UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LUCIANA MAYUMI GUTIYAMA

RIC-8B, um fator trocador de nucleotídeo guanina (GEF), é essencial para a embriogênese

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

26/07/2013

LUCIANA MAYUMI GUTIYAMA

RIC-8B, um fator trocador de nucleotídeo guanina (GEF), é essencial para a embriogênese

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Bettina Malnic

São Paulo

2013

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

Gutiyama, Luciana Mayumi
G984r RIC-8B, um fator tracador de guanina (GEF), é essencial para a embriogênese / Luciana Mayumi Gutiyama. -- São Paulo, 2013.
1v. (Várias paginações)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Malnic, Bettina

1. Biologia molecular I. T. II. Malnic, Bettina, orientador.

574.88 CDD

Aos meus pais, que sempre estiveram ali, pertinho,
prontos para me levantar a cada queda.

Ao meu marido, sem o qual absolutamente
nada teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof.ª Drª Bettina Malnic pela orientação precisa e principalmente por toda compreensão e amizade ao longo de todos esses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório, Drª Daniela Gonzalez-Kristeller, Drª Lúcia Armelin-Correa, Dr. Isaias Glezer, Daniel S. Kerr, Jussara Michaloski, Débora Y. Brandt, Ana Carolina Bottura, Hebe Mizuno, Erica, Edson, João Batista, Umberto, André e Raissa por terem feito o meu dia-a-dia leve e completo pela amizade, agradeço a todos pela ajuda e aprendizados; e em especial, agradeço aos amigos Tiago Jonas de Almeida e Maíra Harume Nagai, por todo apoio, todas as conversas de bandejão, sugestões, críticas, por todo interesse e ajuda no laboratório, por toda amizade.

Agradeço aos professores e colegas do Departamento pela oportunidade de estar inserida num ambiente de tamanha riqueza científica e filosófica, o qual certamente levo como modelo e padrão a ser seguido. Agradeço em especial, aos professores Dr. Sandro Marana, Dra. Maria Teresa Machini, Dr. Frederico Gueiros, Dra. Alicia Kowaltowski, Dr. Walter Colli, que muito inspiraram minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço ao CNPq e FAPESP pelo financiamento.

Agradeço a toda a minha família, minha base, pela compreensão nos momentos difíceis e nos momentos de ausência.

E, principalmente, ao Romulo, meu companheiro pra vida e quem mais de perto acompanhou e incentivou o desenvolvimento de todo este trabalho, desde o seu início.

We have a belief, founded on long-continued, personal observation, that there is more in the Nose than most owners of that appendage are generally aware. We believe that, besides being an ornament to the face, or a convenient handle to grab an impudent fellow, it is an important index to its owner´s character (…) It will not be contended that all the faculties and properties of the mind are revealed by the Nose (…) it rather reveals Power and Taste – Power or Energy to carry out ideas, and the Taste or Inclination which dictates or guides them.

Nasology, or Hints towards a Classification of Noses

Eden Warwick, 1848

RESUMO

RIC-8B é uma proteína que apresenta, *in vitro*, atividade de fator de troca de nucleotídeos guanina (GEF). No entanto, seu papel *in vivo* não é conhecido. Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que essa proteína interage especificamente com $G\alpha_{olf}$, que é uma proteína G exclusiva do sistema olfatório, presente nos cílios dos neurônios olfatórios, onde ocorre a transdução de sinal ativada pelos odorantes. No camundongo adulto verificou-se, por meio de ensaios de hibridização *in situ*, que RIC-8B está presente somente em regiões de expressão de $G\alpha_{olf}$: no epitélio olfatório maduro e no núcleo estriado do sistema nervoso central. Para avaliar a função fisiológica de RIC-8B *in vivo*, resolvemos gerar uma linhagem de camundongo *knockout* para *Ric-8B*. Verificamos que a linhagem é inviável devido à letalidade dos embriões já em fases precoces do desenvolvimento (por volta de E8,5 e E9,0). A coloração de embriões com X-gal mostra que RIC-8B é especificamente expressa em regiões que darão origem ao sistema nervoso, como na região ventral do tubo neural, e em regiões cefálicas. Interessantemente, mostramos que RIC-8B é expressa na placa do assoalho do tubo neural, de uma maneira muito semelhante ao padrão de expressão de Sonic Hedgehog (SHH), que apresenta um papel fundamental para a organização do sistema nervoso, entre outras funções. Nossos resultados indicam, portanto, que RIC-8B desempenha um papel crucial durante a embriogênese, e que este papel pode estar relacionado com o papel exercido por SHH. Além disso, como a via de sinalização de SHH ocorre em cílios primários nas células alvo, nossos dados levantam a interessante possibilidade de que RIC-8B apresenta funções relacionadas a cílios, tanto no camundongo adulto (neste caso nos cílios dos neurônios olfatórios) como no embrião (neste caso nos cílios primários).

Palavras-chave: RIC-8B; GEF; *knockout*; cílios; olfato.

ABSTRACT

RIC-8B is a protein that, *in vitro*, acts as a guanine nucleotide exchange factor (GEF). However, its role *in vivo* remains unknown. Previous data from our laboratory demonstrated that this protein is able to interact specifically with $G\alpha_{olf}$, a G protein found only in the olfactory system. This G protein is located in the cilia from olfactory neurons, where odorant signaling occurs. *In situ* hybridization experiments showed that RIC-8B, in adult mice, is expressed only in regions where $G\alpha_{olf}$ is expressed, such as the olfactory epithelium and the nucleus striatum in the central nervous system. In order to determine the function of RIC-8B *in vivo*, we decided to generate a knockout mouse strain for *Ric-8B*. We found that this strain is not viable due to the lethality of embryos in the early stages of development (around days E8.5 and E9.0). X-gal staining of embryos shows that RIC-8B is specifically expressed in regions that originate the nervous system, such as the ventral neural tube and also cephalic regions. Interestingly, we show that RIC-8B is restrictedly expressed in the floor plate of the neural tube, in a pattern that is very similar to the one shown by Sonic Hedgehog (SHH). The SHH protein plays a fundamental role in the organization of the nervous system, among other functions. Therefore, our results indicate that RIC-8B plays an essential role during the embryogenesis, and that this role can be related to the role played by SHH. Furthermore, because the SHH signaling pathway occurs in primary cilia in the target cells, our data raise the interesting possibility that the role played by RIC-8B is related to ciliary functions, both in adult mice (in this case, in olfactory cilia), and in the embryo (in this case, in primary cilia).

Keywords: RIC-8B; GEF; knockout; cilia; olfaction.

ABREVIATURAS

7-TMR (7-*Transmembrane receptor)* – receptores 7-transmembranas

cAMP – monofosfato cíclico de adenosina

AOB (*Accessory Olfactory Bulb*) – bulbo olfatório acessório

AOE (*Accessory Olfactory Epithelium*) – epitélio olfatório acessório

ATP – adenosina trifosfato

BG – Glândula de Bowman

cDNA – DNA complementar

cNGC (*cyclic Nucleotide Gated Channel)* – canal ativado por nucleotídeo cíclico

DAPI – diamino fenilindol

DMSO – dimetilsulfóxido

DNAg – DNA genômico

dNTP – desoxirribonucleosídeos trifosfato

DPBS – tampão fosfato-salino modificado por Dulbecco para culturas celulares

G418 – geneticina

GBC (*Globose Basal Cell*)– célula basal globosa

GDP – guanosina difosfato

GFP (*Green fluorescent protein)* – proteína verde fluorescente

GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) – fator que estimula a troca do GDP por GTP

GG – Gânglio de Grueneberg

GMEM – *Glasgow Minimum Essential Medium*

G_{olf} – proteína G olfatória

GTP – guanosina trifosfato

Gα – subunidade alfa da proteína G

Gβ – subunidade beta da proteína G

Gγ – subunidade gama da proteína G

HBC (*Horizontal Basal Cell*) – célula basal horizontal

HT – heterozigoto

IFT – transporte intrafragelar

Kb – quilobases

LB – meio de cultura Luria-Bertani

LCA – amaurose congênita de Leber

ME – mesencéfalo

MMRRC – *Mutant Mice Regional Resource Centers*

MOB (*Main Olfactory Bulb*) – bulbo olfatório principal

MOE (*Main Olfactory Epithelium*) – epitélio olfatório principal

NC (*Nasal Cavity*) – cavidade nasal

NSE – enolase neurônio específica

OE (*Olfactory Epithelium*) – epitélio olfatório

OEC – *olfactory ensheating cells*

OMP – *olfactory marker protein*

ONB (*Olfactory Neuroblastoma*) – neuroblastoma olfatório

OR (*Odorant Receptor*) – receptor olfatório

OS – órgão do septo

OSN (*Olfactory Sensory Neuron*) – neurônio olfatório sensorial

OSN_m (*mature Olfactory Sensory Neuron*) – neurônio olfatório sensorial maduro

OSN_i (*immature Olfactory Sensory Neuron*) – neurônio olfatório sensorial imaturo

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PE – prosencéfalo

PFA – paraformaldeído

Rb – rombômeros

RE – rombencéfalo

RNAm – RNA mensageiro

rpm – rotações por minuto

SAS – sítio aceptor de splicing

som – somitos

St (*Striatum*) – estriado

Sus – células de sustentação

TAAR (*Trace-amine-associated receptor*) – receptor associado a traços de amina

TF (*Transition fiber*) – fibra de transição

TN – tubo neural

TZ (*Transition Zone*) – zona de transição

VNO (*Vomeronasal Organ*) – órgão vomeronasal

V1R (*Vomeronasal Receptor type 1*) – receptor vomeronasal tipo 1

V2R (*Vomeronasal Receptor type 2*) – receptor vomeronasal tipo 2

WT (*Wild type*) – selvagem

β-gal – β-galactosidase

β-geo – fusão do gene da β-galactosidase com o gene de resistência a neomicina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: O sistema olfatório....15
Figura 2: Epitélio olfatório principal....16
Figura 3: Receptores do sistema olfatório acessório vomeronasal....18
Figura 4: Cascata da sinalização intracelular olfatória....21
Figura 5: Possível papel de RIC-8B *in vivo* como GEF no neurônio olfatório – ativação da cascata de sinalização por via independente de ligante....27
Figura 6: Injeção de células-tronco embrionárias nos blastocistos....30
Figura 7: Plano de cruzamentos para a criação de colônia das linhagens RRA103 e RHH188 e obtenção dos camundongos *knockout*....40
Figura 8: Esquema da inserção do vetor pGT01 no gene *Ric-8B*....53
Figura 9: Esquema da região amplificada no PCR de verificação da construção das linhagens RRA103 e RHH188....54
Figura 10: A região amplificada indica a interrupção do gene *Ric-8B*....54
Figura 11: As linhagens RRA103 e RHH188 apresentam marcadores células-tronco específicos....56
Figura 12: Quimeras da linhagem RHH188 com alto índice de quimerismo e transmissão da linhagem....57
Figura 13: Exemplo de resultado de genotipagem inicial....60
Figura 14: Expressão de RIC-8B nos tecidos olfatórios....62
Figura 15: Determinação da expressão da proteína RIC-8B em outros tecidos pela expressão do gene repórter β-geo no camundongo heterozigoto adulto....63
Figura 16: Determinação da região de inserção do vetor Genetrap no íntron 3 do gene *Ric-8B*....69
Figura 17: Localização do sítio de integração do vetor utilizando PCR....70
Figura 18: Resultado da genotipagem de um cruzamento *Ric-8B*$^{+/-}$ X *Ric-8B*$^{+/-}$....71
Figura 19: Embriões no estágio E8,5 corados com X-gal....74
Figura 20: Embriões no estágio E10,5 corados com X-gal....75
Figura 21: Embriões no estágio E12,5 corados com X-gal....76
Figura 22: Corte de embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ no estágio E12,5 corados com X-gal....77
Figura 23: Não há diferença de localização da proteína RIC-8B nos camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$ e *Ric-8B*$^{+/-}$....79
Figura 24: Localização de RIC-8B no epitélio olfatório maduro....81
Figura 25: A proteína RIC-8B é altamente conservada em diferentes espécies....83
Figura 26: Alinhamento entre RIC-8B de camundongo e humana....85
Figura 27: Expressão de RIC-8B também é predominante no epitélio olfatório em humanos....87
Figura 28: O papel putativo de RIC-8B *in vivo* no cílio....96
Gráfico 1: Coloração por X-gal em extrato total de diversos tecidos do camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$....65
Gráfico 2: A redução do RNAm de RIC-8B observada nos camundongos Ric-8B$^{+/-}$ é menor que 50%....67
Tabela 1: Resultado do cruzamento: Quimeras X C57BL6/J....59
Tabela 2: Determinação da expressão da proteína RIC-8B em alguns tecidos pela expressão do gene repórter β-geo no camundongo heterozigoto adulto....63
Tabela 3: Resultado do cruzamento: *Ric-8B*$^{+/-}$ X *Ric-8B*$^{+/-}$....72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 14

1.1 O sistema olfatório..... 14

1.2 Via de transdução de sinal no sistema olfatório..... 20

1.3 RIC-8B..... 23

1.4 Camundongos *knockout*..... 28

2. OBJETIVOS..... 32

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 34

3.1 Expansão das linhagens RRA103 e RHH188..... 34

3.2 Extração de RNA das células-tronco..... 35

3.3 RT-PCR..... 35

3.4 PCR para confirmação da inserção do vetor pGT01 no gene *Ric-8B*..... 36

3.5 Coloração das culturas de células-tronco com X-gal..... 36

3.6 Imunofluorescência em células-tronco..... 37

3.7 Estabelecimento das colônias de camundongo: transmissão do vetor..... 38

3.7.1 Retrocruzamentos..... 41

3.7.2 Cruzamentos programados..... 42

3.8 Genotipagem da prole proveniente dos retrocruzamentos..... 42

3.9 Identificação do ponto de inserção do vetor pGT01 na linhagem RHH188..... 44

3.10 Estratégia de genotipagem padronizada..... 45

3.11 Ensaio de coloração de tecidos, lâminas e embriões por X-gal..... 45

3.12 Genotipagem dos embriões..... 47

3.13 Quantificação indireta da expressão de RIC-8B total por X-gal..... 47

3.14 Imunofluorescência em cortes de epitélio olfatório..... 48

3.15 Amplificação da RIC-8B humana........ 49

3.15.1 Ligação..... 49

3.15.2 Transformação de bactérias..... 50

3.15.3 Mini preparação de plasmídeos..... 50

3.15.4 Digestão de plasmídeo..... 50

3.15.5 Sequenciamento de DNA..... 51

4. RESULTADOS..... 52

4.1 Parte I..... 52

4.1.1 As linhagens RRA103 e RHH188 apresentam a inserção do vetor Genetrap no gene *Ric-8B* 52

4.1.2 Fundação das colônias RRA103 e RHH188 57

4.2.1 Transmissão da linhagem RHH188 58

4.2.2 Transmissão da linhagem RRA103 59

4.1.3 Genotipagem dos camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ 60

4.1.4 Análise da expressão de RIC-8B 61

4.1.5 O camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ é haplossuficiente 66

4.1.6 Genotipagem e obtenção dos camundongos *Ric-8B*$^{-/-}$ 68

4.1.7 Perfil de expressão da proteína RIC-8B na embriogênese 73

4.1.8 Localização celular da proteína RIC-8B 78

4.2 Parte II 82

4.2.1 Conservação de RIC-8B em outras espécies 82

4.2.2 Análise da proteína RIC-8B em humanos 83

4.2.2.1 Conservação da sequência de RIC-8B humana 83

4.2.2.2 Expressão de RIC-8B em humanos 85

5. DISCUSSÃO 88

5.1 PARTE I 88

5.2 PARTE II 97

6. CONCLUSÕES 100

7. REFERÊNCIAS 102

SÚMULA CURRICULAR

ANEXOS

Anexo 1: Capítulo *Odorant Receptors*, do livro *The Neurobiology of Olfaction* (2009).

Anexo 2: Artigo *Odorant Receptor genes are expressed in olfactory neuroblastoma, Genetics and Molecular Research*, manuscrito no prelo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Olfatório

Desde protozoários unicelulares a complexos vertebrados, a maioria dos seres possui um mecanismo quimiossensório que identifica informações do ambiente no qual está inserido e transmite essas informações a um sistema de reconhecimento que, por sua vez, cria uma representação interna do mundo externo. Há inúmeras maneiras descritas de como um organismo investiga seu ambiente: particularmente como mamíferos, possuímos os atributos da olfação, audição, visão e tato. As informações geradas por todos estes sentidos são interpretadas pelo nosso sistema de reconhecimento central, o cérebro, cuja função vai além de memorizar uma imagem exata do mundo, mas cria uma imagem seletiva restrita a cada um, de acordo principalmente com o que lhe é importante para a sobrevivência e reprodução da espécie (Axel, 2005).

Portanto, cores, tons, gostos e cheiros são construções criadas dentro de um contexto de uma experiência sensorial, e existem e são reconhecidos como tal dentro daquele contexto.

O olfato é um dos mais primitivos sentidos e proporciona à maioria dos organismos habilidades para detectar comida, predadores, parceiros sexuais; alertar sobre a existência de perigos físicos como incêndios e presença de gases tóxicos; além de ser capaz de eliciar vários comportamentos inatos como agressividade, comportamento maternal e medo (Buck, 2005).

Para o ser humano, sabe-se popularmente que o olfato também é capaz de se associar a memórias emotivas, tais eventos são conhecidos como experiências proustianas, em referência ao escritor Marcel Proust, um escritor francês, que em sua obra, datada do início do século XX, descreve recordações vívidas sobre sua infância, que retomam tempos, lugares e pessoas, despertadas apenas pelo aroma de *madeleines* (Proust, 1913). Interessantemente,

parece haver uma preferência às memórias olfatórias adquiridas durante a primeira infância em relação às memórias auditivas ou visuais e até mesmo em relação às memórias olfatórias recentes e, ainda, uma maior fixação de uma memória olfatória considerada desagradável do que outra considerada agradável (Yeshurun et al., 2009).

O olfato baseia-se, fundamentalmente, em dois sistemas denominados sistema olfatório principal e sistema olfatório acessório (Figura 1).

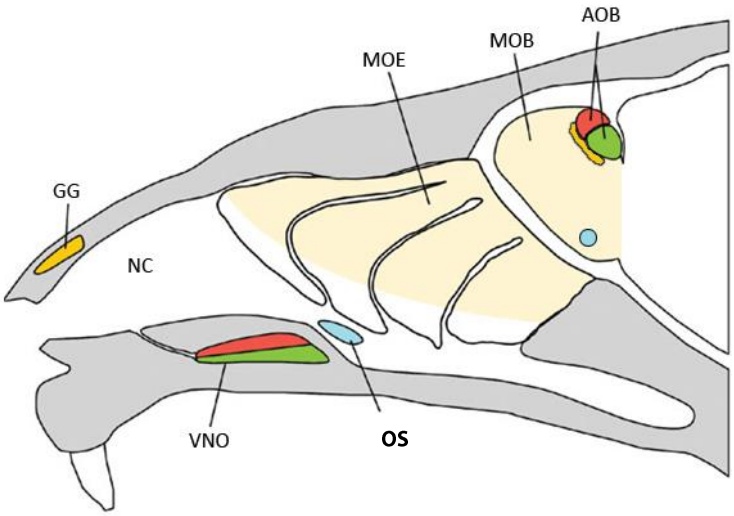


Figura 1| O sistema olfatório. Esquema de corte sagital da cabeça de um camundongo evidenciando os tecidos do sistema olfatório e suas projeções no bulbo olfatório. O sistema olfatório é baseado em dois sistemas independentes: o sistema olfatório principal e o sistema olfatório acessório. O sistema olfatório principal é composto pelo epitélio olfatório principal (em bege, MOE) que recobre estruturas denominadas turbinadas, localizadas na cavidade nasal (NC), e pelo bulbo olfatório principal (em bege, MOB). O sistema olfatório acessório é formado pelo órgão vomeronasal (em verde e vermelho, VNO) e pelo bulbo olfatório acessório (em verde e vermelho, AOB). Além desses sistemas, o camundongo também apresenta o gânglio de Grueneberg (em amarelo, GG) e o órgão do septo (em azul, OS). *Adaptado de From pherormones to behavior, Physiological Reviews* (Tirindelli et al., 2009).

O sistema olfatório principal é composto pelo epitélio olfatório (OE) e o bulbo olfatório principal (OB). O epitélio olfatório localiza-se no recesso posterior da cavidade nasal e é

constituído por neurônios sensoriais olfatórios (OSN), células progenitoras basais e células de sustentação (Figura 2a). Os neurônios olfatórios apresentam de 10 a 30 cílios nos quais se concentra a maquinaria de reconhecimento e transdução do sinal olfatório. O olfato se inicia pela entrada de ar e odorantes do ambiente na cavidade nasal. Os odorantes são moléculas pequenas e voláteis, de estrutura e grupos químicos variados. O ar passa pela cavidade nasal em que micropartículas como poeira e agentes infecciosos são filtrados por pelos e muco – ao mesmo tempo, o ar é aquecido e umidificado. Mais à frente, os odorantes então se ligam e ativam receptores olfatórios (OR) presentes nos cílios dos neurônios olfatórios (Figura 2b) e, por meio de uma cascata de segundos mensageiros, despolarizam o neurônio olfatório. Ao contrário da sinalização de outros sentidos, o neurônio olfatório faz sinapse diretamente com o bulbo olfatório por uma via direta extra-talâmica e, dali saem projeções corticais e subcorticais que finalizarão o processamento dessas informações pelo cérebro.

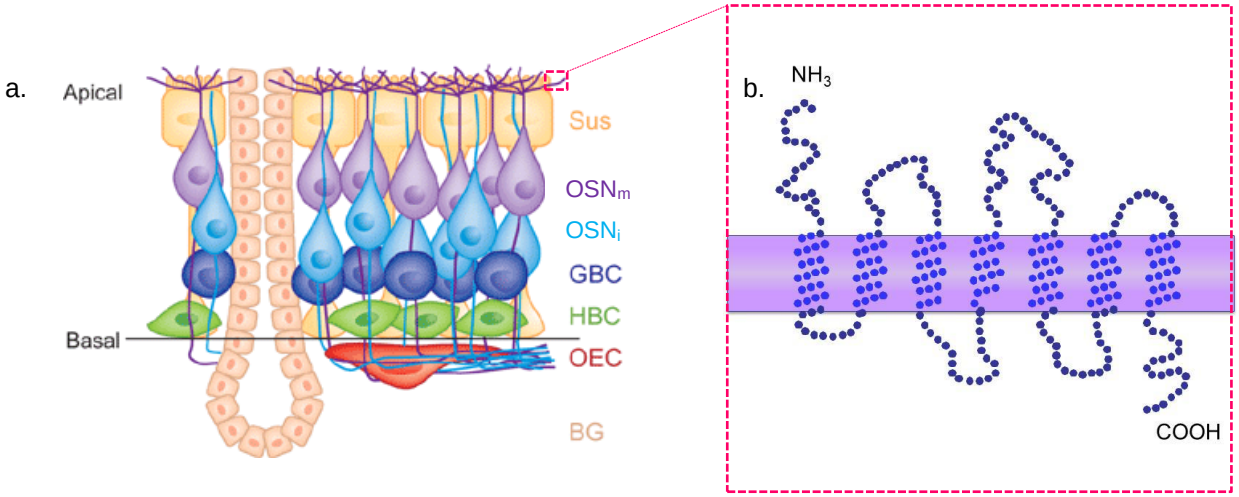


Figura 2| Epitélio olfatório principal. (a.) O epitélio olfatório pseudoestratificado é composto por células de sustentação (Sus); neurônios olfatórios maduros e imaturos (OSN_m e OSN_i); e dois tipos de progenitores, as células globosas (GBC) e as células basais horizontais (HBC); no esquema podemos ver também as *ensheating cells* (OEC), que envolvem o nervo olfatório e as células da glândula de Bowman (BG). **(b.)** Aumento esquemático sobre região de um cílio de um neurônio olfatório maduro evidenciando a estrutura de um receptor olfatório com suas sete α-hélices transmembranares e alças extra e intra celulares. *Adaptado de Scent of a smell, Nature Neuroscience* (Duggan and Ngai, 2007).

Os ORs são responsáveis pela primeira interação do odorante com a célula. Os ORs de mamíferos são receptores 7-transmembrana (7-TMRs) e pertencem a uma superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Buck and Axel, 1991). Essa é uma das maiores famílias de GPCRs conhecidas até hoje, com 1209 genes descritos em camundongos e 636 em humanos (Godfrey et al., 2004; Malnic et al., 2004). Os ORs, por meio da via canônica da cascata de ativação da adenosina cíclica monofosfato (cAMP), transformam energia química em sinais elétricos.

O sistema olfatório acessório é composto pelo órgão vomeronasal (VNO) nos camundongos, que corresponde ao órgão vestigial de Jacobson nos seres humanos. O VNO envia suas projeções a uma região específica do bulbo olfatório, denominada bulbo olfatório acessório (AOB) (Figura 1). Este órgão se localiza abaixo do septo nasal e é constituído por neurônios olfatórios que expressam, em suas microvilosidades, receptores denominados vomeronasais. Esta classe de receptores é dividida em duas famílias: V1R e V2R (Figura 3) e, assim como os ORs, esses receptores são GPCRs (Dulac and Axel, 1995; Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). A maioria dos V1Rs e V2Rs são responsáveis pela detecção de feromônios. Enquanto o camundongo apresenta 165 V1Rs e 121 V2Rs, o homem praticamente não apresenta esses tipos de receptores. Na verdade, grande parte dos genes codificantes para esse tipo de receptor são pseudogenes nos humanos, o que indica que este órgão acessório não é funcional no homem (Dulac and Torello, 2003; Mombaerts, 2004). Interessantemente, além dos receptores vomeronasais, cerca de 2/3 do repertório de receptores olfatórios passaram a ser pseudogenes nos humanos – fato esse que coincide temporalmente com o surgimento da visão tricromática e da postura ereta, que distanciou nosso nariz de uma rica paleta de odorantes dispersos no solo.

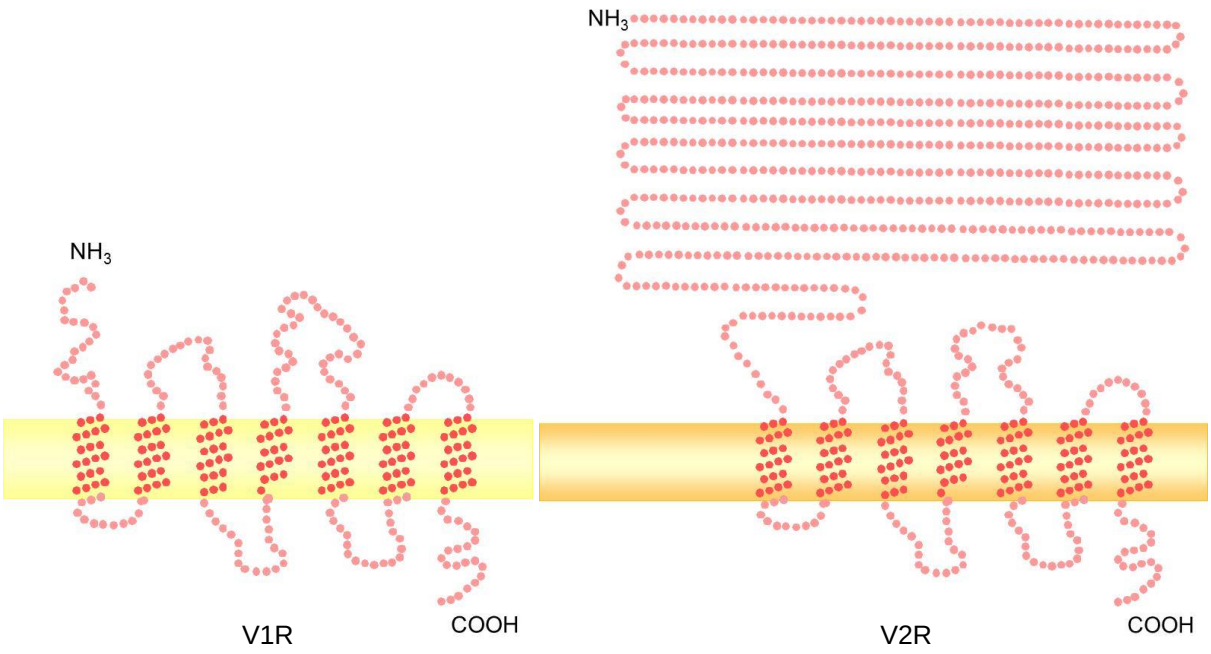


Figura 3| Receptores do sistema olfatório acessório vomeronasal. Representação esquemática dos receptores V1R (esquerda) e V2R (direita). Ambos, assim como os ORs, apresentam sete α-hélices transmembranares. A estrutura N-terminal do receptor V1R é muito semelhante a do OR, porém, a estrutura N-terminal extracelular do receptor V2R é mais longa. *Adaptado de Nobel Lecture, Buck, 2005.*

Além do epitélio olfatório principal e do vomeronasal, o sistema olfatório também apresenta o órgão do septo de Masera e o gânglio de Grueneberg (Figura 1). O órgão do septo se localiza à frente, bilateral e ventralmente na base do septo nasal, bem acima da porção final do órgão vomeronasal. O gânglio de Grueneberg também se localiza na extremidade frontal do nariz, bilateralmente no vestíbulo anterior da cavidade nasal (Figura 1). Ambas as estruturas apresentam neurônios olfatórios que projetam seus axônios para áreas particulares do cérebro. Entretanto, apesar de expressarem a proteína marcadora olfatória (OMP), proteína que é expressa exclusivamente em neurônios olfatórios maduros, suas funções fisiológicas no sistema olfatório ainda não foram completamente determinadas.

O órgão do septo se assemelha ao epitélio olfatório principal na sua composição celular: apresenta OSNs, células de suporte e células basais. Entretanto, o epitélio do OS apresenta

menos camadas celulares (cerca de duas ou três enquanto que MOE apresenta de seis a oito camadas). Os neurônios do OS também apresentam diferenças morfológicas: são mais achatados e apresentam dendritos mais curtos e botões dendríticos mais largos (Ma et al., 2003). Do repertório de 1000 genes para ORs, alguns já foram encontrados expressos no OS. Nove dos ORs mais expressos no OS correspondem, juntos, a 95% das células, sendo que o OR mais expresso – SR1 – corresponde a 50% das células do OS. Além disso, a maioria dos neurônios do OS expressam também $G\alpha_{olf}$ e ACIII, o que indica que a via de transdução de sinal neste órgão também se dá pela cascata de sinalização mediada por cAMP. Surpreendentemente, apesar da pequena representatividade de ORs, o OS apresentou responsividade a uma ampla gama de odorantes de diferentes tamanhos, formas e grupos funcionais – assim, foi hipotetizado que o OS poderia funcionar como um "mini-nariz", já que se situa bem à frente ao fluxo de entrada de ar e assim poderia "alertar" o organismo na pesquisa de alimento e pistas sociais (Breer et al., 2006; Rodolfo-Masera, 1943). Outra função curiosa do OS é a responsividade da maioria dos OSNs para estímulos mecânicos correlatos às diferenças de pressão estabelecidas pela entrada do fluxo de ar. Foi verificado que esta mecanossensitividade também é mediada por segundos mensageiros via cAMP (Grosmaitre et al., 2007).

O gânglio de Grueneberg (GG, Figura 1), ao contrário do MOE, VNO e OS, não se apresenta em forma de epitélio pseudoestratificado, mas em pequenos grupos de neurônios, como cachos de uva, que possuem cerca de 500 neurônios. Outra diferença é que não apresenta estruturas quimiossensoriais usuais como cílios ou microvilos, contudo, expressam de 30 a 40 cílios primários, profundamente invaginados no citoplasma. Os OSNs do GG também não expressam elementos centrais da via de transdução de sinal olfatório, como $G\alpha_{olf}$, ACIII ou cNGC, apesar de expressarem OMP; contudo, a identificação de quimioreceptores reforça seu papel quimissensório: verificou-se a expressão de receptores do tipo V2R e TAARs (que são

receptores do tipo GPCR que são ativados por ligantes que possuem grupos amina) e elementos de vias de transdução como $G\alpha_0$ e $G\alpha_{i2}$. O número de neurônios no GG é particularmente alto em fases perinatais, sugerindo um possível papel na interação mãe/ filho, no entanto, verificou-se intensa atividade de OSN V2r83 positivos na ausência da mãe e, ainda, que essa atividade, na verdade, é ativada por temperaturas baixas e independe de pistas olfatórias (Mamasuew et al., 2008). Outra função descrita é a ativação dos neurônios do GG por feromônios de alarme liberados pela execução de outro camundongo por CO_2, essa sinalização está envolvida no desencadeamento de comportamento de *freezing*, característico de estresse. Aparentemente, o GG exerce distintas funções; não se sabe ao certo se o comportamento de alerta e o de sensação de temperaturas baixas são desencadeados pelos mesmos tipos de neurônios. Humanos também possuem esse órgão (Gruneberg, 1973), mas não se sabe se as funções também são as mesmas.

1.2 Via de transdução de sinal no sistema olfatório principal

A percepção de um odorante inicia-se quando este interage com o seu receptor olfatório específico (Mombaerts, 2004). O OR ligado ao odorante ativa a proteína G_{olf}, que é a proteína G específica de neurônios olfatórios (Jones and Reed, 1989), esta, por sua vez, ativa a adenilil ciclase III. As concentrações intracelulares de cAMP aumentam levando a abertura de canais de membrana regulados por nucleotídeos cíclicos (cNGCs). Como resultado disso, ocorre a entrada de sódio e cálcio para o meio intracelular levando à despolarização da membrana e ativação do neurônio olfatório (Figura 4).

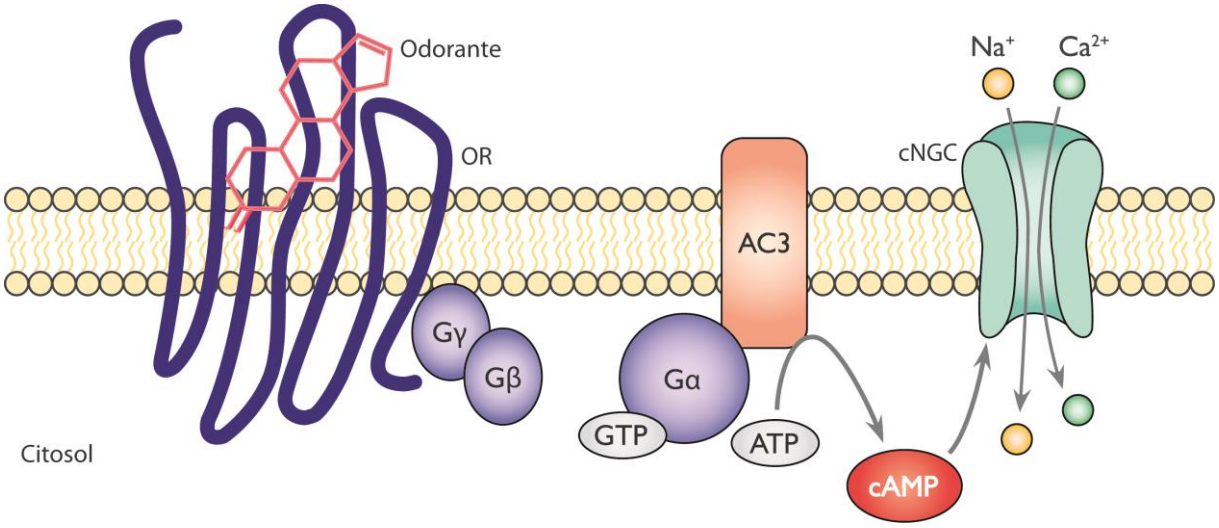


Figura 4| Cascata da sinalização intracelular olfatória. A ligação do odorante, usualmente uma molécula pequena e volátil, ao seu respectivo receptor olfatório (OR) leva a uma mudança de conformação do receptor. Esta mudança de conformação do OR que, por sua vez, é um receptor acoplado à proteína G_{olf} (GPCR), leva à separação do heterotrímero e, assim, gera $G\alpha_{olf}$-GTP que ativa a adenilil ciclase III (AC3), aumentando os níveis citoplasmáticos de cAMP. Este aumento de concentração de cAMP leva à abertura de canais dependentes de nucleotídeos cíclicos (cNGC), permitindo a entrada de cálcio e sódio para o interior da célula, despolarizando, dessa forma, o neurônio olfatório.

Os ORs são bastante diversificados em relação às suas sequências de aminoácidos (a identidade de aminoácidos varia de ~34%-99%), o que possibilita o reconhecimento e a discriminação de uma grande variedade de odorantes. Regiões de grande variabilidade são encontradas nos domínios transmembrânicos III, IV e V da estrutura dos ORs, sugerindo serem regiões importantes para a variabilidade da ligação aos odorantes (Buck and Axel, 1991).

Estudos demonstraram que um mesmo OR pode ser estimulado por diferentes odorantes e que um mesmo odorante pode interagir com diferentes ORs (Malnic et al., 1999). Tais resultados demonstraram que cada odorante estimula certo número de ORs específicos e este conjunto de receptores ativados possibilita sua identificação, formando o início do “código” para um dado odorante.

A possibilidade de combinação de diferentes ORs para a detecção de um odorante aumenta muito a capacidade de discriminação do sistema olfatório, acredita-se que o ser humano possa identificar até 10.000 odores diferentes, sendo que cada odorante ativa um único conjunto de receptores olfatórios e possui, assim, uma "assinatura" própria. A partir daí, os sinais são encaminhados às regiões corticais correspondentes, levando a processos conscientes e à ativação do sistema límbico que gera um contexto emocional (Savic, 2002).

A proteína G_{olf} é uma proteína heterotrimérica composta de três subunidades: a subunidade α, denominada de $G\alpha_{olf}$, uma subunidade Gβ e uma Gγ. O acoplamento de receptores a proteínas G garante plasticidade às respostas, maior especificidade e uma regulação mais fina dos processos celulares. Os mamíferos, por exemplo, apresentam 20 tipos de subunidades Gα, 5 tipos de Gβ e 12 tipos de Gγ, que podem se associar em diferentes combinações e, assim, intermediar uma grande variedade de respostas celulares (Birnbaumer, 2007).

ORs se acoplam a $G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_{15}$ *in vitro*, porém, apesar de, em comparação à proteína $G\alpha_s$, ligar-se mais lentamente ao GTP e ativar em menor intensidade a ACIII em ensaios *in vitro* (Chan et al., 2011), sabe-se que a $G\alpha_{olf}$ apresenta o papel principal na detecção dos odorantes *in vivo* (Belluscio et al., 1998). Foi demonstrado em trabalhos do laboratório que a subunidade β predominante em OSN é $G\beta_1$ e a subunidade γ é a $G\gamma_{13}$ (Kerr DS et al., 2008). Dados recentes gerados no estudo de uma linhagem knockout condicional de $G\gamma_{13}$ demonstraram que a ausência da subunidade $G\gamma_{13}$ resulta na anosmia do animal. Isto comprova que fisiologicamente, a subunidade γ constituinte do heterotrímero da proteína G_{olf} na cascata de sinalização olfatória é exclusivamente a subunidade $G\gamma_{13}$ (Li et al., 2013).

Em condições em que o neurônio não está estimulado, o complexo $G\alpha_{olf}$ – GDP/ Gβγ predomina na membrana celular e a via de sinalização permanece inativa. A ligação de um odorante específico ao receptor causa uma alteração conformacional que leva a uma

diminuição de afinidade da proteína $G\alpha_{olf}$ pela molécula de GDP que se dissocia da proteína G. Assim, por estar em vantagem estequiométrica no citoplasma, uma molécula de GTP se liga à proteína $G\alpha_{olf}$. A ligação do GTP à subunidade Gα causa a dissociação da subunidade $G\alpha_{olf}$ – GTP, que segue ativando a cascata de segundos mensageiros descrita anteriormente.

O sinal de ativação é terminado pela hidrólise de GTP à GDP, catalisada pela atividade GTPásica intrínseca da subunidade Gα. Então, $G\alpha_{olf}$ – GDP se reassocia à Gβγ, reconstituindo o heterotrímero inativo.

Estudos utilizando camundongos *knockout* para $G\alpha_{olf}$, $G\gamma_{13}$, adenilil ciclase III ou o canal CNG olfatório indicaram que estas proteínas são fundamentais para a transdução de sinais de odorantes, pois aqueles camundongos são anósmicos, ou seja, são incapazes de sentir cheiros (Belluscio et al., 1998; Brunet et al., 1996; Li et al., 2013; Wong et al., 2000; Zheng et al., 2000).

Recentemente foi identificada em nosso laboratório uma proteína preferencialmente expressa nos neurônios olfatórios que interage com a $G\alpha_{olf}$ e é capaz de regular a sua atividade (Von Dannecker et al., 2005, 2006). Esta proteína, RIC-8B, apresenta uma identidade significativa na sua sequência de aminoácidos com a proteína RIC-8A e, *in vitro*, assim como RIC-8A, age como um fator trocador de guanina (GEF) (Chan et al., 2011; Tall et al., 2003).

1.3 RIC-8B

RIC-8B está entre as proteínas recentemente identificadas capazes de atuar como moduladores positivos de proteínas G. Miller e colaboradores (Miller et al., 1999) identificaram diversos mutantes de *C. elegans* que foram resistentes aos efeitos tóxicos de inibidores da colinesterase. Essa busca tinha por objetivo localizar proteínas que modulassem

a transmissão sináptica. As proteínas encontradas dessa maneira foram denominadas de **R**esistentes a **I**nibidores de **C**olinesterase (RIC) e entre elas estava a Ric-8.

No ano seguinte, o mesmo grupo publicou dois trabalhos tendo como tema principal a Ric-8, demonstrando o possível papel desta proteína em *C. elegans* no processo da transmissão sináptica (Miller et al., 2000) e embriogênese (Miller and Rand, 2000), por seu envolvimento na movimentação do centrossoma. Por esses dois aspectos, Ric-8 foi também designada como *Synembryn*.

No primeiro trabalho, Ric-8 foi localizada por imunohistoquímica no citoplasma de neurônios (Miller et al., 2000). Além disso, a análise do fenótipo de mutantes com perda ou redução de função para Ric-8 indicavam sua participação na liberação de acetilcolina por uma via envolvendo $G\alpha_o$ e $G\alpha_q$.

