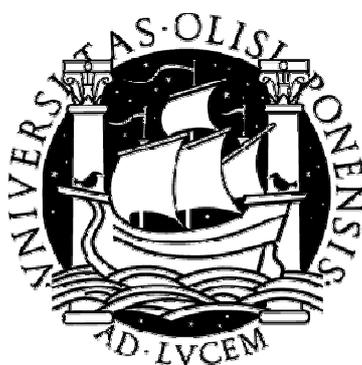


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



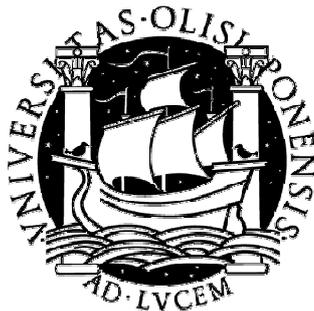
**O Ligando Notch Delta4 na hematopoiese
embrionária do ratinho**

Pedro Almeida Dias Guedes Saavedra

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**O ligando Notch Delta4 na hematopoiese
embrionária do ratinho**

Por

Pedro Almeida Dias Guedes Saavedra

Dissertação para o grau de Mestre orientada pelas

Professora Doutora Leonor Parreira, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina
da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Rita Zilhão, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007

“Failure is simply the opportunity to
begin again, this time more intelligently”

Henry Ford

Agradecimentos

A realização desta tese não teria sido possível sem a ajuda de várias pessoas, a quem desejo expressar o meu profundo agradecimento. Peço desculpa se eventualmente me esquecer de alguém.

Ao Pedro Faria, Divo Salgueiro, Luís Duarte, Ricardo Cara de Anjo e aos outros “ceoquianos”. Ao Padre Ismael Teixeira, pelo convívio e amizade demonstrada ao longo do ano. Deixo uma palavra de apreço ao Sr. Alfredo, à Dona Deolinda, ao Sr. Paulo, ao “Pintor” e aos demais clientes do *Snackbar* “O Basto” pelas tertúlias vividas.

Aos meus amigos Hugo Roberto, Gonçalo Pereira, Isabel Vitória, Rhaisa Romanini, Rui Mendes, Tiago Mota, Rui Lucas, Joana Lamego, Susana Gonçalves, Margarida Silva e Marco Antunes, por todo o apoio, amizade e episódios que tivemos. A tese também é vossa!

Ao Professor Doutor António Duarte por gentilmente ter cedido a linha heterozigótica Delta4^{+/-} e o cDNA de Delta4, que me permitiu a realização deste trabalho.

Às várias unidades de investigação do Instituto de Medicina Molecular, e em especial à Cristina Afonso pelos conselhos, à Elsa Abranches, Evguenia Bekman e Susana Rocha pela gigantesca paciência que tiveram comigo. À Margarida Carvalho, Marisa Cabrita, Ana Sacristán e Maria do Carmo pelo auxílio precioso no meu trabalho.

À segunda melhor unidade de investigação do mundo, a UBCa.

À Leila Martins por me dar a oportunidade de empurrar o carro dela à porta do IMM, à Ana Girio por ter dado a conhecer o vasto mundo dos colecionadores de pacotinhos de açúcar, à Catarina Henriques pelas interessantes conversas sobre a vida de cientista, à Cristina Santos por me ter aturado tanto tempo. À Ana Silva por toda a amizade, brincadeiras e momentos inesquecíveis que passamos, ao Doutor João Barata, o “Sahib”, pela imensa amizade e conselhos dados e por nunca ter desaproveitado as minhas assistências para golo. A última pessoa a quem agradeço é ao Bruno Cardoso, simplesmente um dos meus melhores amigos e o meu “*wing man*” de laboratório.

À melhor unidade de investigação do mundo, a UBH.

Ao Ricardo Laranjeiro por toda a ajuda prestada no laboratório.

À Sónia Oliveira pela companhia nos pequenos-almoços.

Ao Mário Matos por me ter introduzido ao Jazz e por ser um grande amigo, para todas as ocasiões. Agradeço também a ajuda no meu trabalho.

À Vanda Oliveira, a “Banda”, o elemento mais importante da unidade. E por ser a pessoa que mais me compreendia na questão de almoçar bem.

À Andreia Gomes, a minha “mãezinha” de laboratório, sempre disponível para me ajudar e com uma paciência do tamanho do mundo. Muito obrigado por me ter ensinado qRT-PCR.

Ao Ricardo Fonseca, por ser a melhor companhia, o melhor conselheiro e o melhor amigo que se pode desejar.

À Isabel Alcobia, a “Setora”, por ter sido uma das pessoas mais extraordinárias com quem convivi e por ter estado sempre presente em todas as situações difíceis. Muito obrigado por me ter ensinado tudo sobre cultura de células.

Ao Professor Doutor António Cidadão, por ter partilhado comigo muito do seu enorme saber e conhecimento e pelo apoio que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Rita Zilhão, por toda a incansável disponibilidade que teve para me ajudar e pelas palavras de incentivo que me deu. Obrigado!

À Professora Doutora Leonor Parreira, nem todas as palavras serviriam para agradecer o que fez por mim e pela decisiva contribuição que teve na minha formação. Não só é a minha mestre na Ciência como também é um dos meus modelos. Obrigado!

Aos meus pais, porque estiverem sempre presentes, apesar da distância. Porque ajudaram sempre, mesmo quando não sabiam como o fazer. Porque acreditaram sempre nas minhas capacidades, até quando eu próprio duvidava delas. Obrigado!

Índice

<u>Lista de abreviaturas</u>	8
<u>Resumo</u>	10
<u>Abstract</u>	11
<u>Introdução</u>	12
• A hematopoiese	12
• O sistema Notch	14
• O ligando Delta4	17
<u>Objectivo</u>	19
<u>Materiais e Métodos</u>	20
• Cultura de células	20
• Preparação de DNA plasmídico	21
• Análise de expressão génica	21
• Imunohistoquímica em EBs	22
• Construções moleculares de Delta4	23
<u>Resultados</u>	24
• Expressão do gene Delta4 ao longo do desenvolvimento de EBs	24
• A expressão de Delta4 desaparece em EBs heterozigóticos Delta4 ^{+/-}	25
• Potencial hematopoiético em EBs Delta4 ^{+/-}	26
• A haploinsuficiência de Delta4 não interfere com os genes alvo da sinalização canónica do sistema Notch	27
• Expressão de NICD clivado em S3 em EBs controlo e mutante Delta4 ^{+/-}	28
• Detecção de formas de Notch1 clivadas não canonicamente	30
• Diminuição de E-Caderina em EBs Delta4 ^{+/-}	33
• Construção da molécula Delta4ΔATEV	34

Discussão	37
------------------	-----------

Bibliografia	41
---------------------	-----------

Anexos	43
---------------	-----------

- Anexo A 43
- Anexo B 44
- Anexo C 45
- Anexo D 46
- Anexo E 47

Lista de abreviaturas

AGM – Aorta, Gónadas, Mesonefros

APS - *Ammonium Persulfate*

BL-CFC – *Blast Colony – Colony Forming Cells*

BSA – *Bovine Serum Albumine*

CEE – Células Estaminais Embrionárias

CEH – Células Estaminais Hematopoieticas

CFC – *colony forming cell*

CFU-E – *colony forming unit* – Eritrócitos

CFU-G – *colony forming unit* – Granulócitos

CFU-GEMM – *colony forming unit* – Granulócitos, Eritrócitos, Macrófagos, Monócitos

CFU-GM – *colony forming unit* – Granulócitos, Macrófagos

CFU-M – *colony forming unit* – Macrófagos

PLC – Progenitor Linfóide Comum

PMC – Progenitor Mielóide Comum

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

Δ ADEV – Delecção da sequência de aminoácidos da extremidade C-terminal de Delta4:
Alanina, Treonina, Ácido Glutâmico e Valina

Δ E – Delecção de NECD e do local de clivagem S2 na molécula de Notch1

DTM – Domínio Transmembranar

EBs – Corpos Embrióides (*Embryoid Bodies*)

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*

GFP – *Green Fluorescent Protein*

EPO – Eritropoietina

FITC – Fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

FWD – *Forward*

HEK293 – *Human Embryonic Kidney fibroblasts*

HRP – *Horseradish Peroxidase*

ICN – Notch1 intracelular com delecção do NECD e da porção transmembranar

IL-3 – Interleucina 3

LIF – *Leukemia Inhibition Factor*

MAGUK – *Membrane Associated Guanylate Kinases*

MEFs – Fibroblastos Embrionários de Ratinho (*Murine Embryonic Fibroblasts*)

min – minutos

NICD – Domínio Intracelular de Notch (*Notch Intracellular Domain*)

NECD – Domínio Extracelular de Notch (*Notch Extracellular Domain*)

NK – *Natural Killer*

o/n – over night

pb – pares de bases

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDZ – domínio proteico presente em PSD-95,Dlg e ZO-1

PEG – Polietilenoglicol

qRT-PCR – PCR quantitativo por Transcrição Reversa (*quantitative Reverse Transcription-PCR*)

REV – *Reverse*

SCF – *Stem Cell Factor*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

SV – Saco Vitelino

TBST – *Tris Buffer Saline Tween20*

TR – *Texas Red*

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

wt – *Wild Type*

Resumo

O sistema Notch é uma via de sinalização evolutivamente conservada que desempenha um papel fundamental nos processos de diferenciação celular. Foi já demonstrada a sua função reguladora na hematopoiese pós-natal, mas conhece-se muito pouco do seu papel na hematopoiese embrionária.

A hematopoiese embrionária ocorre nos microambientes do saco vitelino e, posteriormente, na AGM. Para investigar os efeitos do sistema Notch nos primeiros estádios da hematopoiese, usou-se um modelo *in vitro* de EBs diferenciados a partir de CEE, que reproduz fielmente a hematopoiese primitiva no embrião. Tendo-se observado um aumento transitório da transcrição do gene Delta4, um dos ligandos dos receptores Notch, no início da eritropoiese primitiva (dia 4), procurou-se averiguar as consequências funcionais da ausência deste ligando. Para tal, analisaram-se EBs derivados de uma linha haploinsuficiente para Delta4 (Delta4^{+/-}). Observou-se que a perda de um alelo Delta4 conduz a alterações na dinâmica temporal de expressão Delta4 durante o desenvolvimento de EBs, à redução do seu potencial de geração de hemangioblastos e de linhagens hematopoiéticas definitivas, a profundas alterações da estrutura tridimensional e a uma transição epitélio-mesenchima. Contudo, não se verificaram diferenças quantitativas na expressão de genes alvo do sistema Notch, envolvidos na hematopoiese. Por outro lado, a caracterização bioquímica de EBs controlo e mutantes nos primeiros dias de desenvolvimento, revelou uma presença vestigial de formas de Notch1 clivadas por gama-secretase. Estes resultados mostram que Delta4 é um regulador crítico da hematopoiese embrionária, mas que a sua acção se exerce por mecanismos independentes da sinalização canónica Notch, mediada por gama-secretase. Para investigar esta hipótese procedeu-se à construção de um mutante Delta4 desprovido de 4 aminoácidos da extremidade carboxi-terminal, região esta descrita como responsável por adesão intercelular, independente da sinalização Notch. Esta construção permitirá, posteriormente, analisar se o fenótipo observado em EBs Delta4^{+/-} se relaciona com funções deste ligando independentes da activação do sistema Notch.

Abstract

The Notch pathway is highly conserved during evolution and exerts important roles in cell-fate decisions and differentiation processes. Notch signaling has been shown to regulate post-natal hematopoiesis but its role in embryonic hematopoiesis is less clear.

Primitive hematopoiesis takes place in the microenvironments of the Yolk-sac and, later on, of the AGM. Using Embryoid Bodies (EBs) derived from murine embryonic stem cells (ESC), an in vitro system known to faithfully reproduce primitive hematopoiesis in the embryo we have observed that the expression of Delta4 (a Notch-ligand) is transiently up-regulated in EB-cells at the beginning of primitive erythropoiesis (day4). Therefore, we attempted to investigate the functional consequences of deficiency of this ligand. For this we have made use of an ESC-line haploinsufficient for Delta4 (Delta4^{+/-}). We observed in Delta4^{+/-} EBs loss of transient up-regulation of Delta4 transcript, reduction of hemangioblast and multi-lineage hematopoietic potential, profound architectural abnormalities and evidence of epithelial-mesenchymal transition. Intriguingly, the expression of Notch target genes directly involved in hematopoiesis is similar in wild type and mutant EBs. Biochemical characterization of wild-type and mutant EBs at early days of development further revealed a vestigial presence of gamma-secretase-cleaved Notch1. These results show that Delta4 is a master regulator of primitive hematopoiesis, but in a manner that might be independent of the gamma-secretase-cleaved (canonical) Notch-ICD. To address this hypothesis a Delta4 mutant, devoid of 4 carboxy-terminal aminoacids, a region known to be involved in Delta4 functions independent of Notch. This construct will allow to investigate if the Delta4^{+/-} EBs phenotype is due do Delta4 effects that are independent of Notch activation.

Introdução

A hematopoiese

A hematopoiese é o processo de formação de células do sangue a partir de células estaminais hematopoiéticas (CEH). Estas são células multipotentes capazes de dar origem a todas as linhagens sanguíneas e, concomitantemente, de se renovarem de forma a manter o *pool* de células estaminais no organismo necessário para a produção contínua de todas as células do sangue ao longo de toda a vida.

No decorrer do desenvolvimento embrionário do ratinho, entre os dias 6 e 7 dpc (*dias poscoitum*), uma população de células originárias da mesoderme primitiva vai formar os “ilhéus sanguíneos” no saco vitelino (SV). Pouco tempo depois, as células centrais destes “ilhéus sanguíneos” vão dar origem às CEH, enquanto que a população celular periférica se diferencia em células endoteliais estaminais que posteriormente irão iniciar a formação o sistema vascular. Esta proximidade entre as linhagens hematopoiéticas e endoteliais sugere que as duas linhagens possam ter origem no mesmo precursor bipotente, o **hemangioblasto**, e que a hematopoiese e vasculogénese são dois processos relacionados [1]. O precursor hematopoiético proveniente do hemangioblasto origina, no SV, eritrócitos primitivos que se distinguem dos definitivos por serem nucleados, terem maior volume e produzirem hemoglobinas embrionárias. Estes progenitores podem também formar a linhagem mielóide, mas não a linfóide [2]. Ao dia 9 dpc, são detectados, numa região anatómica dorsal constituída pela aorta e sistema urogenital (*Aorta-Gónadas-Mesonefros* - AGM), precursores hematopoiéticos com capacidade de auto-renovação e de diferenciação em todas as linhagens mielóides/linfóides. As diferenças entre os progenitores hematopoiéticos do SV e da AGM na capacidade de diferenciação e potencial hematopoiético levam à distinção entre hematopoiese primitiva e hematopoiese definitiva, respectivamente. Posteriormente, ao dia 10.5 dpc, as CEH originárias da AGM colonizam o fígado fetal o qual passará a constituir o principal órgão hematopoiético fetal até ao nascimento [3]. Após o nascimento, e para toda a vida, a medula óssea substitui o fígado fetal e passa a ser o principal órgão hematopoiético [4, 5] (Figura 1).

