

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Caracterização da proteína centrossomal TBCCD1 durante o desenvolvimento embrionário do peixe zebra

Maria Lúcia Mourão Barriga Negra

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos
- Especialização em Biologia e Ecologia Marinhas

2011

Maria Lúcia Mourão Barriga Negra

Caracterização da proteína centrossomal TBCCD1 durante o desenvolvimento embrionário do peixe zebra

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar – Recursos Marinhos - Especialização em Biologia e Ecologia Marinha submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutora Leonor Saúde

Categoria – Professora Auxiliar Convidada

Afiliação – Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Co-orientador- Doutora Helena Soares

Categoria – Professora Coordenadora

Afiliação – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

Agradecimentos

Estes últimos meses em que integrei o projecto de investigação científica contribuíram muito para o meu crescimento científico e pessoal. No final deste projecto chegou a altura de agradecer a todos aqueles que me ajudaram na realização deste trabalho.

Quero agradecer especialmente à Professora Leonor Saúde por me ter aceitado como estudante de mestrado no seu laboratório, por ter confiado em mim e principalmente por me ter proporcionado este projecto desafiante que contribuiu para os conhecimentos científicos que adquiri.

Gostaria também de agradecer à Professora Helena Soares por me ter apoiado sempre que precisei ao longo deste projecto e por me ter ensinado tanto.

Ao Professor Eduardo Rocha por me ter sugerido este laboratório, pela sua disponibilidade e principalmente por ter acreditado em mim.

A todos os membros da UDEV que me proporcionaram momentos inesquecíveis, de grande alegria e por me terem ajudado a ultrapassar as minhas dificuldades e a esclarecer todas as dúvidas.

À Ana Margarida que me acompanhou ao longo de todo o meu estágio e me ensinou quase todos os procedimentos práticos e à Joana que foi incansável e me ajudou em tudo.

Aos membros da sala de lavagens e da *fishfacility* que estiveram sempre presentes e pela boa disposição.

Ao Professor Domingos Henrique que me aceitou no seu laboratório nos últimos meses do meu projecto, a todos os membros da UBD pela boa disposição, simpatia, disponibilidade e principalmente à Elsa por me ter cedido a sua bancada e material e à Sara por toda a paciência e ajuda que me deu.

Às minha colegas de casa pela companhia, amizade e por todos os momentos que passámos, principalmente à Ana, a melhor colega de quarto, que me ajudou sempre que precisei e tornou tudo mais fácil, obrigada!

Um agradecimento muito especial às pessoas que tornaram tudo isto possível e que me têm vindo a apoiar em toda a minha vida académica e pessoal, Cristina, irmãos e principalmente os meus pais, a quem dedico com muito carinho esta tese. Muito obrigada!

Resumo

O citosqueleto é uma estrutura altamente dinâmica presente em todas as células eucarióticas e responsável por uma variedade de funções incluindo organização espacial do citoplasma e forma da célula. Para exercer as suas funções, o citosqueleto integra a actividade de múltiplos componentes poliméricos e proteínas associadas.

O citosqueleto é composto por três elementos poliméricos: filamentos de actina também conhecido por microfilamentos, filamentos intermédios e microtúbulos. Os microtúbulos são os filamentos com o maior diâmetro e possuem o processo dinâmico mais complexo de montagem e desmontagem. Estes são encontrados no citoplasma e podem formar estruturas complexas como cílios e flagelos. As subunidades estruturais e funcionais dos microtúbulos são os heterodímeros de α/β -tubulina. As tubulinas e as proteínas associadas a microtúbulos são principalmente responsáveis pelas propriedades dinâmicas finais dos microtúbulos. A via na qual a tubulina adquire a sua estrutura tridimensional funcional (via de “folding”) é complexa e inclui várias etapas que requerem a interacção de tubulinas com diversas moléculas chaperonas e cofactores proteicos que auxiliam no processo. Um dos cofactores é o TBCC (cofactor de tubulina C), o menos estudado nos últimos anos.

Recentemente, descreveu-se em humanos e na alga verde *Chlamydomonas* a existência de uma nova proteína relacionada com o TBCC uma vez que este possui um domínio TBCC e CARP, ambos presentes no TBCC. Esta proteína foi designada TBCCD1 (“TBCC-domain containing 1”) e é altamente conservada ao longo da árvore filogenética.

A proteína humana TBCCD1 localiza-se no centrossoma, zona mediana do fuso mitótico, no corpo mediano e no corpo basal do cílio primário e móvel. O silenciamento de TBCCD1 em linhas celulares humanas provoca diferentes fenótipos: deslocamento do centrossoma em relação ao núcleo, desorganização do aparelho de Golgi, atraso na divisão celular, anomalias na migração celular e defeitos na ciliogénese. Uma vez que os fenótipos descritos demonstraram que TBCCD1 desempenha um papel importante em acontecimentos como divisão celular, migração celular, polaridade celular e várias funções dos cílios sugeriu-se que esta proteína terá funções cruciais na embriogénese. Assim, o nosso objectivo foi caracterizar o papel da proteína TBCCD1 durante o desenvolvimento usando o vertebrado peixe zebra como organismo modelo. Para cumprir este objectivo decidiu-se estudar a expressão do gene *tbccd1* em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião de peixe zebra

realizando a técnica de hibridação *in situ* em embriões inteiros. Foram também analisados cortes histológicos para averiguar diferenças espaciais da expressão do gene *tbccd1* nos embriões hibridados. Finalmente, estas análises foram complementadas com um RT-PCR para analisar a expressão de *tbccd1* nos estádios de desenvolvimento estudados do embrião de peixe zebra.

Os resultados mostram que o gene *tbccd1* é de facto expresso em todos os estádios de desenvolvimento estudados do peixe zebra. Curiosamente, os resultados obtidos através da hibridação *in situ* e a subsequente análise dos cortes histológicos sugeriram a possibilidade da existência não só de um mRNA “sense” mas também de um mRNA “antisense” do gene *tbccd1*. Através da técnica de RT-PCR demonstrou-se inequivocamente que o gene *tbccd1* é transcrito em todos os estádios de desenvolvimento estudados e que a possibilidade da existência de um transcrito “antisense” não é conclusiva. Para compreender o papel de *tbccd1* no desenvolvimento embrionário é necessário estabelecer a sua função exacta *in vivo* que pode ser conseguida através da identificação dos mecanismos moleculares e vias na qual a proteína actua.

Palavras-chave: microtúbulos, TBCCD1, hibridação *in situ*, embriões de peixe zebra

Abstract

The cytoskeleton is a highly dynamic structure present in all eukaryotic cells and is responsible for a variety of functions including the cytoplasmic spatial organization and shape. To achieve this function, the cytoskeleton integrates the activity of a multitude of polymer components and associated proteins.

The cytoskeleton is composed by three polymer elements: actin filaments also known as microfilaments, intermediate filaments and microtubules. Microtubules have the larger diameter of the three polymers and have the most complex assembly and disassembly dynamics. These are found in the cytoplasm and may form complex structures such as cilia or flagella. The structural and functional subunits of microtubules are the α/β -tubulin heterodimers. The tubulins and their microtubule-associated proteins are mainly responsible for the final microtubule dynamic properties. The pathway in which tubulin acquires its functional tridimensional structure (folding pathway) is complex including a number of steps and requiring the interaction of tubulins with several molecular chaperones and protein cofactors that assist in this process. One of the cofactors is the TBCC (tubulin cofactor C), which is the least studied in these past years.

Recently, it was described in human and in the green algae *Chlamydomonas* the existence of a new protein related to TBCC since it possesses a TBCC and CARP domain both present in TBCC. This protein was designated as TBCC-domain containing 1 (TBCCD1) and is highly conserved throughout the phylogenetic tree.

The human TBCCD1 protein localizes at the centrosome, spindle midzone, midbody and basal bodies of primary and motile cilia. Knockdown of TBCCD1 in a human cell line causes a number of different phenotypes: displacement of the centrosome in relation to the nucleus, disorganization of Golgi apparatus, delay of cell division, anomalies in cell migration and defects in ciliogenesis. Since the described phenotypes show that TBCCD1 may have important roles in events like cell division, cell migration, cell polarity and cilia function we hypothesized that this protein will have a critical function to embryogenesis. Therefore, our aim was to characterize TBCCD1 function during development using the vertebrate zebrafish as a model organism.

To accomplish this aim we have decided to study the expression of *tbccd1* gene in different development stages of zebrafish embryo by performing *in situ* hybridization in whole embryos. We also analysed histological sections to investigate the spatial differences of *tbccd1* gene expression in the hybridized embryos. Finally,

these studies were complemented by a RT-PCR analysis of *tbccd1* expression in the studied developmental stages of zebrafish embryo.

Our results show that TBCCD1 is in fact expressed at low and ubiquitous levels in all studied developmental stages of the zebrafish. Curiously, the results obtained by *in situ* hybridization and the subsequent histological sections analysis suggested the existence of a sense and an antisense *tbccd1* mRNA. By RT-PCR we have unequivocally demonstrated that *tbccd1* gene is transcribed in all the developmental stages studied of the zebrafish embryo and showed that an antisense transcript does not justifies the *in situ* hybridization results obtained with the sense probe. Additional investigation is required to uncover the role of *tbccd1* in development and to establish its precise function *in vivo* which can be achieved by identifying the molecular mechanisms and pathways where the protein acts.

Keywords: microtubules, TBCCD1, *in situ* hybridization, zebrafish embryos

Abreviaturas e símbolos

ATP – Trifosfato de Adenosina

CAP – “Cyclase associated-protein”

CARP – “Domain in CAPs”

cDNA – DNA complementar

CCT – “Chaperonin containing T-complex”

cin2 – “Chromosome instability 2”

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

BSA - Albumina de soro bovino (“Bovine Serum Albumin”)

DEPC - Pirocarbonato de Dietilo (“diethyl dicarbonate”)

DNA – ácido desoxirribonucleico (“desoxiribonucleic acid”)

DNase - desoxirribonuclease

ddNTPs - didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (“Dideoxynucleotides Triphosphate”)

dNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfatados (“Dideoxynucleotides Triphosphate”)

EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético (“ethylene diamine tetraacetic acid”)

EF1 α – “Elongation Factor 1 alfa”

EGTA – ácido etileno glicol tetracético (“ethylene glycol tetraacetic acid”)

endo-siRNAs – “endogenous - small interfering RNAs”

g – grama

xg – força centrífuga (g corresponde à força de gravidade)

GAP – “GTPase activating protein”

GCPs - “gamma complexes proteins”

GDP – Difosfato de Guanosina

GFP - “Green fluorescent protein”

GimC – Prefoldina (“hetero-oligomeric protein complex”)

GTP – Trifosfato de Guanosina

HCl – ácido clorídrico

HM – Solução de hibridação (“HybMix”)

H₂O – Óxido de Hidrogénio

hpf – horas pós-fertilização

IFT - Transporte Intraflagelar (“Intraflagellar Transport”)

Kb – 10³ pares de bases

KCl – Cloreto de Potássio

Kda – 10³ Dalton

KH₂PO₄ – Dihidrogenofosfato de Potássio

LB – “Lysogeny Broth

M - Molar

MAPs – Proteínas Associadas a Microtúbulos (“Microtubule Associated Proteins”)

MeOH – Metanol

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

mL – mililitro

mM - milimolar

mRNA – RNA mensageiro

MTOC – “microtubule organizing center”

Na₃C₆H₅O₇ – Citrato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

Na₂EDTA – EDTA dissódico

Na₂HPO₄ – monohidrogenofosfato de Sódio

NATs - “Natural antisense transcripts”

NBT - cloreto de azul de 4-nitro-tetrazólio

ng – nanograma

Pi - Fosfato inorgânico

PBS – “Phosphate buffered saline”

PBT – PBS com detergente Tween20

PCM - Material Pericentriolar (“pericentriolar matrix”)

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PFA - paraformaldeído

pH – inverso do logaritmo da concentração de H⁺

pmol – picomol

RP2 - “retinitis pigmentosa protein”

RNA – ácido ribonucleico (“ribonucleic acid”)

RNase – Ribonuclease

rRNA – RNA ribossomal

RT-PCR – “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”

SSC – “saline-sodium citrate”

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TBC – “Tubulin Cofactors”

TBCA - “Tubulin Cofactors A”

TBCB - “Tubulin Cofactors B”

TBCC - “Tubulin Cofactors C”

TBCD - “Tubulin Cofactors D”

TBCCD1 - “TBCC-containing protein 1”

TCP-1 – “T-complex polypeptide 1”

TE – Tris-EDTA”

tRNA – RNA de transferência

µg - micrograma

µL – microlitro

% - percentagem

°C – graus Celsius

γ-TuRC - “γ-tubulin-containing ring complex”

Índice

I. Introdução.....	1
1. Citosqueleto.....	2
2. Microtúbulos.....	3
2.1. Comportamento dinâmico dos microtúbulos	5
2.2. Nucleação dos microtúbulos.....	7
3. Centrossoma	9
3.1. Organização e função do Centrossoma	9
4. Estruturas especializadas de microtúbulos: os cílios	11
5. Cofactores da Tubulina.....	11
5.1. Via de “folding” da tubulina.....	12
5.2. TBCCD1.....	13
6. Objectivos	16
II. Materiais e Métodos	17
1. Modelo biológico	18
1.1. Peixe zebra	18
1.2. Recolha de embriões de peixe zebra.....	19
2. Estudo da expressão do gene <i>tbccd1</i> em embriões de peixe zebra	21
2.1. Hibridação <i>in situ</i>	21
2.1.1. Sequenciação do plasmídeo pCS2+ <i>tbccd1</i>	21
2.1.2. Transformação de células competentes.....	22
2.1.3. Extracção de DNA plasmídico.....	23
2.1.4. Síntese das sondas sense e antisense a partir do plasmídeo pCS2+ <i>tbccd1</i>	24
2.1.4.1. Electroforese de DNA/RNA.....	24
2.1.4.2. Extracção de bandas correspondentes a fragmentos de DNA a partir do gel de agarose	24
2.1.4.3. Linearização de plasmídeos com enzimas de restrição	25
2.1.4.4. Transcrição <i>in vitro</i>	26
2.1.4.5. Hidrólise não enzimática de sondas de RNA.....	27
2.1.5. Técnica de Hibridação <i>in situ</i>	28
2.2. Análise da expressão de genes por PCR qualitativo.....	30
2.2.1. Técnica de PCR Qualitativo.....	30
2.2.2. Extracção de RNA total de embriões de peixe zebra em diferentes estádios	

do desenvolvimento.....	31
2.2.3. Síntese de cDNA das amostras de RNA dos embriões de peixe zebra.....	32
2.2.4. Análise da expressão “sense” e “antisense” do gene <i>tbccd1</i> em embriões de peixe zebra em diferentes estádios do desenvolvimento por RT-PCR Qualitativo ...	33
III. RESULTADOS	35
1. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para o estudo da expressão e caracterização do gene <i>tbccd1</i> de peixe zebra	36
2. Estudo da expressão do gene <i>tbccd1</i> em embriões de peixe zebra por hibridação <i>in situ</i>	38
3. Análise da expressão sense e antisense do gene <i>tbccd1</i> por RT-PCR qualitativo.....	42
IV. Discussão e Conclusão	50
V. Perspectivas.....	54
VI. Bibliografia.....	57

I. Introdução

1. Citosqueleto

O citosqueleto é uma estrutura altamente dinâmica presente em todas as células eucarióticas. Esta estrutura desempenha três funções principais: organização espacial do citoplasma; comunicação física e bioquímica entre a célula e o meio externo, mobilidade celular e modificação/manutenção da forma da célula. O citosqueleto integra a actividade de inúmeros organelos e proteínas citoplasmáticas importantes para o desempenho das suas funções. O citosqueleto, ao contrário do que se pensava quando foi descoberto, trata-se de uma estrutura dinâmica e adaptativa onde proteínas reguladoras e filamentos proteicos se encontram em constante fluxo. Este é especialmente constituído por três tipos de polímeros: filamentos de actina, filamentos intermédios e microtúbulos (Fig.I.1) (revisto por Fletcher and Mullins, 2010).

Todos estes polímeros são organizados em redes organizadas resistentes à deformação, e capazes de se reorganizarem em resposta a estímulos externos, sendo importantes no arranjo e na manutenção da integridade dos compartimentos intracelulares. Juntos, controlam a forma e mecanismos celulares, tais como a migração, transporte celular, divisão celular entre outros processos. São por isso responsáveis pela dinâmica e ligação contínua entre a maioria das estruturas da célula (Alberts et al., 2002). Todos os três tipos de filamentos associam-se de maneira diferente a proteínas através de ligações não-covalentes fracas. A diferença estrutural das subunidades monoméricas dos filamentos e a maneira como se associam conferem propriedades mecânicas diferentes.

Os filamentos de actina podem ser estáveis ou dinâmicos, desempenhando funções na mobilidade celular, citocinese e contração das células musculares por interacção com filamentos de miosina. Em células especializadas estes filamentos podem originar projecções celulares designadas por microvilosidades que aumentam a área de superfície das células e por isso são tão importantes em órgãos envolvidos na absorção como é o caso do intestino. Os filamentos de actina designados também por microfilamentos são formados por monómeros de actina globular (G – actina). Os polímeros de actina e tubulina ligam-se e hidrolisam um nucleótido de ATP e de GTP, respectivamente. Tal como no caso da polimerização da tubulina, a orientação das subunidades de actina aquando a sua polimerização origina polímeros estruturalmente polares. Os filamentos intermédios na sua maioria são citoplasmáticos existindo tipos específicos para cada tipo celular o que proporciona características mecânicas específicas às células e consequentemente aos diferentes tecidos. Existe um tipo de filamento intermédio nuclear que forma a lâmina nuclear ao longo da superfície interna

do envelope nuclear, envolvendo deste modo o DNA da célula. Estes filamentos são constituídos essencialmente por proteínas filamentosas, sem actividade catalítica e ao contrário dos microtúbulos e dos microfilamentos de actina não são polarizados (revisto por Janmey, 1998). Os microtúbulos, frequentemente encontrados no citoplasma, são dos três polímeros os de maior diâmetro e os mais resistentes. Estes são organizados a partir do centro, geralmente na proximidade do núcleo de uma célula em interfase e reorganizam-se rapidamente para formar o fuso acromático numa célula em divisão mitótica. Os microtúbulos podem também originar estruturas especializadas na superfície da célula tais como os cílios no epitélio respiratório e os flagelos nos espermatozóides (Alberts et al., 2002). Os microtúbulos são formados por subunidades de tubulina. A tubulina é um heterodímero formado por duas proteínas globulares a α -tubulina e β -tubulina. Tanto os microtúbulos como os filamentos de actina apresentam uma extremidade que cresce mais rápido que a outra. A diferença entre as duas extremidades nos microtúbulos e filamentos de actina faz com que haja para cada uma das extremidades taxas distintas de polimerização. A organização dos componentes celulares e as mudanças de forma resultam da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina e microtúbulos (Alberts et al., 2002; Janmey, 1998).