Em 2003, Tall e colaboradores (Tall et al., 2003) utilizaram, num ensaio de duplo híbrido, $G\alpha_s$ e $G\alpha_o$ como iscas na varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro de rato. Enquanto *C. elegans* e *Drosophila* apresentam apenas um gene Ric-8, os mamíferos apresentam dois genes que codificam para duas proteínas tipo Ric-8, denominadas de RIC-8A e RIC-8B. Apesar de estas proteínas apresentarem domínios bastante conservados ao longo de sua sequência, domínios estes anotados como "domínios de sinembrina" e apresentarem identidade de 44%, desempenham diferentes especificidades: RIC-8A atua como um fator trocador de guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factor* – GEF) para $G\alpha_{i/o/q}$ e não para $G\alpha_s$, enquanto que RIC-8B atua como GEF, *in vitro,* para $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf,}$ e não para $G\alpha_{i/o}$ (Chan et al., 2011). GEFs são proteínas que interagem com a subunidade alfa da proteína G ligada a GDP e, desligada das subunidades $G\beta\gamma$, estimulam a liberação do GDP, promovendo a ligação de GTP – que é mais abundante no citoplasma que o GDP.

Na busca por potenciais reguladores de G_{olf}, Von Dannecker e colaboradores (Von Dannecker et al., 2005) identificaram em nosso laboratório, através de um ensaio duplo híbrido numa biblioteca de epitélio olfatório tendo como isca a subunidade $G\alpha_{olf}$, RIC-8B. Esta proteína, além de ser expressa no epitélio olfatório maduro, também é expressa especificamente em regiões do cérebro como os núcleos estriado e acubens, e tubérculo olfatório. Apesar de $G\alpha_{olf}$ apresentar 85% de identidade em relação à proteína $G\alpha_s$, RIC-8B colocaliza-se exclusivamente com áreas de expressão de $G\alpha_{olf}$ no cérebro, excluindo áreas de expressão de $G\alpha_s$ – o que indica que provavelmente $G\alpha_{olf}$ é o alvo fisiológico de RIC-8B. Ensaios *in vitro*, desenvolvidos no mesmo estudo, demonstraram que a coexpressão de RIC-8B com receptores β2-adrenérgicos, ativados por isoproterenol, leva ao acúmulo de cAMP e a maior quantidade de $G\alpha_{olf}$ na membrana celular.

Nagai e colaboradores (Nagai et al., 2010) demonstraram que o *knockdown* de *Ric-8B* em células NIH3T3 reduziu drasticamente o acúmulo de cAMP em resposta ao receptor ativado com isoproterenol, assim como os níveis de $G\alpha_s$ na célula também caíram. E, em contraste a isso, a superexpressão de RIC-8B leva ao aumento da quantidade de $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$ nas células sem aumentar os níveis de mRNA.

Recentemente, Nagayoshi e colaboradores (Nagayoshi et al., 2008) realizaram uma mutagênese pela inserção de um transposon que interrompeu o gene *symbl* em zebrafish, este gene é filogeneticamente próximo ao gene *Ric-8B* de mamífero. A mutagênese gerou um fenótipo caracterizado pela agregação dos melanossomos, e pôde ser revertido pela adição de forskolina, um ativador da adenilil ciclase (Seamon and Daly, 1981), indicando que, em zebrafish, o produto de *symbl* está envolvido na ativação de uma via de sinalização por G_s.

Em *C. elegans* e *Drosophila*, Ric-8 está envolvida na divisão assimétrica de células mitóticas do sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário pelo seu envolvimento na

sinalização por proteínas G, que controla interações entre a membrana plasmática e microtúbulos do centrossoma (Miller and Rand, 2000; Miller et al., 2000). Nas drosófilas, Ric-8 também exerce um importante papel durante a gastrulação: em sua ausência, todas as proteínas G – incluindo $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ e G_β – não vão para a membrana celular. Isso indica que, além de seu papel como GEF, também pode estar envolvida na montagem e no transporte do heterotrímero (Hinrichs et al., 2012).

Em humanos, foi visto que a expressão de RIC-8B está significativamente reduzida em biópsias de epitélio olfatório de pacientes com doenças neurodegenerativas como Parkinson e esquizofrenia (Tajinda et al., 2010), nas quais um dos primeiros sintomas relatado pelos pacientes é a anosmia (Doty, 2012).

Até agora, os dados obtidos no laboratório indicam dois possíveis papéis para a RIC-8B *in vivo* em camundongos: (1) sua ação como GEF, amplificando o sinal de transdução da ligação do odorante ao seu receptor (Figura 5), como já demonstrado *in vitro* (Von Dannecker et al., 2006), justificando assim a alta sensibilidade do sistema olfatório, capaz de detectar odorantes a concentrações muito baixas, e (2) sua ação como um fator que auxilia a montagem do complexo G_{olf} e/ou aumenta o tráfego de G_{olf} a para a membrana.

Foi demonstrado que RIC-8B é capaz de amplificar o sinal de ativação de ORs via $G\alpha_{olf}$ em células heterólogas, auxiliando, assim, na expressão funcional dos ORs (Von Dannecker et al., 2006). Desde então essas proteínas acessórias (RTPs, RIC-8B) têm sido amplamente utilizadas em ensaios para a deorfanização de ORs em sistemas heterólogos (Keller et al., 2007; Saito et al., 2009; Zhuang and Matsunami, 2008).

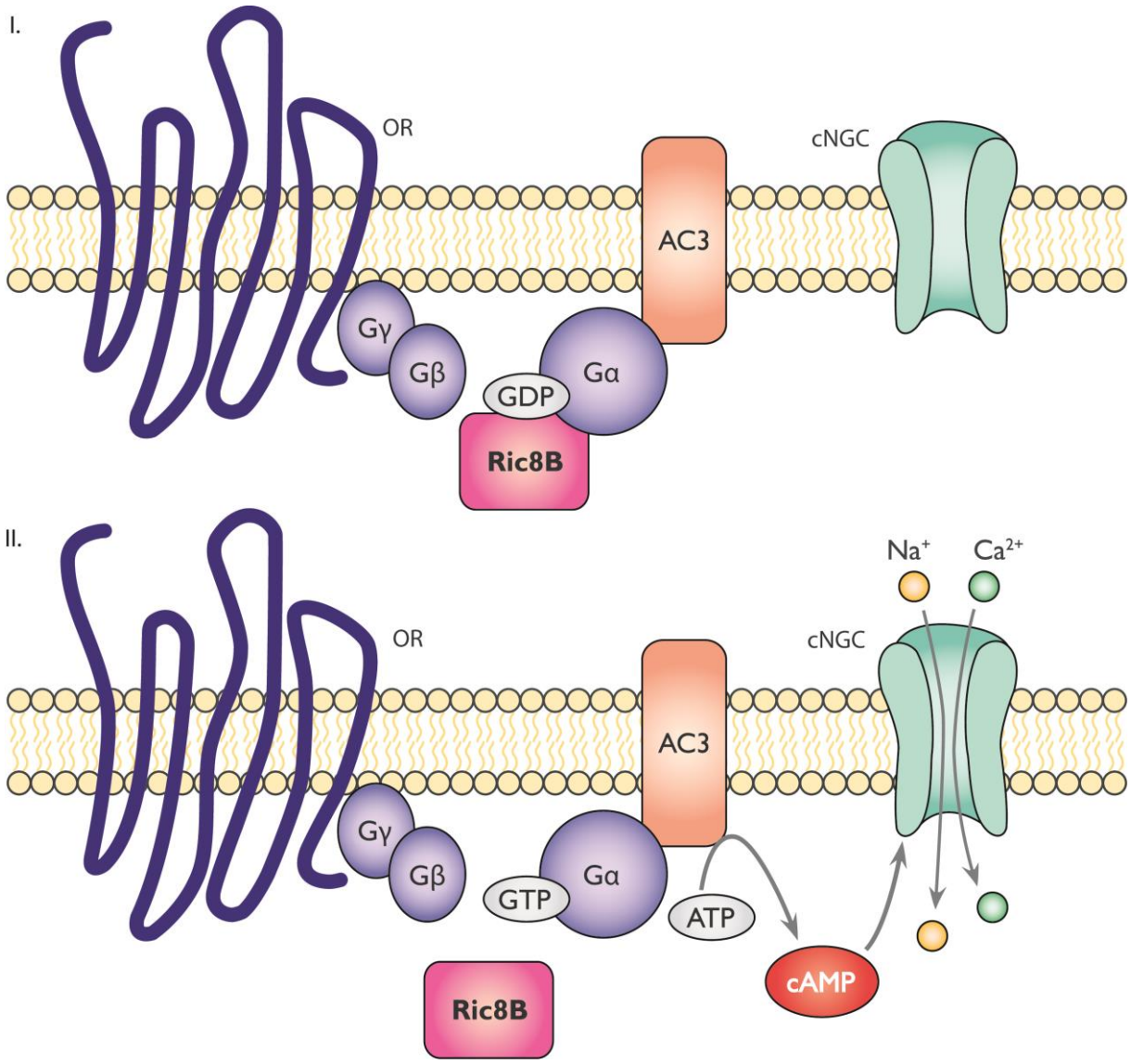


Figura 5| Possível papel de RIC-8B *in vivo* como GEF no neurônio olfatório – ativação da cascata de sinalização por via independente de ligante. Após a sinalização iniciada pela ligação de um odorante ao seu receptor específico (esquematizado na figura 4), a atividade GTPásica intrínseca de $G\alpha_{olf}$ converte GTP a GDP. O par $G\alpha_{olf}$-GDP então recupera sua afinidade às subunidades Gγ/β e tende a reconstituir o heterotrímero G_{olf}. Entretanto, se RIC-8B atuar como uma GEF na sinalização olfatória, ela interagiria com $G\alpha_{olf}$-GDP em sua forma monomérica ainda (**I.**) e catalizaria a saída de GDP. Com o sítio livre, por estar em maior concentração citoplasmática que sua forma inativa, GTP se liga à $G\alpha_{olf}$ e reativa a cascata de sinalização (**II.**) de forma independente à ligação do odorante.

Essa estabilidade hipotética da proteína G na membrana causada pela RIC-8B poderia ser mediada via uma diminuição do *turnover* da proteína G, levando ao aumento da meia vida da

proteína. Foi demonstrado que $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$ são modificadas covalentemente por ubiquitinação e degradadas via proteassomo e que a coexpressão de RIC-8B, *in vitro*, impede essa ubiquitinação (Nagai et al., 2010). Portanto, o aumento de cAMP seria causado, na verdade, pela estabilização da proteína $G\alpha_{s/olf}$ via ligação de RIC-8B, que impede o acesso da proteína E3 ubiquitina ligase. É possível que a amplificação de sinal ocasionado pela proteína RIC-8B deva-se tanto à diminuição da degradação de $G\alpha_{olf}$ quanto à atividade de GEF, dependente de fatores adicionais encontrados nas células ou em sua conformação nativa e, ainda, pelo aumento do tráfego de G_{olf} para a membrana.

Para determinar, de fato, o mecanismo de ação da RIC-8B, faz-se necessária a análise de sua função *in vivo* no microambiente dos neurônios olfatórios em que estejam presentes possíveis proteínas que interajam com ela, assim como toda a interação estrutural da maquinaria de sinalização nos cílios e também a estrutura do próprio cílio.

Com esse objetivo, neste trabalho, nos propusemos a analisar a proteína num modelo animal *knockout* para *Ric-8B* comparado morfológica e fisiologicamente ao animal selvagem.

1.4 Camundongos *knockout*

O uso de animais transgênicos, principalmente os animais *knockout*, tem sido uma abordagem indispensável para o estudo da função de proteínas *in vivo*. Assim como em estudos de complementação gênica bacteriana e sistemas de *knockdown* por Morpholino em *Xenopus* ou *Zebrafish*, a função da proteína alvo é aferida pelo fenótipo molecular e/ou fisiológico obtido pela inativação ou retirada dela do sistema com o qual está envolvida.

Há muitas variações entre as tecnologias utilizadas para a produção de uma linhagem de camundongo *knockout*. Elas dividem-se primariamente em *knockout* de um gene alvo ou de

um gene randômico. Para o segundo caso, a técnica mais utilizada é o GeneTrap. Esta técnica baseia-se na eletroporação de uma linhagem de células-tronco derivadas da massa primordial retirada de blastocistos, permitindo a entrada de vetores, denominados genetrap, para o interior do núcleo das células-tronco e a inserção randômica deles pelo genoma. Esses vetores apresentam, essencialmente, um gene repórter, como o da β-galactosidade; um gene de seleção, como o de resistência a algum antibiótico, e um sítio aceptor de splicing, como exemplificado mais à frente na Figura 8.

As células-tronco modificadas são cultivadas sob a seleção de um antibiótico e, então, são injetadas em blastocistos de camundongos selvagens, usualmente de uma linhagem de pelagem distinta da linhagem de origem das células-tronco (Figura 6). Após a injeção, os blastocistos são incubados em um meio de cultura rico para estabilização e recuperação dos blastocistos; e então, são inseridos no útero de uma fêmea selvagem pseudográvida induzida hormonalmente para que facilite, assim, o processo de implantação do embrião modificado.

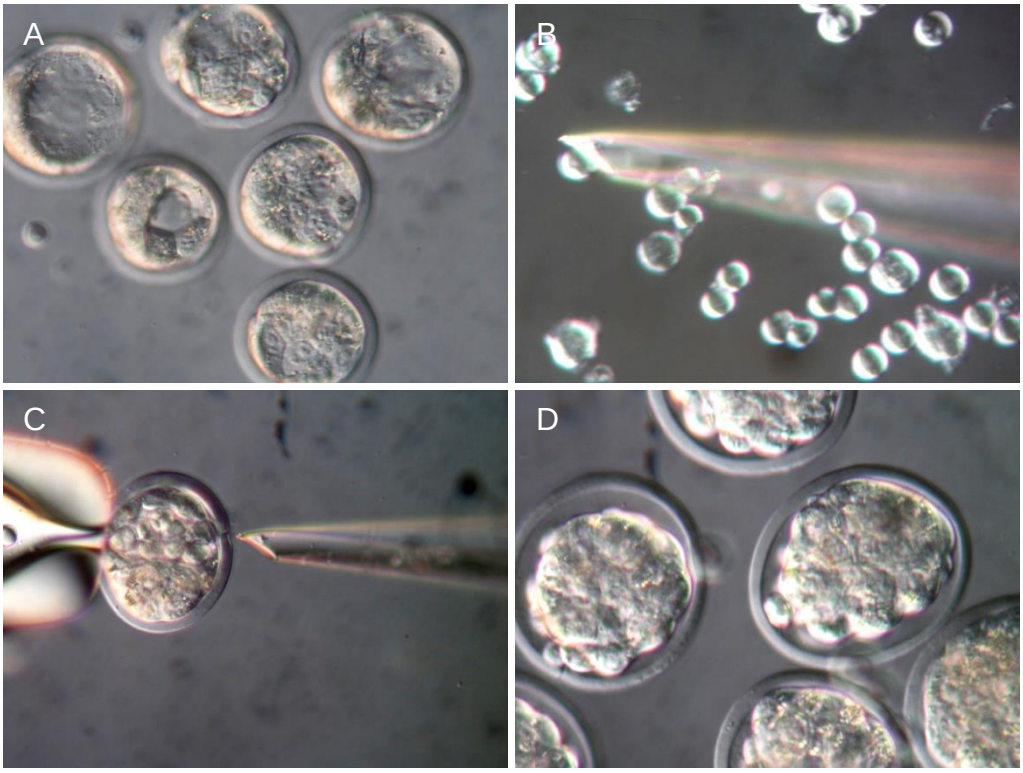


Figura 6| Injeção de células-tronco embrionárias nos blastocistos. Os blastocistos são retirados de camundongos fêmeas selvagens (A). As células-tronco embrionárias modificadas geneticamente são dispersas em meio de cultura e coletadas com uma micropipeta (B) e injetadas no interior dos blastocistos selvagens (C) com cuidado para não danificar a massa de células primordiais do blastocisto e para que as células injetadas não extravasem. Então, os blastocistos injetados permanecem em meio de cultura suplementado em estufa a 37 ºC (D) até a cirurgia para sua implantação no útero das mães pseudográvidas. Imagens gentilmente cedidas pela Dra. Heloísa Allegro, CEDEME/Unifesp.

Uma importante limitação dessa técnica é que aproximadamente 15% dos *knockouts* gênicos são embrionicamente letais, o que significa que os embriões geneticamente alterados não são capazes de atingir a idade adulta.

A falta do animal adulto limita os estudos sobre a função da proteína apenas durante o desenvolvimento e, em alguns casos, a proteína pode apresentar diferentes funções fisiológicas e moleculares em adultos, comparado à sua função embrionária. Outra limitação da técnica é que a perda de função durante o desenvolvimento pode levar a alterações futuras

que não causem a interrupção do desenvolvimento, mas influenciem ou mascarem o efeito da proteína alvo no animal adulto.

Ambas as limitações podem ser resolvidas pelo uso de modelos de *knockout* condicionais. Entretanto, a tecnologia de construção de linhagens *knockout* através de recombinação homóloga é mais trabalhosa e exige o cruzamento de, pelo menos, duas linhagens diferentes de animais modificados para a obtenção do camundongo *knockout* adulto.

Apesar de todas as limitações, o uso de animais *knockout* é essencial para a comprovação do papel fisiológico da proteína devido à complexidade biológica de um organismo vivo, que é impossível de ser mimetizada *in vitro* num sistema fechado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Compreender a função da proteína RIC-8B *in vivo.*

2.2 Objetivos Específicos

PARTE I

- Gerar uma linhagem de camundongo *knockout* para a proteína RIC-8B;
- Caracterizar o fenótipo dos animais mutantes assim como as consequências da inativação do gene *Ric-8B*;
- Determinar a localização da expressão de *Ric-8B* a nível tecidual e celular.

PARTE II

- Comparar as sequências de aminoácidos de *Ric-8B* em diversas espécies.
- Analisar a expressão do gene *RIC-8B* humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expansão das linhagens celulares RRA103 e RHH188

Descongelamos as alíquotas das células-tronco, tanto da linhagem RRA103 como a da linhagem RHH188, em um banho a 37ºC. Cada tubo continha 1,8 x 10^6 células em 1 ml de meio de congelamento (DMSO 10% em GMEM – Sigma cat.# G5154). O conteúdo foi ressuspendido em 9 ml de meio GMEM suplementado com glutamina 2mM (Invitrogen cat. # 25030-024), piruvato de sódio 1mM (Invitrogen cat. # 11360-039), 1x aminoácidos não-essenciais (Invitrogen cat. # 11140-035), soro fetal bovino 10% (v/v) (Invitrogen cat. # 16000-036) inativado por temperatura (30 min a 56 ºC); 1:1000 da solução estoque de β-mercaptoetanol (70 µl de β-mercaptoetanol – Sigma cat.# G5154) em 20 ml de água destilada e deionizada – Invitrogen cat. # 15230-071 filtrada em filtro 0,22 µm – TPP cat. # 99522). Centrifugamos a solução de células (volume final 10 ml) numa centrífuga modelo Eppendorf 5702 por 3 min a 1200 rpm. Ressuspendemos o pellet de células em 5 ml de meio GMEM aquecido a 37ºC e distribuímos a solução num poço de uma placa de cultura de seis poços, previamente recoberta por uma solução de gelatina bovina 0,1% (Sigma cat.# G1393) em DPBS (Invitrogen cat. # 14190-094). Ao final, a cultura foi suplementada com 1000 unidades/ml de fator inibitório de leucócito (LIF, Sigma cat.# L 5158).

No dia seguinte, trocamos o meio de cultura para evitar que as células permanecessem um período prolongado em contato com DMSO residual, já que este induz à diferenciação das células-tronco, além de ser citotóxico em temperaturas superiores a 0ºC.

Repicamos as células, a cada dois dias, na diluição de 1:5 em garrafas de cultura (TPP) de 25 cm^2 e as submetemos à seleção em meio GMEM 150 µg/ml G418. Mantivemos as culturas

na confluência mínima de 50% e máxima de 70%. Trocamos o meio de cultura a cada dia alternante ao repique.

3.2 Extração de RNA total a partir das células-tronco

Para a extração do RNA, cultivamos as células-tronco até 100% de confluência em um poço de uma placa de seis poços. Rompemos as células com 1 ml de Trizol e o lisado resultante foi incubado por 5 min à temperatura ambiente. Adicionamos 200 µl de clorofórmio e agitamos os tubos vigorosamente por 15 seg. Em seguida, deixamo-los à temperatura ambiente por 3 min. Após a incubação, centrifugamos os tubos por 15 min a 12000 x g, a 4ºC. Transferimos o sobrenadante incolor para um tubo novo, adicionamos 500 µl de isopropanol 100% e o incubamos por 10 min à temperatura ambiente. Então, centrifugamos o tubo por mais 10 min a 12000 x g, a 4ºC. Lavamos o precipitado com 1 ml de etanol 75% em água RNase free, vortexamos e o centrifugamos novamente por 5 min a 7500 x g, 4 ºC. Deixamos os pellets à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Ressuspendemos o RNA resultante em 20 µl de água RNase free (~5 µg/ µl) e os mantivemos a -80ºC até o uso.

3.3 RT-PCR

Para a reação de transcrição reversa, ressuspendemos 5 µg de RNA total extraído em água RNase free no volume final 14,5 µl, adicionamos 1 µl de oligo dT 20µM e incubamos a mistura por 2 min a 70 ºC. Em seguida, passamos o tubo para o gelo por 1 min e adicionamos 2 µl de tampão de RT 10X, 1 µl 10 mM dNTP mix, 0,5 µl RNase out (40 U/µl), 1 µl Superscript II (200 U/µl), totalizando um volume final de 20 µl. Incubamos o tubo por 1 h a

42 ºC e, depois, por 5 min a 95ºC. Diluímos a reação final contendo o cDNA para o volume de 40 µl com água RNase free e a estocamos a -20 ºC.

3.4 PCR para confirmação da inserção do vetor pGT01 no gene *Ric-8B*

Para checar as construções das células-tronco recebidas, desenhamos os seguintes primers: **βgeoR** (GACAGTATCGGCCTCAGGAAGATCG), comum às duas construções, e **RRH188F** (GTGACGGTAGACAGTTGGAAGGTGC) e **RRA103F** (CGGAGTCAAGCAGATTGCTGCTGAG), para cada um dos clones.

Para cada reação, preparamos uma mistura composta por 2,5 µl tampão 10X; 1,0 µl $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 µl dNTPs 10 mM; 0,6 µl primer foward 20 µM (RRA103F ou RRH188F); 0,6 µl primer reverse 20 µM (βgeoR); 0,25 µl *Taq* Platinum (5 U/µl); 13,53 µl H_20; 6 µl cDNA; totalizando um volume final de 25 µl por reação.

Inicialmente, as reações foram desnaturadas por 5 min a 95 ºC e passaram por 30 ciclos de amplificação com os seguintes passos: 45 seg a 95 ºC, 45 seg a 60 ºC e 1 min a 72 ºC, e 10 min a 72 ºC e, por fim, estocados a 4ºC.

O tamanho do produto amplificado por esta reação foi aferido via eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE, revelado por brometo de etídeo e comparado com o peso molecular Low DNA Mass Marker (Invitrogen Cat # 10068-013).

3.5 Coloração das culturas de células-tronco com X-gal

O gene da β-galactosidase constitui parte do vetor de interrupção do gene *Ric-8B* nas linhagens de célula tronco modificadas. Portanto, a expressão de β-galactosidase no meio

verificada pela quebra do substrato X-gal indica, consequentemente, a integração do vetor no genoma das células-tronco embrionárias e a não expressão de nossa proteína-alvo.

Realizamos os ensaios em poços de placa de 6 poços com 80% de confluência de células de cada um dos clones. Aspiramos o meio de cultura, lavamos as células com PBS 1X e fixamos as células por 5 min à temperatura ambiente com tampão fosfato 0,1M, EGTA 5mM, $MgCl_2$ 2mM e glutaraldeído 0,2%. Em seguida, lavamos rapidamente duas vezes com tampão fosfato 0,1 M, $MgCl_2$ 2mM. Diluímos uma solução estoque de X-gal 50mg/ml em dimetilformamida (DMF) para a concentração final de 1mg/ml em tampão fosfato 0,1M, $MgCl_2$ 2mM, ferrocianeto de potássio 5 mM e ferricianeto de potássio 5 mM, filtramos esta solução para prevenir a formação de cristais. Incubamos as células com 0,2 ml desta solução por poço a 37ºC por um período de 16h em uma câmara úmida protegida da luz. Ao final da incubação, lavamos as células com tampão fosfato 0,1 M, $MgCl_2$ 2mM e as fixamos com o tampão de fixação utilizado anteriormente. Verificamos a coloração das células ao microscópio invertido de luz Nikon Eclipse, ao aumento de 400x.

Como controle negativo da reação, aplicamos o mesmo protocolo, com os mesmos reagentes, numa cultura de células da linhagem HEK 293T que não apresenta atividade endógena de β-galactosidase.

3.6 Imunofluorescência em células-tronco

Cultivamos células-tronco das duas linhagens por 24h em GMEM a 37ºC e 5% CO_2 sobre lamínula revestida com polilisina.

Fixamos as células-tronco com paraformaldeído 4% em PBS por 15 min. Lavamos as lamínulas por três vezes com PBS estéril e depois as permeabilizamos com Triton X-100

0,1% em PBS por 3 min. Após lavarmos as lamínulas três vezes com PBS 1X para retirar o excesso do detergente, bloqueamos os sítios inespecíficos com BSA 1% em PBS 0,02% azida por 15 min. Então, adicionamos os anticorpos primários, diluídos nesta mesma solução de bloqueio e incubamos as lamínulas nessa solução por 1h30min à temperatura ambiente numa câmara úmida.

Após o período de incubação, lavamos novamente as lamínulas, por três vezes, com PBS 1X e as incubamos novamente por 1h numa câmara úmida, à temperatura ambiente, numa solução PBS 1X com os anticorpos secundários Alexa 594 (vermelho) e 488 (verde) (Molecular Probes), na diluição de 1/300 cada, e DAPI 0,01mM, para visualização dos núcleos. As lamínulas foram montadas em lâminas sobre uma gota de solução *anti-fading* (parafenilenodiamina 0,9 mM, glicerol 90% e PBS 0,01M pH 8,6 10%).

As imagens foram adquiridas em microscópio invertido Nikon Eclipse no aumento de 1000x.

3.7 Estabelecimento das colônias de camundongo: transmissão do vetor

Os camundongos quimeras chegaram ao biotério IQ/USP já com cinco meses de idade. Assim como os camundongos quimeras, toda a colônia estabelecida foi mantida em estante ventilada em sala de experimentação isolada e as gaiolas foram manipuladas apenas em fluxo laminar. Após uma semana de adaptação iniciamos o cruzamento destas quimeras com camundongos selvagens C57BL6/J (Figura 7.e). A presença do vetor na prole (Figura 7.f) indicaria se houve contribuição das células-tronco nocauteadas para a formação das gônadas dos quimeras, o que possibilita a transmissão da interrupção do gene às gerações seguintes. Portanto, iniciamos o processo de fundação das colônias. Os cruzamentos dos camundongos quimeras RHH188 foram desenhados na proporção de um macho quimera para duas fêmeas selvagens por gaiola. Como no caso da linhagem RRA103 só obtivemos um macho quimera (ao contrário da

linhagem RHH188 em que todos os camundongos são machos), arquitetamos também um cruzamento de três fêmeas quimeras para um macho selvagem/ gaiola e duas fêmeas quimeras para um macho selvagem/gaiola. A verificação da transmissão do vetor foi realizada de acordo com a cor da pelagem da prole: negativa para pelagem preta que é recessiva (remetente à linhagem C57BL6/J) e positiva para 50% dos camundongos de pelagem *agouti* (respectiva à linhagem de camundongo 129). Espera-se que apenas metade dos camundongos derivados das células-tronco modificadas tenha *Ric-8B* nocauteado porque somente um dos alelos das células 129/Ola possuía a inserção do vetor.

Para um maior rendimento dos cruzamentos, selecionamos machos selvagens idealmente com cerca de 4 meses e fêmeas selvagens com cerca de 3 meses. A idade máxima dos camundongos que utilizamos em todos os cruzamentos foi de 7 meses.

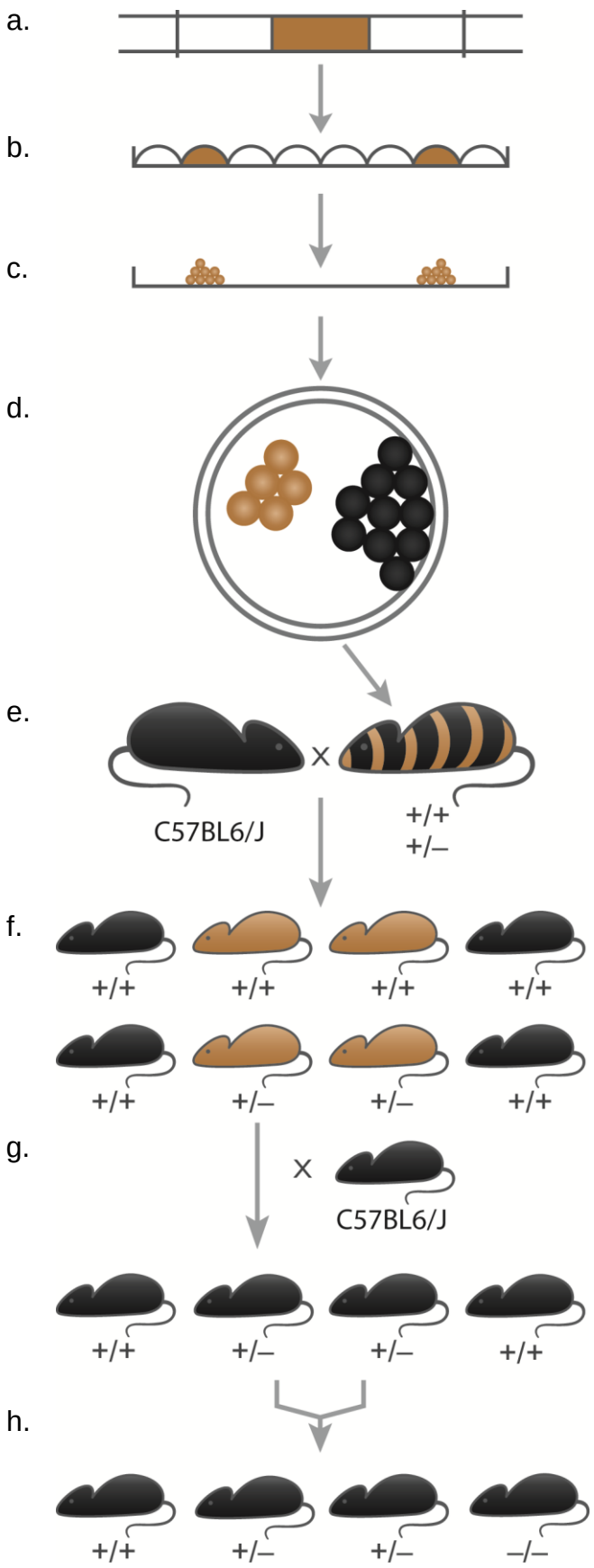


Figura 7| Plano de cruzamentos para a criação de colônia das linhagens RRA103 e RHH188 e obtenção dos camundongos *knockout*. (a) Gene da RIC-8B (em branco) interrompido pela inserção do vetor (marrom).

(b) Cultura de células-tronco com o vetor (marrom) e sem o vetor (branco). (c) Seleção das células-tronco com o vetor por geneticina (G418) e cultivo das células. (d) Inserção das células-tronco com o vetor (marrom) num blastocisto de camudongo C57BL6/J (células-tronco da massa celular interna do blastocisto aceptor em preto). Após a injeção os blastocistos são injetados no útero de camundongos fêmeas pseudo-grávidas C57BL6/J. (e) O camundongo quimera gerado (rajado, marrom e preto) é cruzado com um camundongo C57BL6/J selvagem, que é o *background* genético desejado para esta linhagem e o alelo do gene para pelagem preta é recessivo, ou seja, todo camundongo proveniente de gameta carregando o DNA da célula-tronco injetada, com a RIC-8B nocauteada, será marrom. (f) Dos filhotes obtidos do cruzamento do animal quimera, espera-se que cerca de 50% dos animais *agouti* sejam heterozigotos, pois somente um dos alelos da *Ric-8B* foi interrompido pelo vetor. (g) Retrocruzamentos: para que a linhagem seja estabelecida no background genético C57BL6/J, é necessário retrocruzar um camundongo heterozigoto (*Ric-8B*$^{+/-}$) com um camundongo selvagem C57BL6/J por dez gerações. (h) Cruzamentos programados: espera-se obter um camundongo KO (*Ric-8B*$^{-/-}$) a partir do cruzamento de dois camundongos heterozigotos.

3.7.1 Retrocruzamentos

Como descrito, os camundongos quimeras foram gerados a partir de células originárias de duas linhagens distintas de camundongo: 129/Ola e C57BL6/J. Portanto, os camundongos derivados destas novas linhagens *knockout* apresentam background genético misto que impossibilita seu uso comparativo com modelos já estabelecidos. Como o modelo de estudo consolidado do sistema olfatório é o camundongo da linhagem C57BL6/J, decidimos estabelecê-los no background genético C57BL6/J. Para tanto, selecionamos camundongos genotipados heterozigotos provenientes do melhor casal (maior frequência de nascimentos, maior prole, filhotes mais saudáveis e menor índice de natimortos ou canibalismo), em geral, fêmeas da segunda ou terceira cria, e as cruzamos com machos selvagens C57BL6/J provenientes do biotério IQ/USP (Figura 7.g). Para cada geração foram criados quatro casais, estes descartados apenas quando os casais selecionados da geração seguinte já tiverem cruzado e obtido nascimentos. Para alcançar um índice de 99,9% de pureza do background genético, são necessários 10 retrocruzamentos. Como este processo leva de 2 a 3 anos, após 3

retrocruzamentos (camundongos com aproximadamente 87,5% do perfil genético C57BL6/J), iniciamos as tentativas de obtenção do camundongo *knockout* a fim de padronização das técnicas.

3.7.2 Cruzamentos programados

Para obter o camundongo *knockout* (*Ric-8B*$^{-/-}$) selecionamos um macho e duas fêmeas, todos heterozigotos (Figura 7.h), também provenientes dos melhores casais.

Para a obtenção dos embriões, cada macho foi separado numa gaiola. Após dois dias, cada macho foi novamente colocado numa nova gaiola e as fêmeas (duas por macho), foram colocadas nas gaiolas iniciais, sujas pelo macho. As fêmeas permaneceram por pelo menos dois dias na gaiola do macho, a fim de serem estimuladas pelos feromônios dos machos a entrar em estro, e assim, férteis, serem aceitas pelo macho e aumentar a probabilidade de fecundação. Após este período, as fêmeas foram colocadas na gaiola do macho no final do dia para acasalar. No início do dia seguinte checamos a presença do plug vaginal duas vezes, no intervalo de duas horas. A formação do plug indica que houve cópula, mas não garante fecundação. Quando houve plug, as fêmeas foram separadas em outra gaiola e conta-se como dia E0,5. As fêmeas que não apresentaram o plug também foram separadas, pois a ausência do plug pode ter se devido à reabsorção ou queda do plug. Se após 15 dias não houve sinal de gravidez, o casal pôde ser acasalado novamente.

3.8 Genotipagem da prole proveniente dos retrocruzamentos

Assim que a prole completava 21 dias e era desmamada, coletávamos uma pequena secção da orelha de cada camundongo identificado com furador. As coletas ocorreram no interior de um

fluxo laminar esterilizado, e para cada animal, utilizamos uma tesoura e uma pinça autoclavadas.

Para extrair o DNA genômico de cada material adicionamos 300 µL de NaOH 50mM fresco a cada tubo eppendorf de 1,5ml contendo a secção de orelha. O tecido foi incubado por 5 min a 95ºC e então vortexado por 1 min. Novamente incubado por 5 min a 95ºC, vortexado por 1 min e então, acrescentamos 25 µL de Tris 1M, pH 6,5 a cada tubo e centrifugamos as amostras por 5 min a 13200 x g. Após centrifugação, recolhemos o sobrenadante num novo tubo previamente identificado.

Como necessitamos apenas identificar o vetor para determinar se o camundongo é heterozigoto ou não, utilizamos dois primers internos ao vetor, cujo produto fosse curto e facilmente amplificável. Como primer reverse utilizamos o primer βgeoR, anteriormente descrito e o primer **VectorF2**, cuja sequência é:TTATCGCAGATCTGGACTCTAGAGG. O produto deste PCR apresenta 258pb.

Para cada reação, preparamos uma mistura composta por 2,5 µl de tampão da enzima 10X; 0,75 µl $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 µl dNTPs 10 mM; 0,6 µl primer foward 20 µM (VectorF2); 0,6 µl primer reverse 20 µM (βgeoR); 0,25 µl *Taq* Platinum (5 U/µl); 16,3 µl H20; 3,5 µl DNAg; totalizando um volume final de 25 µl por reação.

As amostras foram submetidas então ao seguinte programa: 95ºC por 3 min, 35 ciclos de 95ºC por 45 seg, 58ºC 45 seg, 72 por 1min e então 72ºC por 10 min e armazenado a 4ºC.

A amplificação do PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE, revelado por brometo de etídeo e comparado com o peso molecular Fast Ruler (Fermentas).

3.9 Identificação do ponto de inserção do vetor pGT01 na linhagem RHH188

A fim de identificar camundongos selvagens (*Ric-8B*$^{+/+}$), heterozigotos (*Ric-8B*$^{+/-}$) e homozigotos (*Ric-8B*$^{-/-}$) da linhagem RHH188, foi necessário localizar o ponto de inserção do vetor no íntron 3 do gene *Ric-8B*, para que assim fosse possível desenhar primers para a reação de genotipagem por PCR.

O íntron 3 apresenta cerca de 10kb de extensão. Como a *Taq* Polimerase convencional permite a amplificação ótima de fragmentos de até 2kb, baseados no genoma putativo da linhagem de camundongo 129/Sv depositada na internet, desenhamos cinco primers foward distantes um do outro mais ou menos 2kb, cobrindo todo o íntron (primers: RHH188F 188intronF1, 188intronF2, 188intronF3, 188intronF4). Em cada reação de PCR, para cada primer foward, utilizamos o primer reverso vector R, presente no vetor. Assim, obteríamos um fragmento de tamanho mais fácil de ser amplificado e identificaríamos o sítio de integração.

Para cada reação, preparamos uma mistura composta por 2,5 µl tampão Rxn *Taq* Platinum 10X; 0,75 µl $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 µl mix dNTPs 10 mM; 0,5 µl de um dos primers foward 20 µM; 0,5 µl primer reverse 20 µM (VectorR); 0,25 µl Taq Platinum (5 U/µl); 19 µl H_20; 1 µl DNAg; totalizando um volume final de 25 µl por reação.

As reações foram denaturadas por 3 min a 95 ºC e passaram por 35 ciclos de amplificação de 45 seg a 95 ºC, 45 seg a 68 ºC e 1 min a 72 ºC, então 10 min a 72 ºC e por fim armazenados a 4ºC.

O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e comparado com os pesos moleculares High Mass Ladder e Low Mass Ladder.

3.10 Estratégia de genotipagem padronizada

A genotipagem utilizada para a linhagem RHH188 é um PCR multiplex com os primers 188intronF2, 188intronR2 e Vector R.

O produto do par 188intronF2 e 188intronR2 apresenta 582pb e somente é amplificado quando o alelo não foi interrompido pelo vetor. O produto do par 188intronF2 e VectorR apresenta um tamanho bem distinto do primeiro, somente 150 pb e só é amplificado se houver inserção do vetor no alelo.

Para cada reação, preparamos uma mistura composta por 2,5 µl tampão Rxn *Taq* Platinum 10X; 0,75 µl $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 µl mix dNTPs 10 mM; 0,5 µl do primer 188íntronF2 20 µM; 0,5 µl do primer 188íntronR2 20 µM; 0,5 µl primer Vector R 20 µM; 0,25 µl Taq Platinum (5 U/µl); 19 µl H_20; 1 µl DNAg; totalizando um volume final de 25 µl por reação.

As reações foram submetidas a 3 min a 95 ºC e 35 ciclos de amplificação de 45 seg a 95 ºC, 45 seg a 68 ºC e 1 min a 72 ºC, então 10 min a 72 ºC e por fim estocados a 8ºC.

O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e comparado ao marcador Fast Ruler (Fermentas).

3.11 Ensaio de coloração de tecidos, lâminas e embriões por X-gal

O gene da β-galactosidase constitui parte do vetor de interrupção do gene *Ric-8B*. Portanto, a expressão de β-galactosidase, verificada pela quebra do substrato X-gal, consequentemente indica a integração do vetor no genoma das células, sob o controle de expressão do promotor do gene *Ric-8B*, isto é, a atividade de β-galactosidase exógena observada num tecido indica que, naquele tecido selvagem, a proteína RIC-8B é expressa.

Os animais foram anestesiados com dose letal da mistura quetamina/xilazina (1/10) e perfundidos com solução salina 0,9%. Este processo de lavagem é necessário para retirar o excesso de sangue dos órgãos e permitir uma melhor visualização da coloração azul ou não. Para o ensaio de *whole mount* os órgãos foram dissecados em PBS 1X gelado e incubados no tampão 1 (100 mM tampão fosfato pH 7,4; 4 % PFA; 2 mM $MgSO_4$; 5 mM EGTA) por 30 min no gelo; lavados uma vez por 5 min com o tampão A (100 mM tampão pH7,4; 2mM $MgCl_2$; 5mM EGTA) e incubados por 30 min no tampão A, à temperatura ambiente. Então o tecido foi retirado e lavado por duas vezes, 5 min cada, no tampão B (100 mM tampão fosfato pH 7,4; 2 mM $MgCl_2$; 0,01 % desoxicolato de sódio; 0,02 % NP-40) e incubado por 16h à 37ºC, protegido da luz, no tampão C (tampão B, 5 mM ferricianeto de potássio, 5mM ferrocianeto de potássio, 1mg/ml de X-gal). Após a coloração, o tecido foi lavado uma vez no tampão A por 5 min e mantido no tampão 1 a 4ºC.

As lâminas foram confeccionadas a partir do epitélio olfatório e do cérebro de animais de 3 semanas de idade. Os animais foram sacrificados por saturação de CO_2. Os tecidos foram dissecados e emblocados frescos em OCT. Os blocos foram incubados a -20ºC por cerca de 2h e cortados e processados no mesmo dia. Os cortes de 20 µm foram fixados por 15min do tampão 1 e então, após o passo de fixação pelo tampão 1, o mesmo protocolo, descrito acima, foi seguido.