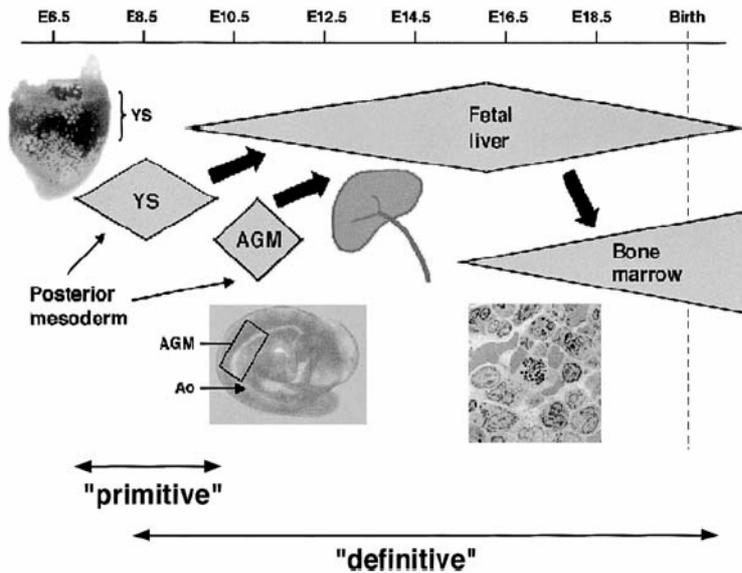


Figura 1: Hematopoiese embrionária desde o dia 8.5 de desenvolvimento do embrião de ratinho até ao nascimento. YS - Saco vitelino; AGM - Aorta-Gónadas-Mesonefros; Primitive - hematopoiese primitiva; Definitive - hematopoiese definitiva (adaptado de Baron, 2003)

Durante a vida pós-natal, a hematopoiese que decorre na medula óssea, inicia-se com a diferenciação duma CEH em dois progenitores distintos, linfóide (Progenitor Linfóide Comum - PLC) e mielóide (Progenitor Mielóide Comum - PMC) [6] (Figura 2).

O primeiro é o precursor das células T/NK e B. O segundo leva ao aparecimento de toda a linhagem mielóide: granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e macrófagos

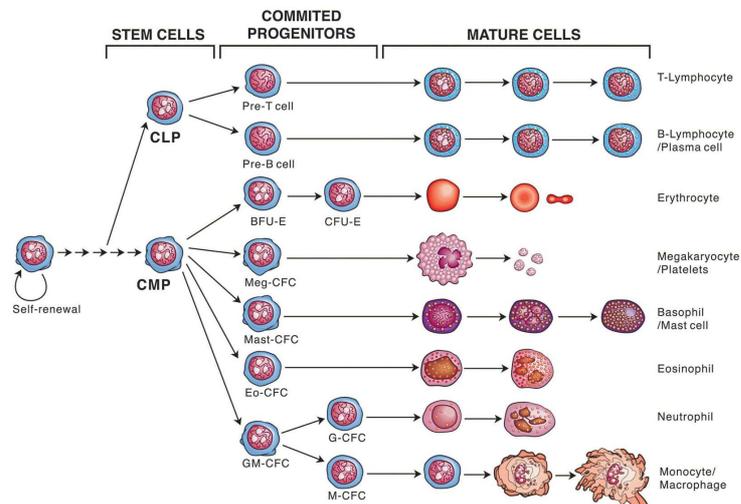


Figura 2: Hematopoiese pós-natal (adaptado de Metcalf, 2007)

De forma a compreender a biologia das CEH bem como os seus processos de diferenciação é necessário conhecer a função que os diferentes sinais provenientes dos vários microambientes, formados quer durante o desenvolvimento do embrião quer no adulto, têm no desenvolvimento da hematopoiese. Um dos principais sistemas reguladores da diferenciação e proliferação na hematopoiese é a via de sinalização Notch.

O sistema Notch

O sistema Notch é uma via de sinalização evolutivamente conservada que desempenha um papel fundamental na diferenciação celular ao longo do desenvolvimento de organismos vertebrados e invertebrados [7].

O gene *Notch* foi inicialmente descoberto por Morgan em *Drosophila* quando a perda parcial da sua função levou ao aparecimento de “dentadas” (*notches*) nas asas [8]. Na *Drosophila* existe um único receptor Notch e dois ligandos, Delta e Serrate.

Em mamíferos, o sistema Notch é composto por 9 proteínas transmembranares: quatro receptores (Notch1-4) e 5 ligandos, divididos em duas famílias: Jagged (Jag-1 e Jag-2), homólogos de Serrate, e Delta (*DL-1*, -3 e -4), homólogos do ligando Delta da mosca [9] (Figura 3).

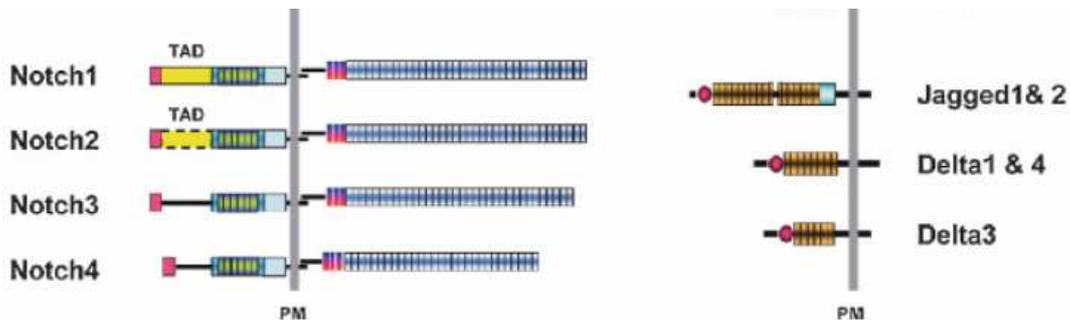


Figura 3: Componentes do sistema Notch em mamíferos (adaptado de Radtke *et al*, 2004)

Os receptores são sintetizados inicialmente no complexo de Golgi, numa forma precursora, sendo depois clivados por uma protease *furin-like* durante o trajeto para a membrana (clivagem S1). Forma-se então um heterodímero composto pelo domínio transmembranar e intracelular, com 120 kDa, e o domínio extracelular (*Notch extracelular domain* - NECD) com 180 kDa [10] (Figura 4).

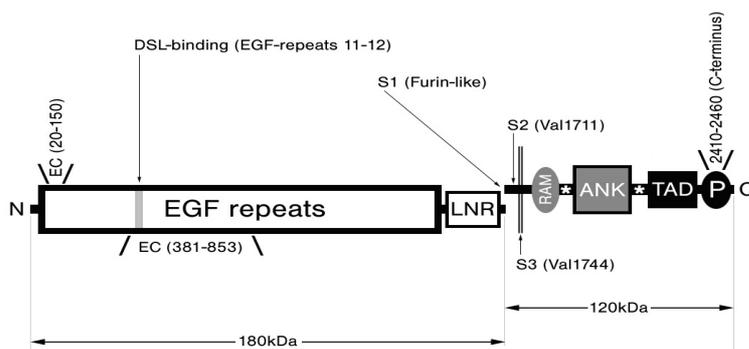


Figura 4: Notch1. P – domínio PEST; TAD – domínio transactivador; ANK – repetições *ankyrin*; RAM – domínio RAM; LNR – repetições *Lin12/Notch*; EGF – repetições *epidermal growth like*; DSL – *Delta-Serrate-Lag2 binding site*. (esquema cedido por António Cidadão)

A sinalização canónica da via Notch ocorre quando um ligando Notch, localizado na membrana plasmática de uma célula, interage com um receptor que esteja na membrana de uma célula vizinha. Seguem-se duas clivagens sequenciais, a primeira (S2), é mediada por uma metaloprotease (*a disintegrin and metalloprotease*) no lado exterior da membrana plasmática na zona transmembranar, libertando-se o NECD que é transendocitado, juntamente com o ligando, pela célula vizinha. A segunda clivagem (S3) ocorre no lado citoplasmático da membrana e é mediada por um complexo multi-proteico com actividade gama-secretase que cliva o domínio intracelular (*Notch intracelular domain* - NICD) no resíduo conservado de valina (Val 1744), libertando-se desta forma o NICD da membrana celular (Figura 4). De seguida, ocorre a sua translocação para o núcleo onde se liga ao repressor de transcrição RBP-Jk a co-activadores entre eles o *mastermind-like* (MAML), formando-se um complexo multiproteico que activa a transcrição de genes alvo da via de sinalização Notch, nomeadamente factores de transcrição que vão regular a expressão de outros genes [10] (Figura 5).

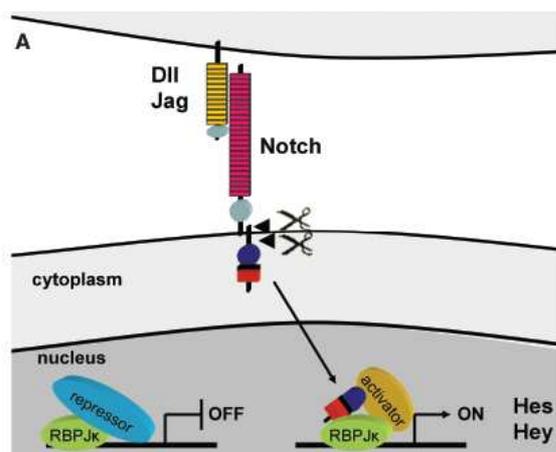


Figura 5: Sinalização Notch (adaptado Fischer *et al*, 2007). Dll – Delta, Jag – Jagged

Contudo, o complexo activador de Notch tem um tempo de vida curto, o que torna extremamente difícil detectar a presença de NICD no núcleo celular. Daí que, para detectar a ocorrência de sinalização Notch, seja necessário recorrer a métodos de detecção indirectos, como a evidência de clivagens dos receptores e estudo da expressão dos genes alvo. Até à data, os genes alvo mais conhecidos da sinalização canónica de Notch, mediada por RBP-Jk, são os factores de transcrição Hey1, Hey2, Hes1, Hes5, havendo já evidências de estarem relacionados com a hematopoiese [11].

A sinalização Notch é ainda regulada por diversos moduladores que podem actuar no citoplasma ou no espaço extracelular. Como reguladores citoplasmáticos incluem-se Numb e Deltex. Numb reprime a sinalização porque aparentemente impede a translocação nuclear de

NICD. Contudo, também poderá promover a endocitose, reduzindo a quantidade de receptor disponível na membrana. Deltex é um regulador positivo da actividade Notch, actuando ao nível dos receptores. Como reguladores extracelulares, existem as glicosiltransferases Fringe que modulam a especificidade dos ligandos, actuando no NECD de maneira a que Delta, mas não Jagged, possa iniciar a sinalização [10]. Outra forma de regulação extracelular consiste na depleção de íões cálcio. *In vitro*, quando se utilizam agentes quelantes, como por exemplo EDTA, ocorre uma forte activação dos receptores, independente do ligando [12].

O facto dos receptores e ligandos Notch serem expressos de forma diferencial em vários compartimentos hematopoiéticos, sugere a importância desta via de sinalização no processo de hematopoiese. Conhecem-se já vários efeitos distintos da sinalização Notch dependentes dos contextos e estadios celulares. Por exemplo, Notch1 leva ao aumento da proliferação de células T/NK e bloqueia a diferenciação de células B e é essencial para a formação das CEH no embrião [13]. Também se verificou que os ligandos Delta1 e Delta4, mas não Jagged1, induzem, *in vitro* e *in vivo*, a formação de células T/NK a partir de progenitores hematopoiéticos CD34⁺, também bloqueando a diferenciação em células B [14, 15]. Notch2 promove a diferenciação de células B na zona marginal do baço, sem afectar a produção de células T no timo [16]. O papel de Notch na mielopoiese *in vivo* é mais controverso. Em modelos *in vivo* verificou-se que o *knockout* condicional de Notch1 [17] não tem qualquer efeito, mas estudos *in vitro* demonstraram que Notch1 e Notch2 [18] e os ligandos Delta e Jagged1 funcionam como factores de crescimento das CEH e bloqueiam a diferenciação mielóide [19]. Contudo, a expressão localizada de receptores e ligandos nas células estromais da medula óssea e nos progenitos hematopoiéticos, sugere que tenham alguma função na diferenciação celular.

Na hematopoiese embrionária, o papel de Notch ainda é muito pouco conhecido. O *knockout* Notch1 [20] ou de RBP-Jk [21] leva à ausência de progenitores hematopoiéticos da AGM e diminuição dos factores de transcrição fundamentais para a hematopoiese, como Runx1, Gata2 e SCL. Contudo, a hematopoiese primitiva do SV ocorre normalmente. Em relação ao *knockout* dos outros receptores, Notch2 [22] e Notch3 [23], embora letais no embrião, não têm qualquer efeito na hematopoiese primitiva, enquanto que Notch4 não têm aparentemente fenótipo mutante, sendo os ratinhos viáveis e férteis [24]. O *knockout* de qualquer ligando no embrião é letal, apesar de não se ter observado até hoje qualquer efeito na hematopoiese primitiva [25-28]. Todavia, a ausência de Delta4 e Jagged1 conduz a graves malformações do sistema vascular, pelo que não será de excluir que tenham algum efeito na hematopoiese embrionária.

O ligando Delta4

O desenvolvimento do sistema vascular e a hematopoiese são dois processos intimamente relacionados, uma vez que derivam de um progenitor comum, o **hemangioblasto** [1]. Sabe-se que o principal regulador da diferenciação e proliferação dos progenitores endoteliais, o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) induz a expressão Delta4 e Notch1 [29, 30], sendo os últimos reguladores fundamentais dos processos de vasculogénese e angiogénese. Curiosamente, Delta4 é o único componente da via Notch haploinsuficiente [26, 31, 32], com os ratinhos a exibirem, ao dia 9.5 dpc, graves perturbações de angiogénese, nomeadamente redução do calibre dos vasos e ausência de organização arterial.

Delta4 é expresso no endotélio arterial, assim como Notch1, Notch4 e Jagged1, embora apenas Delta4 se expresse num padrão consistente com os receptores Notch [33]. Foi já demonstrado que a regulação da vasculogénese e início da angiogénese se dá por sinalização Delta4-Notch1-Hey1/2 [34] e que o *knockout* para qualquer um destes genes leva a graves malformações no sistema vascular e conseqüentemente à morte do embrião ao dia E9.5 [30, 34-42]. Aparentemente, Notch4 não tem importância relevante neste processo, uma vez que a sua ablação não têm qualquer consequência descrita no fenótipo do embrião de ratinho [24].

Na hematopoiese foram também estudadas funções do ligando Delta4. Para além da já referida capacidade de diferenciar células CD34⁺ em linfócitos T [15], quando em sobreexpressão induz doenças linfoproliferativas e inibe a diferenciação de células B [43]. Sabe-se também que este ligando, *in vitro*, promove a diferenciação de eritrócitos a partir de células CD34⁺ [44].

