

Kiara Carolina Cardoso

**“EXPRESSÃO DO RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO COM
MUTAÇÕES NO DOMÍNIO TRANSMEMBRANA”**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica - Kiara Carolina Cardoso.

Campinas, 30 de julho de 2004.

*Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li
- Orientadora -*

Campinas, 2004

Kiara Carolina Cardoso

**“EXPRESSION DO RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO COM
MUTAÇÕES NO DOMÍNIO TRANSMEMBRANA”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Campinas, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

UNIDADE	PL
Nº CHAMADA	Ufmg C179e
V	EX
TOMBO BC/	61852
PROC.	16-86-03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	11.2.05
Nº CPD	

Bibid: 341260

C179e Cardoso, Kiara Carolina
Expressão do receptor sensor de cálcio com mutações no domínio transmembrana. / Kiara Carolina Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Homeostase. I. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profª. Drª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Membros:

Profª. Drª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco

Prof. Dr. Omar Magid Hauache

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/07/2004

030050 v114

AGRADECIMENTOS

À Dra. Lilia, pela oportunidade e confiança de realizarmos um trabalho em conjunto, e também pelo exemplo de respeito e paciência que me ensinou não somente ser uma profissional melhor, mas também uma pessoa melhor.

Ao Dr. Stephen Hyslop, que me auxiliou de forma fundamental para o desenvolvimento da dissertação.

Ao Dr. Antônio Condino Neto, pelo uso dos equipamentos de seu laboratório.

À Pamela Bento, por todo auxílio para a implantação de novas metodologias em nosso laboratório, e também pela pessoa especial que é.

À Cristina Garcia, por me ajudar sem medir esforços.

Ao pessoal do laboratório: Talita, Luciana, Simone, Marcelo, Mércia e Carolina por toda a ajuda e compreensão.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu querido amigo Manuel, por todas as ótimas sugestões.

À todos os meus grandes amigos que me apoiaram nos momentos de alegria e de tristeza, sempre com palavras de motivação e de confiança.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João Rui e Maria Alice e aos meus irmãos Denis e Regis, por todo o carinho, força e amor incondicional, obrigada por serem meu porto seguro. Para o meu amor Diogo por todo companheirismo, calma e pelo seu dom de fazer tudo parecer mais simples.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VII
RESUMO	IX
SUMMARY	XI
INTRODUÇÃO	13
<i>Receptor Sensor de Cálcio</i>	14
<i>Sinalização do receptor do cálcio</i>	16
<i>Doenças relacionadas a mutações no receptor sensor de cálcio</i>	16
<i>Modelo de ativação do CASR induzido pelo agonista</i>	17
<i>Importância do domínio extracelular do CASR</i>	19
<i>Papel da região transmembrana na ativação do receptor</i>	19
OBJETIVOS.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
<i>Construção do vetor de expressão do CASR</i>	25
<i>Preparação de Bactérias Competentes</i>	25
<i>Transformação de bactérias por choque térmico</i>	26
<i>Extração de plasmídios pelo método de lise alcalina (Miniprep)</i>	26
<i>Seqüenciamento</i>	27
<i>Criação de mutações</i>	28
<i>Cultura de células e transfecção transitória</i>	30
<i>Preparação de extrato de proteínas celulares</i>	31
<i>Western Blot</i>	31
<i>Amplificação da região extracelular do CASR para produção da proteína recombinante</i>	32
<i>Construção do Vetor de Expressão do ECD</i>	33
<i>Ligação do inserto ECD no vetor de expressão pET-28a</i>	34
<i>Expressão da Proteína e Teste de Solubilidade</i>	36
<i>Teste da Resina</i>	37
RESULTADOS	38
<i>CASR nativo inserido em pcDNA 3.1</i>	39
<i>Criação in vitro das mutações no CASR</i>	39
<i>Análise da expressão de receptores mutados e de proteínas envolvidas na sinalização celular através da técnica de Western Blot</i>	44
<i>Amplificação e clonagem do domínio extracelular do CASR para a produção de proteína recombinante</i>	47
<i>Análise de indução e solubilidade da proteína recombinante</i>	51
<i>Análise da purificação da proteína recombinante</i>	56
DISCUSSÃO.....	57
<i>Expressão do CASR com mutações no domínio transmembrana</i>	58
<i>Produção da proteína recombinante do ECD</i>	64
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	VI

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa = aminoácidos

AHD = Hipocalcemia autossômica dominante (Autosomal Dominant Hypocalmia)

CASR = receptor sensor de cálcio

C-terminal = carboxi terminal

dNTP = nucleotídeos (A, C, T, G)

DMEM = "Dulbecco's modified Eagle' medium"

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNA = ácido desoxirribonucléico codificador

ECD = domínio extracelular

FBS = soro fetal bovino

FHH = Hipercalcemia hipocalciúria familiar (Familial hipocalciuric hypercalcemia)

HEK 293 = linhagem de célula renal embrionária humana

IPTG = isopropyl-1-thio- β -D-galactoside

IP₃ = trifosfato inositol

NaN₃ = azida de sódio

NSHPT = hiperparatireoidismo neonatal grave (Neonatal severe hyperparathyroidism)

N-Terminal= amino terminal

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

pb = pares de base

PTH= paratormônio

PBS = tampão salina fosfato

PBS-T = tampão salina fosfato com Tween-20

PCR = reação em cadeia da polimerase

PVDF = membrana de "polyvinylidene difluoride"

SDS = dodecilsulfato de sódio

TM = domínio transmembrana

RESUMO

Introdução: O receptor sensor de cálcio (CASR) pertence à família dos receptores que acoplam à proteína G e possui homologia com a subfamília dos receptores metabotrópicos do glutamato. Ele é importante no processo de homeostase do cálcio, e quando a concentração de cálcio se eleva, ele inibe a secreção de paratormônio pelas paratireóides e a reabsorção renal de cálcio. O receptor sensor de cálcio possui 1078 aminoácidos, com 612 aminoácidos no domínio extracelular (ECD), 250 aminoácidos em sete regiões transmembrana (TM) conectadas com 3 alças extracelulares e intracelulares e uma longa cauda intracitoplasmática com 216 aminoácidos. A região transmembrana tem um papel fundamental na ativação do receptor e análise da distribuição das mutações ativadoras demonstra que a sua porção distal (TM 5, 6, 7 e alça extracelular 3) é a mais crítica no processo de ativação do receptor. O estudo de receptores mutados auxilia a elucidar a importância da polaridade de determinados aminoácidos presentes na região transmembrana na expressão do CASR. A produção da proteína recombinante do domínio extracelular do CASR proporciona novas expectativas para uma análise estrutural desta região tão importante para a ligação com o agonista.

Objetivos: Os objetivos do presente estudo foram: 1- investigar o grau de expressão de receptores mutados na região transmembrana. 2- Produzir a proteína recombinante do domínio extracelular do CASR em sistema de *E. coli*.

Resultados e Conclusões: Nos resultados de análise da expressão, observamos que todos os receptores mutados e transfectados em células HEK 293 foram expressos, no entanto os receptores mutados nas posições F806C, A824S, A835D e A843T apresentaram diminuição na expressão quando comparados com o receptor nativo, sugerindo que a mutação de

aminoácidos hidrofóbicos para hidrofílicos na porção transmembrana pode diminuir o grau de expressão do CASR. Obtivemos alta produção da proteína recombinante correspondente ao domínio extracelular do CASR, entretanto não conseguimos quantidades suficientes de proteína solúvel, devido a formação de corpos de inclusões. Isto sugere que o sistema de *E. coli* não é eficiente para produzir proteínas com estruturas mais complexas como o domínio extracelular do receptor sensor de cálcio.

SUMMARY

Introduction: The calcium sensing receptor is a member of the G protein coupled receptor superfamily. It has homology to the family 3 of the metabotropic glutamate receptor family. It is important to the calcium homeostasis. When the extracellular calcium concentration increase, the CASR inhibits PTH secretion in the parathyroid cells and the calcium reabsorption in the kidney. The structure of the CASR consists of 1078 amino acids, and it is characterized by a large extracellular domain (ECD) with 612 amino acids residues, seven transmembrane domains (TMDs) with 250 amino acids and a large intracellular tail of 216 amino acids. The TM domain has fundamental importance in the receptor activation and analysis of the distribution of the activating mutations shows that its distal portion (TM 5, 6, 7 and extracellular third loop) is the most critical region for receptor activation. Mutagenesis studies of the calcium sensing receptor will help the elucidation of the relevance of the amino acids polarity in the transmembrane domain and the degree of its expression. The production of a recombinant protein of the extracellular domain of the calcium sensing receptor will provide new perspectives to the structural analysis of this portion of the receptor.

Objectives: The objectives of this thesis are: 1- To investigate the expression of the receptors with of mutations in the transmembrane domain. 2- To produce a recombinant protein of the extracellular domain of the receptor in an E. coli system.

Results and Conclusions: We demonstrated that all mutant receptors were expressed in HEK 293 cells, however the mutant receptors F806C, A824S, A835D and A843T showed reduced expression levels compared to the wild type. These results showed that substitution of an hydrophobic to an hydrophilic amino acids in the transmembrane domain of the calcium

sensing receptor can impair the receptor expression. We were able to produce the recombinant protein of the extracellular domain of the CASR, however, very few amount were soluble due to the formation of inclusion bodies. This suggests that the *E. coli* system is not suitable for the production of large scale protein of complex protein such as the extracellular portion of the CASR.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Receptor Sensor de Cálcio

O receptor sensor de cálcio (CASR) pertence à família 3 da superfamília dos receptores que acoplam a proteína G (GPCR) (BROWN et al., 1993). A família 3 dos GPCR, além do CASR, inclui os receptores metabotrópico do glutamato (NAKANISHI., 1992), os receptores para GABAB (KAUPMANN et., al., 1997), os receptores vômeros-nasais (ferormônios) (HERRADA et al., 1997), os receptores gustativos (HOON et al., 1999) e três receptores órfãos (BRÄUNER-OSBORNE et al., 2000). Estes receptores apresentam características comuns na interação com seus agonistas e alta homologia na região transmembrana.

O DNA_c do CASR foi clonado inicialmente em células de paratireóides bovina (BROWN et al., 1993) e posteriormente detectado em vários tecidos como paratireóide, tireóide, rim, cérebro, ossos, pele, pâncreas, pulmão e coração. Este receptor é expresso em maior concentração na paratireóide, tireóide, rim e cérebro (BROWN et al., 1995; RUAT et al., 1995). O receptor sensor de cálcio desempenha um papel essencial na regulação da homeostase de cálcio, e é capaz de perceber pequenas alterações nas concentrações de cálcio extracelular. Quando a concentração de cálcio se eleva, ele inibe a secreção de paratormônio (PTH) pelas paratireóides e a reabsorção renal de cálcio (CHATTOPADHYAY et al., 1996).

O gene do receptor sensor cálcio está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q13.3-21) (JANICIC et al., 1995). A região codificadora da proteína está contida em seis exons (exon 2-7) sendo que exon 2 codifica a região 5' não traduzida, a sequência de sinal peptídico e a porção amino terminal do receptor. O restante do domínio extracelular do

receptor é codificada pelos exons 3, 4, 5, 6 e início do exon 7. A região transmembrana do receptor e todo o domínio intracelular são codificados pelo exon 7 (POLLAK et al., 1993).

Estruturalmente CASR é composto por 1078 aminoácidos, sendo que os primeiros 612 aminoácidos compõem um longo domínio hidrofílico extracelular, 250 aminoácidos constituem 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados com 3 alças extracelulares e intracelulares e 216 aminoácidos formam uma longa cauda intracitoplasmática (Figura 1).

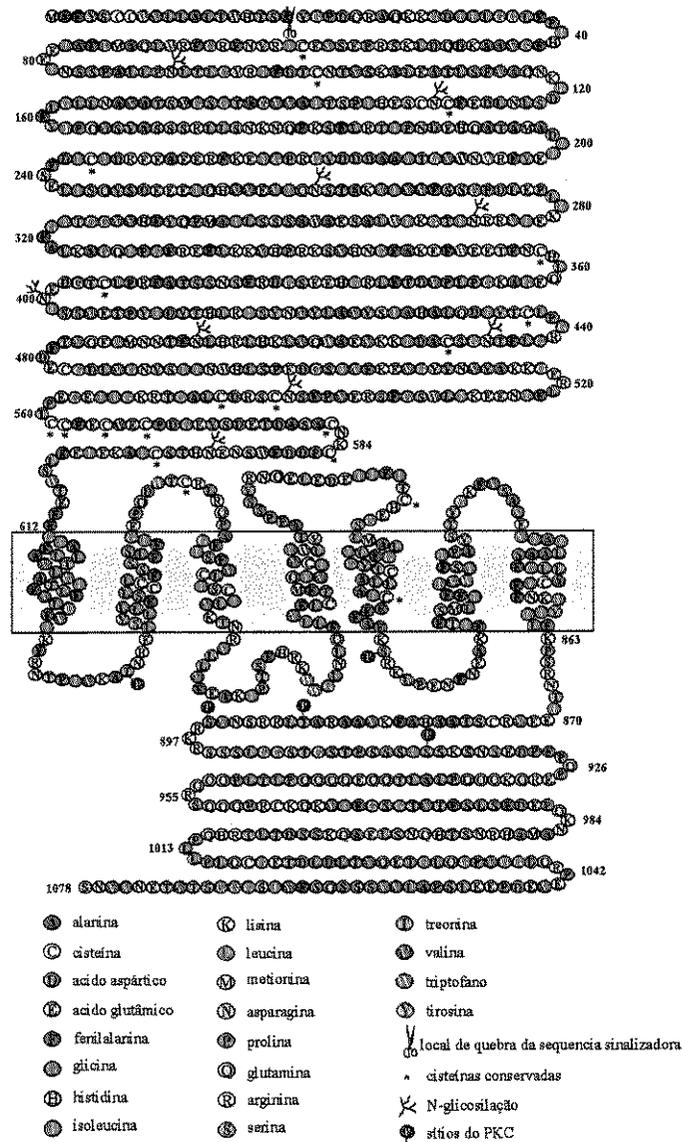


Figura 1. Topologia do receptor sensor de cálcio.

Sinalização do receptor do cálcio

Os componentes da família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) apresentam similaridade não somente na disposição estrutural, mas também na sua relação funcional com as proteínas G. A via de sinalização dos GPCRs se desenvolve pela capacidade de recrutar e regular a atividade intracelular das proteínas heterotriméricas G, controlando a ativação e a desativação de uma série de proteínas G triméricas ($G\alpha\beta\gamma$) através da estimulação da troca de GDP por GTP na subunidade α (HAMM, 1998). Após a dissociação do trímero, $G\alpha$ ou $G\beta\gamma$ interagem com efetores do receptor.

No CASR, a principal proteína envolvida é a $G\alpha_q$, que ativa a produção de fosfolipase C (PLC) (DARE et al., 1998). Isto resulta na produção de inositol trisfosfato (IP3), com conseqüente liberação de cálcio armazenado em bolsões intracelulares, e formação de diacilglicerol, que causa a ativação da proteína C quinase (PKC). O aumento de cálcio intracelular contribui para a inibição de secreção de paratormônio através de mecanismos ainda não compreendidos totalmente.

Doenças relacionadas a mutações no receptor sensor de cálcio

O entendimento das bases moleculares das doenças genéticas tem significativa relevância na compreensão dos estados fisiológicos normais. Mutações no gene do receptor sensor de cálcio demonstram sua importância na regulação do ajuste da concentração de cálcio extracelular. Mutações inativadoras, isto é que resultam em perda de função do receptor causam a hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) e o hiperparatireoidismo neonatal grave (NSHPT) quando presente em estados heterozigótico e homozigótico, respectivamente

(POLLAK et al., 1993). Em contraste, as mutações que ativam o receptor levam a hipocalcemia autossômica dominante (ADH) (POLLAK et al., 1994).

Mais de cem mutações já foram descritas neste gene (HENDY et al., 2000), sendo a maioria inativadoras do receptor. Mutações ativadoras do CASR estão agrupadas em duas regiões distintas do receptor: uma seqüência de 35 aminoácidos na região extracelular (35%) e nas regiões transmembrana 5, 6, 7 e terceira alças extracelular (35%).