Para a obtenção dos embriões, as fêmeas grávidas foram sacrificadas no dia embrionário desejado por injeção de dose letal de quetamina/xilazina (1/10). Os embriões foram dissecados e o mesmo protocolo para coloração das lâminas foi seguido.

3.12 Genotipagem dos embriões

Para a genotipagem dos animais, utilizamos o DNAg do saco embrionário e placenta, extraído pelo mesmo método utilizado na extração do DNAg dos fragmentos de orelha descrito anteriormente e genotipados por PCR.

3.13 Quantificação indireta da expressão de RIC-8B total por X-gal

Preparamos o extrato proteico total de diferentes tecidos, de acordo com protocolo adaptado de Kawaguchi et al., 2008. Os tecidos foram rapidamente dissecados e submersos em tampão 0,1M KH_2PO_4 pH7,4 gelado, PIC (*protease inhibitor cocktail*, Sigma). A seguir, os tecidos foram homogeneizados no gelo com um homogeneizador (Polytron, Kinematica PT1200, Fisher Scientific) e depois sonicados com dois pulsos de 15 seg, intervalo de 30 seg à potência de 20%. O lisado foi então centrifugado por 30 min a 10.000 x g a 4ºC, o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -80ºC.

Os extratos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para a realização do ensaio, padronizamos a quantidade de 300 µg de proteína total por poço (placa de 96 poços), sendo cada amostra avaliada em triplicata. O volume total de 200 µl foi completado com tampão 0,02M KH_2PO_4 pH 7,4. 100 µl dessa reação foram separados como "branco" de cada reação e aos outros 100µl restantes foi adicionado 25 µg de X-gal. A placa foi incubada a 37ºC ON.

No dia seguinte, foi realizada a leitura da placa para o comprimento de onda de 635 nm, onde o substrato da quebra do X-gal é detectado.

3.14 Imunofluorescência em cortes de epitélio olfatório

O procedimento para emblocar as peças de epitélio olfatório em OCT é o mesmo descrito anteriormente para a coloração dos cortes por X-gal. Porém, os cortes para imunofluorescência foram realizados na espessura de 12 µm e da mesma forma, estocados a -80ºC.

No dia de início do procedimento, as lâminas foram retiradas do freezer e deixadas à temperatura ambiente até atingirem o equilíbrio. Então, as áreas das lâminas foram delimitadas com o marcador PapPen (Kiyota Inc.) e os cortes foram fixados por 10 min a 4ºC em 4% PFA em HEPES e depois por 50 min a 4ºC em 8% PFA em HEPES. Após incubação, os cortes foram lavados por três vezes em PBS 1x e permeabilizados por 30 min em 0,5% Triton X-100 em PBS e em seguida, por 15 min em 0,5% SDS em PBS. Então, os cortes foram lavados por três vezes em PBS 1x. Os sítios inespecíficos foram bloqueados por 2h30min com 10% soro de galinha em PBS. O anticorpo primário (anti-RIC-8B, anti-$G\alpha_{olf}$, anti-tubulina acetilada, anti-gama tubulina ou anti-Ggama13) foi diluído em 1% BSA em PBS e incubado por 16h a 4ºC. Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes por 10 min cada vez, com 0,2% Triton X-100. A seguir, os cortes foram incubados por 1h com o anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo (Alexa 594, 488 ou 546) diluídos em PBS 1x acrescido de DAPI 1:2000. Os cortes foram lavados por três vezes em 0,2% Triton X-100 em PBS por 10 min. Por último o corte foi lavado em PBS 1x e montado sob lamínula em Vecta Shield (Vector Labs).

As imagens foram adquiridas em microscópio Olympus BX61 acoplado a câmera Hamamatsu modelo C10600 através do software Cell M e deconvoluídas no software Autoquant X 2.1, no laboratório do Prof. Sergio Schenkman (UNIFESP) e também adquiridas em microscópio

Nikon Eclipse Ti através do software NIS e deconvoluídas pelo módulo de deconvolução do mesmo programa, no laboratório do Prof. Frederico Gueiros (IQ-USP).

3.15 Amplificação da RIC-8B Humana

Os cDNAs das amostras de RNA NF 7T e NF 9T, provenientes de tecido tumoral da cavidade nasal e maxila respectivamente, foram obtidos por RT-PCR utilizando primers randômicos ou oligoDT. Os cDNA dos demais tecidos humanos foram obtidos por RT-PCR a partir de um painel comercial de RNA total humano (Clontech).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com protocolo descrito anteriormente, com um par de primers específicos para a *RIC-8B* humana (Foward: TACTCAGAGGATGAGGACACACAC e Reverse: GTCTAACTGCAGCTCTGTATGA ATG), Tm = 60ºC, situados em éxons diferentes: 8 e 10, respectivamente, de modo a excluir a possibilidade de contaminação de DNA genômico e verificar a existência de uma isoforma inativa, correspondente à *RIC-8B*Δ9 dos camundongos, descrita em camundongos (Von Dannecker et al., 2005). O tamanho do produto esperado é de 371 pb. Como controles, utilizamos primers para GAPDH humano (Foward: CTGCACCACCAACTGCTTA e Reverse: CATGACGGCAGGTCAGGTC) e OMP humano (Foward: TGGACATGCCGCTGGTCCTG e Reverse: CCACGGAGGCCTTGAGGTTG). Para todas as reações foram realizados 35 ciclos.

3.15.1 Ligação

Os produtos de PCR do *RIC-8B* foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% para uma melhor resolução. As bandas foram retiradas do gel separadamente e purificadas

(Bioneer). Os produtos purificados foram clonados em pCR 4 e pCR II, respectivamente pelos kits comerciais TopoTA Cloning – Version J (Invitrogen) e TA Cloning Dual Promoter – Version I (Invitrogen) de acordo com as intruções.

3.15.2 Transformação de bactérias

Para a transformação, foram utilizadas tanto bactérias DH5α quimiocompetentes produzidas em nosso laboratório (Chung et al., 1989), e bactérias do sistema Top10 (Invitrogen) de acordo com recomendações do sistema.

As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB Ampicilina (50 µg/ml) e X-gal cultivadas por 16 h em estufa a 37ºC.

3.15.3 Minipreparação de plasmídeos

As colônias brancas selecionadas após o cultivo da transformação descrita acima, foram cultivadas em 1,5 ml de LB líquido por 16h, em estufa a 37ºC, sob agitação. Foi utilizado o sistema comercial illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE) para a purificação dos plasmídeos de acordo com recomendações do fabricante.

3.15.4 Digestão de plasmídeo

Para checar a entrada do inserto no vetor, o plasmídeo pCR II foi digerido com as enzimas *Sca*I e *Eco*RV e o pCR 4 com as enzimas *Not*I e *Sca*I, sendo o sítio *Sca*I específico do inserto. As digestões foram realizadas de acordo com instruções do fabricante (New England Biolabs).

3.15.5 Sequenciamento de DNA

Foram sequenciados os plasmídeos obtidos da clonagem e também os produtos de PCR purificados do gel. Para cada reação foi preparada uma mistura composta por 3 µL de tampão 5x; 400 ng de DNA ; 3 µL de primer a 2,5 µM (T7, SP6, Ric8Bhuman Foward ou Ric8Bhuman Reverse) 2 µL de BigDye (Aplied Biosystems); e água destilada DNase/RNase free para completar volume final de 15 µL por reação. As reações seguiram 25 ciclos de 30 seg a 96ºC, 15 seg a 55ºC e 4 min a 60ºC e finalizados com 1 min a 4ºC.

Logo após, as reações foram precipitadas pela adição de uma mistura contendo 23 µL de etanol 100%, 1 µL de glicogênio 1 mg/ml e 1 µL de acetato de sódio 3M pH 5,5 por cada reação. As reações, protegidas da luz, foram então incubadas no gelo por 15 min e centrifugadas por 40 min a 4000 rpm, 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e para retirar o líquido restante, foram dados dois pulsos a 1000 rpm com os tubos invertidos. Foram adicionados 50 µL de etanol 70% gelado e as reações foram centrifugadas por mais 10 min a 4000 rpm, 4 ºC. O sobrenadante foi novamente descartado e mais dois pulsos foram dados para eliminar o excesso de líquido. As reações foram secas por 1h à temperatura ambiente, protegidas da luz e depois armazenadas a -20 ºC até o sequenciamento.

As sequências obtidas foram analisadas por BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) e Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).

4. RESULTADOS

4.1 PARTE I

4.1.1 As linhagens RRA103 e RHH188 apresentam a inserção do vetor genetrap no gene *Ric-8B*

Recentemente foi descrito que a proteína RIC-8B é uma GEF *in vitro* e atua especificamente na subunidade α da família G_s (Chan et al., 2011; Von Dannecker et al., 2005; Kerr DS et al., 2008). Com o objetivo de verificar qual a função de RIC-8B *in vivo*, procuramos gerar camundongos *knockout* para *Ric-8B* através da tecnologia *Gene Trap* do consórcio BayGenomics (Stryke et al., 2003).

Para tanto, utilizamos as linhagens de células-tronco modificadas RRA103 e RHH188. Estas linhagens apresentam o gene *Ric-8B* nocauteado pela inserção do vetor *Gene Trap* pGT01. O consórcio internacional BayGenomics produziu inúmeras linhagens *knockout* para diversos genes via a tecnologia de *Gene Trap.* Os genes são interrompidos pela inserção randômica do vetor no genoma de células-tronco em cultura, derivadas do subclone E14Tg2A.4, geradas a partir de blastocistos de camundongos da linhagem 129/Ola. As linhagens de camundongos *knockout* geradas pela BayGenomics foram disponibilizadas e distribuídas pelo Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC – www.mmrrc.org).

O vetor pGT01 utilizado pela Baygenomics apresenta um elemento de seleção – neomicina fosfotransferase II – fusionado a um elemento indicador de expressão – β-galactosidase. Essa nova construção foi denominada β-geo. A 3’ desse gene repórter há um sinal de poli(A). O vetor também apresenta, a 5’, um sítio aceptor de splicing (SAS) responsável pela fusão do vetor com o éxon anterior no RNA mensageiro durante o processo de splicing, gerando a produção de um transcrito interrompido, como mostra a Figura 8.

Nas linhagens RHH188 e RRA103, o vetor se inseriu, respectivamente, no íntron 3 e no íntron 7 do gene *Ric-8B* (Figura 8).

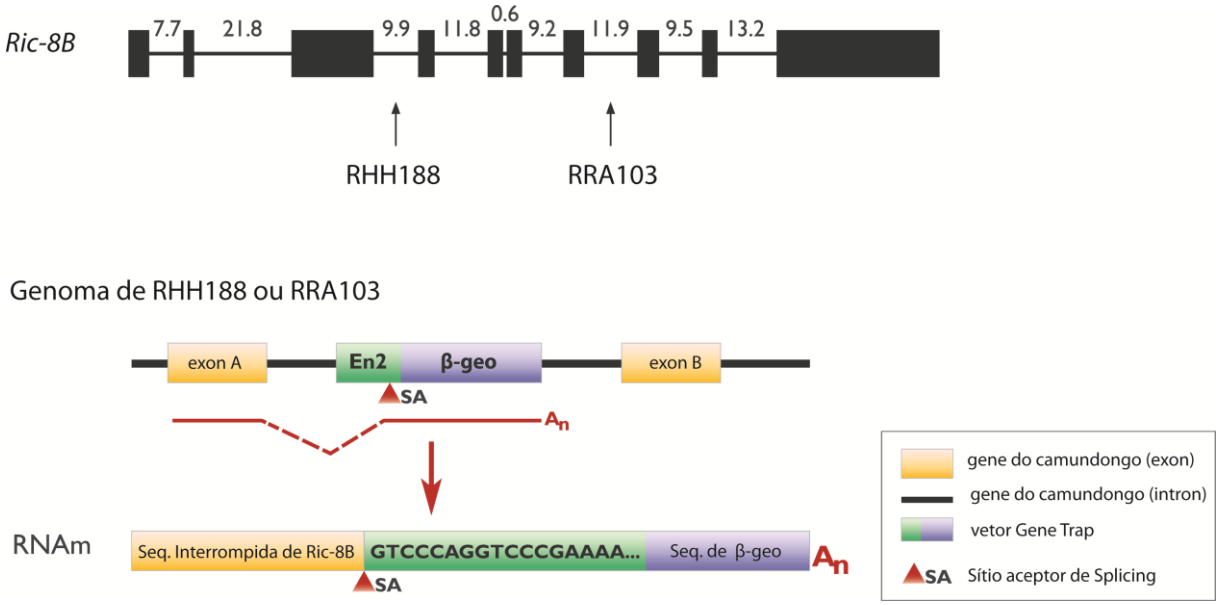


Figura 8| Esquema da inserção do vetor pGT01 no gene *Ric-8B*. O gene *Ric-8B* (painel superior) apresenta 10 éxons e 9 introns contendo diversos tamanhos (indicados em kbs). O vetor pGT01 se inseriu randomicamente no íntron 3 (na linhagem RHH188) e no íntron 7 (na linhagem RRA103). No processamento do RNA transcrito a partir do gene contendo a inserção, a sequência β-geo do vetor é fusionada somente à sequência de *Ric-8B* codificada pelos éxons anteriores ao íntron no qual o vetor se inseriu (no caso de RHH188, os éxons 1, 2 e 3). Dessa maneira, as células deverão expressar a proteína RIC-8B truncada (não funcional) e o repórter β-geo.

Para identificar o gene interrompido em cada um de seus clones, a Baygenomics submeteu os transcritos resultantes da inserção do vetor em cada clone à amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'RACE) seguida de sequenciamento. Entretanto, seguindo as próprias recomendações do consórcio, nos certificamos acerca da interrupção do gene *Ric-8B* por RT-PCR do RNA extraído das linhagens de células-tronco modificadas RRA103 e RHH188.

O RNA total das células-tronco embrionárias foi extraído e retroconvertido à cDNA. O cDNA obtido foi analisado por meio de PCR com primers específicos à região nocauteada: o *primer*

foward foi desenhado para anelar na porção final de cada éxon precedente ao local de inserção previsto pela Baygenomics e o *primer reverse* anela em região interna do vetor (Figura 9). A amplificação de um produto de tamanho esperado comprova a fusão do vetor no ponto de inserção previsto.

Figura 9| Esquema da região amplificada no PCR de verificação da construção das linhagens RRA103 e RHH188. cDNA sintetizado à partir do RNA extraído das células-tronco embrionárias. Abaixo, o tamanho esperado dos produtos de PCR amplificados a partir dos cDNAs das linhagens RRA103 ou RHH188, 388pb ou 421pb respectivamente.

Através da análise do tamanho do produto do PCR, verificamos que a construção está de acordo com o esperado, pois houve a amplificação dos produtos de PCR com primers específicos para o gene *Ric-8B* e o tamanho dos fragmentos está de acordo com o tamanho esperado (Figura 10).

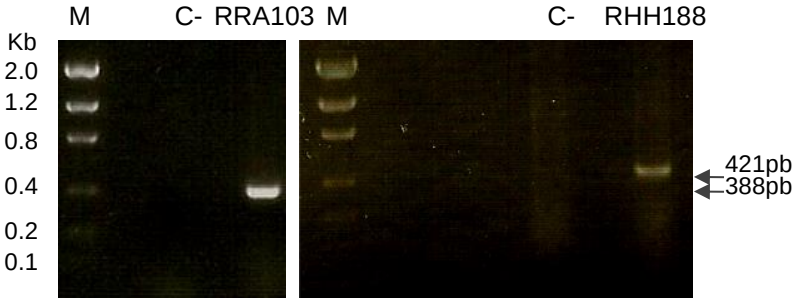


Figura 10| A região amplificada indica a interrupção do gene *Ric-8B*. Fotografias de eletroforese em géis de agarose 1,5% em TAE onde foram aplicados 13 µl do produto de reação. As bandas obtidas correspondem aos

tamanhos esperados de 388 pb e 421 pb. Peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen) (M) = 2000 pb; 1200 pb; 800 pb; 400 pb; 200 pb e 100 pb. Como controle negativo (C-), foi realizada a mesma reação sem adição de cDNA.

Apesar de a cultura de células-tronco apresentar a morfologia esperada e boas taxas de replicação, também nos certificamos da prevalência de células-tronco derivadas do clone nocauteado na cultura, pela expressão do vetor e por um ensaio de coloração por X-gal nas células das duas linhagens, isso ainda somado à pressão seletiva por G418 no meio de cultura.

Após a incubação com X-gal, observamos que 95% das células apresentaram coloração azul citoplasmática homogênea e presença de alguns grânulos de coloração azul intensa. Esta coloração azul das células indica a quebra do substrato X-gal pela enzima β-galactosidade codificada pelo vetor fusionado transcrito (dado não mostrado).

As células também apresentaram expressão dos fatores Oct4 e Nanog, proteínas exclusivas de células pluripotentes (Figura 11).

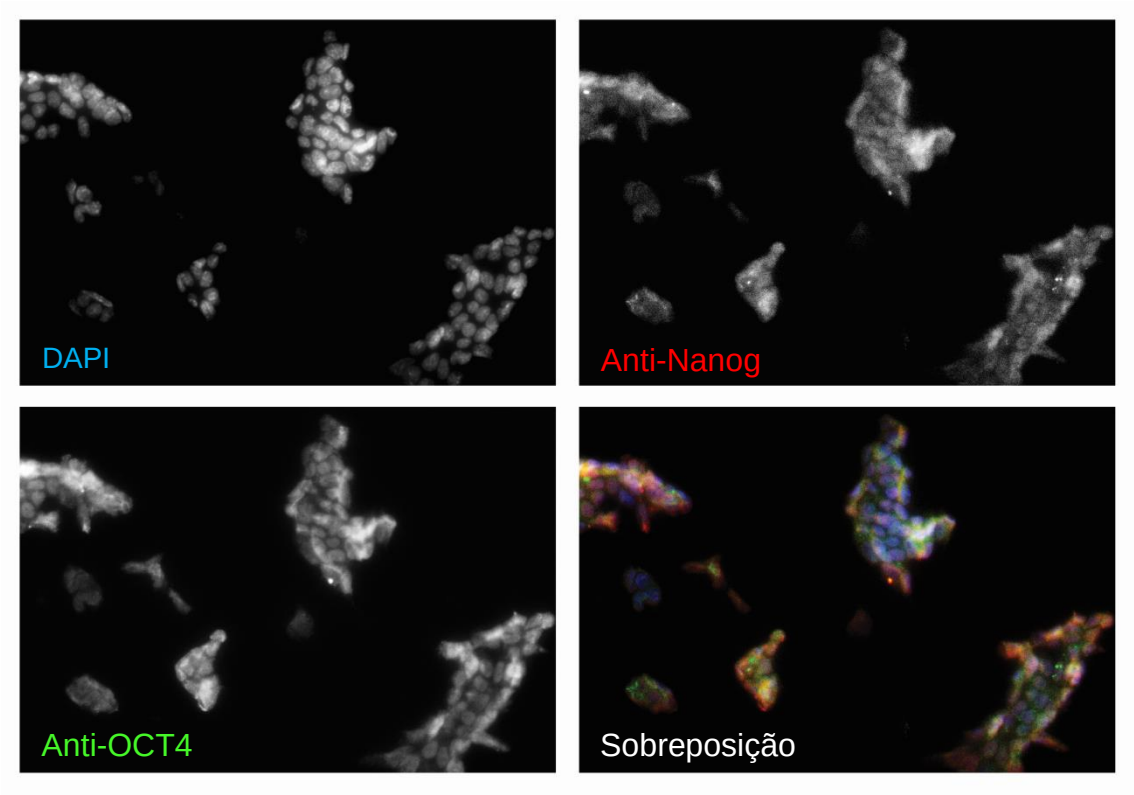


Figura 11| As linhagens RRA103 e RRH188 apresentam marcadores célula-tronco específicos. Imagens de imunofluorescência indireta ao aumento de 1000X no microscópio de fluorescência. Observa-se marcação dos núcleos por DAPI (em azul), anti-Nanog marcada com Alexa 594 (em vermelho), anti-OCT4 marcado com Alexa 488 (em verde), ambos marcadores nucleares específicos de células pluripotentes, e a sobreposição das fluorescências no último campo.

Após verificarmos a inserção do vetor genetrap no gene *Ric-8B* nas linhagens RHH188 e RRA103, requisitamos o serviço de microinjeção de células-tronco em blastocistos oferecido pela Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), mantenedora das construções da BayGenomics.

Obtivemos da MMRRC sete camundongos machos que apresentaram de 75 a 95% de quimerismo da linhagem RHH188 (Figura 12a) e seis camundongos da linhagem RRA103 – um macho e cinco fêmeas, com quimerismo de 20 a 50%.

a.

b.

Figura 12| Quimeras da linhagem RHH188 com alto índice de quimerismo e transmissão da linhagem. (a) Camundongos quimeras com 5 meses de idade, pelagem *agouti*/preta/branca/creme, característica dos camundongos 129/Ola. (b) Ninhada de camundongos *agouti* com 3 semanas, filhotes de pai quimera (pelagem *agouti*) e mãe selvagem C57BL6/J (pelagem preta).

4.1.2 Fundação das colônias de RRA103 e RHH188

Para verificar se houve transmissão da linhagem *knockout* e também dar início ao processo de formação da colônia das linhagens recebidas, após o período de uma semana de adaptação desses animais, iniciamos a formação dos casais.

Como a grande maioria dos dados moleculares obtidos acerca do sistema olfatório faz uso do camundongo C57BL6/J como modelo, para possibilitar a comparação dos nossos resultados com a literatura e eliminar a influência do *background* genético misto nos nossos resultados, decidimos retrocruzar os nossos camundongos quimeras com camundongos selvagens C57BL6/J (Figuras 7 e 12b).

4.1.2.1 Transmissão da linhagem RHH188

Cada macho da linhagem RHH188 foi acasalado com duas fêmeas selvagens C57BL6/J. Dentre sete cruzamentos de dois desses casais, não obtivemos nenhum nascimento, mesmo trocando as fêmeas C57BL6/J. De outros dois cruzamentos, obtivemos somente nascimentos de animais de pelagem preta (48 filhotes), indicando que não houve a incorporação das células-tronco embrionárias modificadas na formação das gônadas. Portanto, esses animais não transmitiram a linhagem de células injetadas (a linhagem 129/Ola apresenta pelagem *agouti*). No entanto, dos outros três cruzamentos, obtivemos um alto índice de nascimentos: 93 filhotes resultantes de 11 ninhadas, todos de pelagem *agouti* (Figura 5b), denominados geração F1, entretanto, como esperado, somente cerca de 50% dos camundongos *agouti* apresentaram o vetor, já que a inserção do vetor na célula tronco RHH188 ocorreu apenas em um dos alelos do gene *Ric-8B* (Tabela 1).

Genótipo	Nº de filhotes	%	% Esperada
RHH188$^{+/-}$	39	42	50
RHH188$^{+/+}$	54	58	50
Total	**93**	**100**	**100**

*χ^2 = 2.419; p= 0.1198

Tabela 1| Resultado do cruzamento: Quimeras X C57BL6/J*. Distribuição dos 93 filhotes *agouti* obtidos no cruzamento dos quimeras com camundongos C57BL6/J selvagens de acordo com o seu genótipo. O resultado do teste qui-quadrado indica que a distribuição está dentro do esperado.

Para dar início à colônia RHH188, selecionamos, por genotipagem, os filhotes da geração F1 de pelagem *agouti* positivos (heterozigotos para a inserção do vetor) e os cruzamos novamente com camundongos C57BL6/J selvagens. A geração F2, independentemente da coloração do pelo, foi genotipada e os filhotes heterozigotos foram selecionados e retrocruzados com camundongos selvagens C57BL6/J até a geração F3.

O resultado da genotipagem da prole gerada a partir dos retrocruzamentos foi de acordo com a proporção já esperada de 50% de heterozigotos e 50% selvagens, já que 50% dos gametas do heterozigoto possuem a modificação e 50% não.

4.1.2.2 Transmissão da linhagem RRA103

Da linhagem RRA103, cuja inserção do vetor ocorreu no íntron 7, após três tentativas de injeções, só obtivemos seis animais quimeras, destes, somente um macho. O índice de quimerismo foi de 20 a 50%, considerado muito baixo. Ainda assim, arquitetamos os seguintes cruzamentos: o macho quimera mais duas fêmeas selvagens C57BL6/J; três fêmeas quimeras para um macho selvagem C57BL6/J e duas fêmeas quimeras para um outro macho selvagem

C57BL6/J. Destes cruzamentos só obtivemos filhotes de pelagem preta, mesmo após diversos nascimentos. Isto indica que devido ao baixo índice de quimerismo, como previsto, não houve transmissão da linhagem RRA103; e, portanto, não prosseguimos com essa linhagem.

4.1.3 Genotipagem dos camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$

Como a única linhagem de camundongos *knockout* para *Ric-8B* foi a linhagem RHH188, designamos os camundongos selvagens desta linhagem como *Ric-8B*$^{+/+}$, os camundongos heterozigotos como *Ric-8B*$^{+/-}$ e os camundongos *knockout como Ric-8B*$^{-/-}$.

Inicialmente, tanto para os cruzamentos dos camundongos quimeras quanto para os retrocruzamentos (heterozigoto X C57BL6/J), bastava diferenciar heterozigotos de selvagens, ou seja, a presença ou ausência do vetor era suficiente para diferenciar os genótipos possíveis. Portanto, desenhamos primers internos ao vetor β-geo, cujo produto fosse pequeno (258 pb) e facilmente amplificável (Figura 13).

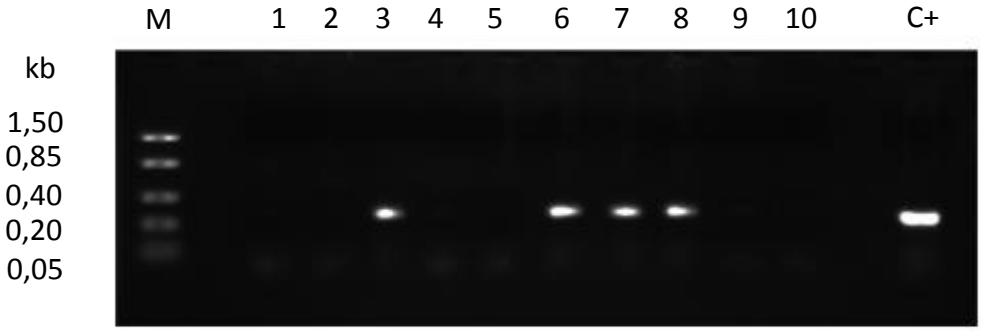


Figura 13| Exemplo de resultado de genotipagem inicial. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Das dez amostras de camundongos *agouti* nascidos de cruzamento de heterozigotos X C57BL6/J (1-10), quatro apresentaram o vetor (amostras 3, 6-8), evidenciado pela banda de 258 pb, ou seja, são heterozigotos. À esquerda, o marcador Fast Ruler (Fermentas, de 1,5 kb a 50 pb) e, à direita, o controle positivo (C+) da reação no qual foi utilizado DNAg extraído das células-tronco.

Para obter 99,9% de pureza do background genético, são recomendadas dez gerações de retrocruzamentos. Entretanto, como este procedimento leva cerca de 2 a 3 anos, após a 3ª geração de retrocruzamentos – em que se espera que os camundongos apresentem 87,5% do background genético de C57BL6/J, realizamos alguns experimentos com os animais em background misto a fim de dar início à padronização dos ensaios e à caracterização da linhagem.

4.1.4 Análise da expressão de RIC-8B

Já foi descrito por hibridização *in situ* que o gene *Ric-8B* é expresso no epitélio olfatório (OE) e no núcleo estriado (St) do sistema nervoso central. Sua especificidade para esses tecidos foi comprovada por RT-PCR, a partir de um painel de cDNAs de diversos outros tecidos (Von Dannecker et al., 2005).

No presente estudo, confirmamos esses dados via a atividade exógena de β-galactosidase do marcador β-geo no camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$, visto que o gene repórter é expresso sob o controle do promotor gênico de *Ric-8B* (Figuras 14, 15 e tabela 2).

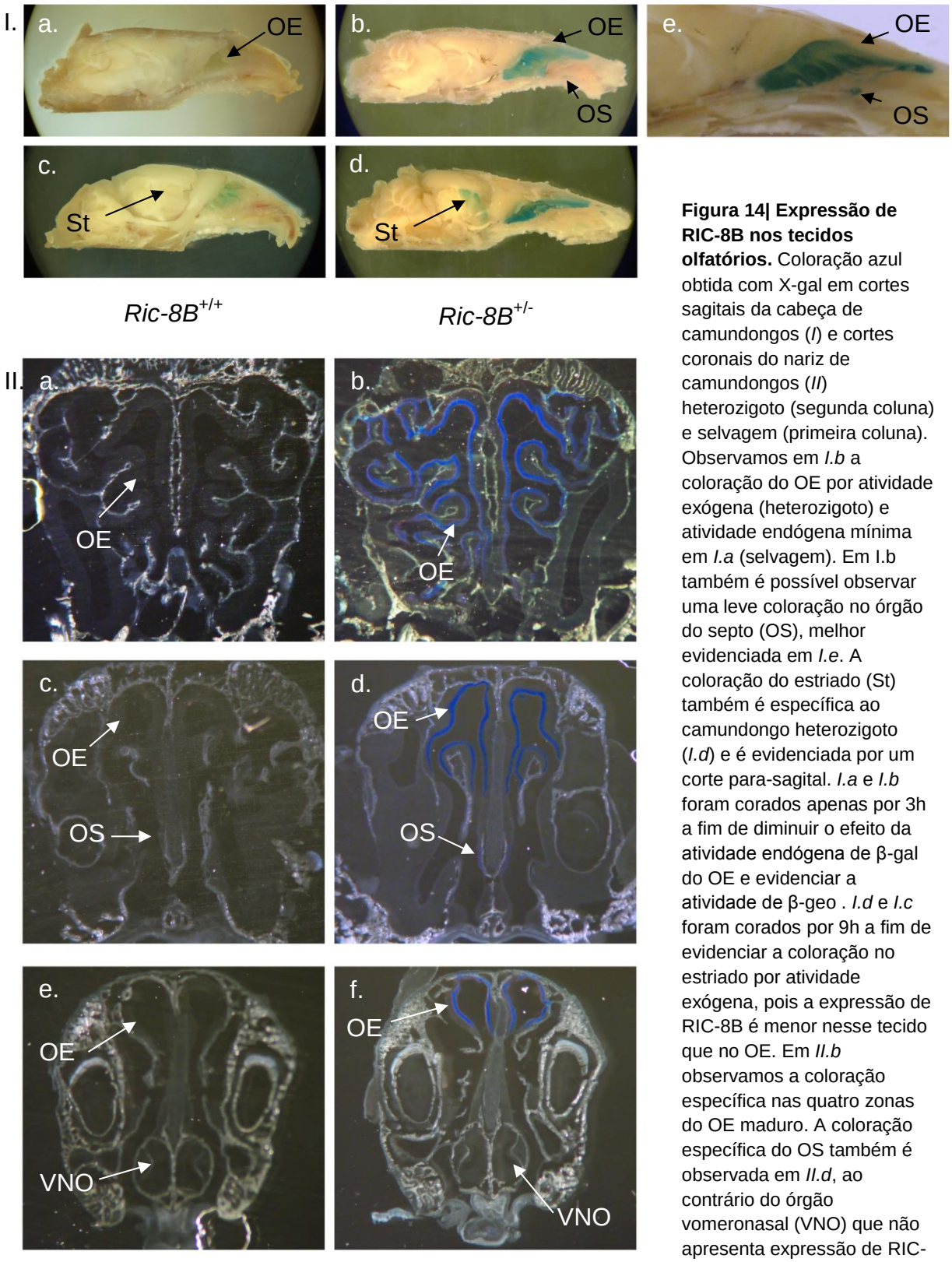


Figura 14| Expressão de RIC-8B nos tecidos olfatórios. Coloração azul obtida com X-gal em cortes sagitais da cabeça de camundongos (*I*) e cortes coronais do nariz de camundongos (*II*) heterozigoto (segunda coluna) e selvagem (primeira coluna). Observamos em *I.b* a coloração do OE por atividade exógena (heterozigoto) e atividade endógena mínima em *I.a* (selvagem). Em I.b também é possível observar uma leve coloração no órgão do septo (OS), melhor evidenciada em *I.e*. A coloração do estriado (St) também é específica ao camundongo heterozigoto (*I.d*) e é evidenciada por um corte para-sagital. *I.a* e *I.b* foram corados apenas por 3h a fim de diminuir o efeito da atividade endógena de β-gal do OE e evidenciar a atividade de β-geo . *I.d* e *I.c* foram corados por 9h a fim de evidenciar a coloração no estriado por atividade exógena, pois a expressão de RIC-8B é menor nesse tecido que no OE. Em *II.b* observamos a coloração específica nas quatro zonas do OE maduro. A coloração específica do OS também é observada em *II.d*, ao contrário do órgão vomeronasal (VNO) que não apresenta expressão de RIC-8B (*II.f*)

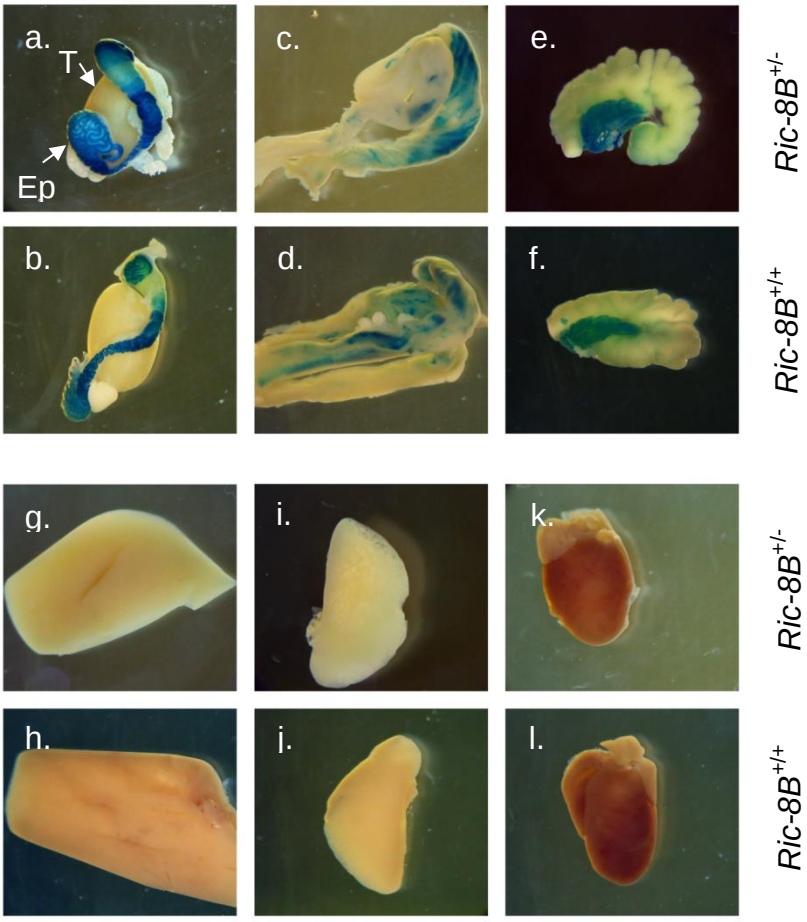


Tabela 2.

Tecido	Coloração X-gal
OE	+
Estriado	+
Língua	E
M. esquelético	0
Olhos	0
Cérebro	0
Epidídimo	E
V. Seminal	E
Baço	0
Timo	0
Pulmão	0
Fígado	0
Int. Delgado	0
Int. Grosso	E
Testículo	0
Pâncreas	0
Rim	E
Coração	0

Tabela 2 e Figura 15| Determinação da expressão da proteína RIC-8B em alguns tecidos pela expressão do gene repórter β-geo no camundongo heterozigoto adulto. *Tabela 2:* lista dos tecidos adultos avaliados e suas marcações: (+) = coloração exógena positiva; (0) = ausência de coloração; (E) = coloração endógena, quando a coloração observada no camundongo selvagem e heterozigoto foi a mesma. N = 4 camundongos machos de 5 meses de idade. *Figura 15:* Coloração azul com X-gal em diversos tecidos. Tecidos dos camundongos heterozigotos sempre na posição superior e selvagem abaixo. *a.* e *b.* testículo (T) e epidídimo (Ep). *c.* e *d.* intestino grosso. *e.* e *f.* vesícula seminal. *g.* e *h.* fígado. *i.* e *j.* pulmão. *k.* e *l.* coração. A coloração exógena devido à expressão do gene *Ric-8B* só foi observada no OE e estriado. Houve apenas a diferença de coloração observada por atividade endógena de β-galactosidase em alguns órgãos, como epidídimo, intestino grosso e vesícula seminal. Enquanto para outros órgãos, como fígado, pulmão e coração, não foi observada nenhuma coloração. Para evitar saturação e verificar uma potencial diferença entre o tecido heterozigoto e selvagem, o testículo e epidídimo foram corados apenas 3h e a vesícula seminal por 9h, quando houve o início das marcações, o restante dos órgãos foi corado por 16h.

Apesar de nosso ensaio ter sido realizado em pH neutro, que corresponde ao pH de atividade ótima da β-galactosidade de origem bacteriana constituinte do vetor pGT01, ao contrário da β-galactosidade endógena, que tem atividade ótima em pH ácido, verificamos a interferência da atividade endógena em alguns órgãos como: epidídimo, testículo, próstata, rim, vesícula seminal, glândulas salivares, e epitélio olfatório. Dados anteriores da literatura demonstram que, de fato, estes tecidos apresentam atividade endógena de β-galactosidase (Bolon, 2008; Van Schoore et al., 2005).

Além de confirmar a expressão de RIC-8B no OE e no estriado, também constatamos expressão no órgão do septo (OS), uma pequena ilha de epitélio olfatório localizada na base do septo nasal (Figura 14.I.e e 14.II.d). Ainda não foi determinado o papel fisiológico desse órgão no sistema olfatório, mas sabe-se que há expressão de receptores olfatórios, $G\alpha_{olf}$ e da proteína marcadora de neurônios olfatórios maduros OMP (Ma et al., 2003).

A coloração azul, pela quebra do substrato X-gal, encontrada no OE, no núcleo estriado e no órgão do septo do camundongo heterozigoto, é muito maior comparada à marcação do camundongo selvagem (Figura 14), entretanto, a marcação do órgão do septo e estriado só é visível no camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ após longo período de incubação (16h) e não é visível no camundongo *Ric-8B*$^{+/+}$.

Além dos tecidos que já se sabia que expressam RIC-8B e o OS, não detectamos marcação diferencial por X-gal em nenhum outro tecido analisado. Apesar dos tecidos terem sido incubados em tempos diferenciais, de acordo com o aparecimento da coloração azul, na tentativa de observar a coloração prévia no camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ devido à atividade de β-galactosidase do vetor, é possível, ainda, que a atividade endógena, por ser intensa em alguns tecidos (Figura 15a, 15b, 15c), mascare uma pequena atividade de β-galactosidade que indicaria a expressão mediada pelo promotor de *Ric-8B*.

Com o objetivo de avaliar a expressão de RIC-8B por um método quantitativo, passível de normalização, e identificar possível expressão de RIC-8B em regiões internas aos tecidos avaliados que não foram alcançadas pelos tampões de coloração no método anterior de *whole mount*, fizemos um extrato total de todos os tecidos avaliados e normalizamos as amostras de acordo com a concentração de proteínas totais de cada amostra (Gráfico 1).

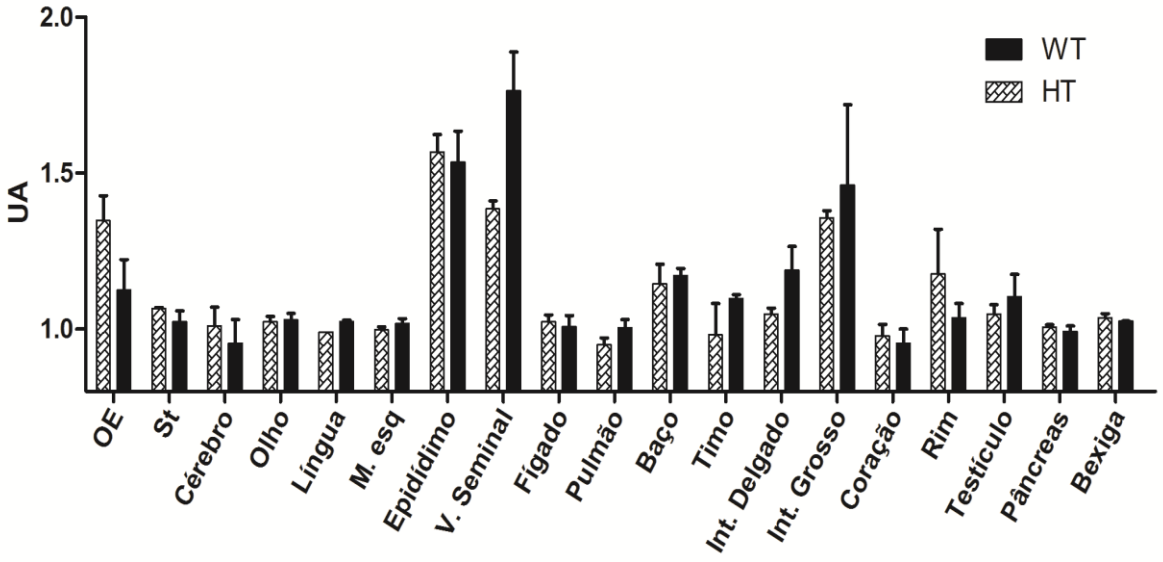


Gráfico 1| Coloração por X-gal em extrato total de diversos tecidos do camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$. Ensaio de coloração por X-gal em extratos totais de diferentes tecidos de camundongos heterozigotos e selvagens em placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para o comprimento de onda de 635 nm. UA = unidades arbitrárias. N = 3 experimentos independentes, a partir de extratos diferentes, pareando apenas os genótipos. Os grupos foram analisados por teste T pareado. *P* = 0,4854.

O OE foi o tecido que exibiu a maior diferença de intensidade de marcação no ensaio. Observamos um aumento de 20% da coloração do extrato de camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ em relação ao extrato do camundongo *Ric-8B*$^{+/+}$. Para o restante dos tecidos, observamos uma coloração mais ou menos equiparada entre os extratos selvagem e heterozigoto, exceto para o

núcleo estriado (St), cérebro, vesícula seminal e rim. Apesar de ser possível observar diferença entre os extratos de camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ e *Ric-8B*$^{+/+}$ para o estriado e cérebro como se esperava, esta diferença apresentou magnitude bem menor que o OE, principalmente em relação ao núcleo estriado. Embora o experimento não permita excluir a expressão de RIC-8B em menor magnitude em outros tecidos, ele nos permite afirmar que o tecido que apresenta maior expressão de RIC-8B no camundongo adulto certamente é o OE.

