que o descrito para *Western blot*. Ao invés de incubar as membranas de PVDF com anticorpos, neste ensaio de *gel-overlay* elas foram incubadas com 200000 cpm de RNA marcado (alguns aptâmeros selecionados do *pool* 12 e os *pools* 5, 7, 9 e 12) em 5mL de PBS 1X. Após incubação de uma hora, as membranas foram lavadas com PBS 1X por 10 min (três vezes) e secas. Autorradiografias foram produzidas mediante o uso de chapas de *phosphor imaging* (Fujifilm) e analisadas. A mesma quantidade de proteína foi usada (cerca de 10 ug), e o tempo de exposição foi o mesmo para todas as membranas de PVDF.

3.19. Imunofluorescência para determinação da localização de CD36 em cortes frescos de epitélio olfatório

Lâminas contendo cortes de epitélio olfatório de camundongos WT e de uma linhagem KO de CD36 foram incubadas em metanol por 20 min a -20 °C. Em seguida, efetuaram-se três lavagens de 5 min cada com PBS 1X. O bloqueio foi feito por 90 min à temperatura ambiente com NDS 10%, TritonX-100 0,25% e BSA 2% em PBS 1X. Para a dupla marcação, alguns cortes (de WT e KO) foram incubados *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários

anti-CD36 *mouse* monoclonal (Millipore™; diluição de 1:500) e anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal (Abcam®; diluição de 1:250) em PBS 1X contendo NDS 5%, Triton X-100 0,125% e BSA 1%. Após três lavagens de 10 min cada com PBS 1X à temperatura ambiente, seguiu-se incubação por 1 h à temperatura ambiente com os anticorpos secundários *Alexa Fluor*® 488 *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)* (Life Technologies™) e *Alexa Fluor*® 546 *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)* (Life Technologies™) diluídos 1:250 em PBS 1X. Realizaram-se mais três lavagens de 10 min cada com PBS 1X à temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram incubados por 30 min à temperatura ambiente com DAPI, diluído 1:2000 em PBS 1X. Seguiram-se mais três lavagens de 1 min cada com água MilliQ à temperatura ambiente. As lâminas foram secas, e os cortes, cobertos com gelvatol e lamínula. O material foi analisado ao microscópio invertido Nikon TE300.

Foram feitos três controles: um controle negativo (uso de cortes da linhagem KO de CD36, gentilmente cedida pelo prof. Dr. Isaías Glezer) e dois controles para avaliar reações cruzadas. Para isso, realizou-se o protocolo de imunofluorescência em duas condições: uma sem o anticorpo primário anti-CD36 *mouse* monoclonal e outra sem o anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Caracterização das células HEK293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce

Para selecionar aptâmeros de RNA que se ligam ao receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce, usamos como alvo extratos de membrana preparados a partir de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3. Em primeiro lugar, foi preciso demonstrar a presença efetiva do receptor na membrana. Realizamos então um ensaio de *Western blot* com preparações de membrana de células HEK293T transfectadas ou não com os vetores para a expressão das proteínas hT1R2 e hT1R3 (Figura 4.1.A). Observamos também o padrão característico de duas bandas em torno de 100 kDa quando cada proteína foi expressa separadamente em células HEK293T (Figura 4.1.B). Uma vez que tanto hT1R2 (95,2 kDa) quanto hT1R3 (93,5 kDa) têm o epítipo FLAG, não podemos distingui-las quando elas são co-expressas. Mas, se cada proteína pode ser detectada quando cada plasmídeo é transfectado separadamente, pode-se supor, por conseguinte, que as duas proteínas são expressas quando ambos os vetores de expressão são transfectados. Assim, poderíamos afirmar que as duas bandas vistas na Figura 4.1.A correspondem a hT1R2 e hT1R3. Provavelmente, esse padrão resulta dos diferentes graus de glicosilação desses receptores (Cvejic and Devi, 1997).

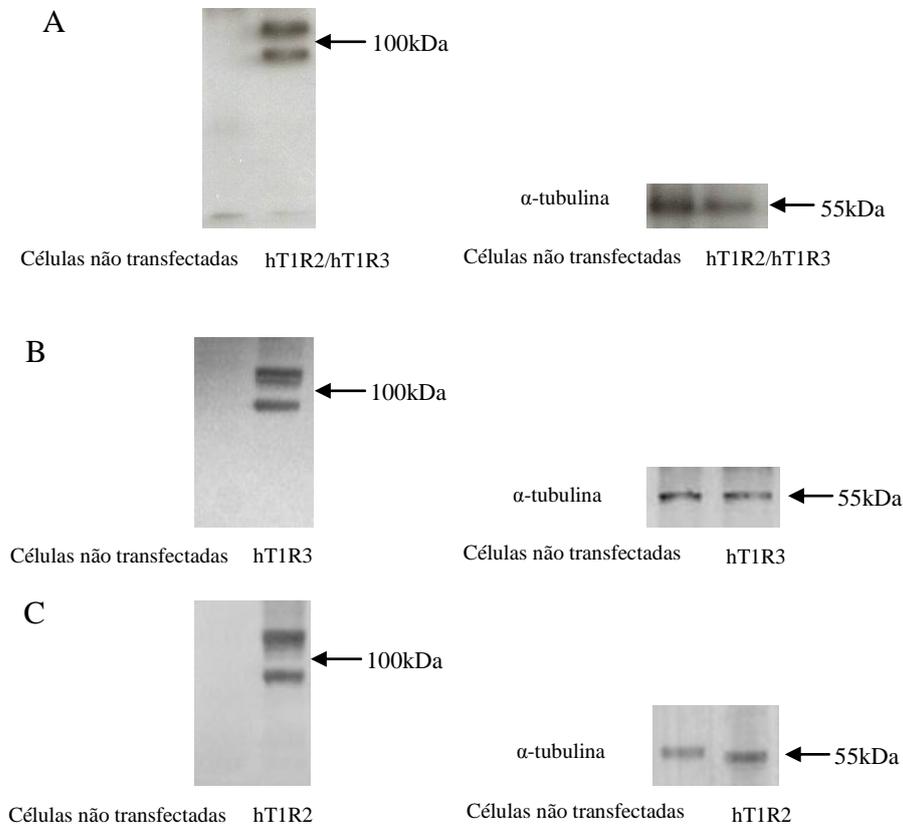


Figura 4.1. Expressão de hT1R2/hT1R3 em células HEK293T. (A) Detecção por *Western blot* do receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce expresso em células HEK293T. O anticorpo anti-FLAG foi utilizado para detectar ambos hT1R2 e hT1R3. O *Western* com o anticorpo anti- α -tubulina constitui o controle interno. (B) Detecção por *Western blot* de hT1R3 em células HEK293T com o anticorpo primário anti-FLAG M2. (C) Detecção por *Western blot* de hT1R2 em células HEK293T com o anticorpo primário anti-FLAG M2. As células foram transfectadas com vetores de expressão contendo hT1R2 e hT1R3 (ou com cada vetor, individualmente), e as preparações de membrana foram purificadas. Aproximadamente 10 μ g de preparação de membrana foram utilizados. A revelação em (A) foi feita quimicamente, com revelador e fixador da Kodak (*Carestream® Kodak® Processing chemicals*); em (B) e (C), ela foi feita em um escâner *Typhoon Trio* (GE).

Para verificar a localização de hT1R2 e hT1R3 nas células HEK293T, ensaios de imunofluorescência foram realizados (Figuras 4.2.A e 4.2.B). Como o receptor purinérgico P2Y1 é uma proteína típica de membrana, expressa endogenamente nessas células, a co-localização dos sinais de imunofluorescência de hT1R2/hT1R3 e P2Y1 indica que os receptores para o gosto doce estão localizados na membrana. Mais uma vez, tivemos que fazer a mesma suposição que a feita no caso do *Western blot*, por causa do epítipo FLAG em ambas as proteínas. Estas foram detectadas separada e simultaneamente por imunofluorescência (Figura 4.2.A), por isso podemos assumir que o sinal de imunofluorescência na Figura 4.2.B1 é de ambas as proteínas, hT1R2 e hT1R3 e, como seus sinais se sobrepõem ao sinal de P2Y1 (Figura 4.2.B2 e 4.2.B3), conclui-se que estão localizadas na membrana.

Depois de confirmar a presença das proteínas do receptor hT1R2/hT1R3 na membrana da célula, avaliamos sua funcionalidade. Para isso, realizamos medidas da variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, por imageamento de cálcio. A estimulação desse receptor em células HEK 293T que expressam Gaq/15 (uma proteína G promíscua) provoca a ativação da fosfolipase C, o que leva a produção dos segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol, sendo o primeiro responsável pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003 e Xu *et al.*, 2004). Inicialmente, verificamos se as concentrações de 200, 250 e 500 mM de sacarose (usadas por Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003 e Xu *et al.*, 2004, respectivamente) causavam, em nosso sistema, uma variação razoável da concentração de cálcio, o que comprovaria a funcionalidade do receptor. Entretanto, constatamos que as células sofriam um choque osmótico muito intenso, elas se contraíam visivelmente após adição da solução de sacarose. Como provavelmente muitas células morriam após o choque osmótico – o que nos daria falsos positivos, já que células em processo de morte apresentam alta variação da concentração de cálcio –, buscamos uma

concentração de sacarose cujo uso não causasse uma contração pronunciada das células HEK293T e que, conseqüentemente, resultasse em menos mortes celulares. Com uma solução de 100 mM, foi possível observar que as células HEK 293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 respondiam à sacarose de forma mais expressiva (Figura 4.3). Está claro, entretanto, que não se tratou de uma resposta intensa – como as observadas por outros grupos de pesquisadores (Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003 e Xu *et al.*, 2004), talvez por causa do tipo de proteína $G\alpha$ que utilizamos –, mas parece ser o suficiente para afirmar que o receptor se encontra funcional quando expresso em células HEK293T.

Como mencionado anteriormente, as proteínas T1R2 e T1R3 do receptor para o gosto doce têm sido encontradas em outros tecidos (Kinnamon, 2011; Henquin, 2012). Decidimos, por isso, avaliar se no nosso sistema heterólogo, as células embrionárias de rim humano (HEK293T), há expressão dessas proteínas. O RNA total dessas células foi extraído e submetido a RT-PCR com *primers* específicos (Jang *et al.*, 2007). Na Figura 4.4.A, vemos bandas em torno de 400 pb, que corresponderiam a fragmentos amplificados dos genes hTAS1R2 (368 pb) e hTAS1R3 (308 pb). Verificamos – após purificar essas bandas do gel de agarose, clonar os fragmentos, sequenciá-los e fazer um BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – que apenas uma das bandas se refere de fato ao fragmento amplificado de um dos genes (hTAS1R2). Pode-se afirmar, assim, que em células HEK293T há expressão do gene hTAS1R2, fato que pode afetar a eficácia do procedimento SELEX, conforme discutiremos na seção Discussão. É importante salientar, entretanto, que não podemos descartar a possibilidade de haver também expressão de hTAS1R3.

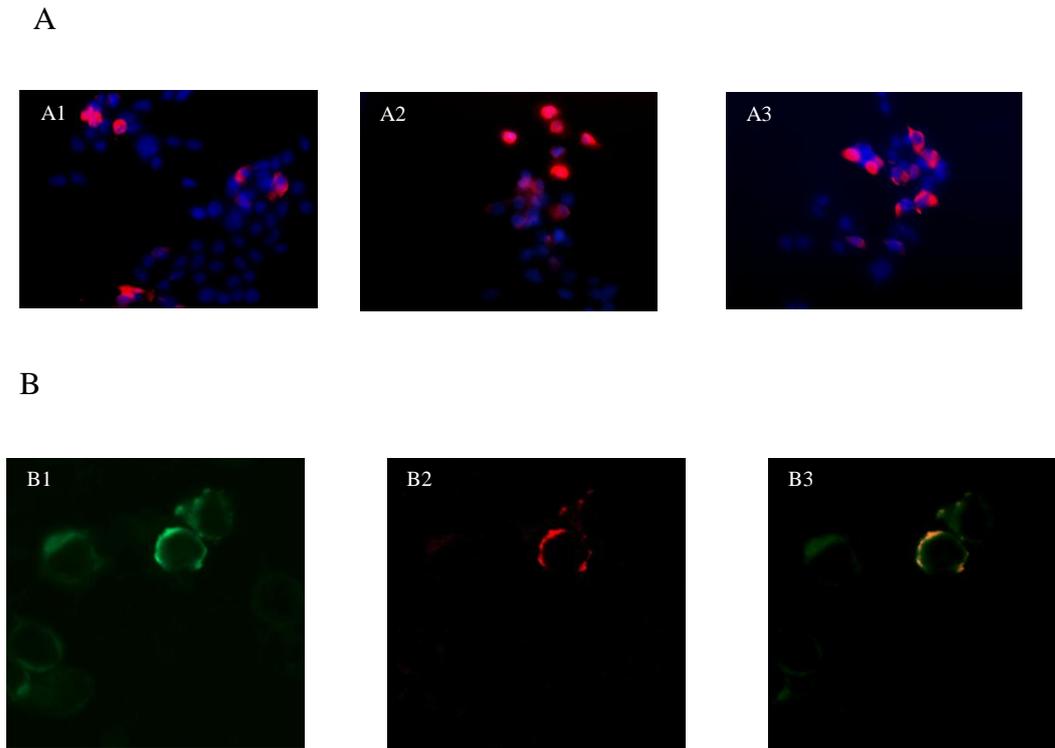


Figura 4.2. Detecção por imunofluorescência do receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce expresso em células HEK293T. (A) As células foram transfectadas com os vetores contendo hTAS1R2 (A1), hTAS1R3 (A2) e com ambos os vetores de expressão (A3). Os núcleos foram corados com DAPI. A detecção das proteínas foi feita com o anticorpo primário anti-FLAG M2 e o anticorpo secundário *anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546* (B) Imunofluorescência para identificar a localização dos receptores. As células foram transfectadas com os vetores de expressão contendo hTAS1R2 e hTAS1R3 e imunomarcadas com os anticorpos anti-FLAG M2/*anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488* (B1) e anti-P2Y1/*anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546* (B2). B3 é a sobreposição das marcações de hT1R2/hT1R3 (verde) e de P2Y1 (vermelho). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio invertido Nikon TE 300.

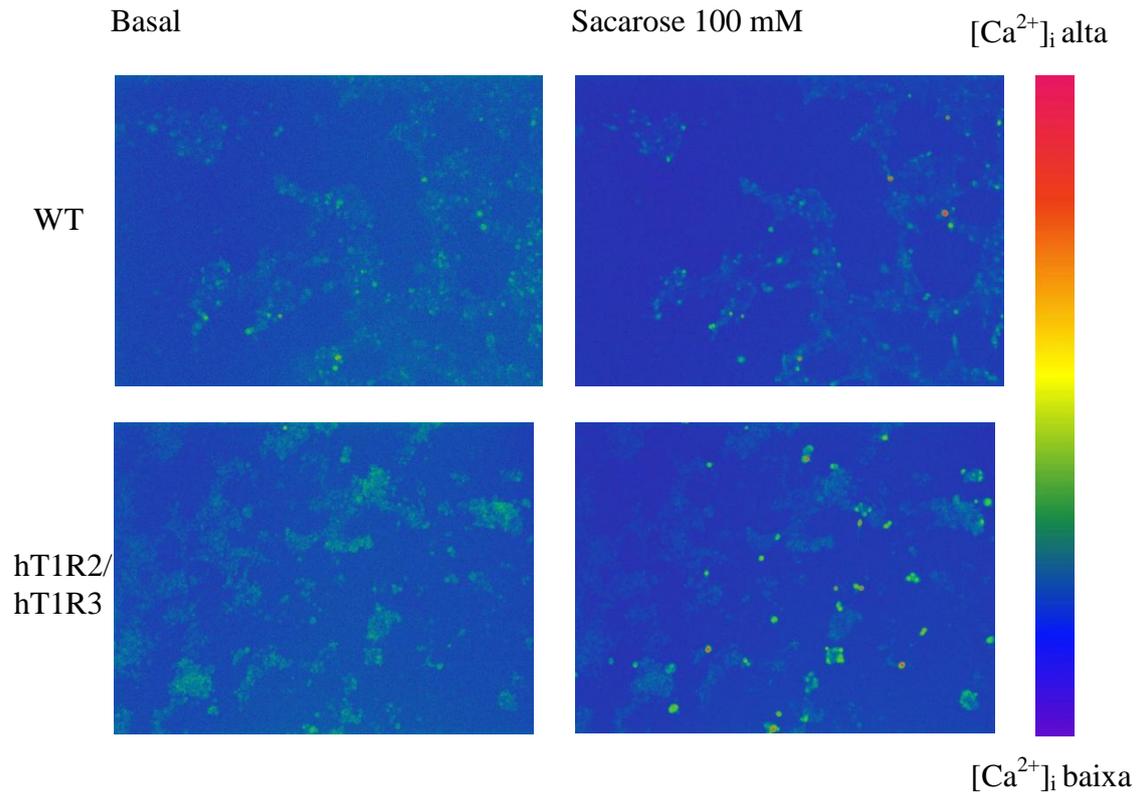


Figura 4.3. Variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, em células HEK 293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 e em células HEK 293T selvagens. Imagens representativas da variação de $[Ca^{2+}]_i$ seguida da estimulação de células HEK 293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 e células HEK 293T selvagens por 100 mM de solução de sacarose. Ao final de cada medida o inonóforo 4-Br-A23187 era adicionado para verificar a viabilidade celular e a resposta máxima. O experimento foi realizado três vezes.

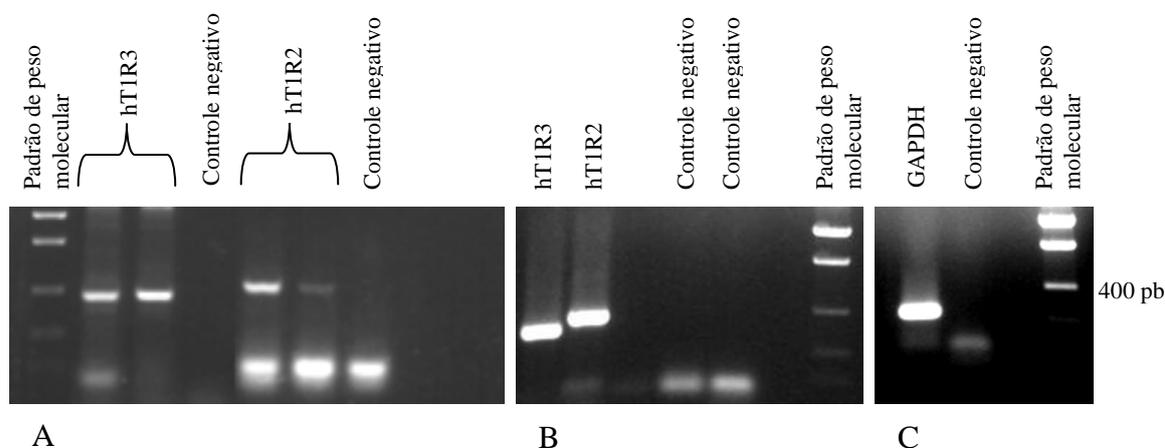


Figura 4.4. RT-PCR de RNA total de células HEK293T. Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 1 μ g de RNA total extraído de células HEK293T. (A) Reações de amplificação feitas com *primers* desenhados para regiões específicas dos genes hTAS1R2 e hTAS1R3 (Jang *et al.*, 2007). As bandas da esquerda (tanto para hT1R2 como para hT1R2) correspondem a PCRs realizadas com DMSO 5%. As da direita (tanto para hT1R2 como para hT1R2) correspondem a PCRs realizadas sem DMSO 5%. O controle negativo foi feito sem a adição de RNA. (B) Controle positivo. Os vetores de expressão pcDNA5 FRT contendo as regiões codificadoras de hT1R2 e hT1R3 foram utilizados. Nos controles negativos, os vetores não foram adicionados à reação. (C) Controle interno. *Primers* específicos foram desenhados para amplificar parte do gene da enzima GAPDH. O controle negativo foi feito sem a adição de RNA. Os padrões de peso molecular (A, B e C) correspondem a *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™).

4.2. Procedimento SELEX

Após caracterização do nosso alvo para o procedimento SELEX, a biblioteca de DNA simples fita (*Operon Biotechnologies Inc.*) foi purificada e amplificada por reação em cadeia

de polimerase sujeita a erro (*error-prone* PCR). Em seguida, o material foi transcrito *in vitro* para que o SELEX pudesse ser iniciado (Figura 4.5). Submetemos então esse primeiro *pool* de RNA ao alvo, qual seja, a preparação de membrana de células HEK 293T que expressam o receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce. Os aptâmeros eluídos pela solução de sacarose 200 mM foram submetidos à transcrição reversa e amplificação por PCR. Em cada ciclo de SELEX foi feito um teste de ciclagem para amplificação dos cDNAs (Figura 4.6.A). Com isso, procurou-se evitar a formação de multímeros. Entretanto, não foi possível evitar a formação de uma banda abaixo de 100 pb (Figura 4.6.A). Testamos várias condições de PCR e não tivemos sucesso na eliminação dessa banda; decidimos purificá-la, clonar o material purificado e sequenciá-lo. Descobrimos se tratar de dímero de *primer*. Portanto, a cada ciclo de SELEX, a banda em 100 pb tinha de ser purificada do gel de poliacrilamida antes da realização de nova transcrição *in vitro* (Figura 4.6.B).