Modelo de ativação do CASR induzido pelo agonista

Para melhor definir o modelo de ativação do CASR ele será dividido em três fases: ligação do receptor com o agonista para geração do sinal, transmissão do sinal para a região transmembrana e transferência do sinal para a região intracelular (JI et al., 1998).

O domínio extracelular do CASR possui regiões homólogas com o receptor do glutamato (mGluRs) e com as proteínas bacterianas periplasmáticas que se ligam a aminoácidos, sugerindo que o CASR tenha evoluído a partir de uma família antiga de proteínas que se ligam a solutos extracelulares (Figura2) (Conklin et al., 1994).

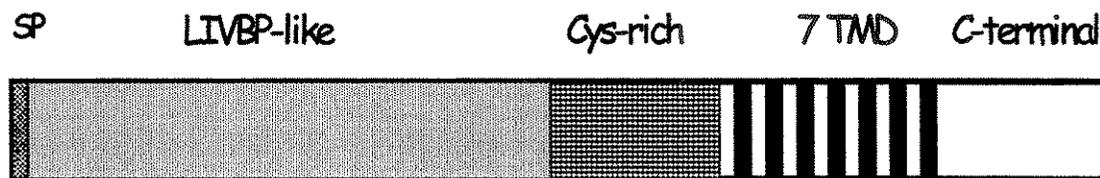


Figura 2. Domínios presentes nos vários membros da subfamília do receptor glutamato metabotrópico. O domínio extracelular possui uma região homóloga à proteína bacteriana que se liga a leucina, isoleucina e valina (LIVBP) seguido de uma região rica em cisteínas. Os sete domínios transmembranas (7TMD) também possuem alta homologia, enquanto que o domínio intracelular (C-terminal) é a região com maior diversidade.

A estrutura cristalográfica tridimensional da proteína periplasmática ligadora de Leucina/Isoleucina/Valina (LIVBP) foi determinada em 1989 (SACK et al., 1989) e revelou a presença de dois lobos distintos ligados por três segmentos curtos de peptídeos correspondentes à conformação bilobada semelhante à da planta carnívora "Vênus flytrap".

O modelo de interação entre o receptor e o agonista proposto para a subfamília dos receptores do glutamato é o do "Vênus flytrap" (O' HARA et al., 1993), baseado na estrutura cristalográfica tridimensional da proteína periplasmática ligadora de Leucina/Isoleucina/Valina (LIVBP) (SACK et al., 1989). Neste modelo, o agonista interage com resíduos de uma região do domínio extracelular do receptor com baixa afinidade (também denominada conformação aberta), e interage com uma segunda região com alta afinidade estabilizando uma conformação fechada (SACK et al., 1989). Isto é seguido de uma interação com o domínio transmembrana para a geração de sinal (O' HARA et al., 1993). O modelo sugerido de interação do agonista com CASR é baseado no modelo proposto aos receptores do glutamato, no entanto ainda não está elucidado.

Outros estudos sugerem que os receptores que acoplam à proteína G encontram-se em um estado inativo devido às amarras repressoras que limitam a sua mobilidade e previnem que o receptor assuma uma conformação relaxada ativada. Quando ativado, o receptor libera estas amarras resultando em exposição de seqüências importantes para a interação com a proteína G (GETHER et al., 1998). Os locais de constrangimentos no receptor podem estar localizados em qualquer domínio do receptor. Em concordância com esta teoria, um estudo publicado recentemente relata que uma deleção extensa na região da cauda citoplasmática do receptor sensor de cálcio resulta em ganho de função do receptor em uma família com hipocalcemia autossômica dominante (LIENHARDT et al., 2000).

Importância do domínio extracelular do CASR

O domínio extracelular do CASR possui papel fundamental na ativação do receptor e é composto por: uma seqüência de sinal peptídeo, onze sítios de N-glicosilação, uma região com alta concentração de aminoácidos hidrofóbicos (28 aminoácidos), regiões ricas em aminoácidos ácidos (Glutamato e Aspartato), dezenove resíduos de cisteína (potenciais formações de pontes dissulfídicas).

Outra característica importante do domínio extracelular é a formação das formas diméricas do CASR. Em estudo de detecção do CASR na superfície celular de células HEK 293, foi observado que este receptor apresenta-se em sua forma dimérica, estrutura formada a partir de pontes de dissulfeto entre as cisteínas localizadas no domínio extracelular do CASR, estes dímeros são de grande relevância para ativação do CASR (BAI et al., 1998).

Mais da metade das mutações descritas no CASR estão localizadas no ECD; e afetam a afinidade do receptor pelo Ca_o^{2+} , possivelmente por alterar os resíduos de aminoácidos específico para a ligação com o agonista Ca_o^{2+} (BAI, 2004). O que sugere que esta região do receptor é fundamental para a ligação com o Ca_o^{2+} com o CASR, no entanto a estrutura cristalográfica desta porção ainda não foi determinada, e estes estudos estruturais são de fundamental importância para a caracterização dos possíveis domínios de ligação do agonista com o receptor, bem como para o desenvolvimento de novas drogas que possam agir diretamente em sítios específicos desta proteína.

Papel da região transmembrana na ativação do receptor

A região transmembrana é de fundamental importância na ativação do receptor sensor de cálcio. A distribuição das mutações ativadoras indica que a porção distal da região

transmembrana (TM 5, 6, 7 e terceira alça extracelular) é a mais crítica no processo de ativação do receptor, entretanto, o mecanismo pelo qual o sinal de ativação é transmitido entre o domínio extracelular e domínio transmembrana ainda não está esclarecido.

Experimentos onde o receptor nativo é estimulado com cálcio demonstra que mais de um íon (provavelmente 3) interage com o receptor (Hill coeficiente de 3), sugerindo mais de um sítio de ligação agonista-receptor (BAI et al., 1996) e um dos potenciais sítios de interação no receptor sensor de cálcio é a terceira alça extracelular na região transmembrana..

A maioria das mutações ativadoras encontradas na região transmembrana é dependente do agonista, isto é, na ausência de cálcio o receptor se encontra em um estado inativo. Isto sugere que o domínio transmembrana pode ser sítio de interação com o cálcio, bem como estar envolvido em uma fase mais tardia de ativação do que o domínio extracelular, porém ainda relacionado e dependente do agonista cálcio. Algumas destas mutações podem estar em regiões envolvidas na mudança conformacional do receptor quando ativado. Espectroscopia de fluorescência do receptor que acopla à proteína G β 2 adrenérgico, mostra que a ativação desta classe de receptores resulta em mudança conformacional do receptor com movimento dos diferentes domínios transmembrana (GETHER et al., 1997).

Atualmente, não se sabe se este movimento da região transmembrana para uma posição ativada é o resultado de um único sinal de ativação envolvendo o domínio extracelular e posteriormente transmitido para o domínio transmembrana, ou se a ativação do receptor ocorre sequencialmente, com a ativação da porção extracelular seguido de mudança de conformação e interação direta com contato entre regiões do domínio transmembrana e extracelular resultando em uma segunda mudança conformacional.

Com base nestas considerações, no presente trabalho foram investigadas posições do domínio transmembrana com mutações ativadoras descritas em pacientes com ADH, (posições 773, 788, 806, 835, 824, 843 e deleção da terceira alça extracelular do domínio transmembrana). Realizamos a substituição de aminoácidos hidrofóbicos para aminoácidos hidrofílicos com diferentes cargas, e avaliamos o grau de expressão dos receptores em células embrionárias renais (HEK 293).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. O objetivo deste trabalho foi investigar o grau de expressão de receptores mutados na região transmembrana 5, 6, 7 e deleção da terceira alça extracelular, transfectados em célula renal embrionária humana (HEK 293).
2. Avaliar a expressão basal da Fosfolipase C, Proteína quinase C e ERKs em células HEK 293 transfectadas com CASR mutados.
3. Produzir proteína recombinante da porção extracelular do receptor sensor de cálcio em larga escala em sistema de *E. coli*, visando um futuro estudo cristalográfico.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção do vetor de expressão do CASR

O cDNA *CASR* nativo (GenBank X81086) foi gentilmente doado por Dr. Geoffrey N. Hendy (Mcgill University), contendo os sítios de restrição enzimática para *Hind* III (Promega) e *Xba* I (Promega) na região 5' dos respectivos primers. O *CASR* foi inserido em pcDNA3.1 (vetor específico para transfecção em células de mamíferos) e a presença do receptor no vetor foi avaliada a partir da digestão com *Hind* III e *Xba*I (1 μ L de DNA, 1 μ L de cada enzima, 1 μ L de tampão Promega) por 1 hora a 37°C. O cDNA do receptor sensor de cálcio nativo inserido no vetor pcDNA3.1 serviu como molde para as reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) da mutagênese dirigida.

Preparação de Bactérias Competentes

Para a preparação de células competentes, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α utilizada nas transformações foi inoculada em 5 mL de LB (Luria-Bertani MédiuM-Triptona 10g, Extrato de Levedura 5g, NaCl 10g, pH 7,0) sem antibiótico, deixada crescer por 12 horas, a 37° C, sob agitação de 250 rpm em agitador orbital. Cento e cinquenta microlitros desta cultura foram inoculados em um volume de 15 mL de LB sem antibiótico. A solução foi mantida sob as mesmas condições de agitação e temperatura descritas acima, até atingirem o OD_{660nm} de 0.6. Posteriormente, as bactérias foram colocadas no gelo por 1 minuto e centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de bactérias foi ressuscitado em 5 mL de solução de cloreto de cálcio 0.1 M estéril a 4°C e incubado no gelo por 40 minutos. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 1000x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de bactérias foi

ressuspendido em 1 mL de TBF2 (Mops 0.01M pH 7.0, CaCl₂ 0.075M, KCl 0.01M, glicerol 15%), e armazenadas a -70°C em alíquotas até o momento da transformação.

Transformação de bactérias por choque térmico

Para a transformação, a alíquota de células competentes foi descongelada no gelo por 2 minutos e foram adicionados 2 µL de DNA plasmidial purificado. Após incubação de 10 minutos, em gelo, foi aplicado um choque térmico de 42°C por 45 segundos, o que permite a abertura dos poros na membrana da bactéria e introduz o DNA no citoplasma. As células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação de 250 rpm em 250 µL de meio SOC (Tryptona 0.2g, extrato de levedura 0.05g, NaCl 0.006g, KCl 0.002g, MgCl₂ 0.02g, MgSO₄ 0.024g e glicose estéril 20mM), e posteriormente a cultura de bactéria foi espalhada em placas de ágar contendo meio de cultura LB contendo antibiótico específico de cada vetor de clonagem, e incubada a 37°C por 16 h.

Extração de plasmídios pelo método de lise alcalina (Miniprep)

As colônias resultantes da transformação foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo antibiótico específico e incubadas por 14 a 16 horas a 37°C com agitação (250 rpm). O DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o protocolo de lise alcalina (Maniats et al, 1989). Para a extração, 1mL da cultura bacteriana foi centrifugada por 30 segundos a 12,000x g e o precipitado foi ressuspendido em 100 µL da solução I (Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8 e 1 µL de RNase 10mg/mL) a 4°C sob forte agitação. Após homogeneização total do precipitado, 200 µL de solução II (NaOH 0.2N, SDS 1%) recém preparada foi adicionada, a qual promove a lise da parede e da membrana bacteriana, e o tubo foi agitado levemente e incubado por 3 minutos no gelo. Para neutralizar a solução, foram

adicionados 150 μ L da solução III (Acetado de potássio 5M, ácido acético glacial e água estéril) e o tubo foi mantido no gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 12,000x g, formando um “pellet” que agrega membranas, parede bacteriana, proteínas, DNA genômico bacteriano e outras impurezas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado fenol:clorofórmio(1:1) e centrifugado a 12,000x g por 5 minutos. A fração incolor contendo DNA foi transferida e precipitada com dois volumes de etanol 100% e incubada por 15 minutos a -20°C . Após esse período a solução foi centrifugada por 5 minutos a 12,000x g e o sobrenadante foi removido. O precipitado contendo DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70%, e após sua secagem, foi ressuspenso em 50 μ L de TE (Tris 10mM, EDTA 20mM, pH 8) e mantido a -20°C até sua utilização. A presença do DNA de interesse foi confirmada por digestão e seqüenciamento.

Seqüenciamento

Para as reações de seqüenciamento foram utilizados 2 μ L (aproximadamente 10ng) do PCR purificado, 1 μ L de primer à 5pmol, 2 μ L de “save money”, 2 μ L de big dye (versão 2 Applied Biosystem) para um volume final de 10 μ L. O ciclo realizado utilizando o termociclador Mastercycler Eppendorf consiste em: um passo de pré-desnaturação do DNA molde à 96°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de incorporação do big dye que consiste em: desnaturação do DNA molde à 96°C , anelamento do primer à 56°C e uma extensão à 60°C por 4 minutos. Ao produto da reação são adicionados 80 μ L de etanol 100%, repousa 15 minutos temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação à 14.000rpm por 20 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet é lavado com 150 μ L de etanol 70% e centrifugado 14.000rpm por 10 minutos. Descarta sobrenadante e deixa secar o pellet à temperatura

ambiente por 1 hora. As amostras são encaminhadas ao Hemocentro da Unicamp, utilizando o seqüenciador de DNA ABIPrism 377.

Criação de mutações

Mutagênese dirigida foi realizada usando o “kit” “Quick Change Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene, La Jolla, CA). Para cada mutação foi utilizado um par de “primers” que anelam à mesma seqüência, porém em direções opostas. Os “primers” foram desenhados para anelar especificamente com o cDNA *CASR* nativo e os 12 ciclos de extensão foram realizados utilizando a *Pfu* Turbo DNA polimerase, seguida de digestão do cDNA *CASR* nativo com a enzima DpnI. Foram inseridas mutações nas diferentes bases do códon de interesse criando receptores contendo aminoácidos de diferentes polaridades nesta posição. Após a mutagênese, o cDNA mutado foi usado para transformação de *E. coli* (XLI-Blue) que pode incorporar pedaços de DNA e repará-los, seguido de incubação em placas de ágar com meio de cultura LB e 100 µg/µL de ampicilina a 37°C por 16 h.

As colônias positivas foram cultivadas em minipreparações e o DNA extraído pelo método de lise alcalina como descrito anteriormente e previamente ao seqüenciamento a região da mutação foi amplificada (PCR) com os seguintes oligonucleotídios localizados no exon 7 do *CASR*: primer sense das posições 2245 a 2269 e antisense das posições 2722 a 2701.

Os reagentes nas concentrações finais: tampão de PCR (Tris 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM) dNTPs (200 µM cada), oligonucleotídeos (100ng de cada) e 1 U de *Thermus aquaticus* (Taq Promega) polimerase, 10 ng de DNA do *CASR* mutado e água q.s.p para 50 µL. A condição de anelamento do oligonucleotídeos foi de 55° C. A reação foi realizada em 30 ciclos.

Os produtos obtidos do PCR foram observados em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo, após a eletroforese, a imagem foi registrada em Polaroid.

A presença da mutação pontual no cDNA foi confirmada através de seqüenciamento direto. Larga escala de cDNA mutados foram então preparados (HiSpeed Plasmid Midi Kit[®] - Qiagen) para transfecção transitória em células renais embrionárias humanas (HEK-293).

Os seguintes “primers” (sense e antisense) foram utilizados para a mutagênese dirigida. As bases sublinhadas indicam o códon que foi inserido a mutação.