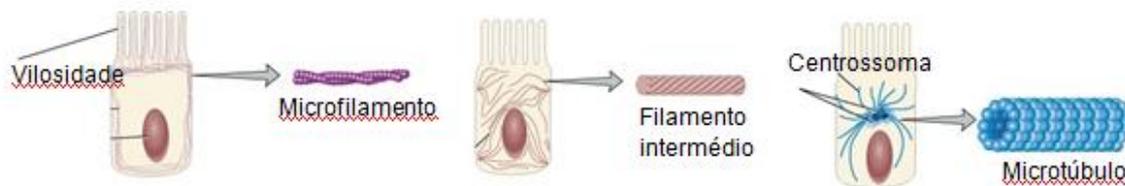


Fig.1.1. **Citoesqueleto.** Distribuição dos elementos do citoesqueleto na célula (esquerda). Detalhes da estrutura (direita) (<http://mbiocel.wordpress.com/2009/05/18/receptores-celulares/>).

2. Microtúbulos

Os microtúbulos são polímeros longos e rígidos que se estendem ao longo do citoplasma. Estes desempenham funções importantes na divisão celular, nomeadamente na formação do fuso mitótico, na segregação dos cromossomas, na orientação do plano de divisão celular e na posição intracelular de organelos. Estes polímeros são a principal estrutura dos cílios e flagelos eucariotas (revisto por Desai e Mitchison, 1997).

Os microtúbulos são compostos por heterodímeros de duas proteínas globulares, α -tubulina e β -tubulina, ligadas fortemente por ligações não-covalentes. Cada microtúbulo é formado normalmente por 13 protofilamentos, onde os heterodímeros de tubulina se organizam topo a topo em protofilamentos lineares, que por sua vez se associam lateralmente formando um tubo oco com cerca de 25nm de diâmetro. Devido ao modo como os heterodímeros de tubulina se associam para originar os protofilamentos os microtúbulos são estruturas polares. Na extremidade (+) encontra-se a β -tubulina sendo que na extremidade (-) encontra-se a α -tubulina. As duas extremidades dos microtúbulos apresentam diferentes taxas de polimerização devido à sua polaridade, sendo designada como positiva (+) a extremidade de maior e com rápida polimerização, e como negativa (-) a de menor e mais lenta polimerização. Este processo requer energia sob a forma de GTP.

Os monómeros de α e β -tubulina têm 50% de similaridade em relação à sequência de resíduos de aminoácidos, tendo cada um uma massa molecular aproximada de 55 KDa (revisado por Desai e Mitchison, 1997). Cada monómero de α e β -tubulina tem um local de ligação a um nucleótido de guanina (trifosfato de guanosina - GTP). A α -tubulina que se liga ao GTP não tem a capacidade de hidrolisar, designando-se como “non -exchangeable” ou não permutável (local de ligação designado como “local N”). Em contraste, a β -tubulina tem a capacidade de hidrolisar o GTP na forma de GDP (difosfato de guanosina) quando o heterodímero é adicionado à extremidade (+) do microtúbulo, resultando na polimerização do microtúbulo. O local de ligação de β -tubulina é designado como “local E” (“exchangeable” ou permutável). A hidrólise do GTP a GDP no local E tem um efeito importante na dinâmica do microtúbulo (Alberts et al., 2002; Downing et al., 1998). No monómero da tubulina o local de ligação N de α -tubulina encontra-se na interface intradímero, sendo que o local E de ligação ao GTP de β -tubulina encontra-se parcialmente exposto na superfície do dímero. No entanto, durante a polimerização este local torna-se “oculto” na interface intradímero, impedindo a permuta de GDP por GTP (revisado por Nogales et al., 2006). Quando ocorre a despolimerização os heterodímeros livres na conformação de GDP têm a capacidade de permutar o GDP pelo nucleótido GTP, tornando-se novamente aptos a polimerizar e podendo assim ser reciclados (revisado por Nogales et al., 2000).

2.1. Comportamento dinâmico dos microtúbulos

Os microtúbulos apresentam um carácter dinâmico, alternando entre fases de crescimento (polimerização) e de fases de encurtamento (despolimerização), que requer a ligação, hidrólise e permuta de GDP/GTP (Alberts et al., 2002; Nogales, 2006).

A Instabilidade Dinâmica dos microtúbulos necessita de energia para alterar o balanço químico entre a polimerização e despolimerização – energia esta que é fornecida pela hidrólise de GTP. A energia de “input” resultante da hidrólise do GTP permite um desequilíbrio no processo de polimerização resultando numa instabilidade dinâmica, onde as extremidades dos microtúbulos alternam, aleatoriamente, entre períodos longos de crescimento (polimerização) e de encurtamento (despolimerização). A transição para a fase de despolimerização designa-se por catástrofe e a transição para a fase de polimerização por recuperação (Fig.1.2.) (revisto por Desai e Mitchison, 1997). Este carácter dinâmico do microtúbulo é determinado pela taxa de incorporação de heterodímeros de tubulina no microtúbulo e pela taxa de hidrólise de GTP (Alberts et al., 1994). A Instabilidade Dinâmica resulta assim de um atraso da hidrólise do GTP em relação à velocidade de ligação da tubulina dos novos heterodímeros de tubulina ao microtúbulo.

Quando o microtúbulo cresce (polimeriza), as moléculas de tubulina juntam-se à extremidade deste polímero, sendo este processo mais rápido que a hidrólise do GTP que é carregado por eles. Isto resulta na presença de um “CAP” de GTP na extremidade (+) do microtúbulo, o que estabiliza o microtúbulo e estimula a polimerização, uma vez que as moléculas de tubulina que contêm GTP ligam-se umas às outras com maior afinidade do que as moléculas que contêm GDP. O “CAP” de GTP promove assim a estabilização e o crescimento do microtúbulo. Por outro lado, a hidrólise do GTP em GDP e a consequente libertação do Pi induzem a alteração da conformação das moléculas de tubulina, resultando na perda do “CAP” de GTP e à subsequente despolimerização do microtúbulo, levando ao seu encurtamento. A diminuição da taxa de polimerização poderá ser também uma das razões que levará à perda do “CAP” (revisto por Desai e Mitchison, 1997; Alberts et al., 1994).

A instabilidade dinâmica de microtúbulos pode influenciar significativamente determinados processos celulares, nomeadamente processos mitóticos, organização do citoplasma, posicionamento de organelos na célula entre muitos outros. Esta instabilidade dinâmica pode ser assim suprimida pela ligação de determinadas proteínas aos microtúbulos, estabilizando-os contra a despolimerização. Uns dos

exemplos destas proteínas são as Proteínas Associadas a Microtúbulos (MAPs). Estas proteínas são geralmente alongadas e flexíveis sendo que algumas delas, nomeadamente a proteína “STOP” (“stable tubule only polypeptide”), protegem os microtúbulos de temperaturas baixas e agentes despolimerizantes, sendo responsáveis pela estabilização da dinâmica dos microtúbulos (revisto por Nogales et al., 2000). Por outro lado, existe também proteínas designadas catastrofinas que se associam à extremidade (+) dos microtúbulos e promovem a catástrofe através da dissociação dos dímeros de tubulina. As MCAK (“mitotic-centromere-associated kinesin”) são um exemplo de catastrofinas, que são membros da família das proteínas cinesinas (proteínas motoras) e promovem a dissociação dos dímeros de tubulina no cinetócoro durante a anafase da mitose.

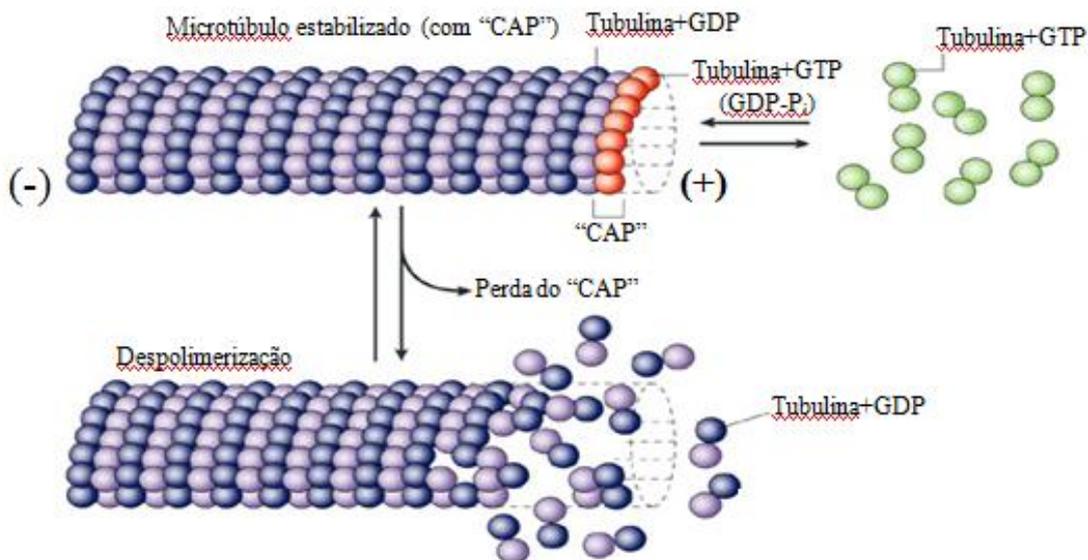


Fig.I.2. Representação esquemática da instabilidade dinâmica do microtúbulo. A Tubulina ligada ao GTP é hidrolisada na forma GDP e fosfato inorgânico (Pi) no momento em que a tubulina se liga às extremidades do microtúbulo (polimerização). A extremidade do microtúbulo que contém tubulina-GTP é estabilizada não sofrendo despolimerização pela adição do “CAP”. A hidrólise do GTP em GDP e a consequente libertação do Pi induzem a alteração da conformação das moléculas de tubulina, resultando na perda do “CAP” e à subsequente despolimerização do microtúbulo (catástrofe) (Adaptado por Jordan e Wilson, 2004).

2.2. Nucleação dos microtúbulos

O processo de nucleação dos microtúbulos desempenha um papel importante na dinâmica intracelular e no funcionamento dos mesmos. A nucleação é assim importante na organização espacial dos microtúbulos (revisto por Desai e Mitchison, 1997). Este processo ocorre principalmente em estruturas especializadas designadas como centros organizadores de microtúbulos (MTOC – “microtubule organizing center”), onde cada centro está associado à extremidade (-) do microtúbulo (revisto por Nogales, 2000). Os MTOCs referem-se normalmente aos centrossomas e aos “corpos polares do fuso” em células animais e em leveduras, respectivamente. O par de centríolos dos centrossomas está envolvido num material proteico designado como material pericentriolar (PCM). A γ -tubulina é um dos componentes proteicos do PCM sendo crítica para o processo de nucleação dos microtúbulos que ocorre nos centrossomas (revisto por Gonçalves et al., 2010; Lüders e Stearns, 2007; Lopez-Fanarraga et al., 2001). Esta proteína possui uma elevada homologia na sequência de aminoácidos com as α - e β -tubulinas. Em contraste com α/β -tubulinas, que são os constituintes das paredes dos microtúbulos, a γ -tubulina localiza-se nos pólos do fuso durante a mitose e nos centrossomas durante a interfase em células animais (revisto por Desai e Mitchison, 1997; Lajoie-Mazenc et al., 1994). A γ -tubulina forma um complexo com uma família de proteínas conservadas, designadas nos humanos como GCPs (“gamma complexes proteins”). Este grande complexo é referido como γ -TuRC (“ γ -tubulin-containing ring complex”) devido à sua forma em anel quando visualizado em microscopia electrónica (revisto por Lüders e Stearns, 2007). O γ -TuRC contém diversas cópias de γ -tubulinas e pensa-se ser uma unidade fundamental para a nucleação dos microtúbulos (Moritz et al., 2000). Foram propostos dois modelos que explicam a nucleação dos microtúbulos: modelo do “Molde” e o modelo do “Protofilamento” (Fig.1.3.). O modelo “Molde” baseia-se na forma e tamanho do complexo γ -TuRC, uma vez que o anel do complexo, onde γ -tubulinas se associam lateralmente formando um “anel”, forma a primeira volta da hélice do microtúbulo em crescimento, servindo como molde para a associação longitudinal dos heterodímeros α/β -tubulina. O segundo modelo, “Protofilamento”, propõe que existem moléculas de γ -tubulinas que se associam umas com as outras longitudinalmente formando estruturas semelhantes a protofilamentos, promovendo a associação lateral de subunidades de α/β -tubulina e o subsequente crescimento e fecho do microtúbulo.

Sabe-se actualmente que o complexo γ -TuRC permite estabilizar os microtúbulos pela adição de um “CAP ” à extremidade negativa durante a interfase, impedindo a dinâmica da extremidade (-) do microtúbulo ancorado ao centrossoma (revisto por Nogales, 2000; Moritz et al., 2000). Em conclusão, este complexo pode influenciar a dinâmica dos microtúbulos, desempenhando funções importantes ao nível dos centrossomas, nomeadamente durante o processo de mitose (revisto por Desai e Mitchison, 1997).

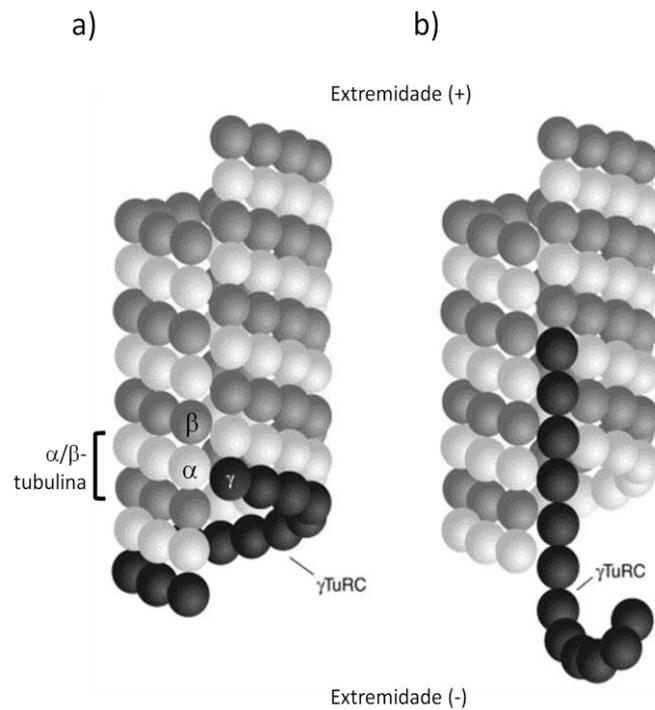


Fig. I.3. Modelos da nucleação do microtúbulo. (a) O modelo “Molde” propõe que as γ -tubulinas do γ -TuRC interagem umas com as outras lateralmente. O γ -TuRC determina o número de protofilamentos no microtúbulo. (b) O modelo ‘protofilamento’ sugere que as γ -tubulinas no complexo γ -TuRC associam-se entre elas longitudinalmente e com as α/β -tubulinas lateralmente (Adaptado de Moritz e Agard, 2001).

3. Centrossoma

3.1. Organização e função do Centrossoma

O Centrossoma é o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) nas células animais. Os centrossomas desempenham assim funções importantes não só na organização do citosqueleto das células, mas também na coordenação de vários processos celulares mediados pelos componentes proteicos presentes no centrossoma incluindo posicionamento de organelos (ex: aparelho de Golgi), migração celular, adesão e polaridade celular, formação do fuso mitótico e nucleação do axonema dos cílios, convertendo-se num corpo basal.

Este é formado por dois centríolos geralmente dispostos ortogonalmente e rodeados pela PCM, referida anteriormente. Cada centríolo apresenta uma estrutura cilíndrica formada normalmente por 9 tripletos de microtúbulos com cerca de 0,5 µm de comprimento e 0,2 µm de diâmetro. O corpo basal dos cílios e flagelos eucariotas apresentam uma estrutura idêntica à dos centríolos.

Durante a divisão celular origina-se um novo centríolo (centríolo-filho) similar ao centríolo maturo originalmente presente nas células-mãe (centríolo-mãe). O centríolo-mãe evidencia-se pela presença de dois conjuntos de apêndices na extremidade sub-distal e distal (ver Fig.1.4). Estes apêndices são responsáveis pelo ancoramento dos microtúbulos nos centríolos e pelo ancoramento do centríolo-mãe na membrana plasmática durante a ciliogénese. Os centríolos são estruturas muito estáveis sendo os microtúbulos que os constituem resistentes a agentes despolimerizadores e ao frio. Esta estabilidade está associada a modificações pós-traducionais tal como a poliglutaminação da tubulina centriolar (revisto por Azimzadeh e Bornens, 2007; Bornens, 2008; Bettencourt-Dias e Glover, 2007).

O centrossoma assume um papel importante em inúmeros processos celulares durante a interfase e mitose tais como divisão e movimento celular, transporte intracelular, nucleação e organização dos microtúbulos. Durante o processo de divisão celular os centrossomas recém formados cooperam na formação e organização do eixo mitótico, e a sua orientação influencia o processo de citocinese. Para além disso, a função do centrossoma como corpo basal é essencial para a formação e desenvolvimento de cílios primários, sendo estes cruciais na fisiologia de um organismo (revisto por Bettencourt-Dias e Glover, 2007; Juliette Azimzadeh e Michel Bornens, 2007).

Entre os mais diversos componentes proteicos da matriz pericentriolar encontram-se complexos de γ -tubulina, assim como várias proteínas como por exemplo pericentrina e nineína envolvidas no ancoramento e nucleação de microtúbulos no centrossoma. A γ -tubulina está presente ao longo de todo o ciclo celular, próximo das paredes dos centríolos. Os seus níveis aumentam abruptamente imediatamente antes da mitose, simultaneamente com o recrutamento de proteínas associadas aos microtúbulos necessárias à formação do fuso mitótico. Os apêndices sub-distais do centríolo-mãe parecem estar relacionados com o ancoramento dos microtúbulos, sendo necessária a intervenção de componentes como a nineína. Um grande número de proteínas centrossomais tem sido também descrito como sendo importante nos processos de citocinese, por exemplo a centriolina.

O centrossoma, para além da sua função na organização de microtúbulos é também importante no processo de ciliogénese, tendo sido demonstrado por diversos estudos que o centríolo-mãe em células de vertebrados é crucial na nucleação e montagem dos cílios, através da sua migração e acoplamento na membrana plasmática durante a fase G0 da mitose e da sua posterior transformação em corpo basal, indispensáveis em vários processos celulares e de desenvolvimento tais como mobilidade celular e propagação de sinais morfogenéticos na embriogénese (revisto por Azimzadeh e Bornens, 2007; Bettencourt-Dias e Glover, 2007; Kobayashi e Dynlacht, 2011).

