

Talita Casagrande Esteves

200505330

**"EXPRESSÃO DO RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO COM
MUTAÇÕES E DELEÇÃO NO DOMÍNIO EXTRACELULAR"**

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 Bioquímica – Talita Casagrande Esteves.

Campinas, 06 de dezembro de 2004.

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

Campinas, 2004

Talita Casagrande Esteves

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO COM
MUTAÇÕES E DELEÇÃO NO DOMÍNIO EXTRACELULAR”**

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

Es85e Esteves, Talita Casagrande
“Expressão do receptor sensor de cálcio com mutações e deleção no domínio extracelular” / Talita Casagrande Esteves. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

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

1. Cálcio no organismo. 2. Cálcio (Bioquímica). 3. Mutação (Biologia). I. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP

UNIDADE	bc
Nº CHAMADA	7/Unicamp
	Es85e
V	EX
TOMBO BCI	02219
PROC.	16-26-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	28/02/05
Nº CPD	

B, bid: 341604



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Membros:

Prof^ª. Dr^ª. 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: 06/12/2004

AGRADECIMENTOS

À Dra. Lília, pela oportunidade que me concedeu e pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho;

Ao Dr. Antônio Condino Neto, pela colaboração no uso dos equipamentos de seu laboratório;

Ao Dr. Omar Magid Hauache, pela gentil doação do anticorpo anti – hCaSR;

Ao Dr. Marcos Nolasco, pelo apoio a mim dado na etapa final deste trabalho;

À Pamela Bento, por ter sido uma “luz” na implantação da técnica de Western blotting;

Aos amigos do laboratório: Kiara, Simone, Luciana, Mércia, Marcelo, por toda colaboração, experiências compartilhadas e por nossos momentos de diversão;

À FAPESP, pelo apoio financeiro – processo 02/06217-7;

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, me incentivaram e me apoiaram nos momentos de felicidade e de dificuldades.

Muito obrigada!



DEDICO ESTE TRABALHO

A quem me deu a vida, Sérgio e Ana, meus pais. Sem eles não haveria sentido algum na busca da minha realização. Obrigada por toda força, apoio, incentivo e amor sem limites.

Aos meus avós, Orlando e Antonia, que Deus ainda me permite conviver, por toda preocupação e oração.

Ao meu amor, Rogério, por todo carinho, amor, companheirismo e compreensão em todos os momentos. E, principalmente, por sempre me fazer sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

EPÍGRAFE

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram”.

Alexandre Graham Bell (1847-1922)

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton (1642-1727)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Introdução.....	13
<i>Receptores que acoplam à proteína G</i>	14
Modelos de interação agonista-receptor.....	14
Dimerização dos GPCRs.....	15
<i>Família III dos GPCRs</i>	17
Modelo de interação agonista-receptor: “Venus flytrap”.....	17
<i>Receptor Sensor de Cálcio</i>	19
Identificação do receptor sensor de cálcio.....	19
Características estruturais do CASR.....	20
N-glicosilação.....	21
Dimerização do receptor sensor de cálcio.....	23
Complementaridade funcional através da dimerização no CASR.....	24
Locais de interação do CASR com o íon Ca^{2+}	25
Sinalização do CASR.....	27
Papel do domínio extracelular na ativação do CASR.....	28
Objetivo.....	30
Material e Métodos.....	32
1. <i>Construção do vetor de expressão do CASR</i>	33
2. <i>Preparação de Bactérias Competentes</i>	33
3. <i>Transformação de bactérias por choque térmico</i>	34
4. <i>Extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina</i>	34
5. <i>Criação de mutações</i>	35
6. <i>Seqüenciamento</i>	37
7. <i>Cultura de células e transfecção transitória</i>	38
8. <i>Preparação do extrato de proteínas celulares</i>	39
Western Blot.....	39
9. <i>Avaliação do grau de expressão dos receptores mutados</i>	40
10. <i>Análise estatística</i>	40
Resultados.....	41
<i>Inserção do CASR nativo no vetor pcDNA3.1</i>	42
<i>Criação in vitro de mutações no CASR</i>	42
Mutação P55S (Prolina – Serina).....	44
Mutação A116T (Alanina – Treonina).....	44
Mutação N118S (Asparagina – Serina).....	45
Mutação E127K (Ácido Glutâmico – Lisina).....	45
Mutação F128Y (Fenilalanina – Tirosina).....	46
Mutação T138K (Treonina – Lisina).....	46
Deleção 139-167.....	47
<i>Expressão do CASR com mutações</i>	47
Expressão dos receptores mutados.....	47
CASR nativo.....	52

<i>Expressão do CASR com mutações no domínio extracelular</i>	54
Expressão dos receptores mutados	55
Conclusão	63
Referências Bibliográficas.....	65

Lista de abreviaturas e símbolos

aa= Aminoácidos

AC = Adenilato ciclase

ADH= Hipocalcemia autossômica dominante

ADD = Anticorpo monoclonal primário anti-CASR contra um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 214-235 do CASR humano (seqüência de aminoácidos 214-235:

ADDYGRPGIEKFREEAEERDI)

Ca_i^{2+} = Cálcio ionizado intracelular

Ca_o^{2+} = Cálcio ionizado extracelular

CASR= Receptor sensor de cálcio

C-terminal= Carboxi terminal

DAG = Diacilglicerol

dNTP= Deoxinucleosídeo trifosfato

DMEM= Meio de cultura de células (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNA= Ácido desoxirribonucleico

ECD= Domínio extracelular

FBS= Soro fetal bovino

FHH= Hipercalcemia hipocalciúria familiar

GABA= Ácido γ - aminobutírico

HEK-293= Células renais de embrião humano-293 (*Human Embryonic Kidney Cell*)

ICD = Domínio intracelular

IP = Fosfato inositol

IP_3 = Trifosfato inositol

NaN_3 = Azida de sódio

NSHPT= Hiperparatireoidismo neonatal grave

N-Terminal= Amino terminal

pb= Pares de base

PBS= tampão fosfato / salina (*Phosphate Buffered Saline*)

PBS-T= PBS com Tween-20

PKA = Proteína quinase A

PKC = Proteína quinase C

PCR= Reação em cadeia da polimerase

PTH= Hormônio da paratireóide; paratormônio

PVDF= Membrana de “polyvinylidene difluoride”

SDS= Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE= Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

(Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis)

TMD= Domínio transmembrana

VFT = “Venus flytrap”

Resumo

O receptor sensor de cálcio (CASR) é membro da família III dos receptores que acoplam à proteína G e é de fundamental importância no processo da homeostase do cálcio. O domínio extracelular (ECD) do receptor é o principal sítio de ligação do Ca_o^{2+} e a maioria das mutações naturais que ocorrem nesse domínio afeta somente a afinidade do receptor pelo Ca_o^{2+} . Algumas mutações no ECD podem causar uma alteração mais grosseira na estrutura do receptor, com conseqüente redução da sua expressão na superfície celular. O objetivo desta tese foi investigar o grau de expressão do CASR com mutações no ECD, incluindo alterações na polaridade ou no caráter ácido/base, em locais onde mutações ativadoras (ADH) ou inativadoras (FHH/NSHPT) já foram descritas. Além disso, também deletamos a região entre os aminoácidos 139 e 167 do ECD por ser uma região altamente hidrofóbica e cuja importância ainda não foi investigada. A técnica de Western blotting nos permitiu verificar a expressão de todos os receptores mutados transfectados em células HEK-293. Através da densitometria das bandas de 140 e 160 kDa e a análise estatística do valores obtidos de três experimentos separados, verificamos uma expressão similar ao CASR nativo dos receptores mutados nas posições A116T, N118S, E127K, F128Y, T138K e Δ 139-167. O receptor com a mutação P55S apresentou uma drástica redução na expressão das formas diméricas e oligoméricas (~220 kDa) em relação ao CASR nativo. Assim, podemos concluir que a expressão do CASR pode ser afetada de acordo com alterações das características dos aminoácidos nativos (polaridade, caráter ácido/base) e a mudança no padrão de expressão é dependente da posição do aminoácido mutado. A posição 55 demonstrou ser crítica para a expressão das formas diméricas do receptor, enquanto que a região hidrofóbica entre os aminoácidos 139 e 167 não é importante para a expressão nem para a formação de dímeros.

Abstract

The calcium sensing receptor (CASR) is a member of the family III of G protein coupled receptors and plays an essential role in calcium homeostasis. The extracellular domain (ECD) of the receptor is the most important site for Ca_0^{2+} -binding and the majority of the naturally occurring mutations in the ECD affects only the affinity of the receptor for Ca_0^{2+} . Other mutations in the ECD could result in a more gross alteration of the receptor structure, reflected by reducing expression levels of the receptor at the cell surface. The objective of this thesis was to investigate the expression levels of the CASR with mutations in the extracellular domain where activating and inactivating mutations have been described. The mutation resulted in changes in aminoacid polarity or acid/base character. In addition, a deletion of a region between 139 and 167 aminoacids of the extracelullar domain of the CASR, a highly hydrophobic region, was perform to investigate its relevance. The Western blotting technique demonstrated that all mutant receptors were expressed in HEK-293 cells. Analysis of the intensity of the bands by densitometry in three separate experiments showed no significant differences in expression levels of the mutants A116T, N118S, E127K, F128Y, T138K and Δ 139-167 compared to the CASR wild type. The mutant receptor P55S showed a drastically decreased expression level in the dimeric and oligomeric forms (~220 kDa) when compared to the CASR wild type. In conclusion, the expression of the CASR could be affected by alterations of the amino acids characteristics (polarity, acid/base character) and the changes in the expression levels is dependent on the position of mutated amino acid. The position 55 is critical for expression of the dimeric forms of the receptor, while the hydrophobic region between 139 and 167 amino acids is not important for the expression nor the dimerization of the CASR.

Introdução

Introdução

Receptores que acoplam à proteína G

Os receptores que acoplam às proteínas heterotriméricas ligadoras de GTP (proteínas G) são proteínas de membrana envolvidas na transmissão de sinais do ambiente extracelular para o citoplasma. Esses receptores compõem a maior família de receptores encontrada na natureza (WESS, 1998). A grande maioria dos hormônios peptídicos, moléculas odorantes, moléculas gustativas, opióides, estímulos luminosos e outras substâncias exercem seus efeitos intracelulares através da ligação a um receptor específico pertencente à classe dos receptores que acoplam à proteína G (GPCRs) (FERGUSON, 1998). Após a clonagem da opsina bovina (NATHANS e HOGNESS, 1983), já foram identificados aproximadamente 2000 GPCRs, os quais são classificados em três subfamílias de acordo com a homologia da seqüência, com a estrutura do ligante e com a função do receptor (JI et al., 1998). A família I é composta pelos receptores relacionados à rodopsina, a família II está relacionada ao receptor de calcitonina e a família III está relacionada ao receptor metabotrópico do glutamato (WESS, 1998).

Todos os receptores que acoplam à proteína G apresentam características estruturais similares: um segmento N-terminal extracelular, sete segmentos transmembranas, três alças extracelulares, três alças intracelulares e um segmento C-terminal (JI et al., 1998).

Modelos de interação agonista-receptor

Os domínios dos GPCRs envolvidos na união do ligante são quase tão diversos quanto a natureza química dos agonistas conhecidos (GETHER e KOBILKA, 1998). Ligantes como fótons, aminas biogênicas, nucleosídeos, eucosanóides e moléculas de lipídios se unem exclusivamente à parte central do domínio transmembrana (TMD), diferentemente dos

peptídeos menores que se ligam tanto na parte central transmembrana quanto nas alças extracelulares. Os polipeptídios maiores se ligam às alças extracelulares e também ao segmento N-terminal. E os hormônios glicoprotéicos, tais como LH, FSH, hCG e TSH, se unem exclusivamente ao segmento N-terminal de seus receptores com posterior interação com as alças extracelulares (JI et al., 1998). Um outro modelo de interação, o do “Venus flytrap”, é proposto para a união de pequenos neurotransmissores, glutamato, cálcio e GABA (O'HARA et al., 1993). Esse modelo é proposto para a família III dos GPCRs e sugere que, após a união do ligante, os dois lobos do amplo domínio extracelular (ECD) do receptor se aproximam e esta mudança de conformação é transmitida para a região transmembrana gerando um sinal (GALVEZ et al., 1999).

Foi observado que muitos GPCRs apresentam uma certa atividade basal podendo ativar a proteína G na ausência de agonistas. Além disso, algumas mutações são capazes de aumentar drasticamente a atividade constitutiva do receptor também de forma independente do agonista (GETHER, 2000). Sugere-se, portanto, que interações intramoleculares de constrangimento mantêm o receptor preferencialmente em sua conformação inativa na ausência do agonista. Essas amarras repressoras, por sua vez, são liberadas como parte do processo de ativação do receptor, promovendo a exposição de seqüências importantes para a proteína G (GETHER, 2000).