Posição: L773Q (Leucina aa hidrofóbico – Glutamina aa hidrofílico)

Primer 773F: 5' GAT CAG GAA GOC CAG GGC CAT GAG GGA G 3'

Primer 773R: 5' C TCC CTC ATG GOC CTG GGC TTC CTG ATC 3'

Posição: F788S (Fenilalanina aa hidrofóbico – Serina aa hidrofílico)

Primer 788F: 5' CTG GCT GCC ATC TGC TCC TTC TTT GCC TTC AAG 3'

Primer 788R: 5' CTT GAA GGC AAA GAA GGA GCA GAT GGC AGC CAG 3'

Posição: F806C (Fenilalanina aa hidrofóbico– Cisteína aa hidrofílico)

Primer 806F: 5' TTC AAT GAA GCC AAG TGC ATC ACC TTC AGC ATG 3'

Primer 806R: 5' CAT GCT GAA GGT GAT GCA CTT GGC TTC ATT GAA 3'

Posição: A824S (Alanina aa hidrofóbico – Serina aa hidrofílico)

Primer 824F: 5' ATC TOC TTC ATT CCA TCC TAT GOC AGC ACC 3'

Primer 824R: 5' GGT GCT GGC ATA GGA TGG AAT GAA GGA 3'

Posição: A835D (Alanina aa hidrofóbico – Ácido Aspártico aa hidrofílico)

Primer: 835F: 5' GGC AAG TTT GTC TCT GAC GTA GAG GTG ATT GCC 3'

Primer: 835R 5' GGC AAT CAC CTC TAC GTC AGA GAC AAA CTT GCC 3'

Posição: A843T (Alanina aa hidrofóbico– Treonina aa hidrofílico)

Primer: 843F: 5' GTG ATT GCC ATC CTG ACA GCC AGC TTT GGC TTG 3'

Primer: 843R: 5'CAA GCC AAA GCT GGC TGT CAG GAT GGC AAT CAC 3'

Deleção da terceira alça extracelular (827-838)

Primer F: 5' CCA GCC TAT GCC AGC - GTG ATT GCC ATC CTG3'

Primer R: 5' CAG GAT GGC AAT CAC - GCT GGC ATA GGC TGG3'

Cultura de células e transfecção transitória

Os estudos de transfecções transitórias dos cDNAs com as mutações foram realizados em células embrionárias renais humanas, linhagem que não expressa o receptor sensor de cálcio (HEK-293, American Type Culture Collection - RL-573). As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-1,8 mM de cálcio e 4,5 g/L de D-Glucose; Invitrogen) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina (meio completo). Para a transfecção, as células foram utilizadas a uma confluência de 80% em frascos de 60 mm. O meio de cultura foi aspirado e as mesmas foram lavadas com DMEM sem soro e antibiótico. Para a formação do complexo DNA-Polyfect® ,

4 µg de DNA e 40 µL de Polyfect® Transfection Reagent (Qiagen) em 150 µL de meio DMEM sem soro foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Para cada tubo contendo o complexo, 1 mL de meio DMEM completo foi adicionado e esta solução foi imediatamente transferida para os frascos de células contendo 3 mL de meio DMEM completo. As células foram incubadas por 48 horas a 37°C e 5% CO₂ e, após esse período, foram utilizadas para a extração das proteínas.

Preparação de extrato de proteínas celulares

Para a preparação de extrato total de proteínas celulares, as células foram lavadas com solução de PBS (tampão fosfato-salina) a 4°C e solubilizadas usando um tampão de lise celular (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 1mM, Aprotinina 5 µg/µL, Pepstatina 5 µg/µL, PMSF 25 µg/µL, NaCl 150 mM, NaN₃ 0,02%, SDS 1%, 1% NP40, 0,5% Sodium Desoxycholate) e incubadas por 5 minutos. Após homogeneização e centrifugação a 12,000x g por 2 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até o uso. A concentração de proteína celular foi determinada através do método de Bradford. As amostras foram preparadas em uma concentração de 40µg de proteínas com tampão SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, Bromophenol blue 0,2%, glicerol 20% e β-mercaptoetanol 5%), aquecidas por 5 minutos a 95° C e posteriormente utilizadas na eletroforese SDS-PAGE.

Western Blot

Os extratos de proteína celular (40µg) foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE de poliacrilamida (8%). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas e imobilizadas em membrana PVDF. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado através da incubação em PBS-Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite desnatado por 24 hora 4°C.

As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: Policlonal Anti-CASR humano, epítipo nas posições dos aminoácidos 215 a 235 da porção N-terminal do CASR, gentilmente doado por Dr. Geoffrey N. Hendy em uma diluição 1/250, Policlonal Anti-Fosfolipase C, diluição 1/750 (Santa Cruz), Policlonal Anti-PKC, diluição 1/1000 (Santa Cruz) e Policlonal Anti-ERK 1/2, diluição 1/1000 (Santa Cruz).

A incubação com os anticorpos primários foi realizada em PBS-T e 5% de leite desnatado, sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. Após 4 lavagens em PBS-T, de 10 minutos cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado anti-coelho conjugado à peroxidase do rábano silvestre (Jackson Immunoresearch, diluído 1/5000) sob agitação por 2 hora, em PBS-T e 5% de leite desnatado. Para detecção das proteínas, foi utilizado o “kit” de quimiluminescência ECL (Amersham Biosciences) e filme autoradiográfico.

Amplificação da região extracelular do CASR para produção da proteína recombinante

O domínio extracelular do receptor sensor de cálcio (ECD) foi amplificado através de PCR, utilizando oligonucleotídeos posicionados logo após a seqüência de sinal peptídeo no exon 2 na posição 56 a 76 (sense) com um sítio de restrição enzimática para Nde I (Fermentas) e um códon ATG inicial na sua porção 5' e o primer reverso localizado entre os pares de base 1833 e 1810 no exon 7 com um sítio de enzima de restrição Xho I (Promega) e um códon terminal TAA na sua região 5'.

Primer sense:

5' CAT ATG TAC GGG CCA CAG CAG CGA GCC 3'

Primer antisense:

5' CTC GAG TTA GGG CTC CGT OCA CGA CGA CAG CAG AAA CTC 3'

O cDNA do receptor sensor de cálcio nativo inserido no vetor pcDNA3.1 foi usado como molde para a reação de PCR (Reação da polimerização em cadeia). A amplificação consistiu dos seguintes reagentes nas concentrações finais: tampão de PCR (Tris 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM) dNTPs (200 μ M cada), oligonucleotídeos (100ng de cada) e 1 U de *Thermus aquaticus* (Taq Promega) polimerase, 10 ng de DNA do CASR nativo e água q.s.p para 50 μ L. A condição de anelamento do oligonucleotídeos foi de 60° C. E a reação foi realizada em 35 ciclos.

O cDNA amplificado foi clonado no vetor pCR[®]-Blunt II-Topo (Invitrogen) e usado para transformação de *E. coli*, cepa DH5 α , seguido de incubação em placas de ágar e meio de cultura LB (Luria-Bertani Medium) a 37°C por 18 h. As colônias foram cultivadas em minipreparações e a presença da inserção correta no DNA extraído foi realizada através da digestão com enzimas de restrição (NdeI e XhoI), a reação foi deixada por 2 horas a 37°C.

Construção do Vetor de Expressão do ECD

Para a expressão protéica, foi utilizado o vetor pET-28a (Novagen) (Figura 3). Ele possui as seguintes características: 5.369 pares de base, com um gene que confere resistência ao antibiótico Kanamicina, e a expressão protéica é controlada pelo promotor T7. Além disso, possui uma etiqueta com uma seqüência que codifica seis histidinas (His.tag) nas regiões N-terminal da proteína recombinante, o que facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade empregando-se resinas contendo níquel ou cobalto (NILSSON et al., 1997).

Para a construção do vetor de expressão, o pET-28a foi digerido com as enzimas de restrições Nde I e Xho I por 2h a 37°C seguido de defosforilação com CIP (fosfatase intestinal bovina) por 1h a 37°C, para evitar o fechamento do vetor sem estar ligado com o inserto. Após inativação das enzimas a 80°C por 20 minutos, o vetor foi purificado do gel após ser submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo utilizando o “kit” QIAEX® (Qiagen). O DNA plasmidial purificado foi utilizado para a ligação com o inserto.

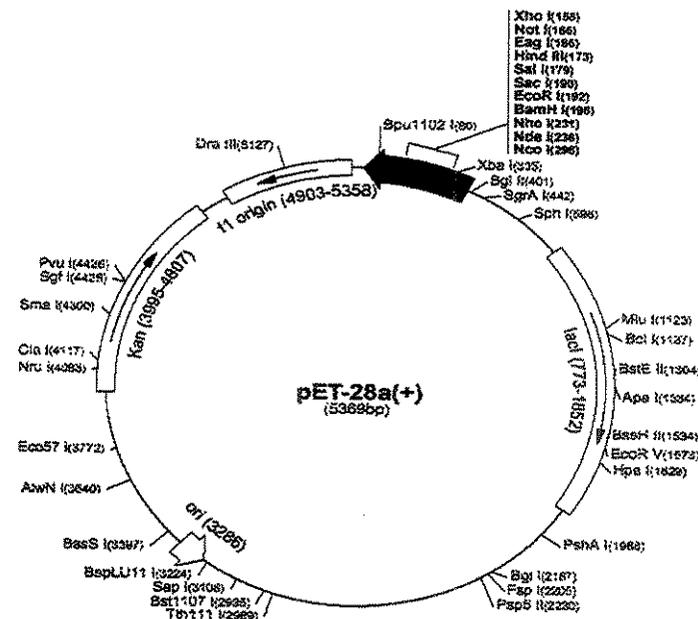


Figura 3. Mapa do vetor de expressão pET-28a. O sistema pET (Novagen) é um dos mais usados para expressão de proteínas em *E. coli*. Os genes alvos são clonados sob fortes sinais de transcrição e tradução do bacteriófago T7. O vetor possui caudas C e N-terminais de trombina, T7 e His, o que facilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. As enzimas de restrição que cortam o vetor apenas uma vez e suas respectivas posições estão indicadas no mapa.

Ligação do inserto ECD no vetor de expressão pET-28a

Após a confirmação da presença da seqüência correta do inserto por seqüenciamento, o inserto foi retirado do vetor de clonagem pCR®-Blunt II-Topo através da digestão com as enzimas de restrição Nde I e Xho I, por 2h a 37°C, seguido de inativação das enzimas por 20

minutos a 65°C. A reação de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. O fragmento contendo o inserto foi retirado do gel e purificado através do “kit” QIAEX® (Qiagen).

A ligação entre o fragmento e o vetor foi realizada nas proporções de 3 para 1 respectivamente. A reação foi realizada com 3µL de inserto, 1µL de vetor, ambos digeridos com as enzimas de restrição Nde I e Xho I, 1µL do tampão da T4 Ligase (New England), 1µL da enzima T4 Ligase (New England) e água Milli-Q qsp para 10µL. Após incubação da ligação por 12 horas em banho-maria a 16°C, 2µL da ligação foram usados para transformação em *E. coli* cepa DH5α (cepa ideal para clonagem), seguida de incubação em placas de ágar e meio de cultura LB, contendo o antibiótico kanamicina (50 µg/mL), a 37°C por 18 h. As colônias positivas foram cultivadas em minipreparações, o cDNA foi extraído e a presença da inserção correta foi investigada através de digestão com enzimas de restrição (Nde I e Xho I).

Para expressão da proteína, o plasmídeo contendo o inserto correto foi transformado em *E. coli* cepa BL21 (DE3)/ BL21 (pLysS). Estas linhagens de *E. coli* são deficientes em proteases evitando degradação da proteína heteróloga. Além disso, elas expressam o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do repressor *lacI*. Na presença de IPTG (lactose ou outro análogo) este se liga ao repressor *lac* permitindo que o promotor T7 induza a transcrição do gene e sob o seu controle inicie a expressão da proteína heteróloga em grande quantidade.

As colônias positivas da clonagem em cepas de BL21 foram cultivadas em minipreparações, o DNA foi extraído e a presença da inserção correta foi investigada através de digestão com enzimas de restrição por 2 horas a 37° C (Nde I e XhoI).

Expressão da Proteína e Teste de Solubilidade

As colônias positivas das bactérias BL21 (DE3 e pLysS) foram utilizadas para a produção da proteína recombinante incubando em 5 mL de LB (pré-inóculo) ou YT (YT *médium* Triptona 16 g, Extrato de levedura 10 g e NaCl 5 g) contendo 5 μ L de kanamicina (50 μ g/ml) por 16 horas a 37° C sob agitação constante de 250 rpm.

Para os testes de expressão e solubilidade foi inoculado 1 mL de pré-inóculo em 100 mL de LB, contendo o antibiótico kanamicina (50 μ g/ml), sob agitação constante de 250 rpm, a 37° C e 22° C, até atingir a densidade óptica ideal (O.D.600=0,6). Nesta fase uma alíquota de 500 μ L foi retirada e centrifugada a 12,000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuscitado em 40 μ L de água milli Q estéril, em seguida foram adicionados 20 μ L de tampão de amostra SDS-PAGE 2x. (contendo 5% de β -mercaptoetanol). Posteriormente, a amostra foi incubada a 95° C por 5 minutos e armazenada a -70° C até o momento do uso (amostra NÃO INDUZIDA).

Após a coleta da amostra não induzida, foram adicionados a cultura bacteriana IPTG a uma concentração final de 0.4 mM. As alíquotas subseqüentes foram coletadas após 1, 2, 3, 6 e 24 horas de indução (amostras INDUZIDAS), e preparadas conforme descrito acima.

Após a retirada da última amostra da indução (6 horas), foi realizado o teste de solubilidade, a cultura bacteriana foi coletada por centrifugação a 5,000x g por 5 minutos, a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 5 mL TS-10 (Tris 20mM pH 7.5, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, lisozima 1 mg/mL, PMSF 25 μ g/ μ L). A amostra foi sonicada por aproximadamente 8 pulsos de 30 segundos, com intervalos de entre os pulsos de 1 minuto em descanso em gelo, após a sonicção a amostra foi submetida a banho em

nitrogênio líquido por 1 minuto. Em seqüência, a amostra foi centrifugada a 10,000x g por 30 minutos a 4° C. Frações do sobrenadante (porção solúvel) e do “pellet” (porção insolúvel) contendo tampão SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, Bromophenol blue 0,2%, glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5%), foram incubadas a 95° C por 5 minutos e armazenada a -70° C até o momento da eletroforese em gel de poliacrilamida de 10%.

Teste da Resina

Para este teste foi adicionado 1 mL de resina carregada com níquel, Ni-NTA[®] (Qiagen) ao sobrenadante (50 mL) resultante do teste de solubilidade, a solução foi deixada em agitação com rotação vertical por 60 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 1000x g por 1 minuto a 4° C, uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante foi coletada (amostra TS-10, tampão de lise descrito acima), em seguida a resina foi ressuspensa em 500 μ L de TS-30 (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, Imidazol 30 mM) e centrifugada a 1000x g por 1 minuto a 4° C, o sobrenadante foi coletado, a resina foi ressuspensa em 500 μ L de TS-50 (Imidazol 50 mM), centrifugada como descrito anteriormente e o sobrenadante coletado, o mesmo foi realizado para o TS-100 (Imidazol 100 mM), TS-250 (Imidazol 250 mM) e TS-400 (Imidazol 400 mM).

Alíquotas de 20 μ L das amostras foram preparadas com 10 μ L SDS-PAGE 2x (contendo 5% de β -mercaptetanol) incubadas a 95° C por 5 minutos e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O restante das alíquotas foi armazenado a -70° C.

RESULTADOS

RESULTADOS

CASR nativo inserido em pcDNA 3.1

O CASR nativo foi inserido em pcDNA 3.1 (vetor específico para transfecção em células de mamíferos) e a construção foi analisada através de seu perfil de restrição (Hind III e Xba I) (figura 4). O vetor possui aproximadamente 5.4 Kb e o CASR 3.2 Kb. A ligação foi realizada de forma satisfatória e foi utilizada como molde para todas as mutagêneses dirigidas.

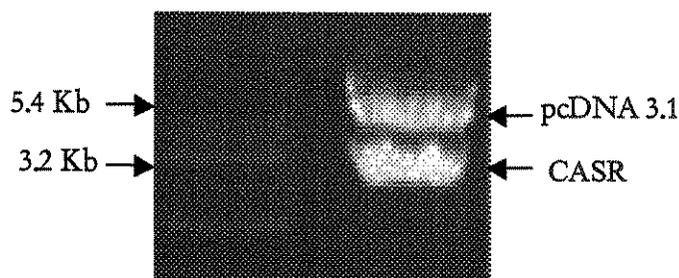


Figura 4. Digestão do vetor de clonagem pcDNA 3.1 contendo o CASR nativo, com as enzimas de restrição Hind III e Xba I. Reação submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,7 %, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 1kb(Fermentas).

Criação in vitro das mutações no CASR

Foram criadas sete mutações na porção transmembrana do receptor sensor de cálcio (CASR) em sítios com mutações ativadoras descritas em pacientes com Hipocalcemia Autossômica dominante (ADH). O objetivo da criação das mutações foi observar se a substituição de um aminoácido por outro aminoácido de outra polaridade resultaria em alteração na expressão do CASR. Todas as mutagêneses realizadas de forma esperada e confirmadas através de seqüenciamento.