4.1.5 O camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ é haplossuficiente

Quando um organismo diploide, por alguma razão, apresenta um alelo inativo, a existência de outra cópia funcional do gene pode não ser suficiente para compensar a ausência da cópia inativa, levando a um quadro denominado haploinsuficiência, que determina um fenótipo alterado. A haploinsuficiência é a causa de algumas importantes doenças autossômicas. Embora a haploinsuficiência não seja comum entre a maioria dos KO descritos, sua ocorrência pode ajudar a desvendar o papel molecular do gene em questão, principalmente em casos de KO letais.

Como os camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ apresentam apenas uma cópia do gene ativa e de modo aparente, apresenta-se comportamental e morfologicamente igual ao camundongo selvagem, decidimos verificar se a única cópia funcional do gene era capaz de reproduzir os níveis de RNAm do animal selvagem ao invés da redução esperada de 50%.

Verificamos através de RT-PCR semi-quantitativo, normalizado pelo gene β-actina, que a diferença da quantidade de RNA mensageiro de *Ric-8B* entre camundongos heterozigotos e camundongos selvagens não é de 50%, como seria esperado (Gráfico 2). A maior diferença observada, no OE, após 25 ciclos, foi de aproximadamente 38%. Enquanto para o St, houve uma redução de apenas 28% nas mesmas condições para o camundongo heterozigoto. Em

amplificações de 30 ciclos, os produtos já estavam muito próximos à saturação e a diferença entre os genótipos foi ainda menor (dado não mostrado).

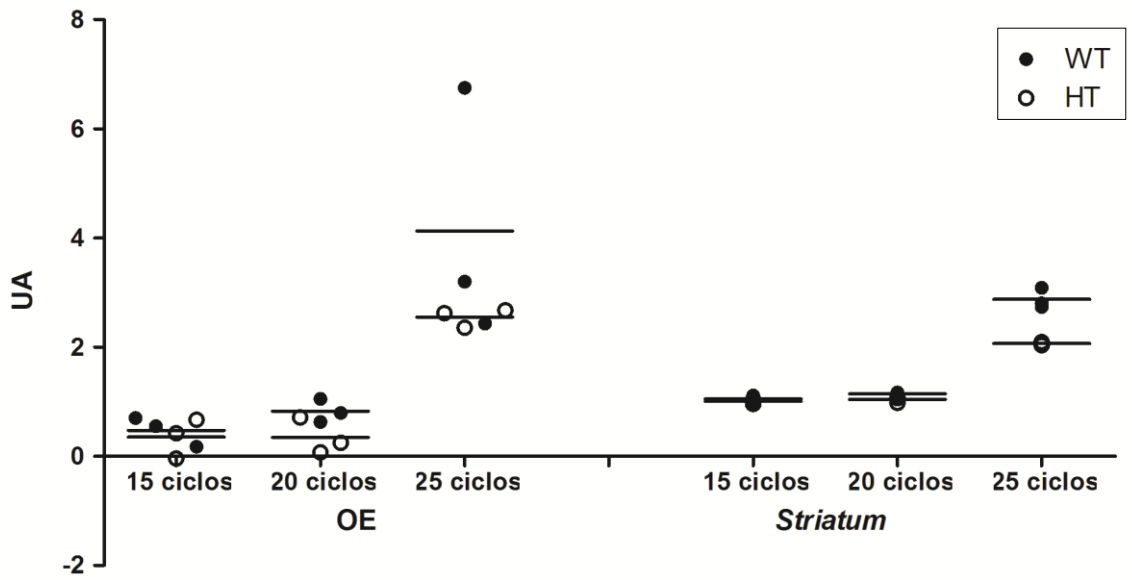


Gráfico 2| A redução do RNAm de RIC-8B observada nos camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ é menor que 50%. Quantificação da intensidade de fluorescência (UA) pelo programa Image J dos produtos de RT-PCR em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. N = 3. Analisado por teste t pareado. Nenhum dos grupos pareados apresenta diferença estatisticamente significante. *P* = 0,0821.

Este resultado corrobora as impressões de que não há nenhuma deficiência olfatória ou locomotora nos camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$. O comportamento geral observado no camundongo heterozigoto adulto, filhote e neonato não apresenta nenhuma diferença evidente em relação ao comportamento do camundongo selvagem em quaisquer destas idades.

Neste experimento foi utilizado um par de primers que flanqueia o éxon 9, permitindo assim analisar também a expressão da isoforma Δ9. Verificamos que as quantidades de RNAm das isoformas do gene *Ric-8B* completo ou Δ9 são equitativas tanto no OE quanto no núcleo estriado adulto, para todas as ciclagens avaliadas, tanto no camundongo heterozigoto quanto selvagem.

4.1.6 Genotipagem e obtenção dos camundongos *Ric-8B*$^{-/-}$

Para discriminar os camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ dos *Ric-8B*$^{-/-}$, já não basta somente identificar a presença do vetor β-geo, pois tanto o camundongo heterozigoto quanto o homozigoto apresentam o marcador.

Assim, procuramos identificar o ponto de inserção do vetor *Gene trap* no intron 3 do gene *Ric-8B* na linhagem RHH188 com o objetivo de desenhar primers que flanqueiam este ponto de inserção do vetor: o camundongo que apresentasse a inserção do vetor não amplificaria o produto da reação, pois o vetor (~8kb) é muito extenso para o limite de amplificação da enzima *Taq* polimerase utilizada no PCR convencional, enquanto que para o camundongo que não apresentasse a inserção, obteríamos um produto de PCR de tamanho conhecido .

Considerando que a *Taq* polimerase amplifica fragmentos de aproximadamente 2kb, para identificar o ponto de inserção do vetor, desenhamos cinco primers forward, mapeando o íntron 3 a cada 2 kb aproximadamente (Figura 16) e um primer reverse que se anela numa sequência interna ao vetor (Vector R). Preparamos reações de PCR com cada um dos primers forward e o primer reverso Vector R. Assim, esperávamos obter a amplificação de, ao menos, um dos possíveis produtos de PCR.

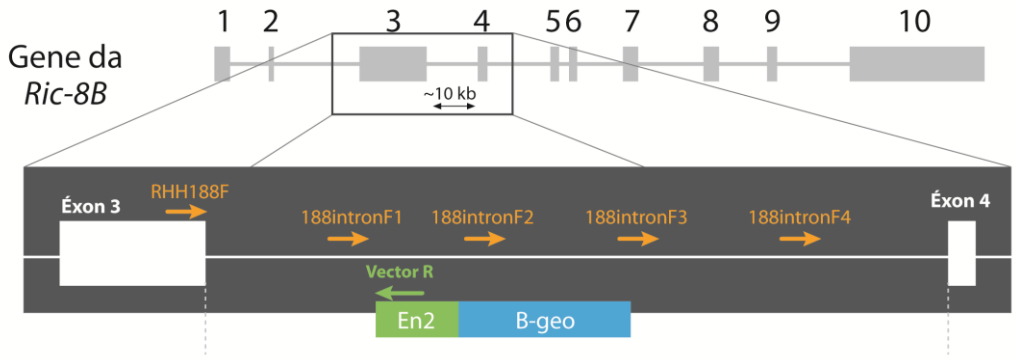


Figura 16| Determinação da região de inserção do vetor Gene trap no intron 3 do gene *Ric-8B*. Os primers forward RHH188F e 188íntronF1 a F4 foram aleatoriamente desenhados ao longo do intron 3 tendo por base as sequências genômicas de camundongos 129/Sv e C57BL6/J depositados na rede. Cada primer dista do outro de aproximadamente 2 kb. Espera-se, assim, que um dos primers forward desenhados (em laranja) deva estar a uma distância ideal para a amplificação do fragmento de íntron vizinho ao vetor (com o primer reverse Vector R em verde), cujo local de inserção é desconhecido.

Da análise do produto de cada reação de PCR, foi possível concluir que o sítio de inserção do vetor está localizado aproximadamente a 150 pb 3' do primer 188íntronF2, o que significa que a inserção do vetor ocorreu a pouco mais de 4 kb do éxon 3, na região central do íntron 3 (Figura 17).

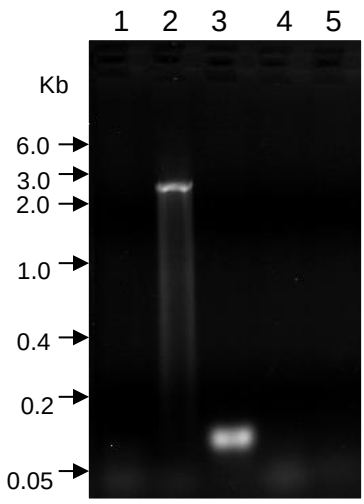


Figura 17| Localização do sítio de integração do vetor no intron 3 do gene *Ric-8B* utilizando PCR. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Em cada poço (1 a 5), foram aplicados 10 µl do produto de PCR correspondente a cada reação especificada abaixo. Em condições menos estringentes, como menor temperatura de anelamento e maior quantidade de DNAg e maior exposição do gel à luz UV, foi possível observar a banda maior de aproximadamente 4 kb no poço 1 (dado não mostrado), comprovando que a inserção ocorreu a mais de 4 kb do início do íntron 3, aproximadamente a 2,5 kb do local de anelamento de 188intron F1 (poço 2) e a 150pb após o local de anelamento do primer 188intronF2 (poço 3). (1) PCR com primers RHH188F e VectorR; (2) PCR com primers 188intronF1 e VectorR; (3) PCR com primers 188intronF2 e VectorR; (4) PCR com primers 188intronF3 e VectorR; (5) PCR com primers 188intronF4 e VectorR.

As bandas encontradas por esse método (tanto a de aproximadamente 150 pb quando a de cerca de 2,5kb) foram sequenciadas, porém, apesar de encontrarmos regiões do vetor, não encontramos propriamente o seu início. Entretanto, de acordo com a literatura (Stanford et al., 2001), é difícil se determinar exatamente o local de inserção por sequenciamento pois, ao entrar, o vetor pode ter sofrido ataque de exonucleases e ter perdido parte de suas extremidades.

Assim, desenhamos o primer a ser utilizado na genotipagem (188íntronR2) há 582 pb do primer 188íntronF2, tendo a certeza de que flanquearíamos o sítio de inserção do vetor. Padronizamos um PCR multiplex (Figura 18.a) com um par de primers para evidenciar a presença do vetor (188íntronF2 e Vector R, que amplifica um fragmento de cerca de 150pb) e outro para evidenciar a ausência do vetor, ou seja, o gene *Ric-8B* íntegro (188íntronF2 e 188íntronR2, que amplifica um fragmento de 582pb) (Figura 18.b).

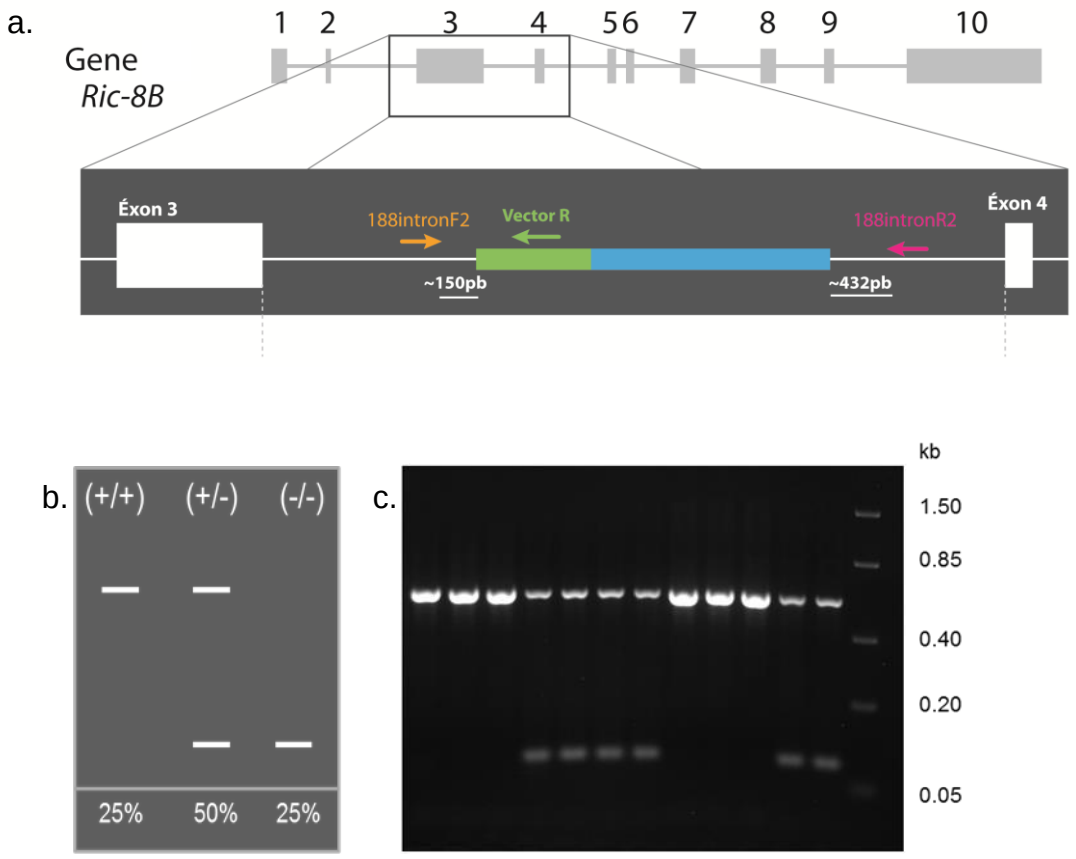


Figura 18| Resultado da genotipagem de um cruzamento *Ric-8B*$^{+/-}$ X *Ric-8B*$^{+/-}$. (a) esquema da genotipagem da linhagem RHH188 por PCR multiplex**.** Numa mesma reação de PCR utilizamos os três primers indicados na figura: 188intronF2, VectorR e 188intronR2 (respectivamente, em laranja, verde e rosa). (b) Esquema demonstrando o padrão de bandas esperado da genotipagem para cada genótipo (*Ric-8B*$^{+/+}$, *Ric-8B*$^{+/-}$ e *Ric-8B*$^{-/-}$) e suas proporções. Em análise de eletroforese em gel de agarose, observaríamos uma banda de aproximadamente 582 pb para os camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$; uma banda de 582 pb (na figura, 432 + 150 pb) e uma de 150 pb para os camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$; e um única banda de 150 pb seria observada para os camundongos

Ric-8B$^{-/-}$. (c) Genotipagem de doze amostras de um cruzamento entre camundongos heterozigotos: seis camundongos são *Ric-8B*$^{+/+}$ e seis são *Ric-8B*$^{+/-}$. À direita, o marcador Fast Ruler (Fermentas, de 1,5 kb a 50 pb).

Para obter os camundongos *knockout*, programamos intercruzamentos de camundongos heterozigotos e obtivemos os nascimentos evidenciados na tabela abaixo (Tabela 3):

Genótipo	Nº de filhotes	%	% Esperada
Ric-8B$^{+/-}$	53	65	50
Ric-8B$^{+/+}$	29	35	25
Ric-8B$^{-/-}$	0	0	25
Total	**82**	**100**	**100**

*$\chi^2 = 27.537$; $p < 0.0001$

Tabela 3| Resultado do cruzamento: *Ric-8B*$^{+/-}$ X *Ric-8B*$^{+/-}$ *. Distribuição dos 82 filhotes obtidos no cruzamento entre quatro casais de camundongos heterozigotos, em 11 cruzamentos, de acordo com o seu genótipo. O resultado do teste qui-quadrado indica que a distribuição difere significantemente da esperada.

No entanto, dentre os 82 filhotes analisados, não encontramos nenhum camundongo KO (Figura 18c e Tabela 3). Este resultado foi bastante inesperado, já que, como apresentado acima, o padrão de expressão de RIC-8B é restrito a poucos tecidos no animal adulto (sendo expresso principalmente nos neurônios olfatórios maduros do epitélio olfatório). E ainda mais, a distribuição de 2:1 dos camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ em relação aos camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$ encontrada é, na verdade, um forte sugestivo da letalidade precoce dos animais Ric-8B$^{-/-}$, já que indica que a porção de ¼ KO da prole foi eliminada do total.

Como muitos dos primeiros comportamentos essenciais à sobrevivência do camundongo recém-nascido dependem do olfato, os camundongos KO recém-nascidos poderiam morrer prematuramente devido à sua anosmia (incapacidade de sentir cheiros). Então, analisamos 23 embriões pré-termo, eliminando assim a possibilidade de morte precoce induzida pela

anosmia. Contudo, não encontramos nenhum camundongo *Ric-8B*$^{-/-}$. Esperava-se que 25% dos camundongos analisados (cerca de 4 camundongos) fossem *Ric-8B*$^{-/-}$ caso a hipótese acima fosse verdadeira.

Esses dados mostram que RIC-8B exerce um papel importante durante a embriogênese e a sua ausência acarreta a morte do embrião.

4.1.7 Perfil de expressão da proteína RIC-8B na embriogênese

Para determinar o estágio embrionário em que ocorre a morte do embrião KO e, assim, inferir a função da proteína RIC-8B na embriogênese, analisamos a expressão de X-gal, a morfologia e o genótipo de embriões e anexos embrionários nos seguintes dias embrionários: E8,5; E10,5 e E12,5 . Neste trabalho, o estabelecimento do dia embrionário E0,5 corresponde à manhã seguinte ao acasalamento dos camundongos, na qual foi detectado o plug vaginal.

Nossos resultados indicam que o embrião torna-se inviável logo no início da embriogênese: por volta dos dias E8,5 e E9,0. Não foi encontrado nenhum embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ que corresponda ao desenvolvimento morfológico normal posterior a esse estágio.

Em ensaios de coloração por X-gal no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ E8,5, verificamos coloração azul altamente específica em regiões anteriores que darão origem às vesículas encefálicas e uma linha fina e ventral ao longo de todo o tubo neural (Figura 19).

As fotografias das figuras 19 e 22 foram captadas pela doutoranda Alice Helena dos Reis Ribeiro, aluna do Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Jr., professor titular do Depto de Anatomia da UFRJ.

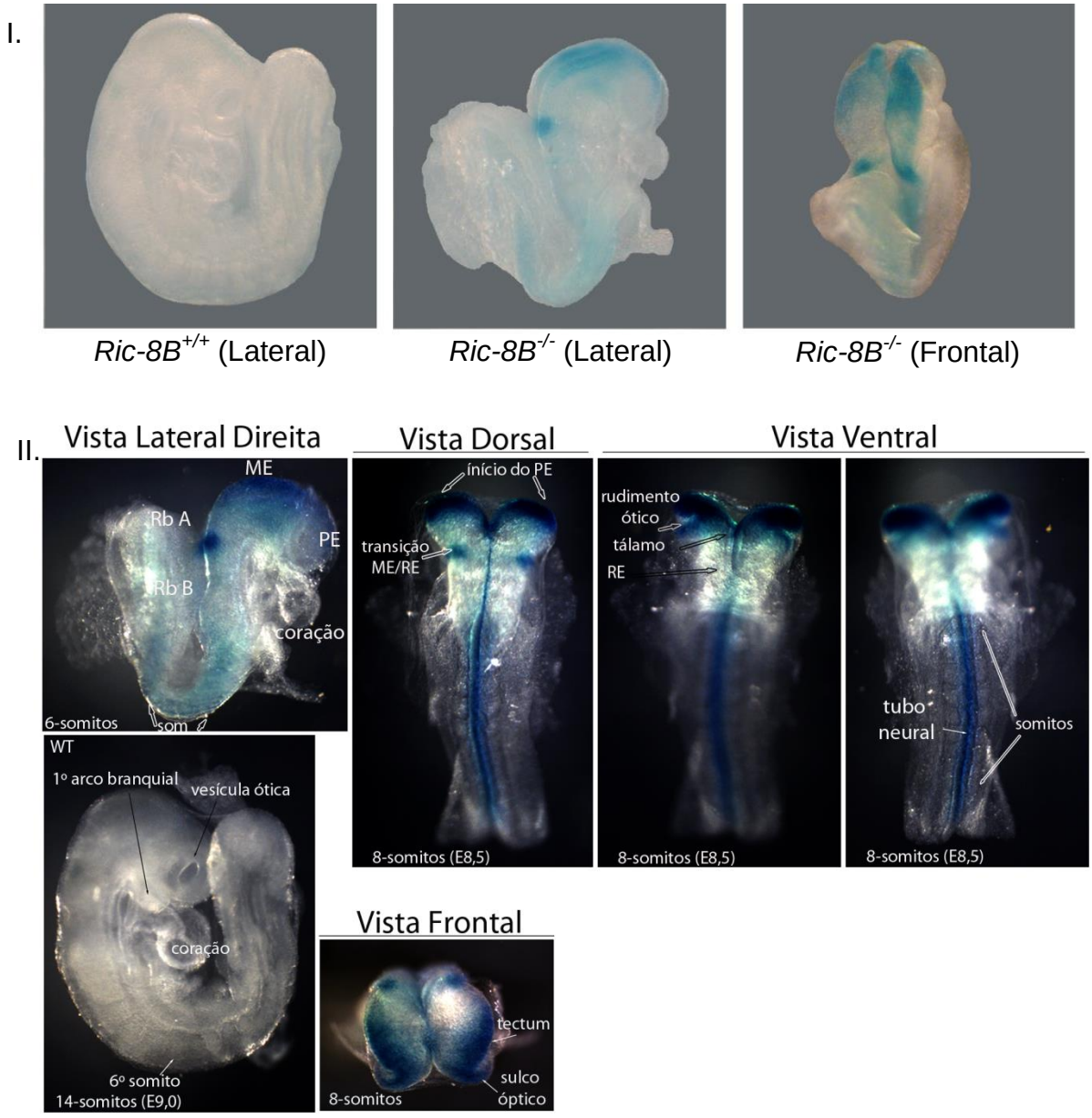


Figura 19| Embriões no estágio E8,5 corados com X-gal. Embriões de camundongos da linhagem *knockout Ric-8B* (WT e KO), no dia embrionário E8,5. (Rb) Rombomeros. (ME) Mesencéfalo. (PE) Prosencéfalo. (RE) Rombencéfalo. (som) Somitos.

Em gestações interrompidas no dia E10,5, encontramos apenas vestígios de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$, como placenta e sacos embrionários vazios, tecidos despedaçados e o embrião ilustrado nas Figuras 20.c e 20.d – este embrião não apresentava desenvolvimento correspondente ao dia E10,5. Além de exibir apenas pouco mais da metade do tamanho dos embriões *Ric-8B*$^{+/+}$ e

Ric-8B$^{+/-}$ da mesma ninhada, também não apresentou a formação característica das vesículas encefálicas, já que não houve nem o fechamento da extremidade anterior do tubo neural, que deveria ter ocorrido por volta do dia E9,0, indicando morte prévia a este estágio. Porém, a formação dos brotamentos dos membros superiores indica que a morte ocorreu após o dia E8,5. Apesar de seu genótipo ser *Ric-8B*$^{-/-}$, acreditamos que não apresentou coloração positiva para X-gal devido à degradação da enzima β-gal pela morte anterior (cerca de dois dias) à data de dissecção e fixação do embrião.

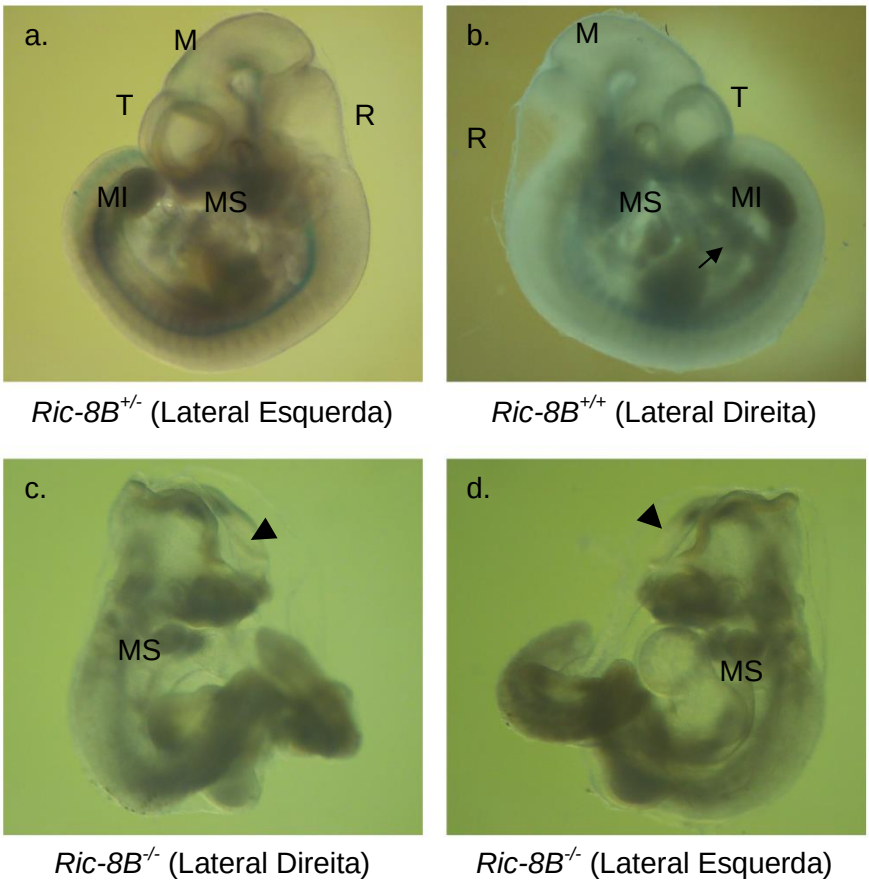


Figura 20| Embriões no estágio E10,5 corados com X-gal. Embriões de camundongos da linhagem *KO Ric-8B*, HT (a), WT (b) e KO (c, d), no dia embrionário E10,5. Os embriões KO apresentam desenvolvimento incompleto e apresentam cerca da metade do tamanho dos embriões WT e HT. a e b foram fotografados ao aumento de 20x, enquanto c e d foram fotografados ao aumento de 50X em lupa estéreo binocular Nikon. (T) vesícula telencefálica; (M) vesícula mesencefálica; (R) vesícula rombencefálica; (MS) brotamento do membro superior; (MI) brotamento do membro inferior. A seta indica o alongamento e afinamento da cauda, característica do desenvolvimento normal do embrião ao dia E10,5. As cabeças de seta indicam a abertura anormal na região frontal do embrião.

A morfologia dos embriões RHH188$^{+/-}$ E12,5 corresponde ao desenvolvimento normal idêntico ao camundongo selvagem (Figura 21). A marcação por X-gal nestes camundongos condizem com a marcação descrita nos estágios embrionários anteriores, porém há apenas uma marcação ventral ao longo do tubo neural (Figura 21 e 22) correspondente à região da placa do assoalho. Intrigantemente, o embrião também apresenta marcação específica nos dígitos em formação das patas superiores e inferiores.

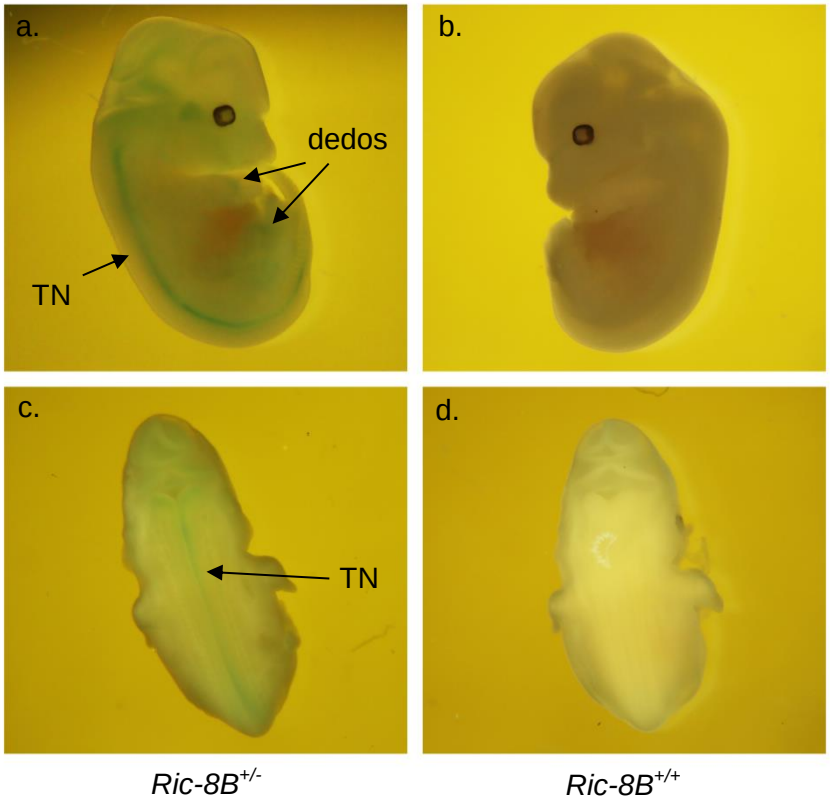


Figura 21| Embriões no estágio E12,5 corados com X-gal. Embriões de camundongos da linhagem *knockout Ric-8B* WT (b, d) e HT (a,c) no dia E12,5. (a) e (b) apresentam a vista lateral do embrião, enquanto (c) e (d) apresentam vista dorsal do embrião. O embrião heterozigoto apresenta morfologia normal, idêntica ao embrião selvagem. É possível observar a marcação específica por X-gal no camundongo heterozigoto na região ventral ao longo do tubo neural (TN) e na região dos dedos superiores e inferiores.

Comprovamos a marcação ventral ao longo do tubo neural através de um corte coronal num embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ do estágio E12,5 (Figura 22). Observamos uma marcação altamente

específica numa importante região do tubo neural denominada placa do assoalho. A placa do assoalho é uma estrutura glial conservada entre os vertebrados e com estruturas homólogas entre os invertebrados; e desempenha um importante papel no desenvolvimento do embrião: atua na ventralização de tecidos no embrião, assim como promove a diferenciação e o posicionamento neuronal ao longo do eixo dorsoventral do tubo neural. A placa do assoalho apresenta uma alta concentração da proteína Sonic Hedgehog (SHH), que é uma molécula sinalizadora que apresenta um papel fundamental no desenvolvimento, como organização do cérebro, cordão espinhal e formação dos dígitos (Breunig et al., 2008; Hagemann and Scholpp, 2012; Litingtung and Chiang, 2000; Martinez-Ferre and Martinez, 2012; Ribes et al., 2010; Spassky et al., 2008a).

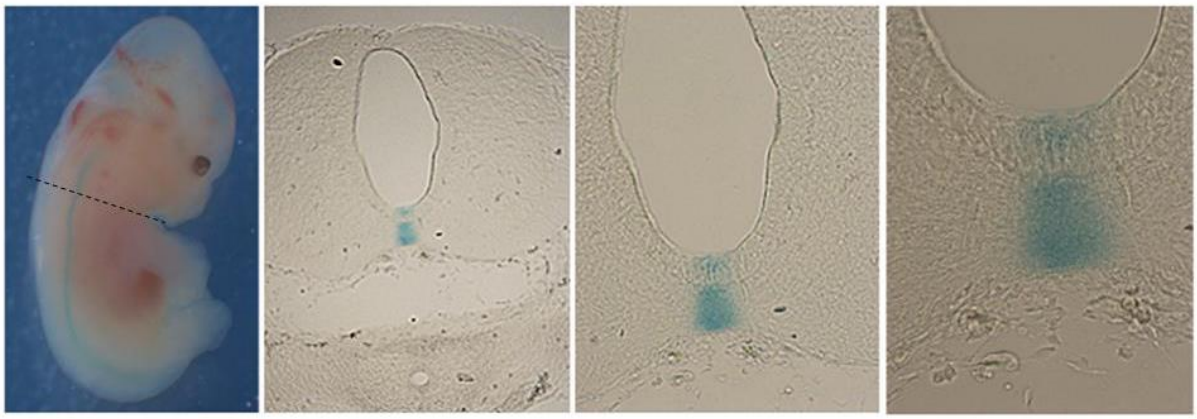


Figura 22| Corte de embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ no estágio E12,5 corados com X-gal. Corte na região cervical do embrião heterozigoto de camundongos da linhagem RHH188 no dia E12,5 evidenciando a marcação específica apenas na placa do assoalho do tubo neural.

Em conjunto, estes resultados indicam que RIC-8B exerce um importante papel em regiões que darão origem ao sistema nervoso do embrião (Figuras 19-22) e que a ausência da expressão de RIC-8B nessas regiões específicas leva à inviabilidade do desenvolvimento. Como RIC-8B é expressa na placa do assoalho, de uma maneira muito semelhante ao padrão de SHH, estes

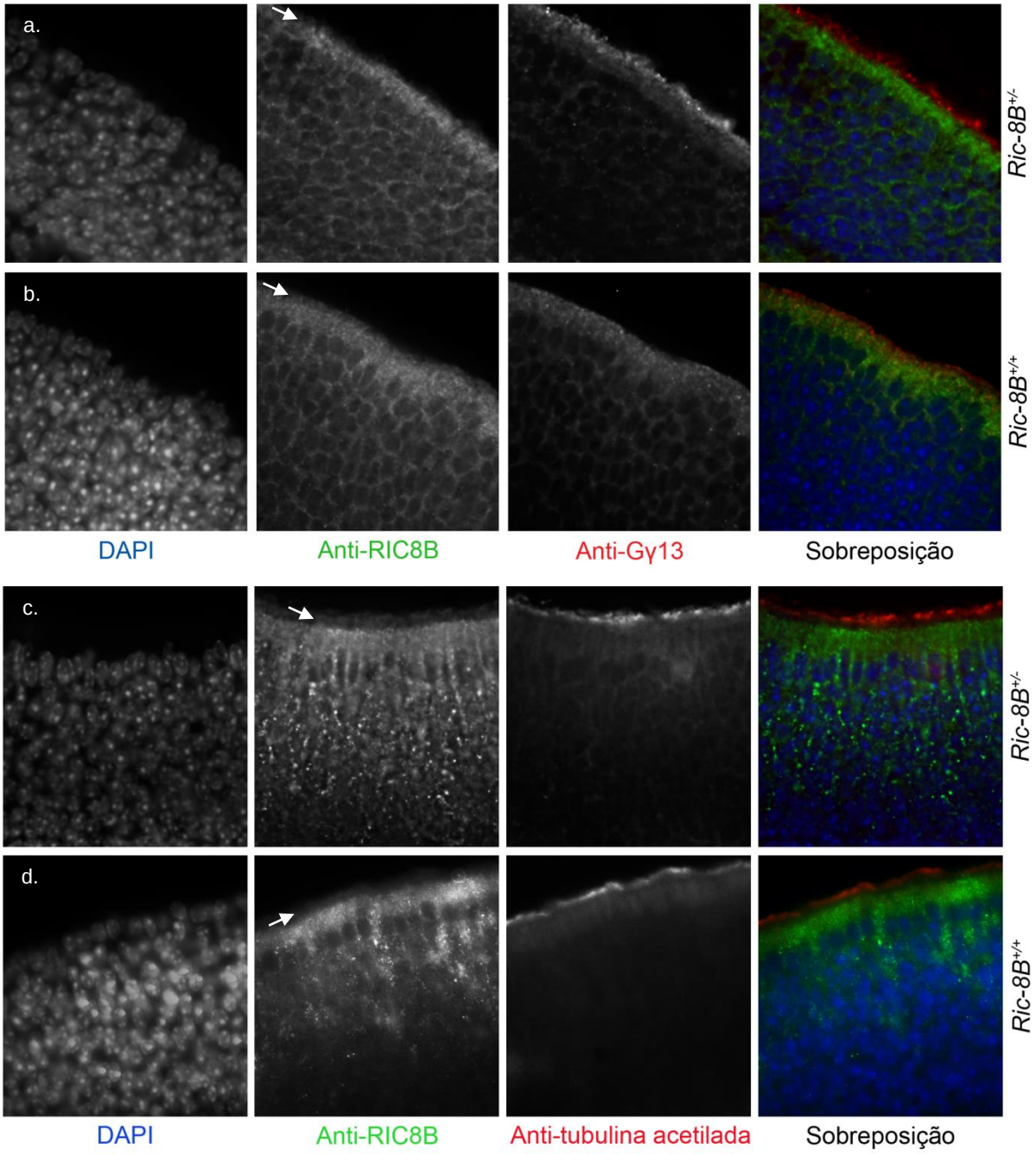
resultados indicam que RIC-8B pode ter um papel relacionado de alguma maneira com a função de SHH. Interessantemente, sabe-se que a transdução de sinal desencadeada por SHH nas células alvo ocorre em cílios primários, e depende destes para que funcione normalmente (Han et al., 2008; Horner and Caspary, 2011; Larkins et al., 2011; Spassky et al., 2008b). Como a função de RIC-8B nos camundongos adultos parece estar relacionada com os cílios dos neurônios olfatórios, nossos resultados levantam a possibilidade de que RIC-8B exerça um papel relacionado à sinalização ou tráfego ciliar tanto no camundongo adulto como durante o desenvolvimento.

4.1.8 Localização celular da proteína RIC-8B

Como a proteína RIC-8B é expressa no epitélio olfatório maduro (Von Dannecker et al., 2005; Kerr DS et al., 2008), verificamos se a diminuição de sua expressão acarretava alguma alteração morfológica no OE do camundongo adulto *Ric-8B*$^{+/-}$. Desta forma, por meio de ensaios de imunofluorescência indireta, avaliamos a organização estrutural do epitélio olfatório do camundongo heterozigoto.

A fim de verificar a localização da proteína RIC-8B no neurônio olfatório, comparamos a localização das proteínas RIC-8B com a localização de algumas proteínas com padrão de marcação bem determinado no OE, como as proteínas $G\gamma_{13}$, $G\alpha_{olf}$, alfa tubulina acetilada e gama tubulina. As proteínas $G\gamma_{13}$, $G\alpha_{olf}$ são componentes da via de transdução de sinal olfatório e localizam-se preferencialmente nos cílios dos neurônios olfatórios maduros; a alfa tubulina acetilada é um conhecido marcador de cílios; enquanto gama tubulina é um componente dos botões dendríticos (Kulaga et al., 2004). Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em cortes de OE de camundongos adultos *Ric-8B*$^{+/+}$ e *Ric-8B*$^{+/-}$, marcados com os anticorpos anti-RIC-8B, gerado no nosso laboratório pelo doutor Daniel

S. Kerr; anti-Gα_{olf} (Santa Cruz); anti-Gγ13 (Santa Cruz); anti-α-tubulina acetilada (Abcam) e anti-γ-tubulina (Abcam). Não encontramos nenhuma diferença entre a localização dessas proteínas da via de sinalização olfatória entre os camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$ e os camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ (Figura 23).



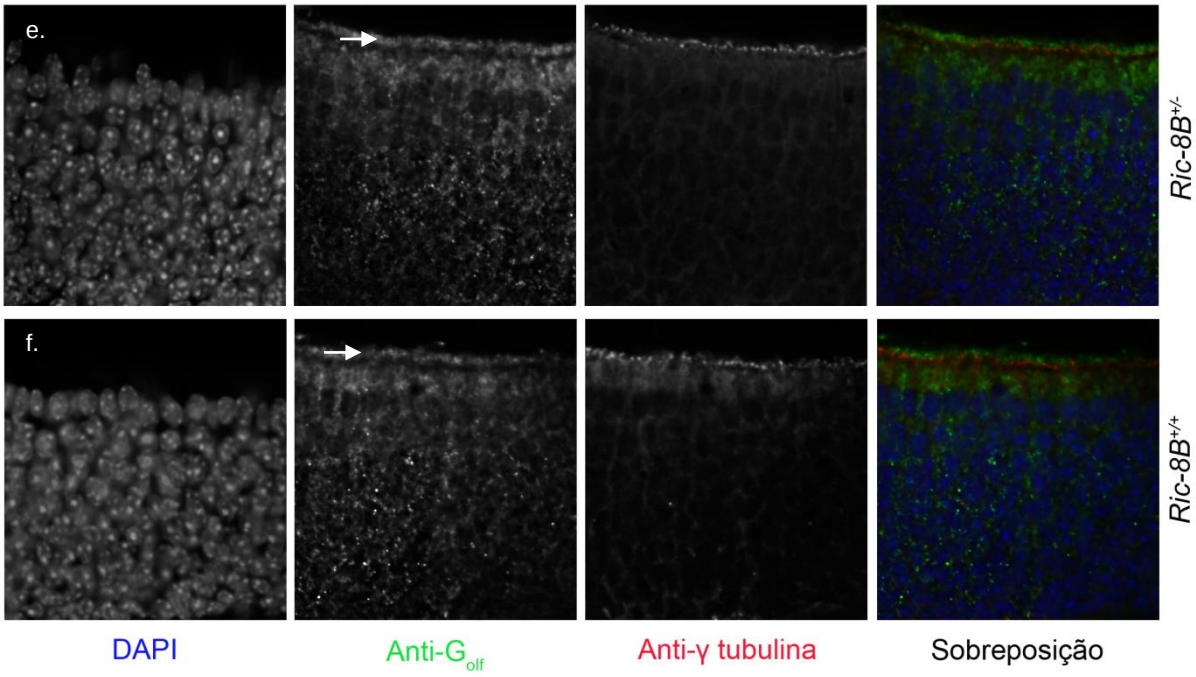


Figura 23| Não há diferença de localização da proteína RIC-8B nos camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$ e *Ric-8B*$^{+/-}$. Ensaio de imunofluorescência indireta em OE maduro de camundongos adultos. Fotografias retiradas ao aumento de 1000x e deconvoluídas pelo software NIS Elements (Nikon). **(a, b)** DAPI (em azul), anti-RIC-8B (verde), anti-Gγ_{13} (vermelho). **(c, d)** DAPI (em azul), anti-RIC-8B (verde), anti-α-tubulina acetilada (vermelho). As setas apontam a fraca marcação da camada ciliar do OE pelo anticorpo contra a proteína RIC-8B. **(e, f)** DAPI (em azul), anti-G_{olf} (verde), anti-γ-tubulina (vermelho). Genótipos indicados na lateral direita: linha superior *Ric-8B*$^{+/-}$; inferior *Ric-8B*$^{+/+}$. As setas indicam a camada ciliar.