Antes de executar o primeiro ciclo de SELEX, foi necessário verificar se a biblioteca inicial de aptâmeros apresentava randomicidade. A sequência de 40 nucleotídeos flanqueada por duas sequências constantes tinha de ser, com efeito, randômica. Para isso, o material de uma alíquota da PCR sujeita a erro foi clonado, e 48 clones, sequenciados (Figura 4.7). Na sequência randômica dessas moléculas, motivos tais como AA, GG, CT, CA etc. devem estar igualmente distribuídos, e cada base deve estar presente em uma porcentagem de 25% (Ulrich *et al.*, 2005). É o que se vê na Figura 4.7, cada nucleotídeo compõe entre 20-30 % dos clones sequenciados, e os motivos apresentam uma distribuição razoavelmente homogênea, com exceção de TT. Uma possível explicação para essa exceção é fato de que a *Taq* DNA polimerase falha ao replicar sequências com alterações químicas, que podem ter sido causadas no processo de síntese, e partes com sequências repetitivas. Com a PCR sujeita a erro, buscou-se justamente evitar esse tipo de problema e aumentar a randomicidade. Ademais, analisamos 48 sequências de uma biblioteca que tem em torno de 10^{15} moléculas diferentes, é

pouco para concluirmos que a porcentagem de TT quebra a homogeneidade da distribuição dos motivos. Os dados apresentados na Figura 4.7 parecem permitir, portanto, a afirmação de que a biblioteca apresenta alta complexidade e randomicidade o suficiente para o desenvolvimento da técnica SELEX.

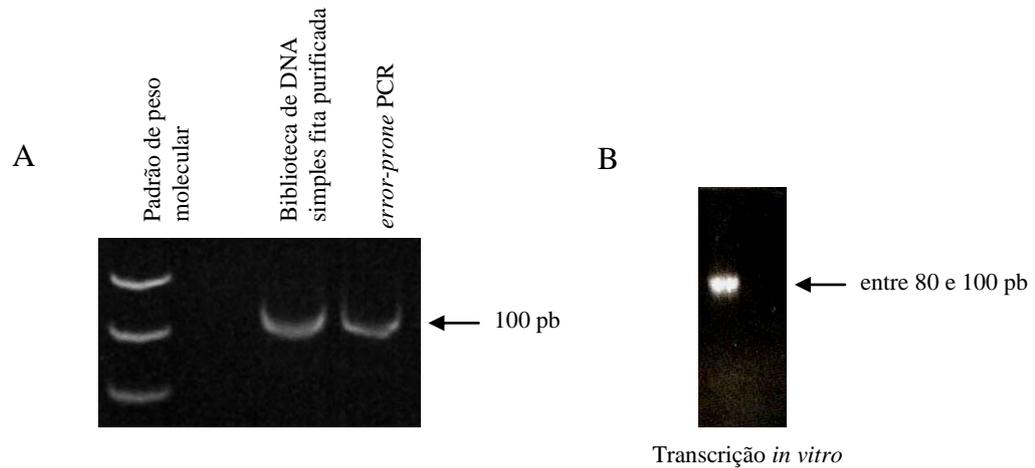


Figura 4.5. Início do procedimento SELEX. Em torno de 400 μg da biblioteca de DNA simples fita foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 8% e purificados (banda em 100 pb). O resultado dessa purificação foi submetido à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% (A). Para a amplificação, foi necessário buscar a ciclagem mais adequada. Após testes, verificou-se que, com 9 ciclos, se obteria um bom rendimento e não se observaria a formação de multímeros. O produto da amplificação da biblioteca por *error-prone* PCR também está em A. Uma alíquota desse material foi utilizada em uma transcrição *in vitro*, e o produto da transcrição, submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 8% (B). O padrão de peso molecular (A) corresponde a *FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific). Vê-se em (A) as bandas referentes a 200 pb, 100 pb e 50 pb.

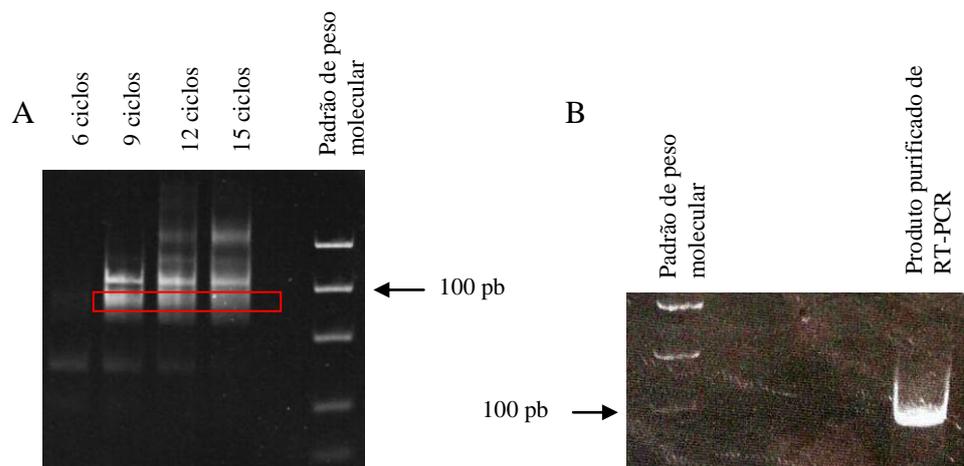
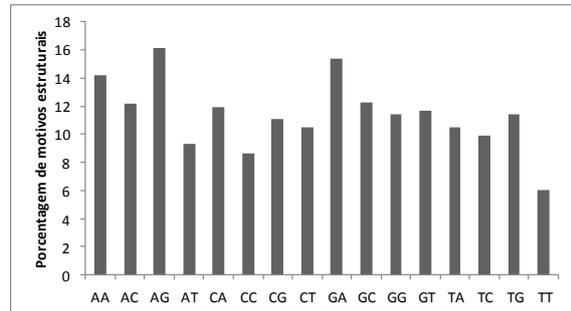


Figura 4.6. Exemplo de teste de ciclagem (RT-PCR de aptâmeros de RNA selecionados) e produto da amplificação purificado. (A) Quatro alíquotas de 5 μ L da mistura reacional de RT-PCR foram submetidas a diferentes ciclagens de amplificação, e os produtos, à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. O exemplo refere-se a um teste de ciclagem feito para RT-PCR de aptâmeros selecionados no ciclo 4 de SELEX. (B) Após escolha da ciclagem e amplificação do material, a banda em 100pb foi purificada. Uma alíquota de 3 μ L do resultado dessa purificação foi submetida novamente à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. Os dímeros de *primer* estão indicados no retângulo vermelho (A). O padrão de peso molecular (A) corresponde a *FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific) (bandas referentes a 200, 100, 50 e 20 pb). Em (B), o padrão de peso molecular corresponde a *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™) (bandas referentes a 400, 200, e 100 pb).

A

5'-TCTCATGCTACCACGCTGTGTAGCAGGGCCGGCTGACCC-3'
 5'-GCAGAGAGGAGTGCTGATATCACCAATTGTCGACAGATG-3'
 5'-CATTGCAGCTACTGGAGACCAAATGGCCGTGACGATGCC-3'
 5'-TTCAGGGAGTGACAAGGGCTCGGCTCAGCTAACATGTGCG-3'
 5'-GAATCTGGTGGCACCTGCGAGAANTGAACAGCGACAAGA-3'
 5'-GGAATCTTCCCCAGCCACGAGGATCCAAGAGTGTCTAGC-3'
 5'-TGTAACGCCCATTAAGTAGGCCACTTGAGTGGGCTGTCC-3'
 5'-AGAAACGTCCGAGGCCAGCAAGTCTAACTCCCGGCTCGA-3'
 5'-ATACCCATGAAACGGGAACAANGAGGACACAAAAGCGATA-3'
 5'-ATTCTGAAGTCCCGAGGGTTCGAACTGGACCGAATTGAAA-3'
 5'-TAGAAACGTGCGAGGCCAGCAAGTCTAACTCCCGGCTCGA-3'
 5'-AACACGCTAGATATCTCGTCGGAAGTAGAAGATCACAACC-3'
 5'-TCCAGGGCAAAATAGAGTGGAGAGTGAACAGACATATGG-3'
 5'-TCAAATCCGAACATTTGAGCTTACCTGAAGAGGGCTGTGT-3'
 5'-ATACGAAAGGGCAATGACATGTCCTTCGCCCTAGAAGC-3'
 5'-TTAAAAAAAAGGGAATAAGGAGACAAAAGAGCTGGTGGTCC-3'
 5'-TGGTACCTAGTGGCTTCGTAGCGGCCCGGAAGCGGGACT-3'
 5'-GAGTCAAATCTAAACAGTGTTCAAAGCGGAGGACTGCT-3'
 5'-TAAGGTACGTAATAATTAACGCCACACGTATTCGGAAGGTG-3'
 5'-TACGACCGAATTACGAGGCACAGACGGAAACAGGATTTGG-3'
 5'-GCTCTCAAGTACCATGATTGTCCATGAAGTCAATCGGTGCTA-3'
 5'-ANTCCGNTGNAGAANAAGCNGCAGCAAGTACGTACAAAANAC-3'
 5'-ATGAATGGCGTATGGAATCCTTGATAGGTTGCTCAAAGAC-3'
 5'-ACTGAGCGCTCCTAGTAGAATCATATTGGCGCACAAGAAA-3'
 5'-AATCCTAGCCAAGCAGACACAATGGTCGTCGGCATCCA-3'
 5'-AAAGAATGAGCGCGAAGGGTGGCGGATCTCCGGATTTCC-3'
 5'-GACAGATGTGGCGATTGGGAGCGGCTTGGGTGTGGCTGTT-3'
 5'-GTCCGGGTAGCAAGTAGACAGCTCNGGAAAACNCCAGGGANAC-3'
 5'-GGGAGAATCAACTGCCATCTAGACTACAAGCTTCTGGAGTCGGT-3'
 5'-GCGCCAGCGTGTAACTCTAGACAAAAGCTAGAATATCCC-3'
 5'-AAAGAATGAGCGCAAGGGTGGCGGATCTCCGGATTTCC-3'
 5'-TGCAAGTGATTGTAGAGGACAGAACCCTAACTACCGGC-3'
 5'-AAGGAGGTATGCAGTACAATGGATCTCAGAGCTCCTGTA-3'
 5'-GGAGTTGACAGGTGGGAAATCTTGCCTAGCTAATCCGGA-3'
 5'-AGGCCTCGGTAAACTCTAGGTCGAGGGGCGATTCCAAAGG-3'
 5'-AAGCATGCAAGACATACACCATAAGTCTTCCAGCCGTTAGA-3'
 5'-CCTATGACGTCGAAGTAGAATTTGAAGGTAATCTGTGAA-3'
 5'-CCACTAGTATCTGTAGTGTAGAGGAACGGTTCGAAGAGA-3'
 5'-AGACGCAGGCGCCCGTCGATCATAGGCACCTGGTAAGTGA-3'
 5'-AGTACAAGCATCGCGGCCACCTGCAATCCAAACAAGTGA-3'
 5'-CCCTTAAAAAGGTAGTGTGGTGTAGTGTTCGGAACCAT-3'
 5'-GGACGTTACCTCTACTAGCAAGAGAACCCTTGTGACGGTT-3'
 5'-GCAACTGCCGTGGTCTTTGCCAAATACGGCTACGAACT-3'
 5'-CAACCCAATAAAGTACTAACGGGNCATAGTNTGTTATNACNA-3'
 5'-CCGACTACCGTGTAAACATAAAATACAGCGGTGGTAAA-3'
 5'-AGGCAGAAACCCCAAAAGTTTCGTCCTAGTTTGGACGTA-3'
 5'-CCTAGTGTCACTACGTTGCGATATGGAACCTGGCACAGCT-3'
 5'-GCGACGGTGGCATACAGACCTCAAGTTACGGTCGTGAC-3'

B



C

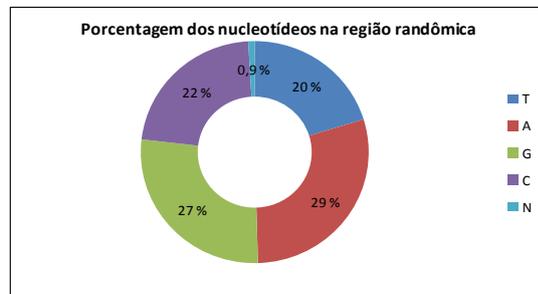


Figura 4.7. Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX. A biblioteca de DNA simples fita foi purificada e amplificada por PCR sujeita a erro. O material de uma alíquota da PCR sujeita a erro foi clonado em pCRII (Invitrogen™), e 48 clones, sequenciados. Em (A), apenas as sequências randômicas desses clones são apresentadas. A randomicidade é medida pela distribuição dos motivos estruturais (B) e pela porcentagem de cada nucleotídeo nas sequências obtidas (C).

Foram realizados doze ciclos de seleção *in vitro* e quatro contrasseleções negativas (para eliminar as moléculas de RNA que se ligam inespecificamente a membrana de nitrocelulose e a proteínas diferentes do alvo, endógenas de células HEK293T). O esquema apresentado na Figura 4.8 detalha todo o procedimento.

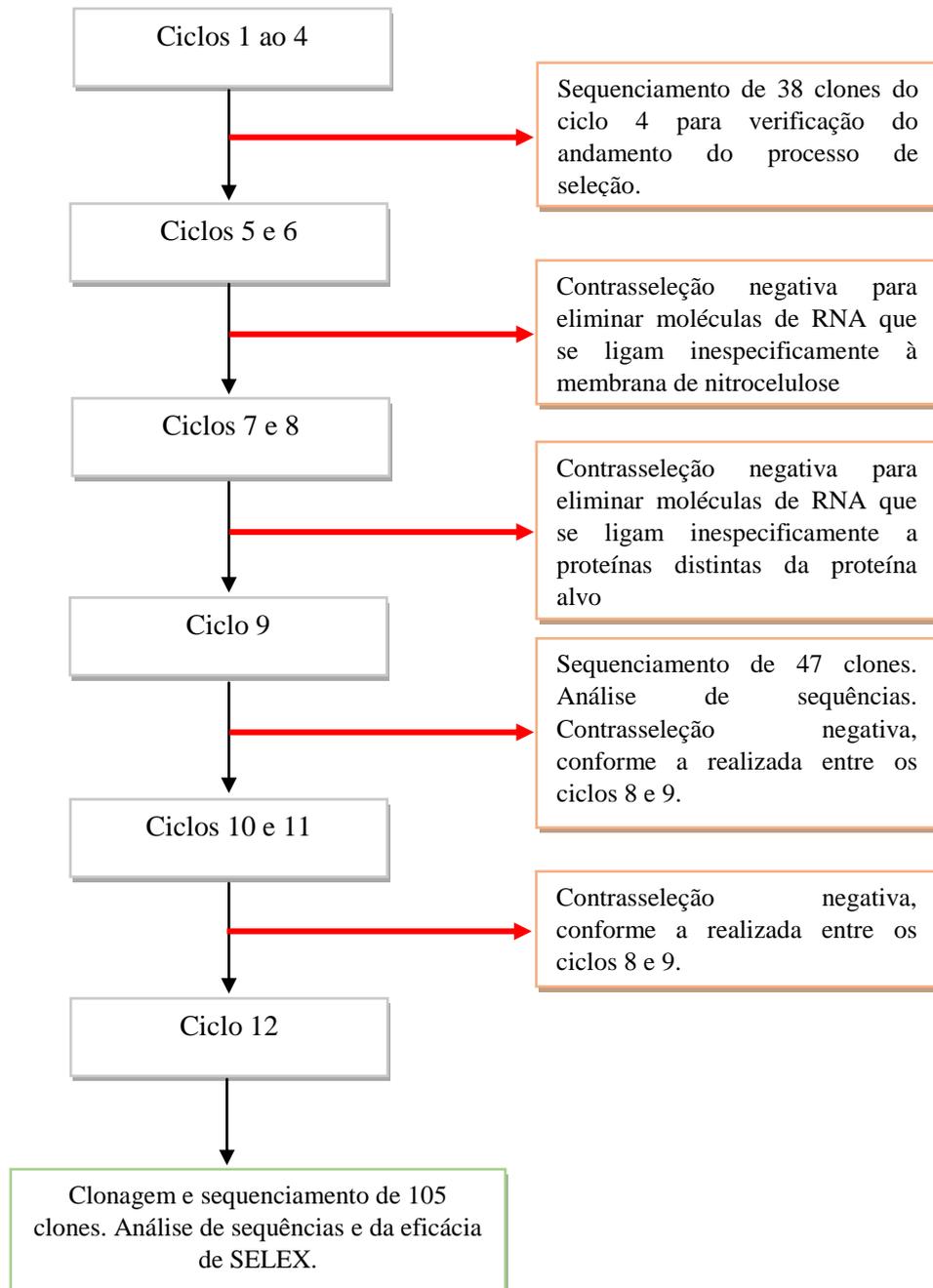


Figura 4.8. Esquema das etapas executadas no processo SELEX.

4.3. Análise da eficácia de SELEX

Para monitorar o progresso do enriquecimento, *pools* de três ciclos (7, 9 e 12) foram marcados com ATP [α - 32 P] mediante transcrição *in vitro*, e a ligação (no equilíbrio) entre os *pools* de RNA radioativos e o alvo proteico foi medida. A ligação específica entre os aptâmeros selecionados e o alvo é definida como a diferença entre a ligação total e a ligação não específica na presença de um excesso de competidor (Ulrich *et al.*, 2005). No experimento da Figura 4.9.A, aptâmeros de RNA não marcados de cada ciclo foram utilizados como competidores (dez vezes a concentração dos *pools* marcados). No experimento da Figura 4.9.B, 100 mM de sacarose foram utilizados como competidor. Apesar de termos usado 250 mM de sacarose para eluir aptâmeros nos ciclos reiterativos de SELEX, 100 mM de competidor representa ainda um excesso de cinco vezes o limiar *in vivo* e foi eficaz nesse ensaio. Os resultados mostrados na Figura 4.9.A (competição homóloga) nos permitem afirmar que a especificidade em relação ao alvo aumentou com o número de ciclos, ou seja, houve enriquecimento. Além disso, os resultados mostrados na Figura 4.9.B indicam que o alvo pode ser o sítio de ligação da sacarose no receptor para o gosto doce, pois a sacarose deve competir com os aptâmeros de RNA marcados com [α - 32 P] que se ligam especificamente ao sítio de ligação da sacarose.

A interação entre os *pools* dos ciclos 7, 9 e 12 e o alvo foi também avaliada por meio de outra abordagem: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase semiquantitativa (RT-PCR semiquantitativa). Na Figura 4.10, pode-se notar que uma maior quantidade de aptâmeros do *pool* 12 se liga a células HEK293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 (é preciso menos ciclos de PCR, 6 ciclos, para que observemos a banda típica dos aptâmeros, em 100 pb) do que a células HEK293T que não expressam o receptor hT1R2/hT1R3 (a banda em 100pb só aparece após 15 ciclos).

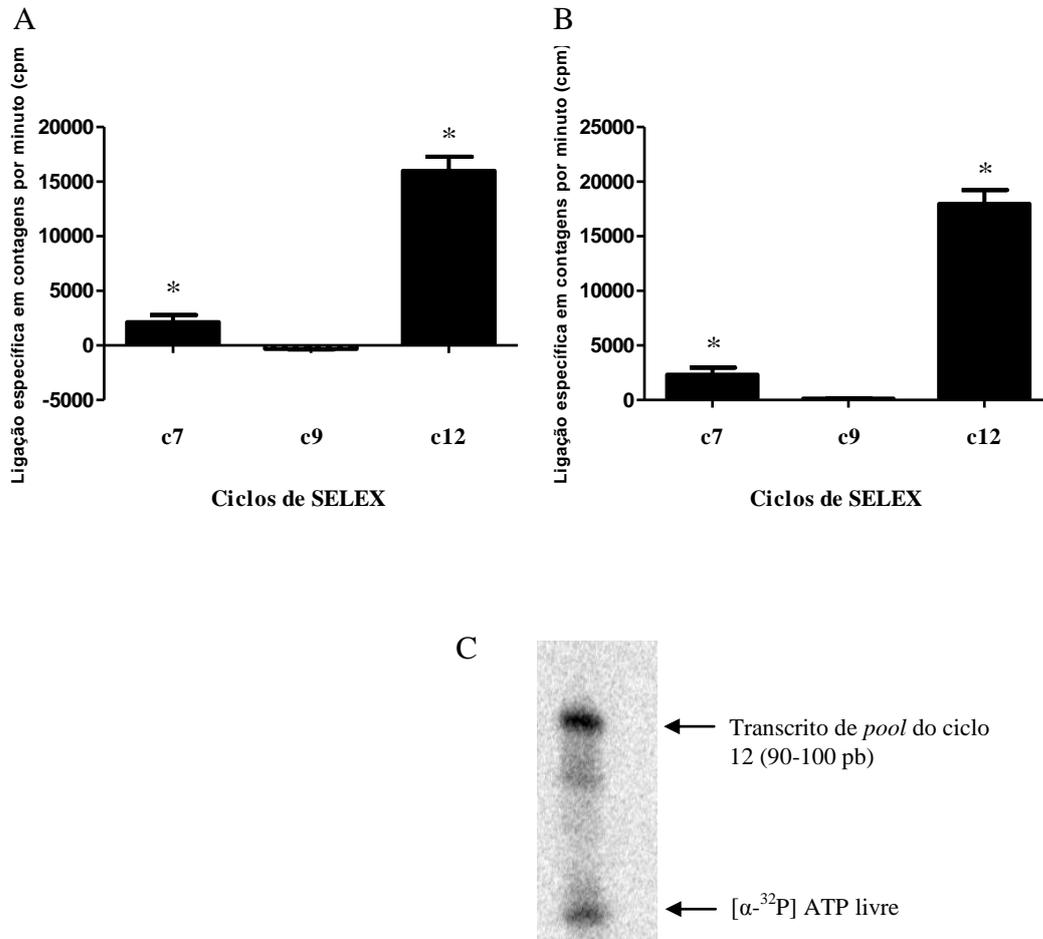


Figura 4.9. Ensaio de ligação. (A) Aptâmeros de RNA dos ciclos 7, 9 e 12 foram marcados com [α - 32 P] ATP e incubados com 10 μ g de proteína da preparação de membrana de células HEK293T que expressam os receptores para o gosto doce (hT1R2/hT1R3). Após filtração dessa mistura e lavagem com tampão de seleção, a quantidade de aptâmeros de RNA radiomarcados que se ligaram ao alvo foi medida por contagem de cintilação (cpm). A ligação não específica para cada ciclo foi determinada na presença de excesso de aptâmeros de RNA não marcados do mesmo ciclo (competição homóloga) (A) ou na presença de 100 mM de sacarose (B). (C) Autoradiografia de gel de poliacrilamida desnaturante 8% (transcrição radioativa *in vitro* de *pool* do ciclo 12). Os dados em (A) e (B) correspondem à intensidade média em cpm de medidas de radioatividade da ligação específica \pm E.P.M. de três experimentos independentes; * $p < 0,001$.