As posições alteradas foram: 773 foi alterado de Leucina, um aminoácido hidrofóbico para Glutamina um aminoácido hidrofílico (Figura 5), 788 foi alterado um aminoácido

hidrofóbico Fenilalanina, para aminoácido hidrofílico (Serina) (Figura 6), 806 foi alterado de Fenilalanina, um aminoácido hidrofóbico para um aminoácido hidrofílico Cisteína (Figura 7), 824 foi alterado de Alanina, um aminoácido hidrofóbico para um aminoácido hidrofílico Serina (Figura 8), 835 foi alterado de Alanina, um aminoácido hidrofóbico para um aminoácido hidrofílico Ácido Aspártico (Figura 8), 843 foi alterado de Alanina, um aminoácido hidrofóbico para um aminoácido hidrofílico Treonina (Figura 9) e Deleção da terceira alça extracelular do domínio transmembrana (827-838) (Figura 10).

Mutação 773: L773Q (Leucina - Glutamina)

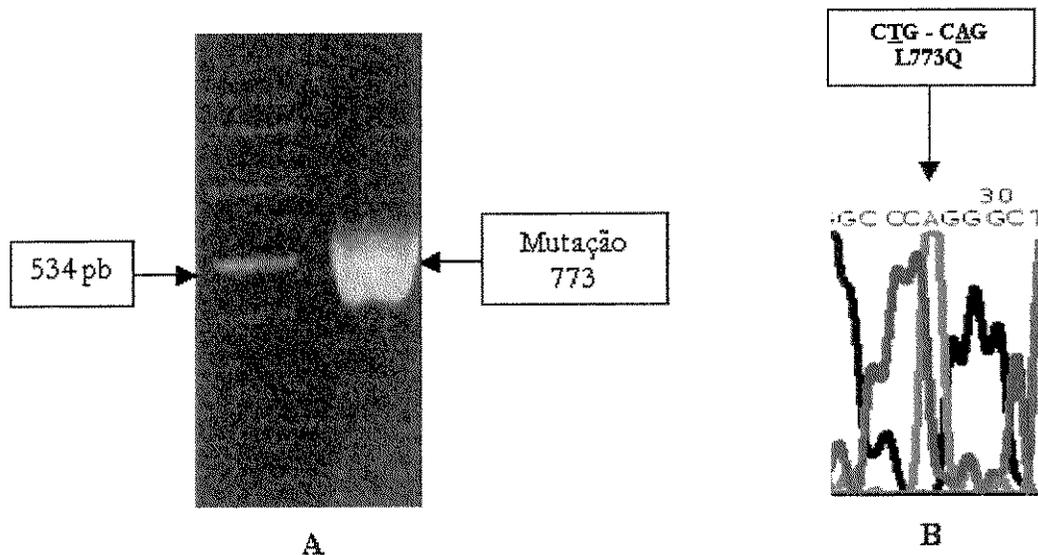


Figura 5. Confirmação da mutagênese do DNA do CASR com a mutação c.2319 L>A resultando na substituição de L773Q. **A**- Amplificação por PCR da região da mutação 773. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta Marcador 100pb (Fermentas). **B**- Sequenciamento direto da região da mutação.

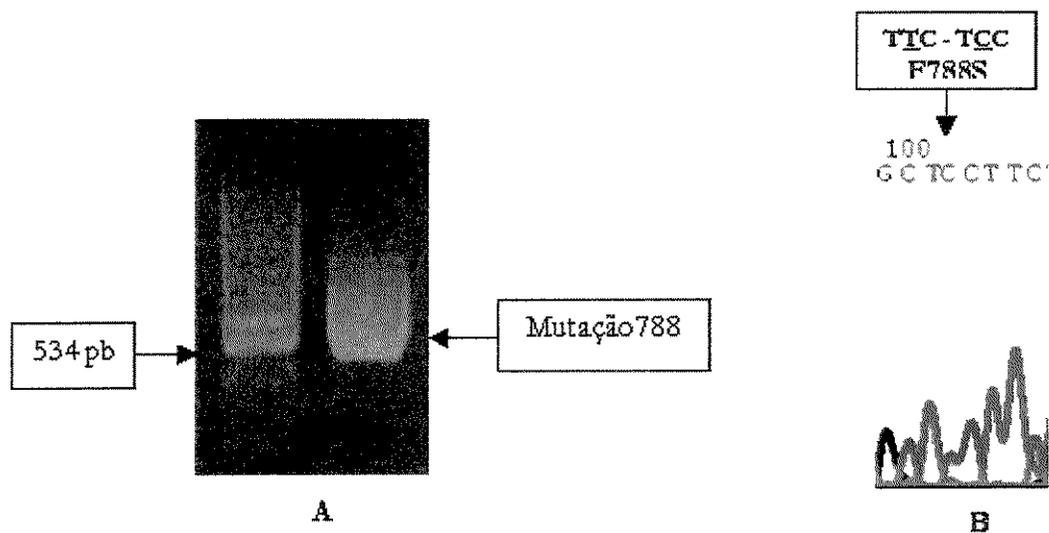
Mutação 788: F788S (Fenilalanina-Serina)

Figura 6. Confirmação da mutagênese do DNA do CASR com a mutação c.2364 F>S resultando na substituição de F788S **A** - Amplificação por PCR da região da mutação 788. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 100pb. **B** - Sequenciamento direto da região da mutação.

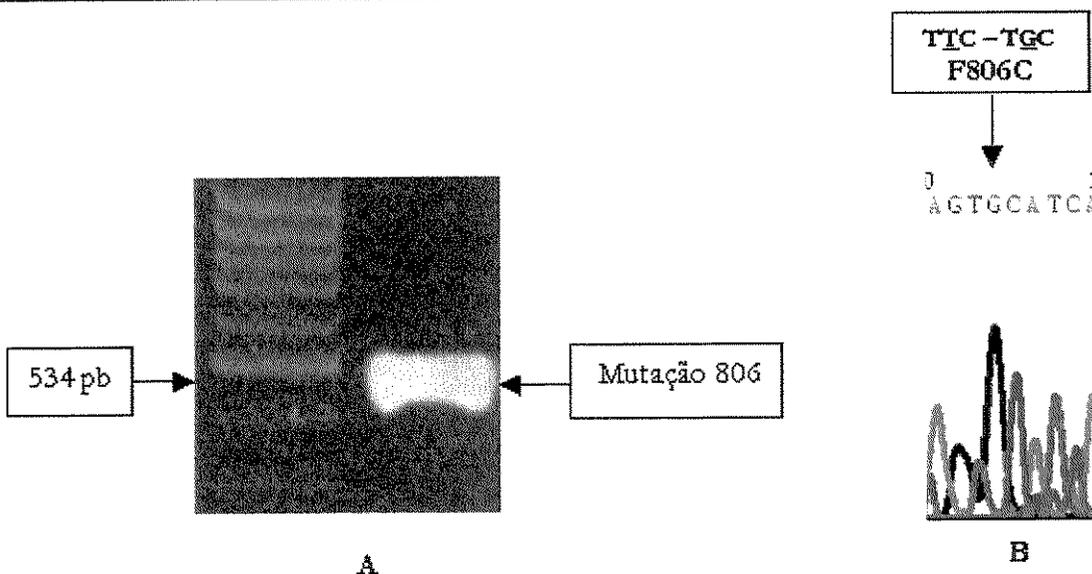
Mutação 806: F806C (Fenilalanina-Cisteína)

Figura 7. Confirmação da mutagênese do cDNA do CASR com a mutação c.2418 F>C resultando na substituição de F806C **A** - Amplificação por PCR da região da mutação 806. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 100pb. **B** - Sequenciamento direto da região da mutação.

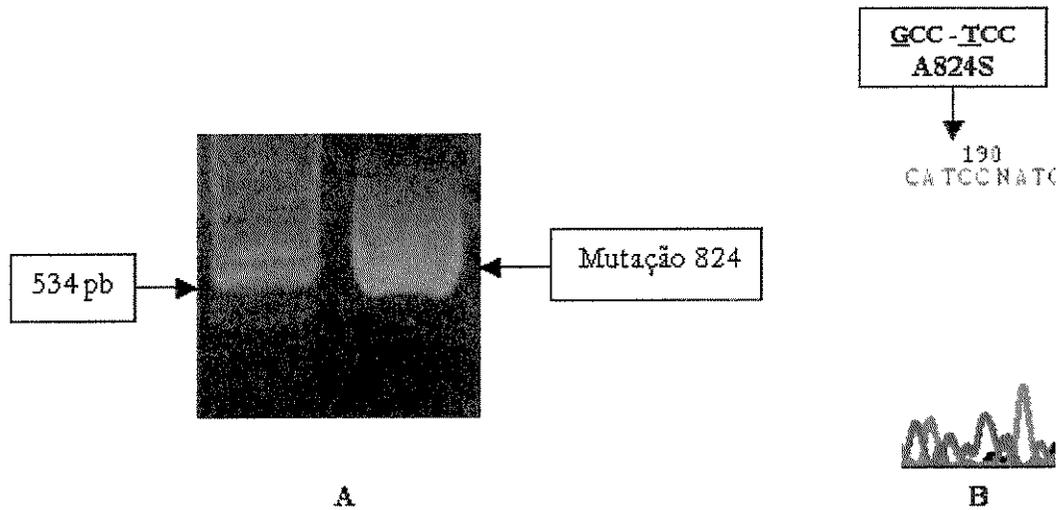
Mutação 824: A824S (Alanina-Serina)

Figura 8. Confirmação da mutagênese do DNA do CASR com a mutação c.2472 A>S resultando na substituição de A824S. **A** - Amplificação por PCR da região da mutação 824. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. (Marcador 100pb). **B** - Sequenciamento direto da região da mutação.

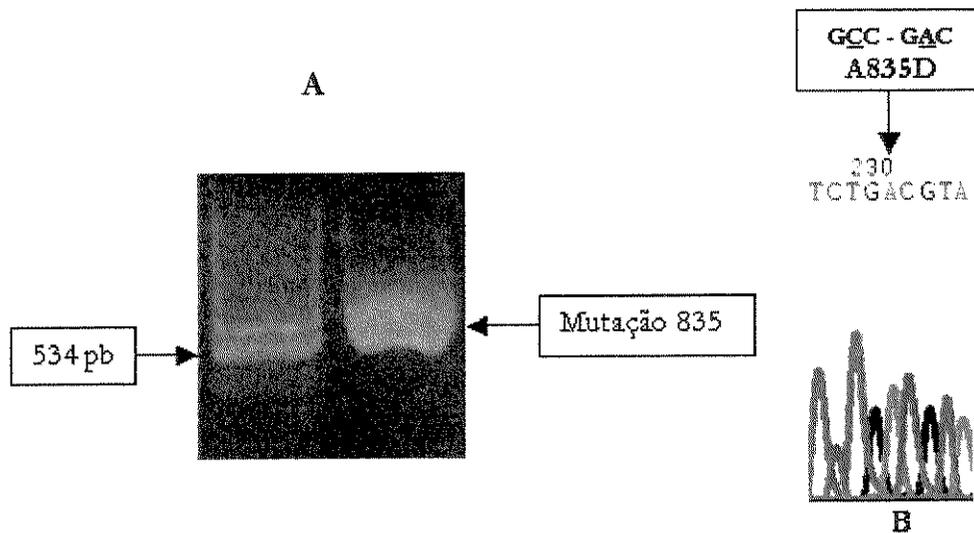
Mutação 835: A835D (Alanina-Ácido Aspártico)

Figura 9. Confirmação da mutagênese do cDNA do CASR com a mutação c.2505 A>D resultando na substituição de A835D. **A** - Amplificação por PCR da região da mutação 835. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 100pb. **B** - Sequenciamento direto da região da mutação.

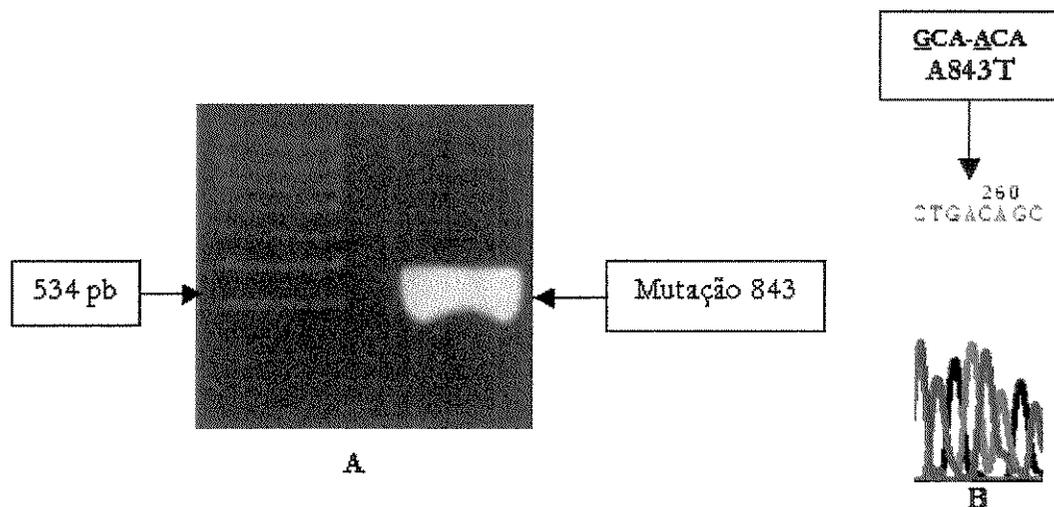
Mutação 843:A843T (Alanina - Treonina)

Figura 9. Confirmação da mutagênese do cDNA do CASR com a mutação c.2529 A>T resultando na substituição de A843T. **A**-Amplificação por PCR da região da mutação 843. A reação foi submetida à eletroforese, em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 100pb (Fermentas). **B**-Seqüenciamento direto da região da mutação.

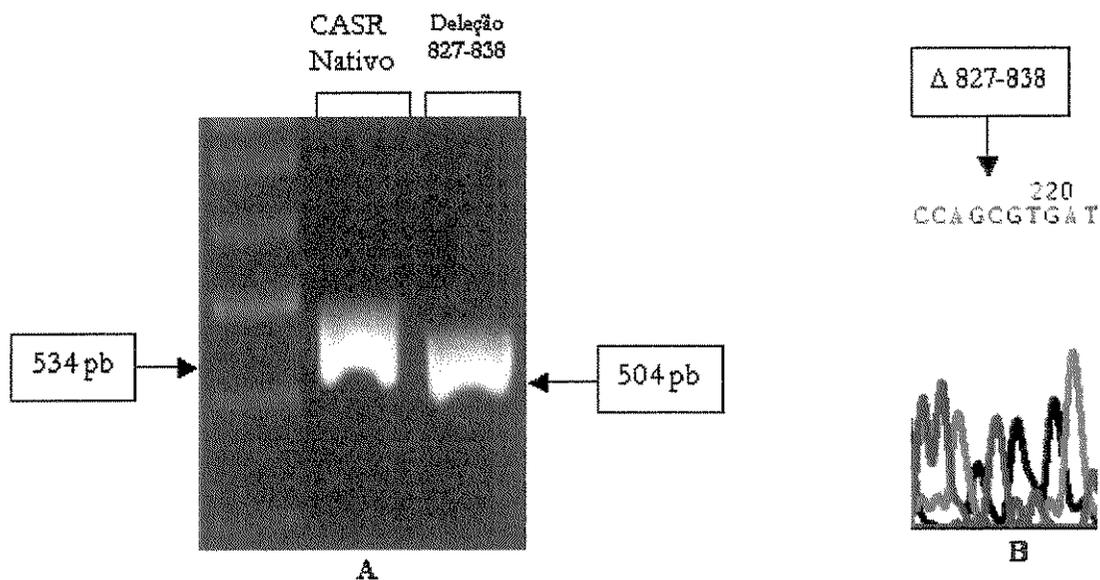
Deleção 827-838

Figura 10. Confirmação da deleção da terceira alça extracelular do domínio transmembrana do cDNA do CASR resultando na deleção de 11 aminoácidos (33 pb) da região (827-838). **A**-Amplificação por PCR do cDNA do receptor sensor de cálcio nativo e da deleção 827-838, a diferença de tamanho das bandas é devido à falta de 33 pb. Marcador 100 pb (Fermentas). **B**-Seqüenciamento direto da região da deleção.