A marcação linear superior verificada com a marcação para a proteína α-tubulina acetilada, semelhante tanto para o camundongo *Ric-8B*$^{+/+}$ quanto para o camundongo *Ric-8B*$^{+/-}$ demonstra que o camundongo heterozigoto apresenta uma camada ciliar organizada e corretamente posicionada acima dos botões dendríticos (marcados por anti-γ-tubulina). Pela sobreposição da marcação das proteínas Gγ_{13} e Gα_{olf}, provavelmente, os cílios também são funcionais.

Interessantemente, em análises preliminares, nossas imagens de imunofluorescência com o anticorpo anti-RIC-8B, captadas em aumento 1000x, alta resolução e posteriormente

deconvoluídas, evidenciaram que a marcação de RIC-8B, apesar de positiva na camada ciliar, é muito fraca nos cílios e mais intensa numa região acima da camada das células de sustentação – região composta pelos dendritos dos neurônios olfatórios; também está presente no citoplasma dos neurônios olfatórios maduros (Figura 23). A proteína $G\alpha_{olf}$ apresenta o mesmo padrão de marcação: citoplasmática, região de dendritos, acima da camada de células de sustentação e cílios, porém, a intensidade de marcação nos cílios é proporcional à marcação encontrada na região dos dendritos (Figuras 23.e, 23f. e 24). Por outro lado, a proteína $G\gamma_{13}$, previamente identificada como parte do trímero da proteína G_{olf} (Kerr DS et al., 2008), localiza-se preferencialmente na região ciliar do epitélio olfatório (Figuras 23.a e 23.b), de maneira muito similar à marcação por anti-α-tubulina acetilada. O mesmo padrão de marcação é compartilhado entre os camundongos *Ric-8B*$^{+/+}$ e *Ric-8B*$^{+/-}$.

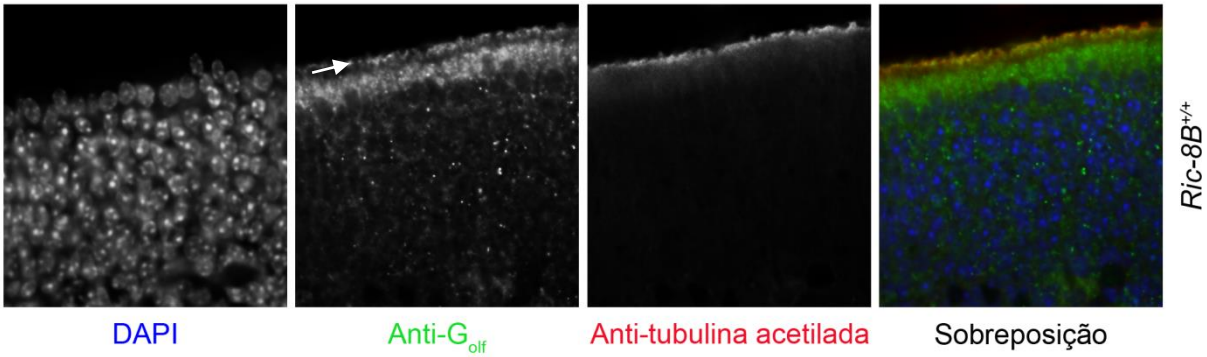


Figura 24| Localização de $G\alpha_{olf}$ no epitélio olfatório maduro. Ensaio de imunofluorescência indireta em OE maduro de camundongos adultos. Fotografia retirada ao aumento de 1000x e deconvoluída pelo software NIS Elements (Nikon). DAPI (em azul), anti-G_{olf} (verde), anti-α-tubulina acetilada (vermelho). A proteína $G\alpha_{olf}$ localiza-se equitativamente na camada ciliar, colocalizada com α-tubulina acetilada, quanto numa camada inferior, rica em dendritos, localizada acima da camada de células de sustentação – localização preferencial de RIC-8B no OE. As setas indicam a camada ciliar.

Pretendemos confirmar esses dados preliminares acerca da localização exata da proteína RIC-8B no cílio olfatório através de uma técnica chamada *en face* (Liu et al., 2012), que será

realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Xavier Grosmaitre, Centre des Sciences du Goût. Essa preparação conserva melhor a morfologia do tecido e possibilita a análise de imagens com melhor resolução.

4.2 PARTE II

4.2.1 Conservação de RIC-8B em outras espécies

Dado que as fases iniciais do desenvolvimento dos vertebrados são bastante semelhantes e proteínas guias da diferenciação e migração celular são altamente conservadas, em seguida, nós analisamos como diferem as proteínas RIC-8B de diferentes espécies.

Analisamos também a conservação da proteína RIC-8A, que é uma GEF paráloga à RIC-8B. RIC-8A e RIC-8B apresentam entre si 44% de identidade na sequência de aminoácidos, e assim como para RIC-8B, o KO de RIC-8A também é embrionicamente letal. A interrupção no KO de RIC-8A ocorre em estágios anteriores, devido ao possível envolvimento da proteína no processo de gastrulação (Tõnissoo et al., 2010).

O alinhamento das sequências de aminoácidos da RIC-8B de várias espécies de famílias filogeneticamente distantes revelou alto grau de identidade entre as proteínas e demonstrou assim que a proteína RIC-8B é altamente conservada (Figura 25). Este resultado é compatível com o fato de que RIC-8B desempenhe um papel fundamental na embriogênese.

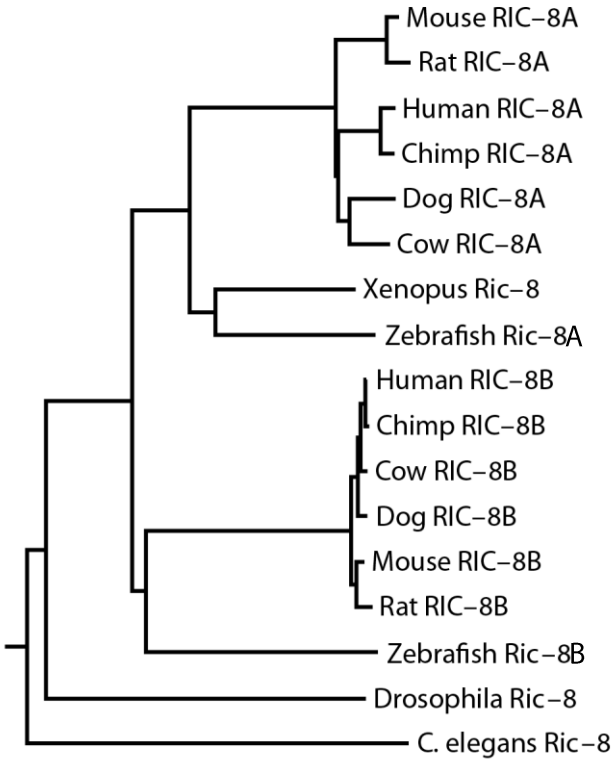


Figura 25| A proteína RIC-8B é altamente conservada em diferentes espécies. Dendrograma cujo comprimento do traço evidencia a conservação das proteínas RIC-8B, RIC-8A e Ric-8 (*D. melanogaster* e *C.elegans* apresentam apenas um gene Ric-8) entre as espécies analisadas.

Curiosamente, apesar de as duas proteínas exercerem papel embriológico fundamental para o desenvolvimento, as sequências de RIC-8B apresentam-se muito mais conservadas em comparação às de RIC-8A.

4.2.2 Análise da proteína RIC-8B em humanos

4.2.2.1 Conservação da sequência de RIC-8B humana

Em seguida analisamos o padrão de expressão da RIC-8B humana. Como não dispúnhamos de tecido olfatório humano normal, analisamos amostras de um tumor de

epitélio olfatório, o neuroblastoma olfatório, obtidos do hospital AC Camargo, em colaboração com a Dr.ª Helena Brentani.

Assim, amplificamos o cDNA correspondente ao RNAm transcrito do gene *RIC-8B* humano, clonamos e analisamos a sua sequência por alinhamento com a sequência humana depositada na rede, tanto por BLAST quanto por Clustal W e verificamos 100% de identidade.

E curiosamente, do alinhamento das sequências nucleotídicas analisadas neste trabanho, entre as sequências humana e murina, depositadas na rede, encontramos 72,8% de identidade e o mesmo valor para similaridade. Do alinhamento das sequências de aminoácidos obtivemos 97,1% de identidade das sequências e 99,0% de similaridade (Figura 26).

```
Mouse   1 MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYSDKHRATFKFESADEDKRKKLCEGI   50
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||||||
Human   1 MDEERALYIVRAGEAGAIERVLRDYSDKHRATFKFESTDEDKRKKLCEGI   50

Mouse  51 FKVLVKEVPTTCQVSCLEVLRILSRDKKILVPVTTKENMQILLRLAKLHE  100
          ||||:|::||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||:|
Human  51 FKVLIKDIPTTCQVSCLEVLRILSRDKKVLVPVTTKENMQILLRLAKLNE  100

Mouse 101 SDDSLEKVSEFPVIVESLKCLCNIVFNSQMAQQLSLELNLAAKLCNLLRK  150
          .||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 101 LDDSLEKVSEFPVIVESLKCLCNIVFNSQMAQQLSLELNLAAKLCNLLRK  150

Mouse 151 CKDRKFINDIKCFDLRLLFVLSLLHTDIRSQLRYELQGLPLLTQILESAF  200
          ||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||
Human 151 CKDRKFINDIKCFDLRLLFLLSLLHTDIRSQLRYELQGLPLLTQILESAF  200

Mouse 201 SIKWTDEYESAIDHNGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVDSWKVHKESDS  250
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 201 SIKWTDEYESAIDHNGPPLSPQETDCAIEALKALFNVTVDSWKVHKESDS  250

Mouse 251 HQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICPL  300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 251 HQFRVMAAVLRHCLLIVGPTEDKTEELHSNAVNLLSNVPVSCLDVLICPL  300

Mouse 301 THEETAQEAATLDELPSDKTTEKDTALKNSTMVYNGMNMEAIHVLLNFME  350
          |||||||||.|||||||:||.||:|.|||:||||||||||||||||||||
Human 301 THEETAQEATTLDELPSNKTAEKETVLKNNTMVYNGMNMEAIHVLLNFME  350

Mouse 351 KRIDKGSSYREGLTPVLSLLTECSRAHRNIRKFLKDQVLPPLRDVTNRPE  400
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 351 KRIDKGSSYREGLTPVLSLLTECSRAHRNIRKFLKDQVLPPLRDVTNRPE  400

Mouse 401 VGSTVRNKLVRLMTHVDLGVKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYGNAAG  450
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 401 VGSTVRNKLVRLMTHVDLGVKQIAAEFLFVLCKERVDSLLKYTGYGNAAG  450

Mouse 451 LLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTDTEEYKNAKPKEELLKPMGLKPDGTIT  500
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Human 451 LLAARGLLAGGRGDNWYSEDEDTDTEEYKNAKPKEELLKPMGLKPDGTIT  500

Mouse 501 PLEEALSQYSVIEETSSDTD  520
          ||||||:||||||||||||||
Human 501 PLEEALNQYSVIEETSSDTD  520
```

Figura 26| Alinhamento entre as sequências depositadas de aminoácidos de RIC-8B de camundongo e humana. O alinhamento foi realizado utilizando Clustal W. As sequências apresentam, entre si, 97,1% de identidade e 99% de similaridade.

4.2.2.2 Expressão de RIC-8B em humanos

Considerando a alta similaridade entre as proteínas RIC-8B humana e de camundongo, investigamos se o padrão de expressão da RIC-8B humana é semelhante ao da RIC-8B no camundongo adulto, analisamos a sua expressão em vários tecidos humanos.

Amostras de RNA total de outros tecidos humanos foram obtidos comercialmente da Clontech (*Human Total RNA Master Panel II*, Clontech).

Duas amostras de RNA total de neuroblastoma olfatório, cada uma proveniente de indivíduos diferentes, ambos pacientes do hospital AC Camargo, foram utilizadas. A extração de RNA total a partir das amostras foi realizada pela mestranda Eloísa Olivieri, do hospital AC Camargo. As amostras, identificadas como NF 7T e NF 9T, foram obtidas a partir de tecidos tumorais da cavidade nasal e maxila, respectivamente.

Reações de PCR foram realizadas utilizando cDNA que foi sintetizado a partir do RNA total com primers randômicos ou com oligoDT. O par de primers utilizado é capaz de amplificar tanto a isoforma completa da RIC-8B quanto a forma de splicing alternativo, RIC-8BΔ9, que apresentam respectivamente 413 pb e 371 pb de tamanho.

Como mostrado na Figura 27.a, dentre todos os tecidos analisados, as amostras de epitélio olfatório apresentaram o maior nível de expressão de RIC-8B. Para controle da origem do tecido, foi utilizado também um par de primers para OMP humana que, como esperado, apresentou produto somente para as amostras NF 7T e NF 9T (Figura 27.b), confirmando a existência de neurônios olfatórios apenas nas amostras de OE.

A análise dos produtos da amplificação de OMP (446pb) evidencia a presença de neurônios olfatórios maduros na amostra 12 e, em menor quantidade, na amostra 11; a expressão de RIC-8B – tanto a isoforma que codifica para a proteína inteira quanto a isoforma Δ9 (respectivamente 413 e 371 pb) – é mais intensa na amostra 12, indicando que essa proteína também é mais abundante no epitélio olfatório humano tumoral comparado aos outros tecidos, como visto anteriormente em camundongo (Von Dannecker et al., 2005). Interessantemente, diferente do que foi observado em camundongos, mesmo em condições não saturantes, após apenas 20 ciclos de PCR, as bandas apresentaram intensidades

distintas: a menor é muito mais abundante nas amostras humanas (Figura 27.a), este resultado indica que nos tecidos analisados houve predominância do RNAm da isoforma RIC-8BΔ9, que no camundongo é inativa, ou seja, não apresenta atividade de GEF *in vitro*. Como controle positivo da reação utilizamos um par de primers para GAPDH humana (Figura 27.c), que comprovou a presença e amplificabilidade de todos os cDNAs utilizados.

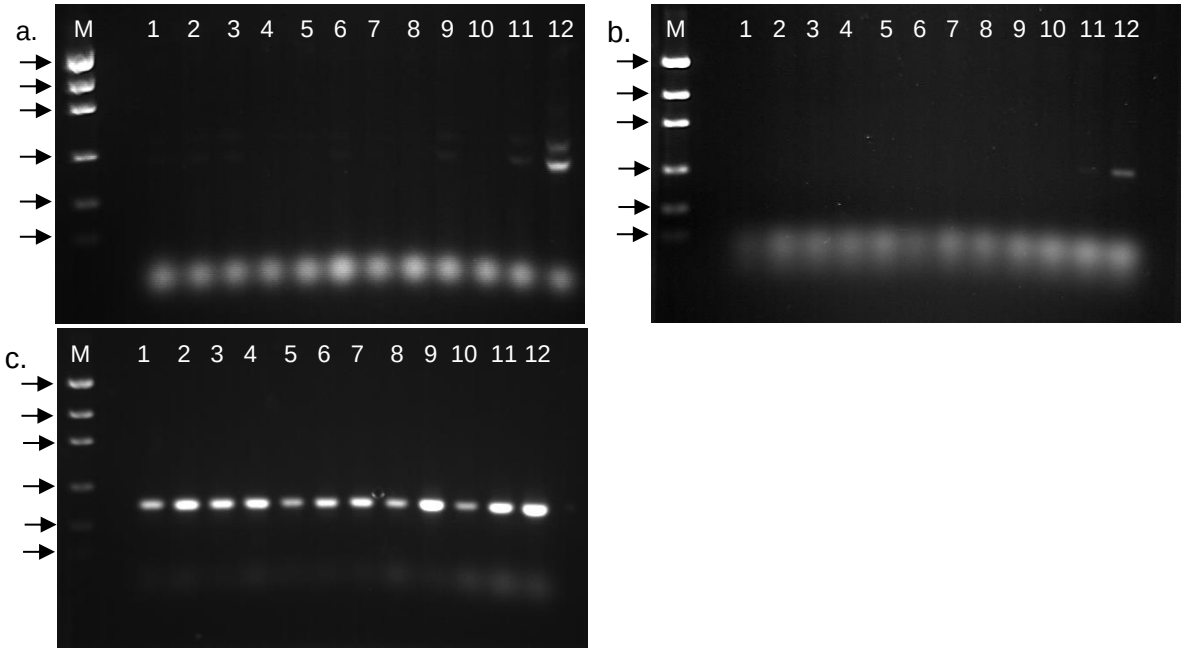


Figura 27| Expressão de RIC-8B também é predominante no epitélio olfatório em humanos. Produtos amplificados por RT-PCR por 20 ciclos com primers específicos para amplificação de RIC-8B (a, RIC-8B = 413 pb e RIC-8BΔ9 = 371 pb); OMP (b, 446 pb) e GAPDH (c, 296 pb), em géis de agarose corados com brometo de etídeo (gel de agarose 1,5 % em b e c; gel de agarose 2 % em a). Os números representam produtos amplificados a partir do cDNA dos seguintes tecidos humanos: (1) cérebro; (2) timo; (3) cérebro fetal; (4) coração; (5) rim; (6) testículo; (7) fígado fetal; (8) pulmão; (9) músculo esquelético; (10) fígado; (11) NF7T; (12) NF9T. Estes dois últimos cDNAs (11 e 12) foram removidos de um tecido tumoral presente no neuroepitélio olfatório, denominado neuroblastoma olfatório. Marcador molecular (M) Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen) indicado pelas setas, bandas respectivas de 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.

5. DISCUSSÃO

5.1 PARTE I

Neste trabalho, utilizamos uma linhagem KO a fim de determinar a função da proteína RIC-8B *in vivo*. Entretanto, a obtenção de camundongos KO para elementos da via de transdução de sinal olfatório já é, por si, fisiologicamente difícil. Muitos dos primeiros comportamentos, como o mamar e o reconhecer da mãe, essenciais para a sobrevivência do recém-nascido, são mediados pelo olfato. Por exemplo, somente cerca de 3% dos KOs de $G\alpha_{olf}$, ACIII e cNGC chegam a ser adultos, sendo que o restante morre ao terceiro dia pós-natal, a não ser que os camundongos selvagens e heterozigotos sejam retirados da mãe para facilitar o acesso dos KOs ao leite materno (Belluscio et al., 1998; Brunet et al., 1996; Zou et al., 2007). No entanto, a busca pelo camundongo *knockout Ric-8B*$^{-/-}$ nas proles recém-nascidas e pré-termo nos indicou que a anosmia dos animais não era o problema.

A inviabilidade dos camundongos KO é um indicativo de que a proteína RIC-8B exerce um papel distinto e essencial durante o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que as proteínas G são fundamentais na divisão e migração celular durante o desenvolvimento (Offermanns, 2001). A ausência de proteínas G de qualquer uma das quatro famílias (G_s, G_o, G_i ou $G_{12/13}$) pode causar distúrbios na vasculogênese, organogênese e formação de diversos anexos embrionários. Portanto, é possível que a ausência de uma proteína ativadora de proteínas G cause distúrbios similares.

Assim como as proteínas G, a proteína RIC-8A, que é uma GEF, também é essencial ao desenvolvimento. A sua ausência leva à gastrulação defectiva e desorganização mesodérmica (Tõnissoo et al., 2010). Porém, RIC-8A, ao contrário da proteína RIC-8B, apresenta um padrão de expressão ubíquo no adulto e interage com todas as famílias de proteínas G, exceto

$G_{s,}$ enquanto RIC-8B apresenta um padrão de expressão adulto restrito a tecidos olfatórios e interage com as proteínas $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker et al., 2005).

Em concordância, por sua expressão ubíqua no sistema nervoso central, camundongos *Ric-8A*$^{+/-}$ apresentam alterações fenotípicas claras de comportamento, como o aumento da ansiedade (Tõnissoo et al., 2010). Já os camundongos *Ric-8B*$^{+/-}$ não apresentam nenhuma alteração fenotípica aparente, nem morfológica (Figura 14 e 15) em relação aos camundongos selvagens.

Entretanto, é pouco provável que a letalidade precoce do animal *Ric-8B*$^{-/-}$ seja causada pelo envolvimento de RIC-8B com algum elemento da via de transdução de sinal olfatório, pois os receptores olfatórios são na sua maioria expressos somente a partir do dia E14,5 e a proteína G_{olf} só é expressa a partir do dia E12,5. Já os placóides olfatórios surgem no dia E9,5 (Cuschieri and Bannister, 1975), depois de uma migração da parte anterior do tubo neural. Estudos demonstraram que embriões que tiveram seus placóides retirados ou apenas lesionados são letais, já que o desenvolvimento do telencéfalo depende da interação com os placóides olfatórios. Sendo assim, nesse caso, a proteína RIC-8B poderia estar envolvida nessa via responsável pela migração das células do tubo neural e formação dos placóides olfatórios.

Um estudo em paralelo a este também verificou que o camundongo *Ric-8B*$^{-/-}$ de uma linhagem *knockout* distinta, obtida através da tecnologia VelociGene, é embrionicamente inviável e morre por volta do dia E8,5 (Gabay et al., 2011). Naquele trabalho, foram analisadas células-tronco retiradas de embriões (E3,5 a E6,5) *Ric-8A*$^{-/-}$ e *Ric-8B*$^{-/-}$. Nas células *Ric-8B*$^{-/-}$, Gabay e colaboradores verificaram uma redução de 85% de $G\alpha_s$ na membrana plasmática, reforçando o possível papel de RIC-8B no transporte e/ou estabilização (via um possível papel de chaperona) de $G\alpha_s$ na membrana.

É muito provável que a conservação da sequência de RIC-8B entre diferentes espécies filogeneticamente distantes (Figuras 25 e 26) deva-se, na verdade, à conservação de seu papel embrionário nessas espécies.

Embriões de *Zebrafish* com o gene *ric-8* interrompido também são letais. A ausência de Ric-8 causa edema, mudanças no fenótipo pigmentar e morte precoce (Nagayoshi et al., 2008). O *knockdown* de Ric-8 em drosófilas também resultou na divisão assimétrica defectiva nos primeiros estágios da embriogênese, isto levou à desorganização celular durante a gastrulação e na diferenciação de neuroblastos. Além disso, também foi verificado em drosófilas que na ausência de Ric-8 há menor concentração de proteínas G na membrana plasmática (David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Wang et al., 2005). Em *C. elegans,* Ric-8 também participa da divisão assimétrica no desenvolvimento, pelo seu envolvimento com o controle do movimento dos centrossomos (Afshar et al., 2005; Couwenbergs et al., 2004; Miller and Rand, 2000). A expressão de Ric-8A também foi verificada em embriões de *Xenopus tropicalis,* tanto em estágios precoces do desenvolvimento, quanto em estágios mais tardios, restrita ao tubo neural, cérebro, estruturas derivadas da crista neural e região craniofacial (Maldonado-Agurto et al., 2011).

Outro achado relevante que encontramos nas análises dos embriões é que o padrão de expressão do gene *Ric-8B* durante a embriogênese do camundongo assemelha-se ao padrão ventral ao longo do tubo neural, descrito para a via de sinalização de Sonic Hedgehog (SHH) (Figuras 19-22). Interessantemente, a via de sinalização de SHH ocorre em uma estrutura denominada cílio primário – organela que concentra proteínas de sinalização, como proteínas G e seus receptores. Essa colocalização pode ser um indicativo da função molecular de RIC-8B durante o desenvolvimento.

A via de sinalização de SHH desempenha papel fundamental na organogênese: está intimamente envolvida na formação dos dedos nos brotos dos membros superiores e inferiores e na organização das vesículas encefálicas (Ericson et al., 1997), assim como também é fundamental para a organização da placa do assoalho (Ribes et al., 2010), situada na região ventral do tubo neural. A marcação de RIC-8B na região ventral do tubo neural localiza-se exatamente na placa do assoalho (Figura 22).

A placa do assoalho é uma estrutura glial fundamental durante o desenvolvimento. Localizada na porção ventral do tubo neural, ao longo do eixo anteroposterior do embrião, desde o mesencéfalo à cauda, organiza, durante a embriogênese através da sinalização por SHH, os tecidos embrionários no eixo dorsoventral, sendo também responsável pelo direcionamento de axônios e diferenciação dos neurônios na divisão dorsoventral no tubo neural. Em adultos, a expressão de SHH está ligada ao desenvolvimento de alguns tipos específicos de tumores (Ellison et al., 2011; Novak, 2003), além da regeneração neuronal adulta de células do hipocampo (Breunig et al., 2008; Han et al., 2008; Spassky et al., 2008b).

O cílio primário, onde estão compartimentalizadas as moléculas da via de sinalização de SHH (Satir et al., 2010), é, na verdade, uma pequena extensão da superfície celular e atua como uma organela sensória através da qual regula a fisiologia e comportamento intracelular em resposta às variações extracelulares. Como a maioria das células de mamíferos, os progenitores neurais e neurônios também exibem cílio(s) primário(s). Estudos recentes apontam que essa pequena projeção exerce papéis importantes no desenvolvimento nervoso (envolvendo-se principalmente na formação do hipocampo, bulbo olfatório e diencéfalo) e em algumas patologias (Gerdes et al., 2009; Han and Alvarez-Buylla, 2010; Veland et al., 2009; Ware et al., 2011; Willaredt et al., 2012). A ciliogênese está intrinsecamente relacionada à progressão do ciclo celular, o que indica que o cílio primário pode exercer papéis fundamentais na proliferação celular e diferenciação durante o desenvolvimento.

Na base do cílio primário, somente proteínas (ou complexos proteicos) contendo sequências-alvo para direcionamento ciliar têm o acesso liberado através de uma zona definida por fibras de transição. Foi demonstrado que esta regulação seletiva da entrada de proteínas para o compartimento ciliar envolve proteínas G específicas e GEFs que estão associadas a complexos proteicos (Anand and Khanna, 2012; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Hsiao et al., 2012, 2012; Ishikawa and Marshall, 2011).

A escolha de proteínas para o cílio primário é um processo finamente regulado que, provavelmente, envolve múltiplos mecanismos moleculares de reconhecimento proteico e interação proteína-membrana. Sabe-se que o estado GDP-GTP dessas proteínas é fundamental nesse processo de escolha, assim como há uma grande variedade de GEFs que atuam na base do cílio reativando proteínas importantes para a modulação de diversos eventos celulares através da ativação de seus efetores secundários, como a seleção de proteínas em vesículas, ativação de cinases, fosfatases e proteínas motoras (Hsiao et al., 2012). Mutações descritas de GAPs e GEFs estão ligadas a diversas ciliopatias humanas, e levam a desordens no desenvolvimento do sistema nervoso devido à má formação na transição mesencéfalo/prosencéfalo.

Mutações em outros elementos participantes no cílio primário, como *Ift88* e *Cep290*, em camundongos, levam à falha da formação ou função do cílio primário, respectivamente. Deleções descritas no gene IFT88 resultam em fenótipos que indicam redução da sinalização da via SHH, tais como a perda de certos tipos celulares na região ventral do tubo neural e polidactilia.

Da mesma forma, a marcação de RIC-8B no camundongo heterozigoto marcado com X-gal também é incidente na região ventral do tubo neural e região de formação dos dedos (Figuras 21, 22).

Além do déficit olfatório, má formação do sistema nervoso e polidactilia, outro fenótipo característico de ciliopatias são anomalias renais, como rins policísticos e nefronofitíase. Na análise semiquantitativa da expressão de RIC-8B (Gráfico 1), além das regiões conhecidas de expressão de RIC-8B, o rim apresentou um discreto aumento da coloração por X-gal em relação ao selvagem. Apesar de apresentar atividade endógena de β-galactosidase, o rim apresenta ORs, ACIII e também $G\alpha_{olf}$ em seus túbulos distais e mácula densa (Pluznick et al., 2009). A expressão de $G\alpha_{olf}$, provável alvo fisiológico de RIC-8B no rim, fundamentaria a expressão de RIC-8B nesse órgão. Estima-se que a maquinaria de transdução de sinal olfatória estaria envolvida na moderação da excreção de renina e controle da filtração glomerular. Um importante papel desempenhado por cílios no rim é a mecanossensação em que os cílios sinalizam o fluxo de urina e modulam a morfogênese de ductos.

Verificou-se recentemente que várias proteínas relacionadas a nefropatias também estão presentes no epitélio olfatório. A ausência delas pode perturbar a estratificação usual do OE entre OSN imaturos e maduros e também acarretam má-formação da estrutura ciliar. Também foi descrito que, *in vitro*, 6 diferentes ORs coimunoprecipitam com proteínas envolvidas em nefropatias. Contudo, não se sabe se essa interação ocorre *in vivo* e se ela está envolvida no tráfego de ORs para a membrana ciliar (Pluznick et al., 2011).

Mutações hipomórficas em outros genes componentes dos cílios primários em camundongos, como CEP290 (linhagem *rd16*), IFT88 (linhagem ORPK) e Bbs1, 2, 4 e 8-*null* também resultam em camundongos anósmicos (McEwen et al., 2007; McIntyre et al., 2012; Tadenev et al., 2011). Assim como os camundongos da linhagem *rd16*, pacientes com mutação em CEP290 que apresentam amaurose congênita de Leber (LCA) apresentam anosmia.

Curiosamente, apesar da perda da sinalização olfatória, os cílios dos camundongos *rd16* apresentam-se intactos, tanto os axonemas quanto os botões dendríticos. Além disso, os OSN

apresentam ORs, ACIII e cNGC nos cílios mas não apresentam nem $G\alpha_{olf}$, nem $G\gamma_{13}$, o que indica que há diferentes mecanismos de regulação do tráfego das moléculas aos cílios olfatórios.

Foi verificado neste mesmo trabalho que $G\alpha_{olf}$, e $G\gamma_{13}$ são coimunoprecipitadas com CEP290, indicando que CEP290 é uma molécula chave no transporte de elementos da via de transdução de sinal olfatório para os cílios. Curiosamente, em dados gerados previamente em nosso laboratório, Kerr e colaboradores (Kerr DS et al., 2008) verificaram que $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$ também coimunoprecipitam com RIC-8B.

Intrigantemente, um trabalho recente demonstrou que a ausência da proteína $G\gamma_{13}$ numa linhagem *knockout* condicional de camundongo consequentemente leva à diminuição da concentração de $G\alpha_{olf}$, $G\beta_{1,}$ RIC-8B e CEP290 no epitélio olfatório, enquanto outras proteínas da cascata de sinalização como ACIII não sofreram redução. A marcação por α-tubulina acetilada nesses camundongos indica que, como os camundongos da linhagem *rd16*, eles apresentam a camada ciliar intacta, porém, são anósmicos (Li et al., 2013).

Assim como os cílios primários, os cílios dos OSNs não possuem a maquinaria necessária para a síntese proteica. Sendo assim, as proteínas sintetizadas no citoplasma necessitam ser transportadas do corpo celular para o interior do cílio. Os cílios dos OSNs e os cílios primários compartilham não só as proteínas envolvidas no movimento pelo axonema dos cílios – as proteínas da família de proteínas transportadoras intraflagelar (IFTX) –, como também compartilham várias moléculas localizadas na região do corpo basal do cílio, que constituem a zona de transição e atuam como barreiras que restringem o acesso ao ápice do cílio (McEwen et al., 2007). Uma das principais proteínas constituintes dessa zona de transição é CEP290. A localização celular de RIC-8B que observamos no epitélio olfatório maduro (Figura 23) está de acordo com esta hipótese, já que apesar de haver uma marcação fraca na camada ciliar apical, observamos uma imunoreatividade maior na parte basal da

camada ciliar, negativa para α-tubulina acetilada e logo abaixo dos botões dendríticos (evidenciados pela marcação de γ-tubulina).

Portanto, nossos resultados, juntamente com resultados anteriores do grupo (Von Dannecker et al., 2005), sugerem a possibilidade de que RIC-8B possa estar envolvida na regulação do trânsito de proteínas para o cílio.

Nesse caso, RIC-8B exerceria um papel molecular comum, relacionado à função ciliar, tanto na vida adulta quanto durante o desenvolvimento: nos cílios olfatórios dos neurônios olfatórios no camundongo adulto e nos cílios primários nas células embrionárias.

RIC-8B poderia atuar nos cílios das seguintes maneiras: (1) através de sua atividade GEF na via transdução de sinal, amplificando a sinalização; (2) através de sua atividade GEF na zona de transição do cílio, interagindo também com outras proteínas, no caso dos cílios olfatórios, com $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$; (3) através do carreamento específico das proteínas sinalizadoras à membrana do ápice ciliar para a transdução de sinais ($G\alpha_{olf,}$ nos neurônios olfatórios e $G\alpha_s$ nas células do tubo neural); (4) na base do cílio, através de sua atividade GEF pela regulação da entrada das proteínas nos cílios por meio de seu estado GTP-GDP. Essas hipóteses, que deverão ser investigadas no futuro, estão sumarizadas na Figura 28.

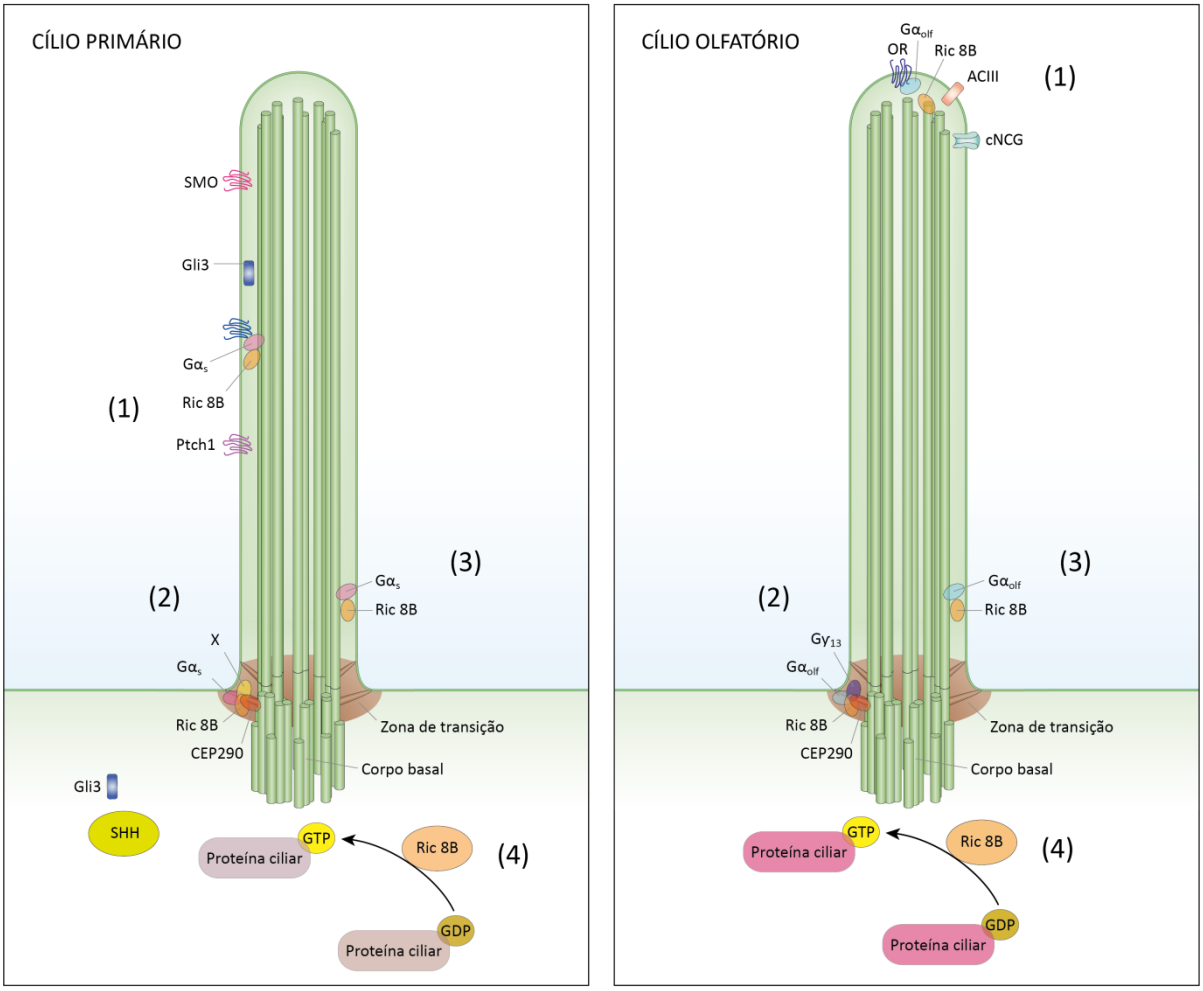


Figura 28| Possíveis papéis de RIC-8B *in vivo* nos cílios. Representação esquemática dos possíveis papéis de RIC-8B num cílio primário (esquerda) e num cílio olfatório (direita). Nossos resultados sugerem que, além de seu papel de GEF na cascata de transdução de sinal **(1)**, é possível que RIC-8B atue na regulação do transporte de proteínas, tanto para o cílio primário quanto para o cílio olfatório. Essa regulação ocorreria pela sua interação com proteínas presentes na zona de transição do cílio **(2);** pela interação e carreamento de proteínas sinalizadoras ao ápice do cílio **(3)** e/ou por meio de sua atividade GEF em proteínas específicas na base do cílio **(4)**.

Por fim, em conjunto, os nossos dados indicam que *in vivo*, RIC-8B apresenta um papel fundamental durante a embriogênese. RIC-8B é expresso no sistema nervoso desde fases iniciais do desenvolvimento, na região ventral do tubo neural, por toda a sua extensão e em regiões cefálicas específicas. O padrão de expressão sugere que RIC-8B está relacionada com a via de SHH, que desempenha papel fundamental durante a organogênese dos vertebrados,

como o desenvolvimento dos dígitos nos membros e a organização das vesículas encefálicas. Como a via de SHH ocorre nos cílios primários, curiosamente, nossos dados sugerem que RIC-8B exerça um papel relacionado à sinalização em cílios tanto no animal adulto quanto durante a embriogênese.

5.2 PARTE II

RIC-8B e RIC-8A são proteínas ortólogas que compartilham 44% de identidade na sequência de aminoácidos, correspondentes a domínios conservados denominados "domínios sinembrina". Entretanto, apesar de apresentarem domínios conservados, apresentam especificidades diferentes: RIC-8A atua como GEF para as proteínas das famílias $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ e $G\alpha_q$, enquanto RIC-8B atua como GEF para proteínas das famílias $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$. Comparando a conservação das proteínas RIC-8B e RIC-8A, observamos que a proteína RIC-8B apresenta-se muito mais conservada entre as espécies analisadas (Figura 25). O alinhamento das proteínas RIC-8B de camundongo e humana, por exemplo, revelou que elas apresentam entre si 97% de identidade de aminoácidos e 99% de similaridade. Este alto índice de conservação deve-se provavelmente ao papel essencial que RIC-8B desempenha durante o desenvolvimento.

A proteína RIC-8B se apresenta sob duas isoformas, sua forma completa e o transcrito alternativo RIC-8BΔ9, tanto no camundongo (Von Dannecker et al., 2005) quanto no homem. Todavia, no homem, a isoforma mais expressa é a RIC-8BΔ9 (Figura 27), diferentemente do camundongo, no qual as duas isoformas são expressas equitativamente. Curiosamente, esta isoforma truncada de RIC-8B não se liga nem à $G\alpha_{olf}$ ou $G\alpha_s$ *in vitro* e não apresenta atividade GEF. O papel fisiológico exercido por esta isoforma deve ser, portanto, independente da função GEF, mas ainda é desconhecido. No entanto, não sabemos ao certo se a prevalência da

isoforma RIC-8BΔ9 sobre a proteína RIC-8B é natural do epitélio olfatório humano ou se esse estado é resultado, ou causa, do processo tumoral.

O neuroblastoma olfatório (ONB), tumor do qual foram extraídas as amostras utilizadas e também conhecido como estesioneuroblastoma, é uma neoplasia maligna rara. Os principais sintomas da doença são: obstrução nasal, cefaléia, dor facial, visão distorcida, hiponosmia, sangramento nasal, lacrimação excessiva e massa maxilar, resultantes de um estágio avançado do tumor. O comportamento biológico desse tumor varia de indolente, com o paciente apresentando uma longa sobrevida; ou agressivo, que em poucos meses progride à metastização seguida de morte. Por sua baixa incidência, há controvérsias quanto sua origem, diagnóstico e tratamento – não há nenhum marcador molecular exclusivo da doença descrito para o diagnóstico, nem para o estadiamento da doença (Matayoshi and Otaki, 2011). Os marcadores moleculares utilizados atualmente, como a enolase neurônio específica (NSE), sinaptofisina, cromogranina, CD56 e CD57, são expressos numa ampla gama de células neuronais, limitando seu uso como marcadores de ONB. Além disso, outros tumores como carcinoma sinonasal indiferenciado e carcinoma nasofaríngeo indiferenciado, se apresentam nas mesmas regiões e com sintomas bastante similares, dificultando ainda mais o diagnóstico de ONBs. No entanto, verificamos que essa neoplasia tem origem nos neurônios olfatórios, pois, além de RIC-8B, também expressam OMP, exclusiva de neurônios olfatórios maduros que, em condições normais, não são expressas na entrada da cavidade nasal ou na maxila.

Em análises adicionais das amostras, a pós-doutora Daniela Gonzales verificou a expressão de vários ORs representantes das quatro zonas das turbinadas, apontando que o tumor, provavelmente, tem sua origem clonal nas células basais, progenitoras do epitélio olfatório (ver em Anexo). A descoberta da origem clonal desse tumor possibilita o diagnóstico molecular a partir de biópsias do tumor, tornando o diagnóstico mais rápido e preciso, assim como acelera e aumenta a acurácia da intervenção clínica.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, os dados gerados nesta tese permitem as seguintes conclusões:

- Em camundongos adultos, RIC-8B é expressa nos mesmos tecidos que outras proteínas conhecidas da via de transdução de sinal olfatório;
- A proteína RIC-8B também é expressa no órgão do septo.
- Claramente, RIC-8B apresenta dois papéis fisiológicos distintos no camundongo *in vivo*: (1) papel olfatório no camundongo adulto, já que sua expressão é predominante em áreas de sinalização olfatória e interage especificamente com a proteína olfatória $G\alpha_{olf}$; (2) papel embrionário independente de $G\alpha_{olf}$ e que antecede a formação do placóide olfatório, primeiro tecido olfatório na embriogênese e que dá origem ao MOE.
- No dia embrionário E8,5, *Ric-8B* está expresso especificamente ao longo de toda a região ventral do tubo neural e em áreas específicas da região cefálica; no dia embrionário E10,5, RIC-8B mantém seu perfil de expressão na região ventral do tubo neural e nas regiões cefálicas anteriores. No dia embrionário E12,5, RIC-8B é expresso na placa do assoalho, em regiões específicas das vesículas encefálicas e também na região de separação dos dígitos dos membros superiores e inferiores.
- O embrião knockout (*Ric-8B*$^{-/-}$) torna-se inviável por volta dos dias E8,5 e E9,0.
- O camundongo heterozigoto (*Ric-8B*$^{+/-}$) é haplossuficiente. A expressão de apenas um dos alelos é suficiente para viabilizar a embriogênese do animal. O animal heterozigoto adulto não apresenta nenhuma deficiência morfológica ou comportamental aparente e os níveis de RNAm apresentam redução menor do que a esperada de cerca de 50%.