Para além da sua função sinalizadora no sistema Notch, supõe-se que Delta4 apresente uma função de adesão independente da activação Notch [45]. Watt e colaboradores [46] observaram que a sobreexpressão de Delta1, ligando com 51% de homologia com Delta4, em queratinócitos aumenta a coesão intercelular. O fenómeno de adesão parece depender de uma região específica da extremidade C-terminal do domínio citoplasmático da molécula. Por outro lado, a sobreexpressão em queratinócitos de uma construção de Delta1, à qual foi removida toda a região citoplasmática, excepto treze aminoácidos, revelou que, embora a molécula se comportasse como dominante negativo da sinalização Notch, a adesão intercelular era fortemente afectada com aumento de migração celular. Os autores concluíram que Delta1 tem funções de adesão intercelular independentes da sinalização Notch. Verificou-

se igualmente noutros estudos [45, 47] que esta função de adesão de Delta1 depende essencialmente de um motivo localizado na extremidade citoplasmática e constituído por quatro aminoácidos terminais: alanina, treonina, ácido glutâmico e valina (ATEV). Este motivo só se encontra presente nos ligandos Delta1 e Delta4 e corresponde a uma zona de ligação de proteínas com domínio PDZ, tais como proteínas MAGI-1 e Dlg da família MAGUK, (*Membrane Associated Guanylate Kinases*) fundamentais para a formação das junções intercelulares. Outros trabalhos [48, 49] demonstraram que MAGI-1 interage com Beta-catenina através do domínio PDZ e que, Beta-catenina, por sua vez, se liga ao domínio citoplasmático da E-caderina, formando um complexo responsável pela formação das junções intercelulares (Figura 6). Admite-se que a ausência do motivo ATEV em Delta1 ou Delta4 se traduz por instabilidade do complexo juncional, conduzindo à perda de coesão intercelular e aumento de mobilidade celular. Globalmente, portanto, estes resultados sugerem que Delta1 e Delta4 tenham funções de adesão intercelular que são independentes da sua função sinalizadora na via Notch.

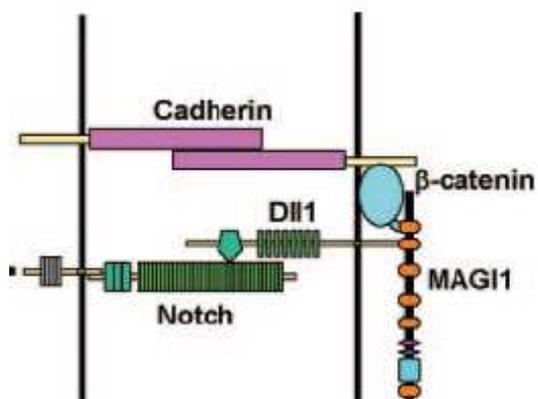


Figura 6: Função de adesão de Delta1 (adaptado de Mizuhara *et al*, 2005)

Objectivo

Estudos realizados previamente no laboratório tinham demonstrado que a expressão do gene Delta4 aumenta de forma brusca e transitória aos dias 4-5 do desenvolvimento do modelo experimental dos Corpos Embrióides (*Embryoid Bodies* – EBs). Este estadio do desenvolvimento coincide com o pico da eritropoiese primitiva, neste modelo de diferenciação *in vitro*. Esta observação sugere que a sinalização Notch mediada por Delta4 pode estar funcionalmente envolvida na regulação destes estadios precoces da hematopoiese embrionária. A investigação desta hipótese foi o objectivo específico deste trabalho. Neste trabalho utilizou-se o mesmo modelo de diferenciação de EBs a partir de células estaminais embrionárias de ratinho, atendendo à sua capacidade de recapitular fielmente, *in vitro*, a hematopoiese primitiva no embrião (Figura 7)[50].

Para investigar a função Delta 4 utilizou-se uma linha celular estaminal embrionária heterozigótica para uma mutação do gene Delta4 (clone #45, Delta4^{+/-}) [26] e induziu-se a sua diferenciação em EBs, de modo a estudar o efeito da haploinsuficiência de Delta4 na génese e desenvolvimento de células hematopoiéticas primitivas.

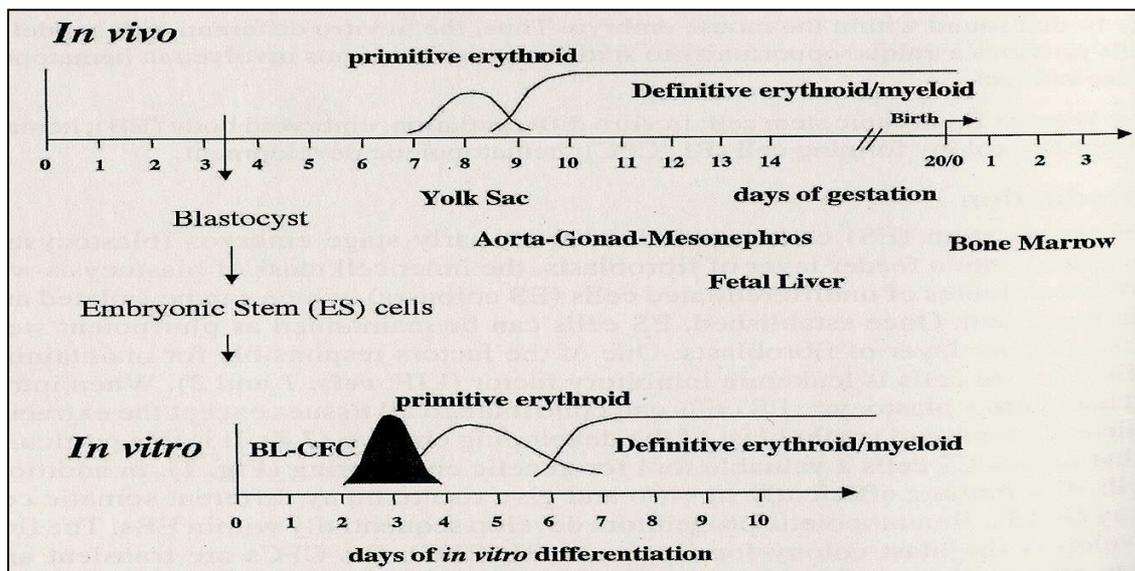


Figura 7: Processo de hematopoiese embrionária *in vivo* e em EBs *in vitro* (adaptado de Baron, 2005)

Materiais e Métodos

Cultura de células

- Linhas celulares R1, Delta4^{+/-}, Ainv15, MEFs e HEK293T

As linhas celulares R1 e Ainv15 utilizadas neste trabalho, são células estaminais embrionárias de ratinho. A construção da linha heterozigótica Delta4^{+/-} a partir da linha R1 está descrita em [26] e foi gentilmente cedida por António Duarte, Faculdade de Medicina Veterenária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal. A linha celular MEFs consiste em fibroblastos embrionários de ratinho, enquanto que HEK293 é uma linha celular de fibroblastos humanos embrionários de rim.

- Manutenção *in vitro* de células estaminais embrionárias (CEE)

MEFs previamente inativados com Mitomicina C foram descongelados a 37°C e transferidos para meio de MEFs (anexo A) aquecido também a 37°C. De seguida, foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ no dia anterior às CEE, para permitir a sua adesão. No dia seguinte as CEE foram descongeladas no banho a 37°C e transferidas para meio de CEE (anexo A) gerando uma suspensão de células isoladas, que de seguida foram plaqueadas sobre os fibroblastos e incubadas a 37°C, 5% CO₂. O meio das CEE foi mudado todos os dias.

- Diferenciação das CEE em EBs

As CEE na presença de LIF (*leukemia inhibition factor*) e em co-cultura com fibroblastos embrionários, que lhes fornecem todos os factores de crescimento necessários, mantêm-se indiferenciadas. Quando se removem os fibroblastos e LIF, as CEE diferenciam-se espontaneamente em estruturas esféricas multi-celulares, os EBs, constituídos por linhagens celulares hematopoiéticas, endoteliais, musculares e neuronais. Para a diferenciação de EBs, as CEE mantidas em cultura sobre MEFs têm de apresentar uma confluência entre 70% a 90%. Antes de se proceder à diferenciação, as CEE passam por uma fase de pré-diferenciação para sincronizar o seu desenvolvimento, na ausência de MEFs. As células foram ressuspendidas de forma a obter uma suspensão de células isoladas e plaqueadas durante meia hora, de modo a que só os MEFs aderissem à placa. De seguida, as CEE foram recolhidas e plaqueadas em nova caixa mas em meio de pré-diferenciação (anexo A). Foram mantidas durante 2 dias a 37°C, 5% CO₂ mudando-se o meio todos os dias. Após a pré-diferenciação, as CEE foram recolhidas e ressuspendidas, para serem novamente plaqueadas 1.5x10⁵ células

por placa, em meio de diferenciação de EBs (anexo A) e mantidas a 37°C e 5% CO₂, sendo o meio mudado de 2 em 2 dias. Dois dias depois, os EBs foram mudados para nova placa e colocados em agitação suave para impedir a adesão ao fundo da placa. Foram depois recolhidos a vários dias para os diferentes estudos.

- Ensaio clonogénico [1, 51]

EBs do dia 3 e 6 de diferenciação foram usados para ensaios clonogénicos em metilcelulose para averiguar a emergência de hemangioblastos (BL-CFCs) e precursores hematopoiéticos, respectivamente. Os EBs são previamente dissociados com 0.25% tripsina-EDTA e cultivados em diversas densidades. Para fazer ensaios de BL-CFCs utiliza-se o meio de cultura “Methocult – M3120” da StemCell Technologies enriquecido em VEGF e SCF (Anexo A). As colónias são observadas por microscopia óptica e contadas após 4 dias de cultura. Para analisar a emergência de precursores hematopoiéticos, as células de EBs dissociados são cultivadas em meio “Methocult – M3434” sendo necessário adicionar SCF, Il-3, Il-6 e eritropoietina (Anexo A). As colónias são observadas e contadas após 7 dias do início da cultura. A morfologia dos precursores hematopoiéticos foi confirmada por coloração May-Grunwald e Giemsa. O tratamento estatístico foi feito recorrendo ao método de *t Student*.

Preparação de DNA plasmídico

- Os plasmídios recombinantes utilizados neste trabalho encontram-se na tabela 6 anexo D. A amplificação destes plasmídios foi feita transformando bactérias competentes da estirpe de *E.coli* DH5t. A extração de DNA plasmídico foi realizada usando os *kits* da Qiagen “Qiaprep Spin Miniprep kit” ou “Hispeed plasmid Midi kit” de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi feita num espectrofotómetro NanoDrop ND-100 e analisada com o Software NanoDrop. A identidade e integridade dos plasmídios amplificados foram confirmadas através da análise de restrição (ver tabela 4, anexo C). As digestões foram feitas a 37°C durante uma hora e trinta minutos. Os marcadores usados também se encontram no anexo C.

Análise da expressão génica

- qRT-PCR

A extração de RNA total das células dos EBs, foi feita com o *kit* “RNeasy Micro Kit” da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit* “SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” da Invitrogen, de acordo com

as instruções do fabricante. Os cDNAs foram depois usados para ensaios qRT-PCR (*quantitative* Reverse Transcription - PCR), para fazer uma quantificação relativa da expressão génica, usando como controlo interno o gene GAPDH. Os ensaios foram feitos num ABI Prism 7000 Sequence Detection System da Applied Biosystems, usando SYBR Green PCR Master Mix da Applied Biosystems e os resultados foram analisados com o software ABI Prism 7000 SDS. Os *primers* usados encontram-se na tabela 1, anexo B. No capítulo dos Resultados, os dados relativos à figura 7 foram analisados com o software GraphPad Prism recorrendo ao método *One Way ANOVA*, enquanto que os dados relativos às figuras 8 e 11 foram analisados pelo método *Two Way ANOVA*.

- Análise de proteínas por *western blot*

A extracção total de proteínas dos EBs nos diversos dias analisados e das HEK293 transfectadas com os plasmídios pMSCV+ Δ E e pMSCV+ICN (ver Anexo D), foi feita por tratamento com o tampão de lise *Sample Buffer 2x*. A adição de Benzonase, serve para evitar contaminações com DNA, a uma concentração final de 200U/mL. A quantificação relativa de proteínas foi feita com base na coloração com azul de Coomassie porque os reagentes de quantificação não são compatíveis com o *Sample Buffer* usado. Quantidades semelhantes de extractos proteicos dos vários dias de desenvolvimento de EBs foram resolvidas em geis SDS-PAGE com 8% de poliacrilamida e espessura 0.75mm. A transferência para uma membrana de nitrocelulose foi efectuada utilizando o sistema “Mini Trans Blot®” da *BioRad Laboratories*. O bloqueio das membranas foi feito com leite magro da *Regilait*, a 3% e preparado em tampão TBST (tabela 5 Anexo C). As incubações com os anticorpos estão na tabela 2 Anexo B, e foram feitas com agitação suave.

Imuno-histoquímica em EBs

- Os EBs foram fixados em paraformaldeído a 3.7% em PBS a pH 7.2. Foram posteriormente desidratados em concentrações crescentes de álcool e incluídos em polietilenoglicol. Realizaram-se cortes seriados de 1 μ m em lâminas tratadas com poli-L-lisina. Precedendo a incubação dos anticorpos primários fez-se uma incubação de 10 minutos com BSA a 5%. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS e incubados a 4°C *o/n*, seguidos por lavagens em PBS, duas vezes durante cinco minutos. Foram utilizados anticorpos secundários, conjugados com fluoresceína (FITC) ou Texas Red (TR) diluídos em PBS e incubados de 30 minutos a 1 hora a 37°C, seguidos por lavagens em PBS 2 vezes 5

minutos. Os cortes foram contrastados com DAPI em meio de montagem aquoso e avaliados num microscópio de epifluorescência. Na tabela 3 anexo B, estão os anticorpos utilizados, diluições e métodos de recuperação antigénica.

Construções moleculares de Delta4

- A deleção do motivo ATEV de Delta4, foi feita recorrendo à técnica de *overlapping* PCR, segundo a estratégia delineada no Anexo E (Figura 3 e 4). Os *primers* usados, bem como as condições de PCR, encontram-se estão no anexo E (tabela 7,8 e figura 5). Os produtos de amplificação foram separados num gel de agarose 0.8%, extraídos e purificados usando o *kit* da Eppendorf “Perfectprep Gel Cleanup” de acordo com as instruções do fabricante. As moléculas finais, contendo Delta4/FLAG e Delta4 Δ ATEV/FLAG, foram clonadas usando o *kit* da Invitrogen “TOPO TA cloning” de acordo com as instruções do fabricante. A polimerase usada não faz inserção final de adenosinas, tendo-se feito a sua adição seguindo o protocolo em anexo E tabela 9. Os plasmídios resultantes, após confirmada a correcta amplificação dos fragmentos de PCR por sequenciação (STABVIDA), foram posteriormente digeridos com Sall e SacI, e clonados em pEGFP-N3, previamente digerido com as mesmas enzimas de forma a expressar GFP na porção C-terminal de Delta4 (também clonado em pEGFP-N3), Delta4/FLAG e Delta4 Δ ATEV/FLAG. A ligação foi mediada pela ligase de DNA do fago T4. Só se obteve, até à data, a construção contendo Delta4/FLAG.

Resultados

- Expressão do gene Delta4 ao longo do desenvolvimento de EBs

De forma a caracterizar o sistema Notch no desenvolvimento de EBs, estudou-se o perfil de transcrição dos genes dos receptores Notch e respectivos ligandos, por qRT-PCR, nos dias 2, 4 e 6, em EBs desenvolvidos a partir da linha celular Ainv15. Observaram-se variações na expressão de todos os genes ao longo dos dias analisados, com especial destaque para o aumento transitório da expressão de Delta4 e Notch4 ao dia 4, dia em que é sabido ocorrer o pico da eritropoiese primitiva nos EBs. Ao dia 6, quando já se observa o aparecimento de linhagem mielóide, ocorre um aumento de expressão dos ligandos Jagged (Figura 8).