Dimerização dos GPCRs

Muitos estudos têm revelado que os GPCRs existem como dímeros, os quais podem estar presentes como homo ou heterodímeros/oligômeros. Além destes, várias outras proteínas existem e funcionam como dímeros, entre elas estão os receptores da tirosina-quinase, os fatores de transcrição e os receptores esteróides intracelulares (RIOS et al., 2001). As propriedades dos receptores, tais como afinidade pelo agonista, potência e eficácia, são

alteradas como resultado da dimerização. As regiões extracelulares, TM e C-terminal estão envolvidas neste processo, e enquanto alguns GPCRs formam unidades diméricas em compartimentos intracelulares, outros as formam na superfície celular de forma dependente do agonista (RIOS et al., 2001). O mecanismo de formação de dímeros, entretanto, parece ser consideravelmente diferente entre os receptores. No receptor β_2 -adrenérgico e no receptor D_2 da dopamina, a dimerização envolve interações entre os segmentos transmembranas (HEBERT et al., 1996). No receptor δ -opióide, a dimerização indica o envolvimento de uma região da cauda C-terminal (CVEJIC e DEVI, 1997), enquanto que para os receptores metabotrópicos do glutamato esse processo é dependente de pontes dissulfídicas intermoleculares entre cisteínas nos domínios extracelulares (BAI et al., 1998; ROMANO et al., 1996; WARD et al., 1998). As implicações funcionais da dimerização ainda não foram completamente estabelecidas para a maioria dos GPCRs (BAI et al., 1999). No entanto, os agonistas podem estabilizar as formas diméricas de vários receptores, tais como o receptor β_2 -adrenérgico e receptores da quemoquina (HEBERT et al., 1996; RODRIGUEZ-FRADE et al., 1999). Isto sugere, portanto, que a homodimerização pode desenvolver um papel tanto diretamente no mecanismo de ativação do receptor quanto, alternativamente, nos processos subsequentes de dessensibilização e internalização dependentes do agonista (GETHER, 2000). A heterodimerização têm mostrado importância entre os subtipos de receptores proximamente relacionados, como no caso do receptor $GABA_B$, onde a co-expressão dos subtipos R1 e R2 é que permite detectar um receptor completamente funcional e glicosilado na superfície celular (GETHER, 2000).

Família III dos GPCRs

A família III dos GPCRs compreende os receptores metabotrópicos do glutamato, mGluRs 1-8 (PIN e DUVOISIN, 1995); os receptores GABA_B (WHITE et al., 1998); o CASR; um subgrupo de receptores de feromônios (HERRADA e DULAC, 1997); e os receptores gustativos (HOON et al., 1999). Todos esses receptores possuem um amplo ECD (500-600 resíduos) que apresenta uma homologia limitada às proteínas bacterianas ligadoras periplasmáticas (PBPs), as quais exibem uma característica estrutural de um “Venus flytrap” bilobado (O'HARA et al., 1993; RAY et al., 1999; REYES-CRUZ et al., 2001). Mais recentemente foram clonados quatro receptores homólogos órfãos: RAIG1, GPCR5B, GPCR5C e GPCR5D que se mostram proximamente relacionados aos receptores mais primitivos da família III e apresentam um domínio N-terminal curto, ao contrário dos membros dessa família (BRAUNER-OSBORNE et al., 2001). Outro receptor, o GPCR6A, também foi clonado recentemente através do cDNA de rim humano e apresenta uma homologia significativa com o CASR e com outros membros da família III (WELLENDORPH e BRAUNER-OSBORNE, 2004).

Modelo de interação agonista-receptor: “Venus flytrap”

O modelo de interação ligante-receptor proposto para a família III dos GPCRs é o modelo do “Venus flytrap” (O'HARA et al., 1993). O domínio de ligação do agonista nesta família é homólogo ao das PBPs e este achado foi confirmado através da estrutura cristalográfica do domínio extracelular do mGluR1 (GOUDET et al., 2004). Neste modelo, se observam duas conformações: uma conformação aberta com o ligante unido inicialmente a um lobo com baixa afinidade no amplo ECD do receptor, e uma conformação fechada na qual o ligante se une a um segundo domínio do receptor estabilizando uma conformação fechada de

alta afinidade. Ainda permanece desconhecido o mecanismo que possibilita a passagem do sinal de ativação do ECD para o TMD. No entanto, sabendo que esses receptores formam dímeros, sugere-se que a ligação do agonista em pelo menos um dos domínios VFT promove uma ampla mudança conformacional nos ECDs dos dímeros, possivelmente forçando os dois TMDs para interagirem entre si estabilizando o estado ativo dos receptores (GOUDET et al., 2004). Além disso, mutantes truncados do mGluR1 com o ECD e sem a região rica em cisteínas não se expressam normalmente na membrana celular e não apresentam nenhuma interação significativa com o ligante, um indicativo de que essa região rica em cisteínas, que se encontra entre o ECD e o TMD, é importante para a estrutura conformacional, para a expressão da proteína bem como para a ativação do receptor (OKAMOTO et al., 1998). A estrutura dimérica dos domínios VFT do mGluR1 revelou duas mudanças conformacionais importantes resultantes da ligação do glutamato. Primeiro, os agonistas podem estabilizar um estado fechado de pelo menos um domínio VFT no dímero. Segundo, a orientação relativa dos domínios VFT no dímero é diferente na presença do glutamato, ou seja, o final da cauda C-terminal (que está conectada ao TMD que ativa a proteína G) se torna mais próxima por mais de 20 Å. Isto sugere que esta última mudança na orientação desempenha um papel chave na ativação do receptor, como mostra BESSIS et al. (2002) em seu estudo com o receptor mGlu8. Recentemente, GOUDET et al. (2004) evidenciou que um modulador alostérico positivo foi capaz de ativar o mGluR5 agindo como agonista em receptores truncados sem a presença do amplo domínio extracelular (VFT e região rica em cisteínas), ativando espontaneamente o subtipo G_q das proteínas G através do seu TMD. Esse resultado sugere que o TMD da família III dos GPCRs apresenta atividade constitutiva que pode ser regulada positiva ou negativamente pelos ligantes, assim como ocorre com a família I (GOUDET et al., 2004).

Receptor Sensor de Cálcio

O receptor sensor de cálcio é uma proteína de membrana que pertence à superfamília dos receptores que acoplam à proteína G (BROWN et al., 1993). Esse receptor desempenha um papel central na homeostase do cálcio regulando a secreção do paratormônio (PTH) bem como a excreção renal de cálcio. Além das paratireóides e rins, o CASR é expresso no cérebro, intestino, pele e outros órgãos onde provavelmente regula os efeitos do cálcio extracelular em uma variedade de outras funções celulares, tais como atividade de canal iônico, diferenciação e proliferação celular (CHATTOPADHYAY et al., 1997).

Identificação do receptor sensor de cálcio

O cDNA do CASR foi clonado de paratireóides bovinas (BoPCar1) por BROWN et al. em 1993 e sua expressão foi analisada através da clonagem em oócitos de *Xenopus laevis*. O CASR é uma proteína de peso molecular de aproximadamente 120 kDa que compreende uma similaridade limitada com os receptores metabotrópicos do glutamato. Esse receptor apresenta um amplo domínio extracelular, sete TMD e uma longa cauda C-terminal situada no citoplasma (BROWN et al., 1993). Esse receptor foi identificado, posteriormente, em adenoma de glândula paratireóide humana (GARRETT et al., 1995) e também em rim humano (AIDA et al., 1995). Os CASRs de diferentes espécies mostram um alto grau de homologia com o BoPCaR (>90% de identidade de aminoácidos), sugerindo que são homólogos do mesmo gen ancestral (CHATTOPADHYAY et al., 1996). O gen do CASR está localizado no cromossomo 3q13.3-21 (AIDA et al., 1995; JANICIC et al., 1995) e apresenta uma região codificadora de 3234 pares de bases, a qual está contida dentro de seis exons (GARRETT et al., 1995).

Características estruturais do CASR

O CASR humano consiste de 1078 resíduos de aminoácidos e apresenta três domínios estruturais maiores: um amplo domínio N-terminal extracelular de 612 aminoácidos; uma parte central de 250 aminoácidos que compõem os sete domínios transmembranas com alças intra e extracelulares; e uma região C-terminal hidrofílica de 216 aminoácidos (cauda citoplasmática) (GARRETT et al., 1995). O receptor apresenta onze sítios potenciais de glicosilação no ECD, cinco sítios potenciais de fosforilação da proteína quinase C (PKC), e dois sítios potenciais de proteína quinase A (PKA) dentro das alças intracelulares e da região C-terminal (BAI, 2004).

Várias regiões dos CASR e mGluRs apresentam resíduos de aminoácidos altamente conservados. As posições relativas de 20 cisteínas (17 delas na região N-terminal, uma na primeira e outra na segunda alça extracelular e uma no quinto TMD) são conservadas tanto no CASR quanto nos mGluRs. A região rica em cisteínas com nove cisteínas altamente conservadas em uma seqüência muito próxima (aproximadamente ao longo de 60 aminoácidos) está presente entre o domínios do “Venus flytrap” (VFT) e o TMD de todos os membros da família III, exceto no GABA_BR1 (BAI, 2004). Além disso, uma seqüência de resíduos não-carregados entre as posições 141 e 171 no ECD do CASR é muito similar (48% de identidade e 70% de similaridade) ao segmento equivalente no ECD dos mGluRs. Esses elementos conservados provavelmente fornecem um suporte estrutural para a correta formação da estrutura terciária da proteína de ambos, CASR e mGluRs (BAI, 2004).

Além das regiões do ECD citadas acima, a primeira e terceira alça intracelular (i1 e i3) são conservadas significativamente no CASR e nos mGluRs (49 e 69% de identidade, respectivamente). Vários autores verificaram que a segunda alça intracelular e parte da cauda C-terminal dos mGluRs determinam a especificidade para o acoplamento da proteína G (G_{q/11} e G_o, as quais ativam fosfolipase C e inibem adenilato ciclase, respectivamente) (GOMEZA et al.,

1996;PIN e DUVOISIN, 1995;PIN et al., 1994). Essas duas regiões não são bem conservadas no CASR, o que deve provavelmente permitir que esse receptor acople tanto com G_q como com G_i (BAI, 2004).

***N*-glicosilação**

O domínio extracelular do CASR contém onze sítios potenciais de *N*-glicosilação, sugerindo que esse receptor é uma glicoproteína (HENDY et al., 2000). As proteínas do CASR isoladas de células renais embrionárias humanas (HEK-293) transfectadas com esse receptor apresentam padrões de expressão similares aos das proteínas isoladas das células de paratireóide (BAI et al., 1996). A detecção do CASR dessas células através de um anticorpo para esse receptor mostrou a presença de três bandas imunorreativas específicas entre 120 e 200 kDa e bandas adicionais de alta massa molecular (~350 kDa). A espécie menor de 120 kDa representa a forma não-glicosilada; a banda de 140 kDa representa a forma imatura glicosilada com alta manose, sensível à endoglicosidase H (Endo H) e à *N*-glicosidase F (PNGase F); e a banda de 160 kDa representa a forma completamente madura glicosilada por carboidratos complexos, resistente à Endo H e sensível à PNGase F (BAI et al., 1996;RAY et al., 1998). Somente uma fração muito baixa do receptor maduro é expressa na superfície celular (BAI et al., 1998). A glicosilação de pelo menos três sítios de glicosilação é essencial para a expressão na superfície celular, mas não parece ser crítico para a transdução do sinal, o qual pode ser medido através do acúmulo de fosfatos-inositolis (IPs) induzido por alta $[Ca_o^{2+}]$ (RAY et al., 1998).