Se fizermos uma comparação entre os *pools*, vemos também que uma menor quantidade de aptâmeros dos *pools* 7 e 9 se liga a células HEK293T que expressam o receptor (são necessários 9 e 12 ciclos, respectivamente, para que abanda característica em 100 pb apareça). Isso pode indicar um aumento de especificidade dos aptâmeros. Em outras palavras, à medida que aumentamos os ciclos de SELEX, a quantidade de aptâmeros que se liga especificamente ao alvo parece aumentar e a de aptâmeros que se liga inespecificamente a outros sítios parece diminuir.

Essa abordagem corrobora, de alguma forma, o experimento cujos dados são exibidos na Figura 4.9. Entretanto, é preciso frisar que RT-PCR semiquantitativa não é uma técnica muito precisa. A extração dos aptâmeros com álcool iso-amílico/fenol/clorofórmio é, nesse caso, um processo complicado. Ao lisar as células, para a obtenção dos aptâmeros ligados, gera-se uma solução viscosa de difícil manuseio, por conta do DNA genômico. Isso pode levar a perdas e a subquantificação.

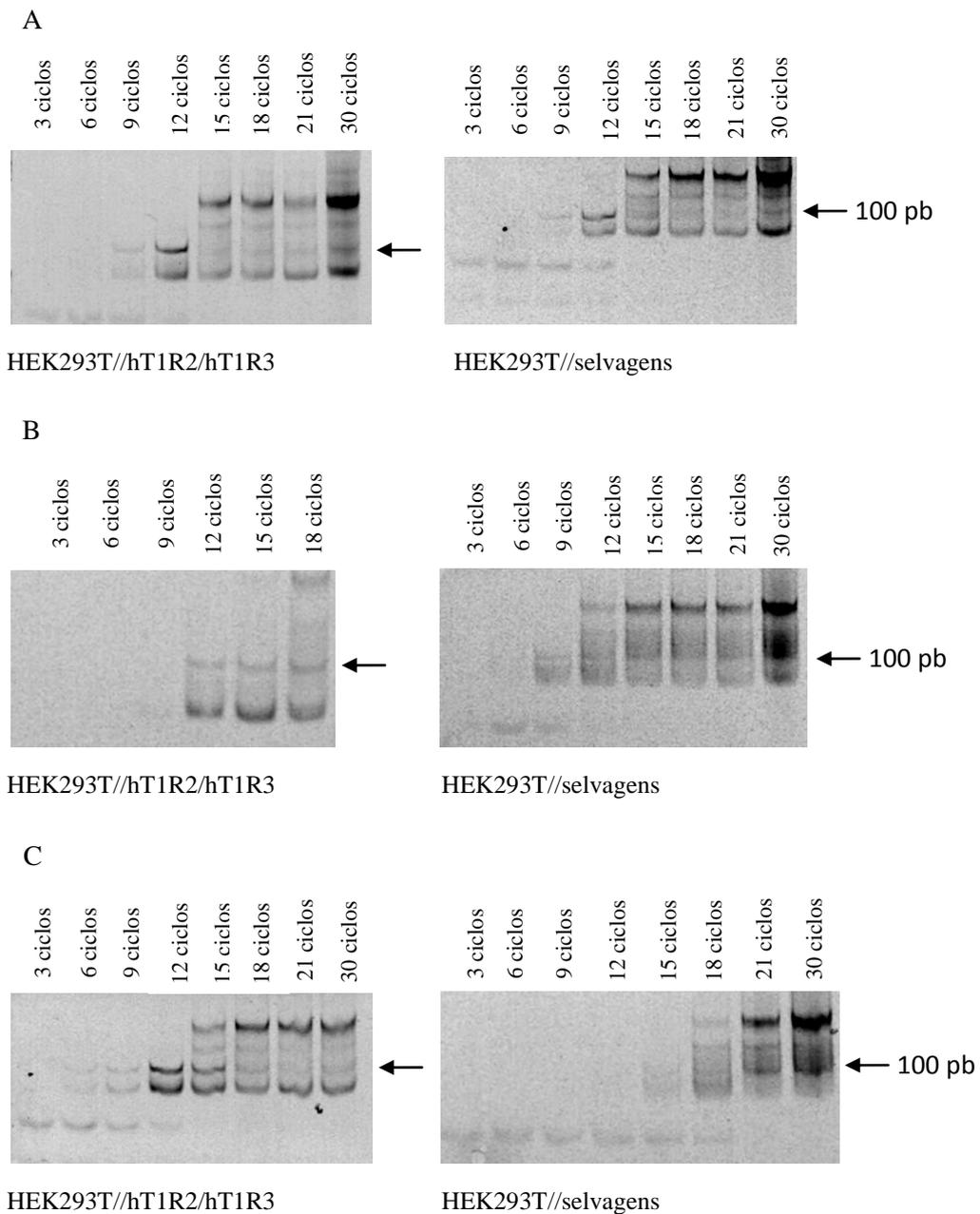


Figura 4.10. RT-PCR semiquantitativa. Cerca de 1 pmol dos ciclos 7 (A), 9 (B) e 12 (C) de SELEX foram incubados por 40 minutos com células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 e que não expressam hT1R2/hT1R3. Após esse tempo, as células foram lavadas com tampão PBS e lisadas com SDS (1%) e citrato de sódio (100 mM). Os aptâmeros ligados foram extraídos, precipitados e solubilizados em água livre de RNase. Alíquotas de 5 μ L foram submetidas a transcrição reversa e a várias ciclagens de PCR. O experimento foi realizado três vezes.

Em seguida, calculamos a constante de dissociação (K_d) do *pool* de aptâmeros do ciclo 12. Para isso, realizamos um experimento de saturação do receptor, ou seja, medimos a ligação específica, no equilíbrio, de várias concentrações do *pool* de aptâmeros radiomarcados do ciclo 12 (Figura 4.11.A). Já que nesse experimento a sacarose (250 mM) foi utilizada como competidor para a medida de ligação específica, o valor de K_d obtido poderia indicar que o receptor humano para o gosto doce tem uma afinidade na faixa nanomolar ($K_d = 9,731 \pm 4,231$ nM) pelos aptâmeros do ciclo 12. (O K_d foi determinado com base na equação $Y = B_{max} \cdot X / [K_d + X]$, em que Y é o valor da ligação específica do radioligante ao receptor, X é a concentração do radioligante livre e K_d é a concentração em que 50 % dos receptores são ocupados pelo radioligante). Neste momento, só podemos considerar isso uma possibilidade, já que uma alta concentração de sacarose foi utilizada para deslocar os aptâmeros que se ligam ao sítio de ligação de sacarose no receptor para o gosto doce. Assim, poderia haver no ciclo 12 uma quantidade razoável de aptâmeros que se ligam a outros sítios e foram deslocados em razão de outras interações causadas por essa concentração elevada. Um experimento de ligação competitiva também foi realizado (Figura 4.11.B). Ele consistiu no seguinte: uma concentração fixa do *pool* de aptâmeros marcados radioativamente do ciclo 12 foi incubada com o alvo na presença de várias concentrações de ligante não marcado (sacarose), e a ligação específica foi medida. A constante de dissociação calculada para o ligante não marcado, K_i , foi determinada com base na equação de Cheng-Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973), $K_i = IC_{50} / 1 + (L / K_d)$, em que L é a concentração do radioligante usada no experimento, K_d é a constante de dissociação do radioligante, determinado nas mesmas condições do ensaio, e IC_{50} é a concentração do ligante não marcado que inibe em 50 % a ligação de um radioligante ao seu receptor (Motulsky, 1995-1996; Deupree and Bylund, 2002). K_i é quatro vezes o limiar de detecção de sacarose para esse receptor *in vivo*, que é aproximadamente 20 mM (Nelson *et al.*, 2001); em outras palavras, uma concentração de

sacarose quatro vezes maior do que o limiar de detecção é necessária para deslocar metade dos aptâmeros ligados do ciclo 12. Infelizmente, o intervalo de confiança de 95 % para o K_i (Figura 4.11.B) é muito grande, o que também pode ser explicado pelo fato de que uma alta concentração de sacarose teve de ser usada (o limiar de detecção de sacarose para esse receptor, *in vivo*, já é bastante elevado, na faixa do milimolar). Isso pode ter afetado a estabilidade do receptor e sua interação com os aptâmeros.

4.4. Caracterização dos aptâmeros do ciclo 12

O passo seguinte foi analisar as sequências dos aptâmeros do ciclo 12 e procurar motivos conservados. O *pool* desse ciclo foi clonado, e 105 clones, sequenciados. As sequências da região randômica dos aptâmeros foram então analisadas com o software MEME, que foi ajustado para buscar sequências de seis a dez nucleotídeos conservados. Selecionamos três motivos (denominados Classe 1, Classe 2 e Classe 3), que foram encontrados em mais de dez sítios. Suas respectivas expressões regulares consistem em: [UG]UGAAU[UA]C[CG][AG], GAAU[UAG][GA][UA][CU]C[CG] e U[UG][CG]G[AC][CA][UA]C[CA]A. Na Figura 4.12, temos representações dessas expressões obtidas no site WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>), da universidade de Berkeley, e nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3, os aptâmeros e suas respectivas classes.

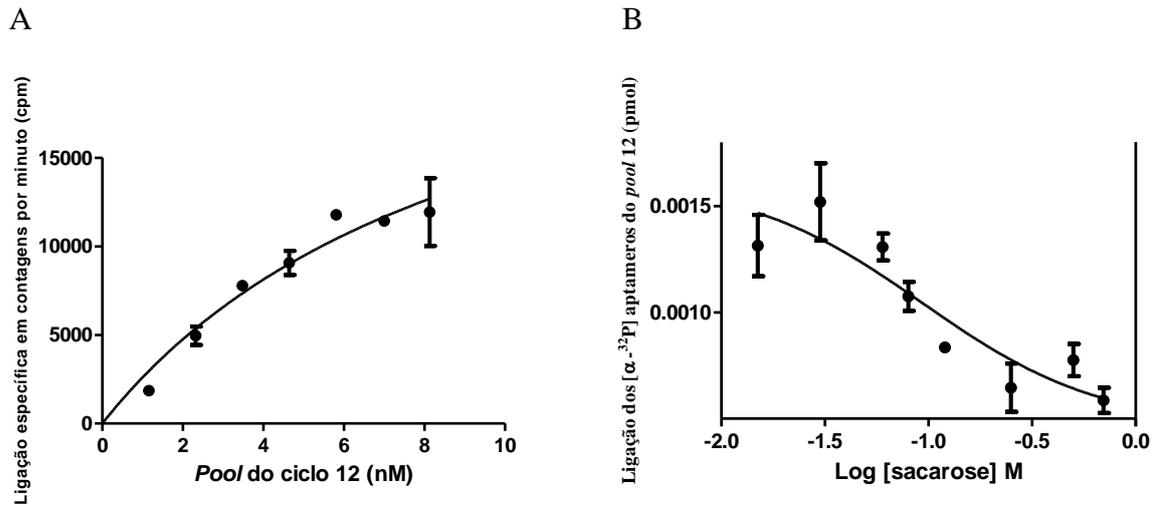
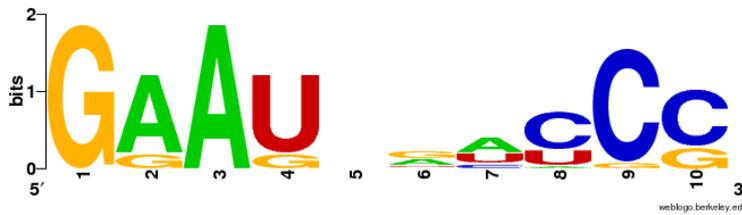


Figura 4.11. Saturação e ligação competitiva. (A) 10 ug de proteína da preparação de membrana de células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com várias concentrações de aptâmeros radiomarcados do ciclo 12. A ligação não específica foi determinada na presença de 250 mM de sacarose. $K_d = 9,731 \pm 4,231$ nM. (B) Células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com aptâmeros radiomarcados do ciclo 12 (1,2 nM) na presença de várias concentrações de ligante não marcado (0-700 mM de sacarose) em um volume total de 50 μ L de tampão de seleção. $K_i = 83,37$ mM (Intervalo de Confiança de 95 %: 8,4 mM a 827,1 mM). Cada ponto representa a intensidade média em cpm das medidas de radioatividade da ligação específica \pm E.P.M. de três experimentos independentes.

Classe 1



Classe 2



Classe 3

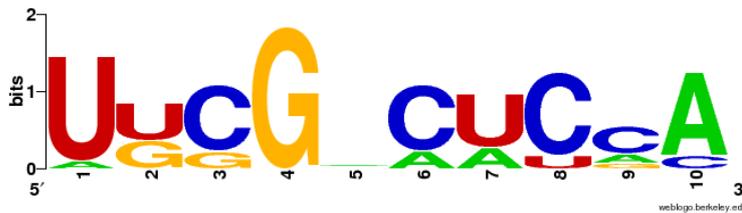


Figura 4.12. Representações em WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) das expressões regulares de cada classe. O tamanho da letra significa uma maior ou menor probabilidade de se encontrar um determinado nucleotídeo em uma posição específica do motivo.

Tabela 4.1. Lista de aptâmeros com motivo Classe 1. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde, na região randômica do aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos, em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências, que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).

Aptâmero	Início	Valor de p	Sítios		
77	6	7.50e-07	GAAUG	UUGAAUCCA	CCGGAA
12	9	2.28e-06	AAACAGAA	UUGAAUCCA	UCCCGGGCCA
109	2	3.33e-06	C	UUGAAUCCA	CAGUAAGUAA
6	25	5.16e-06	AUUAACUCCA	GUGAAUCCA	ACCAGA
60	8	2.47e-05	GAUCGCA	GUGAAUGCCA	GAA
99	5	2.80e-05	AAAG	UUGAAAUGCA	UCCAGAC
74	6	2.80e-05	GAAAG	UUGAAAUGCA	UCCAGAC
13	19	3.43e-05	AUAUAUGGAA	UUGAAUGACA	CCCCGGUUGA
79	5	4.15e-05	AGAA	UUGAAUAGGA	GUUUGUUA
2	14	4.15e-05	AAGCUGGCCU	UUGAAUAGCG	CUCCCU
112	25	6.37e-05	AGGCCAGCUC	UUGAGUUCGG	ACUAGA
37	28	6.37e-05	CCUGGUGUAG	UUGAAAACCG	G
48	19	6.86e-05	UUGAUGAUAU	UUGAAUGAGA	ACUGCCCGCC
91	3	7.55e-05	GA	GUGAAUACA	GGAACUGAGU
62	29	8.00e-05	AUGAUCGCAG	UGGAAUUCGG	CC
33	23	1.05e-04	AGGUGACGGU	GUGAAUUGGG	CCAAUGA

Tabela 4.2. Lista de aptâmeros com motivo Classe 2. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos, em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências, que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).

Aptâmero	Início	Valor de p	Sítios		
46	22	2.29e-05	AUGGGAAGUU	GAAUCAUCCC	AAAAGCAGA
54	1	4.71e-05		GAAUAGUCC	UCGACGCAGU
34	18	4.71e-05	CAGUAAAAGCC	GAAUGGACCG	UUCACUUCU
52	24	5.36e-05	GGUCCCAAU	GAAUCACCC	UAGAAGG
90	26	6.37e-05	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
78	26	6.37e-05	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
39	29	6.37e-05	ACUCGCGUAU	GAAUAGACCG	GG
90	5	8.00e-05	AUUU	GGAUGGACCC	GAUACAGAAA
78	5	8.00e-05	AUUU	GGAUGGACCC	GAUACAGAAA
53	5	8.00e-05	GGUG	GAAUUAUCCG	GAGAAUCAA
31	1	8.00e-05		GGAUUGAUCC	ACCCUUAAGA
15	11	9.11e-05	AAAACAAAAU	GAAUUUCCG	UCUAUCAGAA
102	18	1.26e-04	UACAUCGCAG	GAAUUGAAC	GACCCUGCCA
88	23	1.43e-04	CACUAUGUGC	GAAUAACUCC	CGCACAGG
71	23	1.43e-04	CACUAUGUGC	GAAUAACUCC	CGCACAGG
9	9	1.88e-04	GCAUGACU	GAAGUUUCCC	UGAUCACAGA
87	3	2.88e-04	AG	GAAUGGACCG	AGGAGGUUGU
40	7	3.63e-04	UUAUCC	GAAUCCUCCG	GCACAGAAGA

Tabela 4.3. Lista de aptâmeros com motivo Classe 3. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; a terceira mostra os valores de p , que são estimativas do número esperado de motivos, em logaritmo da razão da probabilidade dada (ou maior), com o mesmo tamanho e número de ocorrências, que seriam encontrados em um conjunto de sequências aleatórias de tamanho similar; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).

Aptâmero	Início	Valor de p	Sítios		
1	25	6.33e-06	CGCUCAAAAAG	UUGGACUCCA	UCAGA
53	53	8.39e-06	GGAGAGAGAG	UUCGAAUCCA	GACCAAAUUC
32	28	1.15e-05	GGAAAAAGAA	UUCGCCACCA	GA
19	28	1.15e-05	GGAAAUAGAA	UUCGCCACCA	GA
4	3	1.15e-05	UG	UGCGACUCAA	CUCUAAAAGU
87	27	1.83e-05	GGUUGUAGCC	UUCGCCUCGA	GCG
43	24	4.61e-05	UAGUAGGGAA	UGCGUCUUA	CCCUUC
41	24	4.61e-05	UAGUAGGGAA	UGCGUCUUA	CCCUUC
65	8	6.17e-05	AGCUGAA	AGCGACUCCA	UCUAAAAGGUG
85	28	6.79e-05	AAGAAUUCAU	UGCGAAACCA	UGA
75	28	6.79e-05	AAGAAUUCAU	UGCGAAACCA	UGA
61	2	1.10e-04	A	UUGGGCUCAA	UCCCGAAAAG
55	6	1.10e-04	GUUGU	UUCGGCUCAC	UAACGAGCUG
39	15	1.78e-04	AGUCCUGGAU	UUGGACUCGC	GUAUGAAUAG

Aptâmeros individuais de cada classe foram selecionados com base em sua similaridade com o motivo consenso (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Aptâmeros selecionados do Ciclo 12. As três classes contêm dez ou mais aptâmeros diferentes. A primeira coluna refere-se ao número do clone que foi sequenciado; a segunda refere-se ao logotipo da sequência conservada; a terceira indica onde no aptâmero, a partir da extremidade 5', o motivo conservado começa; e a quarta mostra o trecho da região randômica do aptâmero em que o software encontrou a sequência conservada (em cor).

Aptâmero	Motivo	Início	Sítios		
109		2	C	UUGAAUACCA	CAGUAAGUAA
13		19	AUAUAUGGAA	UUGAAUGACA	CCCCGGUUGA
46		22	AUGGGAAGUU	GAAUCAUCCC	AAAAGCAGA
9		9	GCAUGACU	GAAGUUUCCC	UGAUCACAGA
90		26	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
85		28	AAGAAUUCAU	UUCGAAACCA	UGA
19		28	GGAAAUAGAA	UUCGCCACCA	GA

Esses aptâmeros (Tabela 4.4) foram marcados radioativamente e avaliados quanto à ligação total com células HEK293T que expressam e células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3. Verificou-se que alguns aptâmeros (9, 46 e 90, que são aptâmeros classe 2, e 85 e 19, que são classe 3) apresentaram maior afinidade por células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 do que por células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3 (Figura 4.13). Aptâmeros de classe 1 (109 e 13), por outro lado, não apresentaram esse comportamento. O aptâmero 25 foi selecionado aleatoriamente (entre aqueles nos quais o software MEME não identificou nenhum motivo conservado) e usado como controle. Vemos, na Figura 4.13, que

são praticamente iguais os valores de ligação total do aptâmero 25 com células HEK293T que expressam e células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3. Apesar de os aptâmeros de classe 1 e de classe 2 compartilharem uma sequência (GAAU), eles são claramente diferentes com relação à ligação ao alvo (Figura 4.13). Além disso, os aptâmeros nos quais o motivo Classe 1 foi identificado diferem dos aptâmeros nos quais o motivo Classe 2 foi identificado (Tabelas 4.1 e 4.2).