- O camundongo heterozigoto apresenta um epitélio olfatório organizado e que expressa α-tubulina acetilada e γ-tubulina em seus cílios, assim como RIC-8B, $G\gamma_{13}$ e $G\alpha_{olf}$ e sem nenhuma alteração morfológica aparente.
- A proteína RIC-8B, diferentemente de $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$, apresenta uma marcação ciliar fraca. No entanto, apresenta uma marcação citoplasmática nos OSNs maduros, constituindo uma marcação intensa numa região rica em dendritos, acima da camada de células de sustentação e inferior à camada dos botões dendríticos.
- RIC-8B apresenta-se altamente conservada entre espécies filogeneticamente distantes.
- As proteínas RIC-8B de camundongo e humana apresentam 97% de identidade e 99% de similaridade entre os aminoácidos.
- Diferentemente do que é descrito para os camundongos, em que as isoformas são expressas equitativamente, a isoforma RIC-8BΔ9 é mais expressa no tecido tumoral de neuroblastoma olfatório em humanos.
- A proteína RIC-8B também é expressa no sistema olfatório humano. O tecido do tumor neuroblastoma olfatório apresenta expressão de RIC-8B e OMP, comprovando a origem neuronal olfatória das células do tumor.

7. REFERÊNCIAS[1]

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2005). Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during C. elegans asymmetric cell division. Development *132*, 4449–4459.

Anand, M., and Khanna, H. (2012). Ciliary transition zone (TZ) proteins RPGR and CEP290: role in photoreceptor cilia and degenerative diseases. Expert Opin. Ther. Targets *16*, 541–551.

Axel, R. (2005). Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. *44*, 6110–6127.

Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. Neuron *20*, 69–81.

Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. Biochim. Biophys. Acta *1768*, 772–793.

Bolon, B. (2008). Whole mount enzyme histochemistry as a rapid screen at necropsy for expression of beta-galactosidase (LacZ)-bearing transgenes: considerations for separating specific LacZ activity from nonspecific (endogenous) galactosidase activity. Toxicol Pathol *36*, 265–276.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry *72*, 248–254.

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

Breer, H., Fleischer, J., and Strotmann, J. (2006). The sense of smell: multiple olfactory subsystems. Cell. Mol. Life Sci. *63*, 1465–1475.

Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., Arellano, J.I., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R.A., Rakic, P., and Town, T. (2008). Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. PNAS *105*, 13127–13132.

Brunet, L.J., Gold, G.H., and Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. Neuron *17*, 681–693.

Buck, L.B. (2005). Unraveling the sense of smell (Nobel lecture). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. *44*, 6128–6140.

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

Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., and Tall, G.G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. J. Biol. Chem. *286*, 19932–19942.

Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *86*, 2172–2175.

Couwenbergs, C., Spilker, A.C., and Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by C. elegans RIC-8. Curr. Biol. *14*, 1871–1876.

Cuschieri, A., and Bannister, L.H. (1975). The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. J. Anat. *119*, 277–286.

Von Dannecker, L.E.C., Mercadante, A.F., and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an Olfactory Putative GTP Exchange Factor, Amplifies Signal Transduction Through the Olfactory-Specific G-Protein Gαolf. J. Neurosci. *25*, 3793–3800.

Von Dannecker, L.E.C., Mercadante, A.F., and Malnic, B. (2006). Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 9310–9314.

David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaïche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. Nat. Cell Biol. *7*, 1083–1090.

Doty, R.L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. Nature Reviews Neurology *8*, 329–339.

Duggan, C.D., and Ngai, J. (2007). Scent of a stem cell. Nature Neuroscience *10*, 673–674.

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

Dulac, C., and Torello, A.T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 551–562.

Ellison, D.W., Dalton, J., Kocak, M., Nicholson, S.L., Fraga, C., Neale, G., Kenney, A.M., Brat, D.J., Perry, A., Yong, W.H., et al. (2011). Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. Acta Neuropathol. *121*, 381–396.

Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Jessell, T.M. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *62*, 451–466.

Gabay, M., Pinter, M.E., Wright, F.A., Chan, P., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., and Tall, G.G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. Sci Signal *4*, ra79.

Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega, T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., et al. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. Nat. Genet. *43*, 776–784.

Gerdes, J.M., Davis, E.E., and Katsanis, N. (2009). The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. Cell *137*, 32–45.

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.

Grosmaitre, X., Santarelli, L.C., Tan, J., Luo, M., and Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. Nat Neurosci *10*, 348–354.

Grüneberg, H. (1973). A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. Z Anat Entwicklungsgesch *140*, 39–52.

Hagemann, A.I.H., and Scholpp, S. (2012). The Tale of the Three Brothers – Shh, Wnt, and Fgf during Development of the Thalamus. Front Neurosci *6*.

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., and Knoblich, J.A. (2005). Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. Nat. Cell Biol. *7*, 1099–1105.

Han, Y.-G., and Alvarez-Buylla, A. (2010). Role of Primary Cilia in Brain Development and Cancer. Curr Opin Neurobiol *20*, 58–67.

Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. Nat. Neurosci. *11*, 277–284.

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.

Hinrichs, M. v., Torrejón, M., Montecino, M., and Olate, J. (2012). Ric-8: Different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. Journal of Cellular Biochemistry *113*, 2797–2805.

Horner, V.L., and Caspary, T. (2011). Disrupted dorsal neural tube BMP signaling in the cilia mutant Arl13b hnn stems from abnormal Shh signaling. Dev. Biol. *355*, 43–54.

Hsiao, Y.-C., Tuz, K., and Ferland, R.J. (2012). Trafficking in and to the primary cilium. Cilia *1*, 4.

Ishikawa, H., and Marshall, W.F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 222–234.

Jones, D.T., and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. Science *244*, 790–795.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., and Decho, A.W. (2008). Rapid screening of quorum-sensing signal N-acyl homoserine lactones by an in vitro cell-free assay. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 3667–3671.

Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L.B., and Matsunami, H. (2007). Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. Nature *449*, 468–472.

Kerr DS, Von Dannecker LE, Davalos M, Michaloski JS, and Malnic B (2008). Ric-8B interacts with G alpha olf and G gamma 13 and co-localizes with G alpha olf, G beta 1 and G gamma 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol Cell Neurosci *38*, 341–348.

Kulaga, H.M., Leitch, C.C., Eichers, E.R., Badano, J.L., Lesemann, A., Hoskins, B.E., Lupski, J.R., Beales, P.L., Reed, R.R., and Katsanis, N. (2004). Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. Nat Genet *36*, 994–998.

Larkins, C.E., Aviles, G.D.G., East, M.P., Kahn, R.A., and Caspary, T. (2011). Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. Mol Biol Cell *22*, 4694–4703.

Li, F., Ponissery-Saidu, S., Yee, K.K., Wang, H., Chen, M.-L., Iguchi, N., Zhang, G., Jiang, P., Reisert, J., and Huang, L. (2013). Heterotrimeric G Protein Subunit Gγ13 Is Critical to Olfaction. J. Neurosci. *33*, 7975–7984.

Litingtung, Y., and Chiang, C. (2000). Control of Shh activity and signaling in the neural tube. Developmental Dynamics *219*, 143–154.

Liu, Z., Fenech, C., Cadiou, H., Grall, S., Tili, E., Laugerette, F., Wiencis, A., Grosmaitre, X., and Montmayeur, J.-P. (2012). Identification of new binding partners of the chemosensory signaling protein Gγ13 expressed in taste and olfactory sensory cells. Front Cell Neurosci *6*.

Ma, M., Grosmaitre, X., Iwema, C.L., Baker, H., Greer, C.A., and Shepherd, G.M. (2003). Olfactory Signal Transduction in the Mouse Septal Organ. J. Neurosci. *23*, 317–324.

Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., Henriquez, J.P., Olate, J., Hinrichs, M.V., and Torrejón, M. (2011). Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in Xenopus embryogenesis. Gene Expr. Patterns *11*, 401–408.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L.B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. Cell *96*, 713–723.

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.

Mamasuew, K., Breer, H., and Fleischer, J. (2008). Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. Eur. J. Neurosci. *28*, 1775–1785.

Martinez-Ferre, A., and Martinez, S. (2012). Molecular Regionalization of the Diencephalon. Front Neurosci *6*.

Matayoshi, R., and Otaki, J.M. (2011). Immunohistochemical detection of olfactory-specific sensory transduction proteins in olfactory neuroblastoma. Neurosci. Res. *69*, 258–262.

Matsunami, H., and Buck, L.B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. Cell *90*, 775–784.

McEwen, D.P., Koenekoop, R.K., Khanna, H., Jenkins, P.M., Lopez, I., Swaroop, A., and Martens, J.R. (2007). Hypomorphic CEP290/NPHP6 mutations result in anosmia caused by the selective loss of G proteins in cilia of olfactory sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 15917–15922.

McIntyre, J.C., Davis, E.E., Joiner, A., Williams, C.L., Tsai, I.-C., Jenkins, P.M., McEwen, D.P., Zhang, L., Escobado, J., Thomas, S., et al. (2012). Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. Nat. Med.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in Caenorhabditis elegans. Genetics *156*, 1649–1660.

Miller, K.G., Emerson, M.D., and Rand, J.B. (1999). Goalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in C. elegans. Neuron *24*, 323–333.

Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., and Rand, J.B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the C. elegans nervous system. Neuron *27*, 289–299.

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

Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N., and Itoh, H. (2010). Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. J. Biol. Chem. *285*, 11114–11120.

Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., and Kawakami, K. (2008). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: tcf7 and synembryn-like. Development *135*, 159–169.

Novak, K. (2003). Back in time. Nature Reviews Cancer *3*, 238–238.

Offermanns, S. (2001). In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. Oncogene *20*, 1635–1642.

Pluznick, J.L., Zou, D.-J., Zhang, X., Yan, Q., Rodriguez-Gil, D.J., Eisner, C., Wells, E., Greer, C.A., Wang, T., Firestein, S., et al. (2009). Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney. PNAS *106*, 2059–2064.

Pluznick, J.L., Rodriguez-Gil, D.J., Hull, M., Mistry, K., Gattone, V., Johnson, C.A., Weatherbee, S., Greer, C.A., and Caplan, M.J. (2011). Renal Cystic Disease Proteins Play Critical Roles in the Organization of the Olfactory Epithelium. PLoS One *6*.

Proust, M. (1913). In Search of Lost Time: Proust 6-pack (Modern Library).

Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L.L., Novitch, B., Marti, E., et al. (2010). Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. Genes Dev. *24*, 1186–1200.

Rodolfo-Masera, T. (1943). Su 1'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. Arch Ital Anat Embryol. 157–212.

Ryba, N.J., and Tirindelli, R. (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors. Neuron *19*, 371–379.

Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., and Mainland, J.D. (2009). Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. Sci Signal *2*, ra9.

Satir, P., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2010). The primary cilium at a glance. J Cell Sci *123*, 499–503.

Savic, I. (2002). Imaging of brain activation by odorants in humans. Curr. Opin. Neurobiol. *12*, 455–461.

Van Schoore, G., Mendive, F., Pochet, R., and Vassart, G. (2005). Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse. Histochem. Cell Biol. *124*, 35–50.

Seamon, K., and Daly, J.W. (1981). Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. J. Biol. Chem. *256*, 9799–9801.

Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M.R., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008a). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. Dev. Biol. *317*, 246–259.

Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M.R., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008b). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. Dev. Biol. *317*, 246–259.

Stanford, W.L., Cohn, J.B., and Cordes, S.P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. Nat. Rev. Genet. *2*, 756–768.

Stryke, D., Kawamoto, M., Huang, C.C., Johns, S.J., King, L.A., Harper, C.A., Meng, E.C., Lee, R.E., Yee, A., L'Italien, L., et al. (2003). BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. Nucleic Acids Res *31*, 278–281.

Tadenev, A.L.D., Kulaga, H.M., May-Simera, H.L., Kelley, M.W., Katsanis, N., and Reed, R.R. (2011). Loss of Bardet-Biedl syndrome protein-8 (BBS8) perturbs olfactory function, protein localization, and axon targeting. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 10320–10325.

Tajinda, K., Ishizuka, K., Colantuoni, C., Morita, M., Winicki, J., Le, C., Lin, S., Schretlen, D., Sawa, A., and Cascella, N.G. (2010). Neuronal biomarkers from patients with mental

illnesses: a novel method through nasal biopsy combined with laser-captured microdissection. Mol. Psychiatry *15*, 231–232.

Tall, G.G., Krumins, A.M., and Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor. J. Biol. Chem. *278*, 8356–8362.

Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., and Menini, A. (2009). From Pheromones to Behavior. Physiol Rev *89*, 921–956.

Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., and Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. Dev. Dyn. *239*, 3404–3415.

Veland, I.R., Awan, A., Pedersen, L.B., Yoder, B.K., and Christensen, S.T. (2009). Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. Nephron Physiol *111*, p39–53.

Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., and Yu, F. (2005). Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. Nat. Cell Biol. *7*, 1091–1098.

Ware, S.M., Aygun, M.G.-, and Hildebrandt, F. (2011). Spectrum of clinical diseases caused by disorders of primary cilia. Proc Am Thorac Soc *8*, 444–450.

Willaredt, M.A., Tasouri, E., and Tucker, K.L. (2012). Primary cilia and forebrain development. Mech. Dev.

Wong, S.T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G.C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G.H., and Storm, D.R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. Neuron *27*, 487–497.

Yeshurun, Y., Lapid, H., Dudai, Y., and Sobel, N. (2009). The privileged brain representation of first olfactory associations. Curr. Biol. *19*, 1869–1874.

Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., and Mombaerts, P. (2000). Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. Neuron *26*, 81–91.

Zhuang, H., and Matsunami, H. (2008). Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. Nat Protoc *3*, 1402–1413.

Zou, D.-J., Chesler, A.T., Le Pichon, C.E., Kuznetsov, A., Pei, X., Hwang, E.L., and Firestein, S. (2007). Absence of adenylyl cyclase 3 perturbs peripheral olfactory projections in mice. J. Neurosci. *27*, 6675–6683.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Luciana Mayumi Gutiyama
Local e data de nascimento: Sorocaba, SP; 01 de agosto de 1984.

2. EDUCAÇÃO:

Março de 2008 – Atual
Doutorado em Ciências (Bioquímica)
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Bettina Malnic
Projeto de Pesquisa: O papel da proteína Ric-8B *in vivo*.
Instituição: Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP).

Janeiro de 2005 – Dezembro de 2007
Estágio de Iniciação Científica (Biologia Celular)
Orientador: Prof. Dr. Sergio Schenkman
Projeto de Pesquisa: Caracterização da fosforilação da histona H1 de *T. cruzi* ao longo do ciclo celular
Instituição: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

2004 – 2007
Bacharelado em Ciências Biológicas modalidade médica.
Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), *campus* Vila Clementino, São Paulo.

2000 – 2002
Ensino Médio Técnico em Processamento de dados
Instituição: Organização Sorocabana de Ensino (OSE)

3. BOLSAS RECEBIDAS:

Doutorado

Bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de 2008 a maio de 2011.

Iniciação Científica

Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de 2005 a 2007.

4. OCUPAÇÃO:

Tecnologista Júnior III (Ministério da Ciência e Tecnologia), Instituto Nacional de Câncer (INCA), de junho de 2011 até o presente.

5. PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

GUTIYAMA, L. M.; da Cunha, J. P. C.; Schenkman, S. Histone H1 of Trypanosoma cruzi Is Concentrated in the Nucleolus Region and Disperses upon Phosphorylation during Progression to Mitosis. *Eukaryotic Cell*, v. 7, p. 560-568, 2007.

GUTIYAMA, L.M., Coutinho D.F., Lipkin M.V., Zalcberg I.R. Myeloid neoplasias: what molecular analyses are telling us. *ISRN Oncol.* 2012:321246, 2012.

Gonzalez-Kristeller D.C., **GUTIYAMA L.M.**, Campos A. H., Soares F. A., Brentani H. and Malnic B. Odorant receptor genes are expressed in olfactory neuroblastoma. *Genetics and Molecular Research*, 2013 Sep 10;12(3):3479-87.

Armelin-Correa L.A., **GUTIYAMA L.M.**, Brandt D.Y.C. and Malnic B. Nuclear compartmentalization of odorant receptor genes. Submetido para publicação.

Capítulo de livro publicado

Bettina Malnic; Daniela C. Gonzales-Kristeller; **GUTIYAMA, L. M.**. Odorant Receptors. In: Anna Menini. (Org.). *The neurobiology of olfaction*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group, 2009, v., p. 181-202.

Resumos em anais de Congressos

NAGAI, M. H.; **GUTIYAMA, L. M.**, ALMEIDA, T. J., MALNIC, B. Ric-8B is essential for mouse embryogenesis. In: ISOT, 2012, Estocolmo, Suécia. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.

CORREA, L. M. A.; BRANDT, D. Y. C.; **Gutiyama, L. M.**; Malnic, B. Spatial organization of odorant receptor gene alleles within the nucleus of olfactory sensory neurons. In: ISOT, 2012, Estocolmo, Suécia. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.

Gutiyama, L. M.; Bettina Malnic. The Role of Ric-8B *in vivo*. In: SBBq, 2011, Foz do Iguaçú. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2011.

CORREA, L. M. A.; BRANDT, D. Y. C.; **Gutiyama, L. M.**; Bettina Malnic. Spatial organization of the P2 odorant receptor alleles within the nucleus of olfactory neurons. In: 75th Symposium: Nuclear Organization & Function meeting, 2010, Cold Spring Harbor. 75th Symposium: Nuclear Organization & Function meeting. Cold Spring Harbor: CSHL, 2010.

GUTIYAMA, L. M.; Bettina Malnic. The role of Ric-8B in olfaction in vivo. In: 1st Sao Paulo School of Translational Science, 2010, São Paulo. 1st Sao Paulo School of Translational Science, 2010.

GUTIYAMA, L. M.; CUNHA, Julia Pinheiro Chagas da; SCHENKMAN, Sergio. Trypanosoma cruzi histone H1 nuclear localization depends on its phosphorylation. In: XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2007, Caxambu. XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2007. p. 45.

Gutiyama, L. M.; CUNHA, Julia Pinheiro Chagas da; SCHENKMAN, Sergio. Caracterização da fosforilação da Histona H1 em Trypanosoma cruzi. In: Congresso de Iniciação Científica UNIFESP, 2006, São Paulo. Congresso de Iniciação Científica UNIFESP, 2006.

GUTIYAMA, L. M.; CUNHA, Julia Pinheiro Chagas da ; SCHENKMAN, Sergio . Phosphorylation and dephosphorylation of Trypanosoma cruzi histone H1 through the cell cycle. In: XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006, Caxambu. XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006. p. 48.*

*Prêmio Zigman Brenner categoria melhor painel científico em Biologia Celular, Sociedade Brasileira de Protozoologia.

Anexo 1

Capítulo *Odorant Receptors*, do livro *The Neurobiology of Olfaction* (2009).

NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.

Menini A, editor. The Neurobiology of Olfaction. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010.

Bookshelf ID: NBK55985 PMID: 21882436

Chapter 7 Odorant Receptors

Bettina Malnic, Daniela C. Gonzalez-Kristeller, and Luciana M. Gutiyama.

7.1 THE IDENTIFICATION OF ODORANT RECEPTORS (ORs)

The receptors responsible for odorant discrimination were first cloned in 1991 by Linda Buck and Richard Axel (Buck and Axel 1991). A series of physiological and biochemical experiments performed during the mid-1980s indicated that odorant activation of olfactory sensory neurons was mediated by a G-protein-dependent pathway, which led to activation of adenylyl cyclase, increases in intracellular concentrations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), activation of cyclic nucleotide-gated channels, and neuron depolarization (Firestein et al. 1991; Lowe et al. 1989; Nakamura and Gold 1987; Pace et al. 1985; Sklar et al. 1986; see also Chapter 8). The subsequent cloning of olfactory-specific genes coding for a Gα protein (Gαolf) (Jones and Reed 1989) and for a cAMP-gated channel (Dhallan et al. 1990) further strengthened the involvement of cAMP in odorant signal transduction. These experiments strongly indicated that the odorant receptors (ORs) should be G-protein-coupled receptors (GPCRs).

About the same time, the polymerase chain reaction (PCR) technique was developed (Saiki et al. 1988), and the first GPCRs had been identified. Comparison between the sequences of rhodopsin and (β-adrenergic receptors indicated that receptors that couple to G-proteins showed related structures, with seven membrane-spanning regions (Dixon et al. 1986). Comparison of the sequences of a higher number of GPCRs (around 20 G-protein-compled receptor (GPCR) sequences were known by 1989) revealed that they all shared a related seven-transmembrane structure and they also shared limited sequence motifs. In 1989, it was shown for the first time that degenerate primers could be used in PCR reactions to identify new members of the GPCR family (Libert et al. 1989).

The approach used by Buck and Axel to isolate the Odorant receptor (OR) genes was based on the assumptions that the receptors should belong to a large family of GPCRs and their expression should be restricted to the olfactory epithelium (Buck and Axel 1991). Eleven degenerate primers that would allow amplification of all known GPCRs at the time were designed and all possible combinations were used in PCR reactions with rat olfactory epithelium cDNA. As a result, 64 bands of appropriate sizes were obtained in agarose gels. The next step was to screen these bands for the ones containing the OR genes. It was reasoned that if one of the bands contained cDNAs corresponding to multiple OR genes, four-cutter restriction enzymes would cleave the DNA into smaller fragments showing sizes that, when summed up, would produce a size greater than that of the original band. The 64 PCR bands were treated with the *Hinf*I or *Hae*III restriction enzymes, and for most of the bands, restriction digestion generated fragments with sizes that summed up to the original band size. Therefore, these PCR products contained a single DNA species. However, restriction digestion of one of the bands produced fragments with sizes that summed to a value far greater than that of the original PCR product. This PCR band contained a mixture of different DNA species, each of which was amplified by the same pair of degenerate primers. The band was cloned into plasmid, and individual recombinant plasmids were sequenced. All sequences were different, but they all showed a GPCR-like structure. Using Northern blot analysis, it was also demonstrated that these receptors are expressed in the olfactory epithelium, but not in a further eight tissues analyzed, including the brain, retina, and liver (Buck and Axel 1991). In addition, in order to estimate the approximate size of the OR gene family, rat genomic libraries were screened for OR genes using a mixture of the OR cDNAs as probes. It was estimated then that the rat haploid genome should contain at least 500–1000 OR genes (Buck and Axel 1991; Buck 1992).

Comparison of different rat OR amino acid sequences revealed that, even though they are extremely diverse, they share conserved motifs that are characteristic of the OR family, such as GN in transmembrane domain I, PMYF/LFL in transmembrane domain II, MAYDRYVAIC in transmembrane domain III, KAFSTCA/GSHLSVV in transmembrane domain 6, and PMLNPFIYSLRN in transmembrane domain VII (Buck and Axel 1991) (Figure 7.1). Additional members of the OR family were identified by using degenerate primers matching these OR motifs in PCR reactions with olfactory epithelium cDNA or genomic DNA (since the OR coding region is contained in one single exon). Degenerate primers matching to the highly conserved motifs in transmembrane III and VI were very efficient in amplifying a large fraction of the mouse OR genes (Malnic et al. 1999; Michaloski et al. 2006; Ressler et al. 1993).

7.2 THE ODORANT RECEPTOR (OR) GENE FAMILY

7.2.1 Class I and Class II Odorant Receptors (ORs)

The ORs can be classified into two distinct classes, based on their amino acid sequences and phylogenetic distribution. The class I ORs were first identified in fish (Ngai et al. 1993) and in frog (Freitag et al. 1995), and it was later shown that teleost fish, including the goldfish, have only class I OR genes (Freitag et al. 1998). Semiaquatic animals, such as frogs, have both class I and class II OR genes (see also Chapter 4), and initially it was believed that mammals lacked functional class I ORs, and only contained class II ORs (Freitag et al. 1998). These findings suggested that the class I ORs (also denominated fishlike ORs) must be specialized in recognizing water-soluble odorants, while class II ORs (mammalianlike ORs) must recognize volatile odorants. However, recent analysis of genome sequences has shown that there are relatively large numbers of class I ORs in the genomes of human (Glusman et al. 2001; Malnic et al. 2004; Zozulya et al. 2001), mouse (Godfrey et al. 2004; Young et al. 2002; Zhang and Firestein 2002), and other mammalian species (Niimura and Nei 2007). Even though the majority of OR genes belong to class II, between 10% and 20% of the ORs in mammals are class I ORs (Glusman et al. 2001; Niimura and Nei 2007; Zhang and Firestein 2002), indicating that class I ORs may also have important roles in mammalian olfaction.

7.2.2 The Size of the Odorant Receptor (OR) Gene Family

The recent availability of the complete genome sequences for several different species allows for the rapid identification of their OR genes. The fact that OR genes have intronless coding regions facilitates their identification. Typically, conserved amino acid sequences corresponding to known OR genes can be used as queries in TBLASTN searches of the genome sequences, to obtain new sequences that are related to OR genes (Glusman et al. 2001; Godfrey et al. 2004; Malnic et al. 2004; Niimura and Nei 2003; Zozulya et al. 2001). The retrieved nucleotide sequences are then translated into amino acid sequences and analyzed. A protein is considered an OR if it is encoded by a coding region of around 1 kb and if it contains the OR sequence motifs (or its variants) located at the appropriate positions (Figure 7.1).

In this way, the complete repertoires of OR genes have been identified for a large number of species. The OR repertoires vary in size and probably reflect the specific olfactory requirements of each one of these species. Some species have high numbers of intact (and potentially functional) OR genes, such as mouse (~1000), dog (~800), and opossum (~1200), while

others have comparatively lower numbers of intact OR genes, such as human (~370), chimpanzee (~370), and platypus (~300) (Figure 7.2). The numbers of pseudogenes, which do not express functional ORs, also vary among species, although not as dramatically: while humans and chimpanzees have around 460–480 pseudogenes, dogs, mice, and opossum have around 250–330 pseudogenes (Figure 7.2). The OR gene repertoires also reflect the habitats of the different species. It has been shown, for example, that marine mammals, which evolved from terrestrial ancestors and have adapted to the aquatic environment, have higher numbers of pseudogenes: in dwarf sperm whales and minke whales 77 and 58% of the OR genes are pseudogenes (Kishida et al. 2007). Dolphins completely lack class I OR genes, and their class II OR genes are all pseudogenes (Freitag et al. 1998).

The number of intact OR genes does not always correlate well with the olfactory abilities of a given species, indicating that other factors must also be involved. For example, dogs, which have a rich sense of smell, have a smaller number of OR genes than mice or rats (Figure 7.2), however, it is well known that they have larger surfaces of olfactory epithelia. Even though it is generally believed that primates have a poor sense of smell, behavioral studies have shown that primates, including humans, have a surprisingly good sense of smell (Laska et al. 2000). Humans have a smaller number of intact OR genes when compared to dogs or rodents (Figure 7.2). Interestingly, it was recently demonstrated that humans have an unexpectedly high number of glomeruli in their olfactory bulbs: while mice, which have around 1000 intact OR genes, have around 1800 glomeruli, humans, who have around 400 intact OR genes, have on average 5500 glomeruli per olfactory bulb (Maresh et al. 2008). Combined with the fact that the regions in the human brain that are involved in olfactory processing are expanded when compared to other species, these anatomical differences may explain why humans have a good olfactory sensitivity despite having a small repertoire of OR genes (Shepherd 2004).

The expression in the olfactory epithelium has been confirmed for around 400 mouse OR genes through the screening of an olfactory cDNA library with degenerate olfactory receptor probes (Young et al. 2003). Using quantitative RT-PCR, it was also demonstrated that some OR genes are expressed at higher levels than others. It was observed that the expression levels can vary by 10- to 300-fold between genes. These same differences were found in three different mice that were examined, although there was a variation in the expression level of some OR genes between mice (Young et al. 2003). Differences may be due to increased numbers of expressing neurons, or to increased levels of OR gene transcripts per expressing neuron.

A high-throughput microarray analysis detected the specific expression of ~800 mouse OR genes in the olfactory epithelium (Zhang et al. 2004). Very few OR genes were expressed in the nonolfactory tissues that were analyzed, such as testis, liver, heart, cerebellum, and muscle, showing that although there might be a small number of OR genes expressed in other tissues, very few are exclusively expressed in nonolfactory epithelium tissues. Microarray analysis was also used to analyze the expression of human OR genes (Zhang et al. 2007). This study detected the expression of 437 OR genes, including pseudogenes, in the human olfactory epithelium.

7.2.3 Comparative Genomics of Odorant Receptors (ORs)

Analysis of the composition of the OR gene families in different species has revealed several interesting points regarding the olfactory sensory function in these animals. In one study, a random group of 221 ORs was cloned from 10 different primate species, from prosimian lemur to human. Analysis of these OR gene sequences showed that the percentage of functional OR genes decreases, from New World monkeys to hominoids: while New World monkeys (like the squirrel monkey and marmoset) lack pseudogenes, Old World monkeys (macaque and baboon) have around 27% pseudogenes, and hominoids (chimpanzee, gorilla, orangutan, and human) have around 50% pseudogenes (Rouquier et al. 2000). These numbers may reflect the evolution of the olfactory sensory function in primates, which shows reduced olfactory abilities, when compared to other species, such as rodents and dogs. The recent availability of the complete sequence of the chimpanzee genome allowed for the comparison between the entire human and chimpanzee OR gene repertoires (Gilad et al. 2005; Gimelbrant et al. 2004; Go and Niimura 2008). While one study showed that humans have a significantly higher percentage of pseudogenes than chimpanzees (Gilad et al. 2005), another study, where an updated version of the chimpanzee genome sequence was analyzed, showed that the numbers of pseudogenes and intact OR genes are approximately the same between the two species (Go and Niimura 2008). However, this same study showed that 25% of the intact ORs are nonorthologous between human and chimpanzees (Go and Niimura 2008), indicating that the OR repertoires of these two species are somewhat different. Differences in OR repertoire composition may be responsible for species-specific abilities of odorant detection, and have also been observed when other species are compared. For instance, comparison of the human and mouse genome sequences identified 29 human ORs that have no counterpart in the mouse, and 177 mouse ORs with no counterpart in humans (Godfrey et al. 2004). Comparison of the canine and human OR genes showed that the canine repertoire has expanded relative to that of humans, leading to the emergence of specific canine OR genes (Quignon et al. 2003). For the class I ORs, no human or dog OR genes appeared to be species-specific, but for class II, one group of 26 ORs was considered to be dog-specific, as no counterparts were found in humans (Quignon et al. 2003).

7.2.4 Chromosomal Distribution of the Odorant Receptor (OR) Genes

Early analysis of the chromosomal distribution of the mouse OR genes revealed that they are broadly distributed in the genome (Sullivan et al. 1996). In these experiments, the chromosomal locations of 21 mouse OR genes were experimentally determined using genetic crosses, and it was shown that these OR genes are clustered within multiple *loci* located in seven different chromosomes. Another study used fluorescence in situ hybridization (FISH) and fluorescence-activated cell sorter (FACS) experiments to determine the genomic locations of a large number of human OR genes (Rouquier et al. 1998). Degenerate oligonucleotide primers matching conserved sequences in OR genes were used to amplify OR genes directly from chromosomes separated by flow sorting. OR genes were found in different *loci* located in all human chromosomes, except for chromosomes 20 and X (Rouquier et al. 1998).

The chromosomal locations of the complete set of OR genes in different species have now been determined using bioinformatics analysis of the genomic sequences. The human OR genes are distributed in clusters located in all chromosomes, except for chromosomes 20 and Y (Glusman et al. 2001; Malnic et al. 2004; Niimura and Nei 2003). Similarly, the mouse OR genes are distributed in several *loci* located in all chromosomes, except for chromosomes 18 and Y (Niimura and Nei 2005; Zhang et al. 2004). Although the majority of the OR genes are concentrated in clusters, a few solitary OR genes have also been identified (Godfrey et al. 2004; Malnic et al. 2004).

7.3 EXPRESSION OF THE ODORANT RECEPTOR (OR) GENES

Even though the OR genes are broadly distributed all over the genome, their expression is tightly regulated by a still undeciphered mechanism. Basically, there are three levels of OR gene expression. First, even though OR gene expression was reported in nonolfactory tissues, principally in the testis (Mombaerts 1999; Parmentier et al. 1992; Spehr et al. 2003), the vast majority of the OR genes are exclusively expressed in the olfactory epithelium (Zhang et al. 2004). Second, each OR gene is expressed in only one out of four OR expression zones in the olfactory epithelium. Third, each olfactory sensory neuron expresses one single OR gene allele, while the other genes remain silent.

7.3.1 Zonal Expression of Odorant Receptors (ORs) in the Olfactory Epithelium

A series of in situ hybridization experiments using ORs as molecular probes showed that the olfactory epithelium is divided

into four distinct spatial zones in which different groups of OR genes are expressed (Ressler et al. 1993; Vassar et al. 1993). The zones are symmetrically distributed along the dorsal-ventral axis of the epithelium, with zone 1 localized in the dorsal region and zone 4 in the ventral region of the epithelium (according to the nomenclature of Sullivan et al. [1996]). Each zone is likely to express hundreds of OR genes, and the olfactory sensory neurons that express a given receptor are randomly dispersed within its expression zone. The class I OR genes are mostly expressed in zone 1 (Tsuboi et al. 2006; Zhang et al. 2004). Some class II OR genes are also expressed in zone 1, but the majority is expressed in zones 2–4 (Miyamichi et al. 2005; Zhang et al. 2004).

In another study, 80 class II OR genes were analyzed for their expression pattern in the olfactory epithelium (Miyamichi et al. 2005). This analysis showed that, with the exception of the zone 1 OR genes, the OR genes did not fit in one of the previously described four expression zones, but their expression areas are distributed in an overlapping and continuous manner along the dorsal-ventral axis of the olfactory epithelium, such that no clear borders are present between the neighboring zones.

It has been expected that each zone in the olfactory epithelium should express about one-quarter of the OR gene repertoire. The spatial distribution of OR gene expression in the olfactory epithelium was analyzed using a high-throughput microarray analysis (Zhang et al. 2004). Regions corresponding to zone 1 and zones 2–4 were microdissected from the olfactory epithelium and tested on the microarray for OR gene expression. Interestingly, zone 1 contained more than one-third of all OR genes expressed in the olfactory epithelium. Together with the fact that class I ORs are specifically expressed in zone 1, these results indicate that zones 1 and 2–4 may play distinct roles in olfaction.

The functional implications of the zonal organization of OR gene expression in the olfactory epithelium are still unclear. The axonal projection from the olfactory epithelium to the olfactory bulb is also organized along the dorsal-ventral axis, that is, zone 1 neurons project their axons to the dorsal region of the bulb, while zone 4 neurons project their axons to the ventral region of the bulb. This pattern of projection suggests that the zonal segregation of ORs, and consequently of the sensory information, in the nasal cavity is maintained in the olfactory bulb. However, it is not yet known whether ORs in different zones respond to different classes of odorants.

7.3.2 One Olfactory Sensory Neuron One Odorant Receptor and (OR)

Olfactory sensory neurons select, from over a thousand possible choices, one single OR gene allele to express (Chess et al. 1994; Malnic et al. 1999; Ressler et al. 1993; Serizawa et al. 2000; Vassar et al. 1993). Axons of neurons that express one same given OR converge onto two or a few glomeruli at two specific sites in the olfactory bulb (Ressler et al. 1994; Vassar et al. 1994). Interestingly, specific glomeruli show approximately the same locations in different individuals. These results indicate that the information provided by different ORs in the nose is organized into a stereotyped sensory map in the olfactory bulb.

The receptor type that is chosen will determine the range of odorants to which this neuron will respond, and it has been shown that it is also required for axonal targeting to specific glomeruli in the olfactory bulb (Mombaerts et al. 1996; Wang et al. 1998). OR gene choice is, therefore, fundamental for the functional organization of the olfactory system.

Different mechanisms have been proposed for the control of OR gene expression. One possibility considered was that OR gene choice could be controlled by specific DNA rearrangements in the olfactory neurons (Kratz et al. 2002). However, it was demonstrated that mice cloned from olfactory sensory nuclei, despite having originated from a neuron expressing a single OR type, showed no irreversible DNA changes in the OR genes and exhibited a normal range of OR gene expression (Eggan et al. 2004; Li et al. 2004). It has also been considered that each OR gene could be selected by a unique combination of transcription factors. However, the fact that OR transgenes and their corresponding endogenous OR genes are not coexpressed in the same neuron (Serizawa et al. 2000) argues against this possibility.

It has been demonstrated that the monoallelic expression of an OR gene is regulated by a negative feedback mechanism that requires a functional OR protein (Lewcock and Reed 2004; Serizawa et al. 2003). In addition, it was shown that immature olfactory neurons expressing a given OR can switch receptor expression at a low frequency, while neurons expressing a mutant (nonfunctional) OR can switch expression with a greater probability (Shykind et al. 2004). These results indicate that after an OR gene is stochastically selected for expression by a limiting factor, its corresponding OR protein product mediates a feedback signal that results in the maintenance of the receptor choice (Serizawa et al. 2004; Shykind 2005).

Little is known about the role of cis-regulatory sequences in the regulation of OR gene expression. In studies using transgenic mice, different sizes of genomic DNA segments containing OR genes were tested for their ability to drive an OR expression similar to that of the endogenous gene. It was demonstrated that short pieces of DNA located upstream of the coding region, ranging from 460 to 6.7 kb, are sufficient for expression of the ORs M4, M71, and MOR23 (Qasba and Reed 1998; Vassalli et al. 2002). However, large segments of around 200 kb are required to obtain expression of MOR28 (Serizawa et al. 2000). Sequence comparison of the mouse and human genome revealed a 2 kb conserved sequence located ~75 kb upstream of the MOR28 cluster. This region, denominated H region or H enhancer, was proposed to work as a cis-acting locus control region (LCR), which would activate the expression of one single OR gene member from within the MOR28 cluster (Serizawa et al. 2003).

A detailed analysis of the minimal proximal promoter of OR M71 showed that it contains homeodomain and O/E-like binding sites (Nishizumi et al. 2007; Rothman et al. 2005). Mutations in these binding sites abolish its ability to drive OR gene expression in transgenic animals, indicating that homeodomain and *olf-1* (O/E-like) transcription factors are involved in OR gene expression. Consistent with this finding, homeodomain and O/E-like binding sites have been identified in a large number of OR gene promoters (Hoppe et al. 2006; Michaloski et al. 2006). O/E-like binding sites were also identified in the promoters of several other olfactory specific genes, such as Golf, adenylyl cyclase III (ACIII), olfactory cyclic nucleotide-gated channel (OcNC), and olfactory marker protein (OMP) (Kudrycki et al. 1993; Wang et al. 1993). Interestingly, the H region also contains homeodomain and O/E-like binding sites (Hirota and Mombaerts 2004), and it was shown that mutations in these sites abolish the ability of the H region to drive expression of OR genes in transgenic animals (Nishizumi et al. 2007).

So far, two different homeodomain transcription factors have been implicated in OR gene expression. Lhx2, a LIM-homeodomain protein, was shown to bind to the MOR71 promoter region (Hirota and Mombaerts 2004). Lhx2-deficient mice lack mature olfactory sensory neurons, indicating that this homeodomain protein is required for olfactory sensory neuron development (Hirota and Mombaerts 2004; Kolterud et al. 2004). In these mutant mice, the expression of class II OR genes is abolished, while most class I OR genes are still expressed in a few OMP-positive neurons located in the dorsal region (corresponding to zone 1) of the olfactory epithelium (Hirota et al. 2007). These results indicate that Lhx2 is directly involved in class II OR gene expression, but is not required for class I OR gene expression. The results also suggest that class I and class II OR gene expression is regulated by distinct mechanisms.

Recently, the Emx2 homeobox transcription factor has also been implicated in OR gene regulation (McIntyre et al. 2008). Emx2 was shown to bind to the mouse OR71 gene promoter (Hirota and Mombaerts 2004) and to be expressed in the olfactory epithelium (Nedelec et al. 2004). Emx2-mutant mice develop a normal olfactory epithelium, except that they have a reduced number of mature olfactory sensory neurons (McIntyre et al. 2008). The expression of many OR genes is reduced greater than the 42% reduction in mature olfactory sensory neurons, indicating that the absence of Emx2 is not

altering OR gene expression only because of a general defect in olfactory sensory neuron development. Altogether, these results indicate that Emx2 acts directly on OR gene promoters to regulate gene transcription. Interestingly, a few OR genes show increased expression, when compared to wildtype mice (McIntyre et al. 2008). It is possible that these OR genes do not depend on Emx2 to be transcribed.

The *olf1* (O/E) transcription factors are specifically expressed in the olfactory neurons and in B-lymphocytes (Hagman et al. 1993; Wang and Reed 1993). The roles of O/E-like proteins in OR gene expression are still unclear. Disruption of *olf-1-like* genes does not alter OR gene expression (Lin and Grosschedl 1995; Wang et al. 2003), possibly due to the functional redundancy of the multiple O/E family members expressed in the olfactory epithelium (O/E1, O/E2, O/E3, and O/E4; Wang et al. 1997, 2002). However, it was demonstrated that O/E2- and O/E3-mutant mice show defects in the projection of olfactory neurons to the olfactory bulb, indicating that the O/E genes function may not be completely redundant (Wang et al. 2003).

Experiments using the chromosome conformation capture (3C) technique showed that in the nuclei of olfactory sensory neurons, the H region, which is located on chromosome 14, associates with OR gene promoters located in different chromosomes (Lomvardas et al. 2006). DNA and RNA FISH analysis demonstrated that the H region is associated with the single OR gene that is transcribed in a given neuron. Also, in the olfactory sensory neurons, one of the two H alleles is methylated, and therefore inactive. Based on these results, a model for OR gene choice was proposed, where one single trans-acting H enhancer element allows stochastic activation of one single OR gene allele per olfactory sensory neuron. However, it was subsequently shown that mice that have the H region deleted show regular expression of OR genes, except for some of the OR genes that are located within the MOR28 cluster. In this case, the expression of the three OR genes located proximal to the H region, MOR28, MOR10, and MOR83, was abolished (Fuss et al. 2007; Nishizumi et al. 2007). These results indicate that the H region acts in *cis* to promote expression of these three genes, but is not an essential trans-acting enhancer that regulates monoallelic expression of OR genes in olfactory sensory neurons.