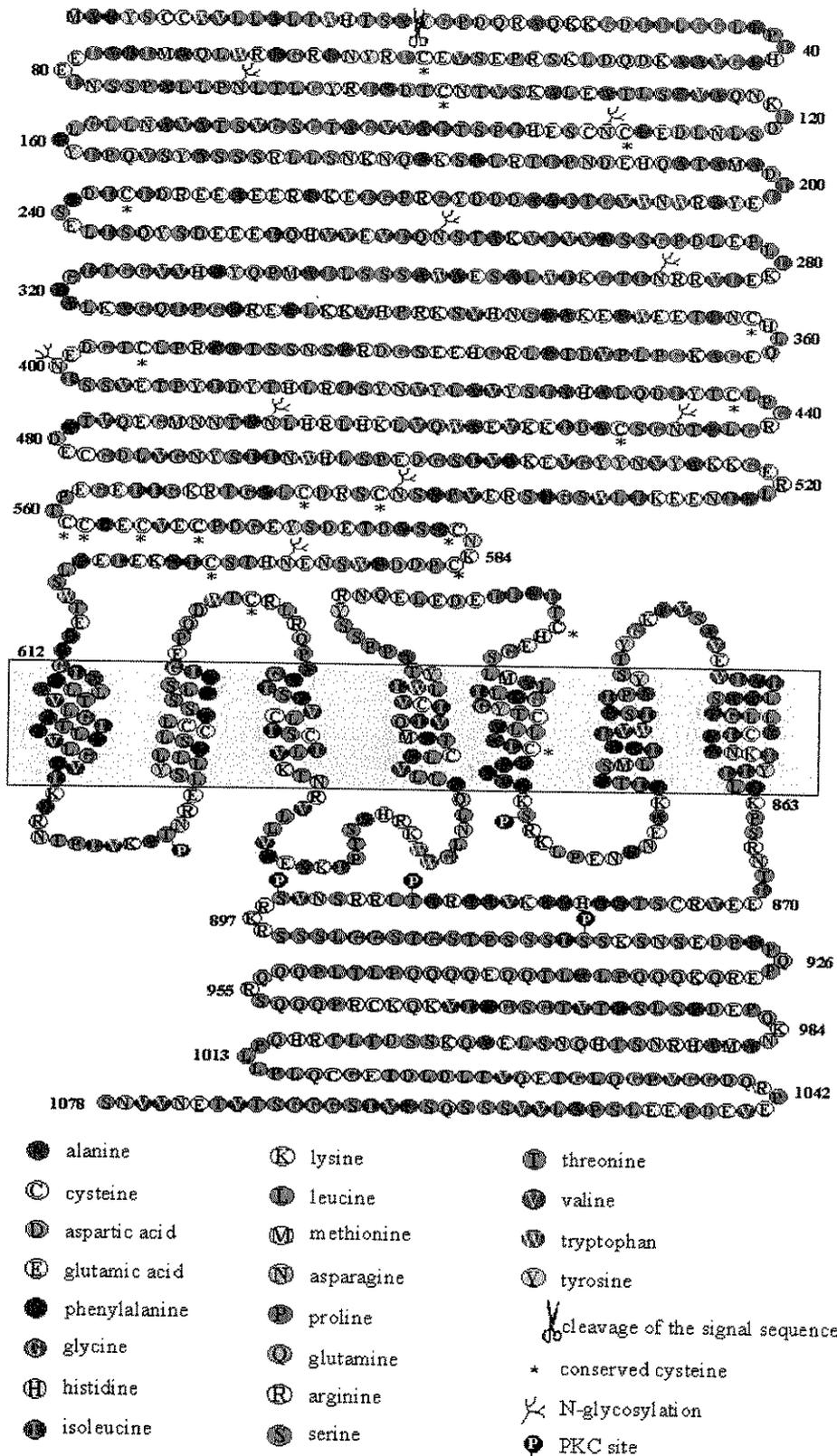


Figura 1. Topologia do receptor sensor de cálcio.

Dimerização do receptor sensor de cálcio

BAI et al. (1998a) demonstrou que o CASR se apresenta na superfície celular das células HEK-293 transfectadas, na maioria das vezes, em sua forma dimérica. Esses dímeros do CASR são ligados por pontes dissulfídicas e a inclusão de agentes redutores são capazes de converter o dímero para monômero em gel SDS-PAGE (BAI et al., 1998).

As cisteínas relevantes envolvidas nas pontes dissulfídicas intermoleculares, tanto no CASR quanto nos mGluRs, estão localizadas no ECD (GOLDSMITH et al., 1999). No mGluR5, especificamente, essas cisteínas estão localizadas dentro dos 17 kDa da região amino-terminal do ECD (ROMANO et al., 1996), onde promovem a formação de homodímeros via ligações dissulfídicas intermoleculares. Dessa forma, devido à homologia entre esses receptores (mGluRs e CASR), sugere-se a possibilidade de que o CASR também possa dimerizar da mesma maneira (ROMANO et al., 1996). Além disso, vários outros GPCRs com menor relação estrutural têm demonstrado formar homodímeros, incluindo o receptor muscarínico, o receptor β_2 -adrenérgico, o receptor do glucagon, e o receptor δ -opióide (BAI et al., 1998).

Um estudo de mutagênese sítio-dirigida no CASR, o qual promoveu a troca de 19 resíduos de cisteínas para serina no ECD, demonstrou que 14 dessas cisteínas (C^{60} , C^{101} , C^{236} , C^{358} , C^{395} , C^{542} , C^{546} , C^{561} , C^{562} , C^{565} , C^{568} , C^{582} , C^{585} , C^{598}) são essenciais para a expressão normal do receptor na superfície celular, e para o funcionamento normal do receptor em resposta à ativação pelo cálcio extracelular, evidenciando um erro na estrutura tridimensional protéica e retenção intracelular dos receptores mutados (FAN et al., 1998). Dessa forma, sugere-se que esta região represente a interface dimérica para o receptor e que mutações de resíduos dentro dessa interface promovem mudanças importantes na resposta do receptor ao Ca^{2+} (FAN et al., 1998). Outro estudo de mutagênese sítio-dirigida, realizado por PACE et al. (1999), revelou que a troca de ambas as Cisteínas, C^{101} e C^{236} , por Serinas promove a eliminação total da

dimerização, mas mantém a dimerização não-covalente. A mutação combinada, C¹²⁹S/C¹³¹S, elimina a maioria das ligações dissulfídicas intermoleculares e as substituições de ambas as cisteínas são necessárias para a ruptura da interação intermolecular covalente (RAY et al., 1999). ZHANG et al. (2001), em um estudo posterior, demonstra resultados consistentes com o estudo realizado por Ray *et al* com relação às Cisteínas 129 e 131, entretanto, não mostrou concordância em relação à duas mutações, C¹⁰¹S e C²³⁶S, demonstrando que estas interferem substancialmente com a expressão do receptor quando presentes individualmente ou em combinação, mas não eliminam a dimerização mediada por pontes dissulfídicas. Além disso, foi verificado que o CASR dimeriza até mesmo na ausência de ligação dissulfídica covalente, podendo também dimerizar através de interações hidrofóbicas não-covalentes (ZHANG et al., 2001), como ocorre, por exemplo, com o receptor β_2 -adrenérgico (HEBERT et al., 1996).

O modelo molecular do ECD utilizando a estrutura cristalográfica do mGluR1 como padrão sugeriu que as leucinas conservadas na interface dimérica do mGluR1 podem ser importantes para interações hidrofóbicas nesses dois receptores. Acredita-se que a Leu¹¹² e Leu¹⁵⁶ nessa interface dimérica são essenciais para a dimerização do CASR através de interações hidrofóbicas não-covalentes e reconstituição funcional (BAI, 2004).

Complementaridade funcional através da dimerização no CASR

O CASR com a C¹²⁹ e a C¹³¹ trocadas por Serinas é substancialmente mais sensível ao Ca_o²⁺ do que o receptor nativo, sugerindo que essas cisteínas não são essenciais para a dimerização desse receptor, mas estão relacionadas ao constrangimento do mesmo para cooperar na manutenção de sua forma inativa através de pontes dissulfídicas (RAY et al., 1999). Além disso, a co-expressão de dois mutantes inativos do CASR, cada qual com atividade reduzida ou ausente, resulta na formação de heterodímeros com uma reconstituição parcial da

sinalização dependente de cálcio extracelular, sugerindo a importância de interações intermoleculares na função do receptor (BAI et al., 1999). A co-expressão de um CASR contendo uma mutação no ECD com outro CASR apresentando mutações no i3 e/ou na cauda C-terminal geralmente resulta em um aparente ganho de função (BAI et al., 1999). Assim sendo, a sinalização intracelular nesses heterodímeros deve ocorrer através do domínio i3/cauda C-terminal normal do CASR co-expresso (BAI et al., 1999). Um mecanismo possível para esse tipo de complementação funcional é a troca de domínios proposta por *Gouldson e Reynolds* (1997). Sugere-se, portanto, que o CASR consiste de pelo menos dois domínios funcionais separados, um compreendendo o ECD e outro que inclui o i3 e a cauda C-terminal (BAI et al., 1999). Além disso, um domínio normal do CASR pode ser afetado negativamente pela presença de um domínio anormal em um receptor heterodimérico. Foi verificado, entretanto, que a co-transfecção de vários CASRs mutantes carregando mutações distintas no ECD com o mesmo receptor truncado na cauda C-terminal, resulta em diferente afinidade pelo agonista (BAI et al., 1999).

Locais de interação do CASR com o íon Ca^{2+}

O CASR apresenta várias regiões altamente ácidas dentro do seu domínio extracelular que são similares às que estão envolvidas na ligação de íons cálcio nas proteínas ligadoras de cálcio de baixa afinidade. Estas regiões se localizam entre os aminoácidos 216-251 e 557-611 no domínio N-terminal extracelular, e em um segmento ácido curto na segunda alça extracelular do CASR e podem estar potencialmente envolvidas na ligação do Ca_0^{2+} e outros cátions polivalentes (BROWN et al., 1993).

A primeira evidência direta de que o Ca_0^{2+} se une ao ECD do CASR foi fornecido por estudos usando receptores quiméricos, expressos em oócitos de *Xenopus laevis*, nos quais o ECD tanto do CASR quanto do mGluR foi fusionado com o TMD/cauda C-terminal do

outro receptor (HAMMERLAND et al., 1999). O receptor quimérico contendo o ECD do CASR e TMD/cauda C-terminal do mGluR1a foi ativado por alta $[Ca_o^{2+}]$, mas não por agonistas do mGluR. Ao contrário, o receptor quimérico contendo o ECD do mGluR e TMD/cauda C-terminal do CASR foi ativado pelo glutamato, mas não por alta $[Ca_o^{2+}]$. Além disso, poliaminas, tais como a neomicina, também mostraram interagir com o CASR via ECD. No entanto, íons trivalentes, como o Gd_o^{3+} , se ligam não somente ao ECD, mas também ao TMD do receptor (HAMMERLAND et al., 1999). Posteriormente, um receptor quimérico compreendendo o ECD do CASR e o TMD/cauda C-terminal do mGluR1a foi ativado pelo Ca_o^{2+} , Mg_o^{2+} e Ba_o^{2+} com valores de EC_{50} muito similares ao do receptor nativo. Esse estudo confirma que o Ca_o^{2+} age no CASR através de sua ligação ao ECD e que outros íons divalentes também são capazes de ativar o ECD do receptor (BRAUNER-OSBORNE et al., 1999). Além disso, os resíduos de serina em posições homólogas aos do mGluR1a, que se unem ao glutamato, também são importantes para as respostas promovidas pelo Ca_o^{2+} via CASR. Dessa forma, pôde-se concluir que a união do Ca_o^{2+} no CASR envolve as serinas nas posições 147 e 170 (BRAUNER-OSBORNE et al., 1999).

Até o presente, não existem ensaios para verificar a ligação do Ca_o^{2+} no CASR. Entretanto, a identificação de determinantes dentro do ECD, os quais são importantes para a união do Ca_o^{2+} , têm permitido a medida do aumento de Ca_i^{2+} ou da atividade da PLC (medida pelo acúmulo de IP_3) promovidos pelo Ca_o^{2+} alto (BAI, 2004). E embora o sítio de união do ligante no CASR esteja no ECD, os resíduos específicos envolvidos na ativação mediada pelo Ca_o^{2+} não estão localizados precisamente (HOFER e BROWN, 2003).

Finalmente, sendo o Ca_o^{2+} o principal ativador fisiológico do CASR, não se pode excluir a possibilidade da existência de outros ligantes endógenos altamente específicos para o CASR que ainda não foram identificados (HOFER e BROWN, 2003).

Sinalização do CASR

Em vários tipos de células, o CASR tem sido relacionado com a regulação de diversos processos celulares, tais como secreção, quimiotaxia, apoptose, proliferação, diferenciação e atividade de canal iônico. Como é o caso de muitos receptores de superfície celular, a ligação do agonista ao CASR resulta na ativação de toda uma rede de sinalização no interior da célula, a qual permite que um único mensageiro extracelular direcione numerosas funções intracelulares (HOFER e BROWN, 2003).

As elevações no cálcio extracelular promovem um aumento nas concentrações de cálcio intracelular geradas por interações entre o CASR e fosfolipase C (PLC), as quais são mediadas pelas subunidades $G\alpha_q$ ou $G\alpha_{11}$ das proteínas G heterotriméricas. Essas interações resultam na hidrólise do fosfatidilinositol 1-4,5-bisfosfato (PIP_2) pela PLC para formar inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (Fig. 2). A conseqüente liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares promovido pelo IP_3 é um importante mediador da sinalização intracelular do CASR, causando a inibição da secreção de PTH através de mecanismos que permanecem por serem completamente definidos (DARE et al., 1998). O CASR também interage diretamente com a $G\alpha_i$, o que resulta na inibição da adenilato ciclase e redução dos níveis celulares de AMPc (DARE et al., 1998; HOFER e BROWN, 2003). Assim como outros GPCRs que agem através de $G\alpha_i$ e $G\alpha_{q/11}$, o CASR estimula a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAPKs), tais como as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) 1/2 e quinase Jun amino-terminal (JNK) (HOFER e BROWN, 2003).