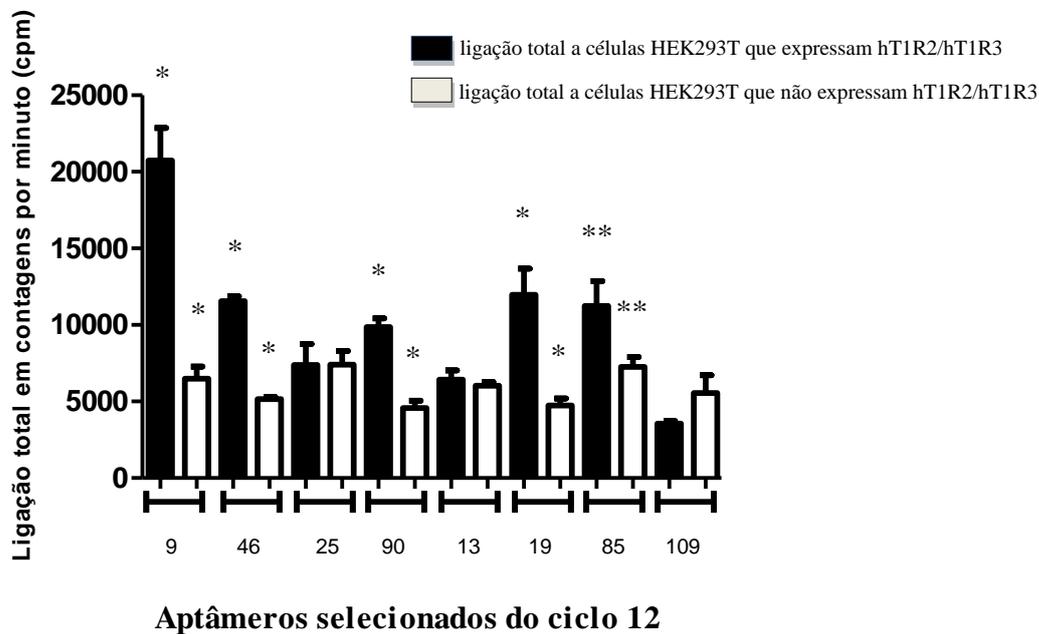


Figura 4.13. Ligação total de aptâmeros selecionados. Aptâmeros do ciclo 12 de cada classe foram selecionados com base em sua similaridade com a sequência consenso. Células HEK293T que expressam e células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3 foram incubadas com esses aptâmeros marcados (1 nM) num volume total de 50 μ L de tampão de seleção (PBS). As células foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com SDS 1% e 100 mM de citrato de sódio, e a radioatividade ligada, medida. Os dados correspondem à intensidade média em cpm das medidas de radioatividade da ligação total \pm E.P.M. de dois experimentos independentes; * $p < 0,005$ e ** $p < 0,05$.

Para melhor analisar a capacidade de ligação desses aptâmeros individuais, ensaios de *gel-overlay* foram realizados. Nesses experimentos, verificamos que os aptâmeros 90 e 85 se ligam a proteínas presentes apenas nos extratos preparados a partir de células que expressam hT1R2/hT1R3, ao passo que o 109 se liga a proteínas presentes apenas nos extratos preparados a partir de células que não expressam hT1R2/hT1R3 (Figura 4.14). Embora os aptâmeros 9, 19 e 46 tenham mostrado uma afinidade preferencial por células que expressam hT1R2/hT1R3, como mostrado na Figura 4.13, nenhuma banda associada a ligação desses aptâmeros foi detectada em nenhum dos extratos celulares (Figura 4.14). O aptâmero 25 se liga a ambos os extratos, com padrões de banda semelhantes. Esses resultados estão de acordo com os resultados de ligação mostrados na Figura 4.13, exceto pelo fato de que os aptâmeros 9, 46 e 19 não se ligam a qualquer preparação de membrana. Uma possível explicação é que o ensaio de *gel-overlay* requer que as preparações de membrana sejam submetidas a um tampão de amostra, que contem ditionotreitól (DTT). Esse reagente pode afetar as estruturas secundária e terciária das proteínas do receptor para o gosto doce, pois ele quebra ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto. A perturbação da conformação nativa das proteínas hT1R2 e hT1R3 pode dificultar a ligação desses aptâmeros. Além disso, nos experimentos de ligação total, foram utilizadas células, proporcionando um ambiente "natural" para o receptor, que foi de algum modo reproduzido no processo de seleção.

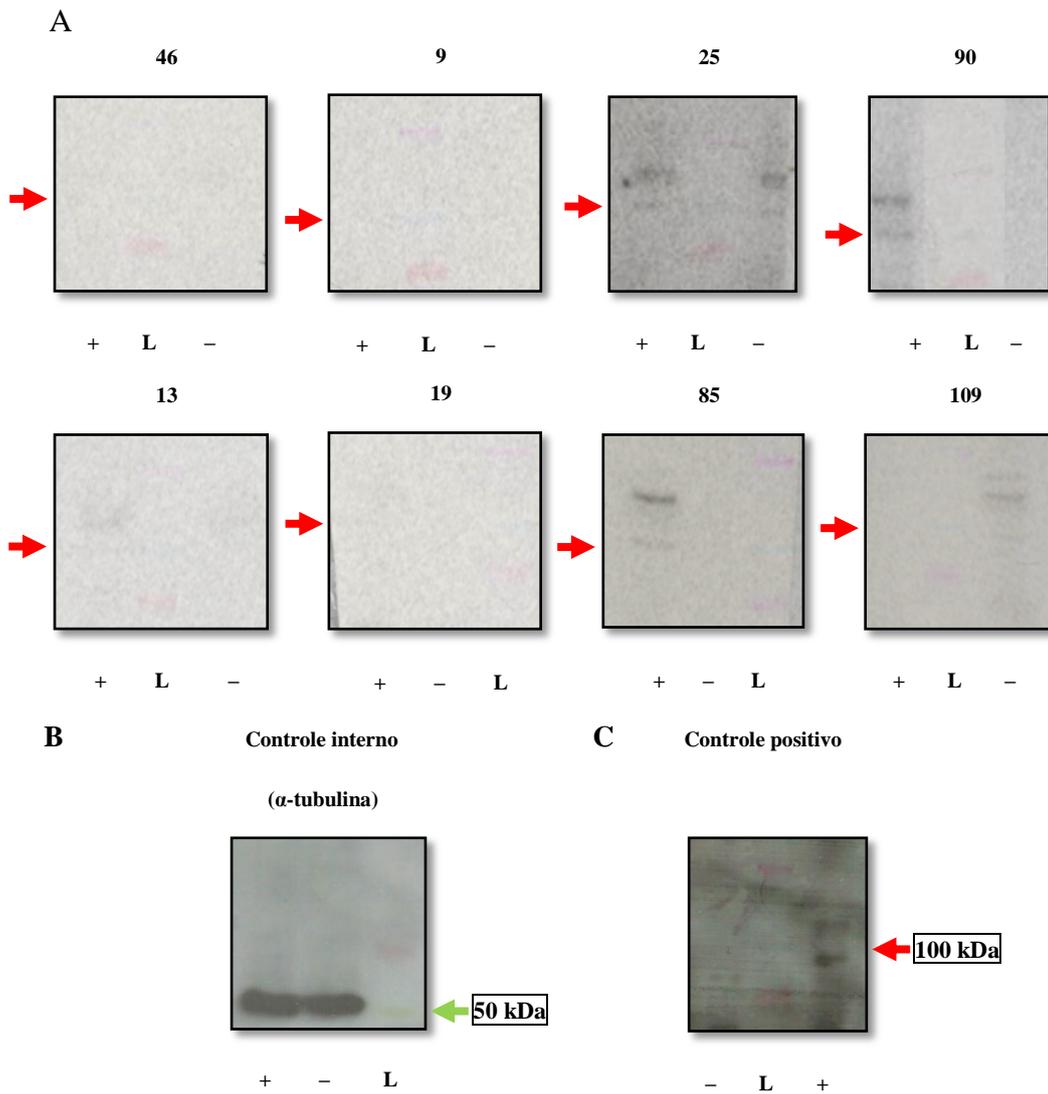


Figura 4.14. Ensaio de *gel-overlay* e *Western blot*. As preparações de membrana (cerca de 10 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, e as proteínas separadas foram transferidas para membranas de PVDF. Essas membranas foram incubadas com os aptâmeros radiomarcados, selecionados do ciclo 12 (A). O controle interno do *Western blot* foi feito com α -tubulina (B). O controle positivo (C) é semelhante ao *Western* mostrado na Figura 4.1, em que foi utilizado anti-FLAG. O sinal "+" refere-se a preparações de membrana que expressam hT1R2/hT1R3; o sinal "-", a preparações de membrana de células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3; a seta verde, à banda de α -tubulina; a seta vermelha, à banda azul clara do peso molecular que corresponde à 100 kDa; e "L" é o padrão de proteínas *Protein Spectra*TM *Multicolor Broad Range* (Fermentas).

Neste momento, pode-se supor que os motivos das classes 2 e 3 exercem alguma influência sobre a ligação dos aptâmeros selecionados do ciclo 12. Para avaliar isso, as estruturas secundárias desses aptâmeros foram previstas por um algoritmo que se baseia na minimização da energia livre, o programa Mfold (Zuker, 2003). A estrutura secundária é constituída de subestruturas, cujas energias livres são somadas. O cálculo dessas energias livres se baseia em tabelas que contêm parâmetros derivados de investigações cinéticas e termodinâmicas de compostos modelos (Schuster, 2006). Espera-se, normalmente, que os motivos conservados estejam em grampos ou alças, em regiões que interajam com o receptor. Esse tipo de programa gera estruturas secundárias subótimas e ótimas termodinamicamente, trata-se de uma ferramenta de busca por regiões em uma sequência dada de nucleotídeo que sejam potencialmente importantes para interações, por exemplo. Entretanto, é preciso ter em mente que o Mfold, por trabalhar com modelos, tem de ignorar alguns aspectos das condições experimentais reais. As previsões de estrutura secundária são feitas considerando que as moléculas estão dissolvidas em uma solução de NaCl 1M. Nossos experimentos foram feitos com aptâmeros dissolvidos em uma solução mais complexa (PBS); além disso, eles possuem nucleotídeos modificados (2'-F-CTP e 2'-F-UTP foram utilizados nas reações de transcrição), e isso não é levado em conta pelo programa. Posto isso, o algoritmo pode ser utilizado, basta não esquecer que as estruturas são aproximações. Na Figura 4.15, vemos as estruturas de quatro aptâmeros previstas pelo Mfold. É possível notar claramente que elas diferem e que os motivos estão localizados em regiões específicas dos aptâmeros Classe 2 (Figura 4.15.A) e Classe 3 (Figura 4.15.B): em uma região de grampo e uma de grampo/alça, respectivamente. O fato de esses dois motivos serem conservados nessas regiões específicas sugere que elas podem ser importantes para a ligação e a especificidade desses aptâmeros.

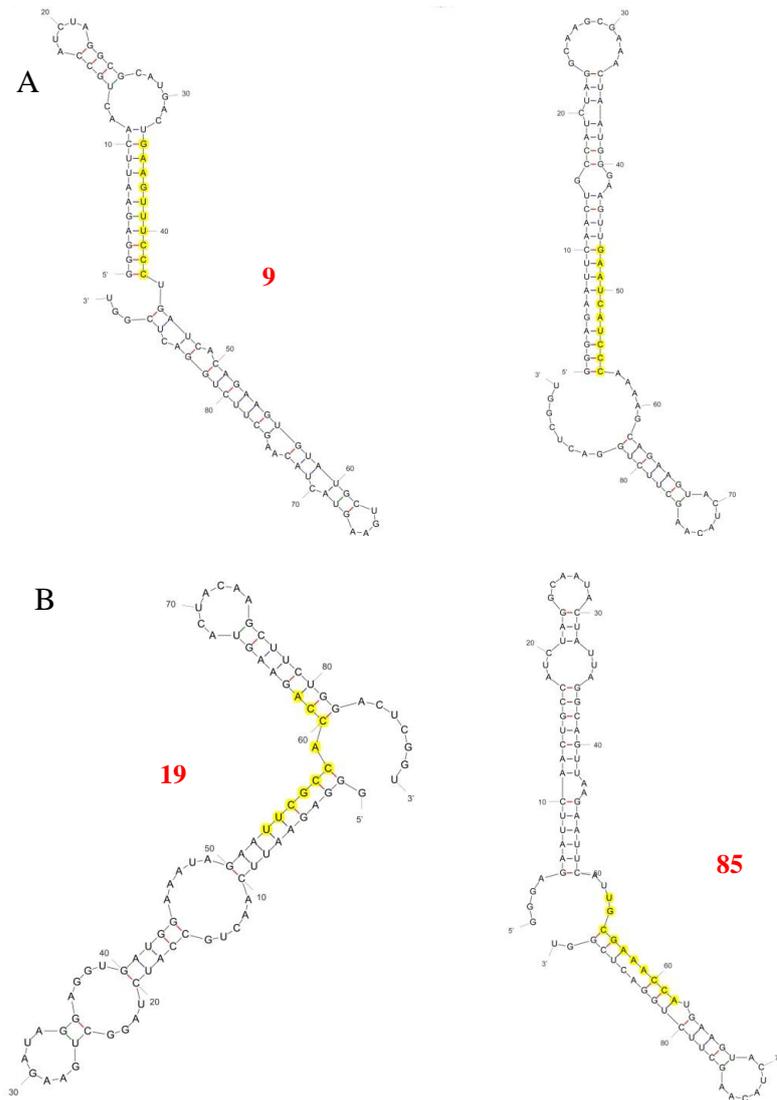


Figura 4.15. Previsão do algoritmo Mfold sobre a estrutura dos aptâmeros de RNA. (A) Aptâmeros Classe 2 (9 e 46). (B) Aptâmeros Classe 3 (19 e 85). As ilustrações representam previsões de estruturas com menor energia livre. A localização dos motivos consenso nos aptâmeros é mostrada em amarelo.

4.5. Imunofluorescência para determinação da localização de CD36 em cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo

Para avaliar se a glicoproteína CD36 está presente no epitélio olfatório de mamíferos, realizamos um ensaio de imunofluorescência com marcação dupla de cortes frescos de

epitélio olfatório de camundongo KO para CD36 e WT utilizando anticorpos primários para CD36 e α -tubulina acetilada. A α -tubulina acetilada está presente em várias estruturas de microtúbulos e exerce um papel na estabilização dessas estruturas. Nos neurônios olfatórios do epitélio olfatório, ela está principalmente localizada nos cílios, onde estão os receptores olfatórios. O anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada marca, portanto, os cílios dos neurônios olfatórios. Na Figura 4.16, é possível observar que a marcação para a proteína CD36 se sobrepõe (*merge*) à marcação para α -tubulina acetilada. CD36 deve estar, portanto, localizada nos cílios dos neurônios olfatórios. Não se observa qualquer marcação no corte de camundongo KO, o que era esperado, já que o camundongo KO para CD36 não deve ter a proteína CD36. Na Figura 4.17, temos os controles da imunofluorescência, que confirmam a eficácia da técnica. A presença de CD36 nos cílios do epitélio olfatório não significa que essa glicoproteína tenha uma função receptora, mas trata-se de um ponto de partida para que se avalie essa possibilidade.

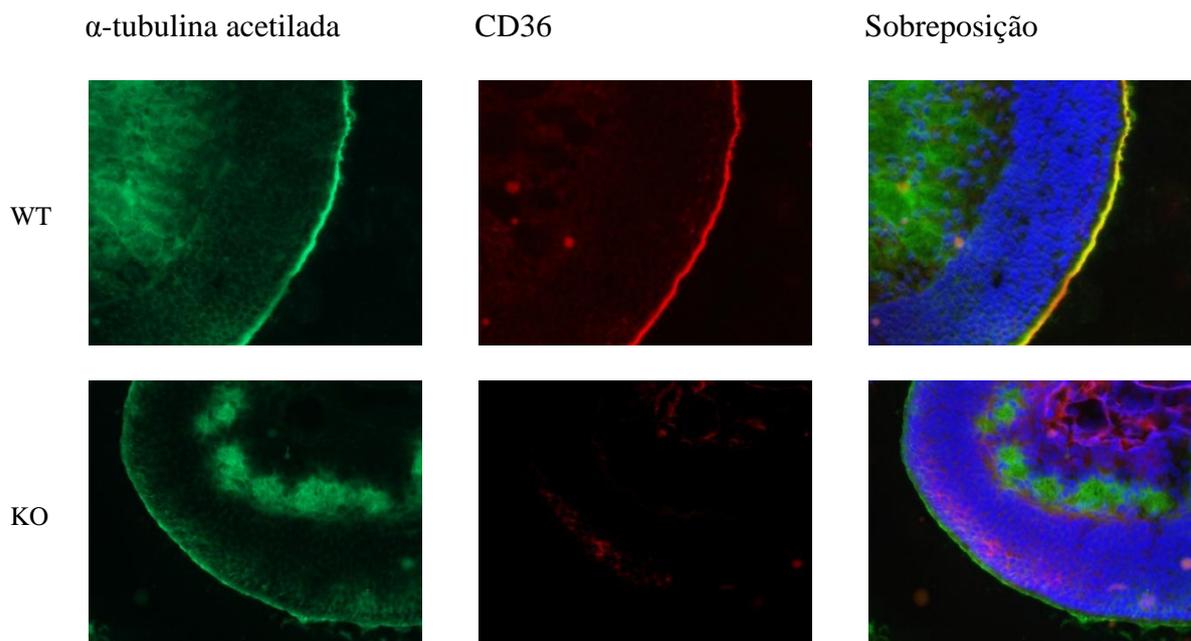


Figura 4.16. Imunofluorescência com marcação dupla de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo *knockout* (KO) e selvagem (WT). Primeira coluna, marcação com anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal e anticorpo secundário *Alexa Fluor*[®] 488 *Goat Anti-Rabbit IgG* para cortes de camundongos WT e KO. Segunda coluna, marcação com anticorpo primário monoclonal anti-CD36 *mouse* e anticorpo secundário *Alexa Fluor*[®] 546 *Goat Anti-Mouse IgG* para cortes de camundongos WT e KO. Terceira coluna, sobreposição (merge).

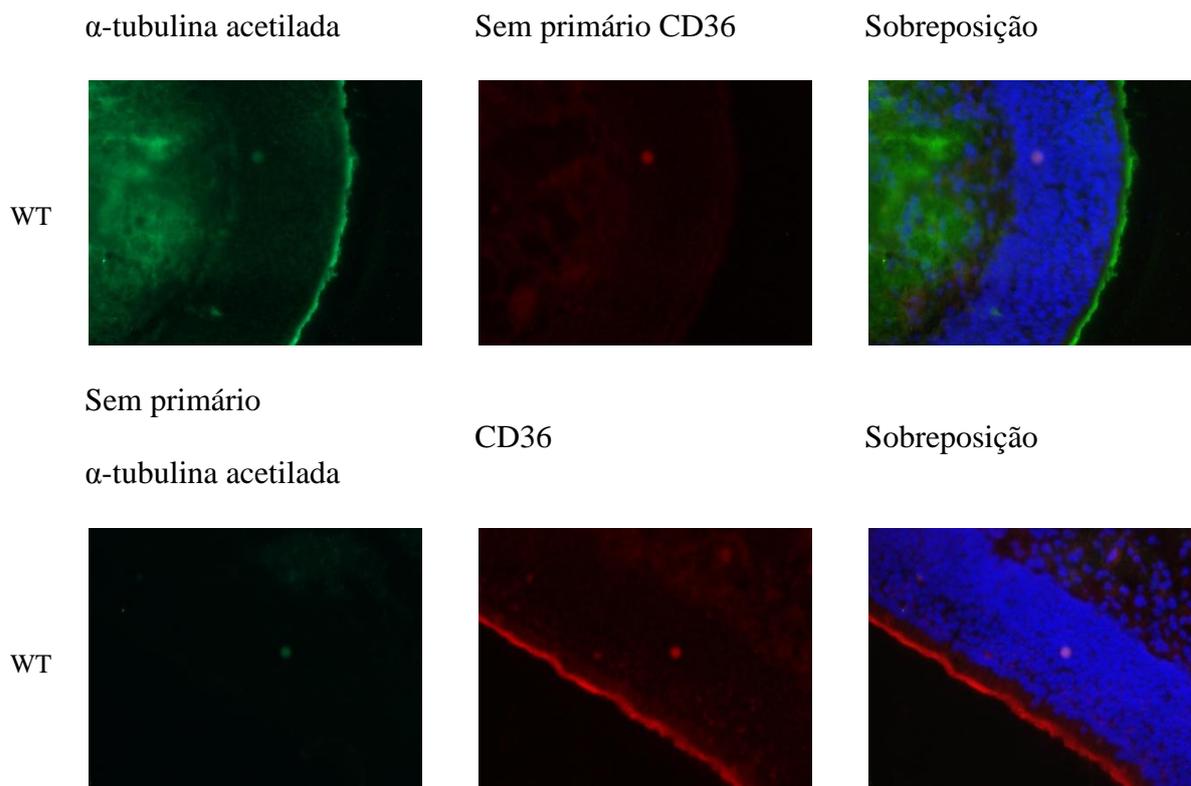


Figura 4.17. Controles da imunofluorescência. Primeira linha, imunofluorescência de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo selvagem (WT), conforme Figura 4.16, porém sem anticorpo primário monoclonal anti-CD36 *mouse*. Segunda linha, imunofluorescência de cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo selvagem (WT), conforme Figura 4.16, porém sem anticorpo primário anti- α -tubulina acetilada *rabbit* monoclonal.

DISCUSSÃO

5. Discussão

A língua contém quatro tipos de papilas, três das quais – as circunvaladas, as foliáceas e as fungiformes – contêm botões gustativos, que são estruturas em forma de cebola preenchidas com em torno de 100 células associadas à percepção do gosto. Estas são classificadas anatomicamente em quatro tipos. As de tipo II contêm os receptores para o gosto doce, amargo e *umami* (Yamolsky *et al.*, 2009). Foram quase sete décadas até que os genes que codificam esses receptores fossem identificados.