In order to obtain expression of a particular OR gene in a large number of olfactory sensory neurons, transgenic mice were constructed, where the full length of the OR coding sequence is placed under the control of the promoter of genes that are abundantly expressed in these neurons, such as the OMP or Gγ8 genes (Nguyen et al. 2007). However, these constructs did not result in transgenic expression of the OR gene. When the OR coding sequence is replaced by a different unrelated GPCR, like the human taste receptor hT2R16 or the opioid receptor RASSL, these GPCRs are expressed in the vast majority of the OMP or Gγ8 positive neurons, indicating that the suppression of OR gene expression in the olfactory sensory neurons is not extended to GPCRs in general, but is specific to OR. In addition, when the OR coding sequence is replaced by an OR coding sequence containing a mutation at the highly conserved DRY sequence, a motif known to be essential for G-protein activation and signal transduction, the OR gene expression is still suppressed, showing that OR function is not required for OR silencing. These results are consistent with other experiments that showed that the mechanism of negative feedback regulation may not require G-protein-mediated signaling (Imai et al. 2006).

The inhibition of the OR transgene expression could be part of the normal process that controls endogenous OR gene expression, so that one single type of OR gene is expressed, while the remaining OR genes are repressed. Interestingly, OR gene expression was achieved only when the OR coding sequence was separated from the promoter sequences: for example, a transgenic line where the OMP (or Gγ8) promoter sequence drives the expression of the tetracycline transactivator is crossed with a transgenic mouse carrying a TetO promoter driving the expression of the OR gene (Nguyen et al. 2007). These results suggest that both the OR coding sequence and the promoter driving its expression, must be involved in OR gene regulation.

7.4 ODORANT SIGNAL TRANSDUCTION THROUGH ODORANT RECEPTORS (ORs)

Antibodies recognizing distinct ORs have been used to determine their cellular distribution. These experiments showed that the receptor proteins are localized in the cilia of olfactory sensory neurons, the site of odorant signal transduction (Barnea et al. 2004; Menco et al. 1997; Schwarzenbacher et al. 2005; Strotmann et al. 2004). Odorant signal transduction is initiated by the binding of odorants to ORs and the activation of the associated heterotrimeric G-protein, Golf. Once activated, Gαolf exchanges guanosine diphosphate (GDP) for guanosine triphosphate (GTP), the GTP-bound Gαolf subunit dissociates from the Gβ/γ complex and activates ACIII, leading to increased intracellular levels of cAMP and opening of cyclic nucleotide-gated channels. The resulting influx of Na^+ and Ca^{2+} ions ultimately leads to the generation of an action potential in the olfactory neuron axon (Firestein 2001; Mombaerts 2004; Ronnett and Moon 2002; see also Chapter 8).

Initially, it was believed that two separate types of intracellular signaling pathways could be activated by different classes of odorants: the cAMP pathway and the IP3 pathway (Boekhoff et al. 1990; Huque and Bruch 1986; Ronnett et al. 1993; Sklar et al. 1986). However, because mice that are knockout for components of the cAMP pathway do not respond to odorants of any class (Belluscio et al. 1998; Brunet et al. 1996; Wong et al. 2000), it is believed that olfactory transduction is exclusively mediated by the cAMP pathway, although it is possible that the IP3 pathway plays a modulatory role (Spehr et al. 2002), or is involved in signaling in different types of cells in the olfactory epithelium (Elsaesser et al. 2005; Gold 1999; Liberles and Buck 2006; Lin et al. 2007; see also Chapter 9).

Recently, additional proteins that are likely to be involved in OR function have been identified. The receptor transporting proteins, RTP1, RTP2, and REEP1, which are specifically expressed in the olfactory sensory neurons in the olfactory epithelium, were shown to associate with ORs when coexpressed in HEK293T cells (Saito et al. 2004). It was also shown that they promote cell surface expression of ORs in HEK293T cells. In vivo, it is possible that they work as chaperones that aid in OR folding and/or trafficking to the plasma membrane (Saito et al. 2004).

The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ric-8B, interacts with Gαolf (Von Dannecker et al. 2005). Ric-8B is specifically expressed in olfactory sensory neurons and in a few regions in the brain where Gαolf is also expressed, such as the striatum, nucleus accumbens, and olfactory tubercle (Von Dannecker et al. 2005). Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP to generate an activated form of Gα, which is then able to activate a variety of effectors. Consistent with this potential function, Ric-8B is able to amplify dopamine receptor and OR signaling through Gαolf (Von Dannecker et al. 2005, 2006). It was recently demonstrated that Ric-8B, besides interacting with Gαolf, also interacts with Gγl3, which is also expressed in mature olfactory sensory neurons (Kerr et al. 2008). In addition, it was shown that GβT is the Gβ subunit that is predominantly expressed in the mature olfactory sensory neurons and that the GpT protein is localized to the cilia of olfactory sensory neurons, together with Gyl3 and Ric-8B (Kerr et al. 2008).

The physiological roles of the RTPs and Ric-8B in OR function should be clarified through the analysis of mice that are knockout for these proteins.

7.5 ODORANT RECEPTORS (ORs) AND AXONAL TARGETING IN THE OLFACTORY BULB

The experiments using antibodies against ORs showed that the receptors are also localized in the axonal processes of the olfactory sensory neurons (Barnea et al. 2004; Menco et al. 1997; Schwarzenbacher et al. 2005; Strotmann et al. 2004), consistent with the role they play in axonal targeting to specific glomeruli in the olfactory bulb (Feinstein et al. 2004; Wang et al. 1998). The mechanisms through which the ORs regulate axonal projection are not completely understood. ORs in the axonal terminals could recognize guidance molecules in the olfactory bulb to form specific glomeruli (Mombaerts 2006),

or, alternatively, axons could coalesce into a glomerulus independently of the presence of a target in the bulb, but as a consequence of homophilic interactions between axons containing the same OR type (Feinstein et al. 2004; Feinstein and Mombaerts 2004). Recent studies have demonstrated that OR-derived cAMP signals are essential for axonal targeting in the bulb (Imai et al. 2006; Serizawa et al. 2006). In this model, each OR type generates a unique level of cAMP The levels of cAMP define the expression levels of guidance molecules, which determine the anterior-posterior topography of axonal projection in the olfactory bulb. It is not yet clear whether ORs present in the cilia or in the axonal terminals, or both, are involved in the generation of the cAMP signals that regulate the formation of the OR-specific glomerular map.

7.6 ODORANT DISCRIMINATION BY ODORANT RECEPTORS (ORs)

7.6.1 Combinatorial Receptor Codes for Odorants

Even though mammals have only 100s of functional ORs, they can discriminate a much higher number (several thousands) of odorants. In order to understand how the olfactory system utilizes the OR gene family to discriminate odorants, one should determine the odorant specificities of individual ORs. However, to date, only a few ORs have been linked to odorants they recognize because ORs cannot be efficiently expressed in heterologous cells (Malnic 2007). They are usually retained in the endoplasmatic reticulum and cannot reach the plasmatic membrane (Gimelbrant et al. 1999, 2001; Katada et al. 2004; Lu et al. 2003, 2004). In order to circumvent this problem, a combination of Ca^{2+} imaging and single-cell RT-PCR was used to identify the ORs expressed by olfactory neurons that responded to different aliphatic odorants (Malnic et al. 1999), to lyral (Touhara et al. 1999), or to eugenol (Kajiya et al. 2001). In these experiments, dissociated olfactory sensory neurons are loaded with the Ca^{2+} sensitive dye, fura-2, and exposed to a panel of odorants. The increases in Ca^{2+} concentration are recorded as fluorescence decreases in the intensity of the emitted light (510 nm) of neurons excited at 380 nm (Malnic et al. 1999). The neurons that respond to the odorants are individually transferred to micro tubes and a two-step, single-cell RT-PCR/PCR procedure is used to identify the OR genes expressed by each neuron. In a primary PCR reaction, cDNAs derived from all of the mRNAs expressed by a neuron are amplified. In a secondary PCR reaction, the primary PCR products are used as template with degenerate primers that specifically amplify members of the OR family. In this way, we can identify the OR expressed by the recorded neuron.

These experiments showed that one OR can recognize multiple odorants, but that different odorants are recognized by different combinations of receptors (Malnic et al. 1999). Thus, the olfactory receptor family is used in a combinatorial manner to discriminate odorants. Given that there are around 1000 OR genes, this combinatorial receptor-coding scheme should permit the detection of a vast number of odorants. It should also permit the olfactory system to discriminate between odorants that have very similar structures, such as aliphatic odorants with different carbon chain lengths (Malnic et al. 1999). These results are consistent with previous observations that single olfactory sensory neurons (Firestein et al. 1993; Sato et al. 1994; Sicard and Holley 1984) and individual glomeruli in the olfactory bulb (Adrian 1950; Friedrich and Korsching 1997; Leveteau and MacLeod 1966; Mori et al. 1992) can be stimulated by multiple odorants.

7.6.2 Functional Expression of Odorant Receptors (ORs) in Heterologous Cells

As explained above, it is believed that the major reason for the inefficient functional expression of ORs in heterologous cells is the fact that the receptors do not reach the plasma membrane. However, recent advances have improved the expression of ORs in heterologous cell lines. Some of the techniques being used to deorphanize ORs in heterologous cells are based on strategies that should contribute to increased amounts of receptors on the cell surface. It has been demonstrated that fusion of the 20 N-terminal amino acids of rhodopsin to the N-terminal region of ORs facilitates cell surface expression of at least some ORs (Krautwurst et al. 1998). Using cotransfection, ORs with an N-terminal segment of rhodopsin ("rho-tagged ORs") can be expressed in heterologous cells together with the Gα15/16 subunits, which can promiscuously couple receptors to the phospholipase C pathway (Krautwurst et al. 1998). Receptor activation by odorants results in increased intracellular Ca^{2+}, which can be measured at the single-cell level using Ca^{2+} sensitive dyes.

ORs expressed in heterologous cells can also couple to Gαolf (the natural partner of ORs), leading to odorant-induced increases in cAMP (Kajiya et al. 2001; Shirokova et al. 2005). A cell line that stably expresses the olfactory signal transduction molecules Gαolf and cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 (CNGA2) (named HeLa/Olf cell line), has also been used to functionally express ORs (Shirokova et al. 2005). Importantly, it was observed that the use of nonolfactory G-proteins may alter the OR responses to particular odorants, indicating that heterologous systems that use endogenous olfactory transduction molecules are more likely to reproduce OR physiological responses (Krautwurst 2008; Shirokova et al. 2005).

It was also demonstrated that coexpression with the olfactory-specific RTPs in HEK293T cells promotes OR functional surface expression (Saito et al. 2004). The RTPs are transmembrane proteins and were shown to directly interact with ORs in coimmunoprecipitation assays (Saito et al. 2004). It was demonstrated that cotransfection of RTP1 and OR also enhances surface expression of RTP1; it is possible that they work as coreceptors with ORs. They could also be involved in different functions, such as OR folding, export from the endoplasmic reticulum, or vesicle transport (Saito et al. 2004). HEK293T cells stably expressing Gαolf, RTP1, RTP2, and REEP1 were established (named Hana3A cell line) and can now be used to investigate the specificities of a large number of ORs (Saito et al. 2004).

In a different approach, it was demonstrated that coexpression with the GEF Ric-8B and Gαolf results in functional expression of ORs in HEK293T cells (Von Dannecker et al. 2006). Importantly, it was shown that Ric-8B promotes functional expression of untagged (without a rho tag) ORs, which is advantageous because it is possible that receptor protein modifications interfere with the ligand affinities. GEFs are considered to work as positive regulators of GPCR signaling. Therefore, in this case, functional expression of ORs is not mediated by an increase in the amount of receptors on the cell surface, but instead, results from the amplification of the OR signaling through the G-protein.

Interestingly, it was recently demonstrated that the use of a combination of Ric-8B, RTP1S (a short form of RTP1), and rho tags results in an improved heterologous expression of ORs (Von Dannecker et al. 2006; Zhuang and Matsunami 2007). The use of these methods in the future should facilitate the deorphanization of mammalian ORs.

7.7 HUMAN ODORANT RECEPTORS (ORs)

The fact that almost half of the human ORs repertoire is apparently nonfunctional (Go and Niimura 2008; Rouquier and Giorgi 2007) suggests that during the process of evolution, olfaction may have lost importance for primates. Even though the number of functional OR genes is smaller when compared to other species, humans have a very sensitive sense of smell, which is important for the detection of odorants that are essential for life, such as the smell of smoke (detection of fire) and the smell of rotten food (to avoid its ingestion). Smells are also intimately related to how humans taste food (Shepherd 2004; see also Chapter 16).

Comparison between the human and mice OR gene repertoires showed that, despite the smaller number of intact human ORs, the vast majority of human OR subfamilies have counterparts in the mouse repertoire (Godfrey et al. 2004). These results suggest, in principle, that the majority of odorant features detectable by one species may also be recognized by the

other. However, mice may have a better ability to discriminate between similar odorants than humans (Godfrey et al. 2004).

7.7.1 Deorphanized Human Odorant Receptors (ORs)

There are approximately 400 functional ORs in humans (Glusman et al. 2001; Malnic et al. 2004; Niimura and Nei 2003; Zozulya et al. 2001). Analysis of the amino acid sequences of all intact human ORs shows that they share the typical OR motifs (Figure 7.3). To date, only a few human ORs have been linked to odorants they recognize. Some examples are shown in Figure 7.4. Two of these (OR51E1 and OR52D1) are class I ORs, and the remaining are class II ORs. Several approaches, which use coexpression with different Gα subunits, have been used to deorphanize these ORs. For instance, receptors OR1A1 and OR1A2 were functionally expressed in Hela/Olf cells (via Gαolf) and can specifically detect citronellic terpenoid odorants (Schmiedeberg et al. 2007). In a previous study, Shirokova and colleagues demonstrated that the mouse orthologue, Olfr43, also responds to this agonist using the same system (Shirokova et al. 2005). Some human ORs were analyzed by using HEK293 cells that coexpress ORs and the promiscuous Gαl6 subunit, which couples the receptor to the IP3-mediated pathway (Krautwurst et al. 1998). OR1G1 was shown to preferentially respond to 9-carbon aliphatic molecules, and can be inhibited by some odorants with structures that are related to that of the agonists (Sanz et al. 2005). OR52D1, a class I OR, was shown to respond to methyl octanoate (Sanz et al. 2005).

7.7.2 Odorant Receptors (ORs) and Pheromones

Pheromones are intraspecific chemical signals that regulate a series of innate behaviors, such as reproduction and aggression (Brennan and Zufall 2006; see also Chapter 6). The detection of pheromones is mediated by an accessory olfactory system, the vomeronasal system, which is anatomically segregated from the main olfactory system. Two different families of vomeronasal receptors, the V1Rs and V2Rs, which are also GPCRs, are expressed in the vomeronasal neurons and are responsible for the recognition of pheromones (Dulac and Torello 2003). Humans, however, do not have a functional vomeronasal organ (Brennan and Zufall 2006). In addition, the vast majority of human V1Rs and all V2Rs are pseudogenes (Young et al. 2005; Young and Trask 2007). Therefore, it is possible that the main olfactory system is the organ that detects pheromones in humans (Brennan and Zufall 2006).

The comparison between the OR repertoires in humans and mice has also revealed the presence of species-specific subfamilies of OR genes. These ORs are strong candidates to be involved in the detection of pheromones, or maybe of odorant classes that are detected by only one species (Godfrey et al. 2004).

The OR repertoires of humans and a closer species in terms of evolution to humans, the chimpanzee, were also compared (Gilad et al. 2005). Although their different habitats should result in different odorant detection needs, these species share the majority of OR genes. However, two subfamilies that are specific to chimpanzees and three subfamilies that are specific to humans were identified. The ORs that constitute these species-specific subfamilies show 99% amino acid sequence identity among themselves, with the exception of one human subfamily, which is composed of ORs with 70% identity among themselves (Gilad et al. 2005). Also, as described above, another study showed that 25% of the intact ORs are nonorthologous between humans and chimpanzees (Go and Niimura 2008). The agonists of species-specific ORs, which may have acquired species-specific functions, are still unknown, but their identification should be of interest.

A second family of GPCRs, known as trace amine-associate receptor (TAARs) and expressed in the olfactory epithelium, was recently described (Liberles and Buck 2006). The term “trace-amines” refers to α-phenylethylamine, p-tyramine, tryptamine, and octopamine, which are present at very low concentrations (nanomolar range) in mammalian tissues. While mice have 15 TAARs, only 6 TAARS were identified in humans (Liberles and Buck 2006). These receptors were shown to bind to volatile amines found in urine, which are linked to stress or are differentially concentrated in male vs female urine, and therefore are believed to be involved in pheromone detection. The role of TAARs in humans remains unknown.

7.7.3 Odorant Receptors (ORs) and Perception

An interesting feature of the human OR repertoire is that it is highly polymorphic. From pioneering perception studies, it is known that the ability to detect some odorants can vary greatly between individuals. Individuals that only detect some odorants when present in high concentrations or individuals that do not detect some odorants at all are relatively common in the human population (Amoore 1967, 1977; Amoore and Steinle 1991). Heterologous systems can now be used to functionally express polymorphic variants of human ORs to correlate differences in the structure of ORs in a population and their agonists.

A small number of polymorphisms in human OR genes have been described so far, but with the increasing availability of genomic sequences and single nucleotide polymorphisms (SNPs) from different individuals, new ones should be identified. For example, analysis of the 17 human OR genes present in the chromosomic region 17pl3.3 revealed the existence of polymorphisms in the coding region of 14 of the OR genes, which show a total of 26 SNPs; from these, 21 are cSNPs (coding SNPs), that is, modifications that result in amino acid changes in the structure of the protein (Sharon et al. 2000).

In another study, 51 OR gene *loci* that are potential pseudogenes were analyzed in 189 individuals from several ethnic origins. The results revealed a high level of interindividual variability (Menashe et al. 2003). Interestingly, it was observed that non-African individuals had fewer functional OR genes than African American individuals. These results suggest that different evolutionary pressures may have shaped the OR repertoire in different human populations (Menashe et al. 2003).

Recently, Keller and colleagues showed that SNP variations in OR7D4 (Figure 7.4) correlate to differences in the perception of two substances that bind to this OR: androstenone and androstadienone (Keller et al. 2007). Individuals containing one or two nonfunctional alleles from gene OR7D4, that is, with two SNPs that result in two amino acid substitutions, are less sensitive to the abovementioned agonists. Another recent study identified a single SNP in the gene OR11H7P This mutation in some individuals changes their sensitivity to the OR agonist, isovaleric acid (Menashe et al. 2007). These results support a relationship between genotypic and phenotypic variability in human olfaction.

Recent studies show that most of the human genome variation is not only due to SNPs, but also to structural variations of the genome, such as deletion of kilo- or megabase pairs, duplications, insertions, and inversions (Kidd et al. 2008; Korbel et al. 2007; Redon et al. 2006). Structural variations that affect the number of copies of a given region larger than 1 kb are called copy number variants (CNVs) (Feuk et al. 2006). Recently, the impact of CNVs on the individual OR gene content has been analyzed. It was shown that ~30% of the human OR genes, including pseudogenes, are polymorphic with respect to copy number (Hasin et al. 2008; Nozawa et al. 2007; Young et al. 2008). Experimental validation of some CNV ORs in 50 individuals demonstrated that some ORs are deleted in some individuals and not in others, while others are duplicated in a subset of individuals (Young et al. 2008). The combination of SNPs and CNVs in the OR gene family among different individuals must have a significant impact on our olfactory abilities.

Recent work by Saito and colleagues identified agonists for 10 human and 56 mouse ORs by using a high-throughput screening (Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H. and Mainland, J.D. (2009) Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. Sci. *Signal*. 2(60): ra9).

REFERENCES

Adrian E.D. Sensory discrimination with some recent evidence from the olfactory organ. Br. Med. Bull. 1950;6:330–33. [PubMed: 15420398]

Amoore J.E. Specific anosmia: A clue to the olfactory code. Nature. 1967;214:1095–98. [PubMed: 4861233]

Amoore J.E. Specific anosmia and the concept of primary odors. Chem. Senses Flavor. 1977;2:267–81.

Amoore J.E., Steinle S. A graphic history of specific anosmia. In: Wysocki C.J., Kare M.R., editors. In Chemical Senses: Genetics of Perception and Communications. Marcel Dekker; NewYork: 1991. pp. 331–51.

Barnea G., O'Donnell S., Mancia F., Sun X., Nemes A., Mendelsohn M., Axel R. Odorant receptors on axon termini in the brain. Science. 2004;304 [PubMed: 15178793]

Belluscio L., Gold G.H., Nemes A., Axel R. Mice deficient in G(olf) are anosmic. Neuron. 1998;20:69–81. [PubMed: 9459443]

Boekhoff I., Tareilus E., Strotmann J., Breer H. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. EMBO J. 1990;9:2453–58. [PMC free article: PMC552272] [PubMed: 2164471]

Brennan P., Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. Nature. 2006;444:308–15. [PubMed: 17108955]

Brunet L.J., Gold G.H., Ngai J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. Neuron. 1996;17:681–93. [PubMed: 8893025]

Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. Cell. 1991;65:175–87. [PubMed: 1840504]

Buck L.B. The olfactory multigene family. Curr. Opin. Gen. Dev. 1992;2:467–73. [PubMed: 1504623]

Chess A., Simon I., Cedar H., Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. Cell. 1994;78:823–34. [PubMed: 8087849]

Dhallan R.S., Yau K.W., Schrader K.A., Reed R.R. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. Nature. 1990;347:184–87. [PubMed: 1697649]

Dixon R., Kobilka B., Strader D., Benovic J., Dohlman H., Frielle T., Bolanowski M., Bennett C., Rands E., Diehl R., et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature. 1986;321:75–79. [PubMed: 3010132]

Dulac C., Torello A.T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 2003;4:551–62. [PubMed: 12838330]

Eggan K., Baldwin K., Tackett M., Osborne J., Gogos J., Chess A., Axel R., Jaenisch R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. Nature. 2004;428:44–49. [PubMed: 14990966]

Elsaesser R., Montani G., Tirindelli R., Paysan J. Phosphatidyl-inosite signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. Eur. J. Neurosci. 2005;21:2692–700. [PubMed: 15926917]

Feinstein P., Bozza T., Rodriguez I., Vassalli A., Mombaerts P. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the β2 adrenergic receptor. Cell. 2004;117:833–46. [PubMed: 15186782]

Feinstein P., Mombaerts P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. Cell. 2004;117:817–31. [PubMed: 15186781]

Feuk L., Carlson A., Scherer S. Structural variation in the human genome. Nat. Rev. Genet. 2006;7:85–97. [PubMed: 16418744]

Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. Nature. 2001;413:211–18. [PubMed: 11557990]

Firestein S., Darrow B., Shepherd G.M. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. Neuron. 1991;6:825–35. [PubMed: 1709025]

Firestein S., Picco C., Menini A. The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. J. Physiol. 1993;468:1–10. [PMC free article: PMC1143811] [PubMed: 8254501]

Freitag J., Krieger J., Strotmann J., Breer H. Two classes of olfactory receptors in Xenopus laevis. Neuron. 1995;15:1383–92. [PubMed: 8845161]

Freitag J., Ludwig G., Andreini I., Rossler P., Breer H. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. J. Comp. Physiol. 1998;183:635–50. [PubMed: 9839455]

Friedrich R., Korsching S. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. Neuron. 1997;18:737–52. [PubMed: 9182799]

Fujita Y., Takahashi T., Suzuki A., Kawashima K., Nara F., Koishi R. Deorphanization of Dresden G protein-coupled receptor for an odorant receptor. J. Recept. Signal Transduct. Res. 2007;27:323–34. [PubMed: 17885925]

Fuss S., Omura M., Mombaerts P. Local and cis effects of the H element on expression of odorant receptor genes in mouse. Cell. 2007;130:373–84. [PubMed: 17662950]

Gilad Y., Man O., Glusman G. A comparison of the human and chimpanzee olfactory receptor gene repertoires. Genome Res. 2005;15:224–30. [PMC free article: PMC546523] [PubMed: 15687286]

Gimelbrant A., Haley S., McClintock T. Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. J. Biol. Chem. 2001;276:7285–90. [PubMed: 11060288]

Gimelbrant A., Skaletski H., Chess A. Selective pressures on the olfactory receptor repertoire since the human-chimpanzee divergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:9019–22. [PMC free article: PMC428465] [PubMed: 15178761]

Gimelbrant A., Stoss T., Landers T., McClintock T. Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells. J. Neurochem. 1999;72:2301–11. [PubMed: 10349839]

Glusman G., Yanai I., Rubin I., Lancet D. The complete human olfactory subgenome. Genome Res. 2001;11:685–702. [PubMed: 11337468]

Go Y., Niimura Y. Similar numbers but different repertoires of olfactory receptor genes in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 2008;25:1897–907. [PubMed: 18562338]

Godfrey P.A., Malnic B., Buck L.B. The mouse olfactory receptor gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:2156–61. [PMC free article: PMC357068] [PubMed: 14769939]

Gold G. Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. Annu. Rev. Physiol. 1999;61:857–71. [PubMed: 10099713]

Hagman J., Belanger C., Travis A., Turck C., Grosschedl R. Cloning and characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. Genes Dev. 1993;7:760–73. [PubMed: 8491377]

Hasin Y., Olender T., Khen M., Gonzaga-Jauregui C., Kim P., Urban A., Snyder M., Gerstein M., Lancet D., Korbel J. High-resolution copy-number variation map reflects human olfactory receptor diversity and evolution. PLoS Genet. 2008;4 [PMC free article: PMC2570968] [PubMed: 18989455]

Hirota J., Mombaerts P. The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:8751–55. [PMC free article: PMC423267] [PubMed: 15173589]

Hirota J., Omura M., Mombaerts P. Differential impact of Lhx2 deficiency on expression of class I and class II odorant receptor genes in mouse. Mol. Cell. Neurosci. 2007;34:679–88. [PubMed: 17350283]

Hoppe R., Breer H., Strotman J. Promoter motifs of olfactory receptor genes expressed in distinct topographic patterns. Genome Res. 2006;87:711–23. [PubMed: 16600568]

Huque T., Bruch R. Odorant and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in the olfactory cilia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986;137:37–42. [PubMed: 3013187]

Imai T., Suzuki M., Sakano H. Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. Science. 2006;314:657–61. [PubMed: 16990513]

Jaquier V., Pick H., Vogel H. Characterization of an extended receptive ligand repertoire of the human olfactory receptor OR17-40 comprising structurally related compounds. J. Neurochem. 2006;97:537–44. [PubMed: 16539658]
Jones D.T., Reed R.R. Golf: An olfactory neuron-specific G-protein involved in odorant signal transduction. Science. 1989;244:790–95. [PubMed: 2499043]
Kajiya K., Inaki K., Tanaka M., Haga T., Kataoka H., Touhara K. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. J. Neurosci. 2001;21:6018–25. [PubMed: 11487625]
Katada S., Tanaka M., Touhara K. Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor. J. Neurochem. 2004;90:1453–63. [PubMed: 15341529]
Keller A., Zhuang H., Chi Q., Vosshall L., Matsunami H. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. Nature. 2007;449:468–72. [PubMed: 17873857]
Kerr D., Von Dannecker L., Davalos M., Michaloski J., Malnic B. Ric-8B interacts with Gαolf and Gγ13 and co-localizes with Gαolf, Gβ1 and Gγ13 in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol. Cell. Neurosci. 2008;38:341–48. [PubMed: 18462949]
Kidd J., Cooper G., Donahue W., Hayden H., Sampas N., Graves T., Hansen N., Teague B., Alkan C., Antonacci F., et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. Nature. 2008;453:56–64. [PMC free article: PMC2424287] [PubMed: 18451855]
Kishida T., Kubota S., Shirayama Y., Fukami H. The olfactory receptor gene repertoires in secondary-adapted marine vertebrates: Evidence for reduction of the functional proportions in cetaceans. Biol. Lett. 2007;3:428–30. [PMC free article: PMC2390674] [PubMed: 17535789]
Kolterud A., Alenius M., Carlsson L., Bohm S. The Lim homeobox gene Lhx2 is required for olfactory sensory neuron identity. Development. 2004;131:5319–26. [PubMed: 15456728]
Korbel J., Urban A., Affourtit J., Godwin B., Grubert F., Simons J., Kim P., Palejev D., Carriero N.J., Du L., et al. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. Science. 2007;318:420–26. [PMC free article: PMC2674581] [PubMed: 17901297]
Kratz E., Dugas J.C., Ngai J. Odorant receptor gene regulation: Implications from genomic organization. Trends Genet. 2002;18:29–34. [PubMed: 11750698]
Krautwurst D. Human olfactory receptor families and their odorants. Chem. Biodivers. 2008;5:842–52. [PubMed: 18618407]
Krautwurst D., Yau K.W., Reed R.R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. Cell. 1998;95:917–26. [PubMed: 9875846]
Kudrycki K., Stein-Izsak C., Behn C., Grillo M., Akeson R., Margolis F. Olf-1 binding site: Characterization of an olfactory neuron-specific promoter motif. Mol. Cell. Biol. 1993;13:3002–14. [PMC free article: PMC359693] [PubMed: 8474458]
Laska M., Seibt A., Weber A. Microsmatic primates revisited: Olfactory sensitivity in the squirrel monkey. Chem. Senses. 2000;25:47–53. [PubMed: 10667993]
Leveteau J., MacLeod P. Olfactory discrimination in the rabbit olfactory glomerulus. Science. 1966;153:175–76. [PubMed: 5940356]
Lewcock J.W., Reed R.R. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:1069–74. [PMC free article: PMC327152] [PubMed: 14732684]
Li J., Ishii T., Feinstein P., Mombaerts P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. Nature. 2004;428:393–99. [PubMed: 15042081]
Liberles S., Buck L. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. Nature. 2006;442:645–50. [PubMed: 16878137]
Libert F., Parmentier M., Lefort A., Dinsart C., Van Sande J., Maenhaut C., Simons M., Dumont J., Vassart G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. Science. 1989;244:569–72. [PubMed: 2541503]
Lin H., Grosschedl R. Failure of B cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. Nature. 1995;376:263–67. [PubMed: 7542362]
Lin W., Margolskee R., Donnert G., Hell S., Restrepo D. Olfactory neurons expressing transient receptor portential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104:2471–76. [PMC free article: PMC1892929] [PubMed: 17267604]
Lomvardas S., Barnea G., Pisapia D., Mendelsohn M., Kirkland J., Axel R. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. Cell. 2006;126:403–13. [PubMed: 16873069]
Lowe G., Nakamura T., Gold G. Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. PNAS. 1989;86:5641–45. [PMC free article: PMC297680] [PubMed: 2787513]
Lu M., Echeverri F., Moyer B.D. Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. Traffic. 2003;4:416–33. [PubMed: 12753650]
Lu M., Staszewski L., Echeverri F., Xu H., Moyer B. Endoplasmic reticulum degradation impedes olfactory G-protein coupled receptor functional expression. BMC Cell Biol. 2004;5 [PMC free article: PMC520810] [PubMed: 15369603]
Malnic B. Searching for the ligands of odorant receptors. Mol. Neurobiol. 2007;35:175–81. [PubMed: 17917106]
Malnic B., Godfrey P.A., Buck L.B. The human olfactory receptor gene family. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 2004;101:2584–89. [PMC free article: PMC356993] [PubMed: 14983052]
Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L.B. Combinatorial receptor codes for odors. Cell. 1999;96:713–23. [PubMed: 10089886]
Maresh A.G., Gil D.R., Whitman M., Greer C. Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb–implications for odor processing. PLoS ONE. 2008;3 [PMC free article: PMC2440537] [PubMed: 18612420]
McIntyre J., Bose S., Stromberg A., McClintock T. Emx2 stimulates odorant receptor gene expression. Chem. Senses. 2008;33:825–37. [PMC free article: PMC2580733] [PubMed: 18854508]
Menashe I., Abaffy T., Hasin Y., Goshen S., Yahalom V., Luetje C., Lancet D. Genetic elucidation of human hyperosmia to isovaleric acid. PLoS Biol. 2007;5 [PMC free article: PMC2043052] [PubMed: 17973576]
Menashe I., Man O., Lancet D., Gilad Y. Different noses for different people. Nat. Genet. 2003;34:143–44. [PubMed: 12730696]
Menco B., Cunningham A., Qasba P., Levy N., Reed R. Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: A freeze-substitution ultrastructural study. J. Neurocytol. 1997;26:691–706. [PubMed: 9368882]
Michaloski J., Galante P., Malnic B. Identification of potential regulatory motifs in odorant receptor genes by analysis of promoter sequences. Genome Res. 2006;16:1091–98. [PMC free article: PMC1557771] [PubMed: 16902085]
Miyamichi K., Serizawa S., Kimura H., Sakano H. Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. J. Neurosci. 2005;25:3586–92. [PubMed: 15814789]
Mombaerts P. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. Ann. Rev. Neurosci. 1999;22:487–509. [PubMed: 10202546]
Mombaerts P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. Nat. Rev. Neurosci. 2004;5:263–78. [PubMed: 15034552]

Mombaerts P. Axonal wiring in the mouse olfactory system. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2006;22:713–37. [PubMed: 17029582]
Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J., Axel R. Visualizing an olfactory sensory map. Cell. 1996;87:675–86. [PubMed: 8929536]
Mori K., Mataga N., Imamura K. Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. J. Neurophysiol. 1992;67:786–89. [PubMed: 1578255]
Nakamura T., Gold G.H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. Nature. 1987;325:442–44. [PubMed: 3027574]
Nedelec S., Foucher I., Brunet I., Bouillot C., Prochiantz A., Trembleau A. Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:10815–20. [PMC free article: PMC490017] [PubMed: 15247416]
Ngai J., Dowling M.M., Buck L., Axel R., Chess A. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. Cell. 1993;72:657–66. [PubMed: 7916654]
Nguyen M., Zhou Z., Marks C., Ryba N., Belluscio L. Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allelic exclusion. Cell. 2007;131:1009–17. [PMC free article: PMC2195930] [PubMed: 18045541]
Niimura Y., Nei M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. PNAS. 2003;100:12235–40. [PMC free article: PMC218742] [PubMed: 14507991]
Niimura Y., Nei M. Comparative evolutionary analysis of olfactory receptor genes clusters between humans and mice. Gene. 2005;346:13–21. [PubMed: 15716120]
Niimura Y., Nei M. Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. PLOS One. 2007;8 [PMC free article: PMC1933591] [PubMed: 17684554]
Nishizumi H., Kumasaka K., Inoue N., Nakashima A., Sakano H. Deletion of the core-H region in mice abolishes the expression of three proximal odorant receptor genes in cis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104:20067–72. [PMC free article: PMC2148423] [PubMed: 18077433]
Nozawa M., Kawahara Y., Nei M. Genomic drift and copy number variation of sensory receptor genes in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104:20421–26. [PMC free article: PMC2154446] [PubMed: 18077390]
Olender T., Fuchs T., Linhart C., Shamir R., Adams M., Kalush F., Khen M., Lancet D. The canine olfactory subgenome. Genomics. 2004;83:361–72. [PubMed: 14962662]
Pace U., Hanski E., Salomon Y., Lancet D. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. Nature. 1985;316:255–58. [PubMed: 3927168]
Parmentier M., Libert F., Schurmans F., Schiffmann S., Lefort A., Eggerickx D., Ledent C., Mollereau C., Gerard C., Perret J., et al. Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. Nature. 1992;355:453–55. [PubMed: 1370859]
Qasba P., Reed R.R. Tissue and zonal-specific expression of an olfactory receptor transgene. J. Neurosci. 1998;18:227–36. [PubMed: 9412503]
Quignon P., Giraud M., Rimbault M., Lavigne P., Tacher S., Morin E., Retout E., Valin A.-S., Lindblad-Toh K., Nicolas J., et al. The dog and rat olfactory receptor repertoires. Genome Biol. 2005;6 [PMC free article: PMC1257466] [PubMed: 16207354]
Quignon P., Kirkness E., Cadieu E., Touleimat N., Guyon R., Renier C., Hitte C., André C., Fraser C., Galibert F. Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. Genome Biol. 2003;4 [PMC free article: PMC329419] [PubMed: 14659017]
Redon R., Ishikawa S., Fitch K., Feuk L., Perry G., Andrews T., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., et al. Global variation in copy number in the human genome. Nature. 2006;444:444–54. [PMC free article: PMC2669898] [PubMed: 17122850]
Ressler K.J., Sullivan S.L., Buck L.B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. Cell. 1993;73:597–609. [PubMed: 7683976]
Ressler K.J., Sullivan S.L., Buck L.B. Information coding in the olfactory system: Evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. Cell. 1994;79:1245–55. [PubMed: 7528109]
Ronnett G.V., Cho H., Lester L.D., Wood S., Snyder S. Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cylase in olfactory receptor neuronal cultures. J. Neurosci. 1993;13:1751–58. [PubMed: 8385207]
Ronnett G.V., Moon C. G proteins and olfactory signal transduction. Annu. Rev. Physiol. 2002;64:189–222. [PubMed: 11826268]
Rothman A., Feinstein P., Hirota J., Mombaerts P. The promoter of the mouse odorant receptor gene M71. Mol. Cell. Neurosci. 2005;28:535–46. [PubMed: 15737743]
Rouquier S., Blancher A., Giorgi D. The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: Evidence for reduction of the functional fraction in primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:2870–74. [PMC free article: PMC16022] [PubMed: 10706615]
Rouquier S., Giorgi D. Olfactory receptor gene repertoires in mammals. Mutat. Res. 2007;616:95–102. [PubMed: 17166524]
Rouquier S., Taviaux S., Trask B.J., Brand-Arpon V., van den Engh G., Demaille J., Giorgi D. Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. Nat. Genet. 1998;18:243–50. [PubMed: 9500546]
Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239:487–91. [PubMed: 2448875]
Saito H., Kubota M., Roberts R.W., Chi Q., Matsunami H. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. Cell. 2004;119:679–91. [PubMed: 15550249]
Sanz G., Schlegel C., Pernollet J.-C., Briand L. Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. Chem. Senses. 2005;30:69–80. [PubMed: 15647465]
Sato T., Hirono J., Tonoike M., Takebayashi M. Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. J. Neurophysiol. 1994;72:2980–89. [PubMed: 7897503]
Schmiedeberg K., Shirokova E., Weber H., Schilling B., Meyerhof W., Krautwurst D. Structural determinants of odorant recognition by the human olfactory receptors OR1A1 and OR1A2. J. Struct. Biol. 2007;159:400–12. [PubMed: 17601748]
Schwarzenbacher K., Fleischer J., Breer H. Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies. Histochem. Cell Biol. 2005;123:419–28. [PubMed: 15868179]
Serizawa S., Ishii T., Nakatani H., Tsuboi A., Nagawa F., Asano M., Sudo K., Sakagami J., Sakano H., Ijiri T., et al. Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. Nat. Neurosci. 2000;3:687–93. [PubMed: 10862701]
Serizawa S., Miyamichi K., Nakatani H., Suzuki M., Saito M., Yoshihara S., Sakano H. Negativefeedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in the mouse. Science. 2003;302:2088–94. [PubMed: 14593185]
Serizawa S., Miyamichi K., Sakano H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. Trends Genet. 2004;20:648–53. [PubMed: 15522461]
Serizawa S., Miyamichi H., Takeuchi Y., Yamagishi M., Suzuki M., Sakano H. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. Cell. 2006;127:1057–69. [PubMed: 17129788]
Sharon D., Gilad Y., Glusman G., Khen M., Lancet D., Kalush F. Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within a human olfactory receptor gene cluster. Gene. 2000;260:87–94. [PubMed: 11137294]

Shepherd G. The human sense of smell: Are we better than we think? PLoS Biol. 2004;2 [PMC free article: PMC406401] [PubMed: 15138509]
Shirokova E., Scmiedeberg K., Bedner P., Niessen H., Willecke K., Raguse J.-D., Meyerhof W., Krautwurst D. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. J. Biol. Chem. 2005;280:11807–15. [PubMed: 15598656]
Shykind B.M. Regulation of odorant receptors: One allele at a time. Hum. Mol. Genet. 2005;14:R33–R39. [PubMed: 15809271]
Shykind B.M., Rohani S.C., O'Donnel S., Nemes A., Mendelsohn M., Sun Y., Axel R., Barnea G. Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. Cell. 2004;117:801–15. [PubMed: 15186780]
Sicard G., Holley A. Receptor cell responses to odorants: Similarities and differences among odorants. Brain Res. 1984;292:283–96. [PubMed: 6692160]
Sklar P.B., Anholt R.R.H., Snyder S.H. The odorant sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells: Differential stimulation by distinct classes of odorants. J. Biol. Chem. 1986;261:15538–43. [PubMed: 3536906]
Spehr M., Gisselman G., Poplawski A., Riffel J.A., Wetzel C.H., Zimmer R.K., Hartt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science. 2003;299:2054–58. [PubMed: 12663925]
Spehr M., Wetzel C., Hatt H., Ache B. 3-Phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. Neuron. 2002;33:731–39. [PubMed: 11879650]
Strotmann J., Levai O., Fleischer J., Schwarzenbacher K., Breer H. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. J. Neurosci. 2004;24:7754–61. [PubMed: 15342743]
Sullivan S.L., Adamson M.C., Ressler K.J., Kozak C.A., Buck L.B. The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:884–88. [PMC free article: PMC40152] [PubMed: 8570653]
Touhara K., Sengoku S., Inaki K., Tsuboi A., Hirono J., Sato T., Sakano H., Haga T. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96:4040–45. [PMC free article: PMC22416] [PubMed: 10097159]
Tsuboi A., Miyazaki T., Imai T., Sakano H. Olfactory sensory neurons expressing class I odorant receptors converge their axons on an antero-dorsal domain of the olfactory bulb in the mouse. Eur. J. Neurosci. 2006;23:1436–44. [PubMed: 16553607]
Vassalli A., Rothman A., Feinstein P., Zapotocky M., Mombaerts P. Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb. Neuron. 2002;35:681–96. [PubMed: 12194868]
Vassar R., Chao S., Sitcheran R., Nunez J., Vosshall L., Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. Cell. 1994;79:981–91. [PubMed: 8001145]
Vassar R., Ngai J., Axel R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. Cell. 1993;74:309–18. [PubMed: 8343958]
Von Dannecker L., Mercadante A., Malnic B. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Gaolf. J. Neurosci. 2005;25:3793–800. [PubMed: 15829631]
Von Dannecker L., Mercadante A., Malnic B. Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;103:9310–14. [PMC free article: PMC1482606] [PubMed: 16754875]
Wang F., Nemes A., Mendelsohn M., Axel R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. Cell. 1998;93:47–60. [PubMed: 9546391]
Wang M., Reed R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. Nature. 1993;364:121–26. [PubMed: 8321284]
Wang M.M., Tsai R.Y.L., Schrader K.A., Reed R.R. Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. Mol. Cell. Biol. 1993;13:5805–13. [PMC free article: PMC360324] [PubMed: 7689152]
Wang S., Betz A., Reed R. Cloning of a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection. Mol. Cell. Neurosci. 2002;20:404–14. [PubMed: 12139918]
Wang S., Tsai R., Reed R. The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: Implications in olfactory gene regulation and neuronal development. J. Neurosci. 1997;17:4149–58. [PubMed: 9151732]
Wang S.S., Lewcock J.W., Feinstein P., Mombaerts P., Reed R.R. Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. Development. 2003;131:1377–88. [PubMed: 14993187]
Warren W., Hillier L., Graves J., Birney E., Ponting C., Grutzner F., Belov K., Miller W., Clarke L., Chinwalla A., et al. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. Nature. 2008;453:175–83. [PMC free article: PMC2803040] [PubMed: 18464734]
Wetzel C.H., Oles M., Wellerdieck C., Kuczkowiak M., Hatt H. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus laevis* oocytes. J. Neurosci. 1999;19:7426–33. [PubMed: 10460249]
Wong S.T., Trinh K., Hacker B., Chan G.C.K., Lowe G., Gaggar A., Xia Z., Gold G.H., Storm D.R. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. Neuron. 2000;27:487–97. [PubMed: 11055432]
Young J., Endicott R., Parghi S.W., Walker M., Kidd J., Trask B. Extensive copy-number variation of the human olfactory receptor gene family. Am. J. Hum. Genet. 2008;83:228–42. [PMC free article: PMC2495065] [PubMed: 18674749]
Young J., Kambere M., Trask B., Lane R. Divergent V1R repertoires in five species: Amplification in rodents decimation in primates, and a surprisingly small repertoire in dogs. Genome Res. 2005;15:231–40. [PMC free article: PMC546524] [PubMed: 15653832]
Young J., Trask B. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. Trends Genet. 2007;23:212–15. [PubMed: 17382427]
Young J.M., Friedman C., Williams E.M., Ross J.A., Tonnes-Priddy L., Trask B.J. Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. Hum. Mol. Genet. 2002;11:535–46. [PubMed: 11875048]
Young J.M., Shykind B.M., Lane R.P., Tonnes-Priddy L., Ross E.M., Walker M., Williams E.M., Trask B.J. Odorant receptor expressed sequence tags demonstrate olfactory expression of over 400 genes, extensive alternate splicing and unequal expression levels. Genome Biol. 2003;4 4. [PMC free article: PMC329117] [PubMed: 14611657]
Zhang X., De la Cruz O., Pinto J., Nicolae D., Firestein S., Gilad Y. Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray. Genome Biol. 2007;8 [PMC free article: PMC1929152] [PubMed: 17509148]
Zhang X., Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat. Neurosci. 2002;5:124–33. [PubMed: 11802173]
Zhang X., Rodriguez I., Mombaerts P., Firestein S. Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. Genomics. 2004;83:802–11. [PubMed: 15081110]
Zhang X., Rogers M., Tian H., Zhang X., Zou D.-J., Liu J., Ma M., Shepherd G., Firestein S. High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:14168–73. [PMC free article: PMC521132] [PubMed: 15377787]
Zhuang H., Matsunami H. Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. J. Biol. Chem. 2007;282:15284–93. [PubMed: 17387175]
Zozulya S., Echeverri F., Nguyen T. The human olfactory receptor repertoire. Genome Biol. 2001;2:11–12. 18.