Análise da expressão de receptores mutados e de proteínas envolvidas na sinalização celular através da técnica de Western Blot

Expressão dos receptores mutados

Foi investigada a expressão dos receptores mutados transfectados em células HEK 293 e observou-se a expressão de todos os receptores mutados em células HEK 293 de forma variada. As bandas de 140 kDa, 160 kDa e as bandas oligoméricas de aproximadamente 220 kDa representam o receptor. A expressão dos receptores com as mutações nas posições L773Q, F788S e deleção da terceira alça extracelular foi similar ao receptor nativo (Figura 11), no entanto os receptores mutados em F806C, A835D e A843T apresentaram uma diminuição da expressão, e a mutação na posição A824S apresentou uma diminuição drástica na expressão quando comparada com receptor nativo.

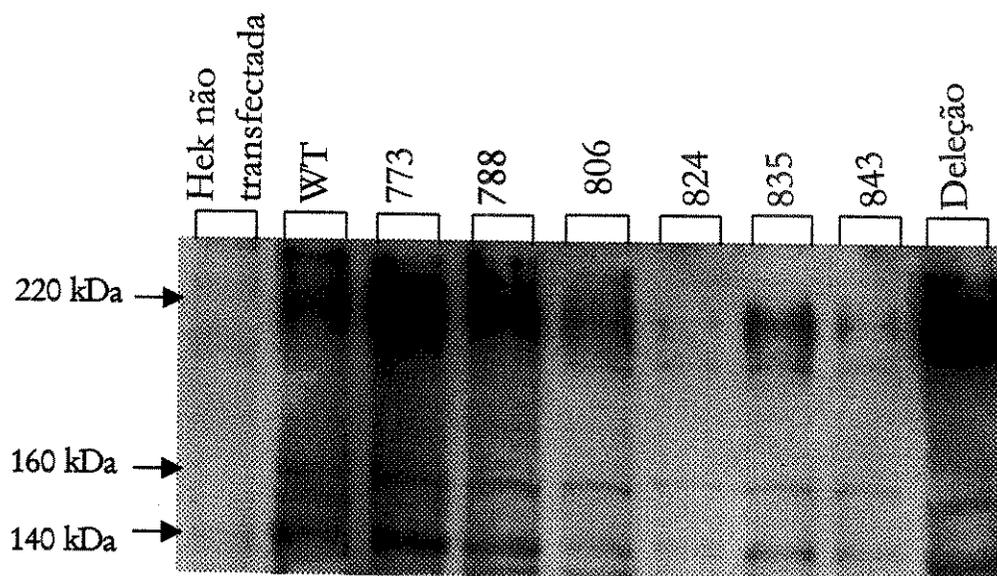


Figura 11. Western blot dos receptores mutados, 40 μ g de extrato proteico total. Coluna 1 - HEK 293 não transfectada. Coluna 2 - Receptor sensor de cálcio nativo (CASR). Coluna 3 - Mutação L773Q. Coluna 4 - Mutação F788S. Coluna 5 - Mutação F806C. Coluna 6 - Mutação A824S. Coluna 7 - Mutação A835D. Coluna 8 - Mutação A843T. Coluna 9 - Δ 827-838. Anticorpo policlonal Anti-CASR. Marcador (Kaleidoscope[®]-Biorad).

Expressão da Fosfolipase $C_{\beta 1}$

A expressão da Fosfolipase $C_{\beta 1}$ foi avaliada em células HEK 293 transfectadas com os receptores mutados. Os experimentos foram realizados com concentrações de cálcio no meio de crescimento celular de 1.8 mM. A célula HEK 293 expressa a $PLC_{\beta 1}$, no entanto foi observado que a maioria das células transfectadas com os receptores mutados apresentaram um aumento na expressão da $PLC_{\beta 1}$ quando comparados com as células transfectadas com o receptor nativo (controle positivo) e célula HEK 293 não transfectada (controle negativo) (Figura 12). Entretanto as células transfectadas com o receptor mutado na posição A843T apresentou uma diminuição na expressão quando comparado com os controles (Figura 12, coluna 8).

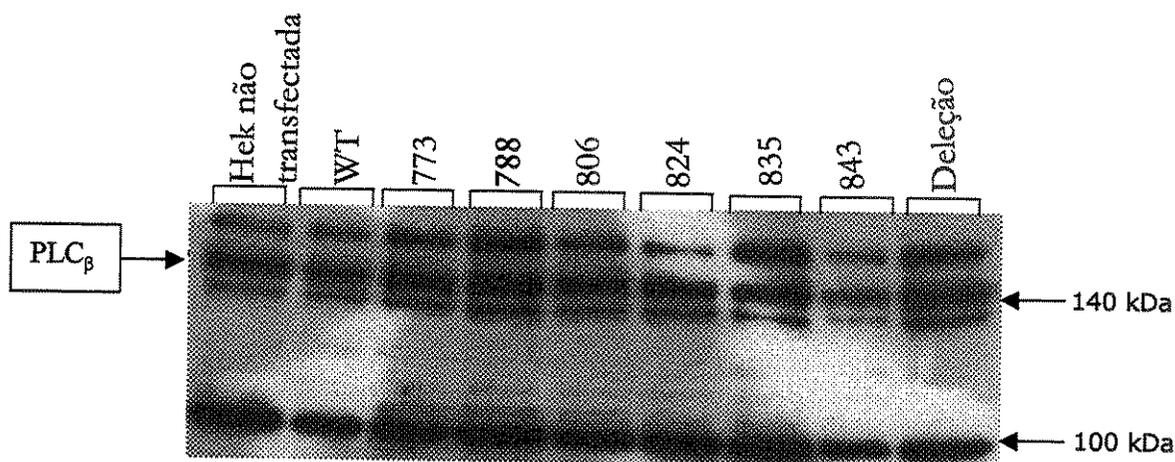


Figura 12. Western blot dos receptores mutados, 40 μ g de extrato proteico total. Coluna 1 - HEK 293 não transfectada. Coluna 2 - Receptor sensor de cálcio nativo (CASR). Coluna 3 - Mutação L773Q. Coluna 4 - Mutação F788S. Coluna 5 - Mutação F806C. Coluna 6 - Mutação A824S. Coluna 7 - Mutação A835D. Coluna 8 - Mutação A843T. Coluna 9 - Δ 827-838. Anticorpo policlonal Anti- $PLC_{\beta 1}$. Marcador (Kaleidoscope[®]-Biorad).

Expressão da Proteína Quinase C (PKC)

A expressão da Proteína Quinase C (PKC) foi analisada em células HEK 293 transfectadas com receptores mutados. A PKC é expressa na célula HEK 293, no entanto a expressão desta proteína aumentou na presença dos receptores mutados nas posições L773Q,

F788S, F806C, A824S e deleção da terceira alça extracelular (Figura 13). A expressão da PKC nas células com os receptores mutados na posição A835D foi similar ao controle positivo (HEK 293 transfectada com receptor nativo) e controle negativo (HEK 293 não transfectada) (Figura 13, coluna 7). A expressão da PKC foi diminuída na presença do receptor mutado na posição A843T quando comparada com os controles (Figura 13, coluna 8). Foram utilizadas concentrações basais de cálcio no meio de crescimento celular (1,8 mM).

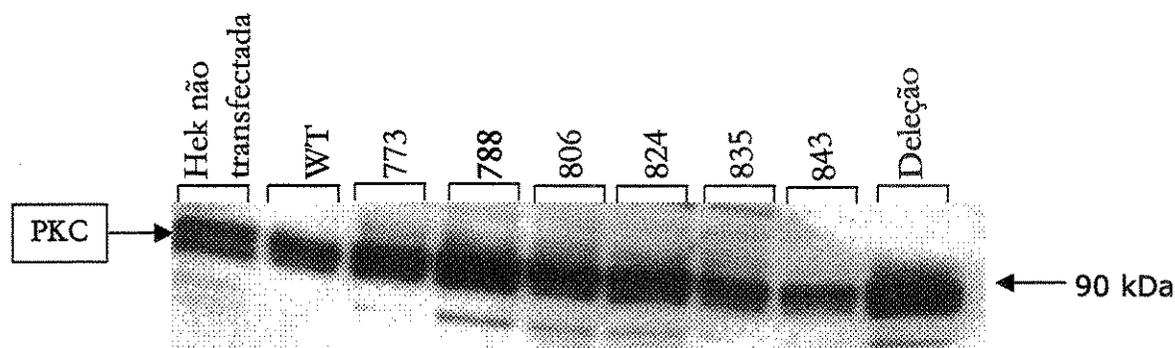


Figura 13. Western blot dos receptores mutados, 40 μ g de extrato protéico total. Coluna 1 - HEK 293 não transfectada. Coluna 2 - Receptor sensor de cálcio nativo (CASR). Coluna 3 - Mutação L773Q. Coluna 4 - Mutação F788S. Coluna 5 - Mutação F806C. Coluna 6 - Mutação A824S. Coluna 7 - Mutação A835D. Coluna 8 - Mutação A843T. Coluna 9 - Δ 827-838. Anticorpo policlonal Anti - PKC Marcador (Kaleidoscope[®]-Biorad).

Expressão de ERK 1/2

A investigação da expressão de ERK 1/2 foi realizada em células HEK 293 transfectadas com receptores mutados. As MAPKs ou ERKs são proteínas expressas em células HEK 293. Nesta avaliação foi observado que as células transfectadas com a maioria dos receptores mutados apresentaram uma expressão similar da ERK 2, enquanto que as células contendo os receptores mutados nas posições A824S e A843T apresentaram uma diminuição da expressão quando comparada com a transfectada com receptor nativo e a HEK 293 não transfectada (Figura 14, colunas 6 e 8 respectivamente).

A expressão da ERK 1 foi diminuída em todas as células transfectadas com os receptores mutados, no entanto a presença dos receptores mutados nas posições A824S e A843T acarretam uma diminuição mais drástica da expressão da ERK 1 quando comparadas com as células transfectadas com o receptor nativo e a não transfectada (Figura 14, coluna 6 e 8). A com concentração de cálcio no meio de crescimento celular foi de 1.8 mM.

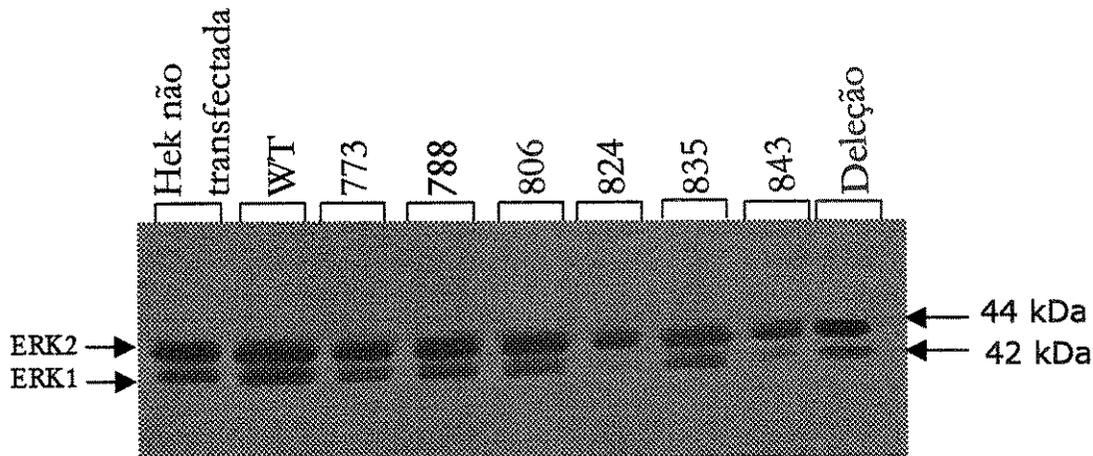


Figura 14. Western blot dos receptores mutados, 40 μ g de extrato proteico total. Coluna 1 - HEK 293 não transfectada. Coluna 2 - Receptor sensor de cálcio nativo (CASR). Coluna 3 - Mutação L773Q. Coluna 4 - Mutação F788S. Coluna 5 - Mutação F806C. Coluna 6 - Mutação A824S. Coluna 7 - Mutação A835D. Coluna 8 - Mutação A843T. Coluna 9 - Δ 827-838. Anticorpo policlonal Anti-ERK 1/2. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Amplificação e clonagem do domínio extracelular do CASR para a produção de proteína recombinante

Foi amplificado de forma eficiente os 1,838 pares de base correspondentes ao domínio extracelular do receptor sensor de cálcio utilizando oligonucleotídeos contendo as enzimas de restrição NdeI e XhoI (Figura 15).

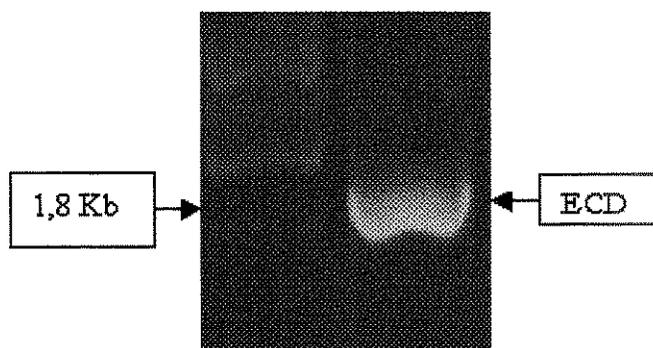


Figura 15. Amplificação do ECD através de PCR. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,7%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 1kb (Fermentas).

A clonagem do inserto do domínio extracelular foi realizada no vetor pCR[®]-Blunt II-Topo. Os clones resultantes desta transformação foram analisados a partir de seu perfil de restrição com as enzimas Nde I e XhoI (Figura 16).

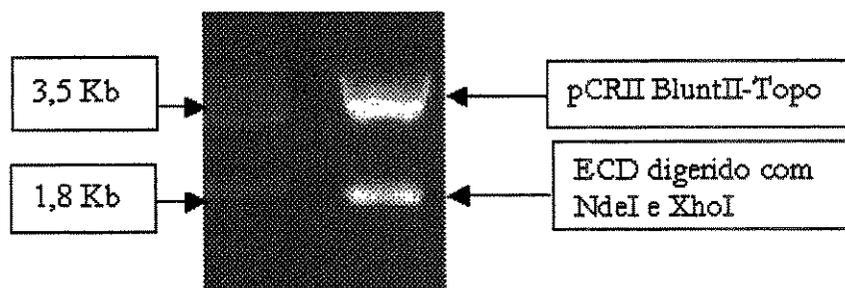


Figura 16. Digestão do vetor de clonagem pCR[®]-Blunt II-Topo contendo o ECD, com as enzimas de restrição NdeI e XhoI. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,7%, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 1kb.

Preparação do vetor pET28a para ligação com o ECD

O vetor pET28a foi submetido à digestão com as enzimas NdeI e XhoI, tratado com fosfatase e purificado do gel (Figura 17).

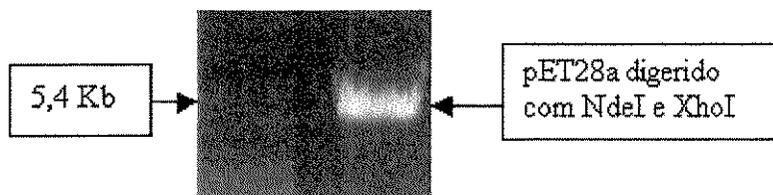


Figura 17. Vetor pET 28a digerido com NdeI e XhoI, submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7 %, contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. Marcador 1kb.

Confirmação da presença do inserto no vetor pET28a através de seqüenciamento direto

Para a confirmação da presença do domínio extracelular do CASR no pET28a realizamos o seqüenciamento direto das colônias positivas resultantes da ligação descrita anteriormente. Realizamos a reação com o primer reverso localizado entre os pares de base 1833 e 1810 no exon 7. A figura abaixo mostra uma região do seqüenciamento correspondente ao ECD (Figura 18).

280 290 :

A AACACG ATGGAGC CATCCCTCTGGGA

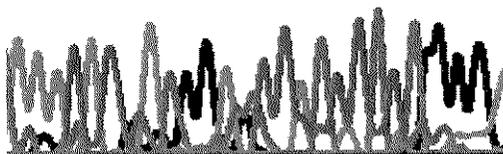


Figura 18. Parte do seqüenciamento da porção ECD correspondente às posições 1489 até 1515 pares de bases.