O gosto doce é “sentido” por meio dos GPCRs heterodiméricos codificados pelos genes TAS1R2 e TAS1R3 (NCBI). O papel desses receptores na mediação da percepção do doce foi revelado por uma série de estudos (Nelson *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.* 2001; Max *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Damak *et al.*, 2003). A capacidade de formar oligômeros parece ser uma propriedade geral de outros GPCRs envolvidos na sensação química (Kuhn *et al.*, 2010). No caso do receptor para o gosto doce, ainda não está completamente clara a razão de ele ser um heterodímero (T1R2/T1R3). Sabe-se que as consequências funcionais da hetero-oligomerização são bem variadas: maturação de proteínas e seu transporte para a membrana plasmática, variação do caminho de sinalização, internalização, alteração da afinidade de ligantes e cooperação positiva ou negativa de ligação (Romano *et al.*, 1996; Cvejic and Devi, 1997; Bai *et al.*, 1998; Jordan and Devi, 1999; Robbins *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010). Foi demonstrado que, para T1R2/T1R3, uma das possíveis consequências funcionais é a detecção de moléculas de grande diversidade química (Behrens *et al.*, 2011). Experimentos utilizando quimeras e mutantes do receptor para o gosto doce e estudos de modelagem molecular mostraram que há, no mínimo, cinco sítios de ligação nesse heterodímero. Resíduos no VFTM de hT1R2 estão implicados na ligação de adoçantes artificiais, enquanto outros resíduos no VFTM de hT1R2 e de hT1R3 são importantes para a

ligação de açúcares naturais. O adoçante ciclamato e o lactisole, um inibidor de percepção de doce, atuam no domínio transmembrana de hT1R3, já o adoçante SWT819, no domínio transmembrana de hT1R2. Por fim, a proteína doce brazeína ativa o receptor ao se ligar ao domínio rico em cisteína de hT1R3 (Zhang *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004 e 2005; Cui *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2005; Winning *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Assim, ao contrário dos receptores olfatórios (Buck and Axel, 1991; Malnic *et al.*, 2004), temos um único receptor para vários tipos de ligante (proteínas, mono e dissacarídeos, D-aminoácidos etc.). Mas como se organizam esses sítios de ligação e como eles se articulam? Variações nos genes TAS1R2 e TAS1R3 que resultem em mudanças estruturais nos sítios de ligação do receptor estariam associadas à variabilidade populacional quanto à percepção de substâncias doces (particularmente quanto à sensibilidade à sacarose) (Fushan *et al.*, 2009)? Para tentar entender melhor como se dá a interação entre a sacarose e o receptor humano para o gosto doce, utilizamos a técnica de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial, ou SELEX (Tuerk and Gold, 1990).

O método SELEX tem sido utilizado para a seleção de moléculas de RNA ou DNA (aptâmeros) – a partir de uma biblioteca de oligonucleotídeos sintetizados de modo combinatório – que se liguem com alta afinidade a uma variedade de alvos (Bock *et al.*, 1992; Ulrich *et al.*, 1998; Ulrich, 2005; Huang *et al.*, 2007; Barfod *et al.*, 2009; Esposito, *et al.*, 2011; Aquino-Jarquín and Toscano-Garibay, 2011). Os aptâmeros são solúveis em água e formam estruturas terciárias específicas que lhes conferem especificidade de ligação e afinidade na faixa de nanomolar e que lhes permite discriminar alvos bastante semelhantes (Ulrich, 2005). A interação entre aptâmero e alvo é comparável a entre anticorpo e antígeno, envolvendo ligações de hidrogênio, complementaridade eletroestática, ligações hidrofóbicas, impedimentos estéricos etc. (Ulrich, 2005; Stoltenburg *et al.*, 2007; Aquino-Jarquín and Toscano-Garibay, 2011). Uma grande desvantagem desse método é a incerteza quanto ao

sucesso da seleção. Parâmetros inerentes dos aptâmeros podem ser afetados durante o processo, e não é possível julgar de antemão se o alvo é adequado, se haverá um enriquecimento bem sucedido contra esse alvo (boa “aptamerogenicidade”; Mayer, 2009).

Utilizamos a abordagem SELEX neste trabalho, visando a seleção de ligantes (aptâmeros de RNA) com alta afinidade e especificidade pelo sítio de ligação da sacarose no receptor hT1R2/hT1R3.

Para os ciclos de SELEX, utilizamos como alvo preparações de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano para o gosto doce. Utilizamos preparações de membrana com o intuito de preservar a conformação nativa das proteínas hT1R2 e hT1R3 (e, conseqüentemente, o sítio de ligação de sacarose), que constituem o receptor. A presença do receptor na membrana dessas células foi verificada mediante *western blot* e imunofluorescência (Figuras 4.1 e 4.2), e sua funcionalidade, por variação da concentração de cálcio intracelular livre (Figura 4.3). Ambas as proteínas possuíam epitopo FLAG, o que nos impediu de distingui-las nos ensaios de *western blot* e imunofluorescência. Acreditamos, entretanto, que os testes feitos com cada uma, individualmente, nos permitem afirmar que elas são, com efeito, expressas em HEK293T e estão localizadas na membrana. No ensaio funcional (Figura 4.3), não observamos uma resposta robusta das células que expressam o receptor ao adicionarmos sacarose para uma concentração final de 100 mM, mas é clara a diferença entre estas e as que não expressam hT1R2 e hT1R3. A falta de uma resposta intensa pode ter duas razões: (1) a transfecção das células com os plasmídeos contendo as regiões codificadoras de hT1R2 e hT1R3 não foi muito eficiente. No ensaio de imunofluorescência (Figura 4.2) nota-se que não há muitas células marcadas; (2) utilizamos uma concentração final de sacarose muito menor que a utilizada em outros estudos (Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003 e Xu *et al.*, 2004). É possível que a resposta observada por esses pesquisadores tenha sido superestimada, pois 250, 300 ou 500 mM de solução de sacarose resultam em

choque osmótico muito intenso, podendo levar muitas células à morte; conseqüentemente, ter-se-iam muitos falsos positivos.

Com o alvo caracterizado, realizamos doze ciclos de SELEX e quatro contrasseleções negativas para eliminar moléculas que se ligam inespecificamente a sítios distintos do alvo (Figura 4.8). Esse controle é extremamente importante, o ambiente em que o alvo se encontra é muito complexo (membrana de células HEK293T contendo outras proteínas, lipídeos etc.), são muitos os possíveis sítios de ligação para os aptâmeros. Na contrasseleção, apresentamos para o *pool* de aptâmeros todo o ambiente, ou seja, a preparação de membrana de células HEK293T sem o nosso alvo (hT1R2/hT1R3), e eliminamos os que ligam (outra contrasseleção é feita para eliminar os que ligam à membrana de nitrocelulose).

Efetuamos então testes para avaliar o grau de enriquecimento dos aptâmeros selecionados. O ensaio de ligação (Figura 4.9) nos permite afirmar que no ciclo 12 há mais aptâmeros se ligando à preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano para o gosto doce. Paralelamente, realizamos um ensaio de RT-PCR semiquantitativa (Figura 4.10). Apesar de certa imprecisão inerente à técnica, os dados são relativos e foram obtidos nas mesmas condições experimentais. Portanto, podemos dizer que de fato há um aumento, dos ciclos 7 ao 12, da quantidade de aptâmero que se liga à preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor. Observa-se também, na Figura 4.10.C, que há uma menor quantidade de aptâmeros do ciclo 12 (em comparação com os outros ciclos) se ligando à preparação de membrana de células HEK293T que não expressam o receptor. Esses experimentos indicam que houve enriquecimento.

O próximo passo foi a determinação da constante de dissociação (K_d) do *pool* do ciclo 12 e a constante de dissociação calculada (K_i) para o ligante não marcado (sacarose) em relação ao mesmo *pool*. Obtivemos um K_d na faixa de nanomolar (9,731 nM), ou seja, a afinidade dos aptâmeros do ciclo 12 é de fato alta. Como já foi dito na seção Resultados, o

valor calculado para o K_i (83,37 mM) significa que uma concentração de sacarose quatro vezes maior que o limiar de detecção do receptor para o gosto doce (que, *in vivo*, é de aproximadamente 20 mM; Nelson *et al.*, 2001) é necessária para deslocar metade dos aptâmeros ligados do ciclo 12. Contudo, o intervalo de confiança obtido foi demasiadamente alto, o que nos impede de concluir que a ligação entre o *pool* 12 e o nosso alvo (o sítio de ligação de sacarose no receptor humano para o gosto doce) é específica. Portanto, pode-se dizer que aptâmeros de RNA com alta afinidade pela preparação de membrana de células HEK293T que expressam o receptor humano para o gosto doce foram selecionados, mas não se pode afirmar que eles se ligam especificamente ao sítio de ligação de sacarose.

Consideremos algumas explicações possíveis. A afinidade baixa da sacarose pelo receptor hT1R2/hT1R3 (na faixa de milimolar) significa uma “pressão seletiva” baixa. Talvez uma quantidade maior de ciclos de SELEX fosse necessária para se chegar a um *pool* mais rico em aptâmeros específicos. Ademais, utilizamos dez vezes o limiar de detecção de sacarose *in vivo* para eluir os aptâmeros que se ligam especificamente ao alvo. Essa concentração (200 mM) é muito alta e pode ter afetado a conformação nativa das proteínas que compõem o receptor para o gosto doce. Há outra questão, verificamos que as células HEK293T expressam endogenamente a proteína hT1R2. Apesar de as HEK293T transfectadas com os vetores contendo as regiões codificadoras de hT1R2 e hT1R3 superexpressarem essas proteínas, a expressão endógena de hT1R2 pode ter prejudicado as contrasseleções, já que a sacarose (e esperaríamos que os aptâmeros específicos também) atua em resíduos no VFTM de hT1R2 e de hT1R3.

De qualquer forma, decidimos analisar o *pool* 12. Para isso, clonamos esses aptâmeros, selecionamos 105 clones e os sequenciamos. Em seguida, com auxílio do programa MEME, realizamos uma busca por motivos conservados na região randômica de 40 nucleotídeos e os organizamos em três classes. Apesar das sequências consenso das classes 1

e 2 apresentarem similaridades, os conjuntos de aptâmeros diferem bastante (Tabelas 4.1 e 4.2). Selecionamos aptâmeros de cada classe com base no grau de similaridade entre sua sequência conservada e as respectivas sequências consenso (Tabela 4.4). Medimos então a ligação total (e não a ligação específica, que é dada pela ligação total menos a ligação na presença de um competidor) entre os selecionados e células HEK293T que expressam e que não expressam hT1R2/hT1R3 (Figura 4.13). Os das classes 2 e 3 apresentaram maior afinidade pelas células com o receptor. Novamente, não podemos afirmar que essa afinidade é pelo sítio de ligação da sacarose (ou mesmo pelo receptor hT1R2/hT1R3), mas está claro que os aptâmeros 9, 46 e 90 (Classe 2) e os 85 e 19 (Classe 3) apresentaram maior afinidade por células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 do que por células HEK293T que não expressam hT1R2/hT1R3.

Em seguida, utilizamos outra abordagem, o ensaio de *gel-overlay* (Figura 4.14), para analisar a capacidade de ligação dos aptâmeros selecionados de cada classe (Tabela 4.4). Como mencionado na seção Resultados, esse experimento corroborou parcialmente os dados apresentados na Figura 4.13, provavelmente por causa do uso de tampão de amostra com DTT, que afeta em demasia as estruturas secundária e terciária das proteínas do receptor. O uso desse composto no tampão de amostra é fundamental para que se evite a formação de agregados (comuns quando se trabalha com GPCRs), que tornariam a eletroforese em gel de poliacrilamida impraticável. Mas o ditiotreitol também perturba ligações de hidrogênio e quebra pontes dissulfeto, e isso pode dificultar a ligação dos aptâmeros. Ademais, as condições em que os ensaios de *gel-overlay* e ligação total foram realizados diferiram bastante (uso de preparações de membrana no primeiro caso e de células em tampão PBS no segundo). É preciso salientar também que as bandas observadas na Figura 4.14 não parecem corresponder às bandas típicas do receptor hT1R2/hT1R3 observadas no ensaio de *western blot* (Figuras 4.1 e 4.14.C).

A análise das estruturas secundárias dessas moléculas de RNA (Figura 4.15), previstas pelo algoritmo Mfold, nos mostra que os motivos conservados estão localizados em uma região de grampo (no caso dos aptâmeros de Classe 2) e uma de grampo/alça (no caso dos aptâmeros de Classe 3). Apesar de essas estruturas serem previsões baseadas em modelos, é possível que o grampo e o grampo/alça sejam fundamentais para a interação entre essas moléculas de RNA e o sítio de ligação.

Em resumo, podemos afirmar o seguinte: aptâmeros do ciclo 12 com diferentes sequências apresentaram motivos conservados em regiões específicas e foram organizados em três classes diferentes. Alguns deles (os das classes 2 e 3) apresentaram maior afinidade por células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3. Talvez um ou alguns se liguem ao sítio de ligação de sacarose no receptor para o gosto doce. No entanto, experimentos adicionais – como, por exemplo, ensaios de variação da concentração de cálcio intracelular livre (Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003 e Xu *et al.*, 2004) – são necessários para confirmar essa hipótese. Testes qualitativos mostraram que células HEK293T que expressam hT1R2/hT1R3 respondem a alguns desses aptâmeros selecionados, mas alguns controles ainda precisam ser realizados para confirmar essa observação.

Por fim, buscamos determinar a localização da glicoproteína CD36 no epitélio olfatório de camundongos para avaliar se ela funciona como um receptor de “gordura”. Dados recentes sugerem que CD36 exerce um papel como quimiorreceptor de lipídeos em diversos tecidos e órgãos, incluindo as papilas gustativas e o hipotálamo de mamíferos e o epitélio olfatório da *Drosophila* (Martin *et al.*, 2011). Essa proteína e moléculas ortólogas reconhecem, com alta afinidade, ligantes exógenos tais como ácidos graxos de longa cadeia, feromônios derivados de ácidos graxos ou diglicerídeos microbianos (Hoebe *et al.*, 2005; Laugerette *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2007). Realizamos então um ensaio de imunofluorescência utilizando cortes frescos de epitélio olfatório de camundongo *knockout*

(KO) e selvagem (WT). As marcações observadas nas Figuras 4.16 e 4.17 nos dizem claramente que CD36 deve estar localizada nos cílios dos neurônios olfatórios. Esses dados não nos permitem afirmar, contudo, que essa proteína está localizada na membrana plasmática e exerce uma função quimiorreceptora (Martin *et al.*, 2011). Outros experimentos precisam ser realizados. Nosso laboratório, em parceria com o laboratório do prof. Dr. Isaías Glezer, iniciou a padronização de ensaios de hibridização *in situ* com dupla marcação. Futuramente, se mais dados corroborarem a função de CD36 como quimiorreceptor, ensaios funcionais podem ser executados para que ele seja “deorfanizado”, ou seja, para que sejam identificados seus ligantes específicos.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Utilizamos neste estudo a técnica SELEX para selecionar aptâmeros de RNA que se ligam especificamente ao sítio de ligação de sacarose no receptor humano T1R2/T1R3 para o gosto doce.

Após doze ciclos de SELEX e quatro contrasseleções para eliminar aptâmeros inespecíficos, selecionamos 105 sequências. Com auxílio do programa MEME, realizamos uma busca por motivos conservados na região randômica de 40 nucleotídeos dessas sequências e os organizamos em três classes. Conseguimos mostrar que houve enriquecimento da biblioteca original de aptâmeros e que o *pool* do ciclo 12 se liga a preparações de membrana de células HEK293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 com uma afinidade na faixa de nanomolar (9,731 nM). Mostramos também que alguns aptâmeros selecionados desse *pool* apresentam maior afinidade por células HEK293T que expressam o receptor hT1R2/hT1R3 do que por células HEK293T que não expressam o receptor hT1R2/hT1R3. Os de Classe 2 (9, 46 e 90) e os de Classe 3 (2, e 85 e 19) parecem ser bons candidatos para futuros ensaios funcionais. Acreditamos, entretanto, que para o alvo utilizado seria interessante realizar mais ciclos de SELEX, utilizando uma concentração menor de sacarose para eluir as moléculas que ligam ao sítio de ligação de sacarose.

SELEX é um procedimento cuja teoria é de fácil entendimento, mas sua execução não é trivial e exige que uma série de fatores seja considerada. A técnica tem se sofisticado continuamente, ampliando sua gama de aplicações. Aqui confirmamos que podemos utilizá-la, com ajustes, contra alvos cujos ligantes naturais, no caso sacarose, apresentem K_d alto.

Demos também início à caracterização de CD36 em epitélio olfatório de camundongos, que pode levar a sua identificação como quimiorreceptor de lipídeos. O estudo

do papel desempenhado por CD36 nos neurônios olfatórios poderá no futuro revelar uma nova função desempenhada pelo sistema olfatório principal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702.

Aquino-Jarquín, G., and Toscano-Garibay, J. D. 2011. RNA Aptamer Evolution: Two Decades of SELEction. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 9155-9171.

Bai, M., Trivedi, S., and Brown, E.M. 1998. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (36): 23605-23610.

Barfod, A., Persson, T., and Lindh, J. 2009. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitol Res* 105: 1557-1566.

Binkley, J., Allen, P., Brown, DM., Green, L., Tuerk, C., Gold, L. 1995. RNA ligands to human nerve growth factor. *Nucleic Acids Res* 23: 3198-3205.

Behrens, M., Meyerhof, W., Hellfritsch, C., and Hofmann, T. 2011. Sweet and *umami* taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angewandte Chemie* 50: 2220-2242.

Benton, R., Vannice, K.S., and Vosshall, L.B. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450: 289-295.

Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. 1992. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355: 564–566.

Bockaert, J., and Pin, J. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18: 1723-1729.

Bouchard, P.R., Hutabarat, R.M., and Thompson, K.M. 2010. Discovery and Development of Therapeutic Aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50: 237–257.

Bugaut, A., Toulmé, J.J., and Rayner, B. 2006. SELEX and dynamic combinatorial chemistry interplay for the selection of conjugated RNA aptamers. *Org Biomol Chem.* 4(22): 4082-8.

Buck, L., and Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.

Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, et al. 2010. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci.* 30: 8376–8382.

Cvejic, S., and Devi, L.A. 1997. Dimerization of the δ opioid receptor: Implication for a role in receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 26959-26964.

Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C., and Ryba, N.J.P. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100: 703-711.

Chandrashekar, J., Hoon, M., Ryba, N., and Zuker, C. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288-294.

Cheng, Y. and Prusoff, W. H. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22: 3099-108.

Cui, M., Jiang, P., Maillet, E., Max, M., Margolskee, R.F., and Osman, R. 2006. The Heterodimeric Sweet Taste Receptor has Multiple Potential Ligand Binding Sites. *Current Pharmaceutical Design* 12: 4591-4600.

Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y., and Margolskee, R. 2003. Detection of sweet and *umami* taste in the absence of taste receptor T1R3. *Science* 301: 850-853.

Degrace-Passilly, P., and Besnard, P. 2012. CD36 and taste of fat. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 15: 107-111.

Deupree, J.D., and Bylund, D.B. 2002. Basic principles and techniques for receptor binding. *Tocris. Reviews*: 18.

Djordjevic, M. 2007. SELEX experiments: New prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomolecular Engineering* 24: 179-189.

Dulac, C., and Axel, R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83: 195-206.

Ellington A.D., and Szostak J.W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.

Ellington A., and Pollard, J.D. 1998. Purification of oligonucleotides using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *in Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc. 2.12.1-2.12.7.

Esposito, C.L., Passaro, D., Longobardo, I., Condorelli, G., Marotta, P., Affuso, A., Franciscis, V., and Cerchia, L. 2011. A Neutralizing RNA Aptamer against EGFR Causes Selective Apoptotic Cell Death. *PLoS ONE* 6(9): 1-12.

- Fuller, J.L. 1974. Single-Locus Control of Saccharin Preference in Mice. *The Journal of Heredity* 65: 33-36.
- Fushan, A., Simons, C.T., Slack, J.P., Manichaikul, A., and Drayna, D. 2009. Allelic polymorphism within the *TAS1R3* promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Current Biology* 19: 1288-1293.
- Gaillard, D., Laugerette, F., Darcel, N., El-Yassimi, A., Passily-Degrace, P., Hichami, A., Khan, N.A., Montmayeur, J.P., and Besnard, P. 2008. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *The FASEB Journal* 22: 1458-1468.
- Gilbertson, T.A., Damak, S., and Margolskee, R.F. 2000. The molecular physiology of taste transduction. *Current Opinion in Neurobiology*, 10: 519-527.
- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., and Lancet, D. 2001. The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* 11: 685-702.
- Godfrey, P.A., Malnic, B., and Buck, L.B. 2004. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2156-2161.
- Hamm, J. 1996. Characterization of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries. *Nucleic Acids Res* 24: 2220-2227.
- Henquin, J-C. 2012. Do pancreatic (beta) cells “taste” nutrients to secrete insulin? *Science signaling* 5 (239): 1-4.
- Herrada, G., and Dulac, C. 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90: 763-773.

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zähringer, U., and Beutler, B. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433: 523-527

Homann M., and Göringer H.U. 1999. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 27: 2006-2014.

Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96: 541-551.

Huang, Z., Pei, W., Jayaseelan, S., Shi, H., and Niu, L. 2007. RNA Aptamers Selected against the GluR2 Glutamate Receptor Channel. *Biochemistry* 46: 12648-12655.

Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L. A., Benard, L. M. J., Osman, R., Max, M., and Margolskee, R.F. 2005. Identification of the Cyclamate Interaction Site within the Transmembrane Domain of the Human Sweet Taste Receptor Subunit T1R3. *J. Biol. Chem.* 280: 34296-34305.

Jiang P., Cui M., Zhao B., Liu Z., Snyder L.A., Benard L.M., Osman R., Margolskee R.F., and Max M. 2005. Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J. Biol. Chem.* 280: 15238–15246.

Jiang P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder L.A., Benard L.M., Margolskee R.F., and Max M. 2004. The Cysteine-rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 43: 45068–45075.

Jang, H-J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B-J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R.F., and Egan,

J.M. 2007. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *PNAS* 104, 38: 15069–15074.

Jordan, B.A., and Devi, L.A. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399:697-700

Kinnamon, S.C. 2011. Taste receptor signaling – from tongues to lungs. *Acta Physiol* 204: 158-168.

Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y., and Hino, A. 2001. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283: 236-242.

Kuhn, C., Bufe, B., Batram, C., and Meyerhof, W. 2010. Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 35(5): 395-406.

Laugerette, F., Passilly-Degrace¹, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J-P., and Besnard, P. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*. 115(11): 3177–3184.

Lee, S.W., and Sullenger, B.A. 1997. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. *Nat Biotechnol* 15: 41-45.

Lefkowitz, R. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nature Cell Biol*. 2: E133-E136.

Li, X., Li, W., Hang, H., Cao, J., Maehashi, K., Huang, L., Bachmanov, A., Reed, R., Legrand-Defretin, V., Beauchamp, G. et al. 2005. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLOS Genetics* 1: 27-35.

- Li, X., Inoue, M., Reed, D.R., Huque, T., Puchalski, R.B., Tordoff, M.G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G.K., and Bachmanov, A.A. 2001. High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mammalian Genome* 12: 13–16
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. 2002. Human receptors for sweet and *umami* taste. *PNAS* 99: 4692-4696.
- Liberles, S., and Buck, L. 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442: 645-650.
- Lindemann, B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219-225.
- Liu, B., Ha, M., Meng, X-Y., Khaleduzzaman, M., Zhang, Z., Li, X., and Cui, M. 2012. Functional characterization of the heterodimeric sweet taste receptor T1R2 and T1R3 from a New World monkey species (squirrel monkey) and its response to sweet-tasting proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 427(2): 431–437.
- Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., and Corsini, G.U. 2005. The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS Journal* 272: 2939–2946.
- Mairal, T., Özalp, V.C., Sánchez, P.L., Mir, M, Katakis, I., and O’Sullivan, C.K. 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 390: 989-1007.
- Malnic, B., Godfrey, P.A., and Buck, L.B. 2004. The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2584-2589.
- Martin, C., Chevrot, M., Poirier, H., Passilly-Degrace, P., Niot, I., Besnard, P. 2011. CD36 as a lipid sensor. *Physiology and Behavior* 105: 36-42.

Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K-i., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T., Ishiguro, M. 2012. Characterization of the Modes of Binding between Human Sweet Taste Receptor and Low-Molecular-Weight Sweet Compounds. PLoS ONE 7(4): e35380.

Matsunami, H., and Buck, L. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. Cell 90: 775-784.

Matsunami, H., Montmayeur, J-P., and Buck, L. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. Nature 404: 601-604.

Matsunami, H. and Montmayeur, J-P. 2002. Receptors for bitter and sweet taste. Current Opinion in Neurobiology 12: 366-371.

Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S., and Margolskee, R.F. 2001. *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *sac*. Nature genetics 28:58-63.

Mayer, G. 2009. The chemical biology of aptamers. Angew. Chem. Int. Ed. 48: 2672-2689.

Meyer, M., Hahn, U., and Rentmeister, A. 2011. Cell-Specific Aptamers as Emerging Therapeutics. Journal of Nucleic Acids. Volume 2011: 1-18.

Milligan, G. 2007. G protein-coupled receptor dimerisation: Molecular basis and relevance to function. Biochimica et Biophysica Acta 1768: 825-835.

Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G., and Carrillo, J.J. 2003. GPCR dimerisation. Life Sciences 74:181-188.

- Miura, H., Kusakabe, Y., Kato, H., Miura-Ohnuma, J., Tagami, M., Ninomiya, Y., Hino, A. 2003. Co-expression pattern of Shh with Prox1 and that of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene Expr Patterns* 3(4): 427-430.
- Mombaerts, P. 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat. Reviews Neuroscience* 5: 263-278.
- Motulsky, H. 1995-1996. The graphpad guide to analyzing radioligand binding data. Graphpad software Inc. p: 1-19.
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
- Nie, Y., Vignes, S., Hobbs, J.R., Conn, G.L., and Munger, S.D. 2005. Distinct Contributions of T1R2 and T1R3 Taste Receptor Subunits to the Detection of Sweet Stimuli. *Current Biology* 15: 1948–1952.
- Niimura, Y., and Nei, M. 2003. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *PNAS* 100: 12235-12240.
- Nieuwlandt, D., Wecker, M., Gold, L. 1995. In vitro selection of ligands to substance P. *Biochemistry* 34: 5651-5659.
- Park, P. S.-H., and Palczewski, K. 2005. Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. *PNAS* 102: 8793– 8794

- Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. 2001. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacology and Therapeutics* 92: 71-87
- Robbins, M. J., Ciruela, F., Rhodes, A., and McIlhinney, A. J. 1999. Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1 α . *Journal of Neurochemistry* 72: 2539-2547.
- Romano, C., Yang, W-L., and O'Malley, K. L. 1996. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (45): 28612-28616.
- Roper, S.D., Chaudhari, N. 2010. The cell biology of taste. *The Journal of Cell Biology*. 190 (3): 285-296.
- Ryba, N.J., and Tirindelli, R. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19: 371-379.
- Scott, K. 2005. Taste Recognition: Food for thought. *Neuron* 48: 455-464.
- Schuster, P. 2006. Mathematical models on RNA evolution, simulations in silico and concepts for in vitro selection. *The Aptamer Handbook, Functional Oligonucleotides and Their Applications*. Wiley-VCH verlag GmbH & Co. p. 29-45.
- Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X-Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., Brust, P., Brune, N., Dubois, G.E., Zoller, M., and Karanewsky, D.S. 2010. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *PNAS early edition*:1-6.
- Soukup, G.A., and Breaker, R.R. 1999. Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA* 5: 1308–1325.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B. 2007. SELEX – A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24: 381-403.

Temussi, P.A. 2006. The history of sweet taste: not exactly a piece of cake. *Journal of Molecular Recognition* 19: 188-199.

Temussi, P.A. 2009. Sweet, bitter and *umami* receptors: a complex relationship. *Cell Press* 34 (6): 296-302.

Tuerk, C., and Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.

Ulrich, H. 2006. RNA Aptamers: From Basic Science Towards Therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* 173: 305-326.

Ulrich, H. 2005. DNA and RNA aptamers as modulators of protein function. *Medicinal Chemistry* 1: 199-208.

Ulrich, H., Ippolito, J.E., Pagan, O.R., Eterovic, V.E., Hann, R.M., Shi, H., Lis, J.T., Eldefrawi, M.E., Hess, G.P. 1998. In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14051-14056.

Ulrich, H., Martins, A.H.B., and Pesquero, J.B. 2005. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Current Protocols in Cytometry* John Wiley and Sons, Inc. 7.28.1-7.28.39.

Ulrich, H., and Wrenger, C. 2009. Disease-Specific Biomarker Discovery by Aptamers. *Cytometry Part A (75A)*: 727-733.

Vandenbeuch, A., Clapp, T.R., and Kinnamon, S.C. 2008. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci* 9:1-13.

Vassilatis, D., Hohmann, J., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J., Mortrud, M., Brown, A., Rodriguez, S., Weller, J., Wright, A. et al. 2003. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *PNAS* 100: 4903-4908.

Villardaga, J-P., Agnati, L.F., Fuxe, K., and Ciruela, F. 2010. G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *Journal of Cell Science* 123 (24) 4215-4220.

Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M., Zoller, M., and Li, X. 2004. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *PNAS* 101: 14258-14263.

Yamolinsky, D.A., Zucker, C.S, and Ryba, N.J.P. 2009. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139: 234-244.

Yee, K., Sukumaran, S. K., Kotha, R., Gilbertson, T.A., Margolskee, R.F. 2011. Glucose transporters and ATP-gated K^+ (K_{ATP}) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1R3)-expressing taste cells. *PNAS*. 7 de Março (Epub ahead of print; www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100495108)

Young, J.M., C., F., Williams, E.M., Ross, J.A., Tonnes-Priddy, L., and Trask, B.J. 2002. Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum Mol Genet* 11: 535-546.

Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R. M., Lunzer, M. M., Sharma, S. K., Kostenis, E., Portoghese, P. S., and Whistler, J. L. 2005. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimmers. *PNAS* 102: 9050-9055.

Winnig, M., Bufe, B., and Meyerhof, W. 2005. Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neuroscience* 6: 22.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R.M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C., and Li, X. 2010. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. PNAS early edition: 1-6.

Zhang, X., Fitzsimmons, R.L., Cleland, L.G., Ey, P.L., Zannettino, A.C.W., Farmer, E-A., Sincock, P., and Mayrhofer, G. 2003. CD36/Fatty acid translocase in rats: Distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. Laboratory Investigation 83: 317-332.

Zhao, G., Y, Z., Hoon, M., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N., and Zuker, C. 2003. The receptors for mammalian sweet and *umami* taste. Cell 115: 255-266.

Zozulya, S., Echeverri, F., and Nguyen, T. 2001. The human olfactory receptor repertoire. Genome Biology 2: 18.11-18.12.

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 31 (13): 3406-3415.

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Tiago Jonas de Almeida

Local e data de nascimento: Salvador, BA, 04/04/1977

EDUCAÇÃO

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (2003)

Cooperativa Educar, Salvador, BA (1994)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Utilização de Enzimas na Indústria de Alimentos. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil (1996).

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, CNPq, 2008-2013.

Monitoria sob supervisão do Professor Eduardo Moraes 2010.2 – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Monitoria sob supervisão das Professoras Gláucia Souza e Aline Silva 2010.1 – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Monitoria sob supervisão do Professor Sandro Marana em 2009.2 – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

PUBLICAÇÕES

Resumos em Congressos

Almeida, T.J.; Martins, A.H.; Ulrich, H.; Malnic, B. 2011. Identificação de aptâmeros que se ligam aos receptores humanos para o gosto doce (T1R2/T1R3). XL reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, Foz do Iguaçu, Brasil.

Almeida, T.J.; Martins, A.H.; Ulrich, H.; Malnic, B. 2011. Identification of Aptamers that Bind to Human Sweet Taste Receptor (T1R2/T1R3). European Chemoreception Research Organization – ECRO XXI 2011 Annual Congress, Manchester, UK.

Screening for Aptamers that Bind to the Human Sweet Taste Receptor (hT1R2/hT1R3)

Almeida, T.J.¹; Martins, A.H.²; Davalos, M.¹; Ulrich, H.¹; Malnic, B.¹.

¹Dep. de Bioquímica, IQ, USP, SP, Brazil; ²Department of Biochemistry

Universidad Central del Caribe, Bayamon, Puerto Rico

Abstract

It has been shown that sweet taste is transduced by the Class III G Protein–Coupled Receptors (GPCRs) T1R2 and T1R3, which show long N-termini that form a globular extracellular ligand-binding domain. These receptors are expressed in the taste cells (epithelial cells that constitute the taste buds in taste papillae) that respond to sweet tastants. When T1R2 and T1R3 are coexpressed in heterologous cells, they respond, as heteromers, to a series of sugars, some D-amino acids, artificial sweeteners and sweet proteins. We used the combinatorial oligonucleotide library screening approach denominated Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) to isolate nuclease-resistant RNA aptamers that bind to the human sweet taste receptor with high affinity. Following a twelve round enrichment of the previous random RNA pool and negative counterselection cycles (to eliminate RNA molecules that bind nonspecifically to the nitrocellulose membrane and to proteins other than the target), the RNA was reverse-transcribed for DNA sequencing. Aptamers with consensus sequences were obtained. We then evaluated the binding of some of these aptamers to the Human Sweet Taste Receptor.

Introduction

All organisms are capable of detecting with great precision a wide variety of chemical stimuli. For the detection of external chemical signals, such as odorants, tastants and pheromones, there are chemosensorial G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) (1, 2). On the membranes of cells found in the tongue there are two GPCR families, denominated T1R and T2R (3–8). The

T2R family – whose receptors interact with molecules associated with bitter taste – is greater than the T1R one – whose receptors interact with molecules associated with sweet taste and *umami* (monosodium glutamate). In humans and mice, the latter is detected by three receptors that belong to the C Family of GPCRs, T1R1, T1R2 and T1R3 (7–9). T1R2 and T1R3 – when coexpressed in heterologous cells – form heteromers. They constitute the receptors for sweet taste, being responsive to sugars (sucrose, fructose, maltose, glucose), some D-amino acids, sweeteners (aspartame, saccharine, cyclamate, acesulfame K) and sweet proteins (monellin, thaumatin, curculin)(3). But how such different ligands can activate the same receptor (T1R2/T1R3) to produce the sensation of sweetness? Previous experiments confirmed the existence of several binding sites for ligands on the sweet taste receptor (12). Although all sites are not yet completely known, it is known that not only the long N-terminal extracellular domain but also the transmembrane (11–13) and the cysteine-rich (16) domains interact with ligands. Moreover, there are positive allosteric modulators of this receptor that intensify the sweet taste (14, 15).

T1R2/T1R3 knock-out mice are incapable of recognizing sweet substances (7). However, T1R2 knock-out mice can detect high concentrations of sweet substances, possibly because T1R3 acts as a receptor whose affinity for its ligands is low (17). The biological relevance of this observation in normal mice is, however, uncertain.

Humans and mice detect differently some of these sweet substances. Mice, for instance, cannot sense the taste of aspartame or monellin. This difference in detection capability is due to differences in the amino acid sequences of T1R2 and T1R3. Interestingly, cats and other felines show a natural deletion of the T1R2 gene, which explains the fact that these animals do not respond to sugars (18). Moreover, Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs, have recently been identified in the T1R3 gene promoter region, and this could explain the sweet perception variability among the human population (19).

It has been previously described the use of SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) to identify RNA/DNA oligonucleotides ligands (aptamers) that bind to a series of targets, including transmembrane proteins (20–24). SELEX is based on a reiterative process of *in vitro* selection cycles in which an initial pool of 10^{14} - 10^{15} of different combinatorially synthesized DNA or RNA molecules is reduced to a smaller pool of different molecules that have greater affinity towards the target in question (25–30). Nucleic acids, because of their primary structure, fold into complex three-dimensional structures; and this explains the different binding specificities. One way of evaluating the expected increase in pool affinity, after some cycles (whose number depends on the target), is to look for conserved motifs (31).

So far, it has not been shown if this technique is efficient when it is used a target whose affinity for its natural ligand is low. We aimed here to isolate RNA aptamers that bind specifically to the sucrose binding site (sucrose detection threshold are 20 mM *in vivo*) on the human sweet taste receptor heterodimer hT1R2/hT1R3.

Materials and Methods

Target Preparation. The sweet taste receptors (hT1R2 and hT1R3), cloned in pcDNA 5 FRT (Invitrogen), both FLAG-tagged, were kindly provided by Professor Wolfgang Meyerhof. These were transiently transfected into human embryonic kidney cells (HEK293T) using the lipofectamine 2000 transfection reagent protocol (Invitrogen). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a 37°C, 5% CO₂, humidified incubator. Forty-eight hours after transfection, plasma membranes from these cells, overexpressing the recombinant receptors, were prepared as described (32). Also, membranes from cells that do not express the receptor protein for negative counterselection were also prepared.

SELEX. The single strand DNA library was synthesized by Operon Biotechnologies Inc. (Ebersberg Germany, 1 μ mol synthesis scale). These oligonucleotides contain a random sequence of 40 nucleotides flanked on both sides by two constant regions (5'-ACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGT(N₄₀)GTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCAA CTGCCATCTA-3'), which are required for PCR amplification, *in vitro* transcription and cloning (see Figure 1). After large scale second-strand synthesis and amplification of the double-stranded DNA using error-prone PCR (32), this DNA pool was transcribed *in vitro*. In order to produce nuclease-resistant RNA molecules, 2'-F-pyrimidines were used for the *in vitro* transcription reaction. The reiterative selection cycles were done as described, using 250 mM sucrose as competitor. For the initial *in vitro* selection cycles, the ratio of RNA to estimated target protein was 1:20. The stringency was gradually increased until this ratio reached 7:10. Negative counterselections to eliminate RNA molecules binding to proteins other than the target and binding nonspecifically to nitrocellulose membrane were also performed as described (32).

Binding Assays. The affinity of the RNA pools from different cycles was measured by means of competition binding to the plasma membrane preparations containing the hT1R2 and hT1R3 receptors. The RNA samples were labeled with [α -³²P]ATP (Perkin Elmer) and purified on a S-30 spin column (Biorad), as described (32). Binding reactions contained a mixture of 10 μ g of protein (estimated by means of Bradford protein assay; Biorad), approximately 1 nM ³²P-labelled RNA and 0,3 μ g/mL yeast tRNA (as nonspecific competitor) in a total volume of 100 μ L selection buffer (Phosphate Buffered Saline – PBS). The fraction of nonspecific binding was determined in the presence of an excess of unlabeled RNA (\approx 50-fold excess amount of cold RNA) and of 100mM of sucrose. All binding reactions were carried out at room temperature for 40 min. These reactions were filtered using a filtration unit with nitrocellulose membrane. The filters were washed with 400 μ L selection

buffer, then transferred to vials containing 2 mL of scintillation fluid. The filter-bound radioactivity was measured by scintillation counting. The amount of filter-binding RNA was determined by mixing approximately 1 nM ^{32}P -labelled RNA and 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yeast tRNA in a total volume of 100 μL selection buffer (32).

For the saturation binding experiment, the specific binding of ^{32}P -labelled RNA aptamers from cycle 12 at various concentrations (approximately 1-8 nM) to the plasma membrane preparations with hT1R2 and hT1R3 receptors (10 μg of protein) was measured. The fraction of nonspecific binding was determined in the presence of an excess of sucrose (250 mM).

The affinity of some selected aptamers from cycle 12 was measured by means of total binding to hT1R2/hT1R3-expressing and non-expressing HEK293T cells. These cells – cultured in 96-wells plates according to standard methods (see, for instance, the Thermo Scientific HEK293T Cell Line protocol) – were transfected as described before. Forty-eight hours after transfection, the cells were washed with selection buffer and incubated for 40 min at room temperature with 1nM ^{32}P -labelled RNA aptamers in a total volume of 50 μL selection buffer. Then, the cells were washed twice with 50 μL PBS and incubated for 30 min with 1% sodium dodecyl sulfate and 100 mM sodium citrate. The disrupted cells from each well were transferred to vials containing 2 mL of scintillation fluid. The cells-bound radioactivity was measured by scintillation counting.

For the competitive binding experiment, hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells were incubated with 1.2 nM of ^{32}P -labelled RNA aptamers from cycle 12 in the presence of various concentrations of unlabeled ligand (0-700 mM sucrose) in a total volume of 50 μL selection buffer (PBS).

Immunofluorescence. HEK293T cells were plated in a 8-well glass chamber slide (Lab-Tek®, Naperville, IL) previously treated with 0,01% L-poly-lysine (SIGMA) and kept for 16-20 h under standard culture condition (without antibiotics). The cells were then transfected with

300 ng of total DNA per well using the lipofectamine 2000 transfection reagent protocol (Invitrogen). After 48h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4°C. The permeated cells were treated with 0,01% Triton for 5 min and washed with PBS. After incubation with blocking solution (5% Horse serum and 2% bovine serum albumin in PBS), the cells were incubated with primary antibody anti-FLAG M2 (SIGMA) diluted in 2,5% Horse serum and 1% bovine serum albumin in PBS (1:2000) for 2h at 4°C. After three 5 min washes with 500 µL PBS, the cells were incubated with secondary antibody anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546 diluted in 2,5% Horse serum and 1% bovine serum albumin in PBS (1:2000) for 1h at 4°C. Then, after three 5 min washes, cells were dyed with 0.1 mg/ml Hoechst for 5 min at room temperature. The slide was washed with 500 µL distilled water and mounted with 90% glycerol.

For colocalization of sweet taste receptor and purinergic receptor P2Y1 (an endogenous membrane protein), the primary antibodies were anti-FLAG M2 (SIGMA), diluted 1:2000, and Goat polyclonal Anti-P2Y1 (Santa Cruz # 15203), diluted 1:500, and the secondary, anti-mouse IgG Alexa-Fluor 546 and anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488, both diluted 1:300.

Western blot. The membrane preparations (approximately 10 µg) were mixed with sample buffer (50mM TrisHCL pH6.8; 100mM DTT; 2% SDS; 0,1% bromophenol blue; 10% glycerol) and submitted to polyacrilamide gel electrophoresis (8% polyacrilamide resolving gel and 4% polyacrilamide stacking gel). The separated proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF; Bio-Rad) membrane and dyed with 0,1% Ponceau. After being washed 3-4 times with H₂O milliQ, the membrane was blocked overnight with 5% skimmed milk TBS-T (Tris-buffered saline with 0.03% Tween) at 4°C. Then, the membrane was incubated with the primary antibody, mouse monoclonal Anti-FLAG (SIGMA), diluted 1:10000 in blocking solution, for 2h at room temperature. Incubation with the secondary antibody Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson

ImmunoResearch Laboratories Inc.), diluted 1:4000 in TBS-T, for 1h at room temperature followed a 5 min wash with TBS-T (four times). After washing again the membrane, the ECL plus system (Amersham Biosciences) was used for protein detection. Mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (Abcam) was used as the internal control.

