

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Ciências**  
**ULisboa**

**Estudo da função das proteínas variantes da TBCCD1  
humana, uma proteína chave na ligação do centrossoma ao  
núcleo**

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialização em Bioquímica

Catarina Sofia de Araújo Peneda

Dissertação orientada por:  
Maria Helena Antunes Soares  
Maria Luísa Santos Sousa Cyrne

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e também ao Centro de Química e Bioquímica (CQB) por terem possibilitado o desenvolvimento deste projeto.

Como não poderia deixar de ser, agradeço imenso à professora Helena Soares. Por ter aceite ser minha orientadora, por todo o apoio e toda a disponibilidade que demonstrou ao longo deste ano. Acima de tudo, agradeço por todas as horas (e horas e horas...) de conversas sobre ciência e sobre qualquer outro assunto e por todo o tempo passado também na bancada, porque todas estas horas fizeram com que este ano fosse mais enriquecedor, tanto a nível científico, com a nível pessoal.

Agradeço a todos os restantes membros do Redox Biology Group, Susana Marinho, Fernando Antunes, Carla Real, Filipe Vilas-Boas e, em especial, à professora Luísa Cyrne, por ter aceite ser minha orientadora interna.

Queria também agradecer aos meus colegas de laboratório, Carolina Camelo, Bruno Carmona e Ana Isabel Câmara. Ao Bruno agradeço especialmente pela ajuda no RT-qPCR, à Ana Isabel, obrigado por todas as horas de ajuda na bancada mas essencialmente por todas as horas intermináveis no microscópio!

Por terem feito destes 5 anos aquilo que foram, porque sem vocês teriam sem dúvida sido diferentes, muito obrigado aos membros do G2, Andreia, Carolina, Rafa e Rita. Obrigado por todas as horas de trabalho mas, essencialmente, pelas horas de não trabalho que tivemos, por todas as gargalhadas, as birras, os dias de mau-humor e acima de tudo por todos os momentos bons e o apoio que acho que sempre existiu entre todos.

Afilhado (Fadhil), obrigado por todas as vezes que impediste que eu trabalhasse para passar horas a falar contigo, por acreditares que sou muito mais responsável que tu e por manteres sempre esse bom humor e despreocupação característicos que animam qualquer um. Daqui a um ano vemos se isso continua!

Obrigado Diogo, Ivan, Raminhas e Andreia, por todo o apoio de tantos anos. Obrigado por apesar da distância dos últimos anos, fazerem de cada café hoje, o mesmo que era há 5 anos atrás.

Como não podia deixar de ser, obrigado à minha família. Obrigado aos meus avós, por serem também meus pais. Por me apoiarem sempre e em tudo, por

acreditarem em mim e pelo orgulho demonstrado. Por todas as horas de conversa, e tudo o que me ensinaram. Obrigado por fazerem de mim quem eu sou. Obrigado Miguel pela relação que só nós percebemos. Agradeço também aos meus pais, por tudo. Mãe, pelo apoio, compreensão e por todas as birras porque sem elas não seria o mesmo. Agradeço também ao meu pai por exigir que fosse sempre melhor mas, no entanto, não se importar se isso não acontecesse. Já agora, obrigado pelo almoço, fico à espera do próximo.

Obrigado Rafa, pelos motivos mais óbvios e por toda a paciência que tiveste quando nada funcionava. Obrigado também por todas as discussões que se tornaram úteis. Obrigado acima de tudo por todo o apoio de todos estes anos, e por sermos aquilo que somos.

## Resumo

Com a identificação e o estudo do gene humano *tbccd1*, foi identificada uma proteína, a TBCCD1, por ele codificada. Esta proteína foi então descrita como sendo uma proteína centrossomal, que se localiza também nos corpos basais de cílios primários e no corpo médio. Foram identificados dois novos transcritos do *tbccd1* resultantes de *splicing* alternativo, nomeadamente, variante 2 e variante 3, sendo que o transcrito variante 1 codifica a proteína TBCCD1 variante 1 inicialmente descrita.

O *knockdown* do *tbccd1* utilizando siRNAs provoca vários fenótipos em células hTERT RPE-1, como o aumento da distância centrossoma-núcleo, a fragmentação do complexo de Golgi e a diminuição na velocidade de migração em ensaios de fecho da ferida.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo o estudo da função biológica de cada uma das variantes identificadas.

Estudou-se a localização celular de cada uma das variantes identificadas em diferentes linhas celulares humanas. Observou-se que as proteínas TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 têm uma localização citoplasmática em todas as situações analisadas. Pelo contrário, como tinha já sido observado, a proteína TBCCD1 variante 1 localiza-se no centrossoma, no corpo médio e nos corpos basais de cílios primários. Curiosamente, observou-se que a localização desta proteína no corpo médio é dependente dos microtúbulos, ao contrário do que acontece com a sua localização centrossomal. Esta observação sugere então uma interação com microtúbulos do corpo médio onde existe uma acumulação de microtúbulos acetilados.

Observou-se também que a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1 ou TBCCD1 variante 2 provoca uma diminuição nos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada, assim como de  $\gamma$ -tubulina e de  $\beta$ -actina. Já a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 3 não parece afetar os níveis dos componentes do citoesqueleto analisados.

Estudou-se também se o fenótipo do aumento da distância centrossoma-núcleo pode ser provocado por apenas uma das variantes ou resulta da ação combinada de mais do que uma variante. Para isso, realizaram-se ensaios de recuperação do fenótipo, tendo-se observado que as proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2 revertem parcialmente o fenótipo em estudo.

Para além disso, realizou-se um estudo recorrendo a RT-qPCR no qual se observou que as variantes têm uma função de regulação entre si. A sobreexpressão das

proteínas TBCCD1 variante 1 ou TBCCD1 variante 2 leva À alteração dos níveis dos transcritos das variantes 1, 2 e 3. Já a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 3 afeta apenas os níveis do transcrito variante 3 endógeno.

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo indicam que as proteínas codificadas pelos três transcritos identificados deverão ter diferentes funções celulares. Para além disso, as proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2 afetam os níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e  $\beta$ -actina, o que pode afetar, por exemplo, a organização do complexo de Golgi e a migração celular, através da regulação da dinâmica dos microtúbulos. Assim, estes resultados contribuem de forma decisiva para a compreensão dos fenótipos observados nas experiências do *knockdown* do *tbccd1*.

**Palavras-chave:** TBCCD1, centrossoma, Golgi, microtúbulos, citoesqueleto

## Abstract

When the human gene *tbccd1* was identified and studied, a protein, TBCCD1, that it encoded was also identified. This protein was then described as a centrosomal protein that also localizes at the basal bodies of primary cilia and to the midbody. Two new transcripts of *tbccd1* originated by alternative splicing were identified, namely, variant 2 and variant 3, and it is now known that variant 1 encodes the TBCCD1 protein initially described.

The knockdown of *tbccd1* using siRNAs causes several phenotypes in hTERT RPE-1 cells, such as the increase in centrosome-nucleus distance, fragmentation of the Golgi apparatus and a decrease of the cell migration in wound healing assays.

The main goal of this work was to study the biological function of each of the identified *tbccd1* variants.

In this study, the cellular localization of each of the variants in different human cell lines was accessed. TBCCD1 variant 2 and TBCCD1 variant 3 proteins have a cytoplasmic localization in all the situations analyzed. As it has already been described, TBCCD1 variant 1 protein localizes at the centrosome, the basal bodies of primary cilia and to the midbody. Interestingly, it was shown that the midbody localization of this protein is dependent on microtubules, while its centrosomal localization is not. This observation suggested an interaction of this protein with a population of microtubules in the midbody where they are highly acetylated.

Overexpression of TBCCD1 variant 1 or TBCCD1 variant 2 causes a decrease on acetylated  $\alpha$ -tubulin levels, and also on  $\gamma$ -tubulin and  $\beta$ -actin levels. The overexpression of TBCCD1 variant 3 does not seem to affect the levels of any of the cytoskeleton components analyzed.

It was also studied if the increased centrosome.nucleus distance phenotype is caused by only one or a combination of the identified variants. In order to do this, we performed phenotype rescue assays, and it was shown that overexpression of TBCCD1 variant 1 or TBCCD1 variant 2 can partially rescue this phenotype.

Moreover, we used RT-qPCR to study whether the identified variants have a regulatory function between them, and showed that TBCCD1 variant 1 or TBCCD1 variant 2 overexpression affects the levels of the three transcripts. On the other hand, the overexpression of TBCCD1 variant 3 only affects variant 3 endogenous transcript levels.

Taken together, the results obtained in this study indicate that the proteins encoded by the three transcripts might have different cellular functions. Furthermore, TBCCD1 variant 1 and TBCCD1 variant 2 affect acetylated  $\alpha$ -tubulin,  $\gamma$ -tubulin and  $\beta$ -actin levels which may be implicated on, for example, Golgi apparatus organization and cell migration by the regulation of microtubules dynamics. Therefore, this results contributed to the comprehension of the causes of the *tbccd1* knockdown phenotypes.

**Key words:** TBCCD1, centrosome, Golgi, microtubules, cytoskeleton

## Índice

Resumo .....	4
Abstract .....	6
1. Introdução.....	17
1.1. Citoesqueleto.....	17
1.2. Actina .....	17
1.3. Microtúbulos .....	19
1.3.1. Via de <i>foldin</i> g da tubulina .....	22
1.3.2. Modificações pós-traducionais da tubulina .....	23
1.4. Centrossoma .....	26
1.4.1. Estrutura do centrossoma .....	27
1.5. TBCCD1 .....	30
1.5.1. Variantes do <i>tbccd1</i> resultantes de <i>splicing</i> alternativo .....	33
2. Objetivos.....	35
3. Materiais e métodos .....	36
3.1. Reagentes .....	36
3.2. Equipamento .....	36
3.3. Estirpes de bactérias usadas, condições de cultura e de transformação e seleção de clones recombinantes .....	37
3.3.1. Estirpes de bactérias usadas e condições de cultura .....	37
3.3.2. Preparação de células de <i>E. coli</i> competentes .....	37
3.3.3. Transformação de células competentes .....	38
3.3.4. Protocolo de <i>Cracking</i> .....	38
3.3.5. Preparação de DNA plasmídico em grande escala .....	39
3.3.6. Hidrólise de DNA.....	40
3.3.7. Eletroforese de DNA .....	40
3.3.8. Sequenciação de DNA baseada no uso de dideoxinucleótidos (método de Sanger) .....	40
3.4. Linhas celulares humanas .....	41
3.4.1. Condições de cultura de linhas celulares .....	41

3.4.2.	Transfecção de linhas celulares humanas .....	42
3.4.3.	Transfecção de linhas celulares humanas com pequenos RNAs de interferência específicos para o <i>tbccd1</i> .....	43
3.4.4.	Ensaio de despolimerização de microtúbulos com nocadazole .....	45
3.4.5.	Indução de cílios primários nas células humanas.....	45
3.4.6.	Preparação de células das linhas celulares humanas para análise em microscopia de imunofluorescência.....	46
3.5.	Preparação e análise de extratos proteicos .....	47
3.5.1.	Preparação de extratos proteicos totais .....	47
3.5.2.	Preparação de extratos proteicos desnaturantes solúveis.....	48
3.5.3.	Determinação da concentração dos extratos proteicos .....	49
3.5.4.	Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) .....	49
3.5.5.	Eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose .....	50
3.5.6.	<i>Western blot</i> .....	51
3.6.	Preparação e análise de RNA .....	52
3.6.1.	Extração de RNA total de linhas celulares humanas .....	52
3.6.2.	Síntese de cDNA.....	53
3.6.3.	RT-qPCR .....	54
3.7.	Análise estatística.....	55
4.	Resultados.....	56
4.1.	Estudo da localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 em sobreexpressão.....	56
4.2.	Estudo da localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 em sobreexpressão na ausência do citoesqueleto de microtúbulos.....	61
4.3.	Estudo do efeito da sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 na acetilação dos microtúbulos .....	67
4.4.	Estudo de reversão de fenótipo do <i>knockdown</i> do <i>tbccd1</i> .....	71
4.5.	Estudo da função regulatória da sobreexpressão de cada variante do TBCCD1.....	75

5. Discussão e conclusões .....	84
5.1. As proteínas variantes da TBCCD1 têm diferentes localizações celulares ...	84
5.2. As proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2 parecem afetar a dinâmica de microtúbulos.....	85
5.3. As proteínas variantes da TBCCD1 reverterem parcialmente o <i>knockdown</i> do <i>tbccd1</i> .....	88
5.4. Estudo da função regulatória entre as três variantes do <i>tbccd1</i> identificadas	89
6. Perspetivas.....	92
7. Bibliografia.....	94
8. Anexos .....	102
8.1. pcDNA3.1 (Invitrogen) – vetor de expressão em mamífero.....	102
8.2. pIC111 (6xHis-PreScission-GFP) – vetor construído no vetor pcDNA3.1+ (Invitrogen) – vetor de expressão em mamífero .....	103
8.3. pIC112 (6xHis-PreScission-GFP) – vetor construído no vetor pcDNA3.1+ (Invitrogen) – vetor de expressão em mamífero .....	104

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Citosqueleto de actina.....	18
<b>Figura 2</b> – Dinâmica de microtúbulos.....	20
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da via de <i>folding</i> da tubulina.....	23
<b>Figura 4</b> – Estrutura do centrossoma e organização da matriz pericentriolar..	28
<b>Figura 5</b> – Satélites centriolares.....	29
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática da localização dos domínios funcionais das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1. ....	31
<b>Figura 7</b> – Efeito do <i>knockdown</i> do <i>tbccd1</i> na distância centrossoma-núcleo e na organização do complexo de Golgi em células hTERT RPE-1.....	32
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática dos exões que constituem o mRNA de cada variante de <i>splicing</i> do gene <i>tbccd1</i> . ....	33
<b>Figura 9</b> – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células HEK 293T. ....	57
<b>Figura 10</b> - Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células HeLa.. ...	58
<b>Figura 11</b> - Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células hTERT RPE-1. ....	58
<b>Figura 12</b> – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células em mitose. ....	59
<b>Figura 13</b> – Localização das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células hTERT RPE-1 ciliadas. ....	60
<b>Figura 14</b> – Localização celular da proteína TBCCD1 variante 1-RFP em células HEK 293T antes e após o tratamento com nocadazole.....	62
<b>Figura 15</b> – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em sobreexpressão, em células hTERT RPE-1 tratadas com nocadazole. ....	64
<b>Figura 16</b> – Localização celular da proteína TBCCD1-GFP em células hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP tratadas com nocadazole. ....	65
<b>Figura 17</b> – Marcação de $\alpha$ -tubulina acetilada em células HEK 293T a sobreexpressarem TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP..	68

<b>Figura 18</b> – Análise dos níveis de $\alpha$ -tubulina acetilada, $\gamma$ -tubulina e $\beta$ -actina em extratos proteicos de células HEK 293T em sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. ....	69
<b>Figura 19</b> – Níveis relativos de $\alpha$ -tubulina acetilada, $\gamma$ -tubulina e $\beta$ -tubulina em células HEK 293T a sobreexpressar as proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. ....	69
<b>Figura 20</b> – Análise da distância centróssoma-núcleo em células com <i>knockdown</i> do <i>tbccd1</i> , após sobreexpressão das variantes TBCCD1. ....	72
<b>Figura 21</b> – Agregados de $\gamma$ -tubulina em células a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. ....	74
<b>Figura 22</b> – Representação esquemática dos locais de emparelhamento dos <i>primers</i> nos exões constituintes de cada um dos três transcritos identificados para o <i>tbccd1</i> , resultantes de <i>splicing</i> alternativo, nas experiências de RT-qPCR. ....	75
<b>Figura 23</b> – Representação gráfica da quantidade relativa dos transcritos de cada variante do <i>tbccd1</i> , obtidos por RT-qPCR, em células HEK 293T a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP e em células RPE e HeLa, em relação aos níveis de células HEK 293T não transfetadas. .	76
<b>Figura 24</b> – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células HEK 293T co-transfetadas. . .	78
<b>Figura 25</b> – Localização das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em células HeLa co-transfetadas. ....	79
<b>Figura 26</b> – Percentagem de células com a proteína TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP no centróssoma. ....	81
<b>Figura 27</b> – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em células HEK 293T co-transfetadas, em divisão. ....	82

## Índice de quadros

<b>Quadro 1</b> – Modificações pós-traducionais da tubulina e enzimas envolvidos.....	24
<b>Quadro 2</b> – Número de células plaqueadas por poço em placas de seis poços e composição das misturas preparadas para a transfeção das linhas celulares. ....	43
<b>Quadro 3</b> - Número de células plaqueadas por poço em placas de vinte e quatro poços e composição das misturas preparadas para a transfeção das linhas celulares. ....	43
<b>Quadro 4</b> – Composição das misturas preparadas para a transfeção de linhas celulares com siRNAs utilizando Lipofectamin3000. ....	44
<b>Quadro 5</b> – Sequência dos quatro siRNAs utilizados, a sua origem e a concentração final na solução de mistura de siRNAs utilizada para transfetar as células. ....	45
<b>Quadro 6</b> – Anticorpos primários utilizados, animal em que foram produzidos e a diluição de trabalho utilizada para microscopia de imunofluorescência.....	47
<b>Quadro 7</b> – Anticorpos secundários utilizados, animal em que foram produzidos e a diluição de trabalho utilizada para microscopia de imunofluorescência.....	47
<b>Quadro 8</b> – Composição do gel resolvente para SDS-PAGE 10%. ....	50
<b>Quadro 9</b> – Composição do gel concentrador 5 % para SDS-PAGE.....	50
<b>Quadro 10</b> – Anticorpos primários utilizados, animal em que foram produzidos e a respetiva diluição de trabalho utilizada nos ensaios de <i>Western blot</i> . ....	52
<b>Quadro 11</b> – Anticorpos secundários utilizados, animal em que foram produzidos e a respetiva diluição de trabalho utilizada nos ensaios de <i>Western blot</i> . ....	52
<b>Quadro 12</b> – Constituição da mistura preparada para a síntese de cDNA a partir de RNA total.....	54
<b>Quadro 13</b> – Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas experiências de RT-qPCR.....	55
<b>Quadro 14</b> – Quantidades relativas, obtidas por RT-qPCR, de cada um dos três transcritos do <i>tbccd1</i> identificados em células HEK 293T a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP e em células RPE e HeLa em relação aos níveis de células HEK 293T não transfetadas. ....	76

## **Lista de abreviaturas**

5'UTR – de *5' untranslated region*

ADP – difosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

Bisacrilamida – N,N'-metileno-bisacrilamida

BSA – albumina do soro bovino

CCT – de *cytosolic chaperonin-containing TCP1*

cDNA – DNA complementar, obtido a partir de moléculas de RNA através de transcrição reversa

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico (de *desoxiribonucleic acid*)

DNase – desoxirribonuclease

dNTPs – 5'-trifosfato de desoxinucleótido

DTT – ditioneitol

ECL – quimioluminescência potenciada (de *Enhanced chemiluminescence*)

EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético

FBS – Soro bovino fetal

GCP – de *γ-tubulin complex proteins*

GDP – difosfato de guanosina

GFP – proteína verde fluorescente (de *green fluorescent protein*)

GTP – trifosfato de guanosina

HDAC6 – desacetilase de histona 6 (de *histone deacetylase 6*)

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S)

HPRT – hipoxantina guanina fosforibosil transferase 1

HRP – peroxidase de rábano (de *horseradish peroxidase*)

LB – meio Luria Bertani ou *Lysogeny Broth*

MAPs – proteínas associadas a microtúbulos (de *microtubule associated proteins*)

mRNA – RNA mensageiro

MTOCs – centros organizadores de microtúbulos (de *microtubule organizing centres*)

NP-40 – nonidet P-40

PBS – tampão de fosfatos salino (de *phosphate buffer saline*)

PCM – matriz pericentriolar (de *pericentriolar matrix*)

PCR – de *polymerase chain reaction*

PFD – prefoldina

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoreto

RFP – proteína vermelha fluorescente (de *red fluorescent protein*)

RNA – ácido ribonucleico (de *ribonucleic acid*)

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real (de *real time quantitative PCR*)

SDS – dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (de *SDS-poliacrilamide gel electrophoresis*)

siRNA – pequeno RNA de interferência (de *small interfering RNA*)

TAE – Tampão tris-acetato-EDTA

TBCA – cofator A de ligação à tubulina

TBCB – cofator B de ligação à tubulina

TBCC – cofator C de ligação à tubulina

TBCCD1 – de *TBCC-domain containing protein 1*

TBCD – cofator D de ligação à tubulina

TBCE – cofator E de ligação à tubulina

TEMED – *N, N, N, N*-tetrametiletilenodiamina

Triton X-100 - *Iso*-octifenoxipolietoxietanol

TTL – tirosina ligase da tubulina (de *tubulin tyrosine ligase*)

TTLs – de *TTL-like*

Tween 20 - polioxietileno(sorbitan)monolaurato

uORF – grelha de leitura aberta na região a montante (de *upstream open Reading frame*)

$\gamma$ -TuRC – de  *$\gamma$ -tubulin-containing ring complex*

$\gamma$ -TuSC – de  *$\gamma$ -tubulin small complex*

# 1. Introdução

## 1.1. Citoesqueleto

O citoesqueleto é essencialmente constituído por microtúbulos, actina e filamentos intermédios, que interagem entre si participando em diversos processos celulares. Entre estes salientam-se a migração, o transporte intracelular, a comunicação célula-célula e a divisão. Para além disso, participa ainda no correto posicionamento dos organelos celulares e na manutenção da forma da célula e do núcleo (Fletcher and Mullins, 2010).