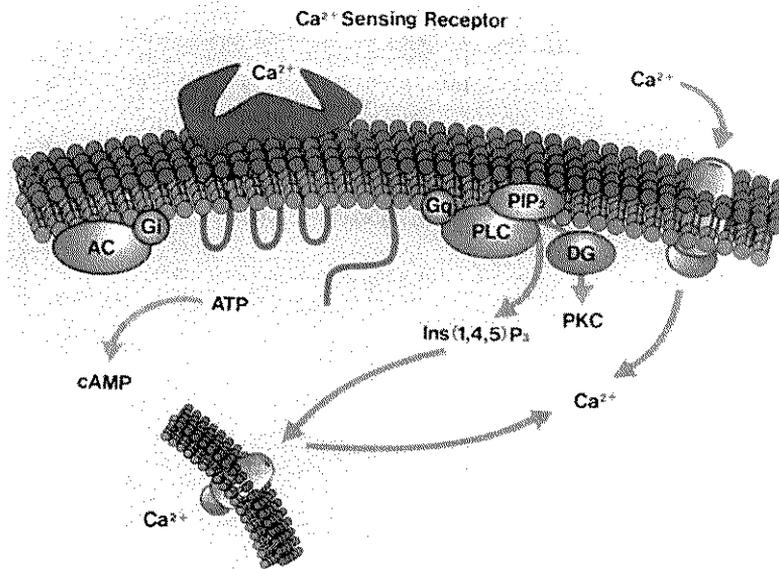


Figura 2. Via de transdução do sinal do CASR; aumentos nas $[Ca_o^{2+}]$ ativam o CASR que acopla a $G\alpha_q$ levando à ativação de PLC seguida pela formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) enquanto o IP_3 eleva a $[Ca_i^{2+}]$ através da liberação de cálcio dos estoques intracelulares e aumento da captação de cálcio extracelular. O aumento na $[Ca_i^{2+}]$ contribui para a sinalização intracelular causando a inibição da secreção de PTH. O CASR também apresenta uma via de sinalização na qual acopla com $G\alpha_i$ em alguns tipos de células. Reproduzido de (BROWN et al., 1995).

Papel do domínio extracelular na ativação do CASR

A identificação de mutações ativadoras e inativadoras no CASR têm fornecido evidências para a informação estrutural e para a relevância fisiológica da função do CASR. Até o momento, já foram identificadas mais de 100 mutações que ocorrem naturalmente no CASR e promovem um impacto funcional neste receptor. As mutações inativadoras estão associadas com a hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) e ocasionalmente com o hiperparatireoidismo neonatal grave (NSHPT), em sua forma heterozigótica e homozigótica, respectivamente. As mutações ativadoras estão associadas com a hipocalcemia autossômica dominante (ADH) (BAI, 2004).

As mutações no CASR se encontram, em sua maioria, agrupadas nos 300 aminoácidos iniciais do ECD e também entre a região transmembrana e o domínio intracitoplasmático

(HENDY et al., 2000). Consistente com a noção de que o ECD do receptor é o sítio de ligação do Ca_o^{2+} , a maioria das mutações que ocorre naturalmente nesse domínio afeta somente a afinidade do receptor pelo Ca_o^{2+} . É possível que essas mutações alterem os resíduos de aminoácidos em contato direto com o Ca_o^{2+} ou o microambiente de um ou mais sítios de ligação do Ca_o^{2+} . Algumas mutações no ECD podem causar uma alteração mais grosseira na estrutura do receptor, refletida pela diminuição da expressão do receptor na superfície celular (BAI, 2004).

Dessa forma, levantamos a hipótese de que mutações de aminoácidos que afetam a interação com o agonista provavelmente não resultarão em alterações no padrão de expressão do receptor, ao passo que mutações de aminoácidos responsáveis pela estrutura tridimensional, possivelmente resultarão em mudança conformacional podendo não conseguir se expressar na membrana celular. Além disso, também hipotetizamos que a presença de uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos no domínio extracelular (aminoácidos 139-167) e altamente conservada entre todos os membros da subfamília dos receptores metabotrópicos do glutamato representa um sítio em potencial para interações entre o domínio extracelular e transmembrana em seu mecanismo de ativação, pois regiões hidrofóbicas tendem a se esconder na camada lipídica da membrana. Assim, a deleção da região citada acima poderia também resultar em uma mudança conformacional no CASR que pode ser capaz de interferir na sua expressão e/ou função. Esse estudo demonstra, portanto, a importância de certas posições (aminoácidos) na estrutura do CASR possibilitando um maior entendimento sobre a mesma.

Objetivo

Objetivo principal

- Avaliar a expressão do receptor sensor de cálcio com mutações e deleção em regiões do domínio extracelular.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do receptor sensor de cálcio com alteração na estrutura, polaridade ou caráter ácido/base através de mutações pontuais nas seguintes posições: 55, 116, 118, 127, 128, 138.
- Avaliar a expressão do receptor sensor de cálcio com deleção da região hidrofóbica entre os aminoácidos 139 e 167.

Material e Métodos

Material e Métodos

1. Construção do vetor de expressão do CASR

O cDNA do CASR nativo (GenBank X81086) contendo sítios de restrição enzimática para Hind III e Xba I foi gentilmente doado pelo Dr. Geoffrey N. Hendy (McGill University). Esse cDNA foi inserido no vetor pcDNA3.1 (vetor específico para transfecção em células de mamíferos) e a sua presença 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 - Promega, 1 μ L de tampão Promega) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, o produto dessa digestão foi visualizado em gel de agarose 0.7% corado com brometo de etídeo e a imagem foi registrada em Polaroid (Amershan Pharmacia Biotech). 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) das mutagêneses sítio-dirigidas.

2. Preparação de Bactérias Competentes

Para a preparação de células competentes, a bactéria *E. coli* DH5 α utilizada nas transformações foi inoculada em 5 mL de meio LB (Meio de Luria Bertani - 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 ressuspenso em 5 mL de solução de cloreto de cálcio 0.1M estéril a 4°C e incubado no gelo

por 40 minutos. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de bactérias foi ressuscitado em 1 mL de TBF2 (Mops 0.01M pH 7.0, CaCl₂ 0.075M, KCl 0.01M, Glicerol 15%) e armazenado em alíquotas a -70°C até o momento da transformação.

3. 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 e 100 µg/µL de ampicilina (antibiótico específico para o vetor pcDNA3.1), e incubada a 37°C por 16 h.

4. Extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina

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 (MANIATIS et al., 1989). Para a extração, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugada por 30 segundos a 12,000 x g e o precipitado foi ressuscitado 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, para promover 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 12,000 $\times g$, 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 12,000 $\times g$ 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 12,000 $\times g$ 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.

5. Criação de mutações

As mutagêneses sítio-dirigidas foram realizadas 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 do CASR nativo e os 12 ciclos de extensão foram realizados utilizando a *Pfu* Turbo DNA polimerase, seguida de digestão do cDNA do CASR nativo com a enzima DpnI. Foram inseridas mutações nas diferentes bases do códon de interesse criando receptores contendo características diferentes em determinadas posições. 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 foram cultivadas em minipreparações e o DNA foi extraído pelo método de lise alcalina como descrito previamente. A presença da inserção correta no DNA extraído foi confirmada através de seqüenciamento direto. Larga escala de cDNAs mutados foram então preparados (HISpeed Plasmid Midi Kit® -Qiagen) para transfecções transitórias em células renais embrionárias humanas (HEK-293). Os seguintes “primers” (sense e antisense) foram utilizados para as mutagêneses dirigidas. As bases sublinhadas indicam o códon em que foi inserida a mutação.

Posição 55 (Prolina → Serina)

Primer 55F: 5' GAT CTC AAA TCA AGG TCG GAG TCT GTG GAA TG 3'

Primer 55R: 5' CAT TCC ACA GAC TCC GAC CTT GAT TTG AGA TC 3'

Posição A116T (Alanina → Treonina)

Primer 116F: 5' GAA GCC ACC CTG AGT TTT GTT ACT CAA AAC AAA ATT GAT TCT TTG 3'

Primer 116R: 5' CAA AGA ATC AAT TTT GTT TTG AGT AAC AAA ACT CAG GGT GGC TTC 3'

Posição N118S (Asparagina → Serina)

Primer 118F: 5' CC ACC CTG AGT TTT GTT GCT CAA AGC AAA ATT GAT TCT TTG AAC C 3'

Primer 118R: 5' G GTT CAA AGA ATC AAT TTT GCT TTG AGC AAC AAA ACT CAG GG T GG 3'

Posição E127K (Glutamato → Lisina)

Primer 127F: 5' GAT TCT TTG AAC CTT GAT AAG TTC TGC AAC TGC TCA G 3'

Primer 127R: 5' C TGA GCA GTT GCA GAA CTT ATC AAG GTT CAA AGA ATC 3'

Posição F128Y (Fenilalanina → Tirosina)

Primer 128F: 5' CT TTG AAC CTT GAT GAG TAC TGC AAC TGC TCA GAG 3'

Primer 128R: 5' CTC TGA GCA GTT GCA GTA CTC ATC AAG GTT CAA AG 3'

Posição 138 (Treonina→Lisina)

Primer 138F: 5' GAG CAC ATT CCC TCT AAG ATT GCT GTG GTG GG 3'

Primer 138R: 5' CCC ACC ACA GCA ATC TTA GAG GGA ATG TGC TC 3'

Posição Deleção 139-167

Primer F: 5' GCA CAT TCC CTC TAC – GCC TCC TCC AGC AGA C 3'

Primer R: 5' G TCT GCT GGA GGA GGC – CGT AGA GGA ATC TGC 3'

6. Seqüenciamento

Para o seqüenciamento direto, foram utilizados os mesmos primers usados para a amplificação. Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 2µL (aproximadamente 10ng) do PCR purificado, 1µL de primer à 5pmol, 2µL de “save money” (MgCl₂ 1M, Tris-HCl 1M pH 9.0 e Água estéril), 2µL de big dye (Applied Biosystem - versão 2) para um volume final de 10µL. O ciclo foi realizado utilizando o termociclador Mastercycler Eppendorf e 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 o qual inclui 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 80µL de etanol 100% e após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente esse produto foi submetido a uma centrifugação de 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150µL de etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado permaneceu à temperatura ambiente por uma hora para secar. As amostras foram encaminhadas ao Hemocentro da Unicamp, onde é utilizado o seqüenciador de DNA ABIPrism 377.

Os dados coletados foram processados através de um computador que gerou um cromatograma. Esses cromatogramas foram transformados em arquivos texto e submetidos ao BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool - programa computacional de busca de homologia) e comparados com a seqüência do receptor sensor de cálcio nativo (Genbank – X81086.1/HSPCAR1 H. sapiens PCaR1 gene). A comparação entre a seqüência do receptor sensor de cálcio nativo e a gerada pelo BLAST identificou as mudanças das bases e a deleção de aminoácidos.

7. Cultura de células e transfecção transitória

Os estudos de transfecções transitórias dos cDNAs com as mutações foram realizados em células embrionárias renais humanas (HEK-293, American Type Culture Collection - RL-573), linhagem que não expressa o receptor sensor de cálcio. 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 células foram lavadas com DMEM sem soro e sem antibiótico. Para a formação do complexo DNA-Polyfect®, 4 µg de DNA, 40 µL de Polyfect® Transfection Reagent (Qiagen) e 150 µL de meio DMEM sem soro e sem antibiótico 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.

8. Preparação do 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 5µg/µL, Pepstatina 5µg/µL, PMSF 25µg/µL, NP-40 1%, Sodium Desoxycholate 0,5%) e incubadas por 5 minutos. Após homogeneização e centrifugação a 12,000 x 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 60µg 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 foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas e imobilizadas em membrana PVDF. As ligações inespecíficas foram bloqueadas através da incubação em PBS-Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite desnatado por 12 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-CASR denominado ADD (gentilmente cedido pelo Dr. Omar Magid Hauache, UNIFESP, São Paulo) contra um peptídeo sintético correspondentes aos resíduos 214-235 do CASR humano, diluição 1:10000. Este procedimento foi realizado em PBS-T sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. Após 4 lavagens em PBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase do rábano silvestre (Jackson Immunoresearch, diluído 1/4.500) sob agitação por 2 horas em PBS-T.

Finalmente, após 4 lavagens com PBS-T, a proteína do CASR foi detectada através do sistema de quimioluminescência ECL (Amersham Biosciences), com revelação em filme de raio X. As mesmas membranas marcadas com o anticorpo contra o CASR foram posteriormente marcadas com o anticorpo anti- β tubulina (Oncogene) em uma diluição 1:1000 (gentilmente doado pelo Dr. Kleber Gomes Franchini). Este procedimento foi realizado como um controle interno para a normalização da quantidade de proteína depositada em cada coluna do gel de poliacrilamida. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase do rábano silvestre (Jackson Immunoresearch, diluído 1/4000) e submetido à quimioluminescência.