Gel-overlay assay. The procedure is almost the same as the one described for western blot. The difference here is that the PVDF membrane is incubated with 200000 cpm of 32 P-labelled RNA (some selected aptamers from pool 12 and pools 5, 7, 9 and 12) instead of with antibodies. After one-hour incubation in selection buffer (PBS), the membrane is washed with PBS for 10 min (three times) and dried up. Autoradiographs were produced using phosphor imaging plates (protocol provided by the manufacturer, Fujifilm) and analyzed. The same amount of protein was used (approximately 10 μ g, estimated by means of Bradford protein assay; Biorad), and the exposure time was the same for all PVDF membranes.

Secondary RNA structure prediction. Selected RNA aptamers had their secondary structure predicted by the Mfold software. The program was run with defaults settings listed on the homepage from the RNA Institute at University at Albany, State University of New York. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>

Results and discussion

Here we have performed the SELEX procedure in order to screen for RNA aptamers that bind to the human sweet taste receptor hT1R2/hT1R3 (Figure 1). In order to do this, we used membrane extracts prepared from HEK293T cells expressing hT1R2/hT1R3 as target. Figure 2A shows a Western blot result for membrane preparations of HEK293T cells expressing the sweet taste receptor proteins (hT1R2 and hT1R3). A characteristic two-band pattern around 100 kDa is also seen when each protein is expressed separately in HEK293T cells (data not shown). Since both hT1R2 (95,2 kDa) and hT1R3 (93,5 kDa) have the FLAG epitope, we cannot distinguish them when they are co-expressed. But if each protein can be detected when

each plasmid is transfected separately, we can assume, therefore, that both proteins are expressed when both expression vectors are transfected. The two-band pattern is probably due to the different extent of glycosylation of these receptors in this cell line (33).

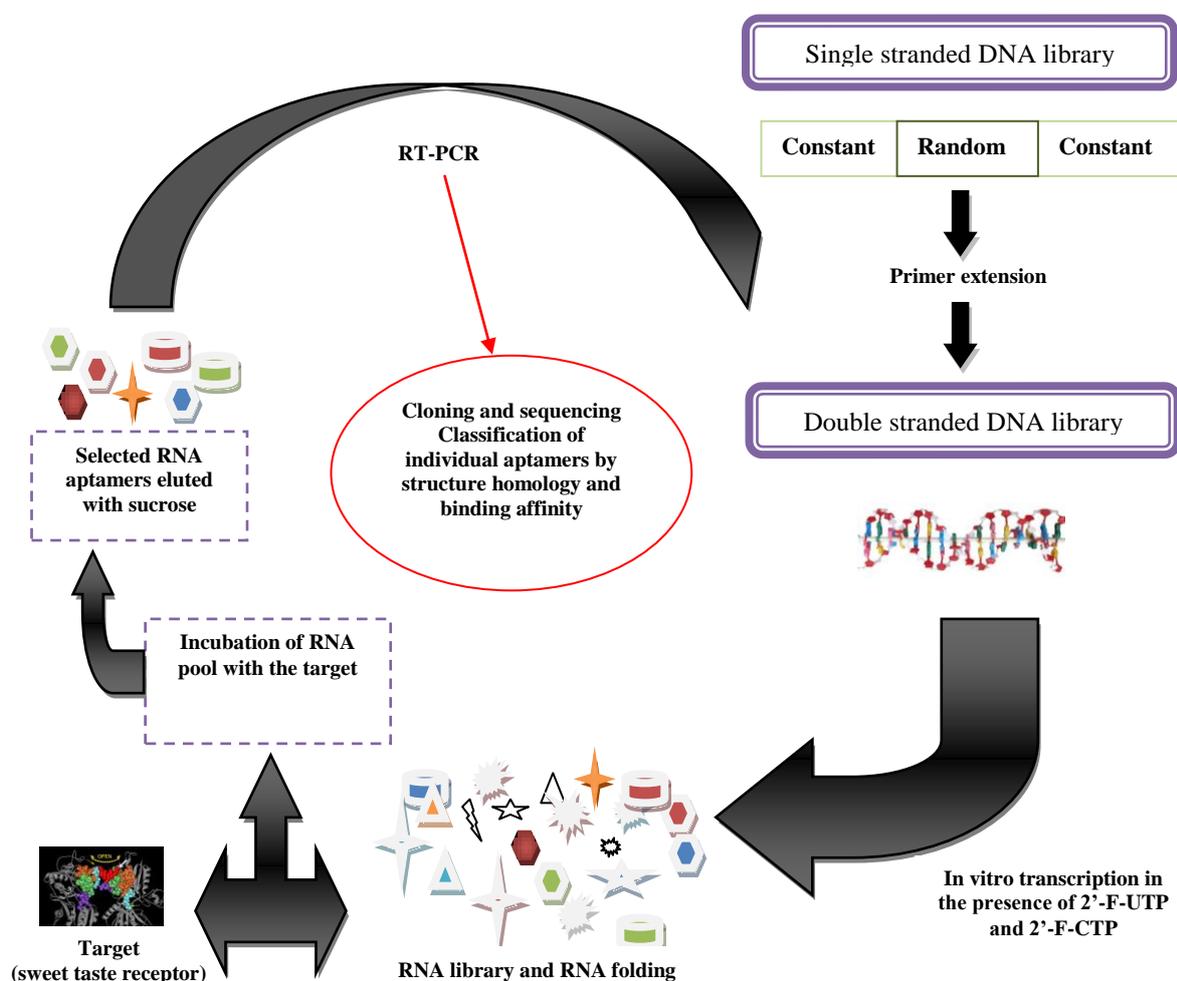


Figure 1 – The SELEX procedure with sweet taste receptor as the target. One cycle is shown.

In order to check whether hT1R2 and hT1R3 were localized on the membrane, immunofluorescence assays were performed (Figure 2B and 2C). The purinergic receptor P2Y1 is a typical membrane protein, which is endogenously expressed in HEK293T cells; thus, the colocalization of the immunofluorescence signals of hT1R2/hT1R3 and P2Y1 indicates that the sweet taste receptors are located on the membrane. Again, we had to make the same assumption as in the case of western blot, because of the FLAG tag in both

proteins. These were detected separately and simultaneously by immunofluorescence (Figure 2B), and so it can be assumed that the immunofluorescence signal in Figure 2C1 is of both proteins, hT1R2 and hT1R3, and since their signals merged with the P2Y1 signal (Figure 2C2 and 2C3), they are located on the membrane.

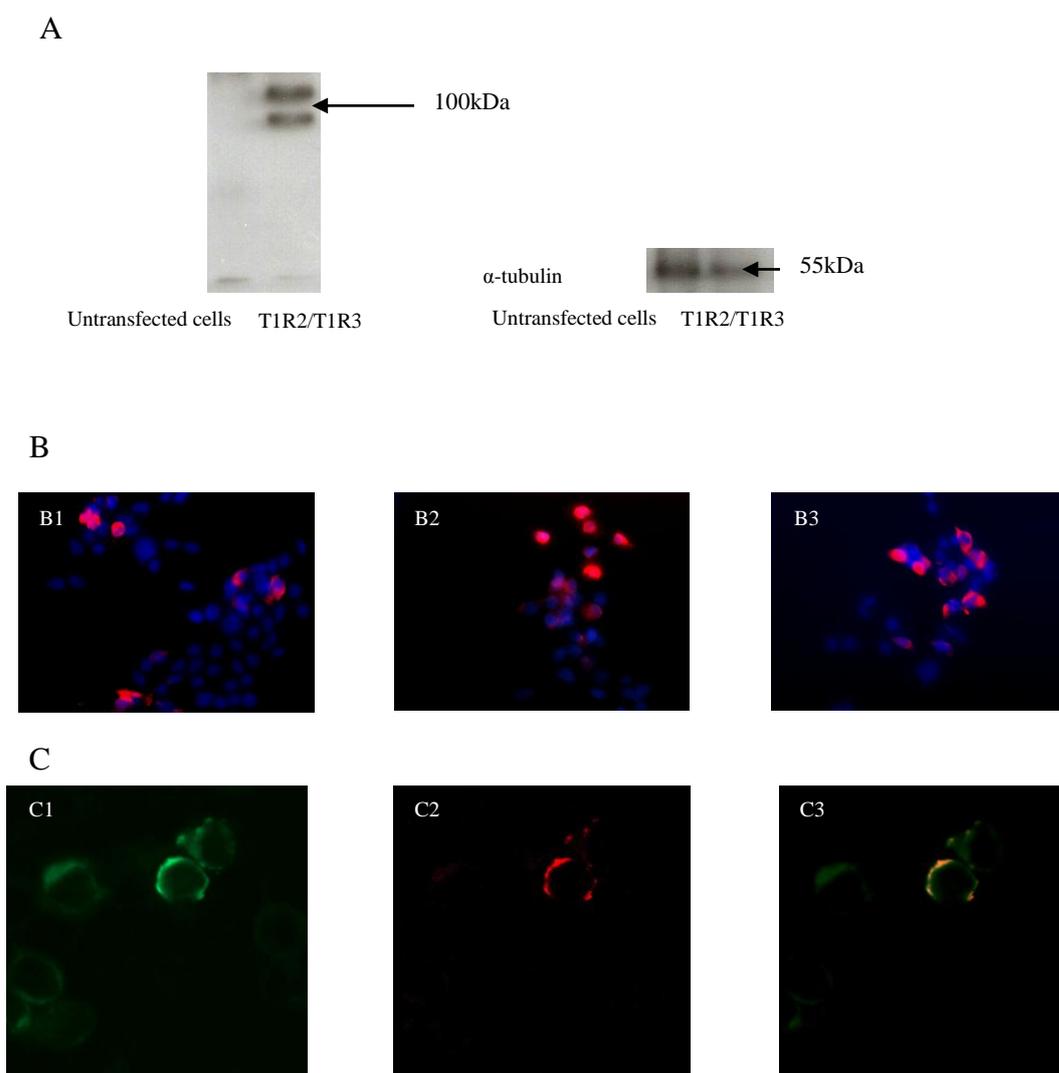


Figure 2 – Expression of hT1R2/hT1R3 in HEK293T cells. (A) Detection by Western blot of sweet taste receptors hT1R2/hT1R3 expressed in HEK293T cells. Cells were transfected with hT1R2 and hT1R3 expression vectors, and the membrane preparations were partially purified by sonication and differential centrifugation. Approximately 10 μ g of membrane preparation were used for the detection of the receptors with the anti-FLAG antibody. The Western on the right refers to the same membrane preparations submitted to anti- α -tubulin antibody (internal control). (B) Detection by immunofluorescence of sweet taste receptors hT1R2 and hT1R3 expressed in HEK293T cells. Cells were transfected with hT1R2 (B1), hT1R3 (B2) and both expression vectors

(B3). Nuclei were dyed with DAPI. (C) Immunofluorescence to evaluate if the proteins were localized on the membrane. Cells were transfected with both hT1R2 and hT1R3 expression vectors (C1) or P2Y1 expression vector (C2), and immunostained with anti-FLAG (C1) or Anti-P2Y1 (C2). C3 is the merged image of hT1R2/hT1R3 (green) and P2Y1 (red). Images were acquired using a Nikon TE 300 inverted microscope.

After verifying the presence of the receptor proteins on the cell membrane, we performed twelve reiterative *in vitro* selection cycles and four negative counterselections (to eliminate RNA molecules binding nonspecifically to nitrocellulose membrane and to proteins other than the target). To monitor the progress of enrichment, we selected the pools of three cycles (7, 9 and 12), labeled them with [α - 32 P]ATP and measured the equilibrium binding between these radiolabeled pools and the protein target. The specific binding of the selected aptamers to their targets is determined as the difference between the total binding and the nonspecific binding in the presence of an excess of competitor (32). In the experiments shown in Figure 3A, unlabeled RNA aptamers from each cycle were used as competitor (ten times the concentration of the labeled pools). In the experiments shown in Figure 3B, 100mM sucrose was used as competitor. Although we used 250 mM sucrose for the reiterative SELEX cycles, 100 mM is still an excess of competitor (5 times the threshold *in vivo*) and was effective in this assay. It seems that the enrichment took place effectively. The results shown in Figure 3A (homologous competition) allows us to assert that the specificity against the target increased with the number of cycles. In addition, the results shown in Figure 3B indicate that the target might be the sucrose binding site on the sweet taste receptor, for sucrose must compete with the [α - 32 P] RNA aptamers that bind specifically to the sucrose binding site.

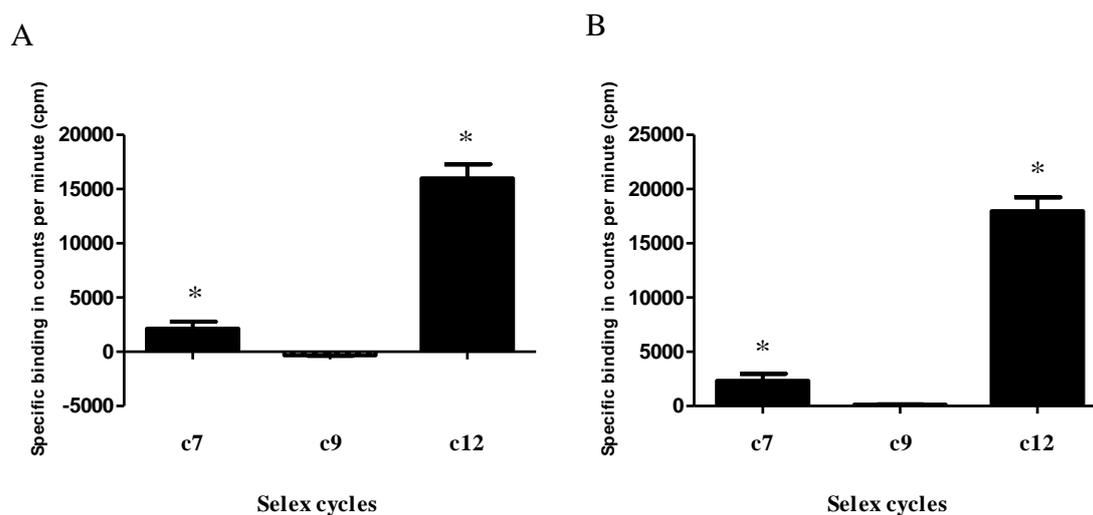


Figure 3 – Binding assay. (A) RNA aptamers from cycles 7, 9 and 12 were labeled with [α - 32 P] ATP and incubated with 10 μ g of protein from membrane preparation of HEK293T cells expressing the sweet taste receptors (hT1R2/hT1R3). After filtering this mixture using nitrocellulose filters and washing it with selection buffer, the amount of bound radiolabeled RNA aptamers was measured by scintillation counting (counts per minute, cpm). The nonspecific binding for each cycle was determined in the presence of excess unlabeled RNA aptamers from the same cycle (homologous competition). (B) Same procedure as (A), except that the nonspecific binding for each cycle was determined in the presence of 100 mM sucrose. The data corresponds to the average intensity in cpm of radioactivity measurements of specific binding \pm SEM of three independent experiments; *p < 0,001.

We next calculated the K_d of the cycle 12 aptamers pool. To do this, we performed a saturation radioligand binding experiment, that is, we measured specific binding at equilibrium at various concentrations of the radiolabeled cycle 12 aptamers pool (Figure 4A). Since in this experiment sucrose (250 mM) was used as a competitor to measure the specific binding, the obtained K_d value could indicate that the sweet taste receptor has an affinity in the nanomolar range ($K_d = 9,731 \pm 4,231$ nM) for the cycle 12 aptamers. At this point, we can only consider that a possibility, because a high concentration of sucrose was employed to displace the aptamers that bind to the sucrose binding site on the sweet taste receptor. Thus there could be in cycle 12 a reasonable quantity of aptamers that bind to other sites and were displaced on account of other interactions caused by this high concentration. A competitive

binding experiment was also performed (Figure 4B), that is, a single concentration of radiolabeled cycle 12 pool was incubated in the presence of various concentrations of unlabeled ligand (sucrose) and the specific binding was measured. The calculated dissociation constant for the unlabeled ligand, K_i , is four times the sucrose detection threshold for this receptor *in vivo*, which is approximately 20 mM (8); in other words, a sucrose concentration four times greater than its detection threshold is necessary to displace half of the bound cycle 12 aptamers. Unfortunately, the 95% confidence interval for K_i (Figure 4B) is too large, which can also be explained by the fact that a large concentration of sucrose had to be used (sucrose detection threshold for this receptor, *in vivo*, is already quite high, 20 mM), and this could have affected the stability of the proteins and their interaction with the aptamers.

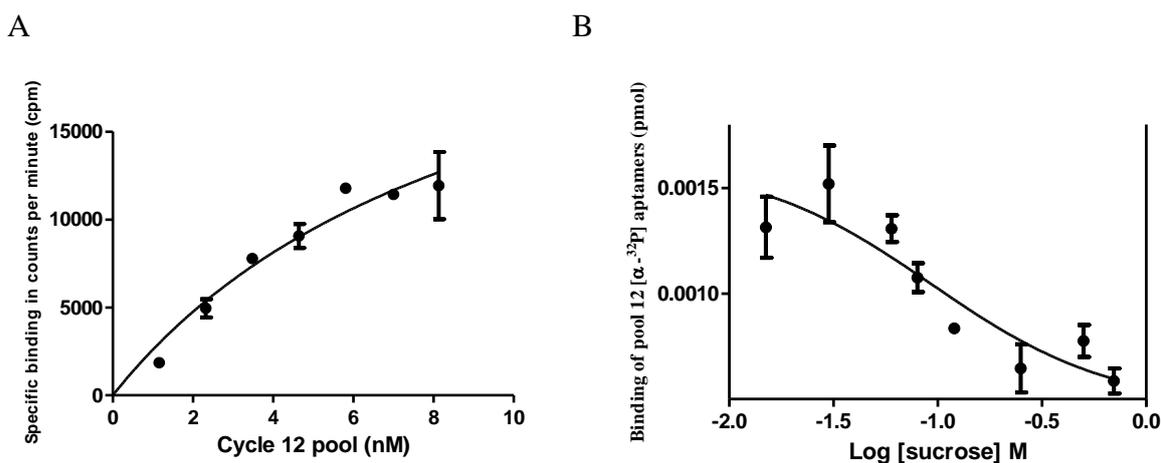
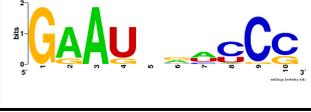
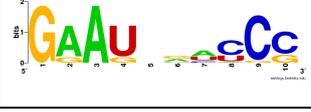
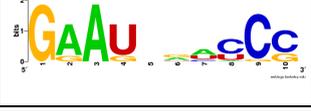


Figure 4 – Saturation and competitive binding experiments. (A) 10 μ g of protein from membrane preparation of hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells were incubated with various concentrations of radiolabeled aptamers from cycle 12. Nonspecific binding was determined in the presence of 250 mM sucrose. The K_d was determined based on the equation $Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$; $K_d = 9,731 \pm 4,231$ nM. (B) hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells were incubated with radiolabeled aptamers from cycle 12 (1,2 nM) in the presence of various concentrations of unlabeled ligand (0-700 mM sucrose) in a total volume of 50 μ L selection buffer. The dissociation constant for the unlabeled ligand, K_i , was determined based on the equation of Cheng-Prusoff (34), $K_i = IC_{50} / 1 + (L/K_d)$; $K_i = 83,37$ mM (95% Confidence Interval: 8,4 mM to 827,1 mM). Each point represents the average intensity in cpm of radioactivity measurements of specific binding \pm SEM of three independent experiments.

The next step was to analyze the sequences of the cycle 12 aptamers and look for conserved motifs. This pool was cloned, and 115 clones were sequenced. The sequences were then analyzed using the MEME software, which was set to discover sequences of six to ten conserved nucleotides within the randomized region. We selected three motifs (denominated class 1, class 2 and class 3) that were found in more than ten sites; their regular expression consisted of, respectively: [UG]UGAAU[UA]C[CG][AG], GAAU[UAG][GA][AU][CU]C[CG] and U[UG][CG]G[AC][CA][UA]C[CA]A. Individual aptamers from each class were selected based on their similarities to the regular expression and are shown in Table 1.

Table 1 – Cycle 12 aptamers selected from the three different classes of motifs

Name	Motif	Start	<i>p</i> -value	Sites		
109		2	3.33e-06	C	UUGAAUACCA	CAGUAAGUAA
13		19	3.43e-05	AUAUAUGGAA	UUGAAUGACA	CCCCGGUUGA
46		22	2.29e-05	AUGGGAAGUU	GAAUCAUCCC	AAAAGCAGA
9		9	1.88e-04	GCAUGACU	GAAGUUUCCC	UGAUCACAGA
90		26	6.37e-05	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
85		28	6.79e-05	AAGAAUUCAU	UGC_GAAACCA	UGA
19		28	1.15e-05	GGAAAUAGAA	UUCGCCACCA	GA

The three classes contain ten or more different aptamers. The first column refers to the number of the clone that was sequenced; the second refers to the conserved sequence logo; the third indicates where in the aptamer, from the 5'-end, the conserved site starts; the fourth shows the P-values, which are estimates of the expected number of motifs with the given log-likelihood ratio (or higher), and with the same width and number of occurrences, that one would find in a similarly sized set of random sequences; and the fifth shows the actual conserved sequence that the software found in the aptamer random region.