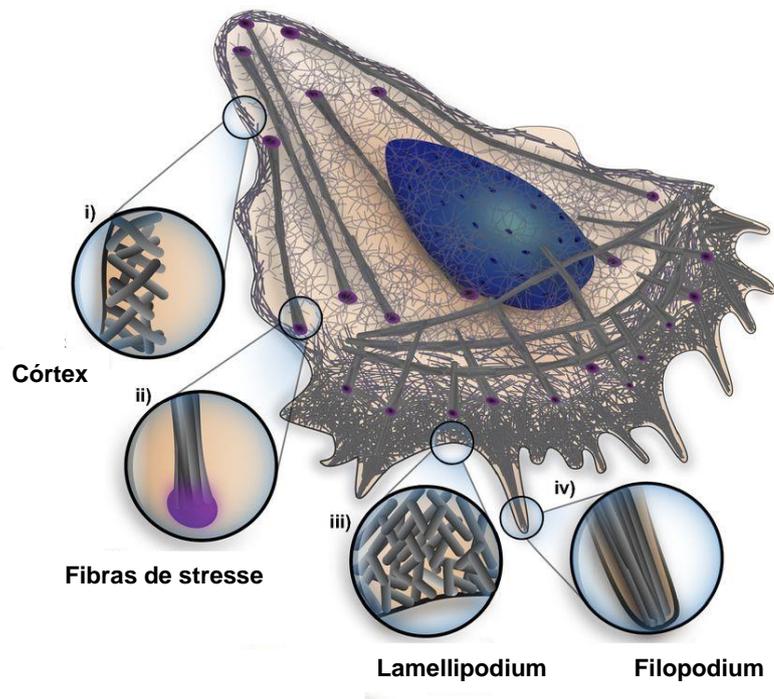
Os filamentos intermédios são polímeros apolares constituídos por diferentes proteínas como a vimentina e a queratina. Sabe-se que existem diferentes tipos de filamentos intermédios que são constituídos por proteínas distintas e têm uma contribuição para as diferentes propriedades de resposta aos stresses mecânicos de diferentes tipos celulares e tecidos (Block *et al.*, 2015). A maioria dos tipos de filamentos intermédios são citoplasmáticos estando alguns associados a estruturas envolvidas na adesão célula-célula e célula-matriz como os desmossomas e os hemidesmossomas. Estes componentes do citoesqueleto têm também um papel na manutenção da estrutura do núcleo e na organização nuclear do DNA, como é o caso das lamínas (Green *et al.*, 2005).

## 1.2. Actina

O citoesqueleto de actina é uma estrutura dinâmica que desempenha um papel essencial em diversas funções celulares como, por exemplo, na contração celular e na definição da forma da célula, em conjunto com os restantes componentes do citoesqueleto, designadamente, os microtúbulos e os filamentos intermédios. O citoesqueleto de actina é também necessário para a migração celular (Chan *et al.* 2014). Para além disso, a actina participa na formação de estruturas como os lamellipodia, os filopodia e os pseudopodia (Figura 1) (Blanchoin *et al.*, 2014).

A actina é uma proteína globular (G-actina) de aproximadamente 42 kDa, que possui a capacidade de polimerizar à custa da hidrólise de ATP formando filamentos polares (F-actina, actina filamentosa). Nestes filamentos ocorre polimerização e despolimerização direcional de forma contínua, existindo uma extremidade em que a

polimerização ocorre a maior velocidade, designada “extremidade (+)” (crescimento rápido), e outra em que a polimerização ocorre a menor velocidade, designada “extremidade (-)” (crescimento lento) (Sun *et al.* 2015).



**Figura 1 – Citoesqueleto de actina.** Representação esquemática de componentes do citoesqueleto de actina: córtex, fibras de stress, lamellipodium e filopodium. Adaptado de Blanchoin *et al.*, 2014.

Foram identificados nos vertebrados seis isotipos de actina bastante conservados, designadamente, a  $\alpha$  músculo esquelético-actina, a  $\alpha$  músculo cardíaco-actina, a  $\alpha$  músculo liso-actina, a  $\gamma$  músculo liso-actina, a  $\beta$  citoplasmática-actina e a  $\gamma$  citoplasmática-actina. Estes isotipos apresentam diferentes padrões de expressão e funções distintas (Benjamin J Perrin and James M. Ervasti 2010). Dos seis isotipos referidos existem dois, a  $\beta$  citoplasmática-actina, que a partir de agora será designada por  $\beta$ -actina, e a  $\gamma$  citoplasmática-actina, que a partir de agora será designada por  $\gamma$ -actina, que são ubiquamente expressos. A  $\beta$ -actina foi associada a adesão e contração celulares, localizando-se essencialmente em junções intercelulares, feixes circulares, fibras de stress ventrais e nos anéis contráteis que atuam no final da mitose. A  $\gamma$ -actina encontra-se nas fibras de stress dorsais nas células que não estão em movimento, enquanto que nas células que estão a migrar participa na formação de estruturas corticais e nos lamellipodia (Shagieva *et al.* 2012).

### 1.3. Microtúbulos

A rede de microtúbulos é, assim como no caso da actina, uma rede dinâmica, essencial para diversos processos celulares como a manutenção da forma da célula, a migração celular, a formação de cílios, a divisão celular, o correto posicionamento dos organelos celulares e o transporte intracelular. Em conjunto com a actina e com sistemas de sinalização, os microtúbulos também são responsáveis pela manutenção da polaridade celular (Akhshi *et al.*, 2014). Para além disso, forma duas estruturas essenciais na divisão celular: o fuso mitótico e o corpo médio.

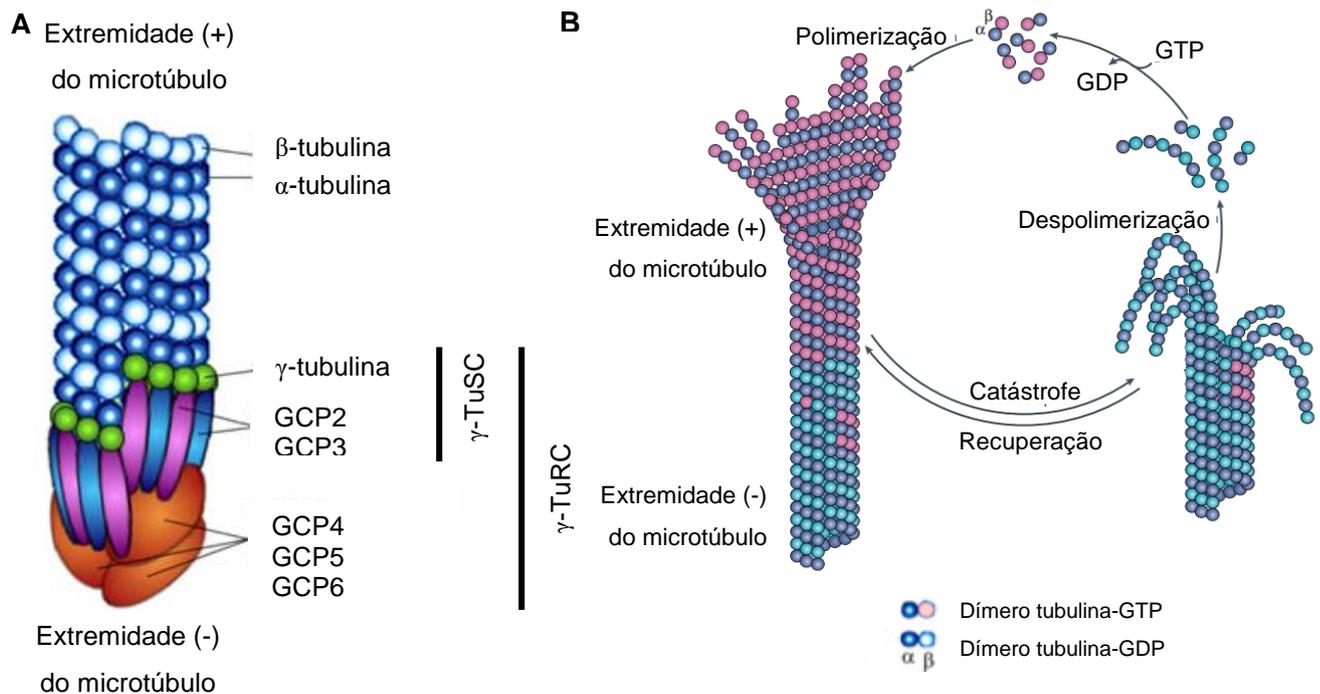
Os microtúbulos são estruturas cilíndricas, ocas e polares com aproximadamente 24 nm de diâmetro. No caso dos mamíferos, são constituídas por 13 protofilamentos associados lateralmente compostos por heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina associados topo a topo por ligações não covalentes (Figura 2A) (Downing and Nogales, 1998). Assim, a  $\beta$ -tubulina de um heterodímero ficará a contactar com a  $\alpha$ -tubulina do heterodímero seguinte. Desta forma, uma das extremidades do microtúbulo terá expostas moléculas de  $\alpha$ -tubulina e a outra extremidade do microtúbulo terá expostas moléculas de  $\beta$ -tubulina. A extremidade que tem expostas moléculas de  $\alpha$ -tubulina designa-se por extremidade (-), onde ocorre polimerização a menor velocidade, e a ponta que tem expostas moléculas de  $\beta$ -tubulina designa-se por extremidade (+) por ser onde ocorre polimerização a maior velocidade (Conde and Cáceres, 2009).

Sabe-se, atualmente, que em vários organismos existem vários genes que codificam para diferentes isotipos de tubulina. Por exemplo, em humanos foram já identificados dez genes que codificam  $\alpha$ -tubulina e nove que codificam  $\beta$ -tubulina. Apesar de serem codificadas por diferentes genes, a identidade entre os monómeros de tubulina é bastante elevada (>90%) (Khodiyar *et al.*, 2007) e todos os isotipos têm capacidade de polimerizar e formar microtúbulos. No entanto, a taxa de polimerização dos microtúbulos e a sua dinâmica parecem ser afetadas pela composição nos diferentes isotipos de tubulina.

Para que ocorra a polimerização dos heterodímeros, é necessário que estes se encontrem na forma GTP (Figura 2B). A  $\alpha$ -tubulina e a  $\beta$ -tubulina têm sequências e estruturas tridimensionais semelhantes e ambas possuem um local de ligação ao GTP. No entanto, apenas a  $\beta$ -tubulina possui atividade de GTPase, ou seja, capacidade de catalisar a conversão de GTP em GDP. Assim, o local de ligação ao GTP da  $\alpha$ -tubulina, que se localiza numa região interior do dímero, é denominado N-site (*nonexchangeable site*, ou seja, local em que não há troca) e o local de ligação ao GTP na  $\beta$ -tubulina, que

se localiza numa região superficial do dímero, é denominado E-site (*exchangeable site*, ou seja, local onde há troca) (Downing and Nogales, 1998). Enquanto a adição de heterodímeros ocorrer a uma velocidade superior à velocidade de hidrólise do GTP, a estabilidade do microtúbulo é mantida pela existência de um *cap* de tubulina-GTP na extremidade (+) continuando a ocorrer polimerização. No entanto, quando este *cap* deixa de existir, ocorre despolimerização do microtúbulo (Nogales, 2001). Os dímeros resultantes da despolimerização são “recicláveis” uma vez que podem voltar a polimerizar e formar um novo microtúbulo (Downing and Nogales, 1998).

Assim, os microtúbulos possuem instabilidade dinâmica, tendo a capacidade de alternar rapidamente entre ciclos de crescimento (polimerização) e de encurtamento ou despolimerização (Conde and Caceres 2009). A passagem de um estado de crescimento para um estado de despolimerização é denominado de catástrofe, e o processo inverso designa-se por recuperação (Figura 2B) (Conde and Caceres 2009).



**Figura 2 – Dinâmica de microtúbulos.** (A) Representação esquemática da nucleação de um microtúbulo a partir do complexo  $\gamma$ -TuRC. A imagem mostra a polaridade intrínseca do microtúbulo devido à associação topo a topo dos heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina a partir do complexo  $\gamma$ -TuRC. Este complexo é constituído por  $\gamma$ -tubulina, GCP2 e GCP3 que formam o  $\gamma$ -TuSC que se associa a GCP 4, GCP 5 e GCP 6 formando então assim o  $\gamma$ -TuRC. (B) Representação esquemática da dinâmica do microtúbulo, representando o *cap* de tubulina-GTP na extremidade (+) e também os eventos de catástrofe e de recuperação. Adaptado de Kollman *et al.*, 2011 (A) e de Akhmanova *et al.*, 2015 (B).

A nucleação de microtúbulos no centrossoma ocorre a partir de um complexo proteico a que se chama  $\gamma$ -TuRC ( *$\gamma$ -tubulin ring complex*) (ver Figura 2A). O  $\gamma$ -TuSC ( *$\gamma$ -tubulin small complex*) é constituído por duas moléculas de  $\gamma$ -tubulina ligadas às

proteínas GCP2 e GCP3 (GCP -  $\gamma$ -tubulin complex proteins). A associação de várias cópias de  $\gamma$ -TuSC às proteínas GCP4, GCP5 e GCP6 contribui para a formação do  $\gamma$ -TuRC. Sendo assim, o  $\gamma$ -TuSC é um complexo proteico essencial para que ocorra nucleação de microtúbulos no centróssoma (Figura 2A). As proteínas MOZART1, MOZART2 (ou GCP8) e NEDD1 (ou GCP-WD) foram também já identificadas como componentes do complexo  $\gamma$ -TuRC que medeia a nucleação de microtúbulos no centróssoma (Stearns *et al.*, 2006). As proteínas responsáveis pelo recrutamento do  $\gamma$ -TuRC para o centróssoma são dependentes da fase do ciclo celular. Enquanto que nas células em interfase as proteínas *ninein-like* recrutam este complexo para o centróssoma e estimulam a nucleação de microtúbulos, nas células em divisão a proteína CEP192 (entre outras proteínas) é necessária para o recrutamento da NEDD1, que também funciona como um fator de recrutamento do  $\gamma$ -TuRC. É ainda de referir que o seu silenciamento leva à perda de centróssomas funcionais em células em divisão mas não em células em interfase (Gomez-Ferreria *et al.*, 2012, Haren *et al.*, 2009).

Tanto o  $\gamma$ -TuRC como o  $\gamma$ -TuSC parecem formar uma espécie de anel que se liga às moléculas de  $\alpha$ -tubulina que estão expostas na extremidade (-) dos microtúbulos. O anel forma a primeira volta da hélice do microtúbulo, servindo de molde para a interação longitudinal com os heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, pelo que o microtúbulo é formado e cresce de forma longitudinal (Nogales, 2001). Desta forma, os microtúbulos crescem com uma polaridade definida a partir dos complexos de  $\gamma$ -tubulina com as extremidades (-) aí ancoradas enquanto que as extremidades (+) estendem-se pelo citoplasma (Petry and Vale, 2015).

Atualmente sabe-se que apesar de o centróssoma ser um dos principais centros organizadores de microtúbulos (MTOC - *microtubule-organizing center*) das células animais, ocorre nucleação de microtúbulos noutros locais na célula de uma forma dependente de  $\gamma$ -tubulina. Alguns dos locais já identificados são o invólucro nuclear (em alguns tipos celulares como, por exemplo, células do músculo esquelético), a cromatina, os cinetócoros, os microtúbulos pré-existentes e o complexo de Golgi. Neste último, em alguns tipos de células como, por exemplo, as RPE-1, existem proteínas que participam no ancoramento do  $\gamma$ -TuRC à matriz pericentriolar (Roubin *et al.*, 2013). Para além disso, a proteína GM130, específica do cis-Golgi, recruta outras proteínas descritas como sendo responsáveis pelo recrutamento do  $\gamma$ -TuRC (Petry and Vale, 2015 e Rivero *et al.*, 2009).

Tanto a dinâmica como a função dos microtúbulos podem ser modeladas por diversos fatores como a regulação da via de *foldin* da tubulina, a expressão diferencial

dos vários isotipos de tubulina, as modificações pós-traducionais da tubulina e interações com outras proteínas. Estas proteínas podem ser proteínas motoras ou não motoras associadas aos microtúbulos as quais são designadas por MAPs (*microtubule associated proteins*). Estas últimas podem estabilizar ou destabilizar os microtúbulos, promovendo alterações na dinâmica e na organização dos microtúbulos na célula (Nogales, 2001, Conde and Caceres, 2009).