9. Avaliação do grau de expressão dos receptores mutados

O grau de expressão dos diferentes receptores mutados foi analisado através da densitometria das bandas, comparando as intensidades das bandas referentes aos receptores mutados com as bandas do receptor nativo, utilizando o programa “Imagemaster” (Amersham Biosciences). Os valores utilizados foram aqueles corrigidos, ou seja, a razão entre o valor do CASR nativo ou com mutações e o valor obtido com a β tubulina.

10. Análise estatística

O teste utilizado para a análise estatística deste trabalho foi o de Mann Whitney, realizado através das medianas das amostras de três experimentos separados. Os valores com $p < 0.05$ são considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Resultados

Inserção do CASR nativo no vetor pcDNA3.1

A inserção do cDNA do CASR nativo no vetor pcDNA3.1 foi analisada através de seu perfil enzimático (Hind III e Xba I). Essa ligação ocorreu de forma satisfatória, pois verificamos a presença de duas bandas nos tamanhos de ~5.4 Kb e ~3.2 Kb que correspondem ao vetor e ao cDNA do CASR nativo, respectivamente (Fig. 3). O receptor sensor de cálcio nativo inserido no vetor pcDNA3.1 serviu como molde para todas as mutagêneses sítio-dirigidas.

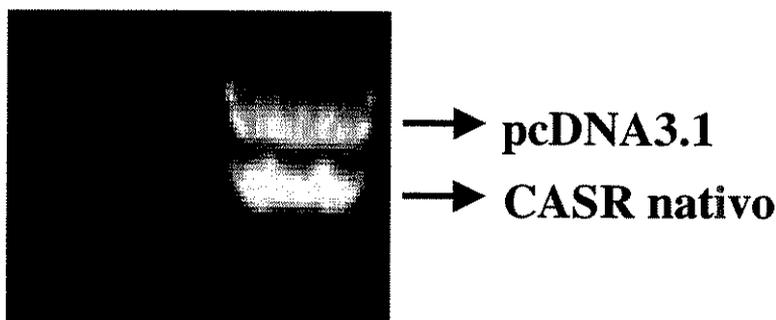


Figura 3. Digestão da ligação do vetor de clonagem pcDNA3.1 com o cDNA do CASR nativo através das enzimas de restrição Hind III e Xba I. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0.7% contendo brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta. A banda superior de 5.4 Kb corresponde ao vetor pcDNA3.1 e a banda inferior de 3.2 Kb corresponde ao cDNA do CASR nativo. Marcador 1Kb (Fermentas).

Criação *in vitro* de mutações no CASR

As sete mutações criadas *in vitro* no cDNA do CASR nativo foram realizadas em locais onde já foram descritas mutações tanto ativadoras quanto inativadoras, causadoras de hipocalcemia autossômica dominante (ADH) ou hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) e hiperparatireoideísmo neonatal grave (NSHPT), respectivamente. Foram mutados pontualmente os seguintes aminoácidos: 55, 116, 118, 127, 128, 138. Além dessas mutações,

também promovemos a deleção dos aminoácidos 139 à 167, uma região altamente hidrofóbica e que ainda não foi estudada. Essas posições foram escolhidas com o objetivo de verificarmos o efeito da mutação na expressão do CASR comparado ao CASR nativo, quando deletamos uma região altamente hidrofóbica (aa 139-167) presente no ECD ou mudamos a estrutura, polaridade ou o caráter ácido/base dos aminoácidos.

O aminoácido correspondente à posição 55 foi alterado de Prolina, um aminoácido hidrofóbico, para Serina, um aminoácido hidrofílico (Fig. 4). Na posição 116 promovemos a troca de Alanina para Treonina, trocando também um aminoácido hidrofóbico por um hidrofílico (Fig. 5). Na posição 118 não foram alteradas as características do aminoácido, mas apenas o tamanho do aminoácido, trocando Asparagina por Serina (Fig. 6). Na posição 127, a troca de Ácido Glutâmico para Lisina promoveu a mudança de um aminoácido hidrofílico ácido para um hidrofílico altamente básico (Fig. 7). Na posição 128 ocorreu a troca de Fenilalanina, um aminoácido altamente hidrofóbico, para Tirosina que apresenta característica hidrofílica (Fig. 8). Na posição 138 ocorreu a substituição de Treonina por Lisina, resultando na troca de um aminoácido hidrofílico neutro para um aminoácido hidrofílico básico (carregado positivamente) (Fig. 9). Além dessas mutagêneses pontuais, deletamos a região hidrofóbica entre os aminoácidos 139 a 167 no domínio extracelular (Fig. 10).

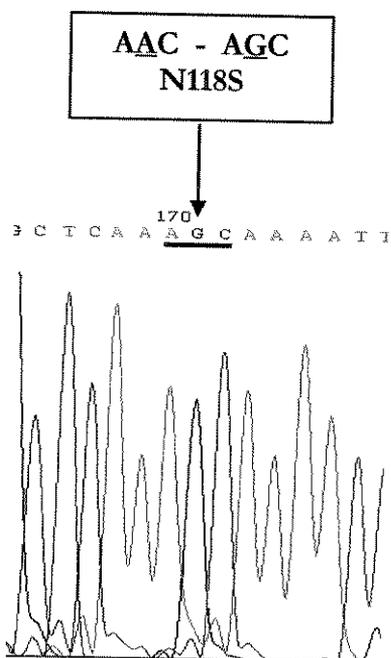
Mutação N118S (Asparagina – Serina)

Figura 6. Sequenciamento direto do cDNA do CASR com a mutação *c.354 N>S*. Confirmação da substituição de aminoácidos na posição 118 (N118S).

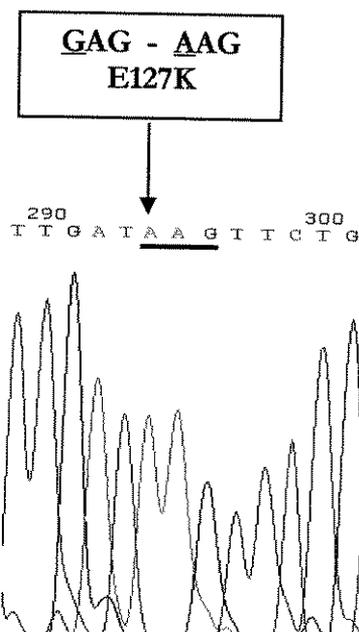
Mutação E127K (Ácido Glutâmico – Lisina)

Figura 7. Sequenciamento direto do cDNA do CASR com a mutação *c.381 E>K*. Confirmação da substituição de aminoácidos na posição 127 (E127K).

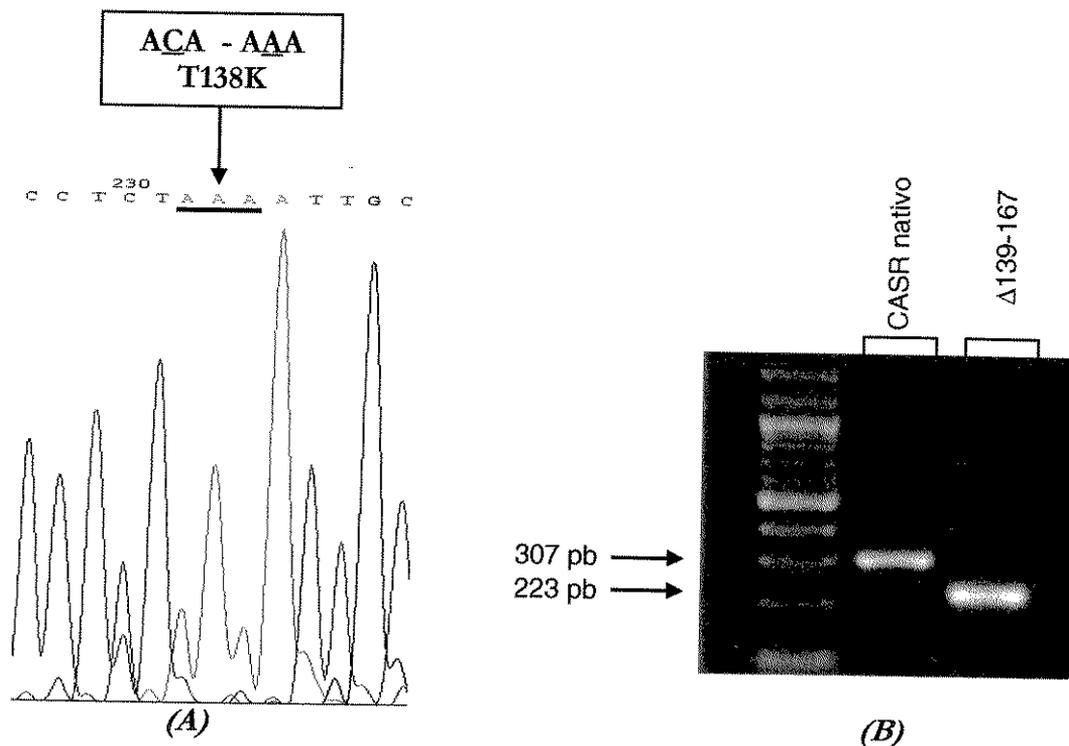
Deleção 139-167

Figura 10. (A) Sequenciamento direto do cDNA do CASR com a deleção dos aminoácidos 139 a 167. (B) PCR do cDNA do receptor sensor de cálcio nativo e com deleção da porção hidrofóbica do domínio extracelular, onde 84 pares de bases foram deletados. Marcador 100 pb (Fermentas).

Expressão do CASR com mutações

Expressão dos receptores mutados

A técnica de Western blotting nos permitiu observar que todos os receptores mutados transfectados em células HEK-293 se expressaram na superfície celular em três experimentos realizados separadamente. Foram visualizadas três bandas correspondentes à proteína do CASR: uma banda de 140 kDa que corresponde à forma imatura, parcialmente glicosilada e sensível a EndoH, uma banda de 160 kDa que corresponde à forma madura, totalmente glicosilada e bandas superiores de ~220 kDa e maiores que correspondem às formas diméricas e oligoméricas. Estas bandas foram visualizadas para todas as mutações, entretanto

observamos uma drástica redução na expressão das formas oligoméricas no receptor mutado na posição P55S, enquanto que os outros receptores mutados (A116T, N118S, E127K, F128Y, T138K e Δ 139-167) apresentaram um padrão de expressão similar ao do CASR nativo (Fig. 11).

Para uma análise semi-quantitativa da expressão de todos os receptores, realizamos a densitometria das bandas de 140 e 160 kDa de cada amostra nos três experimentos. Uma vez obtidos esses valores, a quantidade de proteína em cada coluna foi normalizada pela densidade da banda da β -tubulina, marcando as mesmas membranas com um anticorpo anti- β -tubulina, uma proteína constitutiva (Fig. 12). Este procedimento permitiu a correção de todos os valores, os quais foram obtidos através da razão entre o valor da intensidade da expressão do CASR nativo ou com mutações e o valor da intensidade da expressão da β tubulina.

A tabela 1 mostra os valores corrigidos das medianas referentes aos três experimentos para cada amostra. Na análise estatística, comparando os valores das intensidades das bandas de 140 e 160 kDa do CASR nativo e dos receptores mutados não obtivemos diferenças estatisticamente significantes para uma redução ou aumento da expressão (Tabela 2). As comparações entre as bandas monoméricas do CASR nativo e dos receptores mutados podem ser visualizadas nos gráficos abaixo (Fig. 13 e 14).