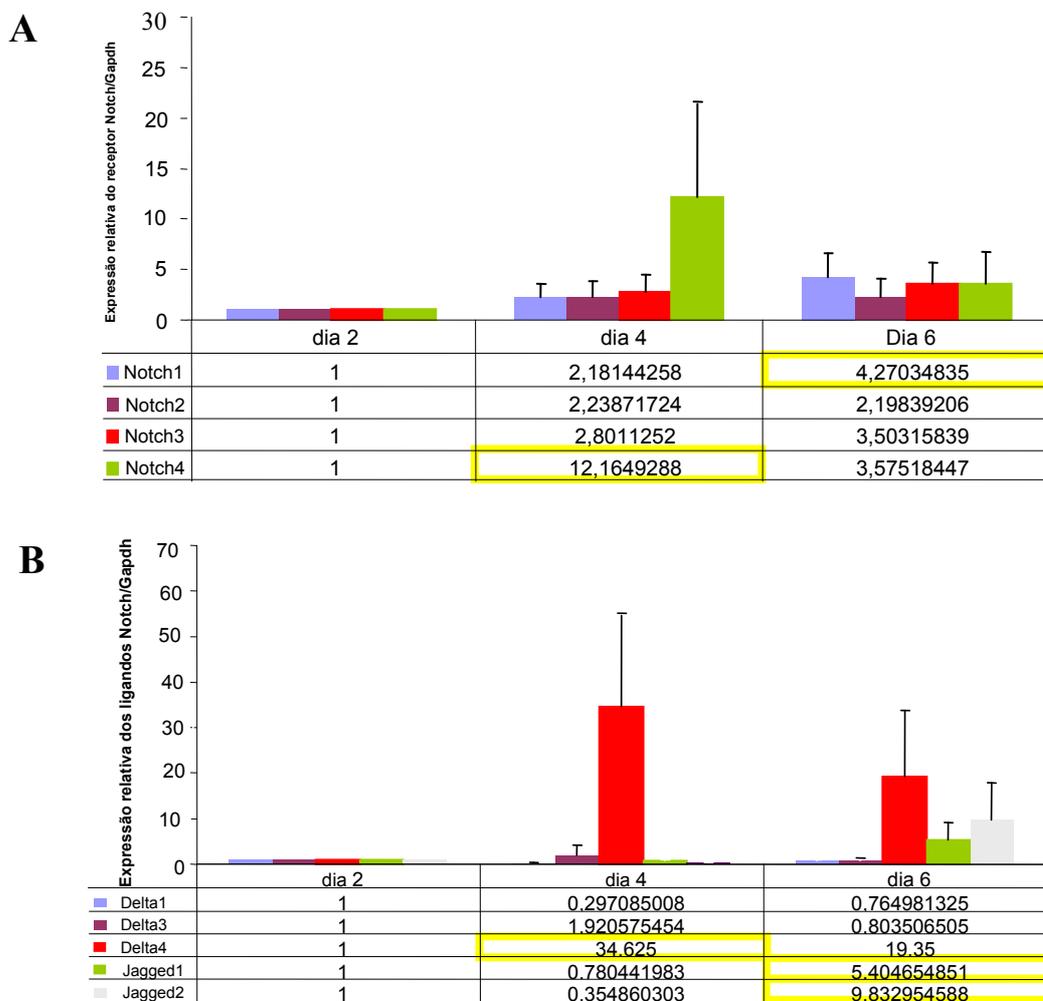


Figura 8: Expressão dos genes de receptores e ligandos Notch aos dias 2, 4, e 6 do desenvolvimento de EBs, por qRT-PCR, em 3 ensaios independentes na linha celular Ainv15 (A) Expressão dos receptores (B) Expressão dos ligandos (Trabalho realizado por Andreia Gomes)

Estudos anteriores [26, 31, 32] demonstraram que Delta4 desempenha um papel fundamental na remodelação dos vasos sanguíneos, como se verificou não só em ratinhos Delta4^{-/-} mas também Delta4^{+/-}. Estes dados, aliados ao aumento transitório de transcrito de Delta4 ao dia 4 do desenvolvimento de EBs, apontam para a possibilidade de Delta4 ter um papel importante no desenvolvimento do hemangioblasto, célula precursora bipotente de eritrócitos primitivos e células estaminais endoteliais, pelo que se decidiu usar uma linha celular estaminal embrionária de ratinho heterozigótica Delta4^{+/-} para este gene [26], e estudar o seu efeito na hematopoiese primitiva.

- Expressão de Delta4 em EBs heterozigóticos Delta4^{+/-}

A análise do perfil de transcrição de Delta4, aos diferentes dias do desenvolvimento de EBs controlo, derivados da linha celular estaminal embrionária de ratinho R1, mostra a mesma fenomenologia que EBs diferenciados da linha celular Ainv15, embora o pico de expressão do gene ocorra um dia mais cedo na linha R1. Em EBs Delta4^{+/-} não se observa um pico de expressão de Delta4, parecendo existir, pelo contrário, uma diminuição progressiva de transcrito ao longo dos dias (Figura 9).

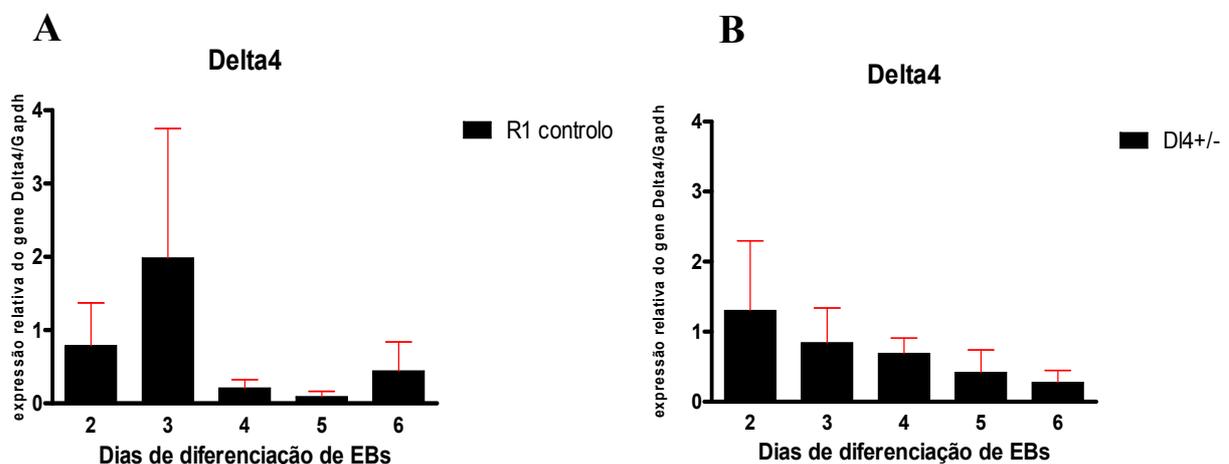


Figura 9: Padrão de expressão do gene Delta4 por qRT-PCR, em duas séries independentes das linhas R1 e Delta4^{+/-} (A) Expressão de Delta4 aos dias 2,3,4,5 e 6 de diferenciação de EBs na linha R1 (B) Expressão de Delta4 aos dias 2,3,4,5 e 6 de diferenciação de EBs na linha Delta4^{+/-}

- Potencial hematopoiético em EBs Delta4^{+/-}

Com o objectivo de analisar o potencial hematopoiético de EBs controlo e Delta4^{+/-}, fizeram-se ensaios clonogénicos em metilcelulose, com três séries independentes. Ao dia 3 do desenvolvimento de EBs, foi analisada, especificamente, a capacidade de geração de hemangioblastos. Para tal, suspensões celulares obtidas por desagregação de EBs controlo R1 e mutantes foram plaqueadas em metilcelulose na presença de VEGF e SCF e cultivadas durante 4 dias. As colónias formadas denominam-se *blast colonies – colony forming unit* (BL-CFC) e constituem o equivalente *in vitro* do hemangioblasto [1]. Observou-se uma diminuição acentuada e significativa do número de BL-CFC formadas a partir de EBs derivados da linha mutante, embora, aparentemente, morfologicamente semelhantes às da experiência controlo (Figura 10).

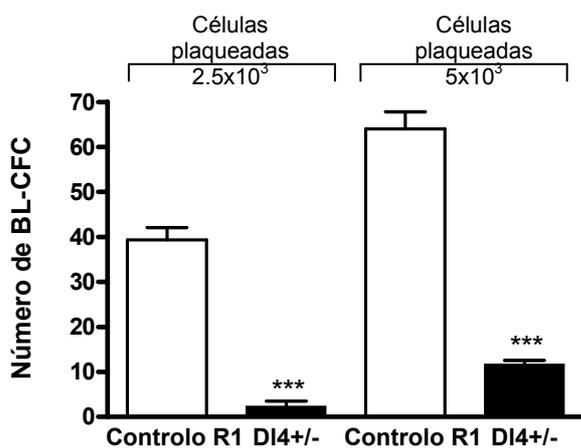


Figura 10: Número de BL-CFC formadas em metilcelulose, na linha Delta4^{+/-} e na linha controlo R1 (Trabalho realizado por Isabel Alcobia)

Para avaliar o potencial clonogénico para as várias linhagens hematopoiéticas, células obtidas ao dia 6 de EBs foram plaqueadas em metilcelulose enriquecida com os factores de crescimento hematopoiético SCF, Il-3, Il-6 e eritropoietina. Após 7 dias de cultura, observou-se, de novo, uma acentuada redução do número de colónias formadas: de eritrócitos (CFU-E *colony forming unit - erythrocytes*), de granulócitos (CFU-G *granulocytes*), de macrófagos (CFU-M *Macrophages*), de colónias bipotentes (CFU-GM *granulocytes/macrophage*) e de colónias pluripotentes (CFU-GEMM *granulocytes/erythrocytes/macrophages/monocytes*). A morfologia das colónias, analisada por coloração citoquímica, mostrou que a alteração quantitativa observada nas colónias Delta4^{+/-} não era acompanhada de alterações morfológicas em qualquer dos subtipos celulares, quando comparadas com colónias geradas pela linha celular controlo (Figura 11).

Portanto, a perda de um alelo do gene Delta4 conduz a uma acentuada diminuição do número de hemangioblastos e, posteriormente, da hematopoiese eritro-mielóide, sem que haja, aparentemente, alterações qualitativas no desenvolvimento de células endoteliais ou hematopoiéticas.

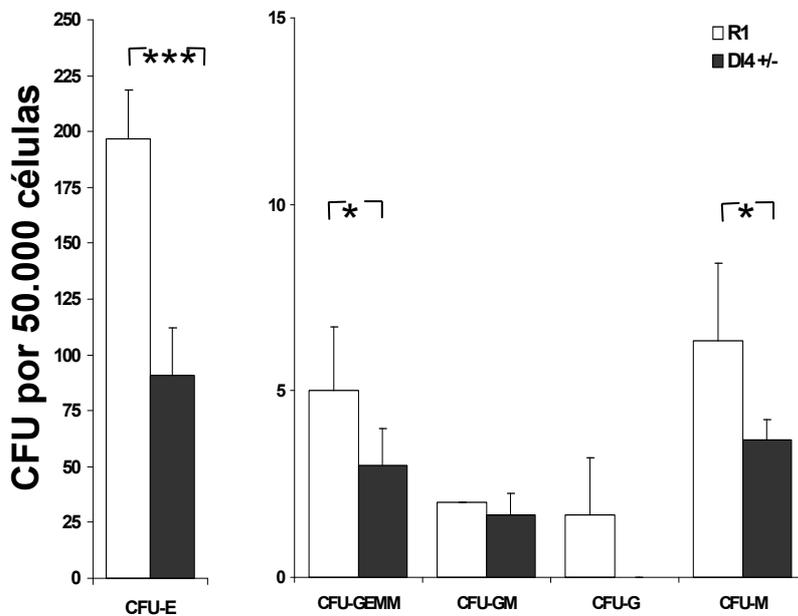


Figura 11: Número de colónias das várias linhagens hematopoiéticas formadas em metilcelulose, na linha Delta4^{+/-} e na linha controlo R1 (Trabalho realizado por Isabel Alcobia)

- A haploinsuficiência de Delta4 não interfere com a expressão de genes alvo da sinalização canónica do Sistema Notch

Sendo Delta4 um ligando de receptores Notch, procedeu-se seguidamente à análise de expressão de genes alvo da activação Notch conhecidos pelo seu papel biológico quer na vasculogénese quer na hematopoiese, Hey1, Hey2, Hes1 e Hes5. Observou-se uma expressão dinâmica ao longo do desenvolvimento de EBs, de todos os genes analisados não sendo, contudo, as diferenças entre EBs da linha R1 e mutante, para cada dia, estatisticamente significativas (Hey1 p=0.8; Hey2 p=0.57; Hes1 p=0.96; Hes5 p=0.49). A análise estatística ao longo dos dias no desenvolvimento dos EBs, mostrou que as diferenças observadas para os genes Hey1 (p=0.52), Hes1 (p=0.15) e Hes5 (p=0.44) não são significativas para nenhuma das linhas celulares. Contudo, e embora a expressão de Hey2 não seja diferente entre as duas linhas estudadas, para cada dia estudado, a sua expressão ao longo do tempo aumenta significativamente (p=0.03) a partir do dia 4. (Figura 12)

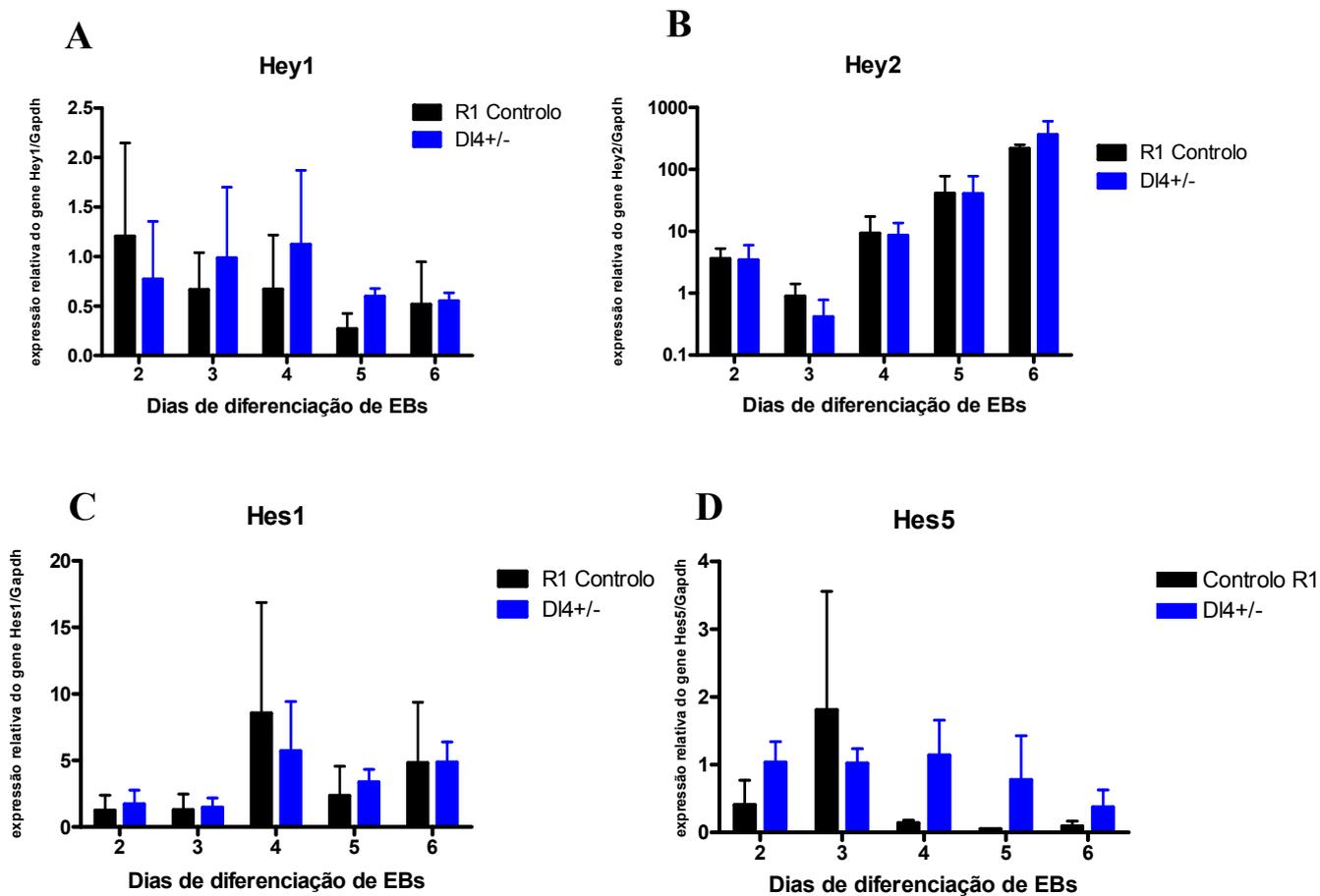


Figura 12: Perfil de transcrição dos genes alvo da sinalização canónica Notch por qRT-PCR, em duas séries independentes, nas linhas R1 controlo e Delta4^{+/-} aos dias 2-6 de diferenciação de EBs (A) Expressão de Hey1 (B) Expressão de Hey2 (C) Expressão de Hes1 (D) Expressão de Hes5

- Expressão de NICD clivado em S3 em EBs controlo e mutante Delta4^{+/-}

A análise por qRT-PCR não demonstrou diferenças significativas de expressão dos genes alvo da via Notch, entre EBs controlo e mutantes. Uma vez que os genes analisados não são exclusivamente regulados pelo sistema Notch, pois RBP-Jk, na ausência de NICD, pode influenciar a transcrição de vários genes [52], procedeu-se à detecção de NICD clivado em S3, forma esta que prova inequivocamente a activação canónica da via.