### 1.3.1. Via de *fold*ing da tubulina

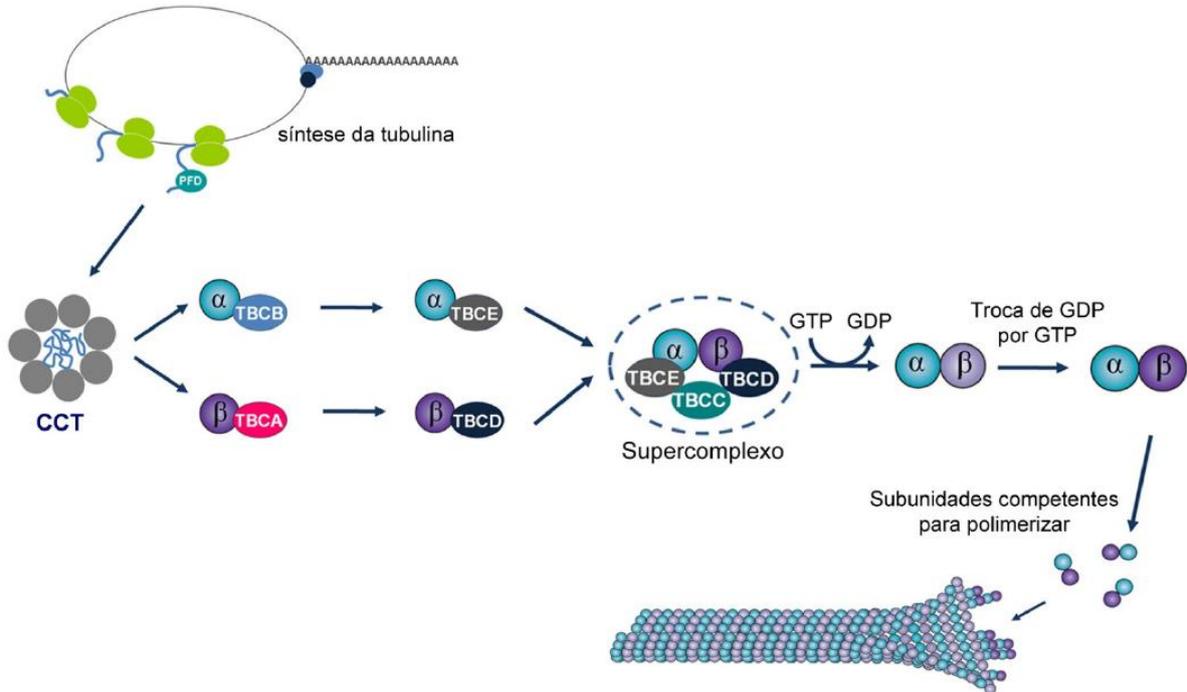
A tubulina não é capaz de adquirir uma conformação nativa de forma independente. Para que tal seja possível, a tubulina terá que interagir com um conjunto de diferentes proteínas, entre elas a prefoldina (PFD), a chaperonina CCT (*cytosolic chaperonin-containing TCP1*, também designada por TRiC) e os cofatores de ligação da tubulina (*tubulin binding cofactor A to E* ou TBCE, TBCB, TBCC, TBCD) (Gonçalves *et al.*, 2010b).

A prefoldina interage com a tubulina recém sintetizada à saída dos ribossomas e promove a sua interação com a CCT (Vainberg *et al.*, 1998).

A CCT é um complexo hetero-oligomérico constituído por dois anéis opostos empilhados, sendo cada anel constituído por oito subunidades (CCT $\alpha$ , CCT $\beta$ , CCT $\gamma$ , CCT $\delta$ , CCT $\epsilon$ , CCT $\theta$ , CCT $\eta$  e CCT $\zeta$ , que em levedura são designadas CCT1-CCT8). Estudos anteriores descrevem esta chaperonina como tendo um papel essencial no *fold*ing de um vasto número de proteínas celulares sendo a actina e as tubulinas os seus substratos principais (Llorca *et al.*, 2001).

A tubulina interage então com domínios específicos de diferentes subunidades da CCT que assiste o seu *fold*ing num processo associado à hidrólise de ATP. Após a interação da tubulina com a CCT, a  $\alpha$ -tubulina e a  $\beta$ -tubulina interagem com diferentes cofatores de ligação à tubulina, seguindo duas vias de *fold*ing diferentes. A  $\alpha$ -tubulina liga-se ao TBCB e a  $\beta$ -tubulina ao TBCE. De seguida, a  $\alpha$ -tubulina interage com o TBCD e a  $\beta$ -tubulina com o TBCC. Neste ponto, as duas vias convergem com a formação de um supercomplexo formado por  $\alpha$ -tubulina, TBCE,  $\beta$ -tubulina e TBCD ao qual se liga o TBCC, promovendo a hidrólise de GTP pela  $\beta$ -tubulina e a libertação do heterodímero  $\alpha/\beta$ -tubulina ligado a GDP (Figura 3). Apenas após a conversão do GDP em GTP é que o dímero será capaz de polimerizar formando microtúbulos. Para além do *fold*ing da

tubulina e da formação do heterodímero, esta via tem outras funções como o controlo de qualidade e a reciclagem dos heterodímeros, para que estes possam integrar novos microtúbulos ou sejam encaminhados para degradação no proteossoma (Gonçalves et al., 2010b).



**Figura 3 – Representação esquemática da via de *folding* da tubulina.** A prefoldina (PFD) interage com a tubulina recém sintetizada promovendo a sua interação com a CCT. A  $\alpha$ -tubulina e a  $\beta$ -tubulina seguem depois duas vias diferentes, interagindo com os cofatores de ligação à tubulina TBCB e TBCE ou TBCA e TBCD, respetivamente. De seguida, forma-se o supercomplexo constituído por  $\alpha$ -tubulina, TBCE,  $\beta$ -tubulina, TBCD e TBCC. Deste supercomplexo liberta-se então o heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina na forma GDP, que depois de ser convertido na forma GTP pode polimerizar e assim formar microtúbulos (Gonçalves, 2010).

### 1.3.2. Modificações pós-traducionais da tubulina

As modificações pós-traducionais da tubulina, como já foi referido, são um dos fatores relacionados com a dinâmica dos microtúbulos. Com os estudos desenvolvidos sobre a estrutura e a função dos microtúbulos e da tubulina, foi já possível identificar várias modificações pós-traducionais que a tubulina pode sofrer como: (i) destirosinação/tirosinação, (ii) acetilação, (iii) glutamilação, (iv) glicilação, (v) fosforilação, (vi) palmitoilação e (vii)  $\Delta 2$ . No Quadro 1 encontram-se as descrições de cada modificação pós-traducional mencionada de forma resumida, assim como os enzimas já identificados como estando envolvidos em cada modificação.

**Quadro 1 – Modificações pós-traducionais da tubulina e enzimas envolvidos.**

<b>Modificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Enzimas envolvidos</b>	<b>Referências</b>
<b>Tirosinação/ destirosinação</b>	Remoção da tirosina da região C-terminal da $\alpha$ -tubulina	TTCP ( <i>tubulin tyrosine carboxypeptidase</i> ), TTL ( <i>tubulin tyrosine ligase</i> )	Idriss, 2001, Ersfeld <i>et al.</i> , 1993
<b>Acetilação</b>	Adição de um grupo acetilo nos resíduos de lisina, geralmente, na K40 da $\alpha$ -tubulina	$\alpha$ -TAT1 (acetiltransferase), HDAC6 ( <i>histone deacetylase 6</i> ), Sirt2 ( <i>NAD-dependent deacetylase sirtuin-2</i> )	Akella <i>et al.</i> , 2010, Hubbert <i>et al.</i> , 2002, North <i>et al.</i> , 2003
<b>Glutamilação</b>	Adição de um ou vários glutamatos como cadeia lateral na região C-terminal	TTLs ( <i>TTL-like proteins</i> )	Wloga <i>et al.</i> , 2008
<b>Glicilação</b>	Adição de uma ou várias glicinas como cadeia lateral na região C-terminal	TTLs ( <i>TTL-like proteins</i> )	Rogowski <i>et al.</i> , 2009, Wloga <i>et al.</i> , 2009
<b>Fosforilação</b>	Adição de um grupo fosfato	Cdk1/ciclina B	Fourest-Lieuvain <i>et al.</i> , 2006
<b>Palmitoilação</b>	Adição de um ácido gordo palmitato no resíduo 376 da $\alpha$ -tubulina	Desconhecido	Ozols and Caron 1997
<b><math>\Delta 2</math></b>	Remoção do penúltimo glutamato da região C-terminal da $\alpha$ -tubulina	CCP ( <i>carboxypeptidase</i> )	Rogowski <i>et al.</i> , 2010

As modificações pós-traducionais parecem estar associadas com as funções específicas de populações de microtúbulos e com alterações na sua dinâmica. A destirosinação/tirosinação, a acetilação e a glutamilação são as modificações pós-traducionais melhor estudadas até ao momento.

A destirosinação/tirosinação parece estar associada ao recrutamento diferencial de proteínas motoras, MAPs e +TIPs (*plus-end tracking proteins*). Por exemplo, observou-se que para que possa haver uma mobilidade robusta da cinesina-2 é necessário que a  $\alpha$ -tubulina se encontre destirosinada (Sirajuddin *et al.*, 2014). Os microtúbulos tirosinados parecem também ter um papel no recrutamento de +TIPs que contêm domínios CAP-Gly (Hammond *et al.*, 2008). Para além disso, vários estudos relacionam baixos níveis de tubulina tirosinada e de TTL com maior capacidade de invasão tumoral (Lafanechère *et al.*, 1998, Prognosis *et al.*, 2001).

A acetilação do resíduo de lisina na posição 40 da  $\alpha$ -tubulina, que se encontra num *loop* altamente flexível projetado para o lúmen do microtúbulo, é a única modificação pós-traducional conhecida que ocorre no lúmen do microtúbulo (Soppina *et al.*, 2012). Esta modificação acumula-se em microtúbulos de cílios, corpos basais e numa subpopulação de microtúbulos citoplasmática descrita como mais estável e com maior tempo de semi-vida (Bulinski *et al.*, 1988, Yu *et al.*, 2015). Apesar de os microtúbulos mais estáveis e com maior resistência a agentes despolimerizantes, como o nocadazole, serem geralmente enriquecidos nesta modificação pós-traducional, não parece que a modificação por si tenha um efeito na estabilidade dos microtúbulos mas sim que afete a interação com outras proteínas. No entanto, a relação entre a dinâmica dos microtúbulos e os seus níveis de acetilação não é ainda clara. Estudos funcionais propõem que a acetilação da lisina 40 pode afetar o transporte intracelular de forma indireta, por exemplo, através da regulação do tráfego das proteínas motoras como algumas cinesinas (Reed *et al.*, 2006, Dompierre *et al.*, 2007). Observou-se também que a associação e o “deslizamento” do retículo endoplasmático (*ER sliding*) ocorrem primeiramente nos microtúbulos acetilados, podendo estes processos ser mediados por proteínas motoras (Friedman *et al.*, 2010 e Wozniak *et al.*, 2009). Assim como o retículo endoplasmático, também os mitocôndrios parecem deslocar-se no citoplasma preferencialmente associados a microtúbulos acetilados (Friedman *et al.*, 2011). Para além disso, esta subpopulação de microtúbulos parece ser necessária para a manutenção da organização do complexo de Golgi (Thyberg and Moskalewski, 1993, Ryan *et al.*, 2012). Os microtúbulos acetilados são também necessários para que ocorra a fusão dos autofagossomas com os lisossomas para a formação dos autolisossomas (Xie *et al.*, 2010). Alguns estudos fazem ainda uma associação entre níveis anormais de acetilação e algumas patologias como o cancro e doenças neurológicas (revisto em Li and Yang, 2015).

Recentemente, foi também descrito um local onde pode ocorrer acetilação da  $\beta$ -tubulina, na lisina 252 (Lys-252), nos heterodímeros livres. Esta modificação é

catalisada pelo acetiltransferase San e pode estar relacionada com a regulação da eficiência de polimerização de microtúbulos uma vez que quando ocorre, impede a polimerização dos heterodímeros, possivelmente por ocorrer num local com grande proximidade à zona de interface entre os heterodímeros polimerizados (Chu *et al.*, 2011).

A glutamilação dos microtúbulos, como já foi referido, é uma modificação pós-traducional em que ocorre a adição de um ou vários glutamatos na extremidade C-terminal da tubulina. Esta modificação é catalisada por TTLLs (*TTL-like proteins*) (Wloga *et al.*, 2008), que são proteínas semelhantes às TTL envolvidas na tirosinação. Os microtúbulos dos axonemas, centríolos, fuso mitótico, cílios e flagelos são geralmente enriquecidos nesta modificação (Yu *et al.*, 2015). Foi já observado que a poli-glutamilação da  $\beta$ -tubulina nos neurónios aumenta a mobilidade da cinesina-1 (Sirajuddin *et al.*, 2014).

As modificações pós-traducionais e a expressão diferencial dos diferentes isotipos de tubulina conseguem regular tanto a progressão e a velocidade das proteínas motoras como a taxa de despolimerização dos microtúbulos (Sirajuddin *et al.*, 2014). Assim, a dinâmica dos microtúbulos, as estruturas formadas por microtúbulos e, conseqüentemente, as suas funções, dependem não só da instabilidade dinâmica intrínseca dos microtúbulos, mas também das interações com diferentes proteínas.

#### **1.4. Centrossoma**

Como referido anteriormente, o centrossoma é um dos principais centros organizadores de microtúbulos nas células animais. Este organelo contribui para a definição dos polos e montagem do fuso mitótico, tendo um papel essencial na divisão celular, e é também necessário para a formação de cílios primários. Para além disso, tem também um papel na definição da polaridade celular (Elric and Etienne-Manneville, 2014). Nas células em interfase localiza-se geralmente no centro da célula, em estreita associação com o núcleo. Apesar dos mecanismos moleculares subjacentes a esta associação ainda não serem totalmente conhecidos, foram já identificadas algumas proteínas que participam no estabelecimento desta ligação centrossoma-núcleo, como a emerina ou as proteínas com domínios SUN e KASH (Salpingidou *et al.*, 2007, Razafsky and Hodzic, 2009).

Com o desenvolvimento dos estudos e do conhecimento sobre a estrutura e função do centrossoma, tem-se tornado cada vez mais claro que a sua função vai muito

para além do seu papel como organizador de microtúbulos. Assim, é atualmente admitido que o centrossoma funciona como uma plataforma de interação de proteínas onde estas se concentram o que facilita a redução do ruído (*background*) na transmissão de sinais e também as interações entre proteínas, tendo um papel em diversos processos como polaridade celular, regulação do ciclo celular, migração, mitose e ciliogénese (Elric and Etienne-Manneville, 2014).

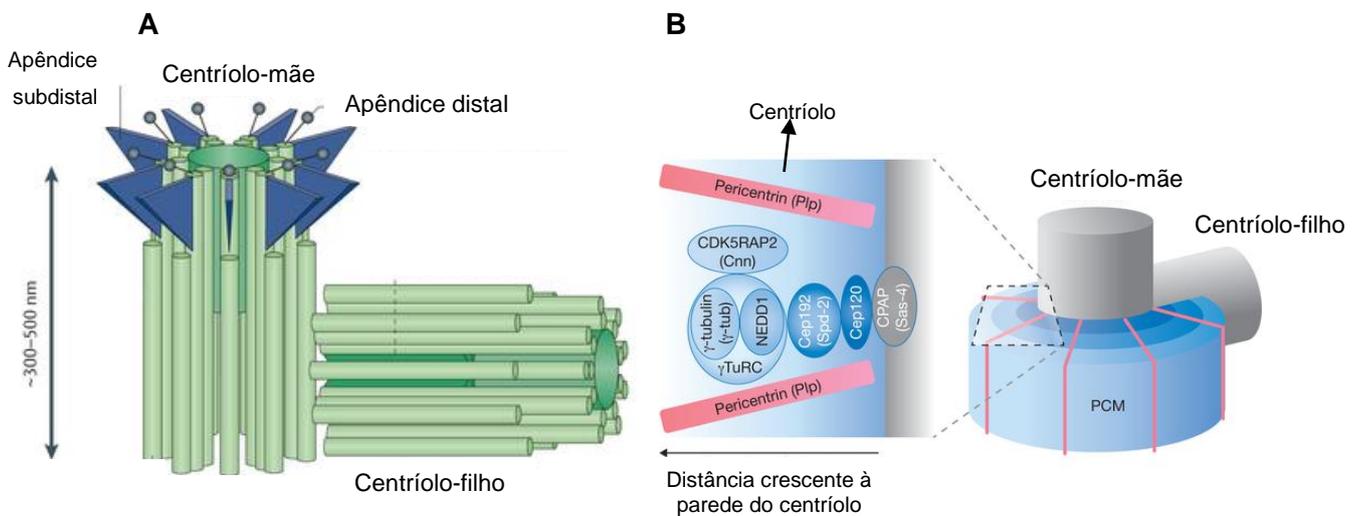
#### 1.4.1. Estrutura do centrossoma

O centrossoma é constituído por dois centríolos, um centríolo mais velho designado por centríolo-mãe e um centríolo mais novo a que se chama centríolo-filho. Os dois centríolos estão orientados de forma ortogonal entre si, são rodeados por uma matriz pericentriolar (PCM – *pericentriolar matrix*) e estão unidos por fibras conectoras que ligam as suas extremidades proximais. Existem diferenças tanto a nível estrutural como a nível funcional entre os dois centríolos como, por exemplo, o facto de algumas proteínas se ligarem diretamente ao centríolo-mãe e formarem estruturas designadas apêndices distais ou subdistais, dependendo do local de ligação (Tollenaere *et al.* 2014), e o centríolo-filho não possuir estas estruturas. Foi também já observado que o centríolo-mãe tem maior capacidade de ancoramento de microtúbulos que o centríolo-filho (Bornens, 2002). Para além disso, existem evidências de que no final da mitose é necessário que o centríolo-mãe migre até ao corpo médio para que ocorra citocinese (Piel *et al.*, 2001).

A assimetria estrutural e funcional dos dois centríolos constituintes de um centrossoma pode favorecer a divisão assimétrica de células estaminais, por exemplo, da linha germinal. Este processo parece ocorrer através da diferente capacidade de nucleação de microtúbulos e da migração diferencial de cada um dos centríolos. O centríolo-mãe fica ancorado na região mais próxima do nicho de GSC (*Germ Stem Cells*) enquanto que o centríolo-filho migra para a região mais afastada. A célula que herda o centríolo-mãe será uma célula estaminal, como a que lhe deu origem, e a célula que herda o centríolo-filho diferenciar-se-á permitindo assim a diferenciação de apenas uma das células formadas na divisão de uma célula estaminal (Yamashita *et al.*, 2007 e Yamashita and Fuller 2008).