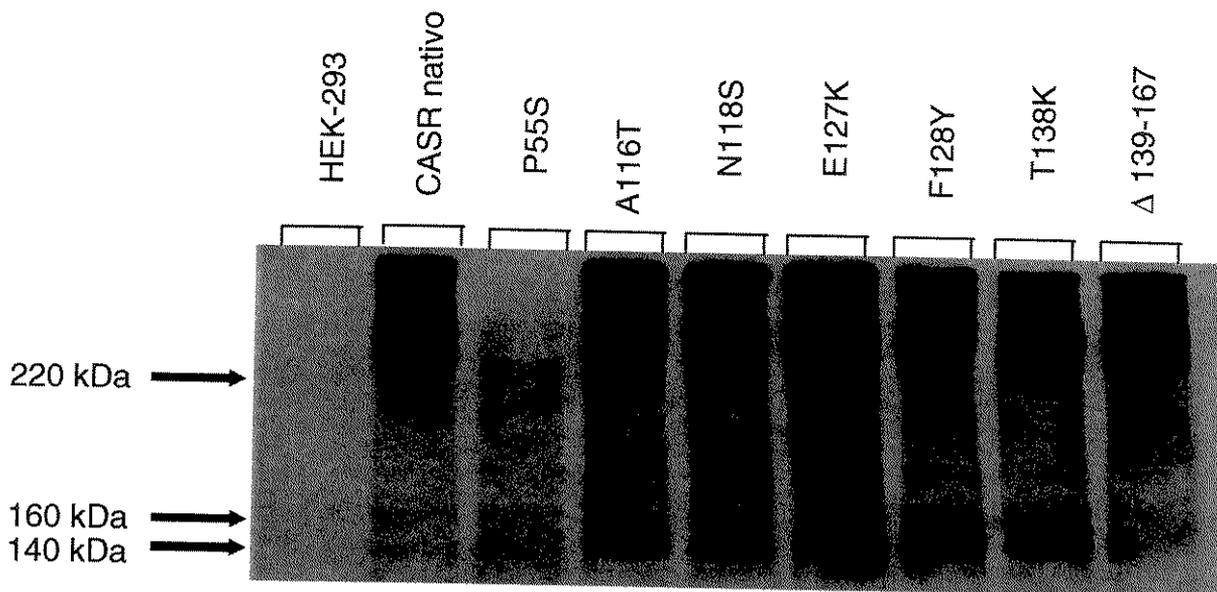


Figura 11. Western blotting indicando a expressão do CASR nativo e com mutações no ECD, 60 μ g de extrato protéico total. Anticorpo monoclonal anti - CASR. Marcador Kaleidoscope (Biorad®).

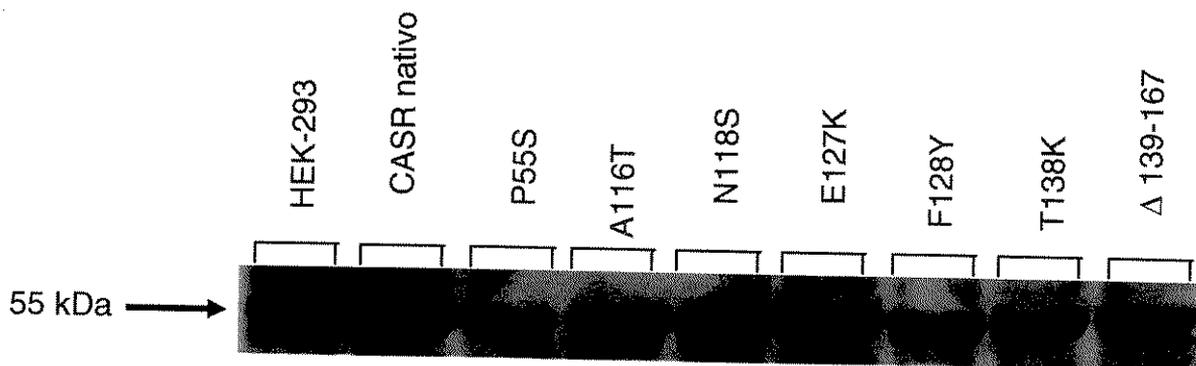


Figura 12. Western blotting indicando a expressão da β -tubulina usada como controle interno para correção dos valores obtidos com a expressão do CASR nativo e com mutações. Anticorpo policlonal anti - β tubulina. Marcador Kaleidoscope (Biorad®).

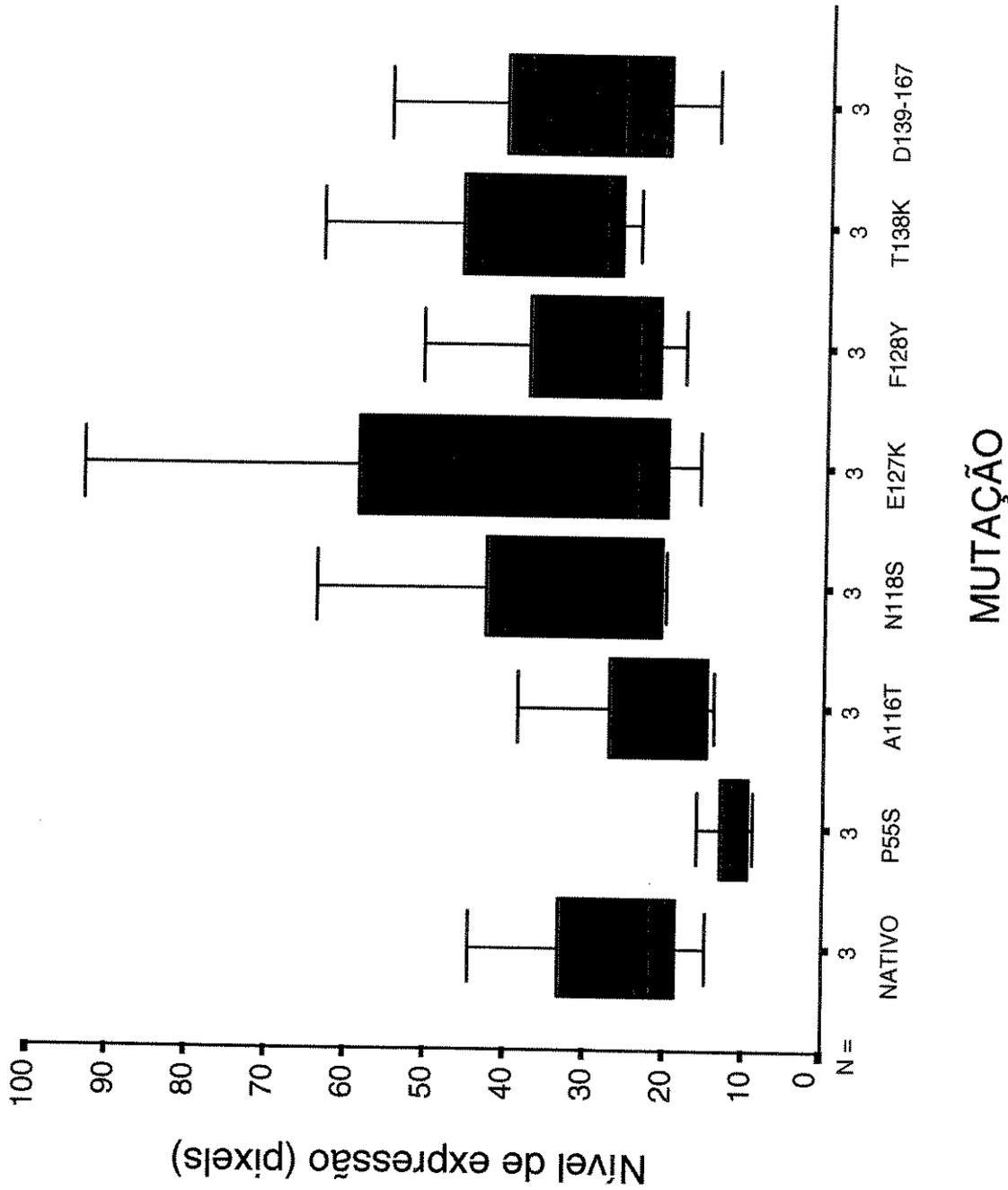


Figura 13. Gráfico representativo da densitometria das bandas de 140 kDa do CASR nativo e com mutações corrigida pela expressão da β -tubulina. As barras mostram as medianas referentes aos valores obtidos dos três experimentos e as linhas verticais representam o valor mínimo e máximo de cada amostra.

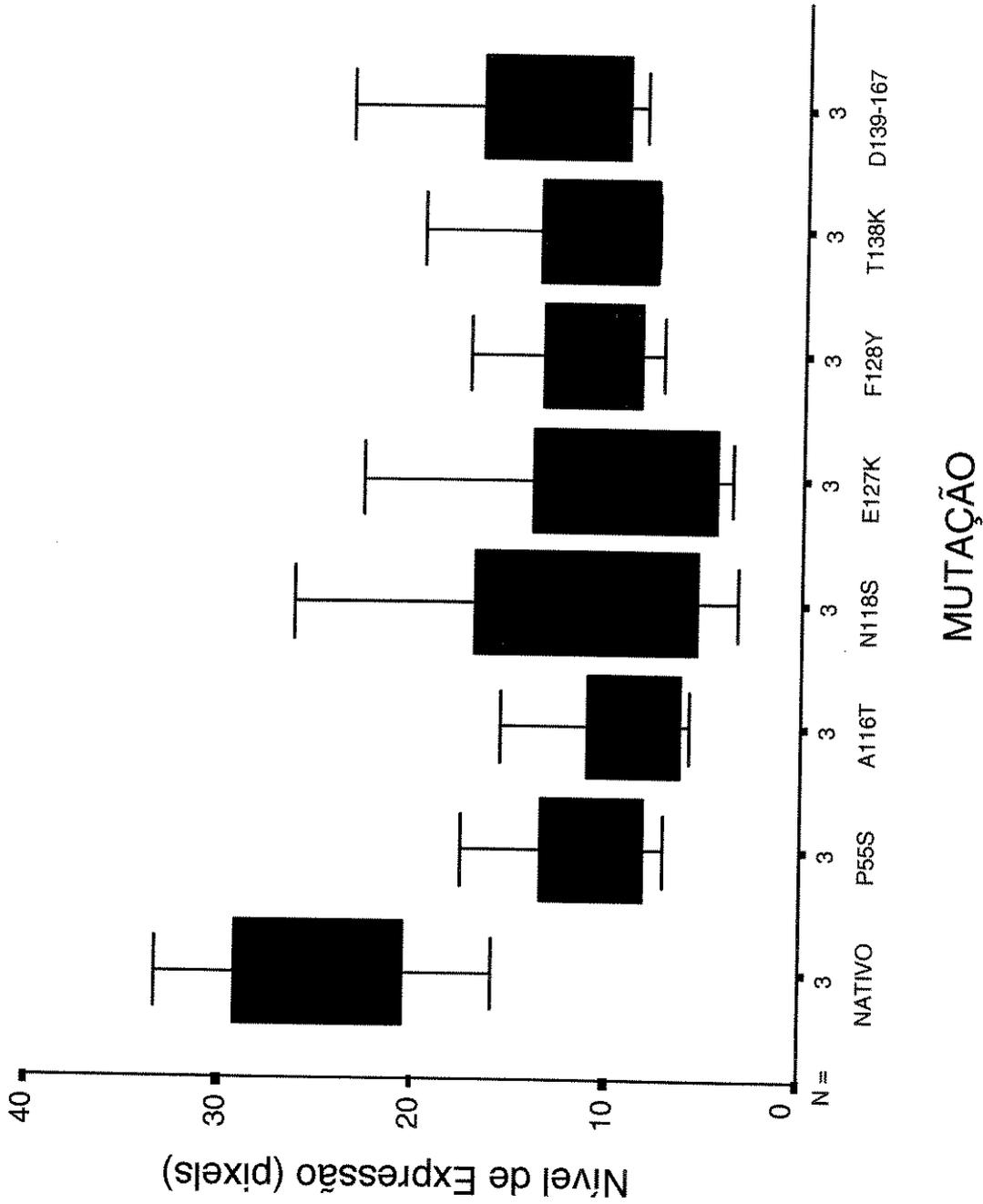


Figura 14. Gráfico representativo da densitometria das bandas de 160 kDa do CASR nativo e com mutações corrigida pela expressão da β -tubulina. As barras mostram as medianas referentes aos valores obtidos dos três experimentos e as linhas verticais representam o valor mínimo e máximo de cada amostra.

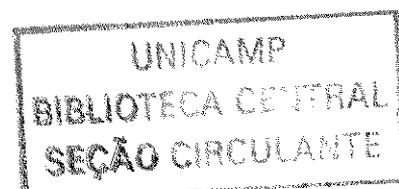
MUTAÇÕES	MEDIANA 140 kDa	MEDIANA 160 kDa
CASR nativo	22,28	25,09
P55S	10,13	9,33
A116T	15,46	6,57
N118S	21,14	7,54
E127K	24,28	5,25
F128Y	24,21	9,71
T138K	28,64	7,88
Del 139-167	26,55	10,22

Tabela 1. Medianas dos valores da densitometria referentes à intensidade de expressão (pixels) de todas as amostras. Esses valores foram analisados utilizando o teste estatístico de Mann Whitney.

COMPARAÇÃO DAS MUTAÇÕES	SIGN.EXATA 140 kDa	SIGN.EXATA 160 kDa
CASR nativo / P55S	0,2	0,2
CASR nativo / A116T	0,7	0,1
CASR nativo / N118S	1	0,4
CASR nativo / E127K	0,7	0,2
CASR nativo / F128Y	0,7	0,2
CASR nativo / T138K	0,4	0,2
CASR nativo / Del139-167	1	0,2

Tabela 2. Valores da significância exata (p) quando comparamos as medianas das densitometrias de todos os receptores mutados com o CASR nativo no Teste de Mann Whitney.