Como já referido anteriormente [20], Notch1 é o único receptor estudado até agora, com papel relevante na hematopoiese definitiva da AGM. Desta forma, decidiu-se verificar se Notch1 está activado por sinalização canónica Notch.

Analisaram-se extractos proteicos de EBs da linha controlo e mutante aos dias 2, 2.5, 3, 4, e 6. Utilizaram-se dois controlos [53]: um controlo positivo que consiste numa forma truncada de Notch1, designada de ΔE , que é rapidamente processada pela gama-secretase; um controlo negativo, denominado ICN, em que a zona de clivagem de Notch1 mediada pela gama-secretase está truncada.

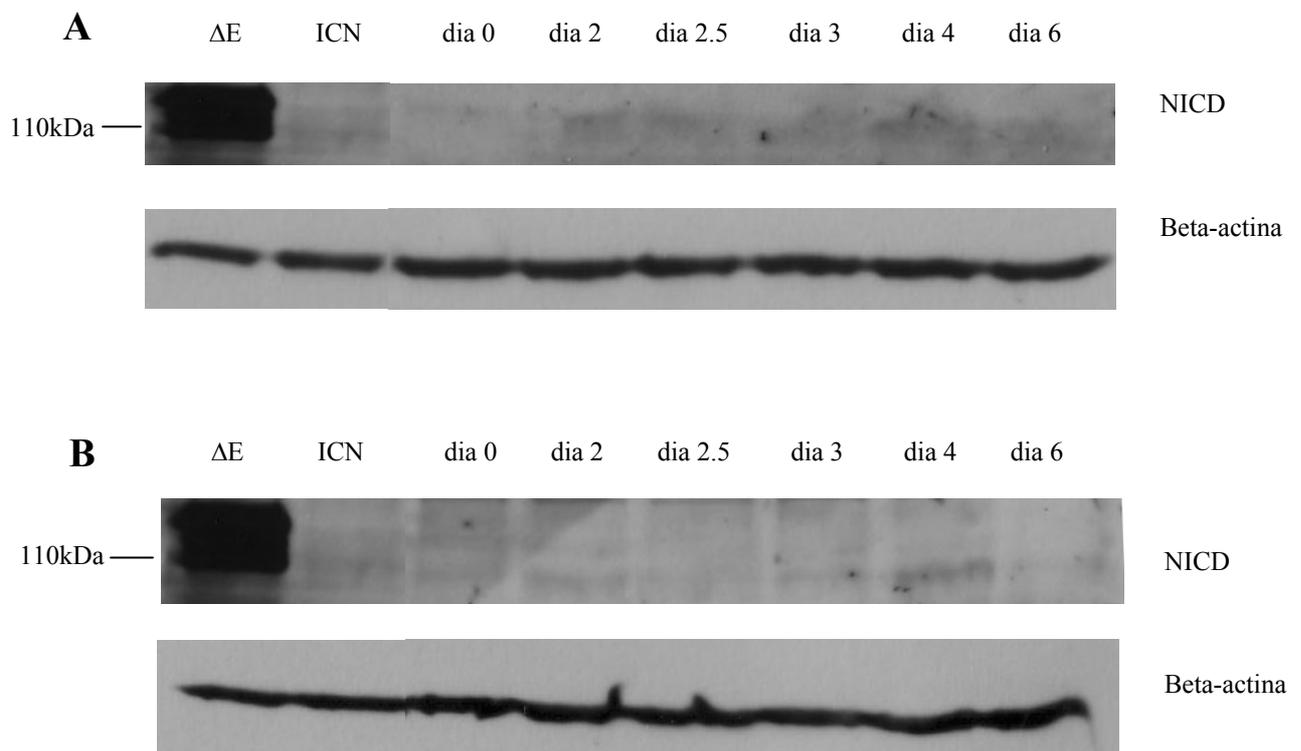


Figura 13: Expressão proteica de NICD (S3) em EBs controlo e EBs $\Delta E^{+/+}$ (A) EBs controlo e respectivo *loading control* com Beta-actina (B) EBs $\Delta E^{+/+}$ e respectivo *loading control* com Beta-actina

O resultado obtido por *western blot* (Figura 13) demonstra que apenas ao dia 4 de desenvolvimento de EBs, em ambas as linhas celulares, se consegue detectar a presença de NICD na forma clivada S3, com tamanho de 110 kDa. Possivelmente, nos outros dias analisados, NICD clivado em S3 ou não existe, ou é vestigial não sendo possível a sua detecção por *western blot*.

O facto de ΔE apresentar uma expressão tão significativa reflecte que o vector pode expressar duas formas da proteína, uma conjugada com GFP e outra sem GFP, o que faz variar o tamanho da proteína entre aproximadamente 140 kDa e 110 kDa, respectivamente.

A aparente inexistência de diferenças na expressão de NICD, leva-nos a supor, juntamente com o facto dos genes alvo da sinalização Notch não sofrerem alterações de expressão na

linha mutante, que o fenótipo causado pela haploinsuficiência de Delta4 poderá não estar relacionado com a sinalização canónica de Notch.

- Detecção de formas de Notch1 clivadas não canonicamente

Outra observação que sugere que o sistema Notch poderá não estar activo pela via canónica é a presença de formas clivadas de Notch1 que impossibilitam a sinalização ligando-receptor. Tal facto foi demonstrado pelo uso de anticorpos que reconhecem diferentes regiões do receptor Notch, nomeadamente: um epitopo localizado na extremidade C-terminal do domínio transmembranar de Notch1 (N1-IC) e dois epitopos diferentes, localizados em NECD. Dos últimos, um anticorpo reconhece os aminoácidos 20-150 da extremidade N-terminal de NECD (NECD 20-150) e, o outro, a porção de NECD compreendida entre os aminoácidos 381-853 (NECD 381-853) (Figura 4).

Sabendo-se de estudos anteriores [54] que o Sistema Notch poderá ser dispensável nos primeiros dias de desenvolvimento do embrião e que a linha celular embrionária de fibroblastos de ratinho (MEFs) não apresenta clivagem NICD clivado em S3 [55], usaram-se MEFs para verificar se a existência daquelas formas clivadas de Notch1 é exclusiva de CEEs ou se as mesmas se encontram presentes em outras linhas celulares embrionárias.

Como demonstrado na Figura 14 A, a forma transmembranar de Notch1, de 120 kDa, era detectável aos diferentes dias analisados, havendo um ligeiro aumento de expressão de proteína ao longo dos dias desenvolvimento de EBs.

Em relação a NECD, com o anticorpo NECD 381-853 (Figura 4), detectaram-se bandas de 105 kDa e outra de 75 kDa que indicam a ocorrência de clivagem de NECD. Também se consegue detectar a forma inteira de Notch1 de 300 kDa, embora esta seja mais acentuada em MEFs. Uma outra banda de aproximadamente 180 kDa poderá indicar a presença da forma de NECD completa em EBs, embora não sendo detectável em MEFs (Figura 14 B).

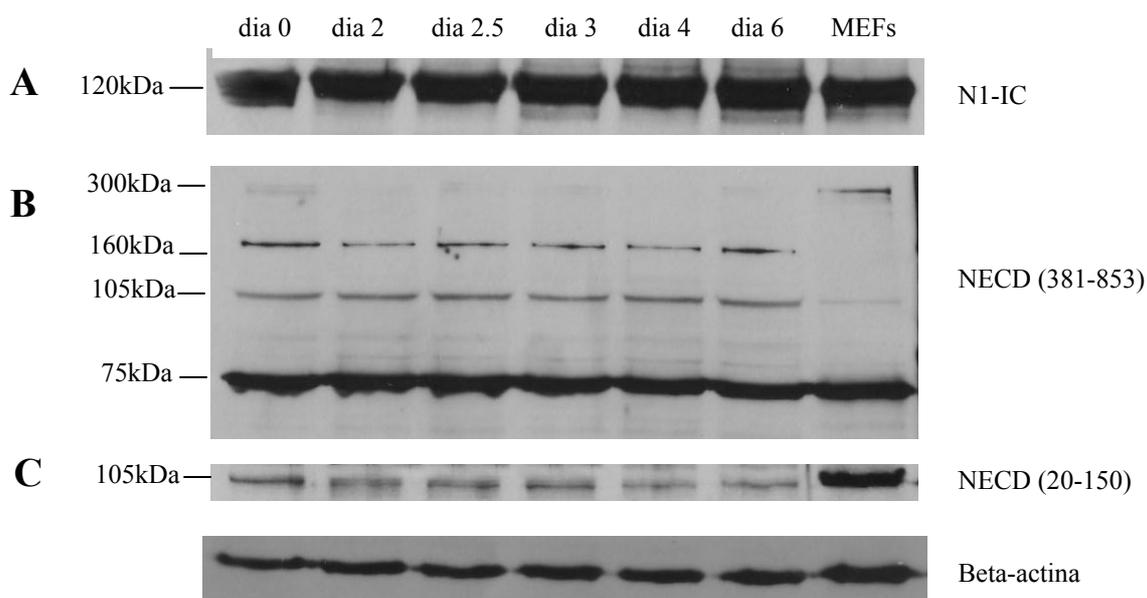


Figura 14: Expressão proteica de Notch1 com diferentes anticorpos em EBs controlo e em MEFs e respectivo *loading control* com Beta-actina (A) Notch1 transmembranar (N1-IC) (B) NECD 381-853 (C) NECD 20-150

Com o anticorpo NECD 20-150 detecta-se uma banda de 105 kDa, muito acentuada em MEFs (Figura 14 C). Esta proteína de 105 kDa será complementar da proteína de 75 kDa reconhecida pelo anticorpo NECD 381-853. Assim, a ocorrência desta clivagem pode eventualmente impedir que o receptor seja activado pelo contacto com o ligando e, por conseguinte, inibir sinalização canónica Notch, ou pelo menos, reduzi-la a níveis vestigiais, não detectáveis por *western blot*. Esta clivagem de NECD também ocorre em MEFs, demonstrando que o fenómeno não é exclusivo da linha celular CEE e que a sinalização Notch canónica é dispensável nos primeiros dias de desenvolvimento do embrião.

Para corroborar estes resultados, analisou-se a localização de Notch1 *in situ*, por imunohistoquímica em EBs controlo do dia 6, dia este onde se verificou a maior expressão de Hey2 (Figura 12 B).

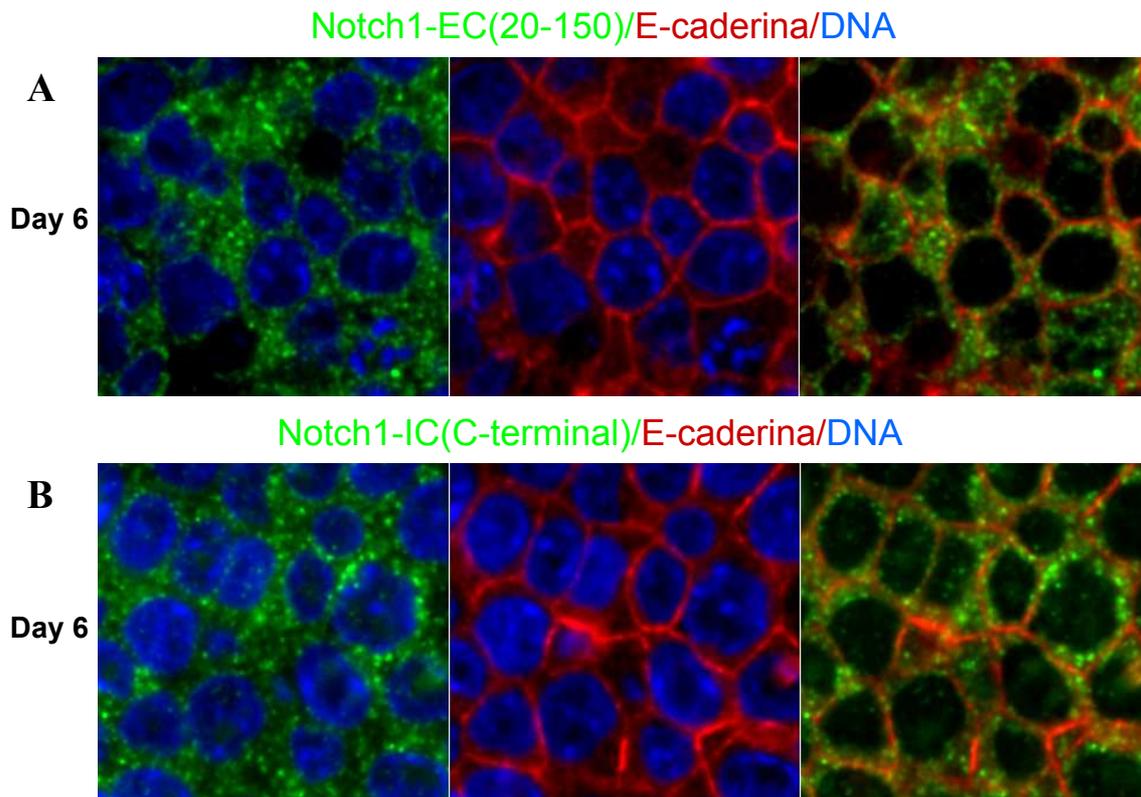


Figura 15: Expressão de Notch1, E-caderina e co-localização de ambos, em EBs controlo do dia 6 de desenvolvimento **(A)** Expressão de Notch1 detectada com NECD 20-150; Expressão de E-caderina; Co-localização de Notch1 e E-caderina **(B)** Expressão de Notch1 detectada com anticorpo N1-IC; Expressão de E-caderina; Co-localização de Notch1 e E-caderina (Trabalho realizado por António Cidadão)

Utilizando o anticorpo NECD 20-150 ou o anticorpo N1-IC, verifica-se a aparente ausência de Notch1 com padrão membranar. A co-localização, nos painéis da direita, de Notch1 com E-caderina demonstra não só a ausência de co-localização, como um padrão vesicular citoplasmático de Notch1 (Figura 15). Os restantes receptores Notch 2-4 apresentam um padrão citoplasmático vesicular semelhante, não se tendo detectado localização membranar (dados não apresentados). Verificou-se também (dados não apresentados) que a proteína NECD reconhecida pelo anticorpo NECD 381-853, é detectada em endossomas marcados com a proteína RAB7, um marcador de endossomas para degradação.