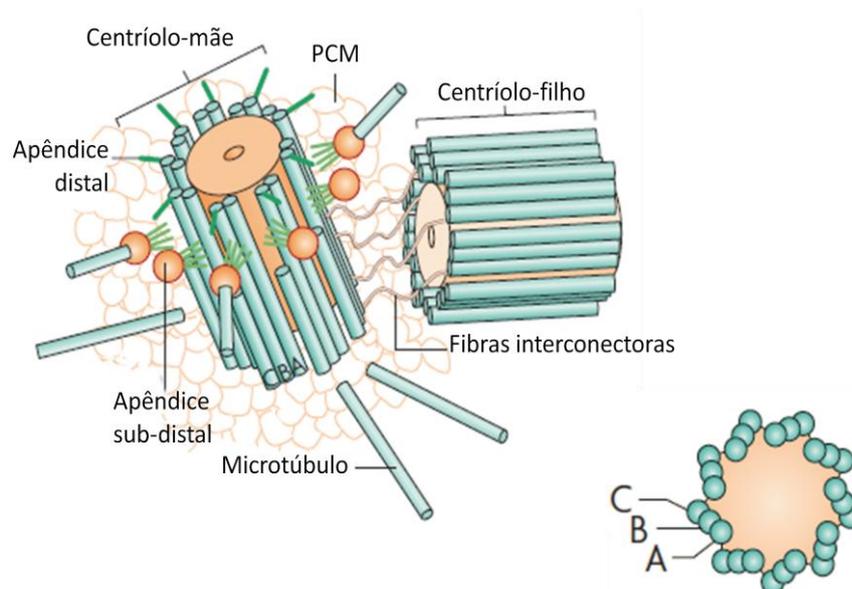


Fig.1.4] Esquema da estrutura do centrossoma. Representação dos dois centríolos, mãe e filho, assim como a matriz pericentriolar. Cada triplete é representado como (A), microtúbulos completos e por (B) e (C), microtúbulos incompletos (Adaptado por Bettencourt-Dias e Glover, 2007; Fliegauf et al., 2007).

4. Estruturas especializadas de microtúbulos: os cílios

Os cílios são organelos celulares especializados, que se projectam das superfícies apicais das células, e desempenham diversas funções celulares como: mobilidade celular, movimento de fluidos, regulação de mecanismos de sinalização (ex: via de sonic hedgehog, crucial durante o processo de organogénese e tumorigénese) e manutenção da homeostasia celular (revisto por Bisgrove e Yost, 2006; Eggenschwiler e Anderson, 2007). Os cílios são constituídos por uma estrutura de microtúbulos especializada, o axonema, que se estende a partir de um centríolo denominado corpo basal (revisto por Scholey, 2003). O axonema é uma estrutura altamente coordenada de nove dupletos periféricos de microtúbulos, dispostos em torno de um núcleo central que pode ou não conter um par central de microtúbulos (9+2 ou 9+0), designando-se por cílios móveis ou secundários e cílios não - móveis ou primários, respectivamente (revisto por Bisgrove e Yost, 2006). Os componentes dos cílios (axonema e membrana especializada ciliar) são sintetizados no corpo celular e de seguida transportados para a base do cílio. Este transporte designa-se como transporte intraflagelar (IFT) e consiste num sistema especializado de transporte de complexos proteicos que ocorre do citoplasma da célula, responsável pela síntese dos componentes estruturais e funcionais do cílio, para o axonema do cílio em direcção à sua extremidade, retornando ao citoplasma do corpo basal (revisto por Scholey, 2008). As ciliopatias são uma classe de doenças genéticas causadas por defeitos na ciliogénese (formação do cílio) ou estrutura e função dos cílios móveis e primários (revisto por Badano et al., 2006; Goetz e Anderson, 2010).

5. Cofactores da Tubulina

Diversos cofactores proteicos designadamente os cofactores da tubulina (TBC) intervêm na via de “folding” das tubulinas. Esta via exerce um papel determinante nos processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos. A associação das tubulinas com os cofactores permite a sua dimerização originando-se no final o heterodímero de tubulina competente para polimerizar. Os cofactores de tubulina, TBCB, TBCC, TBCD e TBCE têm vindo a emergir como proteínas com funções cruciais não só na via de “folding” das tubulinas, mas também na regulação da dinâmica do citosqueleto. Estudos de análise genética em levedura identificaram a

existência de uma hierarquia funcional ao longo dos cofactores de tubulina, existindo uma diferença evidente no papel desempenhado pelos cofactores no “folding” das tubulinas (Gonçalves et al., 2010; Szymanski, 2002).

5.1. Via de “folding” da tubulina

Os heterodímeros de α/β -tubulina competentes para polimerizar nos microtúbulos, resultam de um processo complexo de aquisição da estrutura tridimensional nativa das tubulinas e da subsequente dimerização (via de “folding”) (Lopez-Fanarraga et al., 2001).

Os monómeros de tubulina recém sintetizados interagem inicialmente com a prefoldina à saída dos ribossomas, complexo hetero-oligomérico (GimC), que por sua vez entrega estes polipéptidos à chaperonina citosólica que contém o TCP-1 (CCT) (Lopez-Fanarraga et al., 2001; Guasch et al., 2002). A chaperonina citosólica assiste no “folding” de α e β -tubulina, que requer a hidrólise de ATP e termina com a libertação dos monómeros de tubulina da chaperonina citosólica numa conformação *quasi*-nativa. Vários ensaios *in vitro* demonstraram a interacção das tubulinas *quasi*-nativas com diversos cofactores de tubulina, num processo designado via de “folding” pós-chaperonina, onde a α - e β -tubulina seguem vias distintas (Guasch et al., 2002; Tian et al., 1996; Tian et al., 1997). A α -tubulina é capturada e estabilizada pelo cofactor B (TBCB) na sua forma *quasi*-nativa, enquanto β -tubulina pelo cofactor A (TBCA), que irão ser substituídos pelos cofactores E (TBCE) e D (TBCD), respectivamente. O cofactor C (TBCC) interage com o TBCE e TBCD formando um supercomplexo (TBCE/ α -tubulina/TBCC/TBCD/ β -tubulina). Este complexo estimula a libertação do heterodímero de α/β -tubulina competente através da hidrólise do GTP em GDP pela β -tubulina. Este é finalmente permutado por GTP tornando-se o heterodímero competente para polimerizar (Gonçalves et al., 2010; Nolasco et al., 2005; Radcliffe et al., 2000; Tian et al., 1996).

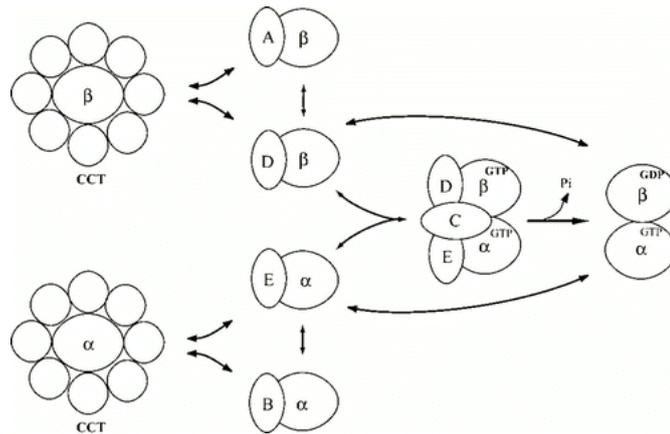


Fig.1.5|Diagrama esquemático da interação da chaperonina citosólica e dos cofactores de tubulina com α - e β -tubulina. Os monómeros de α e β -tubulina ligam-se à chaperonina citosólica (CCT) para formarem o heterodímero α/β -tubulina. Os monómeros de tubulina *quasi* – nativa libertados pela CCT são capturados e estabilizados pelos cofactores B e E, no caso de α -tubulina, e por A e D, no caso da β -tubulina. O complexo dimérico α/E e β/D interagem entre si e ligam-se subsequentemente ao cofactor C, formando um supercomplexo pentamérico (TBCE/ α -tubulina/TBCC/TBCD/ β -tubulina). Por fim, a hidrólise de GTP pela β -tubulina no supercomplexo actua como troca para a libertação dos dímeros de tubulina (α e β) nativos (Adaptado por Nogales, 2000).

5.2. TBCCD1

O TBCC é de todos os cofactores ainda o menos estudado. Este cofactor foi purificado a partir de extractos de testículos de bovino como sendo uma proteína de cerca de 40 KDa e capaz de induzir a libertação do heterodímero α/β -tubulina pelo complexo TBCE/ α -tubulina/TBCD/ β -tubulina, como referido anteriormente, actuando assim como GAP (“GTPase activating protein”) para a β -tubulina (Gonçalves et al., 2010; Nolasco et al., 2005; Tian et al., 1996). O estudo da sensibilidade a drogas despolimerizadoras durante a caracterização de mutantes de levedura *S. cerevisiae* levaram à identificação do gene *cin2* como gene homólogo do TBCC. A proteína CIN2 e o cofactor C actuam ambos na estabilidade dos microtúbulos (Bartolini et al., 2002). A função do TBCC foi igualmente estudada na planta *Arabidopsis thaliana* onde o gene homólogo é designado por *Porcino* (POR). Determinou-se através de imunofluorescência que o gene *Porcino* se localiza no citoplasma, não parecendo haver associação entre a proteína e os microtúbulos. Demonstrou-se que mutantes deste gene possuem uma perda de função levando a deformações celulares significativas, embora não seja posto em causa a viabilidade da célula. Adicionalmente, os embriões mutantes neste gene mostram a ausência de

microtúbulos, evidenciando assim a importância de TBCC na formação dos microtúbulos, possivelmente devido à sua função conservada na via de “folding” das tubulinas. Por outro lado, a sobre-expressão de POR na planta *Arabidopsis* não provocou quaisquer efeitos adversos na formação de microtúbulos sugerindo que POR não se liga directamente aos monómeros de tubulina. Este resultado está de acordo com o da sobre-expressão de TBCC em cultura de células HeLa em que nenhum efeito adverso foi detectado (Steinborn et al., 2002).

A proteína RP2 (“retinitis pigmentosa protein”) associada ao cromossoma X é responsável pela degeneração progressiva de células fotoreceptoras e similar ao TBCC, partilhando mais de metade da sequência nucleotídica, especificamente os domínios “TBCC” e “CARP”, que se encontram na região N-terminal da proteína. Tian (1996) demonstrou que o TBCC e a RP2 complementam parcialmente a deleção de *cin2* em *S. cerevisiae*, o que mostra a ocorrência de uma sobreposição funcional apesar de serem do ponto de vista da sua sequência de aminoácidos distantemente relacionados com a proteína CIN2 (Bartolini et al., 2002; Hage-Sleiman et al., 2010).

Análises da localização celular da RP2 através de imunofluorescência mostraram que a RP2 se localiza na membrana plasmática e predominantemente no citoplasma de células em cultura de mamíferos. No entanto, a localização da RP2 varia de acordo com o tipo celular (Chapple et al., 2000; Gonçalves et al., 2010; Schwahn et al., 2001). Recentemente, detectou-se a localização da RP2 no cílio primário do epitélio renal de peixe zebra e demonstrou-se a interacção e regulação do tráfego do produto proteico do gene da doença policística renal 2 (PKD2), a proteína policistina-2. Adicionalmente, ensaios de perda de função do homólogo da RP2 em peixe zebra demonstraram o aparecimento de defeitos morfológicos associados a anomalias na função ciliar, sugerindo que a RP2 é essencial para o funcionamento dos cílios durante o desenvolvimento de vertebrados (Hurd et al., 2010). Análises estruturais e bioquímicas mostraram que a RP2 actua como GAP para Arl3, proteína associada a microtúbulos (MAP) e localizada nos cílios conectores das células fotoreceptoras. Através de microscopia electrónica a RP2 foi também identificada no corpo basal e no centríolo do cílio conector das células fotoreceptoras, na região pericentriolar e no complexo de Golgi em murganho. Demonstrou-se que a desregulação de Arl3 resultante do silenciamento do gene *rp2* leva a uma fragmentação do complexo de Golgi dos cílios conectores das células fotoreceptoras e a uma dispersão do transporte de proteínas entre o segmento interior e exterior das células fotoreceptoras, nomeadamente da proteína IFT20 envolvida no transporte IFT, presente nos cílios e complexo de Golgi das mesmas células. Foi assim proposto que

a regulação de Arl3 pela RP2 é importante no transporte de vesículas que carregam proteínas a partir do Golgi para o cílio (Evans et al., 2010).

A relação funcional do TBCC com a RP2 levou a um estudo mais aprofundado do genoma humano de busca de proteínas com domínios específicos de cofactores de tubulina. Durante este processo identificou-se uma nova proteína, TBCCD1 (“TBCC – domain containing 1”), conservada ao longo da árvore filogenética (Gonçalves et al., 2010). O TBCCD1 foi descrito em *Chlamydomonas* no estudo do papel do gene *asq2* na orientação do fuso mitótico durante a mitose. O gene *asq2* codifica uma proteína relacionada com o TBCC, o TBCCD1, importante para o posicionamento dos centríolos nos pólos da célula e na orientação do fuso mitótico durante o processo de mitose. Na alga verde *Chlamydomonas*, o TBCCD1 localiza-se na região sub-proximal dos centríolos, entre os filamentos conectores dos centríolos e o envelope nuclear, numa estrutura conhecida por rizoplasto. Na maioria das células mutantes de *asq2* em *Chlamydomonas* os centríolos de um ou de ambos os pólos estão ausentes. Estas células apresentam também defeitos no posicionamento do fuso mitótico. Sugeriu-se que anomalias no posicionamento dos centríolos, no número de centríolos e na orientação do fuso mitótico pode ser resultado de perturbações na ligação entre os centríolos mediado por Tbccd1/Asq2 (Feldman e Marshall, 2009).

Ensaio de microscopia de imunofluorescência em células de mamífero revelaram que o TBCCD1 está localizado no centrossoma durante o ciclo celular, na zona mediana do fuso mitótico, no corpo mediano e no corpo basal do cílios primários e dos cílios móveis (Gonçalves et al., 2010). Ao contrário do TBCC, o TBCCD1 parece não actuar como GAP visto não possuir o resíduo de arginina conservado, responsável pela actividade das proteínas GAP. Estudos do silenciamento de TBCCD1 em cultura de células humanas provaram que esta proteína desempenha um papel importante no controlo e manutenção da associação do centrossoma ao núcleo, na divisão e migração celular, na organização do aparelho de Golgi e principalmente na ciliogénese. TBCCD1 parece assim ser um novo elemento importante na fisiologia e desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2010).

6. Objectivos

Os microtúbulos são estruturas fundamentais em várias funções biológicas como a mobilidade celular, divisão celular, transporte intracelular, manutenção da forma e estrutura da célula entre outras.

A unidade estrutural funcional dos microtúbulos é o heterodímero de tubulina. *In vivo* a aquisição da estrutura tridimensional nativa do heterodímero da tubulina, que o torna competente para polimerizar em microtúbulos, é um processo complexo constituído por várias etapas e envolvendo várias chaperonas moleculares e diferentes cofactores de tubulina (TBCE-TBCA). Nos últimos anos o estudo destes cofactores e de proteínas relacionadas tem vindo a mostrar que estes cofactores não estão exclusivamente envolvidos na maturação dos heterodímeros da tubulina mas também na sua reciclagem e degradação, o que os coloca numa posição privilegiada no processo de regulação da qualidade e da disponibilidade de tubulina para polimerizar, e por consequência na dinâmica dos microtúbulos.

Recentemente, uma nova proteína relacionada com o TBCC, designada por TBCCD1 (TBCC domain-containing 1) foi descrita, quer em células humanas, quer na alga verde *Chlamydomonas*. De facto, o TBCCD1 contém um domínio TBCC e CARP partilhado pelo cofactor da tubulina C (TBCC) e pela proteína RP2 (“retinitis pigmentosa protein 2”), sendo uma proteína conservada ao longo da árvore filogenética (Gonçalves et al., 2010; Hage-Sleiman et al., 2010).

Estudos de silenciamento do gene que codifica o TBCCD1 mostraram que este desempenha um papel importante no posicionamento do centrossoma e na sua ligação ao núcleo com impacto em diversos processos biológicos, nomeadamente na divisão/migração celular, na manutenção e organização de organelos na célula e na ciliogénese devido à sua localização no corpo basal dos cílios (Gonçalves et al., 2010).

Neste contexto, o estudo realizado no Laboratório de Desenvolvimento Embrionário de Vertebrados do Instituto de Medicina Molecular de Lisboa, teve por objectivo caracterizar o papel da proteína TBCCD1 *in vivo* usando como modelo biológico o peixe zebra, poderoso organismo usado no estudo do desenvolvimento embrionário de vertebrados e doenças genéticas humanas (Briggs, 2002).

Concretamente pretendeu-se analisar a expressão específica do gene *tbccd1* ao longo de várias etapas do desenvolvimento embrionário do peixe zebra utilizando para isso a técnica de hibridação *in situ* e de RT-PCR.

II. Materiais e Métodos

1. Modelo biológico

1.1. Peixe zebra

O peixe zebra é um peixe tropical ovíparo, originário da Ásia, que vive em água doce e que atinge um comprimento máximo de seis centímetros.

Devido às suas características o peixe zebra tornou-se nos últimos anos um poderoso organismo modelo nomeadamente para o estudo do desenvolvimento embrionário de vertebrados e para a compreensão de doenças genéticas humanas. Este pequeno teleosteo possui um curto tempo de geração, um elevado número de ovos por cada desova e todos os estádios de desenvolvimento são acessíveis, uma vez que a fecundação é externa e a larva do peixe zebra é transparente. O facto de o genoma estar sequenciado, de existirem mutantes, transgénicos e numerosas ferramentas para manipulação genética, como por exemplo a possibilidade de sobre-expressar genes ou de os silenciar utilizando morfolidos, tem vindo a permitir numerosas abordagens experimentais, que têm contribuído para a sua emergência como modelo biológico dos vertebrados (Briggs, 2002).

Os estádios de desenvolvimento do peixe zebra dividem-se em horas-após-fertilização e baseiam-se nas características morfológicas dos embriões (por exemplo número de células e sómitos), que podem ser facilmente identificadas à lupa (ver Tabela II.1) (Kimmel et al., 1995).

O embrião de 2 hpf pertence ao período de Clivagem (0:75 – 2:25 hpf). Aqui o embrião contém já 64 células formando a blastoderme. Nas fases iniciais dos estádios de desenvolvimento embrionário (0 – 5:25 hpf) o genoma do embrião ainda não está transcricionalmente activo, sendo os genes de origem materna os que contribuem inteiramente para a regulação e desenvolvimento embrionário inicial. Este estágio é caracterizado pela rápida e sincronizada divisão celular (Ciruna et al., 2002).