Discussão



Discussão

Expressão do CASR com mutações no domínio extracelular

As conseqüências das mutações no CASR podem alterar diretamente a afinidade do receptor pelo agonista, ou indiretamente por redução do grau de expressão do receptor na membrana celular seja por alterações na conformação da proteína e no processamento do receptor (CHOU et al., 1995). Assim, analisamos a expressão dos receptores mutados para verificar se essas substituições ou deleção promovem mudanças na estrutura terciária da proteína com conseqüente alteração na sua expressão.

Os receptores mutados foram criados *in vitro* através de mutagênese sítio-dirigida. Esta técnica permite a alteração de qualquer região de interesse, o que possibilita um estudo mais apurado do gene através da verificação da importância desse local na função natural da proteína, como a transcrição, expressão e funcionamento.

Para uma confirmação da expressão das proteínas detectadas por Western blotting, foi realizada a densitometria das bandas correspondentes às formas imatura e madura do CASR nativo e com mutações através do programa computacional ImageMaster (Amersham Biosciences). Para uma normalização da quantidade de proteína presente em cada coluna, os valores das densitometrias referentes a cada amostra foram corrigidos pelos valores da densitometria de uma proteína constitutiva, a β tubulina. Assim, garantimos a utilização de uma mesma quantidade de proteína do CASR nativo bem como dos receptores mutados para a comparação da expressão dos mesmos.

Expressão dos receptores mutados

Verificamos, através de nossos resultados, a expressão de todos os receptores mutados: P55S, A116T, N118S, E127K, F118Y, T138K e a deleção dos aminoácidos 139 a 167. Em todos eles estão presentes as bandas de 140 kDa e 160 kDa que representam as formas imatura (processada incompletamente) e madura (completamente processada) do receptor, respectivamente. A expressão das formas oligoméricas de aproximadamente 220 kDa, que são as formas dimerizadas relacionadas a uma melhor expressão na membrana celular, também foi observada em todos os receptores mutados com exceção do receptor mutado na posição P55S que apresentou uma drástica redução nessas formas. Através da densitometria e posterior análise estatística dos experimentos realizados, pudemos verificar um padrão de expressão similar de todos os receptores mutados em relação ao CASR nativo nas bandas monoméricas (140 e 160 kDa). Devido a alta concentração das bandas maiores (~220 kDa) no gel, não foi possível a detecção dessas bandas pela densitometria, no entanto foi muito visível a redução da expressão dessas formas no receptor mutado na posição 55, enquanto que nos outros receptores mutados a expressão das formas oligoméricas se apresentou similar ao CASR nativo pela análise do Western blotting.

Mutações naturais	Mutações <i>in vitro</i>
P55L	P55S
A116T	A116T
N118K	N118S
E127A / E127K	E127K
F128L	F128Y
T138M	T138K
-	Δ139-167

Tabela 3. Demonstração das mutações naturais descritas na literatura e das mutações deste trabalho realizadas *in vitro* através de mutagêneses sítio-dirigidas.

Pearce et al. (1995) demonstraram que a mudança na posição 55 do aminoácido Prolina de caráter hidrofóbico para Leucina que também apresenta caráter hidrofóbico promoveu uma perda de função (inativação) do receptor resultando em pacientes com FHH (Tabela 3). Em estudos posteriores, o receptor com essa mutação apresentou o mesmo grau de expressão do CASR nativo (PEARCE et al., 1996a) e ainda foi capaz de ser ativado por altas concentrações de agonistas mais potentes, sugerindo que essa mudança estrutural interfere somente na afinidade com o ligante, permitindo a expressão do receptor mutado na superfície celular e o acoplamento funcional para a via de sinalização intracelular (HEALTH et al., 1996). Em nosso trabalho, alteramos a polaridade do aminoácido na posição 55 promovendo a troca de Prolina por Serina, ou seja, a mudança de um aminoácido hidrofóbico para um hidrofílico. Obtivemos um padrão de expressão drasticamente reduzido desse receptor mutado em relação às formas diméricas e oligoméricas (~220kDa) quando comparado ao CASR nativo. Isto sugere que a hidrofobicidade na posição 55 é importante tanto para a expressão do receptor na superfície celular quanto para a ativação do receptor, pois este somente é ativado pelo cálcio extracelular quando se apresenta em sua forma dimérica (BAI et al., 1998). Além disso, a troca de Prolina por Serina na posição 55, além de mudar a polaridade, sugere também uma alteração da mobilidade, pois o anel presente na Prolina determina uma rigidez maior na estrutura do aminoácido nesta posição. Assim, essa troca pode alterar a conformação da proteína interferindo no processo de dimerização do receptor. No caso da expressão das formas monoméricas (140 e 160 kDa), o padrão de expressão desse receptor mutado foi similar ao do CASR nativo, ou seja, seus valores não se apresentaram estatisticamente significativos em relação ao último.

Baron et al. (1996) descreveu a mutação A116T onde o aminoácido Alanina (hidrofóbico) foi trocado por Treonina (hidrofílico), evidenciando uma associação com um

ganho de função do CASR (ADH) (Tabela 3). Um estudo posterior verificou o padrão de expressão do CASR com essa mesma mutação indicando uma expressão muito boa na superfície celular do receptor mutado quando comparado ao CASR nativo (HAUACHE et al., 2000). Em nosso trabalho, analisando a mesma mutação (A116T) pudemos verificar como o estudo anterior, uma expressão do receptor mutado similar a do CASR nativo. Isto sugere que uma alteração da polaridade na posição 116 do CASR não deve causar uma mudança conformacional no receptor, já que a expressão deste foi verificada na superfície celular. Entretanto, essa posição pode ser um sítio de ligação do agonista Ca^{2+} e essa alteração pode afetar a afinidade do receptor pelo cálcio com conseqüente interferência na função do receptor. Através da análise estatística, observamos a presença de $p = 0.1$ na banda de 160 kDa referente a essa mutação A116T, o que pode indicar uma tendência desta para uma redução na forma glicosilada, madura do receptor. Entretanto, é necessário a realização de um número maior de experimentos para verificar a ocorrência ou não de valores estatisticamente significativos para a banda de 160 kDa dessa mutação.

A mutação N118K foi descrita por (PEARCE et al., 1996b) onde a substituição de um aminoácido hidrofílico neutro (Asparagina) por outro hidrofílico altamente básico (Lisina), resultou em um ganho de função do receptor (ativação) associado a ADH (Tabela 3). Posteriormente, De Luca et al. (1997) estudaram a expressão do receptor com essa mutação (N118K) verificando uma diminuição no grau de expressão em relação ao CASR nativo. Isto sugere que a atividade máxima aumentada no receptor mutado é devido a um aumento na afinidade pelo Ca^{2+} . Em nosso trabalho, promovemos a troca de Asparagina por Serina, mantendo as mesmas características hidrofílicas neutras apenas mudando o tamanho do aminoácido, e verificamos um padrão de expressão similar ao do CASR nativo sem valores estatisticamente significantes para redução ou aumento da expressão das formas monoméricas.

Esse resultado sugere que somente uma mudança na estrutura do aminoácido na posição 118 não deve alterar a conformação da proteína, pois esta é capaz de se expressar na superfície celular tão bem quanto o CASR nativo. No entanto, esta mutação pode ser capaz de alterar a afinidade do CASR pelo Ca_0^{2+} , sendo necessário uma análise funcional para tal confirmação.

Pollak et al. (1994) descreveram a mutação E127A indicando que a substituição de Ácido Glutâmico (hidrofilico e ácido) por Alanina (hidrofóbico) promove um ganho de função do receptor associado com ADH (Tabela 3). Outra mutação na mesma posição, E127K, foi descrita por Lienhardt et al (2001) e também promove um ganho de função do receptor estando associada a ADH (Tabela 3). Esta mutação resultou da alteração do Ácido Glutâmico (hidrofilico e ácido) para Lisina (hidrofilico e altamente básico). Não foram realizados estudos de expressão com essas duas mutações. Em nosso estudo criamos a mutação E127K e verificamos um padrão de expressão similar ao CASR nativo sem valores com significância estatística para redução ou aumento de expressão das formas monoméricas. Esse resultado sugere que o caráter ácido/base na posição 127 especificamente não deve alterar a estrutura conformacional da proteína, pois o receptor mutado nesta posição se apresentou bem expresso na superfície celular quando comparado ao CASR nativo. Entretanto, como já foi descrito, a alteração do caráter ácido/base nessa posição promove um ganho de função do receptor, ou seja, essa mudança é capaz de alterar a afinidade do receptor pelo Ca_0^{2+} .

Pearce et al. (1996b) descreveram a mutação F128L, onde o aminoácido Fenilalanina (hidrofóbico e neutro) foi substituído por Leucina (hidrofóbico e neutro) (Tabela 3). Essa mutação está relacionada com ganho de função do receptor (ADH) e parece ser devido a uma mudança estrutural que é capaz de alterar o sítio de interação do ligante no receptor de tal forma que eleva a afinidade deste pelo Ca_0^{2+} , produzindo a ativação do CASR a concentrações de cálcio menores. Um estudo posterior de Hauache (2000), verificou uma leve redução da

expressão do receptor contendo a mutação F128L em relação ao CASR nativo. Em nosso trabalho criamos a mutação F128Y, ou seja, substituímos o aminoácido Fenilalanina por Tirosina (hidrofílico) e verificamos uma expressão similar do receptor mutado em relação ao CASR nativo sem a presença de valores com significância estatística entre o receptor mutado e nativo em relação às formas monoméricas. Isto sugere que a polaridade na posição 128 não é importante para a manutenção da estrutura conformacional da proteína. No entanto, a polaridade nessa posição pode ser importante para a afinidade do CASR pelo Ca_0^{2+} .

A mutação T138M resultante da substituição de Treonina por Metionina, onde um aminoácido hidrofílico foi trocado por um aminoácido hidrofóbico, foi descrita por Chou et al. em 1995 e está relacionada com perda de função do receptor em pacientes com FHH (Tabela 3). Um estudo posterior de expressão desse receptor mutado indicou um padrão de expressão similar ao do CASR nativo (BAI et al., 1996). Em nosso estudo, promovemos a alteração do caráter ácido/base do receptor substituindo o aminoácido Treonina (hidrofílico neutro) por Lisina (hidrofílico básico). Verificamos um padrão de expressão similar ao do CASR nativo, sem valores estatisticamente significantes entre o receptor mutado e o CASR nativo nas formas monoméricas. Assim, esse resultado sugere que a alteração do caráter ácido/base nessa posição não deve alterar a estrutura conformacional da proteína, permitindo que ela se expresse na superfície celular, mas pode interferir na afinidade do receptor pelo agonista alterando a função desse receptor.

A região entre os aminoácidos 139 e 167, ainda não estudada, é altamente hidrofóbica e conservada entre a maioria dos membros dos mGluRs podendo sugerir uma relação dessa região com a manutenção da estrutura terciária da proteína ou até mesmo com o processo de ativação do CASR, ou seja, com a mudança conformacional para a formação do VFT.

139 IAVVGATGSGVS TAVANLLGLFYIPQVSY 167

Figura 15. Região do cDNA do CASR nativo entre os aminoácidos 139 à 167 que foi deletada.

Um modelo computacional do ECD do CASR criado por Ray et al. (1999), através da estrutura cristalográfica do mGluR1, demonstrou o ECD como um domínio VFT bilobado composto de quatro alças. Em um estudo desenvolvido por Reyes-Cruz et al. (2001), os CASRs mutantes com deleção de partes de cada alça propostas neste modelo revelou que a deleção de resíduos dentro da primeira alça ($\Delta 48-59$ e $\Delta 50-59$) não prejudicou significativamente a expressão do receptor, no entanto a deleção dos resíduos 42 a 47 aboliu por completo a ativação e a expressão da forma madura do receptor (160 kDa), sugerindo que essa região é importante para a formação da estrutura terciária da proteína bem como para a formação do VFT no CASR. As bandas imunorreativas de um receptor mutante com deleção dentro da segunda alça do modelo (aminoácidos 117-137) são sensíveis a Endo H, sugerindo que esse receptor mutado não é completamente processado e não atinge a superfície celular, pois somente a forma imatura do CASR é sensível a Endo H. A deleção de resíduos dentro da terceira alça do modelo (aminoácidos 356-416) apresentou um efeito mínimo na expressão do receptor mutado, indicando que esta região não é importante para a expressão do CASR na superfície celular. Ainda, receptores com deleções dentro da pequena região da quarta alça desse modelo (aminoácidos 437-449) demonstraram níveis de expressão similares ao CASR nativo ou levemente diminuídos. Em nosso trabalho, o receptor mutado com a deleção dos aminoácidos 139 a 167 no ECD apresentou um padrão de expressão similar ao CASR nativo, confirmado pela ausência de valores estatisticamente significantes entre as expressões das formas monoméricas do receptor mutado e do CASR nativo. Isto sugere que essa região de

alta hidrofobicidade não é crítica para a expressão bem como para a formação de dímeros que puderam ser visualizados pelo Western blotting. Assim, a deleção dessa região hidrofóbica não deve alterar a conformação da proteína, no entanto pode alterar a função do receptor, pois é um potencial sítio de interações entre o ECD e o TMD no processo de ativação do CASR, pois regiões hidrofóbicas tendem a se esconder na camada lipídica da membrana. De acordo com o modelo computacional, alinhando a estrutura terciária das LIVBP (Proteínas Ligadoras de Leucina/Isoleucina/Valina) com o CASR, a região entre os aminoácidos 139 e 167 é correspondente ao β -sheet C, α -hélice III e β -sheet D que é uma região muito próxima à fenda onde ocorre a interação do ligante para ativação do receptor (O'HARA et al., 1993). Além disso, foram deletados dentro dessa região os resíduos de serina 147 e 170, que se encontram em posições homólogas aos resíduos de serina do mGluR1, importantes para a interação do agonista com o receptor (BRAUNER-OSBORNE et al., 1999). Isso sugere, mais uma vez, uma importância funcional dessa região altamente hidrofóbica.