Cada centríolo corresponde a uma estrutura cilíndrica, em forma de barril, geralmente, constituída por nove tripletos de microtúbulos, dois completos e um incompleto, com polaridade próximo-distal devido à polaridade dos microtúbulos (Figura

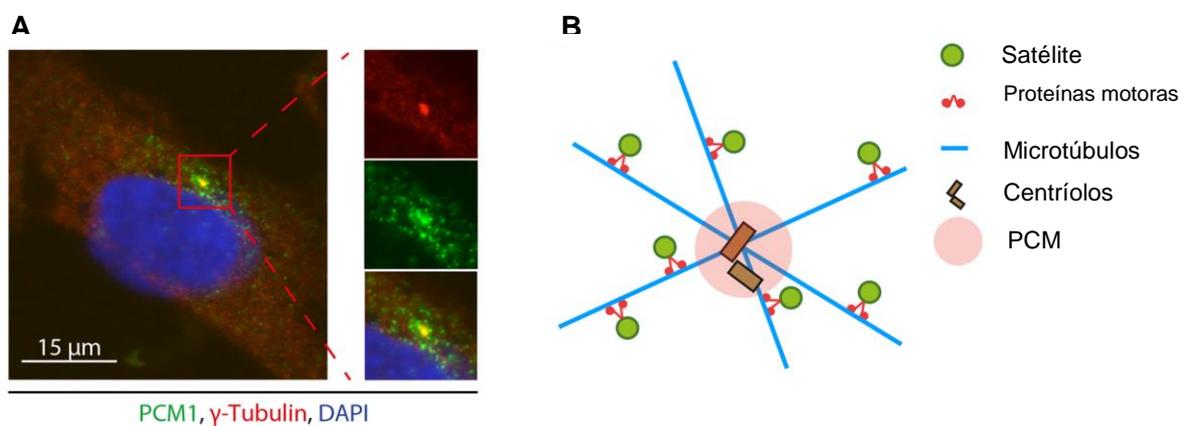
4A) (Fu *et al.*, 2015). No caso dos centríolos de células humanas, a extremidade distal é composta por nove dupletos de microtúbulos (uma vez que cada tripleto possui um microtúbulo incompleto) e apêndices distais e subdistais. Os apêndices têm um papel importante na interação dos centríolos com a membrana para a formação de cílios e no ancoramento de microtúbulos, respectivamente (Bettencourt-Dias *et al.*, 2011, Jana *et al.*, 2014). Os microtúbulos que constituem os centríolos são muito estáveis sendo extremamente resistentes a agentes despolimerizantes de microtúbulos. Esta observação pode ser justificada pelas modificações pós-traducionais identificadas nestes microtúbulos como a acetilação e a poli-glutamilação (Bobinnec *et al.*, 1998).



**Figura 4 – Estrutura do centrossoma e organização da matriz pericentriolar.** Representação esquemática da estrutura dos centríolos (A) e da disposição de várias proteínas constituintes da matriz pericentriolar em anéis concêntricos em torno do centríolo-mãe (B). (A) Adaptado de Conduit *et al.*, 2015 e (B) adaptado de Lüders 2012.

A PCM, que rodeia os centríolos, consiste numa região de elevada concentração de proteínas envolvidas nos processos em que o centrossoma está associado como, por exemplo, proteínas de regulação do ciclo celular e moléculas de sinalização (Arquint *et al.*, 2014). Durante muito tempo pensou-se que a PCM era uma região amorfa, onde existia uma elevada concentração de proteínas. No entanto, atualmente sabe-se que é uma região organizada, na qual diversas proteínas se dispõem em anéis concêntricos em torno do centríolo mãe, como as proteínas CEP192 e CEP120 (Figura 4B). Para além de possuir complexos  $\gamma$ -TuRC, existe também nesta região uma acumulação de várias proteínas com o mesmo tipo de estrutura tridimensional, proteínas *coiled-coil*, que têm funções na nucleação, ancoramento e posicionamento de microtúbulos como, por exemplo, a pericentrina, a nineína e a Cep135 (Salisbury, 2003).

Os satélites centriolares são grânulos esféricos que se acumulam à volta do centrossoma (Figura 5) onde se reúnem diversas proteínas com funções no centrossoma, nos centríolos e/ou no corpo basal. São estruturas dinâmicas e a sua composição proteica é alterada ao longo do ciclo celular e em condições de stresse (Wang *et al.*, 2012). Apesar de a sua função ainda não ser totalmente conhecida, é atualmente aceite que os satélites centriolares são complexos proteicos ancorados a microtúbulos, que são transportados na direção do centrossoma através destes, e contribuem para o transporte de proteínas para a matriz pericentriolar (Tollenaere *et al.*, 2014). Estas estruturas parecem também ter um papel na formação e desmontagem de cílios (Wang *et al.*, 2012).



**Figura 5 – Satélites centriolares.** (A) Satélites centriolares em células U2OS tratadas para análise por microscopia de imunofluorescência com o anticorpo anti-PCM1 a verde, marcando os satélites centriolares, e a vermelho a marcação do centrossoma com anti- $\gamma$ -tubulina. O DNA foi corado com DAPI. (B) Representação esquemática de satélites centriolares em células em interfase. Adaptado de Tollenaere *et al.*, 2014.

Para além da participação na organização do citoesqueleto dos microtúbulos e do fuso mitótico, os centrossomas têm ainda um papel fundamental na montagem dos cílios primários que são estruturas sensoras importantes para variadas funções celulares. Os cílios são projeções da membrana celular com uma estrutura baseada em microtúbulos tendo na sua base o corpo basal. O corpo basal forma-se pela conversão do centríolo mãe que no momento do ancoramento à membrana sofre uma alteração na sua estrutura na extremidade distal, formando-se a zona de transição que servirá de base para o axonema e onde ocorre o controlo do material que é transportado para o cílio. O cílio pode assim ser dividido em duas regiões: a zona de transição, responsável pela ligação do corpo basal ao cílio, e o axonema (Jana *et al.*, 2014). Os cílios possuem diversos recetores na membrana funcionando como sensores de diversos tipos de sinalização extracelular como, por exemplo, hormonas e fatores de crescimento. Estas

estruturas estão também associadas a vários processos celulares como a proliferação e a diferenciação em diversos tipos celulares (Yuan *et al.*, 2015). Defeitos nos cílios estão associados a várias patologias humanas coletivamente designadas por ciliopatias como, por exemplo, a doença renal policística (Bettencourt-Dias *et al.*, 2011).

## 1.5. TBCCD1

A proteína humana TBCCD1 (de *TBCC-domain containing 1*) é uma proteína constituída por 557 resíduos de aminoácidos e com uma localização centrossomal (Gonçalves, 2010). Esta proteína possui dois domínios funcionais: o domínio TBCC e o domínio CARP. Para além da TBCCD1, existem mais duas proteínas identificadas que possuem estes domínios, nomeadamente, o cofator de ligação à tubulina TBCC e a proteína RP2 (Figura 6).

Como já foi referido, o TBCC é um cofator de ligação à tubulina, participando na sua via de *folding*, mais especificamente, na formação do supercomplexo que leva à formação do heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina. Esta proteína possui atividade GAP (*GTPase-activating protein*) para a  $\beta$ -tubulina, devido ao domínio TBCC, essencial para o desempenho da sua função nesta via sendo necessária quando o dímero de tubulina se liberta do supercomplexo aquando da ligação do cofator C da tubulina (TBCC). Este domínio possui um resíduo de arginina conservado que parece ser necessário para a atividade de GAP (Bartolini *et al.*, 2002). A proteína TBCCD1 não possui este resíduo de arginina, pelo que não deve apresentar atividade de GAP, o que pode justificar as observações de esta proteína não ser capaz de reverter o fenótipo de deleção do gene *cin2* (homólogo do *tbcc*) em *S. cerevisiae* (Gonçalves *et al.*, 2010).

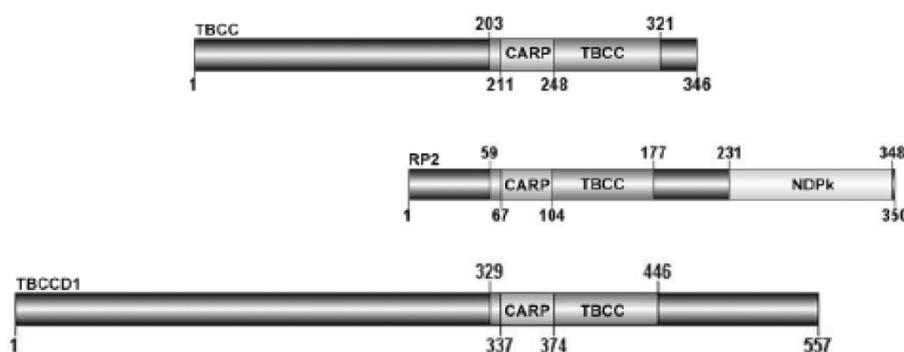
A sobreexpressão da TBCC, leva a um aumento da tubulina não polimerizada, uma diminuição de dímeros-GTP e, conseqüentemente, de microtúbulos. Observa-se também que o ciclo celular é afetado, havendo um aumento da percentagem de células em G2-M e um atraso na entrada em mitose (Hage-Sleiman *et al.*, 2010). Para além disso, a depleção de TBCC leva à formação de fusos mitóticos com múltiplos pólos (Garcia-Mayoral *et al.*, 2011).

A proteína RP2 (*retinitis pigmentosa protein 2*) localiza-se nos corpos basais de cílios de células RPE (células epiteliais da retina) e o seu *knockdown* induzido por siRNAs provoca a fragmentação do complexo de Golgi e a dispersão de componentes dos cílios como o IFT20. Esta proteína também se associa à membrana quando ocorre miristoilação e palmitoilação na sua região N-terminal (Evans *et al.*, 2010 e Schwarz *et*

al., 2012). Apesar de ainda não se conhecer totalmente a sua função, sabe-se que a doença retinitis pigmentosa associada ao cromossoma X está relacionada com mutações nesta proteína, provocando alterações a nível da visão por anomalias nas células fotorreceptoras da retina. Esta proteína possui atividade GAP para o Arl3, funcionando como seu regulador, devido ao domínio TBCC.

A RP2 é uma proteína que, como já foi referido, possui tanto um domínio TBCC como um domínio CARP. No entanto, ao contrário do que acontece com as proteínas TBCC e TBCCD1 que possuem estes domínios na região C-terminal, a RP2 possui estes domínios na região N-terminal. Para além dos domínios TBCC e CARP, possui também um domínio NDPk (*Nucleoside diphosphate kinase*). Este domínio está associado à catálise da troca de grupos fosfato de nucleósidos, apesar de a RP2 não possuir esta atividade. No entanto, a RP2 liga-se ao DNA quando as células são expostas a radiação UV e tem atividade de exonuclease, pelo que pode ter uma função de reparação de DNA (Yoon *et al.*, 2006).

O domínio CARP está associado às proteínas CAP (*cyclase-associated-proteins*) que se ligam a monómeros de actina. Estudos sugerem que as CAPs têm um papel em vias de sinalização e na polimerização do citoesqueleto de actina (Normoyle and Briehner, 2012).

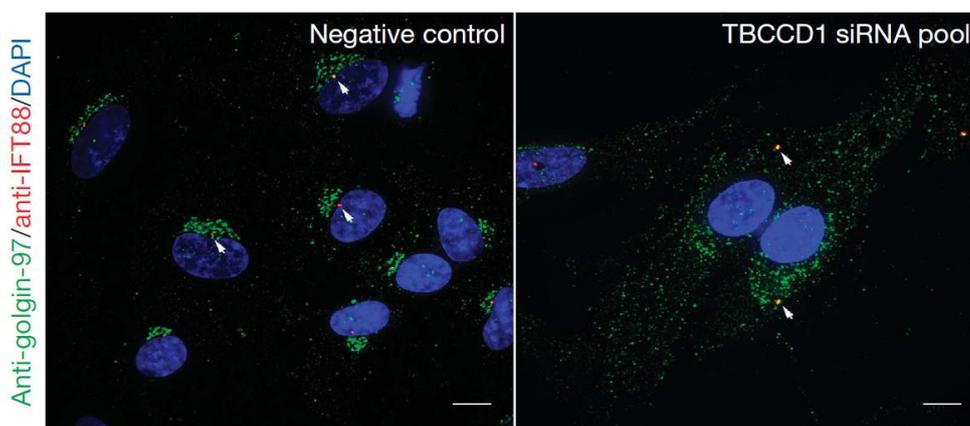


**Figura 6 – Representação esquemática da localização dos domínios funcionais das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1.** (Adaptado de Gonçalves 2010)

Apesar de o conhecimento relativo à proteína TBCCD1 ser ainda bastante reduzido, apenas foi estudada em *Trypanosoma brucei* (André *et al.*, 2013), em *Chlamydomonas reinhardtii* (Feldman and Marshall, 2009) e em linhas celulares humanas (Gonçalves *et al.*, 2010).

Nos estudos realizados em linhas celulares humanas, neste caso células epiteliais da retina imortalizadas (hTERT RPE-1), observou-se que a proteína se localiza no centrossoma, nos corpos basais dos cílios, na zona média do fuso mitótico e no corpo médio. Observou-se também que o *knockdown* do TBCCD1 provoca várias alterações nas células. Os fenótipos descritos são o aumento da distância núcleo-centrossoma (Figura 7), a fragmentação do complexo de Golgi (Figura 7), o aumento do tamanho das células, diminuição da eficiência de formação de cílios, diminuição da velocidade de migração em ensaios de fecho da ferida e um atraso no ciclo celular (Gonçalves *et al.*, 2010).

Para além da identificação dos domínios TBCC e CARP, através da análise da sequência da proteína, foi também já possível identificar, experimentalmente, qual o domínio necessário para a localização centrossomal. Para isso, realizaram-se ensaios de sobreexpressão de regiões da proteína, tendo-se concluído que os primeiros 20 resíduos de aminoácidos são responsáveis pela localização centrossomal da proteína TBCCD1. A sobreexpressão da proteína deletada nos primeiros 20 resíduos de aminoácidos em células humanas, mostra que esta não se localiza no centrossoma. Em contrapartida, em células humanas a sobreexpressar os primeiros 20 resíduos de aminoácidos em fusão com a GFP (*green fluorescent protein*) observa-se que a GFP tem uma localização centrossomal (Pereira, 2011).

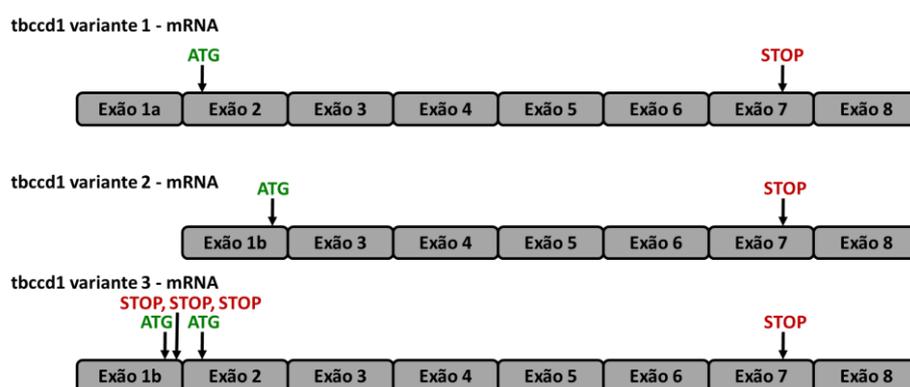


**Figura 7 – Efeito do *knockdown* do *tbccd1* na distância centrossoma-núcleo e na organização do complexo de Golgi em células hTERT RPE-1.** Células hTERT RPE-1 transfetadas com siRNA controlo (à esquerda) ou com siRNAs para o *tbccd1* (à direita) foram processadas para análise por imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-golgina97, que marca o complexo de Golgi, e anti-IFT88 para marcar o centrossoma. O DNA foi corado com DAPI. As barras de escala correspondem a 10 µm. Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2010.

### 1.5.1. Variantes do *tbccd1* resultantes de *splicing* alternativo

O *splicing* alternativo é um processo a partir do qual o mesmo gene pode originar diferentes moléculas de mRNA. Para que tal seja possível, após a transcrição em pré-mRNA, exões alternativos são mantidos ou removidos para a formação do mRNA maduro pelo spliceossoma, ou seja, a partir de moléculas de pré-mRNA iguais, podem-se formar diferentes moléculas de mRNA maduro por diferentes combinações de exões (Arcondéguy *et al.*, 2013). Desta forma, o *splicing* alternativo é um processo que para além de contribuir para a ocorrência de um novo nível regulatório da expressão genética dos eucariotas, permite que a partir de um único gene se formem diferentes mRNAs promovendo, conseqüentemente, a diversidade proteica.

O gene humano que codifica a proteína TBCCD1 localiza-se no cromossoma 3 e possui 8 exões. Estudos desenvolvidos no nosso grupo de investigação demonstraram que, para além do transcrito que codifica a proteína centrossomal TBCCD1 inicialmente descrita (Golçalves *et al.*, 2010), existem dois transcritos alternativos do gene *tbccd1* resultantes de *splicing* alternativo. Assim, estão neste momento identificados três transcritos alternativos: o transcrito que codifica a proteína inicialmente descrita por Gonçalves *et al.* 2010 e por isso aqui designada canónica ou transcrito 1 (variante 1), o transcrito 2 (variante 2) e o transcrito 3 (variante 3) (Figura 8).



**Figura 8 – Representação esquemática dos exões que constituem o mRNA de cada variante de *splicing* do gene *tbccd1*.**

O transcrito 2 codifica uma proteína que neste trabalho será designada por TBCCD1 variante 2 e é mais pequena que a proteína TBCCD1 variante 1. Pela análise da sequência dos transcritos, observa-se que estes diferem na extremidade 5', uma vez que enquanto o transcrito 1 possui os exões 1a e 2, e o transcrito 2 possui apenas o

exão 1b antes do exão 3. Assim, ambas as proteínas devem possuir os domínios TBCC e CARP diferindo apenas na região N-terminal.

A informação relativa ao transcrito 3 é ainda mais reduzida, sabendo-se apenas pela análise da sequência que é semelhante ao transcrito 1 mas na extremidade 5' possui uma pequena grelha de leitura aberta (uORF) que está separada do ATG designado canônico por três codões *stop* (Figura 8).

Resumindo, estão atualmente identificados três transcritos do gene *tbccd1* que resultam de *splicing* alternativo, sendo que um desses transcritos (variante 1) é traduzido e codifica uma proteína com localização centrossomal e que corresponde à proteína caracterizada por Gonçalves *et al.*, 2010. Pela análise da sequência dos transcritos, as três proteínas variantes da TBCCD1 parecem possuir um domínio TBCC e um domínio CARP, diferindo apenas na região N-terminal. Para além disso, o transcrito da variante 3 possui uma uORF cuja função é ainda desconhecida.