O embrião de 6 hpf pertence ao período de Gastrulação (5:25 – 10:33 hpf). O embrião nesta fase encontra-se entre 50 - 75% de epibolia. Neste período o embrião permanece em 50% de epibolia até à formação completa do escudo embrionário ("embryonic shield"). As células do hipoblasto e do epiblasto intercalam-se na futura parte dorsal do embrião, formando assim o escudo embrionário. Este escudo é designado como o "organizador" e é onde se dá a maior movimentação celular que leva à formação da mesoderme que se vai deslocando para o futuro lado anterior do embrião. O escudo embrionário será assim responsável pela organização dos eixos embrionários e pela padronização regional do tubo neural (Kimmel et al., 1995).

O embrião de 13 hpf representa o período de segmentação (10:33 – 24 hpf). Esta fase de desenvolvimento é marcada pela presença de sómitos (8 sómitos às 13 hpf ao longo do tronco e cauda do embrião), pelos arcos faríngeos primordiais, desenvolvimento dos neurómeros, aparecimento da cauda e da vesícula de Kupffer. Esta vesícula é uma estrutura celular ciliada que se desenvolve na cauda do embrião no final da gastrulação. A vesícula de Kupffer tem um papel essencial na definição do eixo esquerdo-direito do embrião (Essner et al., 2005).

O embrião de 24 hpf pertence ao período de Faríngula (24 – 48 hpf). Nesta fase a cabeça e o corpo do embrião começam a endireitar-se. A notocorda e o sistema circulatório encontram-se já bem desenvolvidos. Aparecimento de pigmentação e de batimentos cardíacos pela primeira vez.

O embrião de 48 hpf pertencente ao período de incubação (“Hatching”) (48 – 72 hpf). Este período é marcado pela formação completa do primeiro sistema de órgãos, pelo desenvolvimento da cartilagem, nomeadamente na cabeça. Este período é também caracterizado pelo rápido desenvolvimento das barbatanas peitorais (“Long Pec”), mandíbulas e brânquias (Kimmel et al., 1995).

Após este período o embrião adquire a denominação de larva e nada livremente.

1.2. Recolha de embriões de peixe zebra

Para se proceder ao estudo da expressão do gene *tbccd1* ao longo do desenvolvimento do peixe zebra, foram recolhidos embriões “selvagens” da linha AB de diferentes estádios. Estes foram recolhidos para placas de petri com um meio de crescimento adequado, e incubados a 28°C para promover o seu desenvolvimento.

O meio de crescimento usado para o desenvolvimento dos embriões e larvas de peixe zebra foi o meio embrionário 1x [200 mL de meio embrionário* 50x; 1 mL de azul de metileno (2%)].

* Uma solução “stock” de meio embrionário 50x (1L): 14,69g NaCl; 0,63g KCl; 2,43g CaCl₂ * 2H₂O; 4,07g MgSO₄ * 7H₂O, perfazer com água milli Q.

Tabela II.1| Estádios de desenvolvimento de peixe zebra (adaptado por Kimmel, 1995)

Embrião	Estádio	Horas de desenvolvimento após fertilização (hpf)	Descrição
	1 Célula	0,2 hpf	O ooplasma acumula-se no pólo animal
	64 Células	2 hpf	3 filas regulares de blastómeros
	Cúpula	4,3 hpf	Blastoderme apresenta forma de cúpula; blastómeros movem-se em direcção ao pólo animal; início da epibolia.
	Escudo embrionário	6 hpf	50% Epibolia; movimentos de epibolia em direcção ao pólo vegetativo; escudo embrionário.
	75% Epibolia	8 hpf	Lado dorsal distintamente mais espesso; epiblasto, hipoblasto,
	100% Epibolia	10 hpf	Botão da cauda proeminente; notocorda rudimentar distinta da “quilha” neural; 100% epibolia.
	6 Sómitos	12 hpf	“Polster prominent”; vesícula ótica, vesícula de Kupffer.
	14 Sómitos	16 hpf	Placas óticas; ventrículos do cérebro; sómitos em forma de “v”; extensão do vitelo incompleta; ductos pronéfricos.
	Primórdio 6	25 hpf	Pigmentação na retina e e pele; células sanguíneas; batimento cardíaco.
	“Long pec”	48 hpf	Melanóforos na linha lateral; circulação sanguínea em 2-4 arcos aórticos; batimento de cílios olfactivos; canais semicirculares; neuromastos.
	“Protruding-mouth”	72 hpf	Parte dorsal e cabeça amarela; fendas branquiais; arcos branquiais cobertos pelo opérculo; cleitrum.

2. Estudo da expressão do gene *tbccd1* em embriões de peixe zebra

2.1. Hibridação *in situ*

2.1.1. Sequenciação do plasmídeo pCS2+-*tbccd1*

A sequenciação consiste na determinação da ordem das bases nitrogenadas, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) de um fragmento de DNA. O método tradicional de sequenciação foi proposto por Frederick Sanger na década de 70. Este método baseia-se na adição de nucleótidos modificados, didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), que interrompem a polimerização da cadeia de DNA, uma vez que não possuem o grupo 3'-OH, não sendo assim possível estabelecer a ligação fosfodiéster com o próximo nucleótido a ser adicionado (Sanger et al., 1977). O método divide-se em quatro principais etapas: i) desnaturação do fragmento de DNA de cadeia dupla, originando duas cadeias simples moldes para a síntese *in vitro* de DNA; ii) hibridação de oligómeros ("primers") com a cadeia de DNA molde, facultando o início da reacção de polimerização catalizada pela DNA polimerase; iii) adição de DNA polimerase e dos diferentes dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) e ddNTPs (modificados) marcados com fluorescência, permitindo a distinção das cadeias interrompidas pela respectiva fluorescência; iv) electroforese das cadeias simples de DNA, separando as diferentes cadeias de DNA (que diferem entre si apenas por um ddNTP).

As reacções de sequenciação foram realizadas segundo o protocolo "BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing". Para cada reacção de sequenciação do plasmídeo pCS2+-*tbccd1* foram usados 600 ng de DNA molde e 3,2 pmol dos "primers" SP6 e T7 (Promega) em diferentes tubos, prosseguindo-se com a reacção de PCR, para um volume final de 10 µL. As reacções de sequenciação realizadas por PCR consistiram em 25 ciclos compostos por 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após a reacção de PCR, acertou-se o volume da reacção com 10 µL de água autoclavada milli Q perfazendo um volume final de 20 µL. Em seguida, procedeu-se então à precipitação do DNA com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (pH=4,6) e 2,5 volumes de etanol 95% por cada tubo. Os tubos foram incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugados numa centrífuga a 20800 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e

ressuspendeu-se o sedimento com 250 μL de etanol 70%. Centrifugou-se a 20800 x g por 15 minutos, removendo novamente o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento. O sequenciador usado na sequenciação automática foi o “ABI Prism 377 DNA Sequencer” (Applied Biosystems) do IGC (Instituto Gulbenkian de Ciência). O “software” utilizado para o “377 DNA Sequencer” requer o “filter set E” e “377 Big Dye Terminator v1.1 Matrix Standards”. Foram feitos 1200 “scans”/hora.”

2.1.2. Transformação de células competentes

Uma célula de uma determinada bactéria é competente quando está apta a receber DNA exógeno. As células competentes usadas neste protocolo foram de *Escherichia coli* da estirpe DH5T. A competência pode ser adquirida através de diversas técnicas. Estas técnicas envolvem tratamentos com soluções, como cloreto de magnésio (MgCl_2) e cloreto de cálcio (CaCl_2) e mudanças abruptas de temperaturas. Estas soluções e mudanças de temperaturas alteram a permeabilidade da parede celular das células, permitindo assim a entrada do DNA exógeno (transformação).

As células competentes foram transformadas com a introdução do plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* para ser posteriormente amplificado e se proceder à sua extracção e purificação.

Para cada transformação adicionou-se 100 μL de células competentes para 1 μL de DNA plasmídico recombinante e incubou-se no gelo durante 30 minutos. Em seguida, as células foram sujeitas a um choque térmico de 45 segundos a 42°C seguido de 2 minutos no gelo. Depois do choque térmico adicionou-se 900 μL de meio SOB [20g Peptona; 5g extracto de levedura; 2 mL NaCl 5M; 5,5 KCl 1M em 1 L de H₂O milli Q], suplementado com MgCl_2 1M e MgSO_4 1M, e as bactérias foram deixadas a agitar durante 1 hora a 37°C. No final deste período plaqueou-se 50 μL da suspensão de células transformadas, numa caixa de petri contendo meio sólido de LB agar com 200 μL de antibiótico ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), sendo estas em seguida incubadas a 37°C durante a noite. Só as bactérias efectivamente transformadas com o plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* crescerão na placa com o antibiótico, dado que o plasmídeo pCS2+ possui um gene que lhe confere resistência à ampicilina (AmpR). Isto permitirá o crescimento de colónias puras das bactérias transformadas com o DNA plasmídico.

2.1.3. Extracção de DNA plasmídico

Os métodos de extracção e purificação do DNA plasmídico baseiam-se nas diferenças químicas e físicas (tamanho e conformação) do DNA plasmídico e do DNA genómico. De facto, devido aos plasmídeos serem moléculas circulares de DNA de cadeia dupla e apresentarem um menor tamanho em relação ao DNA genómico, o DNA plasmídico mantém-se na sua forma super-enrolada, reduzindo assim a desnaturação e facilitando a renaturação da molécula, caso desnature. Assim, os plasmídeos podem ser isolados e extraídos por uma diversidade de métodos, os quais consistem no diferencial de desnaturação e renaturação do DNA plasmídico em relação ao cromossómico.

Um método de extracção e purificação de DNA plasmídico mais usado é o da lise alcalina, proposto originalmente por Birnboim and Doly (1979). Um método alternativo é o da ebulição desenvolvido por Holmes and Quigley (1981).

Após a transformação das células competentes procedeu-se assim à preparação e extracção do DNA plasmídico em grande escala utilizando para isso o Genopure Plasmid Midi Kit da Roche (Applied Science). Este protocolo é baseado no procedimento da lise alcalina.

Assim, colocou-se primeiramente a cultura de células transformadas num "Falcon" de 50 mL e centrifugou-se a 5000 x g durante 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento obtido foi ressuscitado em 4 mL no tampão de Suspensão do "kit" com RNase. Em seguida procedeu-se a uma nova centrifugação a 15000 x g durante 25 minutos a 4°C. De seguida, foi adicionada à mistura 4 mL do tampão de Lise a qual foi incubada durante 3 minutos (15-25°C). Adicionou-se 4 mL de tampão de Neutralização e após inversão suave dos tubos as suspensões foram incubadas em gelo durante 5 minutos. Os lisados foram então centrifugados a 15000 x g durante 45 minutos a 4°C, após os quais se recolheram os sobrenadantes para tubos colectores do "kit". Lavaram-se os lisados duas vezes com 5 mL de tampão de Lavagem e uma com 5 mL de tampão de Eluição. Foi então adicionado aos sobrenadantes 3,6 mL de Isopropanol onde foram centrifugados a 15000 x g durante 60 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e mantiveram-se os sedimentos de DNA, aos quais foram lavados com 3 mL de Etanol 70%. Foi então feita uma última centrifugação a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C onde foram descartados os sobrenadantes. Por fim, deixou-se secar o DNA à temperatura ambiente. Depois de

secos os sedimentos de DNA foram ressuspensos em 50 μ L de tampão TE [500 μ L Tris 1M; 100 μ L EDTA 0,5M em 50 mL de volume final, perfazer com H₂O milli Q].

2.1.4. Síntese das sondas sense e antisense a partir do plasmídeo pCS2+-*tbccd1*

2.1.4.1. Electroforese de DNA/RNA

O plasmídeo recombinante pCS2+-*tbccd1*, as amostras de RNA extraídas dos embriões de peixe zebra e os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose.

A técnica de electroforese consiste na separação de moléculas através da sua migração numa matriz sólida, um gel, durante a aplicação de uma diferença de potencial eléctrico.

A electroforese de DNA e de RNA foram realizadas em géis de agarose de 1,5% (m/v) em tampão TAE 1x (Tris 40 mM, EDTA 1mM, pH=8,3). O plasmídeo recombinante e as amostras de RNA extraídas e produtos de PCR directamente amplificados de amostras de RNA foram analisadas durante 20 minutos, sendo que os produtos de PCR de cDNA durante 40 minutos. A electroforese decorreu em tampão TAE 1x e com voltagem constante 100 (V).

As amostras de DNA/RNA aplicadas no gel foram misturadas com 1/10 do volume da solução de amostra ("loading buffer") [0,2g Orange G; 0,37g Na₂EDTA; 60 mL de 100% glicerol com um volume final de 100 mL, perfazer com H₂O milli Q].

2.1.4.2. Extracção de bandas correspondentes a fragmentos de DNA a partir do gel de agarose

Depois de serem analisadas num gel de agarose, a banda correspondente ao plasmídeo recombinante pCS2+-*tbccd1* linearizado e a banda correspondente a uma amostra de cDNA de um embrião de 48 hpf, foram posteriormente extraídas do gel para se proceder à reacção de transcrição do plasmídeo e à sequenciação da amostra de cDNA, respectivamente.

As bandas foram extraídas do gel de agarose e purificadas com o “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system da Promega. Para isso, extraíram-se as bandas de interesse do gel depois da electroforese, as quais foram colocadas num eppendorf de 1,5 mL. As bandas de gel foram primeiro dissolvidas numa solução “Membrane Binding” do “kit” (10 µL/10 mg gel) e incubadas durante 10 minutos a 65°C. Em seguida, colocou-se a mistura dissolvida na mini-coluna que por sua vez está inserida num tubo colector que vem com o “kit”. Incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se a solução do tubo colector e procedeu-se às lavagens da mini-coluna com a solução “Membrane Wash” rica em etanol. Por fim, ressuspendeu-se o DNA da mini-coluna em 30 µL de água livre de nucleases (“Nuclease – Free Water”).

2.1.4.3. Linearização de plasmídeos com enzimas de restrição

A linearização do plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* foi efectuada por hidrólise/digestão enzimática com endonucleases de restrição, seguindo-se a inactivação das enzimas de acordo com as recomendações do fabricante.

As endonucleases de restrição são enzimas que podem ser purificadas a partir de bactérias e que reconhecem e clivam em sequências específicas da cadeia dupla de DNA. Estas sequências designam-se por local de restrição. As enzimas podem ser classificadas em 3 grupos: I, II e III, de acordo com as suas sequências específicas de reconhecimento e pelo seu padrão de metilação. As endonucleases do tipo II são as enzimas mais usadas, pois o seu padrão de clivagem é conhecido e por isso mais controlado. Estas enzimas geralmente reconhecem e cortam em regiões específicas de 4,5 ou 6 nucleótidos com simetria dupla (sequências palindrómicas) e podem originar dois tipos de extremidades na cadeia de DNA hidrolisada: extremidades coesivas ou de pontas cegas.

Para a síntese das sondas sense e antisense a utilizar na técnica de hibridação *in situ* o plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* foi assim hidrolisado com as enzimas de restrição XbaI ou BamHI (Fermentas) (BioLabs), consoante se trate da sonda sense e antisense, respectivamente. Estas enzimas foram usadas nas condições óptimas especificadas pelos fabricantes (5 µg de DNA molde; 5 µL de 10x tampão NE; 5 µL BSA 10x (100 µg/mL) específico para cada enzima; 1 µL de enzima de restrição

em 50 µL de volume final, perfazer com H₂O milli Q; tempo de digestão entre 1:30 – 3:00 h).

Após as reacções de hidrólise, os DNAs plasmídicos foram analisadas num gel de agarose 1% e as bandas correspondentes ao plasmídeo hidrolisado com as respectivas enzimas foram cortadas do gel. Procedeu-se assim à extracção do DNA das bandas de agarose e à purificação das mesmas com o “kit” da Wizard[®]SV Gel and PCR clean up System da Promega como referido na secção 2.1.4.2.

2.1.4.4. Transcrição *in vitro*

A reacção de transcrição, para obtenção de sondas de RNA, consiste na síntese de moléculas de RNA complementares às cadeias de DNA plasmídico recombinante linearizado por enzimas de restrição, e que contêm uma região promotora para RNA polimerase que inicia a reacção de transcrição na presença de nucleótidos trifosfatados (dNTPs), sendo alguns deles conjugados com marcadores químicos que podem ser detectados com anticorpos. Neste protocolo utilizou-se o nucleótido trifosfato de uridina das sondas de mRNA conjugado com digoxigenina. O mRNA dos diferentes tecidos será assim visualizado através do uso de anticorpos anti-Digoxigenina (Roche) conjugados com fosfatase alcalina.

Para a produção da sonda “sense” o plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* foi hidrolisado com XbaI e transcrito com a enzima RNA polimerase SP6, sendo a orientação da sonda “sense”. Para a produção da sonda “antisense” o plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* foi hidrolisado com BamHI e transcrito com a enzima RNA polimerase T7, sendo neste caso o sentido de orientação da sonda “antisense”. Esta reacção decorreu durante 3 horas a 37°C tendo-se procedido posteriormente à precipitação do RNA das sondas. A mistura de reacção de transcrição *in vitro* está ilustrada na tabela II.2. Ainda antes da precipitação foi adicionada à mistura de reacção: 20,5 µL de água tratada com 0,01% DEPC (pirocarbonato de dietilo), 2 µL de EDTA 0,5M pH=8, 2,5 µL de LiCl 8M e por último 150 µL de etanol absoluto. O RNA ficou a precipitar durante a noite a -20°C e em seguida centrifugado a 21691 x g durante 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 150 µL etanol 70%. No final removeu-se o etanol por centrifugação a 21691 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o sedimento em 80 µL de EDTA 10mM.

Tabela II.2| Mistura de reacção de transcrição *in vitro*

Componentes	Volume
Tampão 10x (Sp6)/5x (T7)	2,5/5 µL
DTT 0,75M	2,5 µL
NTP 10x (conjugado com Digoxigenina) (Roche)	2,0 µL
BSA (facultativo, depende da enzima)	2,5 µL
DNA	1 µg
Inibidor de RNase (Promega)	1 µL
Polimerase de RNA Sp6(Roche) ou T7(Promega)	1 µL
H ₂ O milli Q autoclavada	Perfazer até 25µL

2.1.4.5. Hidrólise não enzimática de sondas de RNA

Se as sondas para hibridação *in situ* forem acima de 500 pares de bases, então deve-se proceder à sua hidrólise, reduzindo para 200-300 pares de base. O sinal de revelação da sonda hidrolisada será maior devido a uma melhor penetração da sonda no embrião. Como a sonda usada para hibridação *in situ* é de 666 pares de bases procedeu-se assim à sua redução através da técnica de hidrólise não-enzimática. Para a hidrólise das sondas, ressuspendeu-se o sedimento de RNA em 40 µL de H₂O ultra pura e foi adicionado ao RNA 5 µL de carbonato de sódio 0,6M e 5 µL de bicarbonato de sódio 0,4M, sendo de seguida aquecido durante 15 minutos a 60°C. No final adicionou-se 200 µL de água 0,01% DEPC, 25 µL de acetato de sódio 3M e 600 µL de etanol 100% a -20°C. Deixou-se precipitar durante a noite a -20°C e centrifugou-se em seguida a 17829 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e lavou-se o sedimento com 1 mL de etanol 70% a -20°C. Por último, centrifugou-se a 17829 x g durante 15 minutos a 4°C e deixou-se secar o sedimento ressuspendendo-se no final em 20 µL de água 0,01% DEPC.