These aptamers were radiolabeled and tested for total binding on hT1R2/hT1R3 expressing and non-expressing HEK293T cells. We verified that some aptamers (apt9, apt46 and apt 90, which are class 2 aptamers, and apt85 and apt19, which are class 3 aptamers) showed greater affinity for hT1R2/hT1R3 expressing HEK293T cells than for non-expressing HEK293T cells (Figure 5). Class 1 aptamers (apt109 and apt13), on the other hand, did not show higher binding affinities for the hT1R2/hT1R3 expressing HEK293T cells than for non-expressing HEK293T cells. Aptamer 25 (apt 25) was randomly selected among those in which MEME software did not identify any conserved motif and was used as control. As shown in Figure 5, there is no differential binding to both types of cell. Although class 1 and class 2 aptamers share a sequence (GAAU), they are clearly different regarding binding (Figure 5). Also, the aptamers within which the class 1 motif was identified differ from the aptamers within which the class 2 motif was identified (see Supplementary Materials).

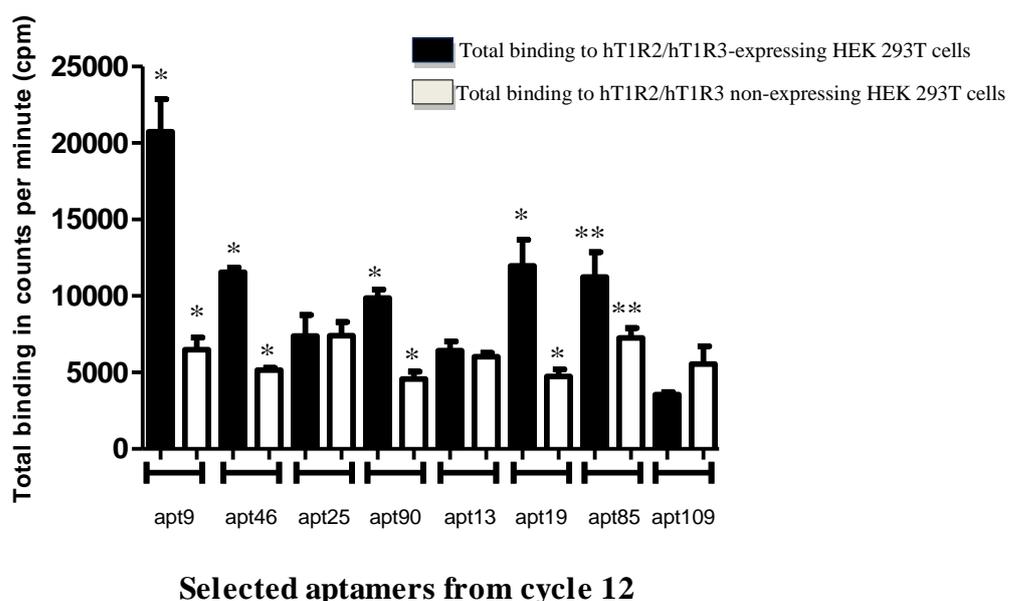


Figure 5 – Total binding of selected aptamers. Individual cycle 12 aptamers from each class were selected based on their similarities to the regular expression (that is, the general motif sequence). The hT1R2/hT1R3-expressing and non-expressing HEK293T cells were incubated with these selected aptamers (1 nM 32 P-labelled aptamers) in a total volume of 50 μ L selection buffer. The cells were washed twice, incubated with sodium dodecyl sulfate and sodium citrate, and the bound radioactivity, measured. The data corresponds to the average intensity in cpm of radioactivity measurements of total binding \pm SEM of two independent experiments; * $p < 0,005$ e ** $p < 0,05$.

In order to better analyze the binding capabilities of these individual aptamers to the target, gel-overlay assays were performed. In these experiments, we found that aptamers apt90 and apt85 bind to proteins present only in the extracts prepared from hT1R2/hT1R3 expressing cells, while apt109 binds to proteins present only in extracts prepared from hT1R2/hT1R3 non-expressing cells (Figure 6). Even though aptamers 9, 19 and 46 showed preferential binding to hT1R2/hT1R3 expressing cells as shown in Figure 5, no band was detected for these aptamers in neither of the cell extracts (Figure 6). Aptamer 25 binds to both extracts, with similar band patterns. These results are in agreement with the binding results shown in Figure 5, except that aptamers 9, 46 and 19 do not bind to any membrane preparation. A

possible explanation is that the gel-overlay assay requires that the membrane preparations are submitted to a sample buffer, which contains dithiothreitol (DTT). This reagent might affect the secondary and tertiary structure of the sweet taste receptor proteins by disrupting some hydrogen and disulfide bonds which could be fundamental to the binding of these aptamers. Also, in the total binding experiments, cells were used, providing a “natural” environment for the sweet taste receptor, that was somewhat reproduced in the selection process. Additional experiments would have to be performed in order to determine the nature of the proteins identified in the overlay experiments.

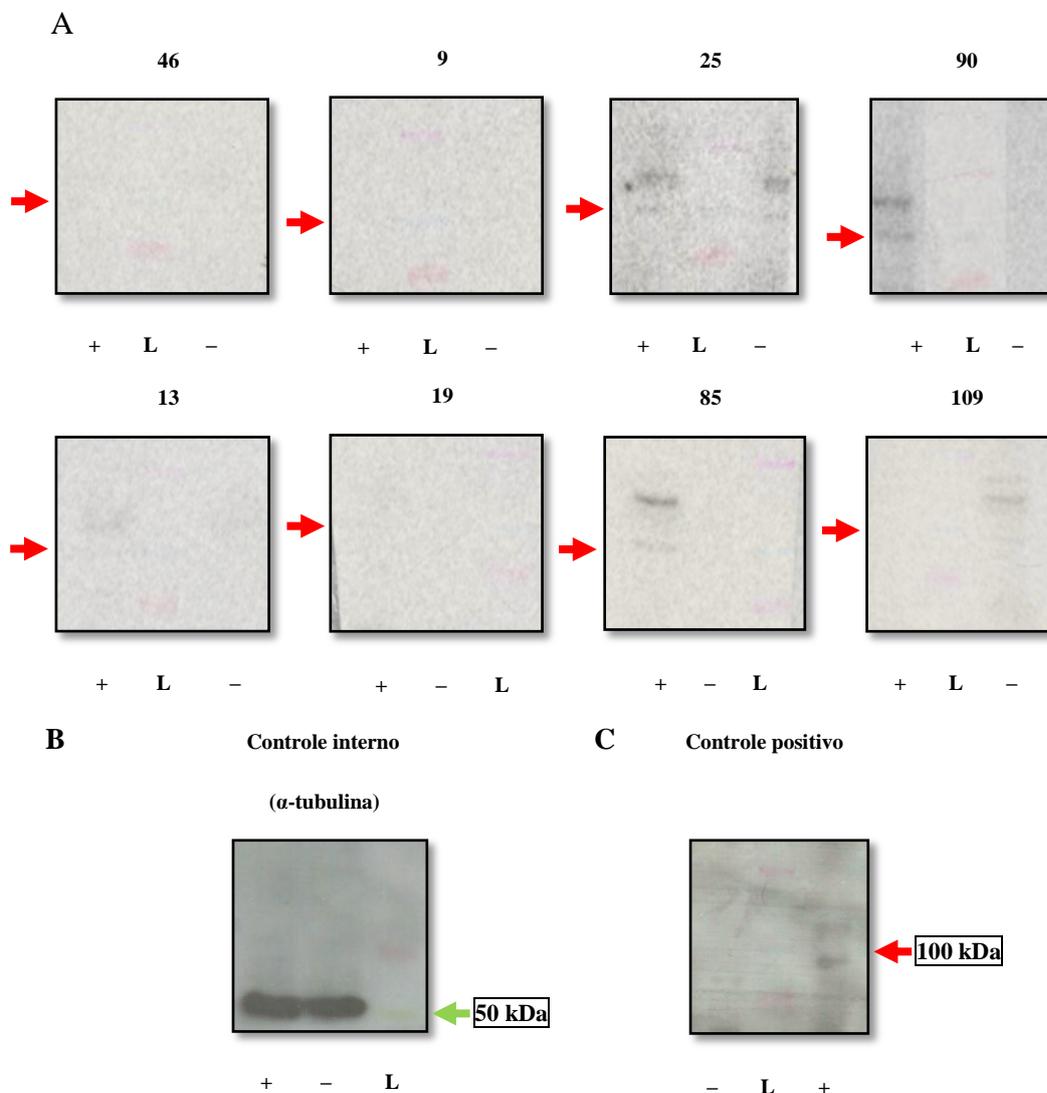


Figure 6 – Gel-overlay assay and western-blot. Membrane preparations (approximately 10 μ g) were submitted to polyacrilamide gel electrophoresis, and the separated proteins were transferred to PVDF membranes. These membranes were incubated with the selected radiolabeled aptamers from pool 12 (A). α -tubulin was used as the internal control western blot (B). The positive control (C) is similar to the western blot shown in Figure 1A. The “+” sign refers to membrane preparations of hT1R2/hT1R3-expressing HEK293T cells; the “-” sign refers to membrane preparations of hT1R2/hT1R3 non-expressing HEK293T cells; “L” is the Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); the green arrow refers to the α -tubulin band around 50kDa in both hT1R2/hT1R3-expressing and non-expressing HEK293T cells; and the red arrow refers to the light blue ladder band around 100kDa.

Our results indicate that aptamers that bind to hT1R2/hT1R3 expressing HEK293T cells and to membrane preparations of these cells were selected, but we cannot conclude that they bind specifically to the sweet taste receptor. However, we can hypothesize that class 2 and 3 motifs have some influence on the binding of the cycle 12 selected aptamers. In order to evaluate this, theoretical structures of class 2 and 3 aptamers were achieved using the Mfold software (31), and the structures with the lowest free energies, depicted (Figure 7). It is clear that the structures are different, and the motifs are located within specific regions of both class 2 (Figure 7A) and class 3 (Figure 7B) aptamers: in a stem and in a stem/loop region, respectively. The fact that these two motifs are conserved in these regions suggests that they might be important for the binding and specificity of these aptamers.

Acknowledgments

We thank Isaias Glezer, Maira Nagai, Lucia Armelin and Daniela Gonzales for their generous help and valuable advice. We also thank Fapesp and CNPq for their financial support.

References

1. Lefkowitz, R. The superfamily of hepatelical receptors. 2000. *Nature Cell Biol.* 2: E133-E136.
2. Nei, M.; Niimura, Y.; and Nozawa, M. 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nature Reviews Genetics* 9, 951-963.
3. Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; and Adler, E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *PNAS* 99: 4692-4696.
4. Hoon, M. A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J. F.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. 1999. Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity. *Cell*, 96, 541–551.
5. Matsunami, H.; Montmayeur, J-P.; and Buck, L. B. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404, 601-604.
6. Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. 2001. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100, 693–702.
7. Zhao, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Erlenbach, I.; Ryba, N.; and Zuker, C. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266.
8. Nelson, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. 2001. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell*, 106, 381–390.

9. Nelson, G.; Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Feng, F.; Zhao, G.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416: 199-202.
10. Chandrashekar, J.; Hoon, M.; Ryba, N.; and Zuker, C. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444: 288-294.
11. Yamolinsky, D.A.; Zucker, C.S.; and Ryba, N.J.P. 2009. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139: 234-244.
12. Xu, H.; Staszewski, L.; Tang, H.; Adler, E.; Zoller, M.; Zoller, M.; and Li, X. 2004. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *PNAS* 101: 14258-14263.
13. Temussi, P.A. 2009. Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Cell Press* 34 (6): 296-302.
14. Servant, G.; Tachdjian, C.; Tang, X-Q.; Werner, S.; Zhang, F.; Li, X.; Kamdar, P.; Petrovic, G.; Ditschun, T.; Java, A.; Brust, P.; Brune, N.; Dubois, G.E.; Zoller, M.; and Karanewsky, D.S. 2010. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *PNAS* early edition: 1-6.
15. Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R.M.; Liu, H.; Xu, H.; Servant, G.; Zoller, M.; Tachdjian, C.; and Li, X. 2010. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *PNAS* early edition: 1-6.
16. Jiang, P.; Ji, Q.; Liu, Z.; Snyder, L.A.; Benard, L. M. J.; Margolskee, R. F.; and Max, M. 2004. The Cysteine-rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Proteins. *JBC* 279, 43: 45068–45075.

17. Damak, S.; Rong, M.; Yasumatsu, K.; Kokrashvili, Z.; Varadarajan, V.; Zou, S.; Jiang, P.; Ninomiya, Y.; and Margolskee, R. 2003. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1R3. *Science* 301: 850-853.
18. Li, X.; Li, W.; Hang, H.; Cao, J.; Maehashi, K.; Huang, L.; Bachmanov, A.; Reed, R.; Legrand-Defretin, V.; Beauchamp, G.; Brand, J. G. 2005. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLOS Genetics* 1: 27-35.
19. Fushan, A.; Simons, C.T.; Slack, J.P.; Manichaikul, A.; and Drayna, D. 2009. Allelic polymorphism within the *TAS1R3* promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Current Biology* 19: 1288-1293.
20. Huang, Z.; Pei, W.; Jayaseelan, S.; Shi, H.; Niu, L. 2007. RNA Aptamers Selected against the GluR2 Glutamate Receptor Channel. *Biochemistry*, 46, 12648-12655
21. Binkley, J.; Allen, P.; Brown, DM.; Green, L.; Tuerk, C.; Gold, L. 1995. RNA ligands to human nerve growth factor. *Nucleic Acids Res* 23: 3198-3205.
22. Nieuwlandt, D.; Wecker, M.; Gold, L. 1995. In vitro selection of ligands to substance P. *Biochemistry* 34: 5651-5659.
23. Ulrich, H.; Ippolito, JE.; Pagan, OR.; Eterovic, VE.; Hann, RM.; Shi, H.; Lis, JT.; Eldefrawi, ME.; Hess, GP. 1998. In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14051-14056
24. Tuerk, C.; and Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.
25. Ellington AD., Szostak JW. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.

26. Ulrich, H. 2006. RNA Aptamers: From Basic Science Towards Therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* 173: 305-326.
27. Ulrich, H. 2005. DNA and RNA aptamers as modulators of protein function. *Medicinal Chemistry* 1: 199-208.
28. Djordjevic, M. 2007. SELEX experiments: New prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomolecular Engineering* 24: 179-189.
29. Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B. 2007. SELEX – A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24: 381-403.
30. Mairal, T., Özalp, V.C., Sánchez, P.L., Mir, M, Katakis, I., and O’Sullivan, C.K. 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 390: 989-1007.
31. Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406-3415.
32. Ulrich, H., Martins, A.H.B., and Pesquero, J.B. 2005. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Current Protocols in Cytometry* John Wiley and Sons, Inc. 7.28.1-7.28.39.
33. Cvejic, S. and Devi, L. A. 1997. Dimerization of the δ Opioid Receptor: Implication for a role in receptor internalization. *JBC* 272 (43): 26959–26964.
34. Cheng, Y. and Prusoff, W. H. 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22: 3099-108.

Supplementary materials



Figure 1 – Class 1 motif regular expression.

Table 1 – List of aptamers within which Class 1 motif was identified.

Name	Start	<i>p</i> -value	Sites		
77	6	7.50e-07	GAAUG	UUGAAUCCA	CCGGAA
12	9	2.28e-06	AAACAGAA	UUGAAUCCA	UCCCGGGCCA
109	2	3.33e-06	C	UUGAAUCCA	CAGUAAGUAA
6	25	5.16e-06	AUUAACUCCA	GUGAAUCCA	ACCAGA
60	8	2.47e-05	GAUCGCA	GUGAAUGCCA	GAA
99	5	2.80e-05	AAAG	UUGAAAUGA	UCCAGAC
74	6	2.80e-05	GAAAG	UUGAAAUGA	UCCAGAC
13	19	3.43e-05	AUAUAUGGAA	UUGAAUGACA	CCCCGGUUGA
79	5	4.15e-05	AGAA	UUGAAUAGGA	GUUUGUUA
2	14	4.15e-05	AAGCUGGCCU	UUGAAUAGCG	CUCCCU
112	25	6.37e-05	AGGCCAGCUC	UUGAGUCCG	ACUAGA
37	28	6.37e-05	CCUGGUGUAG	UUGAAAACCG	G
48	19	6.86e-05	UUGAUGAUAU	UUGAAUGAGA	ACUGCCC GCC
91	3	7.55e-05	GA	GUGAAUACA	GGAACUGAGU
62	29	8.00e-05	AUGAUCGCAG	UGGAAUCCG	CC
33	23	1.05e-04	AGGUGACGGU	GUGAAUUGGG	CCAAUGA

The first column refers to the number of the clone that was sequenced; the second indicates where in the aptamer, from the 5'-end, the conserved site start; the third shows the P-values, which are estimates of the expected number of motifs with the given log-likelihood ratio (or higher), and with the same width and number of occurrences, that one would find in a similarly sized set of random sequences; and the fourth shows the actual conserved sequence that the software found in the aptamer random region.

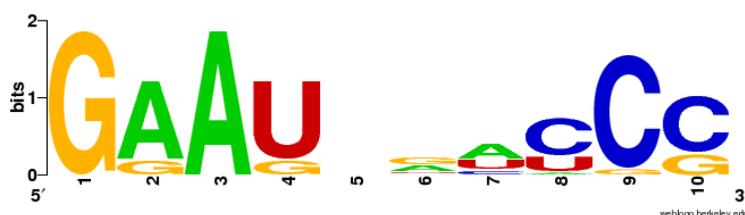


Figure 2 – Class 2 motif regular expression.

Table 2 – List of aptamers within which Class 2 motif was identified.

Name	Start	p-value	Sites		
46	22	2.29e-05	AUGGGAAGUU	GAAUCAUCC	AAAAGCAGA
54	1	4.71e-05		GAAUAGUCC	UCGACGCAGU
34	18	4.71e-05	CAGUAAAGCC	GAAUGGACC	UUCACUUCUU
52	24	5.36e-05	GGUCCAAAU	GAAUCACCC	UAGAAGG
90	26	6.37e-05	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
78	26	6.37e-05	AUACAGAAAC	GAAGUAACCC	CGAAG
39	29	6.37e-05	ACUCGCGUAU	GAAUAGACC	GG
90	5	8.00e-05	AUUU	GGAUGGACC	GAUACAGAAA
78	5	8.00e-05	AUUU	GGAUGGACC	GAUACAGAAA
53	5	8.00e-05	GGUG	GAAUUAUUC	GAGAAUUCAA
31	1	8.00e-05		GGAUUGAUCC	ACCCUUAAGA
15	11	9.11e-05	AAAACAAAU	GAAUUUUCG	UCUAUCAGAA
102	18	1.26e-04	UACAUCGCAG	GAAUUGAAC	GACCCUGCCA
88	23	1.43e-04	CACUAUGUGC	GAAUAACUCC	CGCACAGG
71	23	1.43e-04	CACUAUGUGC	GAAUAACUCC	CGCACAGG
9	9	1.88e-04	GCAUGACU	GAAGUUUCC	UGAUCACAGA
87	3	2.88e-04	AG	GAAUGGACC	AGGAGGUUGU
40	7	3.63e-04	UUAUCC	GAAUCCUCC	GCACAGAAGA

The first column refers to the number of the clone that was sequenced; the second indicates where in the aptamer, from the 5'-end, the conserved site start; the third shows the P-values, which are estimates of the expected number of motifs with the given log-likelihood ratio (or higher), and with the same width and number

of occurrences, that one would find in a similarly sized set of random sequences; and the fourth shows the actual conserved sequence that the software found in the aptamer random region.

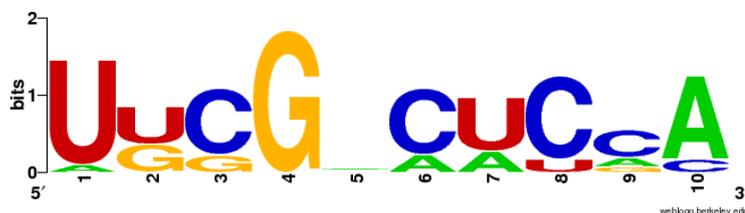


Figure 3 – Class 3 motif regular expression.

Table 3 – List of aptamers within which Class 3 motif was identified.

Name	Start	<i>p</i> -value	Sites		
1	25	6.33e-06	CGCUCAAAAG	UUGGACUCCA	UCAGA
53	53	8.39e-06	GGAGAGAGAG	UUCGAAUCCA	GACCAAUUC
32	28	1.15e-05	GGAAAAAGAA	UUCGCCACCA	GA
19	28	1.15e-05	GGAAAUAGAA	UUCGCCACCA	GA
4	3	1.15e-05	UG	UGCGACUCAA	CUCUAAAGU
87	27	1.83e-05	GGUUGUAGCC	UUCGCCUCGA	GCG
43	24	4.61e-05	UAGUAGGGAA	UGCGUCUUCA	CCCUUC
41	24	4.61e-05	UAGUAGGGAA	UGCGUCUUCA	CCCUUC
65	8	6.17e-05	AGCUGAA	AGCGACUCCA	UCUAAAGGUG
85	28	6.79e-05	AAGAAUUCAU	UGCGAAACCA	UGA
75	28	6.79e-05	AAGAAUUCAU	UGCGAAACCA	UGA
61	2	1.10e-04	A	UUGGCUCAA	UCCCGAAAAG
55	6	1.10e-04	GUUGU	UUCGGCUCAC	UAACGAGCUG
39	15	1.78e-04	AGUCCUGGAU	UUGGACUCGC	GUAUGAAUAG

The first column refers to the number of the clone that was sequenced; the second indicates where in the aptamer, from the 5'-end, the conserved site start; the third shows the P-values, which are estimates of the

expected number of motifs with the given log-likelihood ratio (or higher), and with the same width and number of occurrences, that one would find in a similarly sized set of random sequences; and the fourth shows the actual conserved sequence that the software found in the aptamer random region.