## 2. Objetivos

A proteína TBCCD1 inicialmente caracterizada em Gonçalves *et al.*, 2010, tem uma localização centrossomal. No entanto, com a identificação de novos transcritos alternativos, percebeu-se que os fenótipos observados nos estudos com siRNAs resultam do *knockdown* das três variantes identificadas e não apenas da que codifica para a proteína TBCCD1 inicialmente caracterizada. Desta forma, os fenótipos observados podem ser provocados apenas por uma das variantes ou por uma combinação das mesmas. Assim, tornou-se essencial estudar tanto a localização como as funções de cada variante de forma individual.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da função biológica de cada uma das variantes de *splicing* alternativo do *tbccd1* identificadas em células de mamífero. Para tal, definiram-se como objetivos específicos:

1 - Estudar a localização celular das proteínas codificadas pelos três transcritos do gene *tbccd1* resultantes de *splicing* alternativo, através da sobreexpressão de cada uma das variantes, em fusão com um gene repórter, em linhas celulares de mamífero;

2 - Estudar o impacto da sobreexpressão das referidas proteínas variantes no citoesqueleto de microtúbulos e na sua dinâmica através do estudo das modificações pós-traducionais da tubulina;

3 – Analisar se o fenótipo do aumento da distância núcleo-centrossoma observado quando se realiza o *knockdown* do *tbccd1* é provocado pela depleção de uma TBCCD1 variante específica ou não;

4 – Estudar a existência de interações estruturais e/ou funcionais entre as variantes TBCCD1 identificadas ou mesmo em relação a si próprias.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Reagentes**

O metanol, o etanol, o Tween 20, o EDTA, a glicina e o cloreto de sódio (NaCl) provêm da Merck. O dimetilsulfóxido (DMSO), o Tris-base, a solução de azul de tripano 0,4 %, a poli-L-lisina, o 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), a acrilamida, a bisacrilamida e o persulfato de amônio foram adquiridos na Sigma. O TEMED utilizado provém da Nzytech. A albumina do soro bovina (BSA) utilizada para imunofluorescência e o HEPES advêm da Calbiochem. O leite em pó utilizado em *western blot* é da Molico. O meio de montagem Vectashield provém da Vector. O Bacto agár foi adquirido à Difco. A agarose e o glicerol provêm da VWR, o NaOH da J. T. Baken, o SDS da Calbiochem e o Tris da Fisher Scientific.

#### **3.2. Equipamento**

Para a cultura de bactérias foram utilizadas a incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen para o crescimento de culturas em meio líquido e a estufa Sanyo CO<sub>2</sub> incubator MCO-17AI para o crescimento de culturas em meio sólido. O seu manuseamento foi realizado à chama.

As linhas celulares de mamífero foram manuseadas na câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206 e mantidas na estufa Snijders CO190TC-20. Para a visualização das células o microscópio invertido de contraste de fase utilizado foi um Olympus CK40. Já os microscópios de fluorescência utilizados foram o Leica DMRA2 e o Olympus BX41.

Neste trabalho utilizaram-se também as centrífugas: Centrifuge 5415 D da Eppendorf e a Sigma 4K10.

Os termocicladores utilizados foram: Mastercycler Personal (Eppendorf) e Peltier Thermal Cycler – 100 (MJ Research). Para além destes, para a técnica de RT-qPCR utilizou-se o aparelho o iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System da Bio-Rad.

Nas técnicas de eletroforese utilizaram-se fontes Bio Rad PAC300. Para a quantificação dos extratos proteicos utilizou-se o leitor de placas Tecan Sunrise OEM Remote. No caso da quantificação de DNA e de RNA foi utilizado o Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer, software ND-1000 V3.1.2, Nanodrop Technologies).

A aquisição de imagens de géis de DNA foi realizada no transiluminador (UV) Kodak EDAS 290.

### **3.3. Estirpes de bactérias usadas, condições de cultura e de transformação e seleção de clones recombinantes**

#### **3.3.1. Estirpes de bactérias usadas e condições de cultura**

Para a preparação de células competentes utilizou-se a estirpe de *E. coli* JM109 (genótipo: endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+  $\Delta$ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ $\Delta$ M15] hsdR17(rK-mK+)) adquiridas à Invitrogen. Todas as bactérias foram crescidas em meio LB (Nzytech, Portugal) e, quando necessário, foi utilizado o meio seletivo LB suplementado com ampicilina 100  $\mu$ g/mL (Nzytech, Portugal).

As culturas líquidas de bactérias foram crescidas numa estufa com agitação orbital constante (250 rpm) e temperatura controlada, a 37°C. As bactérias plaqueadas em meio sólido foram crescidas numa estufa a 37°C, sem agitação.

#### **3.3.2. Preparação de células de *E. coli* competentes**

Para a preparação de células de *E. coli* competentes foi inoculada uma pré-cultura em meio LB e deixada a crescer durante a noite a 37°C com agitação contínua. Na manhã seguinte, preparou-se uma cultura com 0,075 OD (absorvância a 600 nm), a partir da pré-cultura, e esta foi mantida a 37°C com agitação constante até atingir o início da fase exponencial (0,300 OD a 600 nm). As células foram então recolhidas por centrifugação a 7000 rpm durante 2 minutos a 4°C. A partir deste ponto todos os procedimentos foram realizados a 4°C.

De seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento de células em metade do volume inicial da cultura em solução de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M e centrifugou-se a suspensão a 7000 rpm durante 2 minutos a 4°C. O sobrenadante voltou a ser

desprezado e ressuspendeu-se o sedimento em metade do volume inicial da cultura de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. A suspensão repousou no gelo durante 20 minutos e realizou-se uma nova centrifugação a 7000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento de células em 1/15 do volume inicial da cultura em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M com 15 % (v/v) de glicerol.

A suspensão de células competentes foi rapidamente dividida em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  cada e guardada a -80°C.

Neste protocolo utilizou-se a centrífuga Sigma 4K10 e o rotor 12254.

### **3.3.3. Transformação de células competentes**

Para a transformação de células competentes o DNA plasmídico (aproximadamente 100 ng) foi adicionado à suspensão de células competentes (100  $\mu\text{L}$ ) e estas foram incubadas em gelo entre 15 a 20 minutos. De seguida, procedeu-se ao choque térmico, colocando as células a 42°C durante 90 segundos seguidos de 2 minutos no gelo. Depois do choque térmico, adicionaram-se às células 600  $\mu\text{L}$  de meio LB e estas foram incubadas a 37°C com agitação constante durante 1 hora. Após esta incubação, as células foram centrifugadas durante 1 minuto a 7000 rpm à temperatura ambiente na centrífuga Centrifuge 5415 D da Eppendorf, o sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se o sedimento de células em aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de meio LB. As células foram então plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido com ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de forma a seleccionar as bactérias transformadas com o vetor de interesse. As placas foram deixadas numa estufa a 37°C durante a noite (aproximadamente 12 horas).

### **3.3.4. Protocolo de *Cracking***

Este método foi utilizado para analisar se os clones obtidos após a transformação são verdadeiros positivos. Para isso, seleccionaram-se algumas colónias das bactérias transformadas e estas foram picadas de forma a colocar um pouco de cada colónia no respetivo tubo para serem lisadas. Adicionou-se a cada tubo 20  $\mu\text{L}$  de tampão com a seguinte composição: 50 mM de NaOH, 0,5 % de SDS e 5 mM de EDTA. De seguida, os tubos foram colocados no termociclador a 55°C durante 30 minutos. Após este

período de tempo, as amostras foram levadas ao vórtex, à velocidade máxima, durante um minuto. Por fim, adicionou-se o volume adequado de tampão de amostra e estas foram analisadas num gel de agarose 1 % (m/v), tendo-se utilizado como controlo de referência de massa molecular o plasmídeo vazio.

### 3.3.5. Preparação de DNA plasmídico em grande escala

Para a preparação de DNA plasmídico em grande escala foram inoculadas culturas das bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse em meio seletivo (100 mL), LB com ampicilina, a partir de pré-culturas também em meio seletivo. As culturas cresceram durante 12 a 16 horas a 37°C com agitação contínua. Após este período, o DNA plasmídico foi extraído utilizando o *kit* NZYMidiprep (Nzytech, Portugal) seguindo as instruções do fabricante. Todas as soluções tampão utilizadas são fornecidas com o *kit*.

Começou por se centrifugar a suspensão de células (100 mL) a 6000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ressuspenderam-se as células em 8 mL de tampão M1 e agitou-se vigorosamente recorrendo ao vórtex. De seguida, adicionaram-se 8 mL de tampão M2 e inverteu-se o tubo 5 vezes para homogeneizar. Adicionaram-se 8 mL de tampão M3 e homogeneizou-se a mistura invertendo o tubo 10-15 vezes. A mistura foi então centrifugada a 10000 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado na coluna NZYTech Plasmid Midi, previamente equilibrada com 12 mL de tampão MEQ, e a eluição ocorreu por efeito da gravidade. Lavou-se a coluna duas vezes com 5 mL e 8 mL de tampão MEQ. Eluiu-se o DNA da coluna com 5 mL de tampão ME para um tubo lavado. Para a precipitação do DNA adicionaram-se 3,5 mL de isopropanol 100 %, deixou-se a mistura repousar durante 2 minutos e centrifugou-se a 15 000 x g durante 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 2 mL de etanol 70 % e centrifugou-se a 15 000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e deixou-se o sedimento secar à temperatura ambiente. Quando o sedimento secou, ressuspendeu-se o DNA em água bidestilada.

Todos os DNAs utilizados na transfeção de células de mamífero foram produzidos segundo este método.

### **3.3.6. Hidrólise de DNA**

As reações de hidrólise com enzimas de restrição foram utilizadas para confirmar que os plasmídeos tinham, de facto, inserido o fragmento de interesse. Para isso, para cada plasmídeo preparou-se uma mistura com um volume final de 30 µL, constituída por 0,05 U de BamHI (New England Biolabs, EUA), 0,05 U de NotI (New England Biolabs, EUA), tampão de reação 3.1 (New England Biolabs, EUA) e 1 µg de DNA plasmídico. Utilizaram-se estas enzimas de restrição uma vez que estas enzimas foram utilizados na clonagem de todos os fragmentos.

### **3.3.7. Eletroforese de DNA**

Para a análise de DNA através de eletroforese foram preparados géis de agarose de 1 % (m/v) em TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM, pH 8,3) contendo 1 µL de GreenSafe Premium (Nzytech, Portugal) por cada 100 mL de solução. A migração realizou-se em TAE 1X e a voltagem utilizada foi 80 ou 100 V. O tampão de amostra utilizado foi o Orange G (Sigma, EUA). Sempre que necessário utilizou-se o marcador de massa molecular NZYLadder III (Nzytech, Portugal). Os géis foram visualizados utilizando um transiluminador (UV) Kodak EDAS 290.

### **3.3.8. Sequenciação de DNA baseada no uso de dideoxinucleótidos (método de Sanger)**

Esta técnica foi utilizada para confirmar que os clones eram verdadeiros positivos e que não tinham mutações.

Para cada reação de sequenciação prepararam-se dois tubos, um com o DNA e o *primer forward* e outro com o DNA e o *primer reverse*, nas quantidades definidas pela empresa prestadora do serviço. A sequenciação de DNA foi então realizada pela empresa Stabvida, Portugal.

### **3.4. Linhas celulares humanas**

Neste trabalho foram utilizadas as linhas celulares HEK 293T, hTERT RPE-1, hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP e HeLa.

A linha celular HEK 293T é uma linha de células epiteliais de rim embrionário humano. hTERT RPE-1 é uma linha celular do epitélio pigmentado da retina humana imortalizada através da expressão de telomerase. A linha hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP expressa constitutivamente a proteína TBCCD1 em fusão com a proteína GFP. HeLa é uma linha epitelial de adenocarcinoma humano.

As linhas celulares HEK 293T, HeLa e hTERT RPE-1 provêm da ATCC. A linha hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP é a linha estabelecida por João Gonçalves (Gonçalves, 2010).

#### **3.4.1. Condições de cultura de linhas celulares**

Todas as linhas celulares utilizadas foram cultivadas numa estufa com temperatura e humidade controladas. A temperatura foi mantida a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e a humidade relativa entre 70 e 80%.

As linhas HEK 293T e HeLa foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagles's medium*) com Glutamax (Invitrogen, Reino Unido), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Reino Unido).

As linhas celulares hTERT RPE-1 e hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP foram cultivadas em meio DMEM/F-12 com Glutamax (Invitrogen, Reino Unido), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, América do Sul) e 0,25 % (m/v) de bicarbonato de sódio (Invitrogen, Reino Unido).

Todas as linhas celulares utilizadas foram passadas a cada 2 a 3 dias, de forma a que se mantivessem numa fase de divisão ativa e em monocamada subconflente.

Para se proceder à passagem das linhas celulares aderentes, retirou-se o meio de cultura, lavaram-se as células duas vezes com PBS 1X estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), retirou-se todo o PBS da placa, adicionou-se 1 mL de tripsina 0,05 % com EDTA 53 mM (Invitrogen, Reino Unido) e retirou-se o excesso da mesma. De seguida, as células foram colocadas a 37°C na estufa, durante

3 minutos. Após este período de tempo, ressuspenderam-se as células no respetivo meio de cultura, procedeu-se à contagem das células em suspensão. O número pretendido de células conforme a experiência foi então plaqueado numa nova caixa com meio fresco.

Para a contagem de células, retirou-se uma amostra de cada suspensão de células e procedeu-se a uma diluição de 1:4 em azul de tripano 0,4 % (Invitrogen, Reino Unido). Estas foram em seguida contadas utilizando uma câmara de Neubauer e o microscópio invertido.

### **3.4.2. Transfeção de linhas celulares humanas**

As linhas celulares HEK 293T e HeLa foram transfetadas utilizando Lipofectamin2000 (Invitrogen, EUA) e a linha hTERT RPE-1 foi transfetada utilizando Lipofectamin3000 (Invitrogen, EUA), em ambas as situações de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram plaqueadas entre 18 a 20 horas antes da transfeção, em placas de 6 ou de 24 poços. O número de células plaqueado em cada caso encontra-se descrito nos Quadros 2 e 3. No caso das células HEK 293T e HeLa 30 minutos antes da transfeção substituiu-se o meio por meio sem soro, uma vez que este inibe a formação dos complexos lipídicos da Lipofectamin2000. No caso das hTERT RPE-1, o meio foi apenas substituído por meio fresco (com soro).

De seguida, prepararam-se dois tubos, segundo os Quadros 2 e 3, um deles com a mistura de Opti-MEM (Invitrogen, Reino Unido) e Lipofectamin2000 ou Lipofectamin3000 e outro tubo com a mistura de Opti-MEM, DNA e P3000 (este último apenas no caso da transfeção com Lipofectamin3000, sendo fornecido com a mesma). Depois de preparados, deixaram-se os tubos à temperatura ambiente durante 5 minutos, após os quais se misturaram ambos os tubos, tendo deixado a mistura final 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se o conteúdo do tubo a cada poço de células a transfetar (ver Quadros 2 e 3 para número de células por poço). No caso das células transfetadas com Lipofectamin2000 parou-se a transfeção após 6h30 substituindo o meio por meio fresco com soro, já no caso das células transfetadas com Lipofectamin3000 não se parou a transfeção.

No caso de as células seguirem para microscopia de fluorescência estas foram fixadas ou alternativamente foram preparados extratos proteicos ou extraído RNA total

24 horas após a transfeção. Quando as células se destinavam a uma análise por microscopia de fluorescência, foram sempre plaqueadas sobre lamelas de vidro. Nesta situação, as lamelas utilizadas para as células HEK 293T foram previamente tratadas com Poli-L-lisina. Para o tratamento com Poli-L-lisina, colocaram-se as lamelas numa placa de Petri com o volume de solução de Poli-L-lisina 0,01 % (Sigma, EUA) necessário para as cobrir. As lamelas foram então incubadas com agitação ligeira na placa de Petri tapada durante 30 minutos. Após esta incubação, cada lamela foi escorrida e colocada no poço. As células foram depois plaqueadas sobre estas lamelas.

**Quadro 2 – Número de células plaqueadas por poço em placas de seis poços e composição das misturas preparadas para a transfeção das linhas celulares.**

Linha celular	Número de células por poço	Tubo 1	Tubo 2
HEK 293T	$3 \times 10^5$	30 $\mu$ L de DNA (6 $\mu$ g) 270 $\mu$ L de Opti-MEM	12 $\mu$ L de Lipofectamin 288 $\mu$ L de Opti-MEM

**Quadro 3 - Número de células plaqueadas por poço em placas de vinte e quatro poços e composição das misturas preparadas para a transfeção das linhas celulares.**

Linha celular	Número de células por poço	Tubo 1	Tubo 2
HEK 293T	$1 \times 10^5$	15 $\mu$ L de DNA (3 $\mu$ g) 110 $\mu$ L de Opti-MEM	4 $\mu$ L de Lipofectamin 121 $\mu$ L de Opti-MEM 1 $\mu$ L de P3000*
hTERT RPE-1			
HeLa			

\* - aplicável apenas na transfeção de células hTERT RPE-1 com Lipofectamin3000

### **3.4.3. Transfeção de linhas celulares humanas com pequenos RNAs de interferência específicos para o *tbccd1***

As células hTERT RPE-1 foram transfetadas com pequenos RNAs de interferência (siRNAs) específicos para o *tbccd1* utilizando Lipofectamin3000 (Invitrogen, EUA).

As células foram plaqueadas entre 18 e 20 horas antes do início da experiência (primeira transfeção) sobre lamela de vidro em placas de 24 poços, tendo-se plaqueado  $1 \times 10^4$  células por poço. Trinta minutos antes da transfeção substituiu-se o meio das células por meio fresco sem soro. De seguida, prepararam-se dois tubos de acordo com o Quadro 4 e os tubos foram incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. Depois desta incubação misturaram-se os dois tubos e a mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente e, seguidamente, adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  da mistura às células. A transfeção foi parada após 6 horas e 30 minutos, através da substituição do meio por meio fresco suplementado com soro. Quarenta e oito horas após a transfeção, realizou-se um reforço de siRNAs repetindo-se o procedimento e, 72 horas depois da primeira transfeção as células foram fixadas caso seguissem para análise por microscopia de fluorescência ou alternativamente foram transfetadas com plasmídeos contendo a sequência de cada uma das variantes do *tbccd1* identificadas no caso dos ensaios de recuperação do fenótipo. Neste caso, o número de células plaqueado inicialmente foi  $3 \times 10^3$  células por poço e o protocolo utilizado nesta última transfeção foi o descrito anteriormente relativo à transfeção de células com vetores de expressão (ver secção 3.4.2).

As sequências de cada siRNA e a respetiva concentração na mistura utilizada encontram-se no Quadro 5.

**Quadro 4 – Composição das misturas preparadas para a transfeção de linhas celulares com siRNAs utilizando Lipofectamin3000.**

<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>
25 $\mu\text{L}$ Opti-MEM	25 $\mu\text{L}$ Opti-MEM
0,75 $\mu\text{L}$ Lipofectamin3000	0,75 $\mu\text{L}$ mistura siRNAs (15 pmol)

**Quadro 5 – Sequência dos quatro siRNAs utilizados, a sua origem e a concentração final na solução de mistura de siRNAs utilizada para transfetar as células.**

<b>Sequência siRNA</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração na mistura de siRNAs</b>
5'-GUGGCUUUACUUCGAAUA-3'	Dharmacon	20 µM
5'-GAGCUAAGAUUGCUUGUAA-3'	Ambion	20 µM
5'-GAUUCAUCGUUGCAACGAA-3'	Ambion	20 µM
5'-CCUUGUGAAUUCUAUGUAU-3'	Ambion	20 µM

#### **3.4.4. Ensaios de despolimerização de microtúbulos com nocadazole**

Para os ensaios de despolimerização de microtúbulos com nocadazole (Sigma, Israel) as células foram plaqueadas e transfetadas de acordo com o protocolo descrito na secção 3.4.2 e, 24 horas após a transfeção, substituiu-se o meio das células por meio fresco completo para se dar início ao tratamento com nocadazole.