2.1.5. Técnica de Hibridação *in situ*

A análise da expressão do gene *tbccd1* em embriões inteiros de peixe zebra foi feita usando a técnica de hibridação *in situ* “Whole Mount”.

A técnica de hibridação *in situ* consiste na detecção de segmentos de DNA/RNA utilizando sondas específicas. Estas sondas são sequências de nucleótidos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos de DNA/RNA que se deseja identificar. As sondas utilizadas neste trabalho foram de mRNA, sonda “antisense *tbccd1*” e sonda “sense *tbccd1*” usada como controlo negativo. O protocolo de hibridação *in situ* que se segue foi realizado tendo por base o descrito por Thisse e Thisse (1998).

Para realizar a hibridação *in situ* os embriões de peixe zebra foram fixados com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PBS) durante a noite a 4°C. Após a fixação os embriões foram lavados três vezes em PBT (PBS1x*, 0,1%Tween 20) e desidratados progressivamente em soluções de maior concentração de metanol (MeOH) em PBS (MeOH 25%, MeOH 50%, MeOH 75%) até atingir os 100% MeOH, solução onde os embriões são armazenados a -20°C até posterior utilização. Entre cada solução, os embriões são incubados 5 minutos à temperatura ambiente.

*Uma solução “stock” de PBS 10x (1L) consiste em: NaCl 80g, KCl 2g, Na₂HPO₄, 26,8g, KH₂PO₄ 2,4g, Perfazer com água destilada (Ajustado a pH=7,4 com HCl).

Para se iniciar a hibridação *in situ* os embriões previamente armazenados em 100% MeOH a -20°C foram primeiramente re-hidratados.

Assim, estes foram re-hidratados com soluções progressivas de menor concentração de metanol em PBS [MeOH 75%/ PBS 25%; MeOH 50%/ PBS 50%; MeOH 25%/ PBS 75%], onde foram incubados em cada uma delas durante 5 minutos à temperatura ambiente.

De seguida os embriões foram lavados 4 vezes com 100% PBT durante 5 minutos. Após estas lavagens procedeu-se à remoção do córion, com a ajuda de duas pinças, e posteriormente à digestão e permeabilização dos tecidos dos embriões com Proteínase K (10 µg/mL) em PBT. O tempo de digestão variou consoante o estágio de desenvolvimento do embrião, sendo que estádios anteriores à formação de sómitos não foram submetidos a este passo (ver Tabela II.3).

Tabela II.3| Digestão com Proteínase K (10 µg/mL) em PBT

Estádio	Tempo de digestão da Proteínase K
9- 12 sómitos	3 minutos
19-20 sómitos	5 minutos
24 horas	15 minutos
36-48 horas	25 minutos

Após o processo de digestão os embriões foram novamente fixados em PFA 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se novamente com lavagens em PBT, 5 vezes durante 5 minutos à temperatura ambiente. Depois das lavagens em PBT, os embriões foram lavados com a solução de Hibridação (“HybMix”, HM) [Formamida, SSC 20x*, 0,1%Tween 20, Ácido Cítrico 1M pH=6, Heparina 50 µg/mL, em água autoclavada milli Q] e posteriormente incubados nesta solução durante 1 hora a 70°C.

*Uma solução “stock” de SSC 20x (500 mL) consiste em: NaCl 3M (87,65g), Na₃C₆H₅O₇ (44,1g) 300mM (ajustado a pH=7 com HCl).

Removeu-se a solução de Pré-hibridação e em seguida adicionou-se a sonda “sense *tbccd1*” ou “antisense *tbccd1*” que foram diluídas 1:100 em solução de Hibridação com tRNA. A hibridação decorreu durante a noite a 70°C.

No segundo dia, removeu-se a solução de hibridação e procedeu-se às lavagens com soluções aquecidas a 70°C [100% HM a 70°C (lavagem rápida); 75%HM/ 25% SSC 2x; 50%HM/ 50% SSC 2x; 25%HM/ 75% SSC 2x; SSC 2x] durante 15 minutos, depois de recuperar as sondas, dado que estas podem ser reutilizadas.

Seguiram-se então as lavagens à temperatura ambiente. Os embriões foram primeiramente lavados 2 vezes com SSC 0,2x durante 30 minutos.

Depois, foram colocados sucessivamente nas soluções à temperatura ambiente [75% SSC 0,2x/ 25% PBT; 50% SSC 0,2x/ 50% PBT; 25% SSC 0,2x/ 75% PBT; 100% PBT] durante 10 minutos.

Após estas lavagens seguiu-se com o bloqueio dos embriões numa solução de bloqueio composta por: 2% soro de cabra, 2 mg/mL BSA (Albumina de soro bovino), em PBT. Os embriões foram assim incubados nesta solução durante 1 hora à temperatura ambiente.

De seguida, os embriões foram incubados durante a noite a 4°C com o anticorpo anti-Digoxigenina 1:5000 em solução de bloqueio.

No dia seguinte, efectuaram-se duas lavagens rápidas em PBT, seguindo-se com mais 6 lavagens em PBT de 15 minutos à temperatura ambiente. Os embriões foram em seguida incubados 1 hora em solução de coloração (NTNT) [Tris HCl 100mM pH=9,5, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, 0,1% Tween 20 em água autoclavada milli Q].

Removeu-se de seguida a solução de coloração e adicionou-se a solução de revelação (solução de coloração suplementada com 50 mg/mL NBT [cloreto de azul de 4-nitro-tetrazólio] e 50 mg/mL BCIP [5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato] da Roche).

Os embriões foram então incubados à temperatura ambiente e no escuro até surgir o sinal de expressão (cor roxa). Para parar a revelação removeu-se esta solução e lavaram-se 3 vezes os embriões em PBT. No final procedeu-se à pós-fixação dos embriões com PFA 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente, sendo depois rapidamente lavados 1 só vez em PBT. Os embriões foram armazenados em 70% glicerol / 30% PBT a 4°C. Para serem fotografados os embriões foram transferidos para 100% glicerol.

2.2. Análise da expressão de genes por PCR qualitativo

2.2.1. Técnica de PCR Qualitativo

A técnica de PCR qualitativo (reação em cadeia da polimerase) consiste na replicação de um fragmento específico de DNA e foi proposto por Mullis, 1993. Qualitativo porque não nos dá uma informação quantitativa do fragmento de DNA amplificado. Esta técnica baseia-se no uso de elevadas temperaturas de forma a separar a dupla cadeia de DNA em duas cadeias simples, permitindo a ligação de oligonucleótidos iniciadores (“primers”) específicos também eles de cadeia simples.

Estes “primers” são complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA que se pretende amplificar. A DNA polimerase liga-se à extremidade livre 3' OH dos “primers”, sintetizando a cadeia complementar do fragmento de DNA no sentido 5'→3'. Cada uma das cadeias simples de DNA do fragmento serve assim como molde para a síntese das cadeias complementares.

Esta técnica divide-se em 3 fases com ciclos de repetição (em geral 25 a 30 ciclos): Desnaturação do DNA, Hibridação dos “primers” (“annealing”) e Extensão do DNA.

2.2.2. Extracção de RNA total de embriões de peixe zebra em diferentes estádios do desenvolvimento

Para se proceder à extracção de RNA, foram recolhidos embriões de peixe zebra de 2, 6, 13 e 24 hpf. Adicionalmente, foram também recolhidas porções correspondentes à cabeça e tronco/cauda de embriões de 48 hpf. Todos os embriões foram descorionados com o auxílio de pinças. Os embriões de 48 hpf foram anestesiados em tricaine (2 mL tricaine + 45 mL meio embrionário) e as suas cabeças e tronco/caudas foram cortadas com a ajuda da pinça e do bisturi e colocados em diferentes tubos eppendorf em gelo, retirando no final todo o tricaine dos eppendorfs. Procedeu-se em seguida à extracção de RNA dos embriões com o “kit” “RNeasy® Protect Mini Kit (Quiagen)”. Este procedimento permite uma estabilização imediata do RNA evitando a degradação de RNA das amostras dos tecidos animais e, conseqüentemente, a alteração da expressão génica. As amostras de tecidos são primeiro lisadas e homogeneizadas na presença de um tampão altamente desnaturante rico em tiocianato de guanidina (tampão RLT), que inactiva de imediato as RNases assegurando a posterior purificação do RNA (intacto). As amostras foram homogeneizadas com a adição de 600 µL/tubo do tampão RLT, e com o auxílio de uma seringa de 0,9 mm fazendo um movimento de “up” e “down”.

Após a extracção as amostras de RNA foram tratadas com DNase. Para isso adicionou-se 8 µL de RNA, 1 µL de DNase RNase-free (1,000U) e DNase 10x tampão de reacção da Promega, e incubou-se a mistura durante 40 minutos a 37°C. A reacção foi parada com a adição de 1 µL da solução de DNase “STOP” da Promega [20mM EGTA (pH 8.0), ácido etileno glico tetracético], sendo esta incubada durante 10 minutos a 65°C.

2.2.3. Síntese de cDNA das amostras de RNA dos embriões de peixe zebra

Para a síntese de cDNA as amostras de RNA foram primeiramente quantificadas no Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer, “software” ND-1000 V3.1.2, Nanodrop Technologies). Este espectrofotómetro (302 nm) permite efectuar medições em apenas 1 µL de amostra de RNA/DNA.

A síntese de cDNA foi realizada através da ferramenta “Synthesis Kit” (K1631) da Fermentas. Na mistura de reacção usou-se sempre 1000 ng de RNA molde. Foi sintetizado cDNA a partir de RNA (“sense”) utilizando os “primers” “random hexamer” da Fermentas. Na possibilidade de existir um transcrito de mRNA “antisense”, tentou-se sintetizar um cDNA a partir de um mRNA “antisense” do gene *tbccd1*, para posterior análise da expressão deste mesmo. Para verificar se as amostras de RNA usadas na síntese de cDNA “antisense” não foram degradadas durante o tratamento com DNase sintetizou-se um cDNA (“sense”) específico que serviu como controlo positivo. Para isso usou-se como molde um mRNA “antisense” de um embrião de 24 hpf usando um “primer” capaz de sintetizar uma cadeia de cDNA complementar ao mRNA molde usado (cDNA “sense”). Como controlo negativo destes PCRs fez-se um PCR directo com as amostras de RNA (extraído de todos os estádios anteriormente referidos) que foram sujeitas a reacções de síntese de cDNA (segundo o “Synthesis Kit”) com os “primers” “random hexamer”, mas sem adicionar à mistura de reacção a enzima transcriptase reversa (RT), não havendo assim síntese de cDNA. Neste caso só se poderia obter um produto de PCR caso houvesse DNA genómico nas amostras de cDNA. Os “primers” específicos de cada reacção (para os diferentes cDNAs) encontram-se descritos na tabela II.4.

Tabela II.4| Sequência dos “primers” usados na síntese de cDNA

“Primer”	Sequência
zfTBCCD1cDNAanti-sense (síntese de cDNA “antisense”)	5'-GGCCATACATATGCTGTG-3'
TBCCD1zfcDNAR2 (síntese de cDNA “sense” – controlo positivo)	5'-TCGCAGTTATCTCCATCC-3'

2.2.4. Análise da expressão “sense” e “antisense” do gene *tbccd1* em embriões de peixe zebra em diferentes estádios do desenvolvimento por RT-PCR Qualitativo

A análise da expressão do gene *tbccd1* nas amostras de cDNA dos embriões de peixe zebra foi feita por um processo RT-PCR qualitativo adaptado de Sambrook & Russel (2001). As amostras de RNAs foram submetidos a um PCR que permitiu amplificar fragmentos do gene *tbccd1*. As sequências dos “primers” usados nesta análise encontram-se listadas na tabela II.5. As reacções de PCR foram realizadas para um volume de 25 µL de uma reacção que continha: 1 µL de 25mM MgCl₂, 1 µL de 10mM dNTPs, 0,5 µL de Taq DNA polimerase (BioLabs) e 2,5 µL de 10x ThermoPol tampão de reacção (BioLabs). As condições de reacção, nomeadamente as quantidades e concentrações de cada um dos componentes da mistura de reacção, dependem do fabricante da Taq DNA Polimerase e do respectivo tampão (consultar “Protocol for Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (M0267) – New England BioLabs”). As condições das reacções de PCR efectuadas para a obtenção do produto de PCR desejado foram: 5 minutos 95°C seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a uma temperatura de hibridação de 58.4°C, 30 segundos a 72°C e para finalizar a reacção 10 minutos a 72°C. Os PCRs foram realizados num termo cicladador (BioRad- DNA Engine®).

Os produtos amplificados foram posteriormente separados em géis de agarose 1,5% (m/v) e as imagens foram adquiridas e digitalizadas pelo “Alpha Innotech” (Alphamager HP).

Tabela II.5| "Primers" usados na análise do gene *tbccd1* por PCR

"Primers"	Sequência	Tamanho do produto esperado (pb)
TBCCD1zfcDNAF2 (Forward)	5'-CAGAGCTGTGAGAATGTCC-3'	332
TBCCD1zfcDNAR2 (Reverse)	5'-TCGCAGTTATCTCCATCC-3'	332
rRNA (ribossomal 28s) (forward)	5'-GCATGAATGGATGAACGAG-3'	600
rRNA (ribossomal 28s) (reverse)	5'-CGTTCAGTCATAATCCCACAG-3'	600
EF1 α ("Elongation Factor") (Forward)	5'-ACGCCCTCCTGGCTTTCACCC-3'	200
EF1 α ("Elongation Factor") (Reverse)	5'-TGGGACGAAGGCAACACTGGC-3'	200

III. RESULTADOS

1. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para o estudo da expressão e caracterização do gene *tbccd1* de peixe zebra

Um fragmento correspondente aos primeiros 666 pares de bases da sequência codificante do gene *tbccd1* foi clonado no plasmídeo pCS2+ com as enzimas BamHI e StuI (João Gonçalves, comunicação pessoal). Foi seleccionado este fragmento dado que se localiza na região N-terminal da proteína TBCCD1, fora do domínio “CARP” e da região “TBCC” partilhados entre a proteína TBCC e RP2 (“retinitis pigmentosa protein 2”). Deste modo, tentou-se que a sonda fosse o mais específica possível para o TBCCD1 (Fig.IV.1 A-C).

O plasmídeo recombinante pCS2+*-tbccd1* foi sequenciado para confirmar a orientação da inserção do fragmento de 666 pares de bases no plasmídeo e assegurar que este não apresentava erros. Depois de confirmar a inserção e ausência de erros do fragmento do *tbccd1* no plasmídeo recombinante, prosseguiu-se com a amplificação do plasmídeo recombinante e com a síntese das sondas de RNA “antisense” e “sense” (ver secção 2.1.2 - 2.1.4.5 dos Materiais e Métodos). Para a síntese da sonda “antisense” o plasmídeo pCS2+*-tbccd1* foi hidrolisado com BamHI e transcrito com a RNA polimerase T7. Para a síntese da sonda “sense” o plasmídeo pCS2+*-tbccd1* foi hidrolisado com XbaI e transcrito com a RNA polimerase SP6 (Fig.IV.1 B e C).

A sonda “antisense *tbccd1*” deverá hibridar com o mRNA (sense) do gene *tbccd1* do embrião, uma vez que é complementar, e revelar as células/tecidos que apresentam expressão deste gene nos embriões. A sonda “sense *tbccd1*” servirá como controlo negativo, uma vez que esta contém a mesma sequência de nucleótidos que o mRNA (“sense”) do embrião, logo não deverá hibridar por esta razão não deverá revelar qualquer sinal de expressão.

Para determinar quando e onde o gene *tbccd1* é expresso durante a embriogénese do peixe zebra, procedeu-se à técnica de hibridação *in situ* conforme descrito em Thisse & Thisse (1998). Foram então produzidas sondas “sense” e “antisense” e foram posteriormente hibridadas em embriões de peixe zebra de diferentes estádios de desenvolvimento.

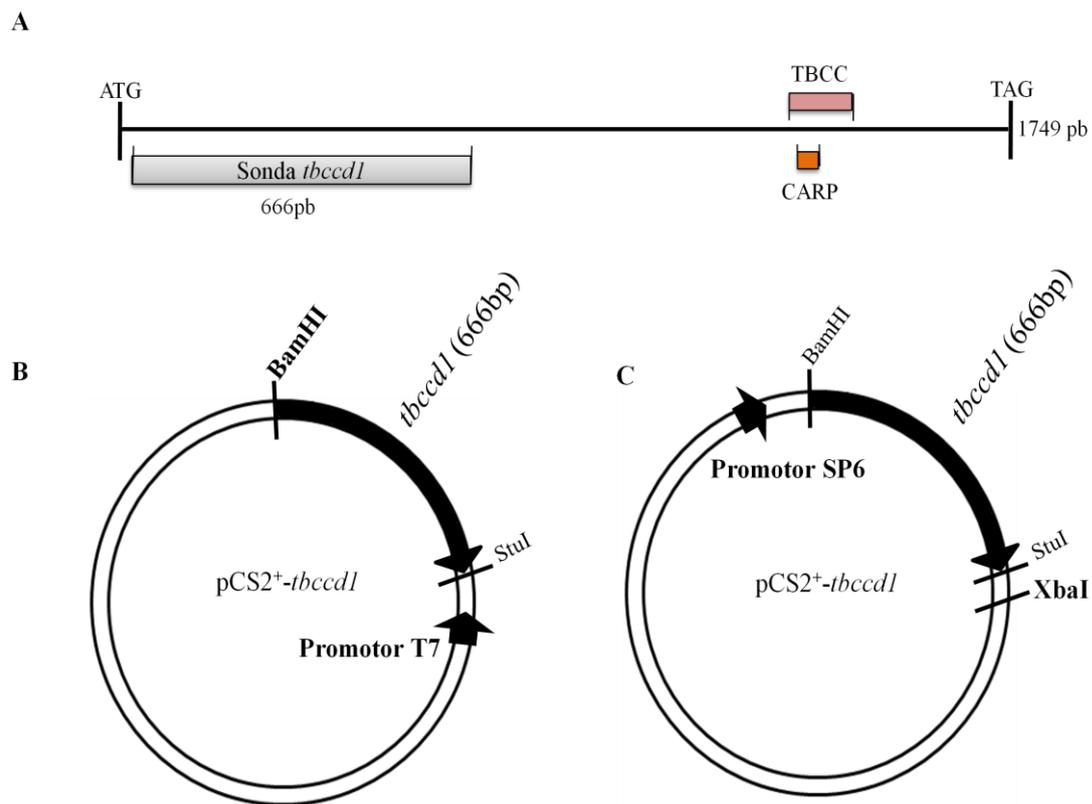


Fig.IV.1| Clonagem de um fragmento do gene *tbccd1* de *Danio rerio* no plasmídeo pCS2+ (pCS2+-*tbccd1*) (A) Representação esquemática da região codificante do gene *tbccd1* e de um fragmento do gene clonado no plasmídeo pCS2+. A cor-de-rosa e a laranja estão representados as regiões codificantes para os domínios TBCC (116 pb) e CARP (38 pb), respectivamente. (B, C) Esquema do plasmídeo recombinante pCS2+-*tbccd1* com as enzimas BamHI e StuI. (B) Esquema de produção de uma sonda antisense de RNA do *tbccd1*. (C) Esquema de produção de uma sonda sense de RNA do *tbccd1*.