Confirmação da presença do inserto no vetor pET28a nas colônias resultantes da transformação em DH5α

Após a ligação do inserto com o vetor de expressão foi realizada uma transformação inicial em *E. coli* cepa DH5α. Foram investigadas 6 colônias digerindo os DNAs previamente preparados em minipreparações, com NdeI e XhoI para confirmação da presença do inserto

de forma correta. Das seis colônias analisadas através de seu perfil de restrição, duas apresentavam o inserto do tamanho esperado (Figura 19).

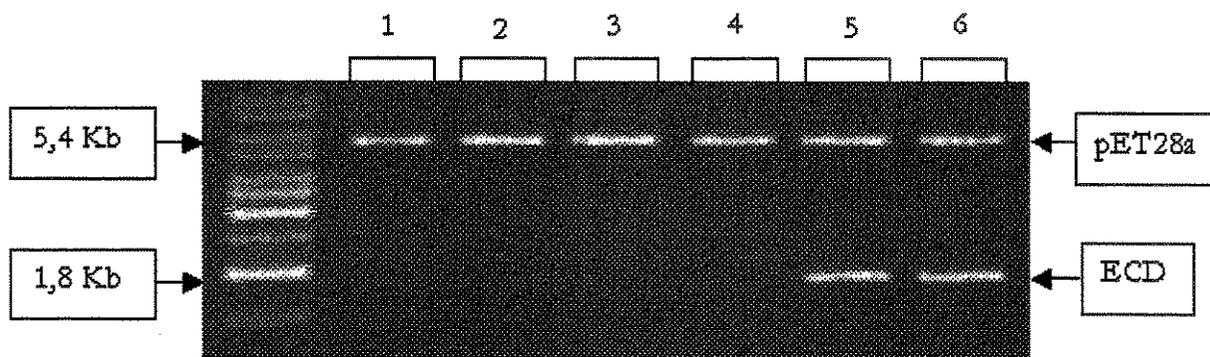


Figura 19. Digestão dos DNAs das colônias com NdeI e XhoI. As colônias 5 e 6 apresentaram o fragmento correto. O marcador utilizado foi o de 1Kb em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.

Confirmação da presença do inserto no pE T28a nas colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3) e (pLysS)

Após a confirmação das colônias positivas transformadas em DH5 α , foi efetuada uma segunda transformação em *E. coli* cepa BL21 linhagem específica para a expressão protéica, por ser defeituosa na produção de proteases. A presença do inserto foi analisada através da digestão de 4 colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3) (Figura 20).

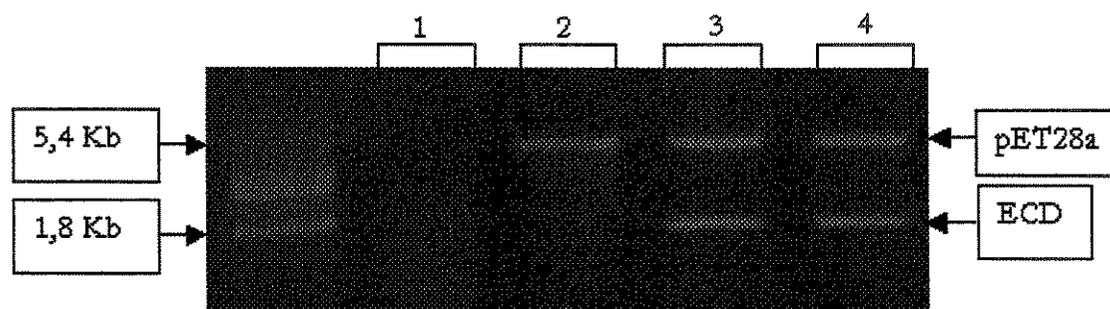


Figura 20. Digestão das colônias positivas para transformação em BL21 DE3. As colônias 3 e 4 foram positivas. A colônia 3 foi utilizada para expressão da proteína recombinante do ECD. Marcador de 1Kb em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.

Para confirmação que a transformação em BL21 (pLysS) ocorreu de forma correta, foi utilizado o DNA de cinco colônias para a digestão com a enzima de restrição EcoR V. O vetor pET28a contendo o inserto possui um tamanho de 7,2 Kb. Após a digestão com EcoR V foram obtidos três fragmentos de tamanhos diferentes, pois a enzima corta o pET28a na posição 1573 pb e o inserto nas posições 702 pb e 1247 pb, os fragmentos resultantes são de 3,7 Kb, 2,8 Kb e 545 pb. A transformação foi realizada de forma satisfatória em 3 de 5 colônias resultantes das transformações em BL21 pLysS analisadas a partir de seu perfil de restrição (Figura 21).

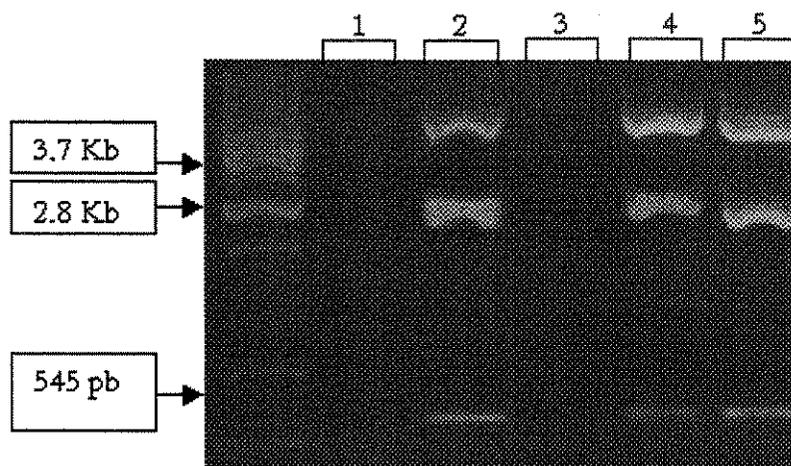


Figura 21. Digestão com EcoR V das colônias resultantes da transformação em BL21 pLysS. As colônias 2, 4 e 5 foram positivas. A colônia 2 foi utilizada para expressão da proteína recombinante do ECD. Marcador de 1Kb em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.

Análise de indução e solubilidade da proteína recombinante

Testes de indução e solubilidade em BL21(DE3)

Para os procedimentos iniciais de indução, foi utilizado pET28a contendo o inserto e transformado em BL21 (DE3) (Figura 22, colunas 6, 7, e 8) e como controle negativo o vetor fechado (pET 28a) (Figura 22, colunas 2, 3 e 4). Os testes realizados a 37°C em meio LB. O

tamanho esperado da proteína recombinante da porção do domínio extracelular do receptor sensor de cálcio é de 68 kDa.

A proteína foi produzida de forma efetiva com um aumento significativo e progressivo da banda correspondente a 68 kDa nas amostras induzidas 1, 2 e 3 horas. Não houve aumento da expressão de nenhuma banda no controle negativo (Figura 22, colunas 2, 3 e 4). Para determinação dos melhores tempos de indução, foram realizadas além das coletas de amostras em 1, 2 e 3 horas (como descrito acima), e as coletas nos tempos 6 e 24 horas, a 37° C em meio LB. Houve aumento significativo da banda de 68 kDa do tempo 1 ao tempo 24 horas (Figura 22 e 23).

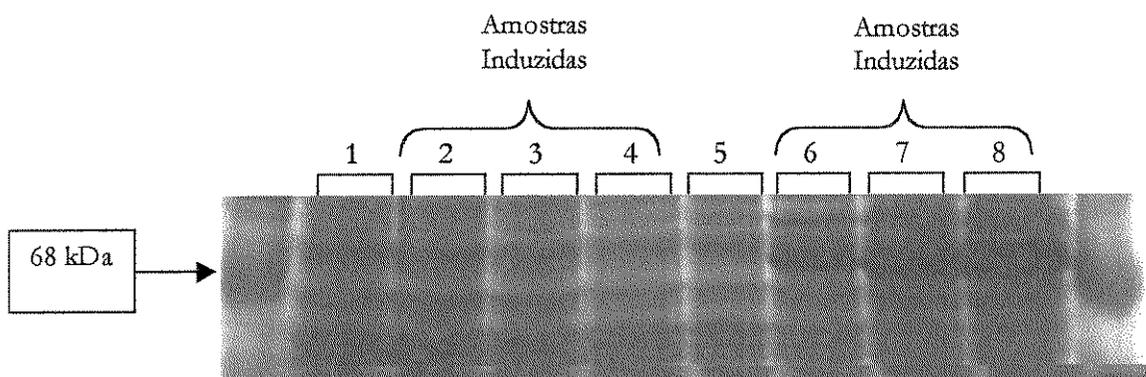


Figura 22. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas, em gel de 10% de poliacrilamida corado com "comassie brilliant blue". Coluna 1- pET28a sem o inserto não induzido. Coluna - 2, 3 e 4 pET28a sem o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG. Coluna - 5, pET28a contendo o inserto, amostra não induzida. Coluna - 6, 7 e 8 pET28a contendo o inserto, amostras induzidas com IPTG 0,4 mM, 1h, 2h e 3h respectivamente. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Os testes iniciais de solubilidade foram realizados no lisado celular resultante dos tempos de 6 e 24 horas. Utilizou-se o tampão de lise contendo lisozima, sonicação e ciclos de congelamento com nitrogênio líquido, mas proteína manteve-se na região insolúvel em ambos os tempos (Figura 23, colunas 5, 6, 7 e 8).

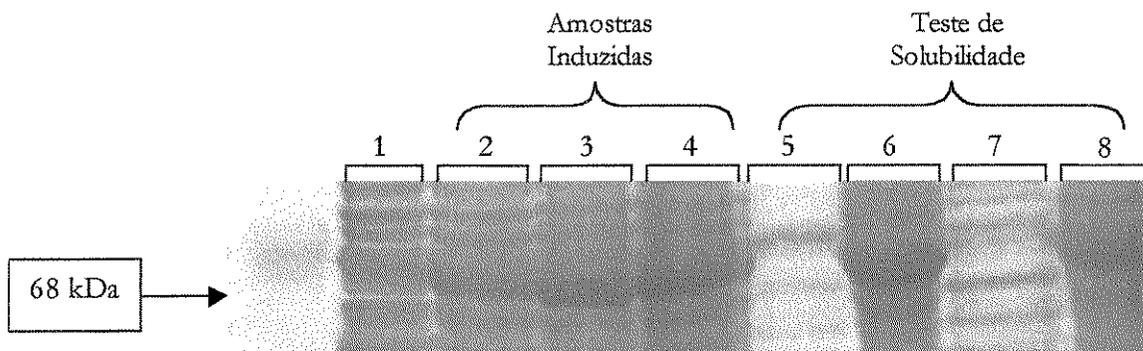


Figura 23. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas a 37°C em LB, em gel de 10% de poliacrilamida corado com “comassie brilliant blue”. Coluna 1- pET28a contendo o inserto não induzido. Coluna - 2, 3 e 4 pET28a contendo o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG, 3h, 6h e 24h respectivamente. Coluna - 5, porção solúvel do tempo de 6h. Coluna - 6, porção insolúvel do tempo de 6h. Coluna - 7, porção solúvel do tempo 24h. Coluna - 8, porção insolúvel 24h. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Buscando obter uma maior quantidade de proteína na região solúvel, os testes de indução e solubilidade foram realizados na temperatura de 22°C, em meio LB. A figura abaixo mostra que nestas condições, houve uma indução leve na produção da proteína. No teste de solubilidade foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, mas a banda correspondente à proteína (68 kDa) aparece mais expressiva na fração insolúvel (Figura 24).

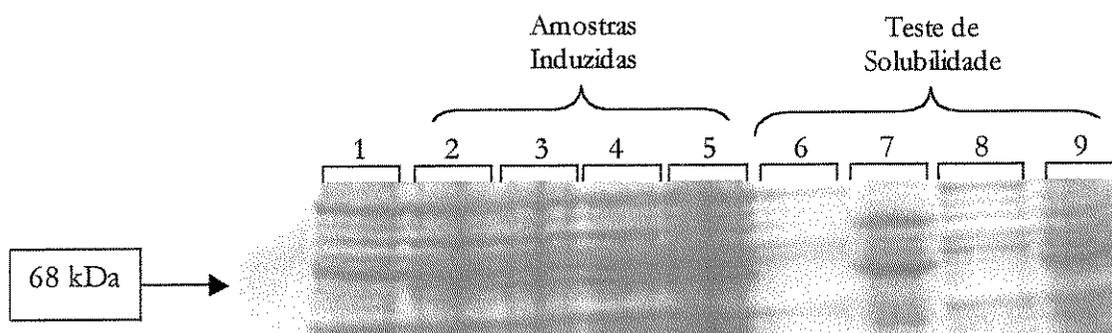


Figura 24. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas a 22°C, em gel de 10% de poliacrilamida corado com “comassie brilliant blue”. Coluna 1- pET28a contendo o inserto não induzido. Coluna - 2, 3, 4 e 5 pET28a contendo o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG, 1h, 3h, 6h e 24h respectivamente. Coluna - 6, porção solúvel do tempo de 6h. Coluna - 7, porção insolúvel do tempo de 6h. Coluna - 8, porção solúvel do tempo 24h. Coluna - 9, porção insolúvel 24h. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Visando a produção da proteína na porção solúvel em quantidades significativas, alterou-se o meio de LB para YT (meio que contém menos NaCl) e foram realizados os testes de indução em BL21 (DE3), a 37°C. Não houve diferença quanto ao grau de expressão e solubilidade entre LB (Figura 23) e YT (Figura 25).

Com a finalidade de solubilizar proteína recombinante do domínio extracelular do receptor sensor de cálcio, foi realizado o teste de solubilidade sonicando duas vezes a porção insolúvel do lisado resultante da indução do tempo de 6 horas. Além da lisozima, acrescentou-se ao tampão de lise Triton X 100 e os ciclos de congelamento foram efetuados igualmente nas duas etapas de sonicação.

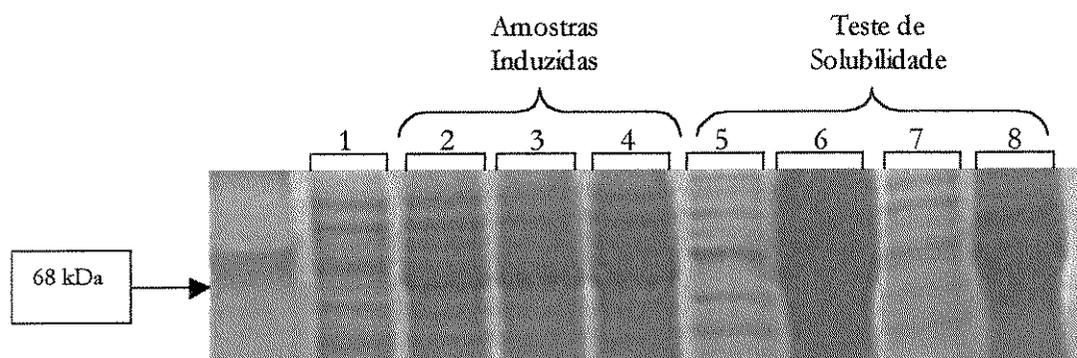


Figura 25. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas em meio YT, a 37°C, em gel de 10% de poliácridamida corado com “comassie brilliant blue”. Coluna 1 - pET28a contendo o inserto não induzido. Coluna - 2, 3 e 4 pET28a contendo o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG, 1h, 3h e 6h respectivamente. Coluna - 5, porção solúvel do tempo de 3h. Coluna - 6, porção insolúvel do tempo de 3h. Coluna - 7, porção solúvel do tempo 6h. Coluna - 8, porção insolúvel 6h. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Os resultados demonstram uma banda pequena na porção solúvel da primeira sonicação, no entanto a maior parte da proteína permaneceu na fração insolúvel (Figura 25, colunas 5 e 6 sonicado 1x, 7 e 8 sonicado 2x). A indução da produção da proteína foi realizada de forma satisfatória (figura 26, colunas 2, 3, 4).