De seguida, adicionou-se o volume necessário da solução de nocadazole em DMSO para que a concentração final fosse de 30 µM e as células foram colocadas em gelo durante 5, 15 ou 30 minutos. Após este período de tempo, as células foram fixadas utilizando metanol (método descrito na secção 3.4.6). De seguida, as células foram processadas para análise por microscopia de fluorescência.

#### **3.4.5. Indução de cílios primários nas células humanas**

De modo a analisar a localização celular das proteínas em estudo em células ciliadas, transfetaram-se células hTERT RPE-1 como descrito na secção 3.4.2. No entanto, plaquearam-se  $1 \times 10^5$  células por poço, em placas de 24 poços, para que as células atingissem a confluência de modo a possibilitar a formação de cílios.

Vinte e quatro horas após a transfeção, substituiu-se o meio das células por meio fresco sem soro. Depois de 48 horas em meio sem soro as células foram fixadas utilizando metanol, segundo o protocolo descrito na secção 3.4.6 e processadas para microscopia de fluorescência.

### **3.4.6. Preparação de células das linhas celulares humanas para análise em microscopia de imunofluorescência**

Para a realização dos ensaios de imunofluorescência, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, sobre lamelas de vidro, como anteriormente descrito nas secções 2.4.2 ou 2.4.3.

Para a fixação das células, retirou-se o meio de cultura e lavaram-se duas vezes as células com PBS 1X. Retirou-se o PBS 1X, adicionou-se lentamente 300 µL de metanol 100% frio (-20°C) e incubaram-se as células a -20°C durante 10 minutos.

Após a fixação efetuaram-se duas lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X. De seguida, aspirou-se o PBS 1X e procedeu-se ao bloqueio adicionando 300 µL de solução de bloqueio (albumina do soro bovino (BSA) 3% em PBS 1X) e incubando durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário, diluído na solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente. Efetuaram-se depois duas lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X seguidas de uma lavagem rápida com PBS-Tween 0,1%. De seguida, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário, diluído na solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente, após a qual se efetuaram duas lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X, seguidas de uma lavagem rápida com PBS-Tween 0,1%. A marcação do DNA foi sempre realizada utilizando DAPI (1 µg/mL) também diluído em solução de bloqueio. A incubação com DAPI foi de 3 minutos à temperatura ambiente, sendo seguida de três lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X.

Por fim, as lamelas foram montadas em lâminas de vidro sobre uma gota de meio de montagem Vectashield (Vector, EUA).

No Quadro 6 encontram-se os vários anticorpos utilizados e as respetivas diluições.

**Quadro 6 – Anticorpos primários utilizados, animal em que foram produzidos e a diluição de trabalho utilizada para microscopia de imunofluorescência.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Animal em que foi produzido</b>	<b>Diluição</b>
Anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma)	murganho	1:100
Anti- $\gamma$ -tubulina (Sigma)	murganho	1:200
Anti-pericentrina (Abcam)	coelho	1:100
Anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (Sigma)	murganho	1:150

**Quadro 7 – Anticorpos secundários utilizados, animal em que foram produzidos e a diluição de trabalho utilizada para microscopia de imunofluorescência.**

<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Animal em que foi produzido</b>	<b>Diluição</b>
Anti-murganho Alexa 488 (Molecular Probes)	cabra	1:500
Anti-murganho Alexa 594 (Molecular Probes)	cabra	1:500
Anti-coelho Alexa 488 (Molecular Probes)	cabra	1:500
Anti-coelho Alexa 594 (Molecular Probes)	cabra	1:500

### **3.5. Preparação e análise de extratos proteicos**

#### **3.5.1. Preparação de extratos proteicos totais**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, um poço para cada condição experimental, e plaquearam-se  $3 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte as células foram transfectadas e 24 horas após a transfeção realizou-se a extração proteica.

Para a preparação dos extratos proteicos totais, aspirou-se o meio de cultura, lavaram-se as células uma vez com 1 mL de PBS 1X frio (mantido a 4°C), retirou-se o

PBS e adicionou-se 1 mL de TBS 1X (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5) com o qual se destacaram as células com o auxílio da micropipeta. De seguida, centrifugaram-se as células a 300 x g durante 3 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 60 µL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 1 % β-mercaptoetanol, 12,5 mM EDTA, 0,2 % azul de bromofenol). Depois, adicionou-se 1 µL de Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (Thermo Fisher Scientific, Lituania) e as amostras foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram fervidas a 95°C durante 5 minutos e aplicaram-se 20 µL de cada amostra num gel de SDS-PAGE 10 %, tendo-se utilizado o tampão de eletroforese Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % (m/v) SDS, pH 8,3) e amperagem definida a 20 mA por gel.

### **3.5.2. Preparação de extratos proteicos desnaturantes solúveis**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, tendo-se utilizado três poços por condição experimental. Em cada poço plaquearam-se 3 x 10<sup>5</sup> células, de acordo com o Quadro 2 e, quando aplicável, as células foram transfetadas de acordo com o protocolo descrito na secção 3.4.2.

Para a preparação destes extratos proteicos, todas as soluções utilizadas encontravam-se a 4°C e as centrifugações foram também realizadas a esta temperatura. Começou-se por retirar o meio das células e efetuaram-se três lavagens com PBS 1X. Após estas lavagens, retirou-se o PBS, adicionou-se 1 mL de PBS 1X, destacaram-se as células utilizando raspadores e a suspensão de células foi depois centrifugada a 300 x g durante 3 minutos. De seguida, ressuspendeu-se o sedimento em 50 µL de solução H (50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 250 mM sacarose) e adicionou-se NP-40 para uma concentração final de 0,1 %, e um cocktail de inibidores de proteases que continha também inibidores de fosfatases, PMSF 0,2 mM e DTT 0,4 mM. Por fim, procedeu-se a uma centrifugação a 12 000 rpm durante 30 minutos, no fim da qual se obteve a fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) dos extratos. A fração solúvel foi então quantificada pelo método de Bradford de modo a se utilizar a mesma quantidade de proteína total de todas as amostras. O volume de amostra a ser analisado foi então fervido a 100°C durante 5 minutos, adicionou-se o volume apropriado de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 1 % β-mercaptoetanol, 12,5 mM EDTA, 0,2 % Azul de bromofenol) e as amostras foram

analisadas num gel SDS-PAGE 10 % tendo-se utilizado o tampão Tris-Glicina-SDS. Definiu-se a amperagem de 20 mA por gel.

Ambas as frações foram, quando necessário, congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas.

### **3.5.3. Determinação da concentração dos extratos proteicos**

A quantificação dos extratos proteicos preparados foi realizada através do método de Bradford (Sigma, EUA) e utilizaram-se placas de 96 poços e o leitor de microplacas. Como referência foi utilizada a albumina do soro bovino (BSA).

Assim, para a determinação da curva de calibração foram preparadas soluções de concentração conhecida de BSA entre 0,1 e 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a partir de uma solução de 1 mg/mL e como controlo negativo (branco) foi utilizada água. De cada solução aplicaram-se 5  $\mu\text{L}$  num poço da placa de 96 poços, adicionaram-se 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford a cada poço e incubou-se a placa no escuro durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação mediu-se a absorvência a 595 nm.

### **3.5.4. Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

A separação de proteínas por eletroforese realizada em condições desnaturantes foi realizada em géis verticais e descontínuos, compostos pelo gel concentrador (no qual são aplicadas as amostras) e pelo gel resolvente. No sistema de mini-géis utilizado (Bio-Rad) os géis tinham as dimensões de 7 cm x 8 cm x 0,15 cm. Os géis concentradores eram de 5 % e os géis resolventes de 10 % (v/v) (acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (m/m)). As composições de ambos os géis estão descritas nos Quadros 8 e 9.

O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % (m/v) SDS, pH 8,3).

A solução de acrilamida/bisacrilamida foi preparada pela dissolução dos dois reagentes em água seguida de agitação com a resina DOWEX MR-3 (Sigma, EUA) 5 % (m/v) durante 30 minutos, seguida de decantação e filtração em sistema Milipore.

**Quadro 8 – Composição do gel resolvente para SDS-PAGE 10%.**

<b>Gel resolvente</b>	
Acrilamida 30 % (m/v):Bisacrilamida 0,8 % (m/v)	3,3 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,9	2,48 mL
SDS 20 % (m/v)	50 µL
Água bidestilada	4,13 mL
Persulfato de amônio 10 % (m/v)	50 µL
TEMED	5 µL

**Quadro 9 – Composição do gel concentrador 5 % para SDS-PAGE.**

<b>Gel concentrador</b>	
Acrilamida 30 % (m/v):Bisacrilamida 0,8 % (m/v)	1,7 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,625 µL
SDS 20 % (m/v)	50 µL
Água bidestilada	7,625 mL
Persulfato de amônio 10 % (m/v)	100 µL
TEMED	10 µL

### **3.5.5. Eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose**

A transferência das proteínas do gel de acrilamida para a membrana de nitrocelulose foi realizada através do método *semi-dry*. Para este método, por cada gel de acrilamida cortaram-se 12 pedaços de papel de filtro de 3 MM (Whatman GE Healthcare, Reino Unido) do mesmo tamanho do gel e um retângulo de membrana de nitrocelulose também com as mesmas dimensões. De seguida, o gel de acrilamida foi equilibrado com o tampão de transferência Tris-glicina-SDS com metanol (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0,0375 % (m/v) SDS, 20 % (v/v) metanol, pH 9,2), sendo incubado no mesmo durante 30 a 45 minutos com baixa agitação. A membrana de nitrocelulose foi inicialmente mergulhada em água destilada e seguidamente também equilibrada com o tampão de transferência durante 15 a 30 minutos. Após estas incubações, mergulharam-se 6 pedaços de papel de filtro previamente cortados em tampão de transferência e estes foram empilhados e colocados no aparelho por cima do ânodo. De

seguida, por cima dos papéis de filtro colocou-se a membrana de nitrocelulose, seguida do gel e dos restantes 6 pedaços de papel de filtro previamente mergulhados no tampão de transferência. Retiraram-se as bolhas de ar com a ajuda de uma vareta e montou-se o cátodo e a tampa do aparelho. A transferência foi realizada a aproximadamente 60 mA por gel ( $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ) durante 1 hora e 15 minutos.

Após a transferência, as membranas foram coradas utilizando Ponceau S (para uma solução 10X: 2 % (m/v) de Ponceau S, 30 % (m/v) de ácido tricloroacético, 30 % (m/v) de ácido sulfosalicílico) e a imagem obtida utilizando o ImageQuant Las 500 (GE Healthcare).

### **3.5.6. Western blot**

Para a deteção de proteínas recorrendo à técnica de *western blot*, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas previamente transferidas foi bloqueada de forma a diminuir as ligações inespecíficas dos anticorpos. Para o bloqueio a membrana foi incubada em leite magro (Molico) 5 % em PBS 1X durante 1 hora com agitação à temperatura ambiente. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio durante 1 hora com agitação constante à temperatura ambiente. Depois desta incubação, realizaram-se três lavagens de 5 minutos cada utilizando PBS 1 X-Tween 0,1 %, após as quais se incubou a membrana com o anticorpo secundário, também diluído na solução de bloqueio, durante 1 hora com agitação constante à temperatura ambiente. Realizaram-se depois três lavagens com PBS 1X de 5 minutos cada. A deteção das proteínas de interesse foi feita com os reagentes de deteção ECL Western Blotting Substrate (Pierce, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A revelação das membranas foi feita através de quimioluminescência no aparelho ImageQuant Las 500 (GE Healthcare) ou por exposição de chapas fotográficas (Kodak).

Os anticorpos primários e secundários utilizados e as respetivas diluições encontram-se descritos nos Quadros 10 e 11.

**Quadro 10 – Anticorpos primários utilizados, animal em que foram produzidos e a respetiva diluição de trabalho utilizada nos ensaios de *Western blot*.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Animal em que foi produzido</b>	<b>Diluição</b>
<b>Anti-<math>\gamma</math>-tubulina</b> (Sigma)	murganho	1:2000
<b>Anti-tubulina acetilada</b> (Sigma)	murganho	1:1500
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina</b> (Sigma)	coelho	1:1000
<b>Anti-GFP</b> (invitrogen)	coelho	1:2000

**Quadro 11 – Anticorpos secundários utilizados, animal em que foram produzidos e a respetiva diluição de trabalho utilizada nos ensaios de *Western blot*.**

<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Animal em que foi produzido</b>	<b>Diluição</b>
<b>Anti-murganho conjugado com HRP</b> (Jackson ImmunoResearch)	cabra	1:4000
<b>Anti-coelho conjugado com HRP</b> (Molecular Probes)	cabra	1:2000

### **3.6. Preparação e análise de RNA**

#### **3.6.1. Extração de RNA total de linhas celulares humanas**

Para a extração de RNA total de linhas celulares, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, à exceção das NCI-H69, que foram cultivadas em frascos de cultura (*T-flasks*). Para as linhas celulares aderentes foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células por poço, tendo-se utilizado dois poços por condição. Para a extração de RNA total de células HEK 293T transfetadas, as células foram plaqueadas e transfetadas no dia seguinte, como está descrito na secção 3.4.2, e procedeu-se à extração do RNA 24 horas após a transfeção. A extração foi realizada utilizando o *kit* E.Z.N.A. Total RNA Kit I (OMEGA,

EUA) e seguindo as instruções do fabricante para a extração de RNA total de linhas celulares.

Assim, retirou-se o meio das células aderentes, estas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e as células foram destacadas utilizando tripsina. De seguida, inativou-se a tripsina com meio com soro e a suspensão de células foi centrifugada a 500 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, ressuspendeu-se o sedimento de células em 350 µL de tampão de lise fornecido com o *kit* e a mistura foi homogeneizada utilizando uma seringa com uma agulha (19 a 21 gauge). Em seguida, adicionou-se 350 µL de etanol 70 %, utilizou-se o vórtex para a homogeneização e a mistura foi transferida para a coluna HiBind RNA Mini Column, também fornecida no *kit*, inserida num tubo de 2 mL. Procedeu-se a uma centrifugação a 10 000 x g durante 1 minuto, desprezou-se o filtrado e repetiu-se este passo até toda a amostra ser transferida para a coluna. Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem 1 (fornecido no *kit*), centrifugou-se durante 30 segundos a 10 000 x g e desprezou-se o filtrado. De seguida, adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem 2 (fornecido com o *kit*), centrifugou-se a 10 000 x g durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado. Este último passo de lavagem foi repetido e depois de se desprezar o filtrado, centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto para secar a coluna. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo e o RNA foi eluído em 30 µL de água bidestilada também fornecida com o *kit*. O RNA foi então quantificado utilizando o NanoDrop, tratado com DNase I (Fermentas) e guardado a -80°C até ser utilizado.

### **3.6.2. Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA utilizou-se o enzima transcriptase reversa (Nzytech, Portugal) tendo-se seguido as instruções do fabricante. Para cada amostra preparou-se uma mistura composta por RNA (500 ng), *random hexamer primers* (Fermentas), dNTPs (Fermentas), transcriptase reversa (200 U) e o respetivo tampão (Quadro 12). Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas no termociclador e incubadas a 25°C durante 10 minutos, seguidos de uma incubação a 50°C durante 30 minutos e de uma última incubação a 85°C durante 5 minutos.

**Quadro 12 – Constituição da mistura preparada para a síntese de cDNA a partir de RNA total.**

<b>RNA</b>	500 ng
<b>Random Hexamer Primers 100 <math>\mu</math>M (Fermentas)</b>	2 $\mu$ L
<b>dNTPs 10 mM (Fermentas)</b>	1 $\mu$ L
<b>Tampão para transcriptase reversa (Nzytech, Portugal)</b>	2 $\mu$ L
<b>Transcriptase reversa (Nzytech, Portugal)</b>	1 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Até 14 $\mu$ L
$V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$	

### 3.6.3. RT-qPCR

Para os ensaios de RT-qPCR, utilizou-se SYBRGreen Master Mix 2X (Applied Biosystems, Reino Unido). As experiências foram realizadas segundo as instruções do fabricante.

Começou-se com uma incubação inicial de 2 minutos a 95°C. Depois, realizaram-se 50 ciclos de 30 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

Em cada experiência, realizaram-se triplicados de cada amostra, cada um contendo 1  $\mu$ L de cDNA. Foram sempre preparados controlos negativos para cada par de *primers*, também realizados em triplicado. Como controlo interno foram utilizados primers para os transcritos do gene que codifica para o *hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Todos os *primers* utilizados encontram-se especificados no Quadro 13.

**Quadro 13 – Sequências dos primers utilizados nas experiências de RT-qPCR.**

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
TBCCD1 variante 1 <i>forward</i>	5' GAGCGGCGCCTGCATTAGCAG 3'
TBCCD1 variante 1 <i>reverse</i>	5' GATGGAGGGGGGACCTGCAAG 3'
TBCCD1 variante 2 <i>forward</i>	5' GGAACAGTTATTCCACGACAGGTG 3'
TBCCD1 variante 2 <i>reverse</i>	5' CACTAAGAAGCGGTGGAAGCC 3'
TBCCD1 variante 3 <i>forward</i>	5' TCGGCTTCCACCGCTTCTTAGTG 3'
TBCCD1 variante 3 <i>reverse</i>	5' TAAGCTCCTTCTGTGGCCCGG 3'
HPRT <i>forward</i>	5' GGCGTCGTGATTAGTGATG 3'
HPRT <i>reverse</i>	5' CATTACAATAGCTCTTCAGTC 3'

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O número de experiências independentes realizadas encontra-se sempre indicado. Foram utilizados intervalos de confiança de 95, 99 ou 99,5 %. Para determinar se as diferenças observadas entre grupos tinham significado estatístico efetuou-se uma análise estatística aplicando o teste *t-student* bicaudal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor-p era inferior a 0,05, 0,01 ou 0,005. Quando um grupo é estatisticamente diferente do controlo, este encontra-se assinalado com \* quando  $p < 0,05$ , \*\* quando  $p < 0,01$  e \*\*\* caso  $p < 0,005$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Estudo da localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 em sobreexpressão

A proteína TBCCD1 está descrita como uma proteína que se localiza no centrôssoma. No entanto, uma vez que foram identificados dois novos transcritos resultantes de *splicing* alternativo, surgiu a questão de qual seria a localização subcelular das proteínas codificadas por estes transcritos. De forma a responder a esta pergunta, realizaram-se ensaios de sobreexpressão de cada uma das três variantes identificadas em fusão com um gene repórter que as permitiu localizar nas células por microscopia de fluorescência.

Para isso, utilizaram-se vetores de expressão recombinantes que contêm as sequências de cada uma das variantes da TBCCD1 identificadas em fusão com a proteína GFP (*green fluorescent protein*) ou a RFP (*red fluorescent protein*) (Câmara, 2013).