2. Estudo da expressão do gene *tbccd1* em embriões de peixe zebra por hibridação *in situ*

Embriões de peixe zebra em estádios de desenvolvimento de 2, 6, 13, 24 e 48 hpf foram processados por hibridação *in situ* usando as sondas específicas para a cadeia “sense” e “antisense” do mRNA do gene *tbccd1*.

Neste estudo observou-se que a sonda “antisense *tbccd1*” revela que o gene *tbccd1* é expresso de forma ubíqua por todo o embrião ao longo dos estádios de desenvolvimento estudados, principalmente nas fases iniciais (Fig.IV.2 **A, B, D e E**). Apesar da expressão ubíqua deste gene, é de notar uma maior expressão na cabeça, olhos e barbatanas peitorais (Fig.IV.2 **K e L**) e talvez na barreira entre os sómitos e pronefros do embrião (Fig.IV.2 **G e K**).

Curiosamente, e inesperadamente, obteve-se um padrão de expressão idêntico em territórios muito semelhantes ao da sonda “antisense” nos embriões hibridados com a sonda controlo “sense *tbccd1*” (Fig.IV.2 **D-F, I, J, M e N**). Porém, esta expressão foi consistente ao longo das repetições das hibridações *in situ*, sugerindo a possibilidade da existência de um transcrito de mRNA “antisense” do gene *tbccd1*.

Para analisar de um modo mais preciso as estruturas/órgãos onde o gene *tbccd1* é expresso é necessária a realização de cortes histológicos de alguns embriões hibridados. Alguns exemplares de embriões de 24 e 48 hpf, usados na hibridação *in situ*, foram assim utilizados para fazer cortes transversais histológicos (intervalos de 12 µm entre cada corte) (Fig.IV.3 e 4). Os cortes dos embriões hibridados foram embebidos no meio de montagem Mowiol [2,4 g de mowiol; 6 g de 100% glicerol; 6 mL de H₂O destilada e 12 mL de 0,2M tris pH=8,5] num banho a 55 °C e em seguidos analisados num microscópio de luz transmitida (“widefield”) Leica DMR e fotografados de seguida.

Mais uma vez, através da análise dos cortes histológicos verificou-se que o gene *tbccd1* expressa-se ubiquamente, apesar de algumas estruturas estarem mais marcadas que outras, nomeadamente a notocorda, vesícula ótica, pronefros, tubo neural entre outras (Fig.IV.3 e 4). Da análise do corte confirma-se que a sonda “sense *tbccd1*” apresenta um padrão de hibridação semelhante há aquele que é apresentado pela sonda “antisense *tbccd1*”.

O facto das sondas *tbccd1* “sense” e “antisense” apresentarem um padrão de expressão ubíquo e semelhante levanta três hipóteses: i) as sondas não dão um sinal específico pois o RNA do gene *tbccd1* não é expresso em embriões dos estádios

estudados; ii) as sondas não dão um sinal específico devido ao RNA do gene *tbccd1* ser expresso em baixos níveis; iii) o RNA “antisense” do gene *tbccd1* é excepcionalmente expresso.

Para testar estas hipóteses decidiu-se analisar a expressão do gene *tbccd1* utilizando a técnica de RT-PCR qualitativo, que nos permite verificar a expressão do gene na sua forma “sense” e “antisense” em embriões de peixe zebra de diferentes estádios de desenvolvimento (ver secção 2.2.4. de Materiais e métodos).

Sonda Antisense *tbccd1*

Sonda Sense *tbccd1*

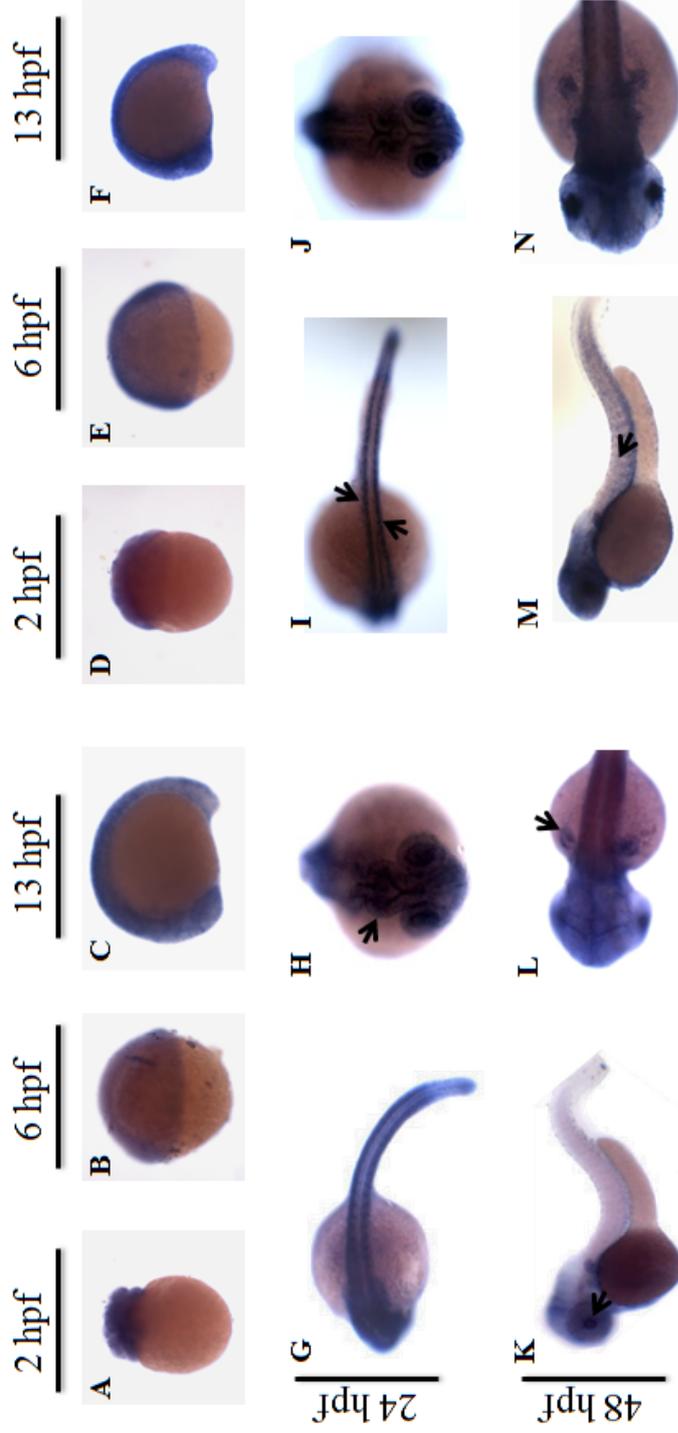


Fig.IV.2] Padrão de expressão do gene *tbccd1* durante o desenvolvimento embrionário do peixe zebra. Embriões de 2hpf (64 células), 6hpf ("Shield"), 13hpf (8 sómitos), 24hpf e 48hpf foram incubados com as sondas "sense *tbccd1*" e "antisense *tbccd1*". (A-C, G, H, K, L) Hidridação *in situ* com a sonda "antisense *tbccd1*". (D-F, I, J, M, N) Hidridação *in situ* com a sonda "sense *tbccd1*". (A-F, K e M) Vista lateral. (G, I, L, N) Vista dorsal. (H, J) Vista dorsal anterior. As setas pretas indicam as estruturas/órgãos de maior expressão.

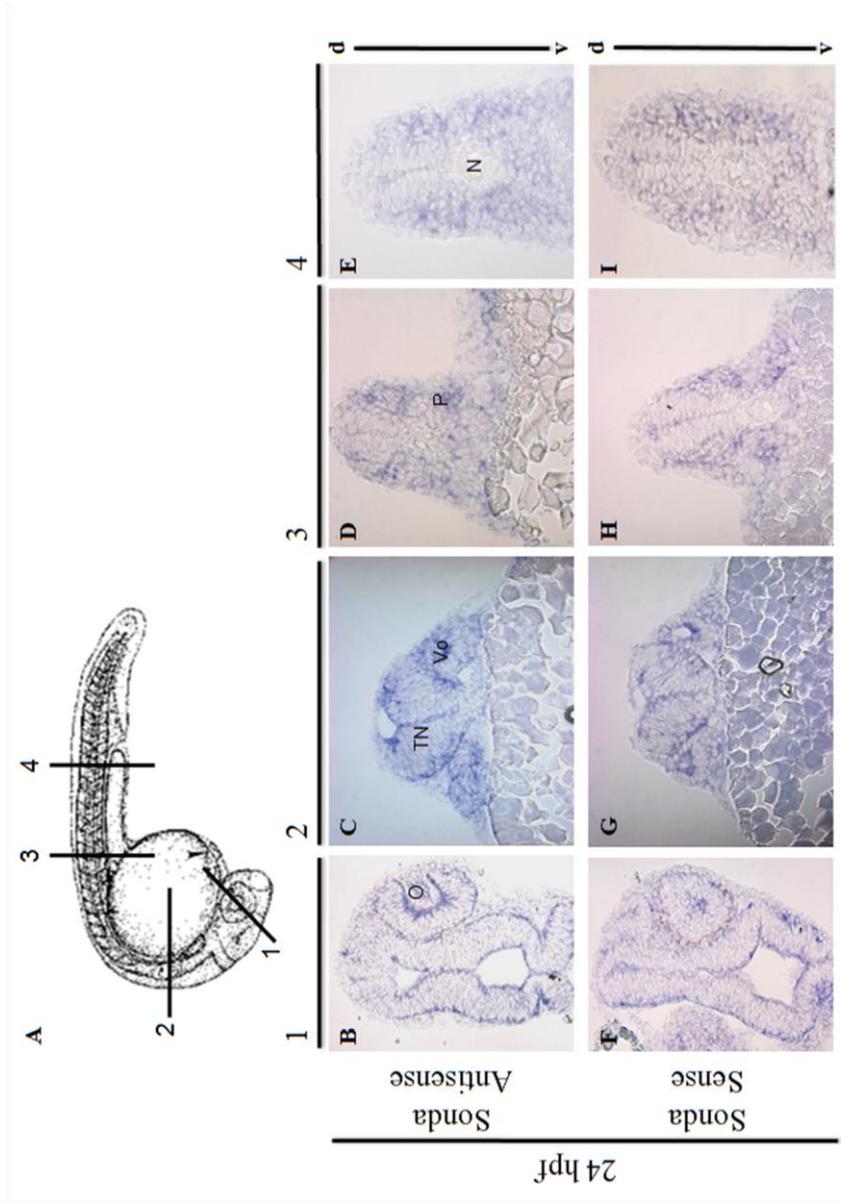


Fig.IV.3| Padrão de expressão do gene *tbccd1* em cortes histológicos de embriões de peixe zebra no estágio de 24 hpf. (A) Representação gráfica de um embrião de peixe zebra no estágio de 24 hpf no qual se identifica o nível dos cortes efetuados.(B-E) Hidridação *in situ* com a sonda "antisense *tbccd1*". (F-I) Hidridação *in situ* com a sonda "sense *tbccd1*". O – Olho, TN –Tubo neural, Vo – Vesícula ótica, P – Pronefros, N – Notocorda. d – Dorsal. v – Ventral.

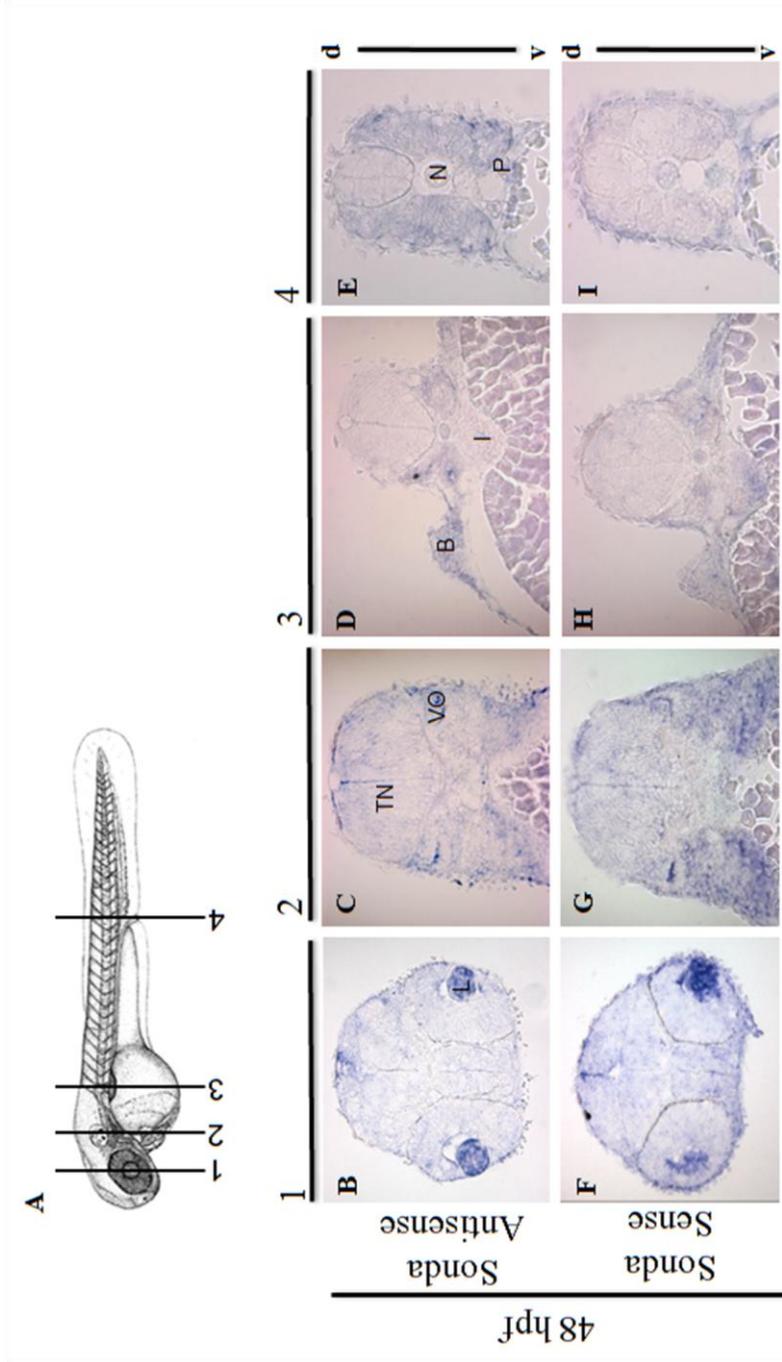


Fig 4| Padrão de expressão do gene *tbccd1* em cortes histológicos de embriões de peixe zebra no estágio de 48 hpf . (A) Representação gráfica de um embrião de peixe zebra no estágio de 48 hpf no qual se identifica o nível dos cortes efectuados. (B-E) Hidridação in situ com a sonda antisense *tbccd1*. (F-I) Hidridação in situ com a sonda sense *tbccd1*. L – lente do olho, TN –Tubo neural, Vo – Vesícula ótica, B – Barbatana peitoral, I – Intestino, P – Pronefros, N – Notocorda. d – Dorsal. v – Ventral.

3. Análise da expressão sense e antisense do gene *tbccd1* por RT-PCR qualitativo

A expressão do gene *tbccd1* foi avaliada através da técnica de RT-PCR qualitativo em vários estádios de desenvolvimento embrionário de peixe zebra. O objectivo desta análise foi avaliar se o gene *tbccd1* é realmente expresso e em que estádios de desenvolvimento do peixe zebra, e correlacionar com os dados obtidos na técnica de hibridação *in situ*. O facto da sonda “sense *tbccd1*” (hibrida com o mRNA “antisense”) ter revelado sinais semelhantes aos mostrados pela sonda “antisense *tbccd1*” levou-nos a colocar a hipótese de existir um transcrito de mRNA “antisense” do gene *tbccd1*. Assim, esta técnica permitiu também avaliar a existência de um transcrito de mRNA “antisense” do gene *tbccd1* e em que estádios este seria expresso. Com este objectivo procedeu-se ao desenho dos “primers” específicos para os transcritos “sense” e “antisense” do gene *tbccd1* a utilizar na técnica de PCR qualitativo (ver Tabela II.5 da secção 2.2.4 de Materiais e Métodos).

RNA total de embriões inteiros de diferentes estádios de desenvolvimento de peixe zebra, nomeadamente, 2, 6, 13, 24 hpf e porções da cabeça e tronco/ cauda de 48 hpf foi extraído com o kit “RNeasy® Protect Mini Kit” da Quiagen (Fig. IV.5 **A** e **C**). As amostras foram tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA genómico. Para confirmar o sucesso do tratamento com DNase as amostras de RNA, antes e depois do tratamento com DNase, foram analisadas por electroforese num gel de agarose 1,5% durante 20 minutos (ver imagem **B** e **D** da Fig.IV.5) tendo-se usado como marcador da massa molecular o “DNA ladder 1kb plus”.