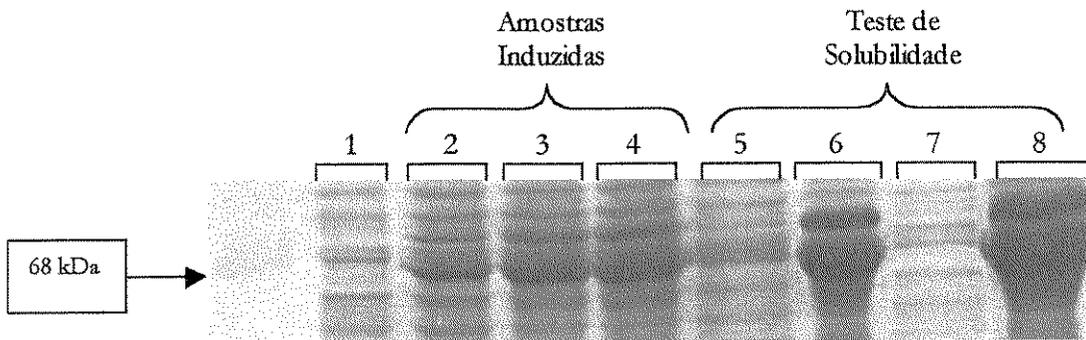


Figura 26. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas em meio YT, a 37°C, em gel de 10% de poliácridamida corado com “comassie brilliant blue”. Coluna 1- pET28a contendo o inserto não induzido. Coluna - 2, 3 e 4 pET28a contendo o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG, 1h, 3h e 6h respectivamente. Coluna - 5, porção solúvel do tempo de 6h (sonicado 1x). Coluna - 6, porção insolúvel do tempo de 6h (sonicado 1x). Coluna - 7, porção solúvel do tempo 6h (sonicado 2x). Coluna - 8, porção insolúvel 6h (sonicado 2x). Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Testes de indução e solubilidade em BL21(pLysS)

Buscando uma melhor solubilização da proteína foi utilizada a cepa BL21 pLysS para induzir a produção da proteína recombinante na tentativa de obter a proteína solúvel. Os experimentos foram realizados com meio YT, a 37° C, nos tempos de 1, 3, 6 e 24h. Os resultados mostram uma indução mais moderada na produção da proteína. O teste de solubilidade foi realizado no tempo 6h e a proteína manteve-se insolúvel (Figura 27).

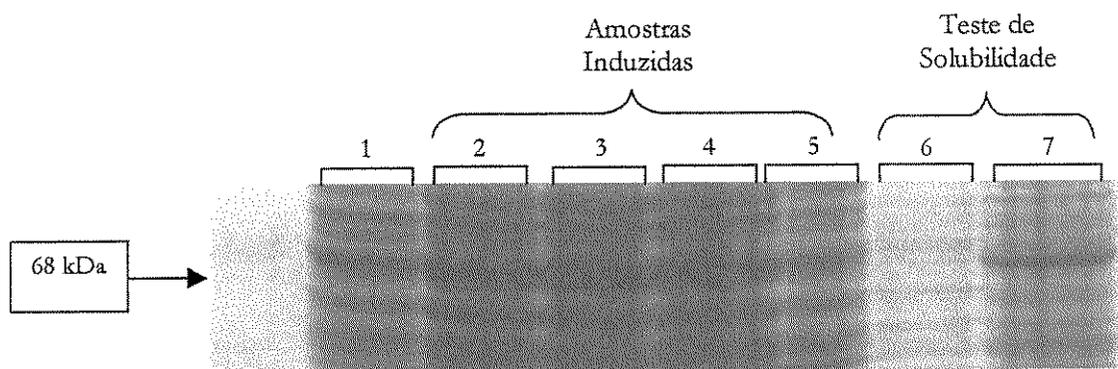


Figura 27. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas em meio YT em BL21 pLysS, em gel de 10% de poliácridamida corado com “comassie brilliant blue”. Coluna 1- pET28a contendo o inserto não induzido. Coluna - 2, 3, 4 e 5 pET28a contendo o inserto induzido com 0,4 mM de IPTG, 1h, 3h, 6h e 24h respectivamente. Coluna - 6, porção solúvel do tempo de 6h. Coluna - 7, porção insolúvel do tempo de 6h. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

Análise da purificação da proteína recombinante

Teste da resina

Para a realização deste teste foi utilizada resina carregada com níquel em contato com porção solúvel do tempo de indução de 6 horas, em meio YT. Foram utilizadas diferentes concentrações de imidazol para purificar a proteína heteróloga, o imidazol possui alta afinidade pelo níquel e compete com a cauda de histidina presente na proteína e que está ligada ao níquel, eluindo a proteína. Os resultados confirmam a insolubilidade da proteína, a banda correspondente à proteína recombinante aparece fracamente e com algumas bandas inespecíficas na fase inicial do experimento e que posteriormente desaparecem (Figura 28).

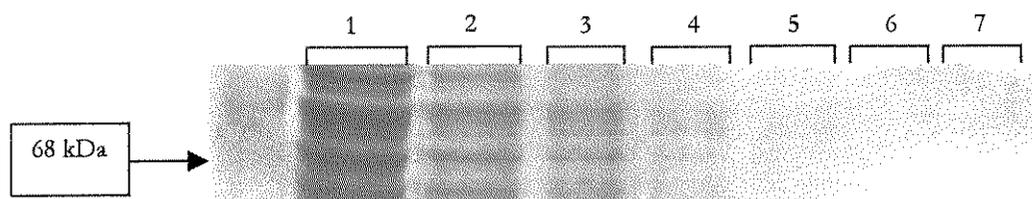


Figura 28. Eletroforese das amostras coletadas no teste da resina de níquel, em gel de 10% de poliacrilamida corado com "comassie brilliant blue". Coluna 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - TS10, TS30, TS50, TS100, TS 250, TS400 e Resina respectivamente. Marcador (Kaleidoscope®-Biorad).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Expressão do CASR com mutações no domínio transmembrana

No presente trabalho selecionamos sete aminoácidos posicionados na região transmembrana do receptor sensor de cálcio (CASR) que apresentam mutações ativadoras descritas em pacientes com Hipocalcemia Autossômica Dominante (ADH) e criamos mutações pontuais. Substituímos aminoácidos hidrofóbicos por aminoácidos hidrofílicos e analisamos o grau de expressão dos receptores mutados, bem como a expressão de proteínas relacionadas com a cascata de sinalização do CASR.

Estudos realizados a partir de mutagênese *in vitro* possibilitam alterações de posições específicas do gene de interesse, proporcionando uma caracterização mais refinada destas regiões e sua importância para a função natural da proteína, como a transcrição, expressão e funcionamento. Em nosso trabalho utilizamos o gene do CASR nativo no vetor pcDNA 3.1 (específico para transfectar células de mamífero), e esta construção foi utilizada como molde para todas as reações de mutagênese dirigida, onde substituímos nucleotídeos específicos que resultam na alteração do aminoácido. Todas as mutações pontuais foram confirmadas através de seqüenciamento direto. Posteriormente o DNA mutado foi transfectado em células renais embrionárias humanas HEK 293 (linhagem celular que não expressa o CASR) avaliando desta forma a expressão dos receptores mutados.

Optamos pela técnica de *Western Blot* para uma investigação qualitativa da expressão dos receptores mutados e das proteínas que compõem a cascata de sinalização do receptor na presença de cálcio no meio de cultura a 1,8 mM: a Fosfolipase $C_{\beta 1}$ (PLC), Proteína Quinase C (PKC) e as Proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAPKs ou ERKs).

Expressão dos receptores mutados

Nossos resultados mostram a expressão de todos os receptores mutados: L773Q, F788S, F806C, A824S, A835D, A843T e deleção da terceira alça extracelular. A banda imatura de 140 kDa e a banda madura de 160 kDa foram detectadas em todos os receptores mutados tranfectados em células embrionárias renais humanas HEK 293. Além destas bandas observamos também a expressão das formas oligoméricas do receptor de aproximadamente 220 kDa, que são as formas dimerizadas do receptor que estão relacionadas com a sua ativação (BAI et al, 1996).

Em nossa avaliação, os receptores mutados nas posições L773Q, F788S e deleção da terceira alça extracelular apresentaram uma expressão similar ao receptor nativo, enquanto que as mutações F806C, A835D e A843T apresentaram uma diminuição da expressão quando comparadas com o receptor nativo, e a mutação na posição A824S apresentou uma diminuição mais drástica na expressão quando comparada ao receptor nativo. Isto sugere que a mudança dos aminoácidos hidrofóbicos para aminoácidos hidrofílicos nestas posições afeta diretamente a expressão destes receptores e que a hidrofobicidade destes aminoácidos é importante para manter a expressão normal do CASR.

De Luca et al, (DE LUCA, et al 1997) relataram análises de expressão do receptor com mutações na posição 773 com alteração de um aminoácido hidrofóbico Leucina para Arginina, um aminoácido hidrofílico carregado positivamente com características básicas em pacientes com ADH e observaram uma diminuição na expressão do receptor mutado quando comparado com o receptor nativo. Em nosso trabalho alteramos a Leucina na posição 773 para Glutamina, um aminoácido hidrofílico não carregado, observando que não houve uma diminuição da expressão do receptor com a mutação L773Q quando comparada com o

receptor nativo. Esta diferença observada entre os nossos resultados e os descritos pelos autores pode ser devido à alteração da carga do aminoácido mutado, que pode interferir na expressão do receptor.

De Luca et al, (DE LUCA, et al 1997) descreveram a análise da mutação na posição 806 onde Fenilalanina um aminoácido hidrofóbico foi substituído por Serina, um aminoácido hidrofílico não carregado e observaram uma diminuição na expressão do receptor mutado quando comparada com o receptor nativo. Quando mutamos Fenilalanina para Cisteína, um aminoácido hidrofílico não carregado na posição 806 obtivemos resultados similares, com diminuição da expressão do receptor mutado. Com isso podemos interpretar que não somente a mudança do aminoácido pode alterar a expressão do receptor, mas também a carga de suas cadeias laterais.

A expressão do receptor com a mutação na posição 788, descrita por Watanabe et al. (WATANABE et al., 1998), onde a mutação resultou em alteração do aminoácido Fenilalanina (hidrofóbico) para Cisteína, um aminoácido hidrofílico não carregado, foi similar ao receptor nativo. Em nossos resultados observamos que a substituição de Fenilalanina para Serina, aminoácido hidrofílico não carregado na posição 788, resultou em expressão do receptor mutado de forma similar ao receptor nativo. O que mostra que a polaridade dos aminoácidos nesta posição não afeta diretamente a expressão do receptor.

Em estudos descritos por D'Souza-Li et al. (D'SOUZA-LI et al., 2002), avaliaram em paciente com ADH a expressão da mutação que alterou a Alanina (hidrofóbico) para Treonina, um aminoácido hidrofílico não carregado e observaram uma expressão similar ao receptor nativo. Em análise mais detalhada da expressão da mutação na posição 835, onde alteramos um aminoácido Alanina (hidrofóbico) para Aspartato, um aminoácido hidrofílico carregado

negativamente com características ácidas, observamos diminuição da expressão deste receptor mutado quando comparado com o receptor nativo. O que suporta a hipótese que não somente a polaridade do aminoácido mutado, mas também sua carga, pode interferir no grau de expressão do receptor mutado.

A mutação A824S foi descrita por Inue et al. (INUE et al., 1998) em paciente com ADH, onde a mutação alterou Alanina (hidrofóbico) para Serina (hidrofílico não carregado), porém não realizou estudos de expressão do receptor. Criamos a mesma mutação A824S e observamos uma diminuição drástica na expressão do receptor mutado quando comparado com o receptor nativo, mostrando que a hidrofobicidade do aminoácido nesta posição é importante para manter um grau de expressão normal do CASR.

A mutação constitutiva que altera Alanina (hidrofóbico) para Glutamato (hidrofílico carregado negativamente, com característica ácida) na posição 843 foi descrita por Zhao et al. (ZHAO et al., 1999), em paciente com ADH. Apesar de sua expressão não ter sido analisada, em análise funcional o receptor responde a estímulo com cálcio sugerindo que sua expressão está preservada. Em nosso trabalho criamos uma mutação nesta posição, substituindo Alanina (hidrofóbico) para Treonina (hidrofílico não carregado) e observamos que a alteração da polaridade do aminoácido desta posição diminui de forma importante a expressão deste receptor.

A ativação do CASR possivelmente resulta em mudança conformacional da estrutura deste receptor, a qual pode estar relacionada com movimentos dos diferentes domínios transmembranas. Estudos de espectroscopia de fluorescência do receptor que acopla à proteína G β_2 adrenérgico, mostra que a ativação desta classe de receptores resulta em mudança conformacional do receptor com movimento dos diferentes domínios

transmembrana (GETHER et al., 1997). Atualmente, não está bem elucidado quais domínios do CASR estão interagindo durante a ativação e transmissão do sinal, a terceira alça extracelular do receptor pode ser um possível sítio de interação do domínio transmembrana com o domínio extracelular do CASR. Neste trabalho deletamos a terceira alça extracelular do CASR e avaliamos a expressão do receptor com esta deleção. A expressão do receptor sensor de cálcio com deleção da terceira alça extracelular foi semelhante ao receptor nativo em células transfetadas HEK 293, mostrando assim que a presença desta porção do receptor não é crucial para a expressão do receptor sensor de cálcio.

Expressão de PLC, PKC e MAPKs

Avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização do receptor, em concentrações basais de cálcio de 1,8 mM contido no meio de crescimento celular. Altas concentrações de cálcio ativam o CASR, e a principal proteína envolvida com a sinalização do CASR é a proteína Gq, que ativa a PLC β_1 (DARE et al., 1998), tendo como resultado a ativação dos segundos mensageiros: o Trifosfato Inositol (IP3), que atua em receptores específicos no retículo endoplasmático liberando cálcio intracelular; e o Diacilglicerol, que ativa a PKC resultando na ativação da cascata de MAPKs ou ERKs.

A linhagem de células embrionárias renais humanas HEK 293 expressa todas as proteínas envolvidas na ativação do receptor sensor de cálcio, sendo assim, consideramos a célula HEK 293 não transfetada e a célula transfetada com o receptor nativo como os controles em todos os ensaios experimentais.

Em nossa avaliação de detecção de PLC β_1 obtivemos resultados similares aos descritos na literatura (LEE et al., 1995), em relação a HEK 293 não transfetada e transfetada com o

CASR nativo. Observamos as bandas de 100 kDa e 140 kDa e as bandas de alto peso molecular que são devido a um estado alterado de diferenciação da linhagem celular HEK 293 imortalizada (DARE et al.,1998). A seqüência de aminoácidos da PLC é altamente conservada em diferentes tecidos e espécies (LEE et al., 1995). A fosforilação protéica e a degradação proteolítica são comuns e contribuem para a presença de múltiplas bandas na detecção por *Western blot* (DARE et al.,1998).

A expressão da Fosfolipase C_{β_1} (PLC_{β_1}) foi aumentada nos extratos celulares das células transfectadas com os receptores mutados nas posições L773Q, F788S, F806C, A824S, A835D e deleção da terceira alça extracelular, quando comparada com os controles. Entretanto, as células transfectadas com receptor mutado na posição A843T apresentaram uma diminuição na expressão da PLC_{β_1} , quando comparadas com os controles. Os resultados sugerem que a maioria dos receptores mutados possivelmente está mais sensível a baixas concentrações de cálcio e devido a isto, apresentam um aumento da expressão da PLC_{β_1} em células HEK 293, e que a presença do receptor mutado na posição 843, pode acarretar diminuição da expressão da PLC_{β_1} .

Houve um aumento na expressão da proteína quinase C (PKC) no extrato celular de células transfectadas com os receptores mutados nas posições L773Q, F788S, F806C, A824S e deleção da terceira alça extracelular, quando comparada com os controles. As células HEK 293 transfectadas com o receptor sensor de cálcio com a mutação A835D, apresentaram uma expressão da proteína quinase C similar aos controles. Enquanto que a presença do receptor sensor de cálcio com a mutação A843T, resultou em uma expressão diminuída da PKC quando comparada com os controles. Os dados demonstram que a alteração da polaridade dos aminoácidos, além de acarretar alteração da expressão do receptor sensor de cálcio podem

alterar a função do receptor com conseqüente modulação da expressão das proteínas relacionadas com a via de sinalização do receptor.