Figures

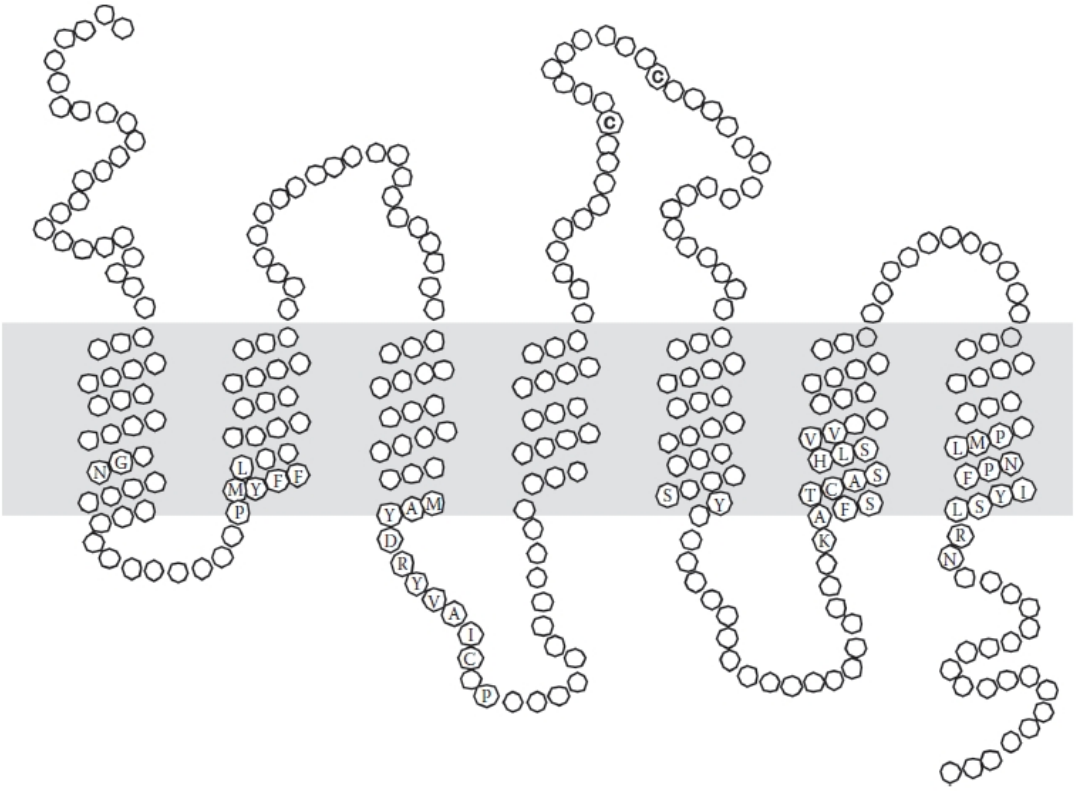


FIGURE 7.1

Typical structure of an odorant receptor. The diagram illustrates one odorant receptor in the plasmatic membrane (shown in gray), with its seven putative transmembrane domains. Amino acids that are highly conserved among the majority of the OR proteins are shown. The remaining residues are extremely variable, consistent with the ability of the OR family to interact with a large number of odorants.

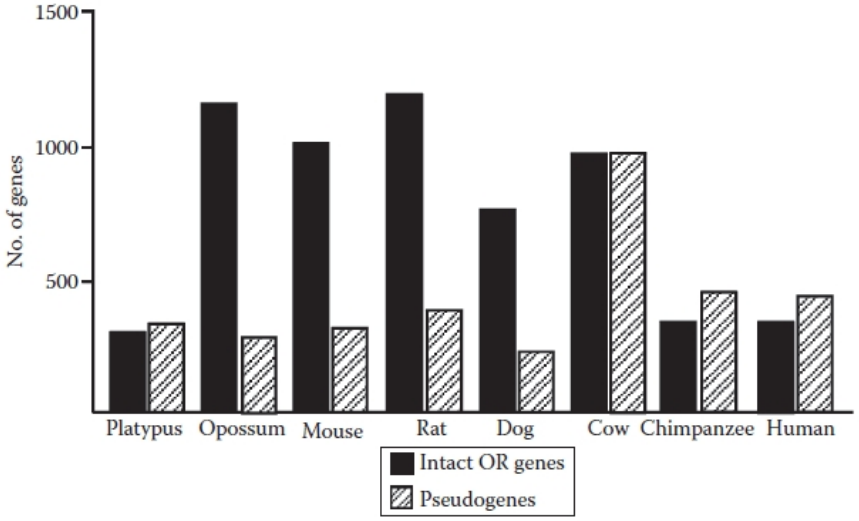


FIGURE 7.2

The size of the OR gene family in different mammalian species. The numbers of intact OR genes and pseudogenes were determined from platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) (Niimura, Y. and Nei, M. 2007; Warren, W. et al. 2008), opossum (*Monodelphis domestica*) (Niimura, Y. and Nei, M. 2007), mouse (*Mus musculus*) (Godfrey, P.A., Malnic, B., and Buck, L.B. 2004: Niimura, Y., and Nei, M. 2005; Young, J.M. et al. 2002; Zhang, X. et al. 2004), rat (*Rattus norvegicus*) (Niimura, Y. and Nei, M. 2007; Quignon, P. et al. 2005), dog (*Canis familiaris*) (Niimura, Y. and Nei, M. 2007; Olender, T. et al. 2004; Quignon, P. et al. 2005), cow (*Bos taurus*) (Niimura, Y. and Nei, M. 2007), chimpanzee (*Pan troglodytes*) (Gilad, Y., Man, O., and Glusman, G. 2005; Go, Y., and Niimura, Y. 2008), human (*Homo sapiens*) (Glusman, G. et al. 2001; Malnic, B. Godfrey, P.A., and Buck, L.B. 2004; Niimura, Y., and Nei, M. 2003; Zozulya, S., Echeverri, F, and Nguyen, T. 2001).

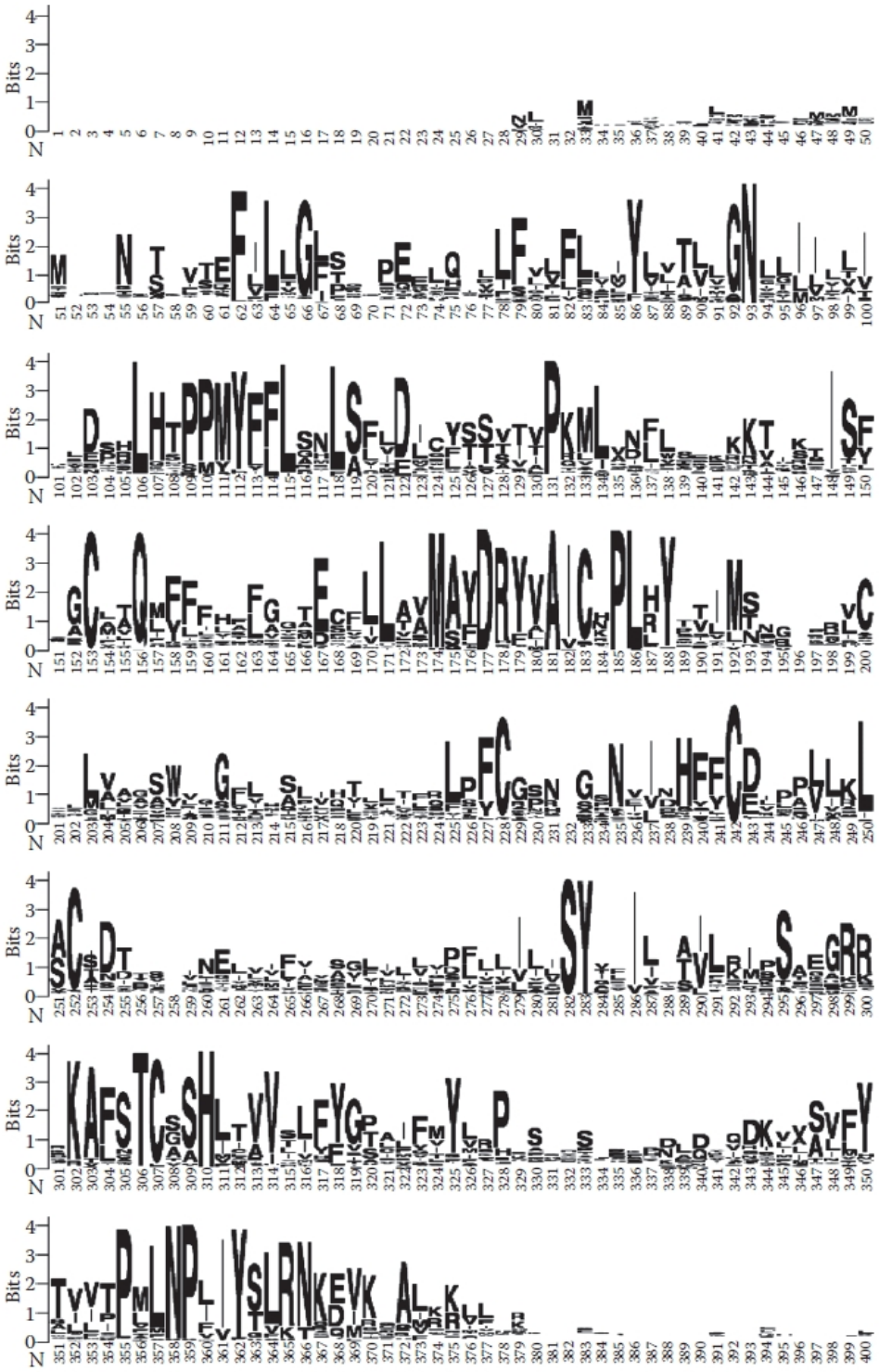


FIGURE 7.3

Motif patterns found in the human ORs. Weblogo representation for 397 human OR amino acid sequences. Sequences were aligned using Clustalw.

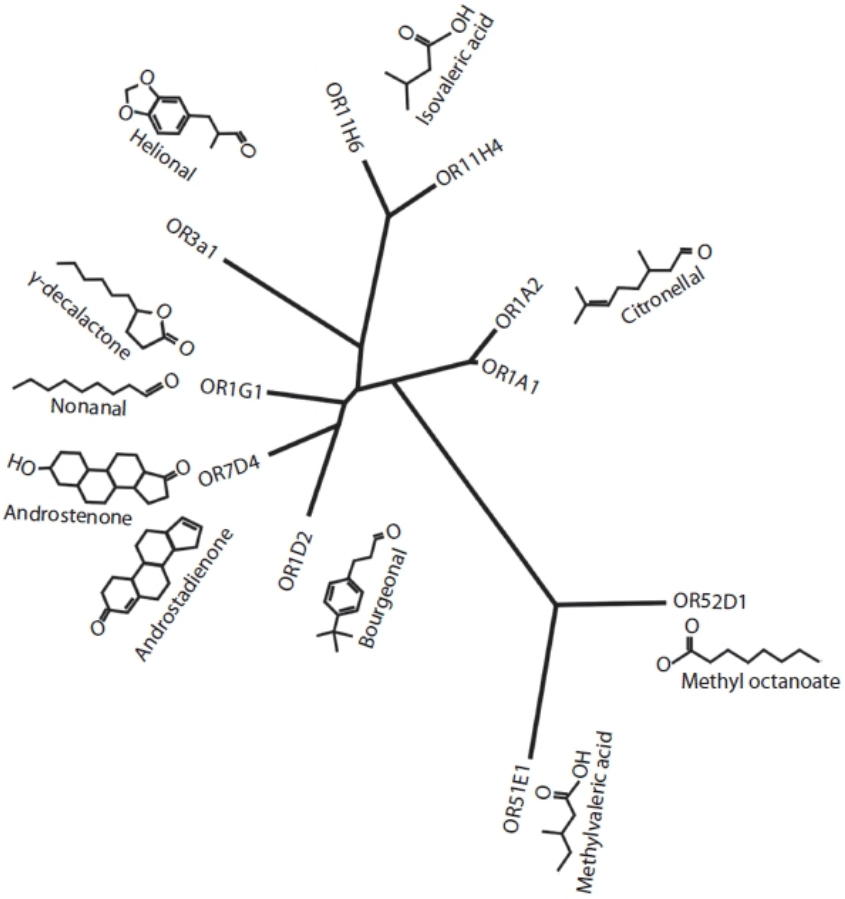


FIGURE 7.4

Phylogenetic relationships of deorphanized human ORs and their ligands. OR1A1 and OR1A2 (Schmiedeberg, K. et al. 2007), OR1D2 (Spehr, M. et al. 2003), OR1G1 (Sanz, G. et al. 2005), OR3A1 (Jaquier, V. et al. 2006; Wetzel, C.H. et al. 1999), OR7D4 (Keller, A. et al. 2007), OR11H6 and OR11H4 (Menashe, I. et al. 2007), OR51E1 (Fujita, Y. et al. 2007), OR52D1 (Sanz, G et al. 2005).

Copyright © 2010 by Taylor and Francis Group, LLC.

Anexo 2

Artigo *Odorant Receptor genes are expressed in olfactory neuroblastoma*, *Genetics and Molecular Research*, manuscrito no prelo.

GMR Genetics and Molecular Research
Online Journal
ISSN:1676-5680

Odorant receptor genes are expressed in olfactory neuroblastoma

D.C. Gonzalez-Kristeller[1], L.M. Gutiyama[1], A.H. Campos[2], F.A. Soares[2], H. Brentani[3] and B. Malnic[1]

[1]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
[2]Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A.C. Camargo,
Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP, Brasil
[3]Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding author: B. Malnic
E-mail: bmalnic@iq.usp.br

Genet. Mol. Res. 12 (3): 3479-3487 (2013)
Received January 20, 2013
Accepted May 29, 2013
Published September 10, 2013
DOI http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.10.4

ABSTRACT. Olfactory neuroblastoma (ONB) is a malignant tumor found in the human nasal cavity. These tumors are rare and poorly characterized at the molecular level. In this study, we asked whether olfactory-specific genes are expressed in ONBs by using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction. We found that the olfactory marker protein and the *RIC-8B* genes, which are specifically expressed in mature olfactory neurons, are expressed in ONBs. Importantly, we also found that ONBs express a large variety of odorant receptor genes, representative of different odorant receptor gene subfamilies. Our results show that the ONBs express genes that are normally expressed in mature olfactory neurons and indicate that they are derived from progenitor or immature cells in the olfactory epithelium and not from a clonal expansion of a single or few mature olfactory neurons.

Key words: Olfactory neuroblastoma; Odorant receptors; *RIC-8B* gene; Olfactory marker protein; Esthesioneuroblastoma

 ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

INTRODUCTION

Esthesioneuroblastoma or olfactory neuroblastoma (ONB) is a rare and aggressive tumor that usually occurs in the upper nasal cavity. This type of tumor accounts for only 6% of the tumors found in the nasal cavity and paranasal sinuses (Svane-Knudsen et al., 1998; Faragalla and Weinreb, 2009). It was first described as 'olfactory esthesioneuroepithelioma' in 1924 by Berger et al. ONBs are usually large tumors that may fill the whole nasal cavity and although it is believed that ONBs are derived from the olfactory epithelium, its tissue of origin remains uncertain (Dulguerov et al., 2001). Because ONBs histologically resemble other types of tumors that occur in the sinonasal tract, they cannot be easily distinguished (Faragalla and Weinreb, 2009; Thompson, 2009). Therefore, the accurate identification of ONBs should contribute to the prognosis and treatment of these tumors.

Due to the rarity of this type of tumor, very few studies have been conducted to date on the molecular characterization of ONBs. A number of neuronal markers, such as neuron-specific enolase, synaptophysin, chromogranin, and others, have been detected in ONBs by immunohistochemical analysis, indicating that the tumor is derived from neuronal tissue (Faragalla and Weinreb, 2009). More direct evidence that ONBs are derived from olfactory sensory neurons came from a study that showed that the human Achaete-scute 1 gene, known to be involved in the differentiation of olfactory neurons, is expressed in ONBs (Carney et al., 1995) and that olfactory-specific signal transduction proteins, such as Gαolf, adenylyl cyclase III, and cyclic-nucleotide channel A2 (Firestein, 2001), are present in ONBs (Matayoshi and Otaki, 2011). The comparison of genomes from ONBs and corresponding normal tissues by whole genome sequencing should also contribute to the molecular characterization of the mutations involved in the generation of these tumors (Weiss et al., 2012). In this study, we analyzed 2 samples of ONBs for the expression of olfactory-specific genes that are normally expressed in mature olfactory neurons.

MATERIAL AND METHODS

Tissue samples

Two olfactory neuroblastoma samples, denominated NF7T and NF9T, were obtained from 2 different individuals from the nasal cavity and maxilla, respectively. Samples were provided by the A.C. Camargo Hospital Biobank (Campos, 2012). Experiments were performed in accordance with the policies of the Research Ethics Committee of the A.C. Camargo Hospital. This committee ensures compliance with existing ethical principles in the Brazilian legislation.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction from the ONB samples was carried out using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, USA). RNA samples from normal human tissues were obtained from a panel of total RNA (Clontech, USA). cDNA synthesis was performed as previously described (Von Dannecker et al., 2005) using oligo dT primers.

Polymerase chain reaction (PCR)

Human *RIC-8B* was amplified using a pair of primers specific to human *RIC-8B* located in exons 8 (forward primer) and 10 (reverse primer) to exclude the possibility of contamination with genomic DNA. Human *OMP* was amplified using a pair of primers that amplify the region of the coding sequence between nucleotides 32 and 476. PCR was performed as previously described (Von Dannecker et al., 2005), except that 2.5 µL cDNA was used in the reactions. Reactions were heated to 95°C for 2 min and then subjected to 20 thermal cycles of 95°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 1 min, with a final incubation of 72°C for 10 min. As a control, we amplified human *GAPDH*.

For the amplification of human odorant receptor (OR) transcripts, the PCR solution contained 0.5 mM of each degenerate primer, 0.2 mM of each dNTP, 1X Taq DNA polymerase buffer, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA), 1.5 mM $MgCl_2$, and 2.5 µL synthesized cDNAs in a final volume of 50 µL. The thermocycler (Perkin Elmer, USA) was programmed as follows: initial denaturation for 2 min at 96°C, followed by 25 cycles of 1 min at 96°C, 3 min at 40°C, and 3 min at 72°C, followed by a final step of 10 min at 72°C. The sequences of the primers used are:

Human *RIC-8B*, forward: 5'-TACTCAGAGGATGAGGACACACAC-3', reverse: 5'-GTCTAACTGCAGCTCTGTATGAATG-3'; human *GAPDH*, forward: 5'-CTGCACCAC CAACTGCTTA-3', reverse: 5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'; human *OMP*, forward: 5'-TGGACATGCCGCTGGTCCTG-3', reverse: 5'-CCACGGAGGCCTTGAGGTTG-3'; P26, (forward): 5'-CITA(CT)GA(CT)CGITA(CT)GTIGCIATITG-3' and P27 (reverse): 5'-ACIACI GAIAG(GA)TGIGAI(GC)C(GA)CAIGT-3'.

DNA sequencing

The PCR products obtained by using the degenerate primers were gel purified, cloned into the pCRII vector (Invitrogen), and transformed into competent DH5α *Escherichia coli* cells (Invitrogen Life Technologies). DNA sequencing was performed using an ABI PRISM™ 3100 device (Applied Biosystems, USA). The sequencing reaction consisted of 2 µL Big Dye terminator mix (Perkin Elmer), 100-200 ng DNA, 9.6 pmol of each oligonucleotide, 200 mM Tris-HCl, pH 9.0, and 5 mM $MgCl_2$ in a final volume of 15 µL. The reaction was incubated for 2 min at 95°C, followed by 35 cycles of 45 s at 96°C, 30 s at 50°C, and 4 min at 60°C. After the reaction was completed, samples were precipitated with 100% ethanol and 1 mg/mL glycogen, rinsed with 70% (v/v) ethanol, suspended in 20 µL formamide, denatured at 94°C for 5 min, and subjected to automatic sequencing.

Phylogenetic analysis

OR amino acid sequences were aligned and used to generate a rooted phylogenetic tree with branch length (UPGMA) by using Clustalw (http://www.genome.jp/tools/clustalw/).

RESULTS

Two ONB samples, denominated NF7T and NF9T, were analyzed in this study. His-

tological analysis demonstrated that they were entirely (100%) composed of tumor tissue, as shown in Figure 1.

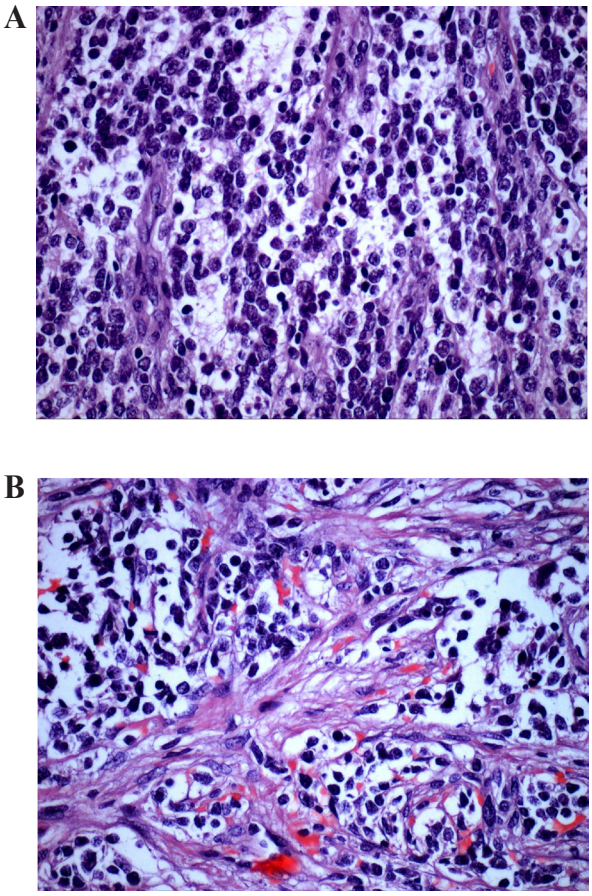


Figure 1. Histological analysis of olfactory neuroblastoma. Sections cut through the NF9T sample were stained with hematoxylin and eosin and analyzed under an Olympus BX43 microscope (magnification 400X). The tumors are composed of cells with round to oval nuclei and scanty cytoplasm (**A**), often forming clusters separated by a fibrovascular stroma (**B**). A fibrillary background is evident

We performed reverse transcriptase (RT)-PCR experiments in order to determine the expression of 2 olfactory-specific genes, *OMP* and *RIC-8B*. *OMP* is expressed specifically in mature olfactory neurons, both in the main and accessory olfactory system, and is therefore commonly used as a marker for this type of cell (Farbman and Margolis, 1980). RIC-8B is a guanine nucleotide exchange factor that is predominantly expressed in mature olfactory neurons, only in the main olfactory system (Von Dannecker et al., 2005; Kerr et al., 2008; Chan et al., 2011). In order to detect the expression of the *RIC-8B* gene, we used a pair of primers complementary to regions that flank the 9th exon of the gene (Figure 2A). By using these primers we were able to identify the full-length *RIC-8B* transcript, and also the alternatively spliced transcript, which

lacks exon 9 (Von Dannecker et al., 2005). We have previously shown that both transcripts (denominated *RIC-8B* and *RIC-8BΔ9*) are present in the mouse olfactory epithelium at equivalent levels (Von Dannecker et al., 2005). As shown in Figure 2B, after 20 PCR cycles, we could detect *RIC-8B* gene expression only in the 2 ONB samples, and not in 9 other normal human tissues. Under the conditions that we used, the NF9T sample showed stronger expression of the *RIC-8B* gene than the NF7T sample. Contrary to what is observed in the mouse olfactory epithelium, in the ONB samples, the *RIC-8BΔ9* transcript was more abundant than the full-length *RIC-8B* transcript (Figure 2B). Like for *RIC-8B* gene, the expression of the *OMP* gene was also observed only in the ONB samples, and not in the other tissues (Figure 2B). These results show that the olfactory-specific genes *OMP* and *RIC-8B* are expressed at considerably high levels in the ONBs, since the transcripts can be detected after only 20 PCR cycles.

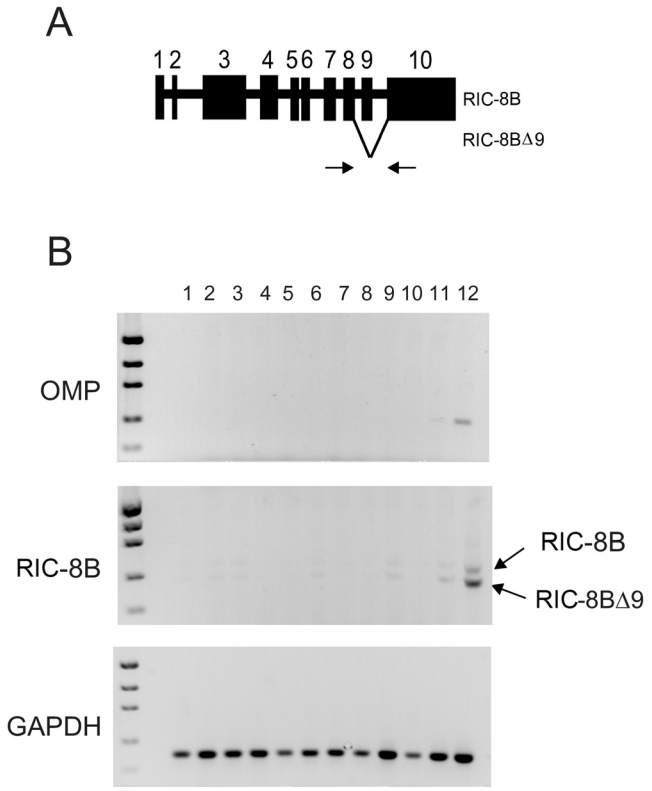


Figure 2. Expression of the *OMP* and *RIC-8B* genes in different human tissues and in ONBs. cDNAs synthesized from different tissues were used to amplify the *OMP* and *RIC-8B* transcripts**. A.** Schematic representation of the *RIC-8B* gene. The alternatively spliced version *RIC-8BΔ9* does not contain exon 9, as indicated. The regions matching the primers used in the PCR experiments are indicated by arrows. **B.** RT-PCR was conducted to amplify *OMP*, *RIC-8B*, and *GAPDH* from the following tissues: *lane 1* = brain; *lane 2* = thymus; *lane 3* = fetal brain; *lane 4* = heart; *lane 5* = kidney; *lane 6* = testis; *lane 7* = fetal liver; *lane 8* = lung; *lane 9* = skeletal muscle; *lane 10* = liver; *lane 11* = NF7T; *lane 12* = NF9T. The PCR product sizes expected for *RIC-8B* (413 bp) and *RIC-8BΔ9* (371 bp) are indicated. The expected size for OMP is 446 bp. Size markers are 2000, 1200, 800, 400, and 200 bp.

ORs are expressed specifically in the olfactory neurons of the nose, and are responsible for odorant recognition (Buck and Axel, 1991). Humans have approximately 400 intact OR genes, which constitute one of the largest gene families in the human genome (Malnic et al., 2004; Nei et al., 2008). We next checked whether the OR genes were also expressed in the ONBs. In order to be able to identify a large number of ORs, we used degenerate primers that hybridize to the majority of OR genes (Figure 3A) (Malnic et al., 1999; Michaloski et al., 2006). By using these primers, we were able to amplify a PCR product showing the expected size (~390 bp) from the ONB samples (Figure 3B). No amplification was obtained from the other tissues that were analyzed (Figure 3B). As shown for the *RIC-8B* and *OMP* genes (Figure 2), the NF9T sample showed stronger expression of the OR genes when compared to the NF7T sample. These results could be due to the intrinsic heterogeneity of these 2 ONB samples, or also due to the low number of PCR cycles that were used in the experiments.

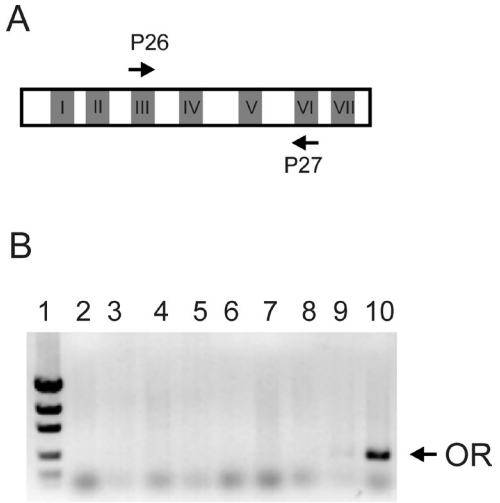


Figure 3. Expression of odorant receptor (OR) genes in different human tissues and in olfactory neuroblastomas. **A.** Schematic representation of an OR-coding region showing the 7 transmembrane regions (I-VII) and the regions matched by the P26 and P27 degenerate primers. **B.** Agarose gel (1.0%) stained with ethidium bromide showing the RT-PCR products obtained by using the P26 and P27 degenerate primers from the following tissues: *lane 2* = liver; *lane 3* = thymus; *lane 4* = fetal brain; *lane 5* = heart; *lane 6* = kidney; *lane 7* = testis; *lane 8* = skeletal muscle; *lane 9* = NF7T; *lane 10* = NF9T. *Lane 1* = molecular size markers: 2000, 1200, 800, 400, and 200 bp. The arrow indicates the PCR product with the expected size (~390 bp).

The bands showing the expected molecular size were purified from the gel and cloned. Ninety-six individual clones were sequenced and sequence analysis indicated that the majority of the clones corresponded to OR genes. Overall, the sequences corresponded to 27 different OR genes. We next asked whether ONBs express a specific group of OR genes. In order to address this question we prepared a phylogenetic tree using the amino acid sequences of the complete repertoire of human OR genes (403 genes), and the localization of the OR genes that were expressed in the ONBs was determined. As shown in Figure 4, the OR sequences that we identified are not concentrated in a few branches, but are spread throughout the human OR phylogenetic tree, indicating that ONBs express a random sample of human OR genes.

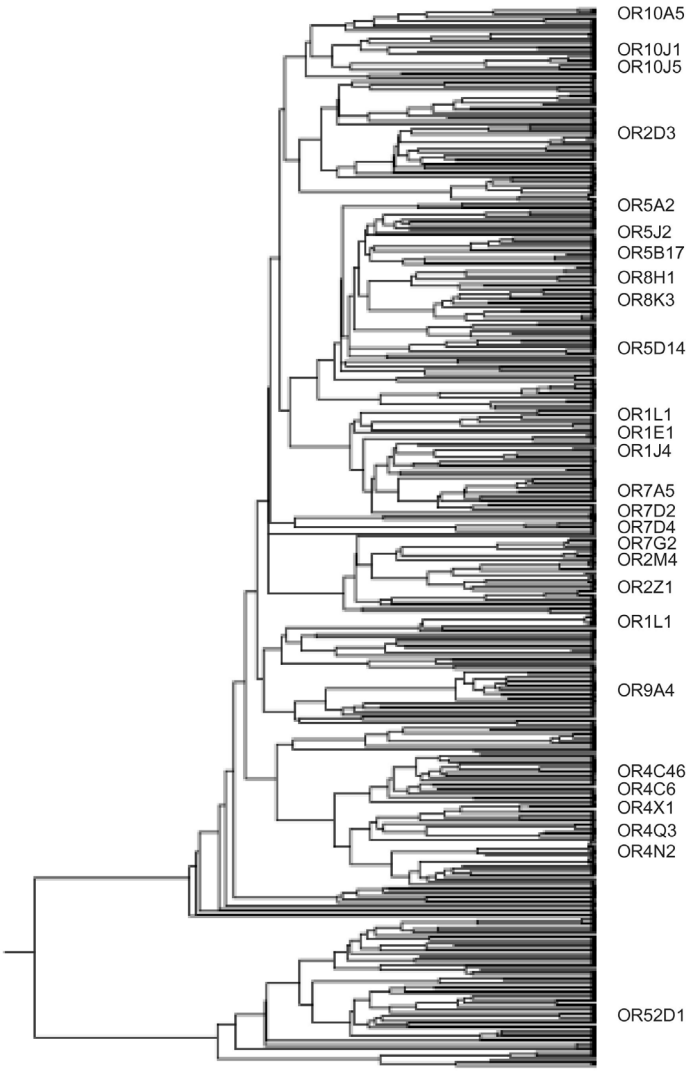


Figure 4. Phylogenetic tree of the human odorant receptors (ORs). A phylogenetic tree was prepared by using the amino acid sequences of 403 human OR genes. The OR genes expressed in the ONB are indicated at the right side of the tree.

DISCUSSION

In this research, we asked whether ONBs express olfactory-specific genes. Our results show that the 2 samples of ONBs that we analyzed in this study express genes, such as *OMP*, *RIC-8B*, and OR genes, that are specifically expressed in mature olfactory neurons. Except for in a few cases (Zhang et al., 2004), these genes are not expressed in other tissues, and therefore can be considered as specific markers for olfactory neurons. Because histological analysis of the samples showed that they are entirely composed of tumor cells, our results indicate that

the ONBs express these olfactory-specific genes and must therefore be derived from olfactory neurons.

In a previous study, immunohistochemistry was used to analyze the expression of *OMP* and other olfactory-specific proteins in ONB (Matayoshi and Otaki, 2011). In that study, *OMP* expression was not detected, while other olfactory-specific proteins, such as Gαolf, ACIII, and CNGCA2, which are normally expressed in mature olfactory neurons, were detected. Another study used RT-PCR to determine *OMP* expression status in ONBs, and also failed to detect expression of this gene (Carney et al., 1995). The lack of detection of the OMP protein or mRNA could be due to a singularity of the ONB samples that were analyzed in these studies. In contrast to these results, our findings show that the *OMP* gene is expressed in ONBs, together with other mature olfactory neuron-specific genes, such as *RIC-8B* and OR genes. The analysis of a larger number of ONB samples in the future should verify these observations.

We show here for the first time that ONBs express OR genes. Using degenerate primers complementary to the majority of the OR genes, we were able to analyze whether a large number of OR genes are expressed in ONBs. We amplified cDNAs corresponding to 27 different OR genes. We cannot exclude the possibility that additional genes are expressed in the ONBs that were not detected by our method (for example OR genes, which are expressed at lower levels). The OR genes that we detected belong to different subfamilies of the human OR gene family, indicating that a random and large variety of OR genes are expressed in the ONB. Interestingly, a previous study on ONBs showed that olfactory neuroblastoma cells are able to respond specifically to odorants (Gomez et al., 1996), indicating that the ORs expressed in this tumor are functional.

Mature olfactory neurons express a single OR gene allele from a large family of genes (Chess et al., 1994; Malnic et al., 1999). The fact that a large number of OR genes are expressed in the ONBs, instead of a single OR gene or just a few OR genes, also indicates that the ONBs are derived from progenitor cells or immature neurons in the olfactory epithelium, as previously observed (Carney et al., 1995), and not from a clonal expansion of a single or few mature olfactory neurons expressing any given OR gene.

It has been previously suggested that ONB cells could be used in order to study the different aspects of olfactory function (Gomez et al., 1996). It is well known, for example, that heterologous functional expression of OR genes is difficult to achieve, and requires co-expression with accessory proteins (Malnic, 2007; Zhuang and Matsunami, 2007). ONB cells could be used to study the odorant specificities of the different ORs that they express. Our results, together with those of other groups, show that ONBs express the olfactory genes that are usually expressed in mature olfactory neurons, indicating that they could be useful tools for studying olfactory function. In addition, if ONB cell lines expressing a single OR gene could be established, they would be useful to study the mechanisms of OR gene regulation.

In summary, our results provide tools that can be used for the accurate and early diagnosis of ONBs, and therefore should contribute to the understanding and appropriate management of this type of tumor. In addition, they indicate that the establishment of cell lines derived from ONBs could be useful for the study of the different aspects of olfactory function.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Luci Navarro for help with the DNA sequencing. Research supported by grants from FAPESP and CNPq.

REFERENCES

Berger L, Luc R and Richard D (1924). L'esthesioneuroepitheliome olfactif. *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer* 13: 410-421.

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

Campos AHJFM, Silva AA, Mota LDC, Olivieri ER, et al. (2012). The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the A C Camargo Hospital. *Biopreservation and Biobanking* 10: 168-173.

Carney ME, O'Reilly RC, Sholevar B, Buiakova OI, et al. (1995). Expression of the human Achaete-scute 1 gene in olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma). *J. Neurooncol.* 26: 35-43.

Chan P, Gabay M, Wright FA and Tall GG (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 286: 19932-19942.

Chess A, Simon I, Cedar H and Axel R (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78: 823-834.

Dulguerov P, Allal AS and Calcaterra TC (2001). Esthesioneuroblastoma: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2: 683-690.

Faragalla H and Weinreb I (2009). Olfactory neuroblastoma: a review and update. *Adv. Anat. Pathol.* 16: 322-331.

Farbman AI and Margolis FL (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev. Biol.* 74: 205-215.

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

Gomez G, Restrepo D, Rawson N, Lowry LD, et al. (1996). Induction of differentiation of human olfactory neuroblastoma cells into odorant-responsive cells. *Neuroscience* 74: 567-577.

Kerr DS, Von Dannecker LEC, Davalos M, Michaloski JS, et al. (2008). Ric-8B interacts with Ga_{olf} and Gg_{13} and co-localizes with Ga_{olf}, Gb_1 and Gg_{13} in the cilia of olfactory sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 38: 341-348.

Malnic B (2007). Searching for the ligands of odorant receptors. *Mol. Neurobiol.* 35: 175-181.

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

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

Matayoshi R and Otaki JM (2011). Immunohistochemical detection of olfactory-specific sensory transduction proteins in olfactory neuroblastoma. *Neurosci. Res.* 69: 258-262.

Michaloski JS, Galante PA and Malnic B (2006). Identification of potential regulatory motifs in odorant receptor genes by analysis of promoter sequences. *Genome Res.* 16: 1091-1098.

Nei M, Niimura Y and Nozawa M (2008). The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* 9: 951-963.

Svane-Knudsen V, Jorgensen KE, Hansen O, Lindgren A, et al. (1998). Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a series of 115 patients. *Rhinology* 36: 12-14.

Thompson LD (2009). Olfactory neuroblastoma. *Head Neck Pathol.* 3: 252-259.

Von Dannecker LE, Mercadante AF and Malnic B (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. *J. Neurosci.* 25: 3793-3800.

Weiss GJ, Liang WS, Izatt T, Arora S, et al. (2012). Paired tumor and normal whole genome sequencing of metastatic olfactory neuroblastoma. *PLoS One* 7: e37029.

Zhang X, Rogers M, Tian H, Zhang X, et al. (2004). High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14168-14173.

Zhuang H and Matsunami H (2007). Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *J. Biol. Chem.* 282: 15284-15293.