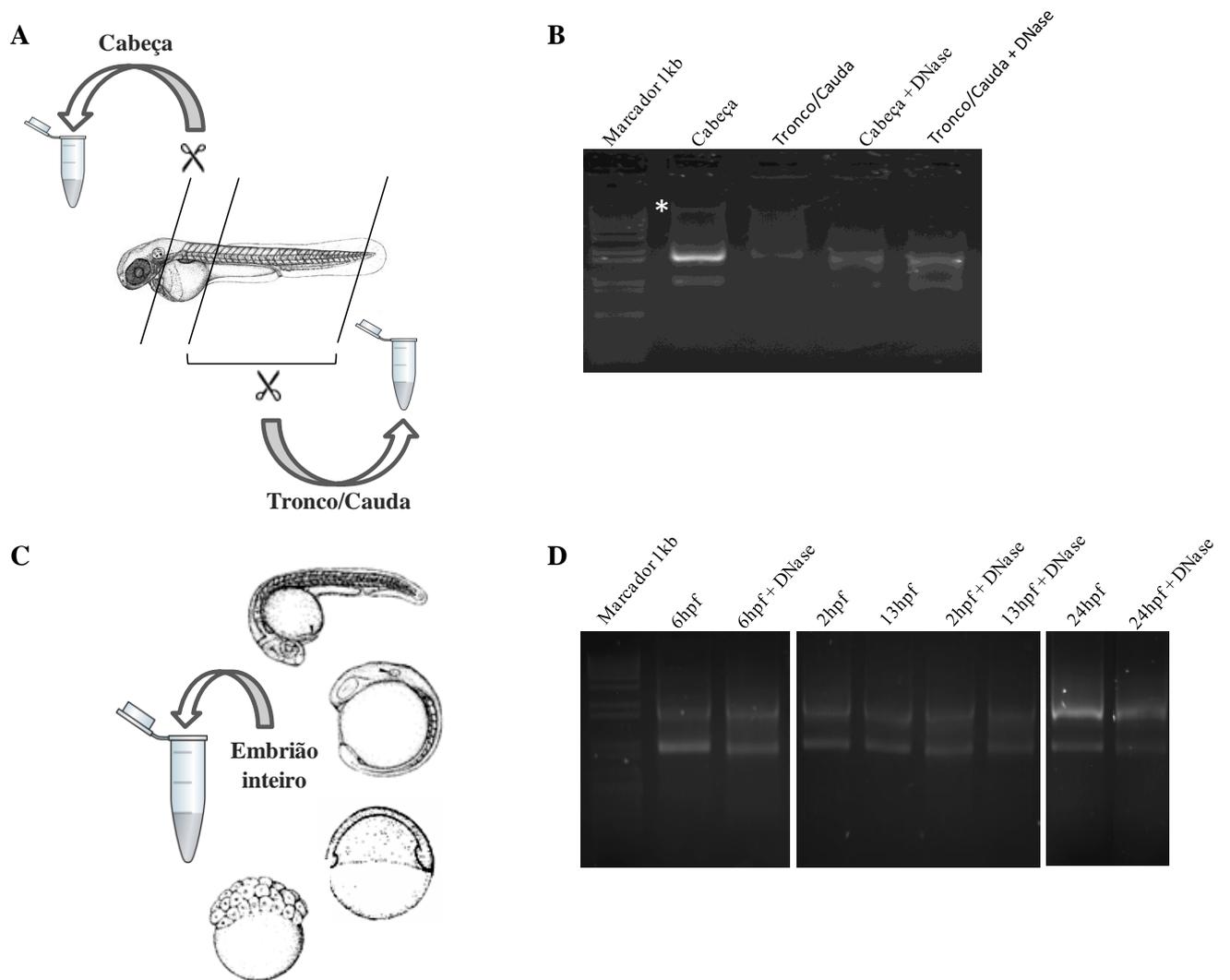


Fig.IV.5| Extracção de RNA de embriões de peixe zebra. (A) Representação gráfica do procedimento experimental de recolha de porções de um embrião de 48 hpf para extracção de RNA. (B) Amostras de RNA extraídas das porções indicadas e separadas electroforeticamente num gel de agarose antes e depois do tratamento com DNase. O asterisco aponta possivelmente uma banda de DNA genómico. (C) Representação gráfica do procedimento experimental de recolha de embriões de diferentes estádios. (D) Amostras de RNA extraídas de embriões nos estádios indicados e separadas electroforeticamente num gel de agarose antes e depois do tratamento com DNase.

A análise dos resultados revelou que as amostras de RNA não apresentavam degradação, pois obtivemos duas bandas: RNA ribossomal subunidade 28S e subunidade 18S. Além disso as amostras não parecem estar contaminadas com DNA genómico (alta massa molecular), uma vez que não se obteve nenhuma banda acima das duas de RNA ribossomal (ver Fig.IV.5 **B** e **D**). No entanto, para confirmar que as amostras de RNA extraídas não estão de facto contaminadas com DNA genómico, estas foram directamente submetidas a um PCR usando os “primers” “TBCCD1zfcDNAF2/R2” referidos na tabela II.5 de Materiais e Métodos. Depois de analisar os produtos de PCR resultantes deste PCR num gel de agarose 1,5% durante 20 minutos, verificou-se que amostras não apresentam contaminação com DNA genómico dado que não se verificou a amplificação de nenhuma banda (ver Fig.IV.6 **B**).

Para a análise da expressão “sense” e “antisense” do gene *tbccd1* nos diferentes estádios, procedeu-se à quantificação das amostras de RNA e à síntese de cDNA utilizando o “primer” “random hexamer” (Fermentas) e o “primer” “zfTBCCD1cDNAanti-sense” desenhado especificamente para produzir cDNA a partir da cadeia “antisense” do gene *tbccd1*, respectivamente (ver tabela II.4 de Materiais e Métodos).

Para a realização do PCR qualitativo foram desenhados “primers” capazes de hibridar com o cDNA produzido a partir do RNA “sense” e “antisense” do gene *tbccd1*, esperando-se um produto com 332 pares de bases (pb) para ambos os cDNAs (ver tabela II.5 de Material e Métodos e Fig.IV.6 **C** e **D** e Fig.IV.7 **B** e **C**).

Como controlos positivos (+) foram usados os primers “RNAr” (600pb) e “EF1 α ” (200pb) (“forward” e “reverse”) indicados na tabela II.5 de Materiais e Métodos. A escolha destes “primers” como controlos positivos deve-se ao facto destes genes serem expressos constitutivamente e serem seguramente expressos no embrião de peixe zebra nos estádios de desenvolvimento em análise. No RNA total dos eucariotas, os RNAs ribossomais e especialmente o rRNA 28S, presente na subunidade grande do ribossoma (60S) é uma das espécies mais abundantes. O gene “elongation factor 1 alfa” (EF1- α) codifica uma proteína que desempenha um papel fundamental ao nível da biossíntese proteica, promovendo a ligação dependente de GTP, dos aminoacil-tRNAs, aos ribossomas de eucariotas. Sendo assim, o rRNA 28S e o EF1- α , deverão originar produtos de PCR que deverão ser detectados como bandas precisas na análise electroforética dos produtos de PCR do cDNA de peixe zebra, servindo assim como bons controlos positivos.

Como controlos negativos (-) realizaram-se reacções de PCR sem amostra de cDNA, apenas com água milli Q. No caso dos PCRs para análise de cDNA antisense, para além do uso de água milli Q como controlo negativo, usou-se também as amostras de RNA sense/antisense sujeitas às reacções de síntese de cDNA mas sem a enzima transcriptase reverse (s/RT).

Para encontrar as condições de PCR de maior especificidade realizou-se primeiro uma optimização do processo. Para a optimização do PCR, foram realizadas várias experiências, de maneira a eliminar os produtos de PCR inespecíficos presentes no gel de agarose após a electroforese como um “smear”, e obter uma banda desejada de 332 pares de bases (ver tabela II.5 de Materiais e Métodos). Para isto, foi feito primeiro uma rampa de magnésio ($MgCl_2$), testando diferentes quantidades de magnésio, 1 mM – 6 mM. Depois de se definir 1 mM como sendo a quantidade óptima de Magnésio (1 μ L em 25 μ L de volume total de reacção), procedeu-se a uma rampa de temperaturas. O intervalo de temperaturas testado variou de 50 °C a 70 °C. Esta experiência teve como objectivo avaliar qual a temperatura óptima de hibridização (“annealing”) tendo especialmente em conta os “primers” usados da tabela III de Material e Métodos e as concentrações já previamente definidas de $MgCl_2$. A temperatura definida como óptima foi 58,4 °C. Os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose 1,5% durante 40 minutos.

Como esperado obtivemos um produto de PCR de cDNA sense de 332 pb em todos os estádios de desenvolvimento analisados, embora o estágio de 24 hpf apresente um produto de PCR mais fraco no gel de agarose, devido talvez a um problema técnico (ver Fig.IV.6 **C** e **D**). Os controlos positivos analisados apresentaram um produto de PCR de 600 pb no caso do “RNAr” e de 200 pb no caso de “EF1 α ” conforme esperado, sendo que nos negativos (sem amostra de cDNA) não se obtiveram produtos de PCR, comprovando a qualidade do cDNA sintetizado (Fig.IV.6 **C** e **D**).

Para confirmar inequivocamente que os produtos de PCR (sense) obtidos correspondiam de facto ao fragmento de 332 pb do gene *tbccd1*, procedeu-se à excisão da banda do gel correspondente aos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do cDNA sense de cadeia de um embrião de 48 hpf. Em seguida, o DNA da banda excisada foi extraído do gel de agarose e purificado e finalmente sequenciado. A sequência nucleotídica obtida foi alinhada com a do gene *tbccd1* de peixe zebra, presente na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e

tendo-se observado similaridade entre as duas sequências, confirmando que o mRNA “sense” do gene *tbccd1* é de facto expresso no estágio de desenvolvimento do embrião de peixe zebra analisado.

Na análise do cDNA “antisense” obteve-se um produto de PCR de 332 pb em quantidades vestigiais nos embriões de 2, 6, 24 hpf e na região da cabeça de embriões de 48 hpf. Nos controlos positivos obtiveram-se os produtos de PCR esperados (600 pb), com a excepção do controlo positivo de cDNA de cabeça (48 hpf “sense”) em que não se obteve produto de PCR, devido certamente a um erro de execução. Como esperado nos controlos negativos não se obtiveram produtos de PCR (ver Fig.IV.7 **B e C**).

Com base nos resultados obtidos, a hipótese da existência de um transcrito de mRNA “antisense” do gene *tbccd1* em embriões nos estádios de desenvolvimento estudados é ainda duvidosa, pois os produtos de PCR das amostras de cDNA “antisense” obtidos foram muito vestigiais, não explicando a intensidade do sinal da hibridação *in situ* e a expressão ubíqua do gene *tbccd1* observada nos embriões hibridados e submetidos a cortes histológicos com a sonda “sense”. A técnica de RT-PCR demonstrou assim que o gene *tbccd1* é efectivamente transcrito em todos os estádios de desenvolvimento analisados do embrião de peixe zebra, não confirmando no entanto a presença de um transcrito “antisense”. Deste modo não se pode confirmar a existência de dois transcritos de mRNA do gene *tbccd1* (“sense” e “antisense”) e a efectividade do método de hibridação *in situ*.

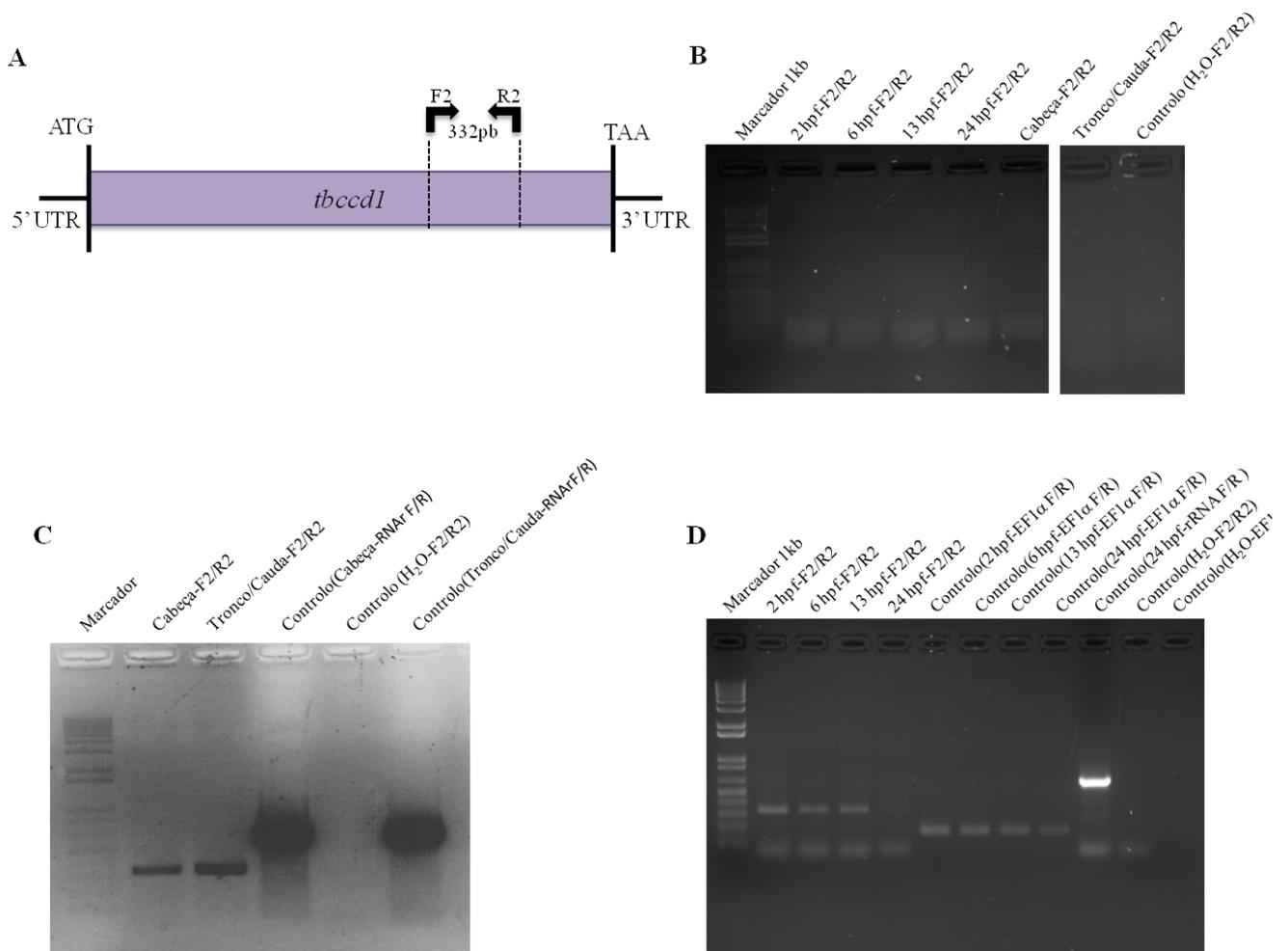


Fig.IV.6| Expressão do gene *tbccd1* (mRNA sense) por PCR qualitativo. (A) Representação esquemática da sequência codificante do mRNA sense do gene *tbccd1*. “Primers” F2 (forward) e R2 (reverse) usados na amplificação do gene *tbccd1* originam um fragmento de 332 pb. (B) PCR qualitativo efectuado com as amostras de RNA depois do tratamento com DNase nos estádios indicados usando os “primers” F2 e R2. (C) PCR qualitativo efectuado com amostras de cDNA obtidas a partir dos RNAs extraídos das porções indicadas de embriões de 48 hp usando os “primers” indicados. (D) PCR qualitativo efectuado com amostras de cDNA obtidas a partir dos RNAs extraídos de embriões em diferentes estádios usando os “primers” indicados.

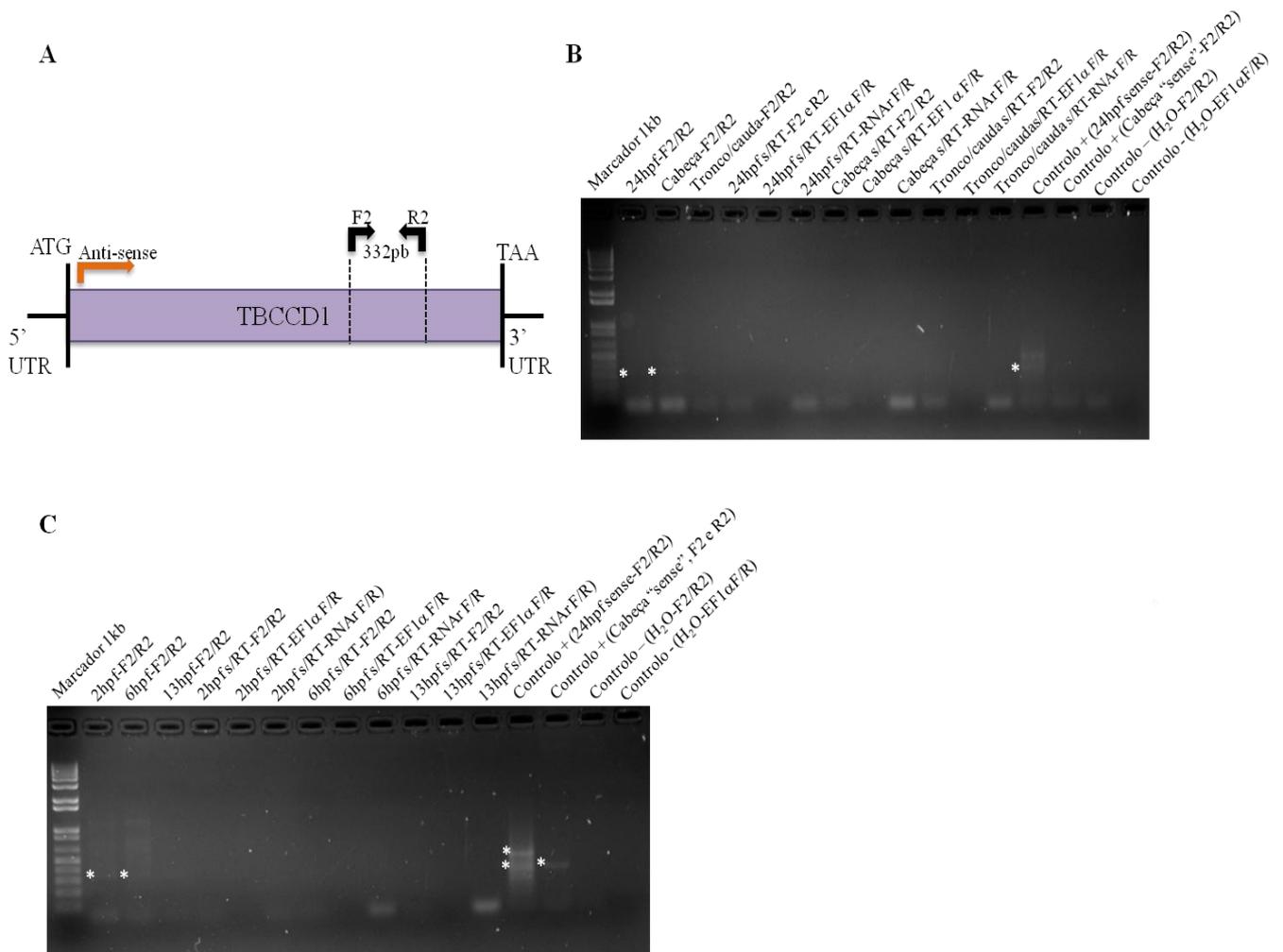


Fig.IV.7| Expressão do gene *tbccd1* (mRNA antisense) por PCR qualitativo. (A) Representação esquemática da sequência codificante do mRNA sense do gene *tbccd1*. A laranja está representado esquematicamente o “primer” específico na síntese de cDNA antisense do gene *tbccd1*. Primers F2 (forward) e R2 (reverse) usados na amplificação do gene *tbccd1* originam um fragmento de 332 pb. (B-C) PCR qualitativo efectuado com as amostras de cDNA obtidas a partir dos RNAs antisense depois do tratamento com DNase nos estádios indicados usando os “primers” indicados. As bandas representadas com asteriscos brancos estão visualmente muito fracas, estando no entanto presentes.