Desta forma, estes resultados de imunohistoquímica sugerem que não há aparentemente uma localização membranar de Notch1, fundamental para ocorrer sinalização canónica. A proteína apenas se consegue detectar em vesículas citoplasmáticas. Apesar dos resultados de *western blot* obtidos com o anticorpo NECD 381-853, figura 14 B, terem demonstrado a presença da proteína inteira de 180 kDa, a imunohistoquímica revelou, com este anticorpo,

que a proteína se localiza em endossomas de degradação. Assim, estes dados sugerem fortemente que o sistema Notch não se encontra activo ao dia 6, ou a estar activo, se encontra em níveis não detectáveis por imunohistoquímica. Em resumo, os resultados obtidos apontam para que o fenótipo observado em EBs $\Delta 4^{+/-}$ poderá ser independente da sinalização canónica Notch.

– Diminuição de E-Caderina em EBs $\Delta 4^{+/-}$

Uma vez que Delta4 pode estar envolvido em funções de adesão intercelular através da interacção com E-caderina, fez-se uma análise topográfica da localização de E-caderina em EBs, por imunohistoquímica, usando um anticorpo contra E-caderina.

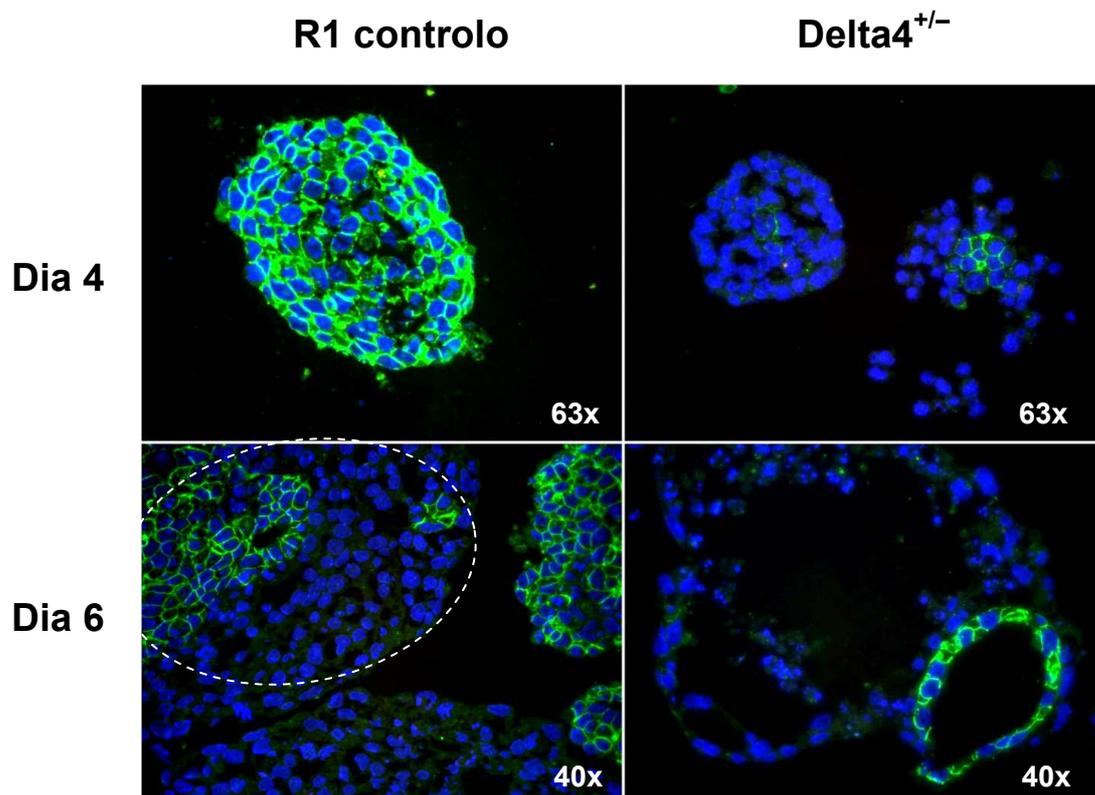


Figura 16: Análise topográfica da E-caderina em EBs controlo e $\Delta 4^{+/-}$ de dia 4 e 6 por imunohistoquímica (Trabalho realizado por António Cidadão)

Verifica-se uma redução do tamanho dos EBs heterozigóticos em comparação com os EBs da linha controlo, aos dias 4 e 6. Ao dia 4 observou-se uma acentuada diminuição de E-caderina na membrana celular, desaparecendo a morfologia em mosaico, típica de células epiteliais adjacentes, característica dos EBs controlo. Esta observação é compatível com a ocorrência de uma transição epitélio-mesenquima nos EBs mutantes. A morfologia dos EBs Delta4^{+/-}, ao dia 6, é marcadamente aberrante, por contraste com EBs controlo e com aparecimento de estruturas tubulares (Figura 16).

Portanto, a perda de um alelo Delta4 leva a alterações morfológicas profundas, diminuição de tamanho dos EBs e redução da coesão intercelular e de E-caderina membranar. Globalmente, estas observações apontam para que tenha ocorrido nos EBs mutantes uma transição epitélio-mesenquima prematura (dia 4; este fenómeno é patente nos EBs controlo apenas ao dia 6, (Figura 16, R1 dia 6).

- Construção da molécula Delta4 Δ ATEV

A função de adesão de Delta4 tem possivelmente por base o aumento da estabilidade do complexo formado por proteínas MAGI da família MAGUK, Beta-catenina e E-caderina [48]. Será de suspeitar que a haploinsuficiência de Delta4 leve a uma redução de Delta4 membranar, diminuindo assim a estabilidade do complexo formado nas junções intercelulares e, conseqüentemente, a redução de E-caderina na membrana celular. De forma a averiguar se Delta4 tem alguma influência na manutenção da E-caderina na membrana, decidiu-se fazer uma construção molecular de Delta4 deletando o motivo ATEV. De maneira a possibilitar a distinção entre Delta4 mutante e Delta4 endógeno, produzido naturalmente pela célula, adicionou-se na construção realizada, a sequência *FLAG* à proteína Delta4 (Figura 17). Todo este trabalho foi feito pela técnica de *overlapping* PCR, (ver esquema das reacções anexo E figura 3 e 4). Em toda as reacções de PCR foi usada a polimerase *Pfu* porque tem actividade de revisão de provas, diminuindo a probabilidade de aparecerem mutações pontuais.

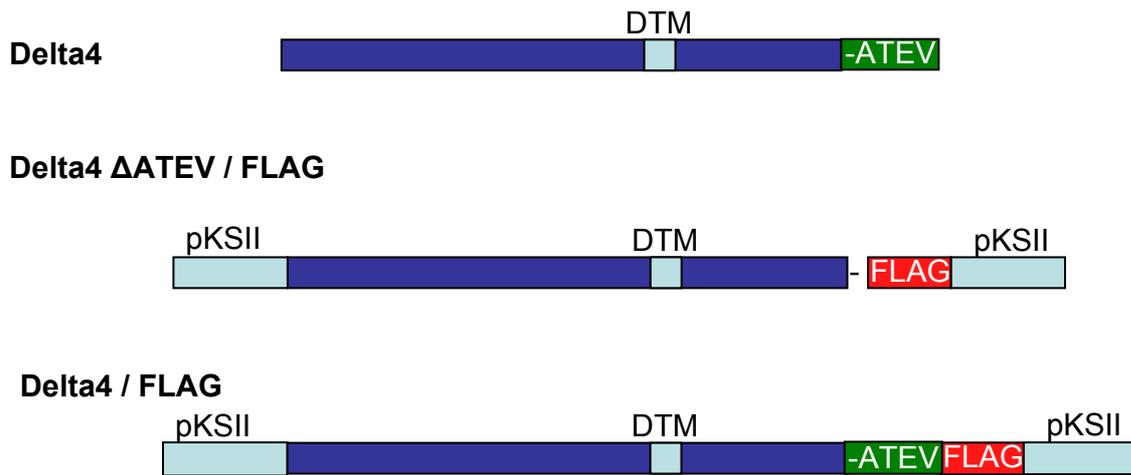


Figura 17: Representação esquemática das construções de Delta4. DTM representa o domínio transmembranar do ligando Delta4. A reacção de *overlapping PCR* foi feita com Delta4 inserido

A primeira fase do *overlapping PCR* consistiu em amplificar o cDNA de Delta4, inserido no plasmídeo pKSII, de acordo com as combinações de *primers* I+VII, VI+II, VI+V e III+IV (Figura 18 A), estando o esquema das reacções em anexo. (anexo E figura 3 e 4). A segunda fase (figura 18 B) dos resultados consistiu em misturar numa reacção de PCR os fragmentos VI-II e III-IV e noutra reacção VI-V e III-IV, utilizando os *primers* VI e IV, de forma a amplificar parcialmente Delta4 Δ ATEV/FLAG e Delta4/FLAG, respectivamente (anexo E figura 3 e 4).

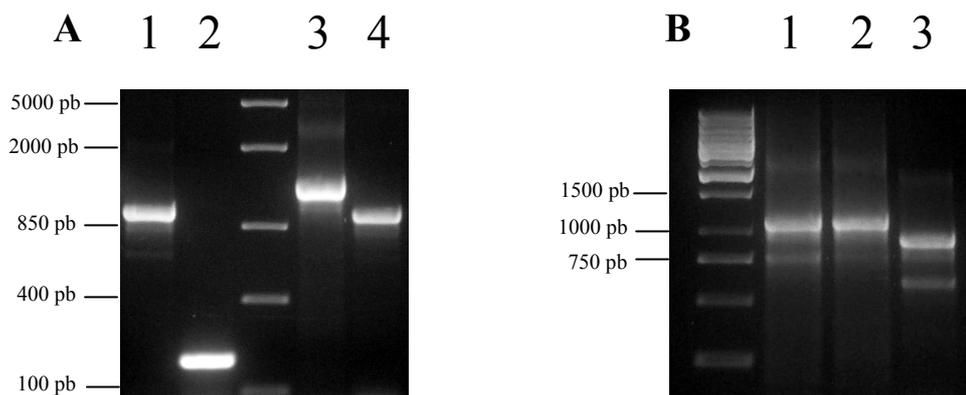


Figura 18: Fragmentos de Delta4 obtidos por *overlapping PCR*. (A) Resultado obtido da primeira fase: 1- VI+II, 2- III+IV, 3- I+VII, 4- VI+V (B) Resultado obtido na segunda fase: 1- VI-IV (com Δ ATEV/FLAG), 2- VI-IV (FLAG), 3- VI-II

Depois da conclusão da fase 3 do *overlapping* PCR (ver anexo E figura 7 e 8, dados não apresentados), as moléculas Delta4 Δ ATEV/FLAG e Delta4/FLAG foram clonadas no vector Topo *cloning*. A figura 19 mostra a confirmação da clonagem, por análise do padrão de restrição.

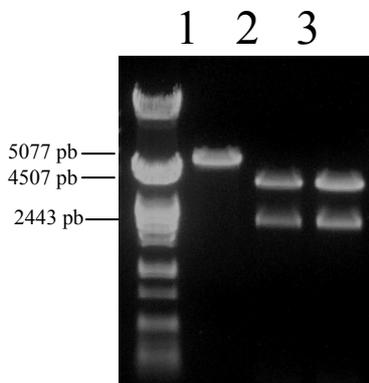


Figura 19: Padrão de restrição das moléculas Delta4, Delta4 Δ ATEV/FLAG e Delta4/FLAG. 1- pKSII+ Delta4 linearizado com Sall, 2- Vector Topo (4Kb) + Delta Δ ATEV/FLAG (\approx 2.4kb) digerido com EcoRI, 3- Vector Topo + Delta4/FLAG (\approx 2.4kb) digerido com EcoRI

Por último, proceder-se-á à clonagem de cDNA de Delta4 controlo (originalmente inserido no vector pKSII) e dos dois fragmentos Delta4 Δ ATEV/FLAG e Delta4/FLAG no vector de expressão epissomal pEGFP, à electroporação da linha celular estaminal embrionária R1 e à diferenciação das células positivas para GFP (isoladas por cell sorting) em EBs. Até à data, apenas se obteve sucesso na clonagem de Delta4/FLAG em pEGFP-N3 (dados não apresentados).

O objectivo é verificar se o fenótipo observado nos EBs da linha heterozigótica Delta4^{+/-} é reproduzido pela presença da molécula Delta4 Δ ATEV/FLAG, uma vez que a mesma não possui o motivo responsável pela função de adesão.

Discussão

De forma a estudar o papel do sistema Notch na hematopoiese embrionária, recorreu-se ao modelo *in vitro* de diferenciação de EBs a partir de células estaminais embrionárias de ratinho. Este modelo reproduz fielmente a hematopoiese primitiva que ocorre no SV o que possibilita um estudo aprofundado das fases mais precoces da hematopoiese embrionária.

Primeiro caracterizou-se o sistema Notch por qRT-PCR aos dias 2, 4 e 6 de desenvolvimento de EBs diferenciados das células estaminais embrionárias Ainv15. É interessante que Delta4 apresente um aumento de expressão de transcrito ao dia 4, enquanto que a expressão de Jagged1 e Jagged2 aumenta ao dia 6. O dia 4 coincide com o pico da eritropoiese primitiva, o que leva a crer que Delta4 poderá ter alguma função neste processo. Outro aspecto importante é o facto de Delta4 ser o único componente da via Notch haploinsuficiente [26, 32], sendo uma forte indicação da sua importância no desenvolvimento embrionário. Notch4 tem também um aumento transitório de expressão, mas como já foi descrito na literatura [24], este receptor não é aparentemente muito importante para o desenvolvimento embrionário, uma vez que estudos de *knockout* deste gene em ratinhos não detectaram diferenças para os ratinhos normais.

Recorrendo a uma segunda linha celular estaminal de ratinho (R1) e a uma linha heterozigótica para Delta4 (Delta4^{+/-}) que deriva da linha R1, verificou-se que o pico de expressão de Delta4 em R1 está presente ao dia 3, um dia mais cedo que na linha Ainv15, o que poderá ser explicado por diferenças intrínsecas na dinâmica de diferenciação das duas linhas celulares. Em relação à linha heterozigótica Delta4^{+/-}, não se observa aumento transitório de expressão Delta4, sendo o nível basal de expressão semelhante ao da linha controlo

O potencial hematopoiético dos EBs foi analisado por ensaios clonogénicos em metilcelulose. A haploinsuficiência de Delta4 leva a uma significativa redução do número de colónias hematopoiéticas formadas, observando-se diminuição quer do potencial de formação de BL-CFC, quer do potencial eritro-mielóide. As colónias não apresentam qualquer diferença morfológica, como foi visto por intermédio da coloração de *Giemsa*. Apesar do EB não ser um modelo que recapitule a hematopoiese da AGM, pois nunca foram neles encontradas as CEH com capacidade de reconstituição hematopoiética definitiva *in vivo*, é esperado que as suas células tenham potencial de dar toda a linhagem hematopoiética, uma vez que estudos já realizados demonstraram que precursores com origem no saco vitelino têm

a capacidade de originar toda a linhagem eritro-mielóide [56]. Contudo estes precursores não apresentam ainda a capacidade de manter a sua estaminalidade, característica esta vista apenas, até à data, nos precursores formados na AGM. É provável que a haploinsuficiência de Delta4 afecte a formação do hemangioblasto, o precursor bipotente das CEH e das células estaminais endoteliais e, como tal, a formação endotelial também poderá estar a ser afectada.