De acordo com a comparação da estrutura tridimensional do VFT do mGluR1 com o do CASR, a maioria das mutações deste trabalho (A116T, N118S, E127K, F128Y) se encontra na segunda alça, entre aminoácidos 116 a 136. Esta região se mostrou importante, pois está envolvida não somente com a dimerização covalente através de pontes dissulfídicas, mas também forma uma porção da interface dimérica. É particularmente interessante que das dezesseis mutações ativadoras descritas no ECD do CASR, oito delas ocorrem na porção proximal desta segunda alça entre os resíduos A¹¹⁶ e C¹²⁹ (HU et al., 2002). Um estudo de mutagênese de saturação nessa região da segunda alça extracelular do CASR também mostrou que mutações neste local freqüentemente levam à ativação do receptor. Assim, essa região parece ser importante para o constrangimento do domínio amino-terminal do CASR na conformação inativa. Mutações nesta região são capazes de liberar esses constrangimentos,

favorecendo a conformação ativa através do mesmo mecanismo de ativação de natureza desconhecida que ocorre no CASR nativo pela ação dos agonistas (JENSEN et al., 2000). Portanto, torna-se necessário uma análise funcional das mutações realizadas neste trabalho dentro dessa região para a confirmação da alteração na afinidade do receptor pelo Ca_o^{2+} .

Conclusão

Conclusão

Todos os receptores mutados foram expressos em células HEK-293. Pudemos verificar que a expressão do CASR pode ser afetada de acordo com alterações das características dos aminoácidos nativos (polaridade, caráter ácido/base) e o determinante da mudança no padrão de expressão é dependente da posição do aminoácido mutado. Os receptores com as mutações A116T, N118S, E127K, F128Y, T138K e Δ 139-167 apresentaram uma expressão similar ao CASR nativo comprovada pela análise estatística através do teste de Mann Whitney. O receptor mutado na posição P55S apresentou uma drástica redução no grau de expressão das formas oligoméricas (~220 kDa), demonstrando ser uma posição crítica para a expressão do CASR na superfície celular. Por outro lado, a região hidrofóbica entre os aminoácidos 139 e 167 não é crítica para a expressão do CASR nem para a formação dos dímeros, já que o receptor mutado com a deleção desses aminoácidos se expressou tão bem quanto o CASR nativo.

Referências Bibliográficas

- AIDA, K.; KOISHI, S.; TAWATA, M.; ONAYA, T. Molecular cloning of a putative Ca(2+)-sensing receptor cDNA from human kidney. **Biochem Biophys Res Commun**, 214:524-9, 1995.
- BAI, M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. **Cell Calcium**, 35:197-207, 2004.
- BAI, M.; QUINN, S.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; PEARCE, S. H.; 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.
- 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.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; QUINN, S. J.; BROWN, E. M. Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96:2834-9, 1999.
- BARON, J.; WINER, K. K.; YANOVSKI, J. A.; CUNNINGHAM, A. W.; LAUE, L.; ZIMMERMAN, D. et al. Mutations in the Ca(2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. **Hum Mol Genet**, 5:601-6, 1996.
- BRAUNER-OSBORNE, H.; JENSEN, A. A.; SHEPPARD, P. O.; BRODIN, B.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; O'HARA, P. Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. **Biochim Biophys Acta**, 1518:237-48, 2001.
- BRAUNER-OSBORNE, H.; JENSEN, A. A.; SHEPPARD, P. O.; O'HARA, P.; KROGSGAARD-LARSEN, P. The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. **J Biol Chem**, 274:18382-6, 1999.

- 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.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G.; CHOU, Y. H.; RICCARDI, D. et al. Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. **N Engl J Med**, 333:234-40, 1995.
- CHATTOPADHYAY, N.; MITHAL, A.; BROWN, E. M. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. **Endocr Rev**, 17:289-307, 1996.
- CHATTOPADHYAY, N.; VASSILEV, P. M.; BROWN, E. M. Calcium-sensing receptor: roles in and beyond systemic calcium homeostasis. **Biol Chem**, 378:759-68, 1997.
- CHOU, Y. H.; POLLAK, M. R.; BRANDI, M. L.; TOSS, G.; ARNQVIST, H.; ATKINSON, A. B. et al. Mutations in the human Ca(2+)-sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcemia. **Am J Hum Genet**, 56:1075-9, 1995.
- CVEJIC, S.; DEVI, L. A. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. **J Biol Chem**, 272:26959-64, 1997.
- 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 Ca²⁺-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**, 82:2710-5, 1997.

- FAN, G. F.; RAY, K.; ZHAO, X. M.; GOLDSMITH, P. K.; SPIEGEL, A. M. Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. **FEBS Lett**, 436:353-6, 1998.
- FERGUSON, S. S. Using green fluorescent protein to understand the mechanisms of G-protein-coupled receptor regulation. **Braz J Med Biol Res**, 31:1471-7, 1998.
- GALVEZ, T.; PARMENTIER, M. L.; JOLY, C.; MALITSCHKEK, B.; KAUPMANN, K.; KUHN, R. et al. Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. **J Biol Chem**, 274:13362-9, 1999.
- 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. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. **Endocr Rev**, 21:90-113, 2000.
- GETHER, U.; KOBILKA, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. **J Biol Chem**, 273:17979-82, 1998.
- GOLDSMITH, P. K.; FAN, G. F.; RAY, K.; SHILOACH, J.; MCPHIE, P.; ROGERS, K. V. et al. Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. **J Biol Chem**, 274:11303-9, 1999.
- GOMEZA, J.; JOLY, C.; KUHN, R.; KNOPFEL, T.; BOCKAERT, J.; PIN, J. P. The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. **J Biol Chem**, 271:2199-205, 1996.
- GOUDET, C.; GAVEN, F.; KNIAZEFF, J.; VOL, C.; LIU, J.; COHEN-GONSAUD, M. et al. Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101:378-83, 2004.

- HAMMERLAND, L. G.; KRAPCHO, K. J.; GARRETT, J. E.; ALASTI, N.; HUNG, B. C.; SIMIN, R. T. et al. Domains determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors. **Mol Pharmacol**, 55:642-8, 1999.
- HAUACHE, O. M.; HU, J.; RAY, K.; XIE, R.; JACOBSON, K. A.; SPIEGEL, A. M. Effects of a calcimimetic compound and naturally activating mutations on the human Ca²⁺ receptor and on Ca²⁺ receptor/metabotropic glutamate chimeric receptors. **Endocrinology**, 141:4156-63, 2000.
- HEALTH, H., 3RD; ODELBERG, S.; JACKSON, C. E.; TEH, B. T.; HAYWARD, N.; LARSSON, C. et al. Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains. **J Clin Endocrinol Metab**, 81:1312-7, 1996.
- HEBERT, T. E.; MOFFETT, S.; MORELLO, J. P.; LOISEL, T. P.; BICHET, D. G.; BARRET, C. et al. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. **J Biol Chem**, 271:16384-92, 1996.
- 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.
- HOFER, A. M.; BROWN, E. M. Extracellular calcium sensing and signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4:530-8, 2003.
- 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.

- HU, J.; MORA, S.; COLUSSI, G.; PROVERBIO, M. C.; JONES, K. A.; BOLZONI, L. et al. Autosomal dominant hypocalcemia caused by a novel mutation in the loop 2 region of the human calcium receptor extracellular domain. **J Bone Miner Res**, 17:1461-9, 2002.
- JANICIC, N.; SOLIMAN, E.; PAUSOVA, Z.; SELDIN, M. F.; RIVIERE, M.; SZPIRER, J. et al. 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**, 6:798-801, 1995.
- JENSEN, A. A.; SPALDING, T. A.; BURSTEIN, E. S.; SHEPPARD, P. O.; O'HARA, P. J.; BRANN, M. R. et al. Functional importance of the Ala(116)-Pro(136) region in the calcium-sensing receptor. Constitutive activity and inverse agonism in a family C G-protein-coupled receptor. **J Biol Chem**, 275:29547-55, 2000.
- JL, T. H.; GROSSMANN, M.; JL, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. **J Biol Chem**, 273:17299-302, 1998.
- LIENHARDT, A.; BAI, M.; LAGARDE, J. P.; RIGAUD, M.; ZHANG, Z.; JIANG, Y. et al. Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 86:5313-23, 2001.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**. 2 th Ed., 1989.
- NATHANS, J.; HOGNESS, D. S. Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. **Cell**, 34:807-14, 1983.
- O'HARA, P. J.; SHEPPARD, P. O.; THOGERSEN, H.; VENEZIA, D.; HALDEMAN, B. A.; MCGRANE, V. et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. **Neuron**, 11:41-52, 1993.

- OKAMOTO, T.; SEKIYAMA, N.; OTSU, M.; SHIMADA, Y.; SATO, A.; NAKANISHI, S. et al. Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. **J Biol Chem**, 273:13089-96, 1998.
- PEARCE, S. H.; BAI, M.; QUINN, S. J.; KIFOR, O.; BROWN, E. M.; THAKKER, R. V. Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells. **J Clin Invest**, 98:1860-6, 1996a.
- PEARCE, S. H.; TRUMP, D.; WOODING, C.; BESSER, G. M.; CHEW, S. L.; GRANT, D. B. et al. Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. **J Clin Invest**, 96:2683-92, 1995.
- PEARCE, S. H.; WILLIAMSON, C.; KIFOR, O.; BAI, M.; COULTHARD, M. G.; DAVIES, M. et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. **N Engl J Med**, 335:1115-22, 1996b.
- PIN, J. P.; DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology**, 34:1-26, 1995.
- PIN, J. P.; JOLY, C.; HEINEMANN, S. F.; BOCKAERT, J. Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors. **Embo J**, 13:342-8, 1994.
- POLLAK, M. R.; BROWN, E. M.; ESTEP, H. L.; MCLAINE, P. N.; KIFOR, O.; PARK, J. et al. 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**, 273:34558-67, 1998.

- RAY, K.; HAUSCHILD, B. C.; STEINBACH, P. J.; GOLDSMITH, P. K.; HAUACHE, O.; SPIEGEL, A. M. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. **J Biol Chem**, 274:27642-50, 1999.
- REYES-CRUZ, G.; HU, J.; GOLDSMITH, P. K.; STEINBACH, P. J.; SPIEGEL, A. M. Human Ca(2+) receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. **J Biol Chem**, 276:32145-51, 2001.
- RIOS, C. D.; JORDAN, B. A.; GOMES, I.; DEVI, L. A. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. **Pharmacol Ther**, 92:71-87, 2001.
- RODRIGUEZ-FRADE, J. M.; VILA-CORO, A. J.; MARTIN, A.; NIETO, M.; SANCHEZ-MADRID, F.; PROUDFOOT, A. E. et al. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. **J Cell Biol**, 144:755-65, 1999.
- ROMANO, C.; YANG, W. L.; O'MALLEY, K. L. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. **J Biol Chem**, 271:28612-6, 1996.
- WARD, D. T.; BROWN, E. M.; HARRIS, H. W. Disulfide bonds in the extracellular calcium-polyvalent cation-sensing receptor correlate with dimer formation and its response to divalent cations in vitro. **J Biol Chem**, 273:14476-83, 1998.
- WELLENDORPH, P.; BRAUNER-OSBORNE, H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. **Gene**, 335:37-46, 2004.
- WESS, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. **Pharmacol Ther**, 80:231-64, 1998.

WHITE, J. H.; WISE, A.; MAIN, M. J.; GREEN, A.; FRASER, N. J.; DISNEY, G. H. et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. **Nature**, 396:679-82, 1998.

ZHANG, Z.; SUN, S.; QUINN, S. J.; BROWN, E. M.; BAI, M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. **J Biol Chem**, 276:5316-22, 2001.