IV. Discussão e Conclusão

Com o objectivo de estudar a função da nova proteína centrossomal TBCCD1 em vertebrados foi realizada uma análise da expressão do gene *tbccd1* em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário no peixe zebra.

Deste modo procedeu-se ao estudo da expressão temporal e espacial dos transcritos do gene *tbccd1* no peixe zebra utilizando-se inicialmente a técnica de hibridação *in situ*. A hibridação *in situ* é uma técnica muito sensível e tem sido largamente usada em estudos de expressão génica, durante o desenvolvimento embrionário em vertebrados (Caliskan et al., 2003). Os resultados deste ensaio em embriões inteiros demonstraram que o gene *tbccd1* é expresso ubiquamente desde estádios embrionários precoces, onde só existe expressão maternal, até larvas de 48 hpf.

Imprevisivelmente, a sonda controlo (“sense”) usada na hibridação *in situ* originou um sinal similar ao da sonda experimental “antisense” (complementar ao mRNA de *tbccd1*), principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento (0 – 5:25 hpf). Estas fases iniciais são caracterizadas pela rápida divisão celular e sincronizada, sendo a contribuição genética no embrião apenas de origem materna (Ciruna et al., 2002; Kimmel et al., 1995).

O sinal obtido após a utilização da sonda “sense” pode ter diversas interpretações. A mais provável é que o sinal seria resultante de “ruído” de fundo (“background”). Um dos principais problemas da técnica de Hibridação *in situ* é por vezes a dificuldade de distinguir um sinal específico do “ruído” de fundo resultante de hibridações inespecíficas. De facto existem inúmeros factores como a concentração da sonda, digestão enzimática, lavagens pós-hibridação entre outros, que podem afectar a especificidade do sinal obtido numa hibridação *in situ* (Silva-Valenzuela et al., 2006). Existem ainda descrições que relatam que por vezes as sondas podem hibridar inespecificamente com genes de mRNA de cauda poli A ou com genes “housekeeping” (ex: actina) conhecidos como sendo expressos constitutivamente em todas as células. As moléculas de RNA mensageiro destes genes podem por vezes competir com as sondas através de determinadas sequências nucleotídicas originando hibridações não-específicas, contribuindo para o “ruído” de fundo na revelação da sonda (Wilcox, 1993). Estudos realizados em tecidos de plantas demonstraram que os fragmentos de ácidos nucleicos resultantes por exemplo de fenómenos de apoptose natural, podem ser também uma fonte de sinal não-específico na hibridação *in situ* de mRNA (Vuosku et al., 2010).

A especificidade do sinal obtido na hibridação *in situ*, foi testada recorrendo-se a cortes histológicos de alguns embriões hibridados. Verificou-se que não se obtiveram diferenças reais no padrão de expressão das sondas “sense” e “antisense” nos embriões seccionados.

Os resultados obtidos da hibridação *in situ* e dos cortes histológicos dos embriões hibridados levantaram assim algumas hipóteses: i) as sondas não dão um sinal específico uma vez que o gene *tbccd1* não é expresso nos embriões dos estádios estudados; ii) as sondas não dão um sinal específico devido ao gene *tbccd1* ser expresso em baixos níveis; iii) o RNA “antisense” do gene *tbccd1* é excepcionalmente expresso.

A hipótese que seria mais provável era a presença de um mRNA “antisense” do gene *tbccd1*. Esta hipótese é apoiada pelo facto de já ser conhecida a possibilidade de transcritos de RNA “sense” e “antisense” co-existirem em vertebrados, nomeadamente em peixe zebra. Por exemplo, estudos do gene *slc34a*, transportador de fosfato inorgânico, realizados em vertebrados (peixe zebra e *Xenopus*) revelaram uma expressão significativa dos transcritos “sense” e “antisense” do gene nas mesmas células, sob a forma de pequenas sequências de RNAs, apesar de frequentemente apresentarem padrões de expressão opostos (Carlile et al., 2008). No entanto, outros estudos envolvendo o mesmo gene em peixe zebra revelaram a co-expressão dos transcritos “sense” e “antisense” num curto período de tempo do seu desenvolvimento. Observou-se ainda que estes transcritos formam “endo-siRNAs” (endogenous - small interfering RNAs) que parecem estar relacionados com o silenciamento transcricional de transcritos complementares através da promoção da sua degradação (Werner et al., 2009).

Para confirmar a hipótese da existência dos dois transcritos do gene *tbccd1* (“sense” e “antisense”) procedeu-se a um RT-PCR com amostras de cDNA “sense” e “antisense” dos estádios de desenvolvimento peixe zebra estudados. Os resultados dos RT-PCRs demonstraram que o gene *tbccd1* de mRNA “sense” é, conforme esperado, expresso em todos os estádios de desenvolvimento embrionário do peixe zebra comprovando os resultados da hibridação *in situ*. Vestígios de produtos de PCR foram igualmente obtidos a partir de amostras de cDNA “antisense”, sugerindo a existência de um transcrito “antisense” para o gene *tbccd1*. No entanto, os produtos de PCR obtidos foram muito ténues, não sendo o resultado preciso e conclusivo. A hipótese de co-existirem dois transcritos para o gene *tbccd1* está ainda por comprovar.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a proteína TBCCD1 parece estar envolvida no desenvolvimento do embrião do peixe zebra, não só pela sua localização ubíqua nos tecidos dos embriões hibridados, mas também pela sua constante expressão ao longo de todos os estádios de desenvolvimento embrionário estudados no embrião de peixe zebra.

V. Perspectivas

As dificuldades encontradas no estudo da expressão do gene *tbccd1* e da análise do transcrito “antisense”, levam à necessidade da aplicação de outras abordagens experimentais. Uma possibilidade a considerar para o estudo da expressão génica de NATs (“Natural antisense transcripts”) em tecidos específicos é o uso da técnica de “Northern blots” e de “microarrays”. Este último permite determinar a expressão simultânea de vários genes (Carlile et al., 2008; Coram et al., 2009). Uma outra técnica para o estudo de transcritos “antisense” é o PCR Real-Time, método que permite a quantificação exacta, sensível e reprodutível de ácidos nucleicos de DNA ou RNA.

Este trabalho constitui um pequeno contributo para o estudo da função da proteína TBCCD1 num organismo vivo, o peixe zebra. Contudo, para aprofundar este estudo determinando os mecanismos moleculares e as vias onde esta proteína participa será necessário realizar experiências adicionais, como por exemplo as que se descrevem de seguida:

1- Hibridação *in situ* com uma nova sonda para o *tbccd1*: Será apropriado sintetizar uma nova sonda com um fragmento de uma região diferente do gene *tbccd1* para excluir a hipótese das sondas serem inespecíficas. Proceder novamente a uma hibridação *in situ*.

2- Realização de ensaios de ganho de função de TBCCD1 em embriões de peixe zebra: Para se proceder à sobre-expressão de *tbccd1* injecta-se mRNA codificante para a proteína TBCCD1 conjugado com GFP (“Green Fluorescent Protein”) sintetizado *in vitro* em embriões de peixe zebra no estágio de uma célula. Após a sobre-expressão de *tbccd1* pode-se analisar por exemplo o posicionamento do centróssoma em relação ao núcleo, a organização do complexo de Golgi e a presença de cílios primários em determinados órgãos do embrião de peixe zebra, como por exemplo nos pronefros, onde estão presentes células ciliadas em abundância, na vesícula de Kupffer, uma vez que é um órgão multiciliado e essencial na definição do eixo esquerdo-direito do embrião, e na vesícula ótica do cérebro visto serem estruturas constantemente marcadas na hibridação *in situ* realizadas neste projecto. Para este tipo de análise poder-se-á proceder à técnica de Imunofluorescência, realizada anteriormente em estudos similares do gene *tbccd1* em células de cultura humanas.

3- Realização de ensaios de perda de função de TBCCD1 em embriões de peixe zebra: Para silenciar (“knockdown”) o gene *tbccd1* pode-se utilizar a tecnologia de morfolino (GeneTools). Um oligómero morfolino contra *tbccd1* e um morfolino controlo com 5 pares de bases incompatíveis (não complementares) são injectados em embriões de uma célula de peixe zebra. Os oligómeros de morfolino irão bloquear pequenas regiões de emparelhamento de RNA do gene *tbccd1*. Isto impedirá a tradução do gene e a proteína não será produzida. No caso do morfolino controlo, uma vez que contém 5 pares de bases não complementares com as do mRNA endógeno não ocorre emparelhamento e a tradução não é impedida. Para confirmar a especificidade do morfolino efectua-se um “rescue” do fenótipo causado pelo morfolino. Se este for específico assistir-se-á à recuperação do fenótipo de embriões do tipo selvagem de peixe zebra. O morfolino deverá assim ser co-injectado com um mRNA com uma sequência ribonucleotídica distinta mas ainda assim codificante para a proteína TBCCD1 funcional. A técnica de Imunofluorescência poderá ser também aplicada com o mesmo fim do ensaio da sobre-expressão de *tbccd1*, referido anteriormente.

4- Citometria de fluxo: Esta técnica poderá servir de complemento aos ensaios de perda e ganho de função referidos anteriormente, permitindo quantificar a percentagem de células ciliadas dos órgãos/estruturas em análise do embrião de peixe zebra.

5- Ensaios de “wound - healing” em cultura de células embrionárias de peixe zebra. Esta experiência contribuirá para o estudo do papel de *tbccd1* na migração celular. Realizando uma ferida (“wound”) em células de cultura de peixe zebra (por exemplo ZF4, linha celular de fibroblasto de um embrião de 24 hpf de peixe zebra) controlo e silenciadas previamente por microinjecção de RNAi contra o gene *tbccd1* para induzir a migração celular. O fecho da ferida pode ser visualizado e monitorizado através de vídeo - imagem em tempo real em microscopia de interferência diferencial.

Em conclusão, com o estudo continuado da proteína TBCCD1 em peixe zebra espera-se compreender a função desta proteína nos vários processos celulares referidos ao longo deste trabalho (ex: divisão e migração celular, montagem e manutenção de cílios, entre outros), na fisiologia e desenvolvimento embrionário de vertebrados.

VI. Bibliografia

- Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. (1994) *Molecular Biology of the Cell* (3rd edition). Garland Science, 16.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) *The Cytoskeleton: Molecular Biology of the Cell* (4th edition), 16.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5 (2): 209-219.
- Azimzadeh J, Bornens M. (2007) Structure and duplication of the centrosome. *Cell Science at a Glance*, 20: 2139-2142.
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. (2006) The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.*, 7:125-148.
- Bartolini F, Bhamidipati A, Thomas S, Schwahn U, Lewis SA, Cowan NJ. (2002) Functional Overlap between Retinitis Pigmentosa 2 Protein and the Tubulin-specific Chaperone Cofactor C. *The journal of biological chemistry*, 277 (17): 14629–14634.
- Bettencourt-Dias M, Glover DM. (2007) Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 451-463.
- Bisgrove BW, Yost HJ. (2006) The roles of cilia in developmental disorders and disease. *133 (21):4131-4143*.
- Bornens M. (2008) Organelle positioning and cell polarity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9:874-886.
- Briggs JP. (2002) The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 282: 3–9.
- Çalışkan M, Ozcan B, Cuming AC. (2003) A Novel application for determination of germin gene products In Situ. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17 (2).

- Carlile M, Nalbant P, Preston-Fayers K, McHaffie GS, Werner A. (2008) Processing of naturally occurring sense/antisense transcripts of the vertebrate Slc34a gene into short RNAs. *Physiol. Genomics* 34:95-100.
- Chapple JP, Hardcastle AJ, Grayson C, Spackman LA, Willison KR, Cheetham ME. (2000) Mutations in the N-terminus of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 interfere with the normal targeting of the protein to the plasma membrane. *Hum. Mol. Genet.*, 9(13): 1919-1926.
- Chen RH, Fuggle SV. (1993) In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am. J. Pathol.*, 143(6): 1527–1534.
- Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, Thisse B, Thisse C, Raz E, Schier AF. (2002) Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(23):14919-24.
- Coram TE, Settles ML, Chen X. (2009) Large-scale analysis of antisense transcription in wheat using the Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array. *BMC Genomics*, 10: 253.
- Downing KH, Nogales E. (1998) Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:785-791.
- Desai A, Mitchison TJ. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:83–117.
- Essner J, Amack J, Nyholm M, Harris EB, Yost HJ. (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*, 132, 1247-1260.
- Evans RJ, Schwarz N, Nagel-Wolfrum K, Wolfrum U, Hardcastle AJ, Cheetham ME. (2010) The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Human Molecular Genetics*, 19 (7): 1358–1367.
- Feldman JL, Marshall WF. (2009) ASQ2 Encodes a TBCC-like Protein Required for Mother-Daughter Centriole Linkage and Mitotic Spindle Orientation. *Current Biology*, 19 (14): 1238-1243.

- Fletcherand DA, Mullins RD. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463: 485 – 492.
- Fliegeauf M, Benzing T, Omran H. (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 880-893.
- Goetz SC, Anderson KV. (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.*, 11(5):331-44.
- Guasch A, Aloria K, Pérez R, Avila J, Zabala JC, Coll M. (2002) Three-dimensional Structure of Human tubulin Chaperone Cofactor A. *J. Mol. Biol.*, 318 (4): 1139-1149.
- Hage-Sleiman R, Herveau S, Matera E, Laurier J, Dumontet C. (2010) Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10:135.
- Hurd T, Zhou W, Jenkins P, Liu C, Swaroop A, Khanna H, Martens J, Hildebrandt F, Margolis B. (2010) The retinitis pigmentosa protein RP2 interacts with polycystin 2 and regulates cilia-mediated vertebrate development. *Human Molecular Genetics*, 19 (22): 4330–4344.
- Janmey P. (1998).The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. *Physiological Reviews*,78(3): 763 – 781.
- Jordan MA, Wilson L. (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4: 253-265.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:255-310.
- Kobayashi T, Dynlacht BD. (2011) Regulating the transiion from centriole to basal body. *J. Cell. Biol.*, 193:435-444.
- Lajoie-Mazenc I, Tollon Y, Detraves C, Julian M, Moisand A, Gueth-Hallonet C, Debec A, Salles-Passador I, Puget A, Mazarguil H, et al. (1994) Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *Journal of Cell Science*, 107: 2825-2837.

- Llorca O, Martín-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J, M. Hynes G, Willison KR, Carrascosa JL, Valpuesta JM. (2000) Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO Journal*, 19 (22): 5971 – 5979.
- Lopez-Fanarraga M., Avila J., Guasch A., Coll M., Zabala C. (2001). Review: Postchaperonin Tubulin Folding Cofactors and Their Role in Microtubule Dynamics. *Journal of Structural Biology*, 135: 219 – 229.
- Lüders J, Stearns T. (2007) Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8(2):161-7.
- Marshall WF, Nonaka S. (2006) Cilia: Tuning in to the Cell's Antenna. *Current Biology*, 16(15): 604-614.
- Moritz M, Braunfeld MB, Guénebaut V, Heuser J, Agard DA. (2000) Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell. Biol.*, 2(6):365-70.
- Moritz M, Agard DA. (2001) γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current Opinion in Structural Biology*, 11 (2): 174-181.
- Nogales E. (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem*, 69:277–302.
- Nogales E, Wang H-W. (2006) Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Current Opinion in Structural Biology*, 16:221–229.
- Nolasco S, Bellido J, Gonçalves J, Zabala JC, Soares H. (2005) Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death. *FEBS Lett.*, 579 (17): 3515-3524.
- Radcliffe PA, Garcia MA, Toda T. (2000) The cofactor-dependent pathways for alpha- and beta-tubulins in microtubule biogenesis are functionally different in fission yeast. *Genetics*, 156(1): 93–103.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (12): 5463-5467.

- Sambrook J., Russel DW. (2001) Molecular Clonning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satir P, Christensen ST. (2007) Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu. Rev. Physiol.*, 69:377-400.
- Scholey JM. (2008) Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *The Journal of Cell Biology*, 180 (1): 23-29.
- Schwahn U, Paland N, Techritz S, Lenzner S, Berger W. (2001) Mutations in the X-linked *RP2* gene cause intracellular misrouting and loss of the protein. *Hum. Mol. Genet.* 10 (11): 1177-1183.
- Silva-Valenzuela MG, Almeida FCS, Matizonkas-Antonio LF, Libório TN. (2006) In situ hybridization with non-radioactive riboprobes: principles and applications in pathology. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 42 (3): 207-213.
- Singla V, Reiter JF. (2006)The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*, 313 (5787): 629-633.
- Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, Geiges B, Küttner F, Lepiniec L, Stierhof Y, Schwarz H, Jürgens G, Mayer U. (2002) The *Arabidopsis* *PILZ* group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.*, 16(8): 959–971.
- Szymanski D. (2002) Tubulin Folding Cofactors: Half a Dozen for a Dimer. *Current Biology*, 12:767–769.
- Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ. (1996) Pathway Leading to Correctly Folded β -Tubulin. *Cell*, 86, 287–296.
- Tian G, Lewis SA, Feierbach B, Stearns T, Rommelaere H, Ampe C, Cowan NJ. (1997) Tubulin Subunits Exist in an Activated Conformational State Generated and Maintained by Protein Cofactors. *J. Cell Biol.*, 138 (4): 821-832.
- Thisse B, Thisse C. 1998. High resolution whole-mount in situ hybridization in zebrafish. *Sci. Mon* 5:8-9.
- Vuosku J, Sutela S, Sääskilahti M, Kestilä J, Jokela A, Sarjala T, Häggman H. (2010) Dealing with the problem of non-specific in situ mRNA hybridization signals

associated with plant tissues undergoing programmed cell death. *Plant Methods*, 6(1): 7.

Werner A, Sayer JA. (2009) Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 18 (4): 343-349.

Wilcox JN. (1993) Fundamental principles of in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem*, (12):1725-33.