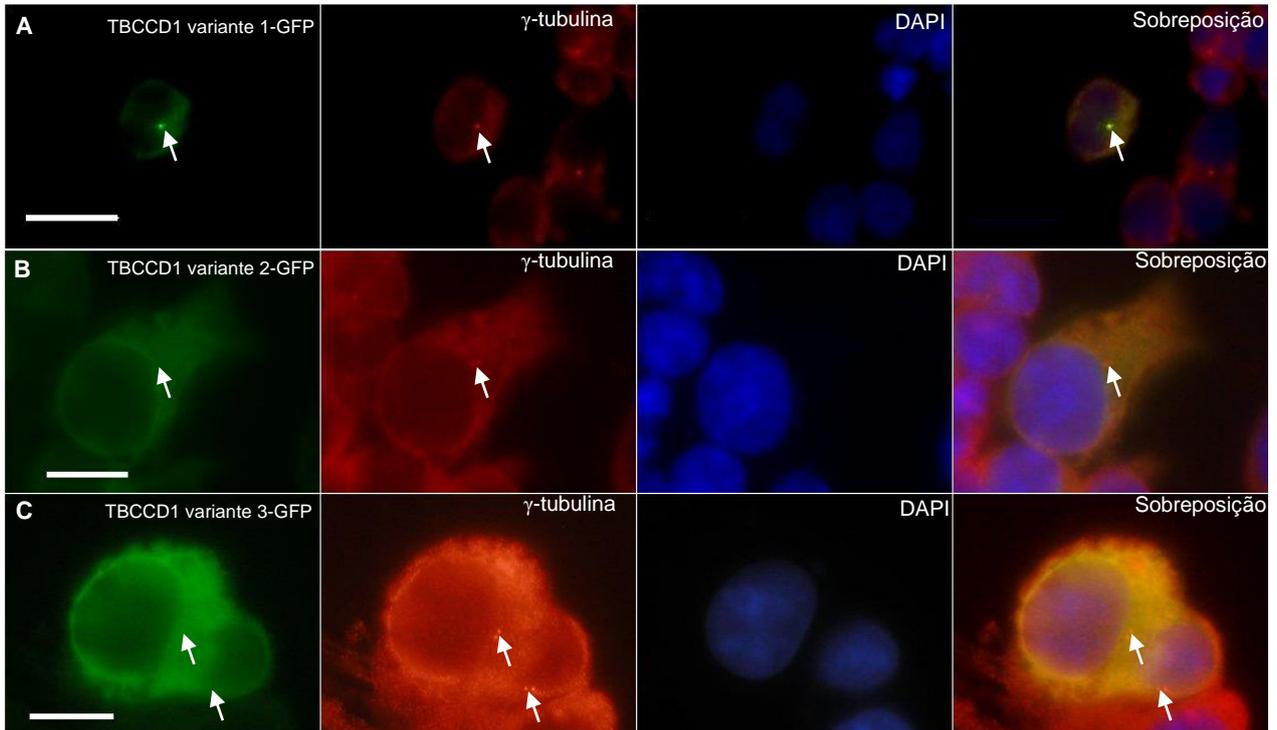
Assim, transfetaram-se células HEK 293T, HeLa e hTERT RPE-1 com cada um dos plasmídeos que continham as sequências que codificam cada um dos transcritos, em fusão com a proteína GFP ou a proteína RFP na região C-terminal. Vinte e quatro horas após a transfeção as células foram fixadas e processadas para microscopia de imunofluorescência utilizando-se o anticorpo anti-pericentrina ou anti- $\gamma$ -tubulina que são proteínas da matriz pericentriolar e assim permitem analisar se as proteínas em estudo se localizavam ou não no centrôssoma.

Pela análise da Figura 9 é possível observar que, em sobreexpressão em células HEK 293T, a TBCCD1 variante 1-GFP se localiza no centrôssoma, o que está de acordo com as observações dos estudos anteriores nomeadamente utilizando o anticorpo policlonal específico contra a proteína (Gonçalves *et al.*, 2010). No entanto, observa-se que as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, não são detetadas no centrôssoma, encontrando-se dispersas pelo citoplasma observando-se por vezes uma marcação perinuclear.

Como referido, estas experiências foram realizadas utilizando também as linhas celulares HeLa e hTERT RPE-1. Neste caso, a proteína TBCCD1 variante foi sobreexpressa utilizando como repórter a proteína RFP em vez da GFP. Como se pode

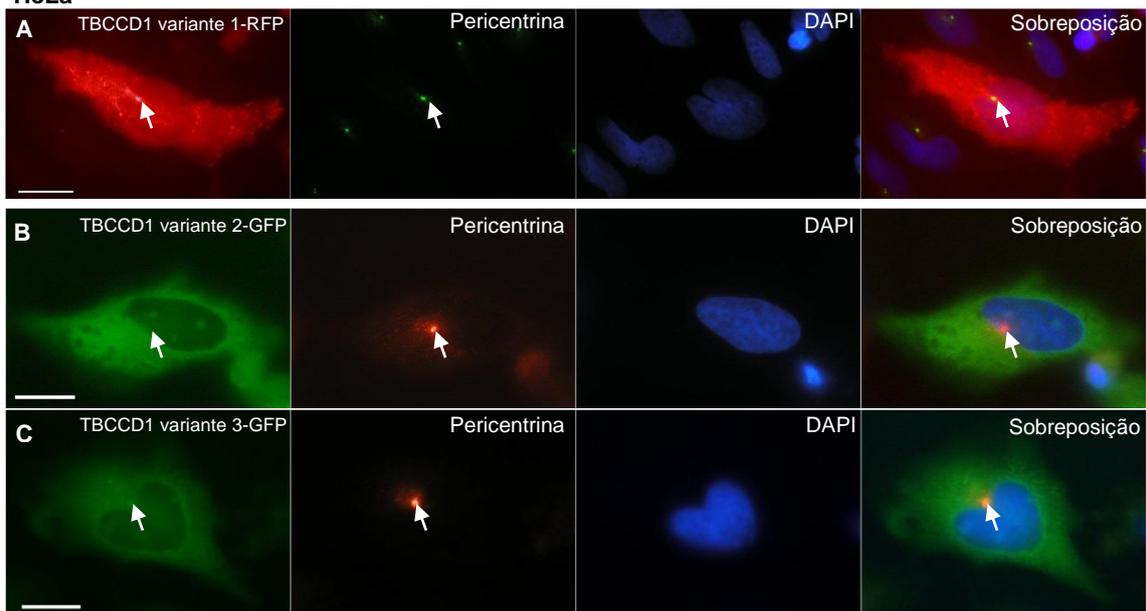
observar nas Figuras 10 e 11, os resultados obtidos foram semelhantes aos observados para a linha celular HEK 293T.

#### HEK 293T

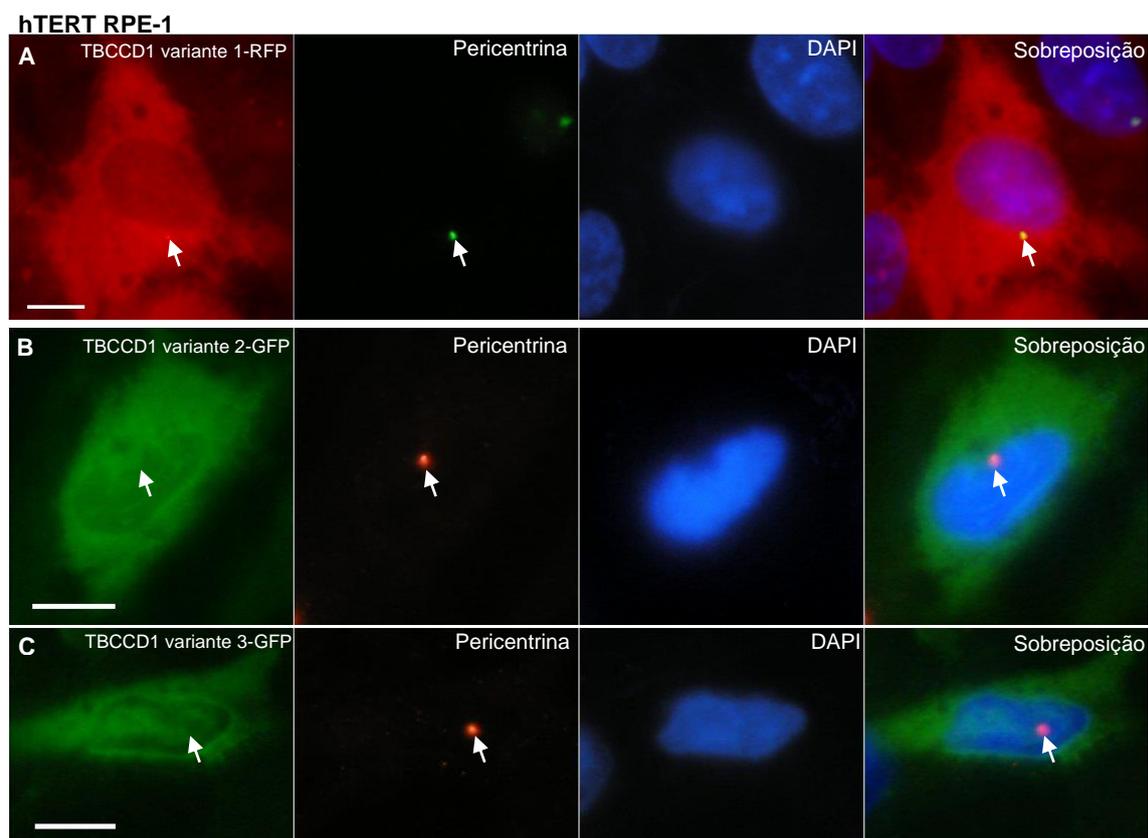


**Figura 9 – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células HEK 293T.** Células HEK 293T transfetadas de modo a expressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-GFP (A), TBCCD1 variante 2-GFP (B) ou TBCCD1 variante 3-GFP (C) foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina. As setas indicam o local da marcação do centrôssoma pela  $\gamma$ -tubulina, observando-se que a proteína TBCCD1 variante 1-GFP se localiza no centrôssoma mas as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP não. O DNA foi corado usando DAPI. Os resultados apresentados são representativos de um total de cinco experiências independentes. As barras da escala correspondem a 10  $\mu$ m.

#### HeLa



**Figura 10 - Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células HeLa.** Células HeLa transfetadas de modo a expressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP (A), TBCCD1 variante 2-GFP (B) ou TBCCD1 variante 3-GFP (C) foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-pericentrina. As pontas das setas indicam o local da marcação do centrossoma pela pericentrina. Observa-se que a proteína TBCCD1 variante 1-RFP se localiza no centrossoma mas as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP não. O DNA foi corado com DAPI. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes. As barras da escala correspondem a 10  $\mu$ m.

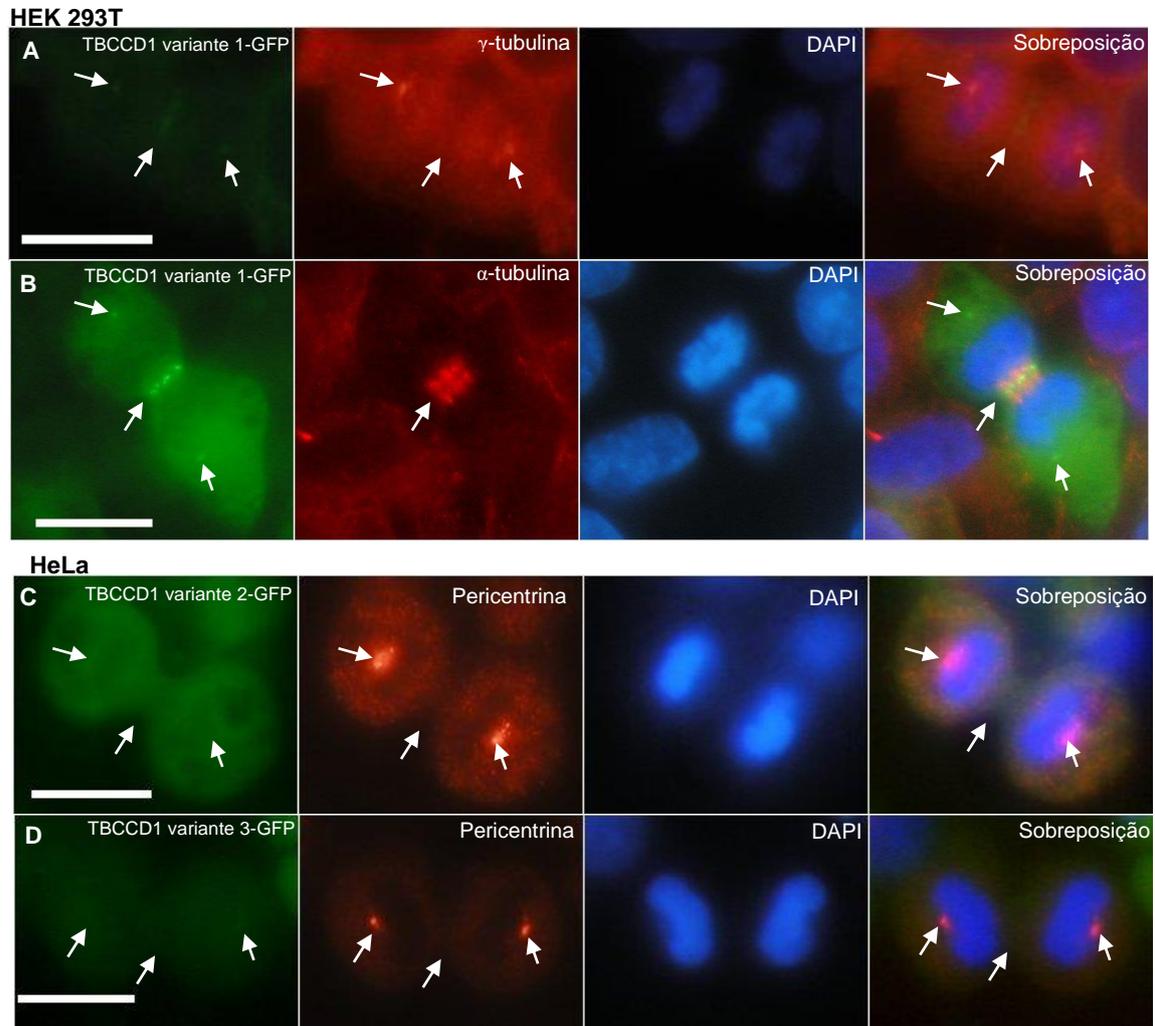


**Figura 11 - Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em sobreexpressão em células hTERT RPE-1.** Células hTERT RPE-1 transfetadas de modo a expressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP (A), TBCCD1 variante 2-GFP (B) ou TBCCD1 variante 3-GFP (C) foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-pericentrina. As pontas das setas indicam o local da marcação do centrossoma pela pericentrina. Observa-se que a proteína TBCCD1 variante 1-RFP se localiza no centrossoma mas as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP não. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes. As barras da escala correspondem a 10  $\mu$ m.

É também possível observar a deformação do núcleo em algumas células transfetadas nas Figuras 10 e 11.

Nas células em divisão as variantes têm também diferentes localizações, como se pode observar na Figura 12. As proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP têm uma localização citoplasmática, como nas células em interfase, não

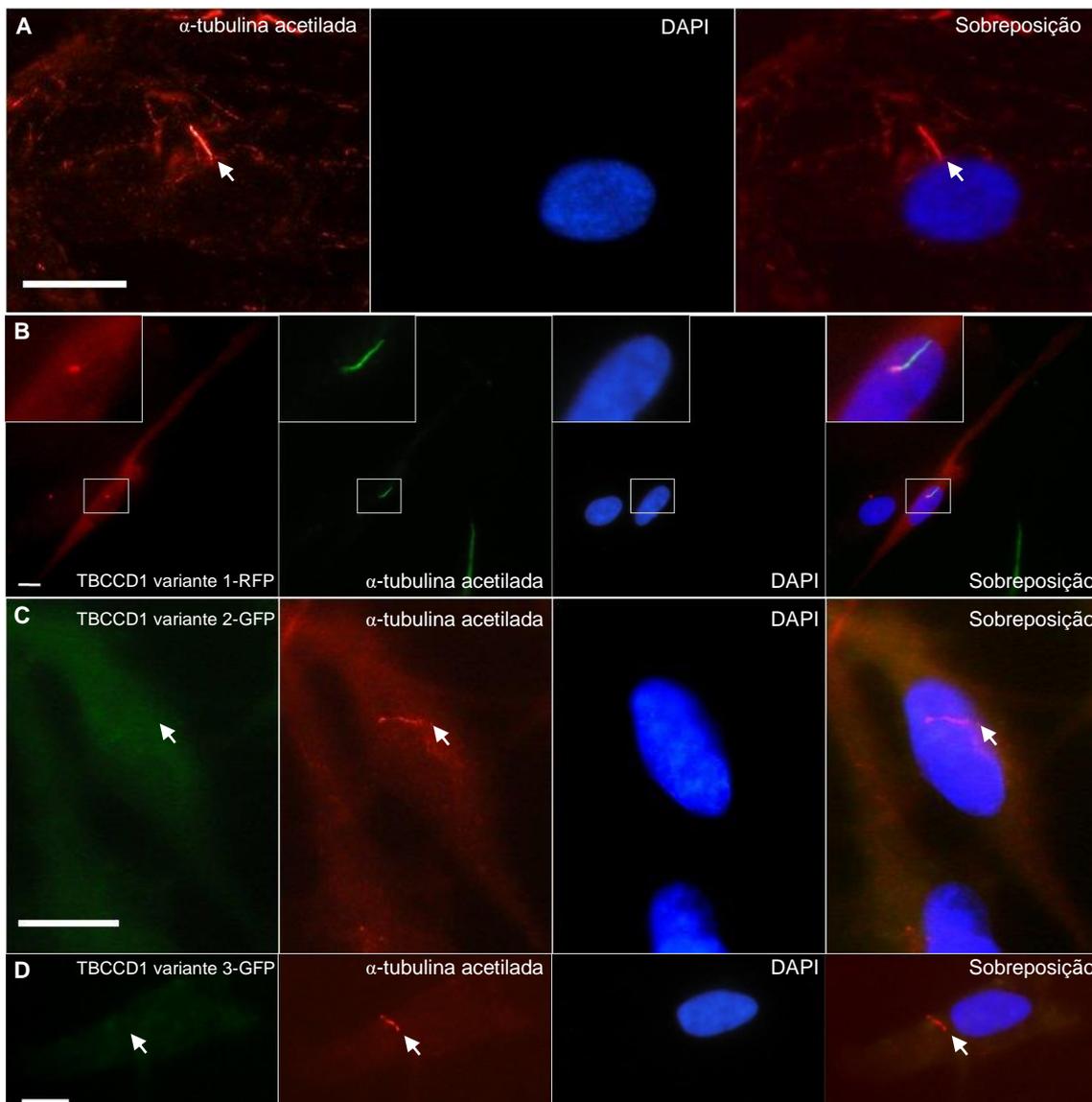
sendo detetadas no centrôssoma. Já a proteína TBCCD1 variante 1-GFP tem uma localização centrôssomal, como a observada nas células em interfase. No entanto, para além desta localização, é também observada no corpo médio (Figura 12).