Para averiguar se o efeito da haploinsuficiência de Delta4 é mediado por sinalização Notch, analisou-se por qRT-PCR a expressão de genes alvo do sistema Notch directamente relacionados com a hematopoiese e com a regulação da vasculogénese, Hey1, Hey2, Hes1 e Hes5. O padrão de expressão destes genes é semelhante nas linhas controlo e mutante, não se tendo observado diferenças quantitativas significativas. Assim, a análise da dinâmica de expressão destes genes nas duas linhas celulares, sugere que a ausência de Delta4 não afecta a sinalização Notch.

Outro ponto que corrobora a independência do fenótipo Delta4^{+/-} da sinalização canónica Notch, é a difícil detecção, por *western blot*, da forma clivada em S3 de Notch1 nos EBs controlo e mutante. De facto, ao longo do desenvolvimento dos EBs, apenas se consegue detectar a presença de proteína Notch1 clivada em S3 ao dia 4. Contudo, estudos recentes demonstraram que formas clivadas de NICD em aminoácidos próximos da Valina 1744 (clivagem S3), produzem formas instáveis mas com capacidade para activar a transcrição dos genes alvo [57]. Daí ser possível haver uma expressão dinâmica de genes alvo, sem necessariamente estar presente a forma clivada em S3.

O facto de não se ter conseguido detectar em EBs controlo Notch1 clivado em S3, excepto ao dia 4, não é de todo inesperado. Este modelo *in vitro* recapitula a hematopoiese primitiva e vários estudos demonstraram que o sistema Notch é dispensável nos primeiros dias de desenvolvimento do embrião [54]. Inclusive, em EBs *knockout* para Notch1 não se verificou qualquer diferença quantitativa das colónias hematopoiéticas formadas, precisamente o contrário do que se vê no fenótipo Delta4^{+/-} [20].

Outro dado importante está relacionado com as formas de Notch1 detectadas por *western blot* e sua localização celular analisada por imunohistoquímica. Por *western blot*, usando o anticorpo N1-IC, verificou-se que a expressão de Notch1 aumenta gradualmente ao longo dos dias desenvolvimentos, facto este que confirma estudos anteriores [20]. Em relação a NECD detectou-se a clivagem da proteína com dois anticorpos diferentes, embora com o anticorpo NECD (381-853) se tenha detectado uma banda muito próxima dos 180KDa, que poderá sugerir a presença de NECD intacto. Contudo, dados de imunohistoquímica não apresentados confirmaram que a proteína detectada com este anticorpo se localiza em endossomas

destinados à degradação. Notch1 detectado com dois anticorpos NECD (epitopo 20-150) e N1-IC (epitopo C-terminal), apresentam também um padrão vesicular citoplasmático, não se tendo conseguido detectar algum padrão membranar destas proteínas. Assim, apesar da co-localização da proteína inteira de NECD com vesículas de degradação e da presença de níveis vestigiais de NICD clivado em S3, não se consegue detectar um padrão membranar de Notch1, possivelmente porque a técnica de imunohistoquímica não tem poder de resolução para detectar a quantidade de proteína de Notch1 presente na membrana. Contudo, o facto de não haver diferenças visíveis entre EBs controlo e mutantes sugere que a sinalização Notch não será responsável pelo fenótipo observado em EBs mutantes.

Como aparentemente o fenótipo dos EBs heterozigóticos não é consequência de sinalização canónica Notch, surge a possibilidade da função de adesão de Delta4 ser importante. A análise por imunohistoquímica de EBs das duas linhas celulares demonstra uma inequívoca redução do tamanho dos EBs mutantes. É interessante verificar que os embriões heterozigóticos são também mais pequenos que os embriões normais [26] sendo, portanto um fenómeno semelhante ao que acontece nos EBs Delta4^{+/-}. As imagens da imunohistoquímica também mostram uma diminuição da E-caderina e uma aberrante morfologia com perda da forma esférica característica (dia 4). Sendo a E-caderina uma molécula membranar e responsável pela adesão, é esperado que a sua diminuição leve a uma redução da coesão celular dos EBs. Resultados de imunohistoquímica não apresentados neste trabalho revelam, ainda, que usando o marcador de estaminalidade SSEA-1 (*Stage Specific Early Antigen-1*) se verifica uma enorme diminuição de marcação de células com características estaminais nos EBs Delta4^{+/-}.

A redução do número de hemangioblastos e de todas as colónias hematopoiéticas em EBs mutantes, sem que haja qualquer alteração morfológica aparente, poderá dever-se, precisamente, a uma diminuição prematura da estaminalidade dos EBs Delta4^{+/-}, necessária para a génese de precursores hemato-endoteliais e posterior diferenciação hematopoiética.

Tendo em mente a importância de Delta4 na estabilidade de junções intercelulares mediadas por E-caderina [45, 48], a construção duma molécula de Delta4 sem o motivo ATEV responsável pela função de adesão de Delta4, poderá confirmar se a diminuição de E-caderina se deve a uma redução de Delta4 na membrana e, consequentemente, a instabilidade do complexo formado por Delta4, MAGI e Beta-catenina. O recurso a uma sobreexpressão da molécula mutante em CEE, poderá minimizar o efeito de Delta4 endógeno. A conhecida dificuldade em transfectar estavelmente CEE, as quais inactivam rapidamente a transcrição de transgenes inseridos no seu genoma, aconselha o recurso a um plasmídeo episomal que

garanta uma maior eficácia na produção da proteína. É importante também salientar que esta deleção do motivo ATEV não é dominante negativa da sinalização Notch, sendo este um aspecto importante para provar que a função de adesão de Delta4 é responsável pelas diferenças morfológicas obtidas e não a sinalização Notch.

Bibliografia

1. Choi, K., et al., *A common precursor for hematopoietic and endothelial cells*. Development, 1998. **125**(4): p. 725-32.
2. McGrath, K.E. and J. Palis, *Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye*. Exp Hematol, 2005. **33**(9): p. 1021-8.
3. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, *The journey of developing hematopoietic stem cells*. Development, 2006. **133**(19): p. 3733-44.
4. Godin, I. and A. Cumano, *The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 593-604.
5. Baron, M.H., *Embryonic origins of mammalian hematopoiesis*. Exp Hematol, 2003. **31**(12): p. 1160-9.
6. Metcalf, D., *On hematopoietic stem cell fate*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 669-73.
7. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
8. Morgan, T., *The theory of the gene*. Am. Nat., 1917. **51**: p. 513-44.
9. Radtke, F., A. Wilson, and H.R. MacDonald, *Notch signaling in T- and B-cell development*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(2): p. 174-9.
10. Maillard, I., T. Fang, and W.S. Pear, *Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 945-74.
11. Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
12. Kadesch, T., *Notch signaling: the demise of elegant simplicity*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(5): p. 506-12.
13. Radtke, F., et al., *The role of Notch signaling during hematopoietic lineage commitment*. Immunol Rev, 2002. **187**: p. 65-74.
14. Jaleco, A.C., et al., *Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 991-1002.
15. Lefort, N., et al., *Short exposure to Notch ligand Delta-4 is sufficient to induce T-cell differentiation program and to increase the T cell potential of primary human CD34+ cells*. Exp Hematol, 2006. **34**(12): p. 1720-9.
16. Saito, T., et al., *Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 675-85.
17. Radtke, F., et al., *Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 547-58.
18. Bigas, A., D.I. Martin, and L.A. Milner, *Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 2324-33.
19. Neves, H., et al., *Effects of Delta1 and Jagged1 on early human hematopoiesis: correlation with expression of notch signaling-related genes in CD34+ cells*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1328-37.
20. Hadland, B.K., et al., *A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3097-105.
21. Robert-Moreno, A., et al., *RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells*. Development, 2005. **132**(5): p. 1117-26.
22. Kumano, K., et al., *Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 699-711.
23. Krebs, L.T., et al., *Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation*. Genesis, 2003. **37**(3): p. 139-43.
24. Krebs, L.T., et al., *Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1343-52.
25. Xue, Y., et al., *Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 723-30.
26. Duarte, A., et al., *Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2474-8.
27. Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre, 2nd, and A. Gossler, *Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 717-21.
28. Zhang, N., C.R. Norton, and T. Gridley, *Segmentation defects of Notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice*. Genesis, 2002. **33**(1): p. 21-8.

29. Liu, Z.J., et al., *Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 14-25.
30. Lobov, I.B., et al., *Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3219-24.
31. Krebs, L.T., et al., *Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2469-73.
32. Gale, N.W., et al., *Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15949-54.
33. Shutter, J.R., et al., *Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1313-8.
34. Hellstrom, M., et al., *Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 776-80.
35. Suchting, S., et al., *The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3225-30.
36. Fischer, A., et al., *The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development*. Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 901-11.
37. Ridgway, J., et al., *Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1083-7.
38. Noguera-Troise, I., et al., *Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1032-7.
39. Thurston, G., I. Noguera-Troise, and G.D. Yancopoulos, *The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 327-31.
40. Siekmann, A.F. and N.D. Lawson, *Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 781-4.
41. Leslie, J.D., et al., *Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis*. Development, 2007. **134**(5): p. 839-44.
42. Iso, T., et al., *Dll4-selective Notch signaling induces ephrinB2 gene expression in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(3): p. 708-14.
43. Dorsch, M., et al., *Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2046-55.
44. Tachikawa, Y., et al., *Pivotal role of Notch signaling in regulation of erythroid maturation and proliferation*. Eur J Haematol, 2006. **77**(4): p. 273-81.
45. Six, E.M., et al., *The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55818-26.
46. Lowell, S. and F.M. Watt, *Delta regulates keratinocyte spreading and motility independently of differentiation*. Mech Dev, 2001. **107**(1-2): p. 133-40.
47. Wright, G.J., et al., *Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development*. Development, 2004. **131**(22): p. 5659-69.
48. Mizuhara, E., et al., *MAGII recruits Dll1 to cadherin-based adherens junctions and stabilizes it on the cell surface*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26499-507.
49. Dobrosotskaya, I., R.K. Guy, and G.L. James, *MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31589-97.
50. Baron, M.H., *Developmental Hematopoiesis: Methods and Protocols*. 2005, New Jersey: Humana Press.
51. Kennedy, M., et al., *A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 488-93.
52. Shen, H., et al., *The Notch coactivator, MAMLI, functions as a novel coactivator for MEF2C-mediated transcription and is required for normal myogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 675-88.
53. Sarmiento, L.M., et al., *Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 157-68.
54. Shi, S., et al., *Canonical Notch signaling is dispensable for early cell fate specifications in mammals*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9503-8.
55. Noggle, S.A., D. Weiler, and B.G. Condie, *Notch signaling is inactive but inducible in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1646-53.
56. Cumano, A., et al., *Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution*. Immunity, 2001. **15**(3): p. 477-85.
57. Del Monte, G., et al., *Monitoring Notch1 activity in development: evidence for a feedback regulatory loop*. Dev Dyn, 2007. **236**(9): p. 2594-614.

Anexo A

Meios de Cultura de Células

- Meio de MEFs

DMEM (Sigma) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (Gibco)
2mM de Glutamina (Sigma)
50U/mL de Penicilina / 50ug/mL de Estreptomicina (Sigma)

- Meio de CEE

DMEM (Sigma) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (Gibco)
2mM de Glutamina (Sigma)
50U/mL de Penicilina / 50ug/mL de Estreptomicina (Sigma)
1:100 de solução de aminoácidos não essenciais (Sigma)
0.1 mM de β -mercaptoetanol (Gibco)
1:100 de solução *stock* de nucleósidos (concentração final no meio: 30uM de adenosina; 30 uM de guanosina; 30 uM de uridina; 30 uM citidina; 10 uM de timidina (Sigma))
2000U/mL de LIF (Chemicon)

- Meio de pré diferenciação

IMDM (Sigma) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Gibco)
A constituição restante é igual ao Meio de CEE

- Meio de EBs

IMDM (Sigma) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Gibco)
2mM de Glutamina (Sigma)
50U/mL de Penicilina / 50ug/mL de Estreptomicina (Sigma)
1:100 de solução de aminoácidos não essenciais (Sigma)
0.1 mM de β -mercaptoetanol (Gibco)
1:100 de solução *stock* de nucleósidos (concentração final no meio: 30uM de adenosina; 30 uM de guanosina; 30 uM de uridina; 30 uM citidina; 10 uM de timidina (Sigma))
200ug/mL de Transferrina (Sigma)
4.5 mM de monotioglicerol (Sigma)
50ug/mL de ácido ascórbico (Sigma)

- Meio de Metilcelulose - Ensaios clonogénicos para medir potencial de BL-CFC:

1% Meio Metilcelulose (M 3120 – StemCell Technologies) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino e 50U/mL de Penicilina / 50ug/mL de Estreptomicina (Sigma)
200ug/mL de Transferrina (Sigma)
4.5 mM de monotioglicerol (Sigma)
50ug/mL de ácido ascórbico (Sigma)
5ng/mL VEGF
100ng/uL SCF

- Meio de Metilcelulose – Ensaios clonogénicos para medir potencial hematopoiético

1% Meio metilcelulose (M3434 – StemCell Technologies) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino e 50U/mL de Penicilina / 50ug/mL de Estreptomicina (Sigma)
200ug/mL de Transferrina (Sigma)
4.5 mM de monotioglicerol (Sigma)
50ug/mL de ácido ascórbico (Sigma)
2U/mL de Eritropoietina
1% IL-3 e 5ng/uL IL-6
100ng/uL SCF

Anexo B

Tabela 1: Primers de qRT-PCR

Primers	Sequência FWD 5'-3'	Sequência REV 5'-3'	Referência
GAPDH	CAT TGT GGA AGG GCT CAT GA	GCC CCA CGG CCA TCA	Zhang et al., 2005
Delta1	GGCCTTTTCTGCAACCAAGAC	GGAACATGTGTAGCTCCCTG	
Delta3	TGAAACCTCTGGCTCCTTGA	CCAACACACAAGCCGCC	
Delta4	GAGGTCCAAGCCGAACCTG	ATCGCTGATGTGCAGTTCACA	Gale et al., 2004
Jagged1	CACGTGGCCATCTCTGCAG	ACCGCAGCAATAAGTGAGCTGT	
Jagged2	AGGTGCCAGGAAGTGGTCATA	CATCCGCACCATACCTTGC	
Notch1	CCAGATCCTGCTCCGGAA	AAGCCGACTTGCCTAGGTCAT	
Notch2	TCTGCTCGGGTCTGCT	TTTTTCAGCCCCACGGC	
Notch3	AACCCTGTTTATGAGAAGTACTGCG	AGAACCCTCGGGCCA	
Notch4	GCTCCTATTGGCCAGCAGAC	GATCAATTCTTCAACCAGGTCCTC	
Hey1	GGG ACA GAG ATC GGA GCT TTC T	GCG ACT TTA GGG TGG TGT TGA C	Sadate-Ngatchou et al., 2004
Hey2	TGCCAAGTTAGAAAAGGCTGA	TCTGTCAAGCACTCTCGGAAT	Koo et al., 2005
Hes1	CTACCCAGCCAGTGTAAC	TTCATTATTCTGCCCTTCG	Koo et al., 2005
Hes5	AAGTGACTTCTGCGAAGTTC	AAGCCATGTGGACCTTGAGG	King et al., 2007