A expressão da ERK 1 no extrato celular de células transfectadas com os receptores mutados nas posições L773Q, F788S, F806C, A835D e deleção foi semelhante aos controles, entretanto as mutações nas posições A824S e A843T apresentaram uma diminuição da expressão. A expressão de ERK 2 foi diminuída nos extratos celulares de células transfectadas com todos os receptores mutados, no entanto em células transfectadas com os receptores mutados nas posições A824S e A843T apresentou uma diminuição mais importante quando comparadas com os controles. A expressão das proteínas ERK 1 e 2 apresentou-se de forma variada na presença dos receptores com mutações no domínio transmembrana.

Produção da proteína recombinante do ECD

Os sistemas de expressão que utilizam *E. coli* são amplamente utilizados para a produção de proteína recombinante por apresentarem diversas vantagens. Estas linhagens bacterianas são rotineiramente empregadas em vários protocolos laboratoriais por não necessitarem de condições extremas para serem manipuladas e principalmente pelo seu baixo custo. Também apresentam resultados rápidos na produção de quantidades significativas de proteína e as técnicas empregadas são relativamente simples. Outra importante característica é o vasto estudo científico disponível para o entendimento de sua base funcional e genética. No entanto, este sistema pode apresentar algumas dificuldades na produção de proteína heteróloga. A proteína produzida pode ser instável e ser alterada por pequenas variações de temperatura e do meio em que estiver crescendo. Pode ocorrer baixo nível de expressão por instabilidade do mRNA, com término prematuro da mensagem e com isso tradução ineficiente. A expressão de proteína em grande quantidade pode precipitar e formar corpos de

inclusão (densos agregados insolúveis) que dificultam a sua solubilização necessitando de agentes desnaturantes para solubilizá-la e posteriormente renaturá-la. O que pode não ser interessante quando se quer estudar uma proteína que a estrutura ainda não foi determinada.

Em nosso trabalho optamos pelo plasmídeo pET28a, cuja expressão protéica está sob o controle do promotor T7 e possui uma etiqueta com uma seqüência que codifica seis histidinas (His.tag) nas regiões N-terminal da proteína recombinante, o que facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade empregando-se resinas contendo níquel ou cobalto (NILSSON et al., 1997).

Duas linhagens de *E. coli* BL21 (λ DE3 e pLysS) foram empregadas por serem deficientes em proteases evitando degradação da proteína heteróloga. Além disso, elas expressam o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do repressor *lacI*. Na presença de IPTG (lactose ou outro análogo) este se liga ao repressor *lac* permitindo que o promotor T7 induza a transcrição do gene da T7 RNA polimerase e sob o seu controle inicia a expressão da proteína heteróloga em grande quantidade.

O indutor IPTG é um análogo da lactose e é amplamente utilizado na indução de proteínas heterólogas por não ser tóxico e por apresentar resultados mais rápidos e expressivos na produção da proteína. A indução é usualmente realizada nas concentrações de 0,4 mM a 1 mM de IPTG, no momento em que as células estiverem apresentando um O.D 600 =0,6. Os estudos de Studier et al, (STUDIER et al.,1986) sugerem que a polimerase do RNA T7 é capaz de canalizar todos os recursos da célula na produção da proteína alvo sob o controle do promotor T7 do plasmídeo, produzindo grandes quantidades da proteína de interesse. A linhagem de *E. coli* BL21 (pLysS) produz baixos níveis de lisozima T7 que auxilia na clivagem da parede bacteriana, facilitando a solubilização e purificação da proteína (STUDIER, 1991).

No presente trabalho obtivemos resultados satisfatórios na amplificação e clonagem do domínio extracelular do receptor sensor de cálcio e na purificação do DNA o que nos permitiu a digestão com as enzimas Nde I (de baixa eficiência, e necessita de DNA altamente purificado) e XhoI. A digestão do vetor pET28a também foi realizada de forma eficiente e desenvolvemos o procedimento da ligação do inserto com o vetor pET28a de forma correta e precisa, e a clonagem em DH5 α e BL21 (DE3/PlysS) foi realizada com sucesso.

Durante este trabalho conseguimos induzir de forma muito eficiente a produção da proteína recombinante do domínio extracelular do receptor sensor de cálcio, na temperatura de 37°C em meio LB e YT, com a cepa BL21 (DE3). Obtivemos bandas muito expressivas no tamanho correspondente a proteína (68 kDa). Para padronizarmos os tempos de indução fizemos variações de 1, 2, 3, 6 e 24 horas de indução com 0,4 mM de IPTG e a expressão manteve-se equivalente nos tempos de 3, 6 e 24 horas. Utilizamos inicialmente como controle negativo o vetor pET28a sem o inserto para nos certificarmos de que não estávamos expressando algum fragmento que poderia estar presente no plasmídio ou na cepa de clonagem e que não fosse a proteína de interesse. Não houve expressão significativa de nenhum fragmento inespecífico no teste de indução realizado com o vetor.

Apesar da indução ser altamente eficaz, os testes de solubilidade demonstraram que a proteína apresentava-se extremamente insolúvel, possivelmente por formar corpos de inclusão (agregados insolúveis). Na tentativa de melhorar a produção de proteína na fração solúvel, iniciamos os testes de solubilidade utilizando o lisado resultante da indução nos tempos de 6 horas e 24 horas, na temperatura de 37°C em meio LB. Utilizamos lisozima para auxiliar a lisar a parede bacteriana, inibidor de protease para evitar a degradação da proteína durante a sonicação e ciclos de congelamento. Entretanto, a proteína permaneceu na porção insolúvel

em grande quantidade. Uma banda muito fraca apareceu na porção solúvel, porém em quantidade muito baixa para a purificação.

Além disso, visando melhorar a solubilidade protéica e diminuir a formação de agregados insolúveis, alteramos a temperatura de indução para 22°C para manter a proteína mais estável em meio LB. No entanto, a indução da expressão protéica apresentou-se menos eficiente que a indução a 37°C, e a banda de 68 kDa revelou-se mais fraca. No teste de solubilidade realizado com o lisado resultante dos tempos de indução de 6 e 24 horas, na temperatura de 22°C, a banda de 68 kDa ficou mais visível na porção insolúvel, e na porção solúvel a banda de 68 kDa não foi verificada.

Outra alternativa utilizada para aumentar a solubilidade da proteína foi a troca de meio de crescimento LB para o YT que, por apresentar menos cloreto de sódio, poderia aumentar a quantidade de proteína não agregada. Realizamos o teste de indução a 37°C, nos tempos de 1, 3 e 6 horas. Obtivemos as bandas de 68 kDa tão intensas quanto aos experimentos utilizando LB, indicando alta eficiência na indução da produção da proteína recombinante. Empregamos o teste de solubilidade com o lisado resultante dos tempos 3 e 6 horas de indução, a banda correspondente ao tamanho da proteína permaneceu em grande concentração na região insolúvel.

Na tentativa de solubilizar a proteína repetimos o mesmo procedimento de indução em YT, porém o teste de solubilidade foi realizado com o lisado resultante da indução de 6 horas, em duas etapas: na primeira etapa realizamos a sonicação do lisado como descrito anteriormente, na segunda etapa solubilizamos o precipitado resultante da primeira sonicação com o tampão de lise e repetimos o procedimento de lise. Neste protocolo, além dos componentes do tampão de lise, acrescentamos Triton X 100, detergente não iônico, que

facilita a lise da parede bacteriana. Uma banda mais expressiva foi observada na porção solúvel da primeira fase de sonicação, no entanto a banda correspondente à proteína permaneceu altamente expressa na porção insolúvel.

Buscando uma melhor solubilidade da proteína utilizamos a cepa BL21 (pLysS), que produz a lisozima T7, nos testes de indução e solubilidade. A indução da produção da proteína foi menos eficiente em todos os tempos analisados (1, 3 e 6 horas), a banda correspondente à proteína mostrou-se menos expressiva. O teste de solubilidade foi realizado com o lisado resultante da indução de 6 horas e a proteína manteve-se totalmente na fração insolúvel.

Seguindo o protocolo recomendado para a purificação de proteína recombinante, realizamos o teste da resina, apesar de não conseguirmos solubilizar com sucesso altas concentrações de proteína. Utilizamos a porção solúvel do experimento de indução em YT, no tempo de 6 h, a 37°C e acrescentamos a resina carregada com níquel que tem afinidade pela cauda de seis histidinas presente na proteína. Utilizamos diferentes concentrações de imidazol, que possui alta afinidade pelo níquel e que compete com histidina. Através de diferentes concentrações de imidazol podemos purificar a proteína que ficou ligada ao níquel pela cauda de histidina e também retirar todas as outras proteínas contaminantes. Obtivemos baixos níveis de proteína nas soluções de purificação. Nas concentrações de 10, 30 e 50 mM de imidazol, observamos a banda de 68 kDa presente, porém com muitas proteínas bacterianas contaminantes, o que não permite a uma purificação eficiente. Na concentração de 100 mM a banda aparece brandamente, e nas concentrações de 250 e 400 mM de imidazol nenhuma banda foi verificada. Não foi possível realizarmos a purificação da proteína nesta metodologia por não conseguirmos expressar a proteína em sua forma solúvel.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Todos os receptores mutados foram expressos em células HEK 293. Os receptores com mutações nas posições 806, 835, 843 e 824 apresentaram uma diminuição mais importante na expressão quando comparada com o receptor nativo. Com isso foi possível concluir que a polaridade e a carga destes aminoácidos são fundamentais para uma expressão normal do receptor sensor de cálcio.
2. A presença dos receptores mutados em células HEK 293 resulta em expressão variada das proteínas fosfolipase $C_{\beta 1}$, proteína quinase C e proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAPK). Isto confirma a importância destas posições na ativação do receptor e sugere que a alteração da hidrofobicidade de aminoácidos presentes no domínio transmembrana pode modificar a função do receptor com conseqüente modulação da expressão das proteínas relacionadas com a via de sinalização do receptor.
3. A produção da proteína recombinante foi satisfatória e em grandes quantidades, no entanto a proteína manteve-se em sua maior parte na porção insolúvel devido à formação de corpos de inclusão o que não permitiu sua purificação. O sistema de *E. coli* não foi eficiente para produzir proteínas com estrutura complexa como o domínio extracelular em sua forma solúvel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 35:197-207, 2004.
- Bai, M.; Trivedi, S.; Brown, E. M. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 273:23605-10, 1998.
- Bai, M.; Quinn, S.; Trivedi, S.; Kifor, O.; Pearce, S. H. S.; Pollak, M. R. et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor. *J Biol Chem* 271:19537-45. 1996.
- Brauner-Osborne, H.; Krogsgaard-Larsen, P. Sequence and expression pattern of a novel human orphan G-protein-coupled receptor, GPRC5B, a family C receptor with a short amino-terminal domain. *Genomics* 2:121-8. 2000.
- Brown, E. M.; Gamba, G.; Riccardi, D.; Lombardi, M.; Butters, R.; Kifor, O. et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-80.1993.
- Brown, E. M.; Pollak, M.; Chou, Y. H.; Seidman, C. E.; Seidman, J. G.; Hebert, S. C. Cloning and functional characterization of extracellular Ca(2+)-sensing receptors from parathyroid and kidney. *Bone* 17:7S-11S. 1995.
- Chattopadhyay, N.; Mithal, A.; Brown, E. M. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism [published erratum appears in *Endocr Rev* 1996 Oct;17(5):517]. *Endocr Rev* 17:289-307. 1996.

Conklin, B. R.; and Bourne H. R. Homeostatic signals marriage of the flytrap and the serpent [news]. *Nature*. 367:22. 1994.

Dare, E.; Kifor, O.; Brown, E. M.; Weber, G. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C isozymes present in the bovine parathyroid and in human kidney HEK293 cells stably transfected with the human parathyroid Ca^{2+} -sensing receptor. *J Mol Endocrinol*. 21:7-17. 1998.

De Luca, F.; Ray, K.; Mancilla, E. E.; Fan G. F.; Winer K. K.; Gore, P. et al. Sporadic hypoparathyroidism caused by de Novo gain-of-function mutations of the Ca^{2+} -sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 8:2710-5. 1997.

D'Souza-Li, L.; Yang, B.; Canaff, L.; Bai, M.; Hanley, D. A.; Bastepe, M. et al. Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 3:1309-18. 2002.

Fan, G.; Goldsmith, P. K.; Collins, R.; Dunn, C. K.; Krapcho, K. J.; Rogers, K.V. et al. N-linked glycosylation of the human Ca^{2+} receptor is essential for its expression at the cell surface. *Endocrinology*. 5:1916-22. 1997.

Garrett, J.E.; Capuano, I. V.; Hammerland, L.G.; Hung, B. C.; Brown, E. M.; Hebert, S. C. et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem*. 270:12919-25. 1995.

- Gether, U.; Lin, S.; Ghanouni, P.; Ballesteros, J. A.; Weinstein, H.; Kobilka, B. K. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J.* 16:6737-47.1997.
- Gether, U.; Kobilka, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 273:17979-82. 1998.
- Hamm, H. E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 273:669-72. 1998.
- Helenius, A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 3:253-65. 1994.
- Hendy, G.N.; D'Souza-Li, L.; Yang, B.; Canaff, L.; Cole, D. E. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat.* 16:281-96. 2000.
- Herrada, G.; Dulac, C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell.* 90:763-73. 1997.
- Hoon, M.A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J. F.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell.* 96:541-51. 1999.
- Inoue, D.; Saika, M.; Ikeda, Yasumasa.; Matsumoto, T. Successful treatment of hypoparathyroidism caused by a novel calcium-sensing receptor mutation with thiazide diuretics and low dose alfacalcidol. Proceedings "Second Joint Meeting of the American society for bone and mineral research and the international bone end mineral society". 1998.

Janjic, N.; Soliman, E.; Pausova, Z.; Seldin, M. F.; Riviere, M.; Szpirer, J. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome*. 11:798-801. 1995.

Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 273:17299-302. 1998.

Kaupmann, K.; Huggel, K.; Heid, J.; Flor, P. J.; Bischoff, S.; Mickel, S. J. et al. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors [see comments]. *Nature*. 386:239-46. 1997.

Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T. et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*. 6807: 971-7. 2000.

Lee, S. B.; Rhee, S. G. Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol*. 7:183-9. 1995.

Lienhardt, A.; Garabedian, M.; Bai, M.; Sinding, C.; Zhang, Z.; Lagarde, J. P. et al. A large homozygous or heterozygous in-frame deletion within the calcium-sensing receptor's carboxylterminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:1695-702. 2000.

Maniatis, Fritsch and Sambrook. *Molecular Cloning*, 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

- Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258:597-603. 1992.
- Nilsson, J.; Stahl, S.; Lundeberg, J.; Uhlen, M.; Nygren, P. A. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*. 1:1-16. 1997.
- Oda, Y.; Tu, C. L.; Pillai, S.; Bikle, D. D. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 36: 23344 -52. 1998.
- O'Hara, P. J.; Sheppard, P.O.; Thogersen, H.; Venezia, D.; Haldeman, B. A.; McGrane, V. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*. 11:41-52. 1993.
- Pollak, M.R.; Brown, E. M.; Chou, Y. H.; Hebert, S. C.; Marx, S. J.; Steinmann, B. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism [see comments]. *Cell*. 75:1297-303. 1993.
- Pollak, M. R.; Brown, E. M.; Estep, H. L.; McLaine, P. N.; Kifor, O.; Park, J. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. 8:303-7. 1994.
- Ray, K.; Clapp, P.; Goldsmith, P. K.; Spiegel, A. M. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem*. 51:34558-67. 1998.
- Ruat, M.; Molliver, M. E.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:3161-5. 1995.

Sack, J. S.; Saper, M. A.; Quioco, F. A. Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J Mol Biol.* 206:171-91. 1989.

Studier, F. W.; Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1:113-30. 1986.

Studier, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.* 1:37-44. 1991.

Zhao, X. M.; Hauache, O.; Goldsmith, P. K.; Collins, R.; Spiegel, A. M. A missense mutation in the seventh transmembrane domain constitutively activates the human Ca²⁺ receptor. *FEBS Lett.* 1:180-4. 1999.

Watanabe, T.; Bai, M.; Lane, C. R.; Matsumoto, S.; Minamitani, K.; Minagawa, M. Familial hypoparathyroidism: identification of a novel gain of function mutation in transmembrane domain 5 of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 7:2497-502. 1998.