Tabela 2: Anticorpos usados em Western blot

Anticorpos primários	Origem	Diluição	Condições de incubação	Referência
N1-IC	Coelho	1:1000 leite 3%	o/n - 4°C	SantaCruz Biotechnology SC-6014
N1-EC (20-150)	Coelho	1:1000 leite 3%	o/n - 4°C	SantaCruz Biotechnology SC-9170
N1-EC (381-853)	Rato	1:1000 leite 3%	o/n - 4°C	Upstate Biotechnology #07-218
N1-S3 (Val1744)	Coelho	1:1000 leite 3%	o/n - 4°C	Cell Signaling Technology #2421
Beta-actina	Ratinho	1:1000 TBST	o/n - 4°C	SantaCruz Biotechnology SC-47778
Anticorpos secundários	Origem	Diluição	Condições de incubação	Referência
α -coelho – HRP	Cabra	1:5000 Leite3%	1 hora - temperatura ambiente	Promega - W4011
α -ratinho – HRP	Cabra	1:5000 Leite3%	1 hora - temperatura ambiente	Promega - W4021
α -rato – HRP	Rato	1:5000 Leite3%	1 hora - temperatura ambiente	SantaCruz Biotechnology SC-2006

Tabela 3: Anticorpos usados em Imunohistoquímica

Anticorpos primários	Origem	Diluição	Recuperação antigénica	Referência
N1-EC (20-150)	Coelho	1:50	15 min Ácido Bórico MW 800W pH 7.0	SantaCruz Biotechnology SC-9170
N1-IC	Coelho	1:100	15 min Ácido Bórico MW 800W pH 7.0	SantaCruz Biotechnology SC-6014
E-caderina	Ratinho	1:50	15 min Ácido Bórico MW 800W pH 7.0	BD Biosciences

Anexo C

Tabela 4: Materiais para a elaboração de géis SDS-PAGE

Resolving Buffer	Stacking Buffer	Mini Resolving Gel 8%	Mini Stacking Gel (para um gel)
91g TrisBase	30.3g TrisBase	5 mL Resolving Buffer	1.3 mL Stacking Buffer
pH 8.8 HCl 1M	pH 6.8 HCl 1M	5.85 mL H ₂ O	3 mL H ₂ O
Perfazer 500 mL H ₂ O	Perfazer 500 mL H ₂ O	4 mL Acrilamida (National Diagnostics)	0.75 mL Acrilamida
Filtrar 0,45 µm	Filtrar 0,45 µm	33.5 µL APS 20% (Biorad 161-0700)	22.5 µL APS 20%
-	-	150 µL SDS 10%	-
-	-	15 µL Temed (Biorad 161-0801)	13 µL Temed

Tabela 5: Soluções para a elaboração de Western Blot

TBST 10x	Running Buffer	Transfer Buffer	Sample Buffer 2x	Azul Coomassie	Solução de descoloração
440g NaCl (Calbiochem)	30.25g TrisBase	30g TrisBase	0.46g DTT 1M (Sigma)	0,25% Azul Coomassie (Biorad 161-0400)	10% Ácido Acético
60g TrisBase (Sigma T-1503)	5g SDS (Calbiochem #428015)	144g Glicina	3.2 mL Glicerol 100% (Calbiochem #356350)	50% Metanol	10% Metanol
pH 7.6	144g Glicina (Sigma G-8898)	Perfazer 8L H ₂ O	9 mL SDS 10%	10% Ácido Acético (Merck 1.00063.2511)	Perfazer com H ₂ O
Perfazer 5L H ₂ O	Perfazer 5L H ₂ O	-	3.2 ml TrisHCl pH 6.8 0.5M	Perfazer com H ₂ O	-
0.1% Tween 20 (Sigma P-7949)	-	20% Metanol (Merck #1.06009.2511) antes de cada utilização	2 mL Azul Bromofenol 0.1% (Merck 1.08122.0005)	(Dissolver o Azul de Coomassie no Metanol)	-
			Perfazer 20 mL H ₂ O	-	-

Anexo D

Tabela 6: Plasmídios recombinantes utilizados

Plasmídios recombinantes	Origem
pMSCV	João Barata
pMSCV+ΔE	João Barata
pMSCV+ICN	João Barata
pKSII+Delta4	António Duarte
Topo+Delta4ΔATEV/FLAG	-
Topo+Delta4/FLAG	-

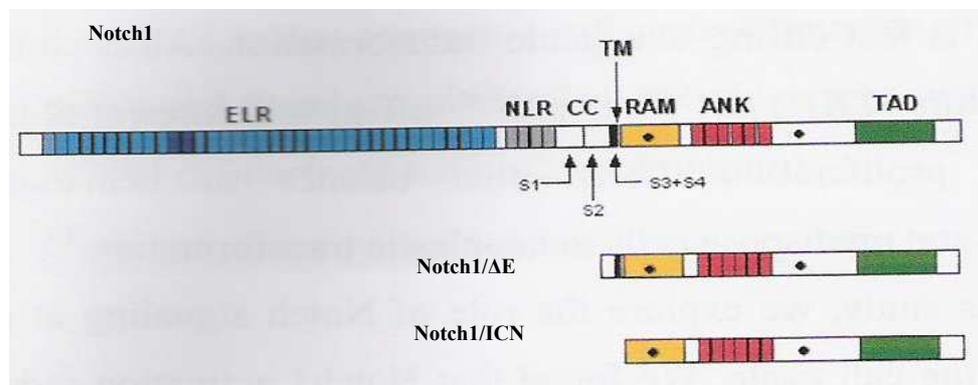


Figura 1: Mapa das construções de Notch1

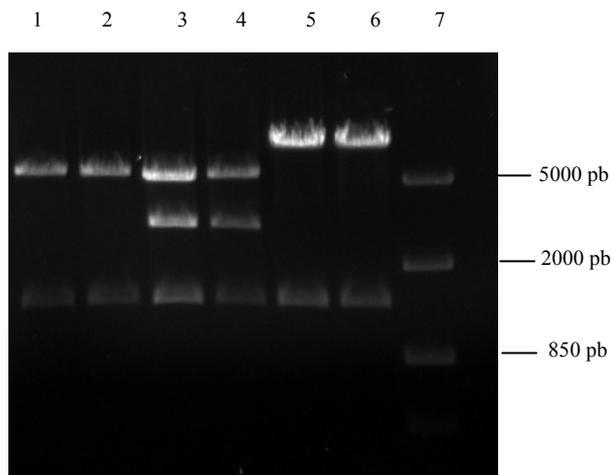


Figura 2: Padrão de restrição dos plasmídios pMSCV, pMSCV+ΔE e pMSCV+ICN num gel de agarose 0.8%

Analisaram-se duas colónias de bactérias transformadas com pMSCV, pMSCV+ΔE e pMSCV+ICN.

1. pMSCV digerido com BglII
2. pMSCV digerido com BglIII
3. pMSCV+ΔE digerido com BglII
4. pMSCV+ΔE digerido com BglIII
5. pMSCV+ICN digerido com BglII
6. pMSCV+ICN digerido com BglIII
7. FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range

Anexo E

Tabela 7: Primers usados no *overlapping* PCR

Primers	Sequência 5'-3'
I.KST7D	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG
II.DI4delFlagR	TCATTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCAATCACACTCGTTCCTCTCTCTG
III.DI4FlagD	GACTACAAGGACGACGATGACAAGTAATGAGGCAGGAGCCTACTCAGACACCCAGCT
IV.KST3R	TACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCAC
V.DI4FlagR	TCATTACTTGTCATCGTCCTTGTAGTCTACCTCTGTGGCAATCACACTCGTTCC
VI-1391DI4-D	GTGAGCATAGTACCTTGACCTGTGCGGACTC
VII-1421DI4-R	GAGTCCGCACAGGTCAAGGTACTATGCTCAC
VIII-1256DI4-D	CAGGCTACACTGGTGAGCACTGTGAGCTGGGACTC

Figura 3: Esquema de construção da molécula Delta4 Δ ATEV / FLAG

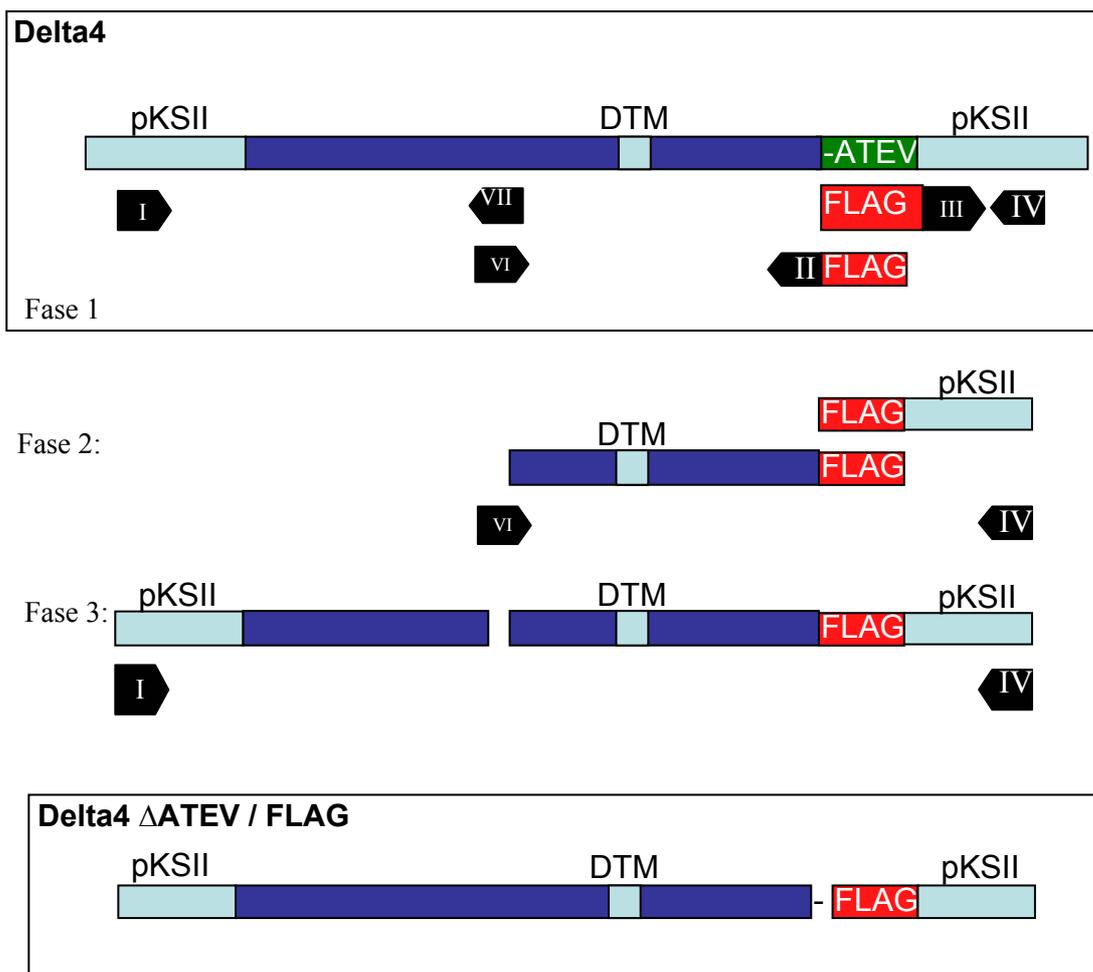


Figura 4: Esquema de construção da molécula Delta4 / FLAG

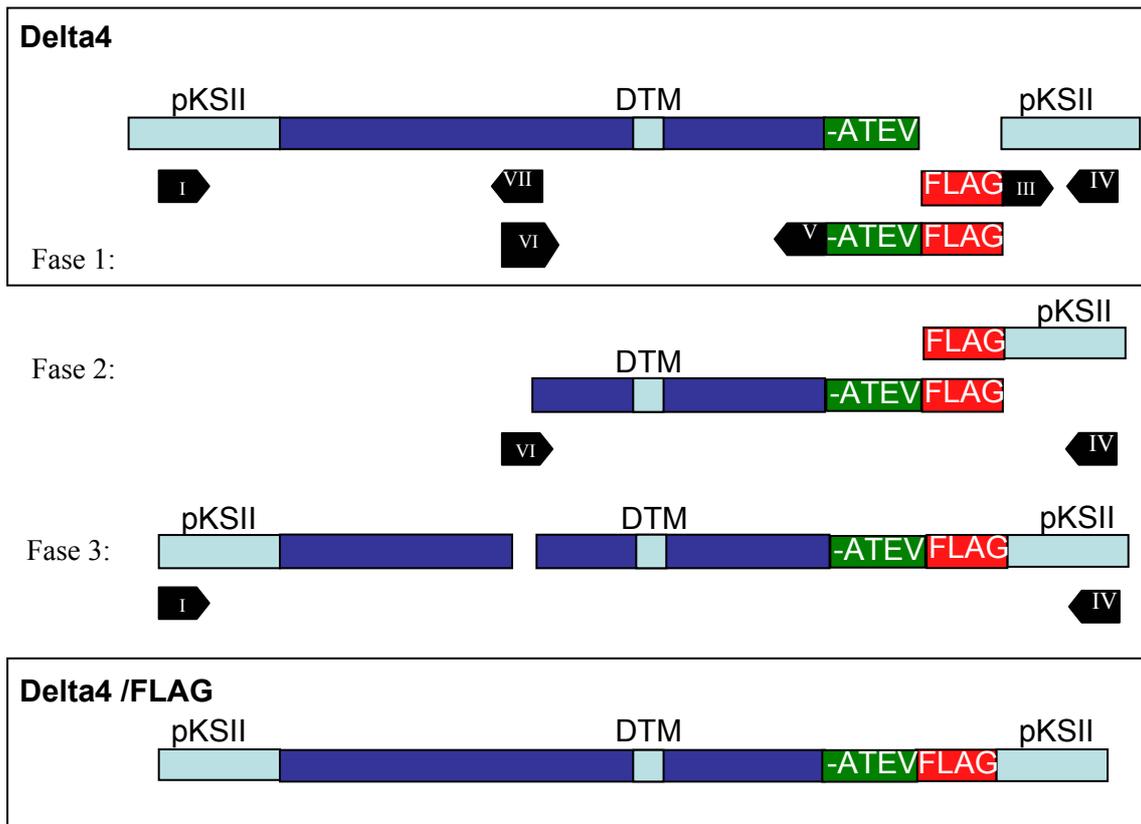


Tabela 8: Condições de *overlapping* PCR

Reagentes	Volume
Tampão <i>Pfu 10x</i>	5 μ L
dNTPs	4 μ L
Primer FWD	2 μ L
Primer REV	2 μ L
DMSO	5 μ L
DNA	\approx 100 ng
Polimerase <i>Pfu</i>	0.5 μ L
H ₂ O	Perfazer até 50 μ L

Tabela 9: Adição terminal de adenosinas

Reagentes	Volume
DNA	\approx 20 ng
Tampão GoTaq	1 μ L
MgCl ₂	0.5 μ L
dATP	1 μ L
Polimerase GoTaq	1 μ L
72°C - 10 min	

Figura 5: Condições de PCR

94°C - 4 min	(35x)
94°C - 2 min	
50°C - 2 min	
72°C - 5 min	
72°C - 7min	