**Figura 12 – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células em mitose.** Células HEK 293T (A e B) e HeLa (C e D) foram transfectadas de modo a sobreexpressarem a proteína TBCCD1 variante 1-GFP (A e B), TBCCD1 variante 2-GFP (C) ou TBCCD1 variante 3-GFP (D). Foram depois tratadas para análise por microscopia de imunofluorescência e marcadas com o anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina, anti- $\alpha$ -tubulina ou anti-pericentrina. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam a localização do centrôssoma ou o corpo médio. Os resultados correspondem a três experiências independentes. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

Uma vez que os estudos anteriores descrevem que a proteína TBCCD1 variante 1 se localiza nos corpos basais de células ciliadas (Gonçalves *et al.*, 2010), realizaram-se também ensaios de sobreexpressão das três variantes identificadas em células hTERT RPE-1 durante a montagem dos cílios primários. Deste modo, vinte e quatro horas após a transfeção, substituiu-se o meio das células por meio sem soro no qual estas foram mantidas durante 48 horas de forma a promover a ciliogênese.

#### hTERT RPE-1



**Figura 13 – Localização das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células hTERT RPE-1 ciliadas.** Células hTERT RPE-1 não transfectadas (A) e transfectadas de modo a sobreexpressarem uma das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP (B), TBCCD1 variante 2-GFP (C) ou TBCCD1 variante 3-GFP (D). 24 horas após a transfeção induziu-se a ciliação substituindo-se o meio de cultura por meio sem soro. 48 horas depois as células foram fixadas e processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam os cílios. As imagens são representativas de três experiências independentes. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

Como se pode observar na Figura 13, a TBCCD1 variante 1-RFP localiza-se nos corpos basais dos cílios primários, como observado por Gonçalves *et al.* 2010. Como acontece nas células não ciliadas, as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP têm uma localização diferente da TBCCD1 variante 1-GFP, apresentando ambas uma localização citoplasmática apesar da presença dos cílios primários.

Parece também que os cílios das células a sobreexpressar a proteína TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP têm uma marcação da  $\alpha$ -tubulina acetilada diferente da observada nas células controlo ou mesmo nas células a sobreexpressar a proteína TBCCD1 variante 1 (comparar na Figura 13 as imagens A e B com C e D). No entanto, a eficiência de transfeção obtida para esta linha celular foi bastante reduzida, o que impossibilitou a quantificação do fenótipo e limitou todas as seguintes abordagens.

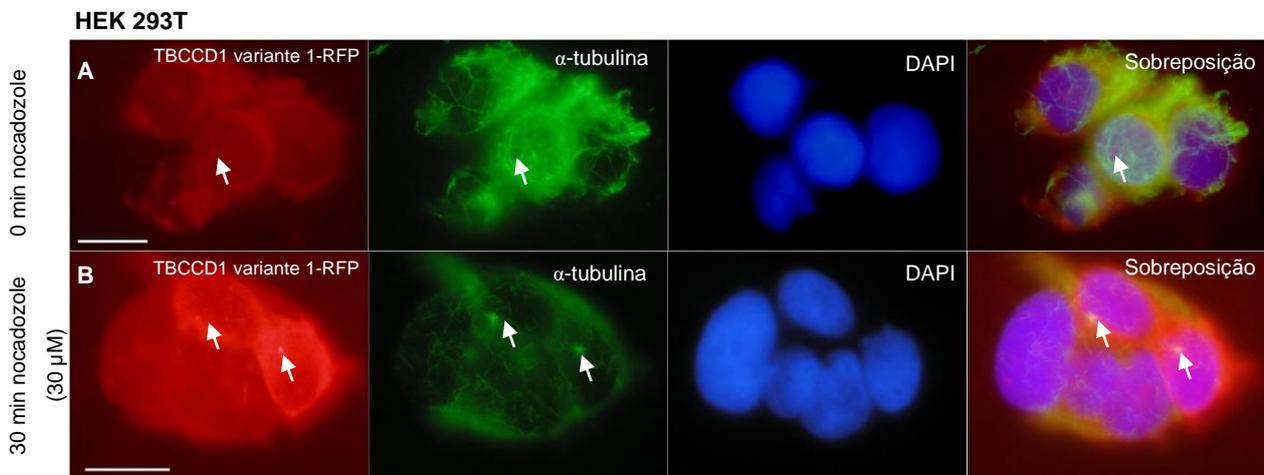
Pela análise destes resultados observa-se então que, nas três linhas celulares estudadas, as proteínas TBCCD1 têm diferentes localizações celulares. A proteína TBCCD1 variante 1 tem uma localização centrossomal, tanto nas células em interfase como nas células em mitose, sendo que nas últimas se localiza também no corpo médio. Localiza-se também nos corpos basais de cílios primários em células hTERT RPE-1 ciliadas. As proteínas TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 têm uma localização citoplasmática em todas as situações analisadas, nomeadamente, em células em interfase, células em mitose e também em células ciliadas.

#### **4.2. Estudo da localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 em sobreexpressão na ausência do citoesqueleto de microtúbulos**

Uma vez que as proteínas TBCCD1 possuem um domínio TBCC e que este está presente em proteínas que interagem com a tubulina, colocou-se a questão de a localização celular de cada uma das proteínas poder ser dependente dos microtúbulos. Assim, realizaram-se ensaios em que se analisou a localização celular de cada uma das três variantes, em sobreexpressão, em células HEK 293T e hTERT RPE-1 tratadas com nocadazole, um agente despolimerizante de microtúbulos. Para além disso, utilizou-se também a linha hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP que expressa constitutivamente a proteína

de fusão TBCCD1 variante 1-GFP. Esta linha foi usada uma vez que este clone foi selecionado por, apesar de a proteína de fusão estar em sobreexpressão, os níveis de expressão são mais baixos do que os níveis observados quando as células são transfetadas.

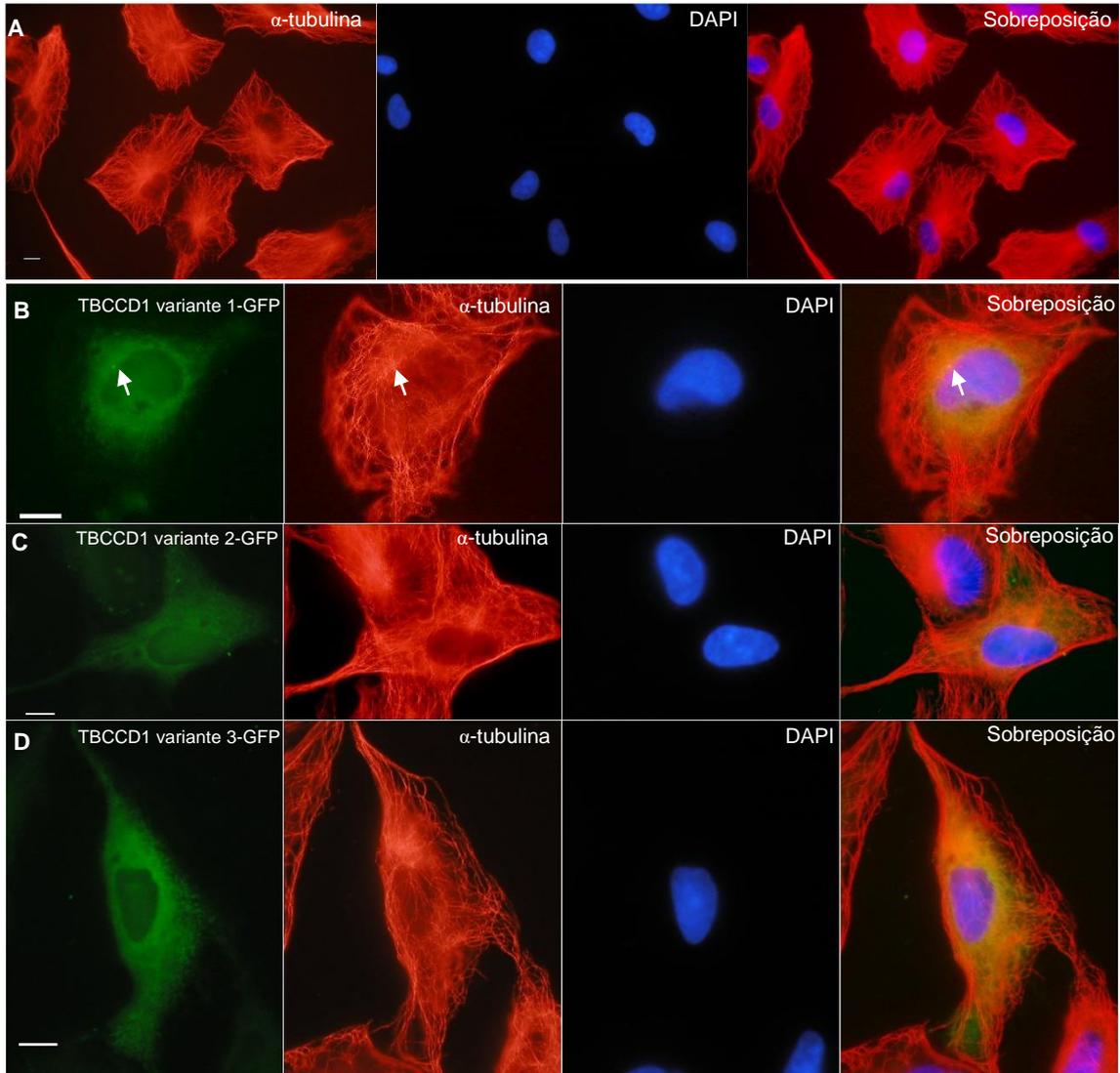
Depois de tratadas com nocadazole (com uma concentração final de 30  $\mu\text{M}$ ), durante 30 minutos, as células foram fixadas e tratadas para análise por microscopia de imunofluorescência. Para isso, utilizou-se o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina de modo a observar a rede de microtúbulos e analisar a extensão da despolimerização dos microtúbulos.



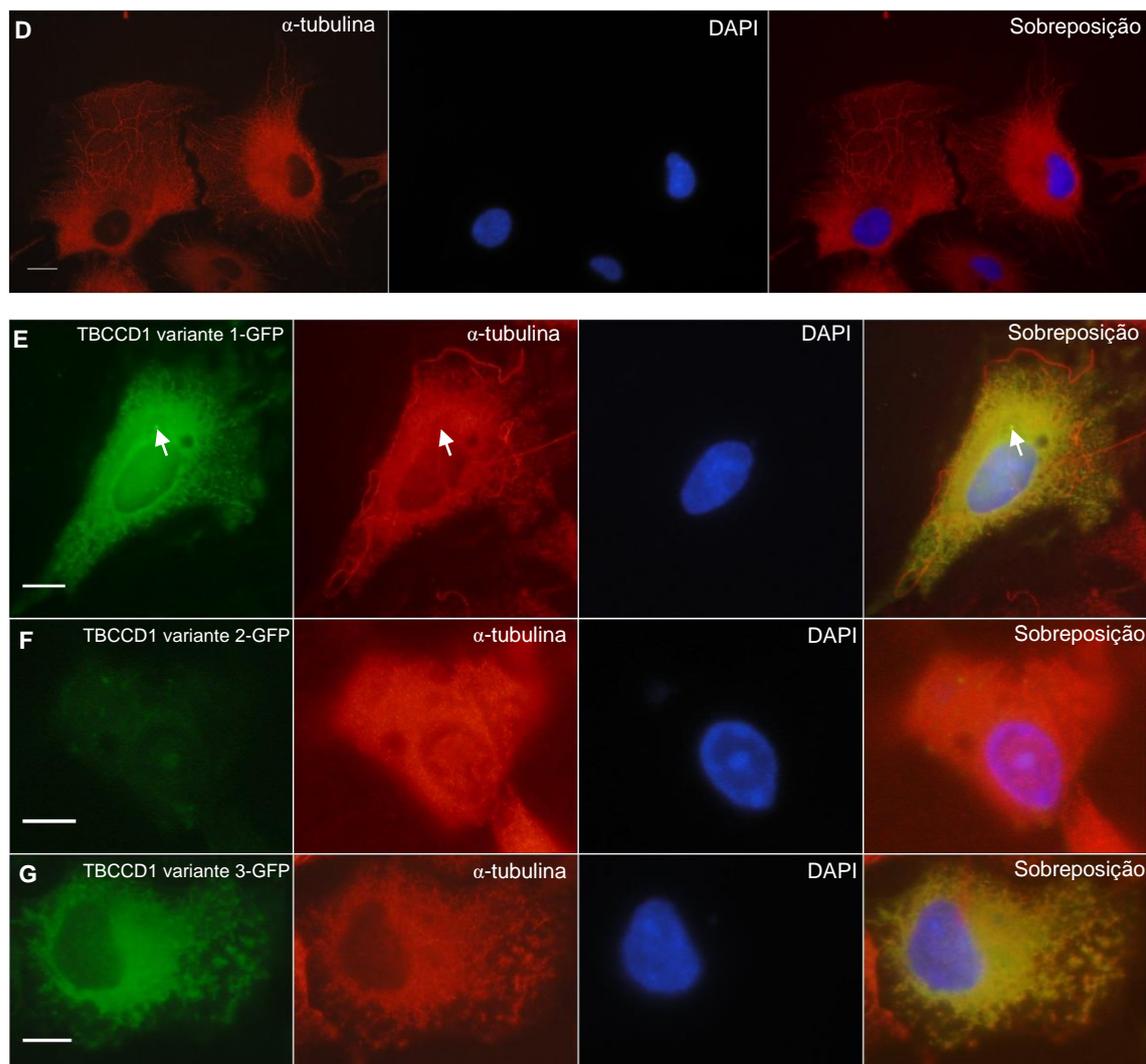
**Figura 14 – Localização celular da proteína TBCCD1 variante 1-RFP em células HEK 293T antes e após o tratamento com nocadazole.** Células HEK 293T foram transfetadas de modo a sobreexpressarem a proteína TBCCD1 variante 1-RFP. 24 horas após a transfeção as células foram fixadas (A) ou tratadas com nocadazole (30  $\mu\text{M}$ ) e colocadas a 4°C durante 30 minutos e depois fixadas (B). Em ambos os casos as células foram depois processadas para microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina. O DNA foi corado com DAPI. As células indicam a localização do centrosoma. Foram realizadas três experiências independentes. As barras de escala correspondem a 10 $\mu\text{m}$ .

**hTERT RPE-1**

**0 minutos de nocadazole**



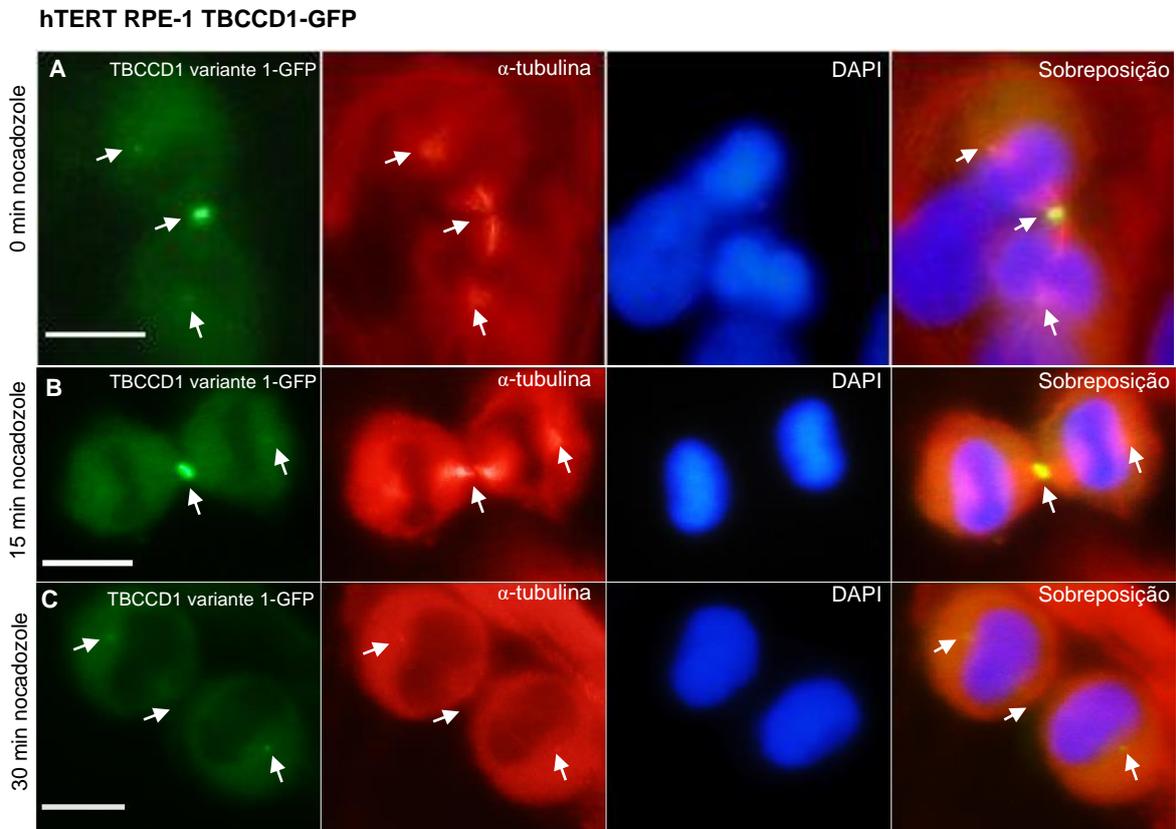
### 30 minutos de nocadazole (30 $\mu$ M)



**Figura 15 – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em sobreexpressão, em células hTERT RPE-1 tratadas com nocadazole.** Células hTERT RPE-1 foram transfetadas de modo a sobreexpressarem uma das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP, tendo-se utilizado como controlo células não transfetadas. 24 horas após a transfeção as células foram fixadas (A, B, C e D) ou tratadas com nocadazole (30  $\mu$ M) e incubadas no gelo durante 30 minutos e depois fixadas. De seguida, as células foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência tendo sido marcadas com o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam a localização do centrosoma. Os resultados são representativos de três experiências independentes. As escalas de barra correspondem a 10  $\mu$ m.

Nas Figuras 14 e 15 é possível observar que a TBCCD1 variante 1 (em fusão com a GFP no caso das células hTERT RPE-1 e em fusão com a RFP no caso das células HEK 293T) mantém a localização centrossomal apesar da despolimerização dos microtúbulos tanto nas células HEK 293T como nas células hTERT RPE-1. Devido à dificuldade de observar a rede de microtúbulos nas células HEK 293T, as restantes análises desta experiência serão realizadas nas células hTERT RPE-1. De modo semelhante observa-se que nas células a sobreexpressar as proteínas TBCCD1

variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP, apesar da despolimerização dos microtúbulos, estas mantêm a sua distribuição no citoplasma.



**Figura 16 – Localização celular da proteína TBCCD1-GFP em células hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP tratadas com nocadazole.** Células hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP que expressam constitutivamente a proteína TBCCD1-GFP (correspondente à variante 1) foram tratadas com nocadazole (30  $\mu$ M) durante 0, 15 ou 30 minutos (A, B e C, respetivamente). Depois de fixadas, as células foram tratadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam o centrossoma ou o corpo médio. Os resultados são representativos de três experiências independentes. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

Salienta-se ainda que apesar da localização da proteína TBCCD1 variante 1-GFP no centrossoma não ser afetada pela exposição das células ao nocadazole a sua localização no corpo médio é, (Figura 16) deixando de ser observada quando há despolimerização dos microtúbulos, mais concretamente, quando ocorre despolimerização dos microtúbulos acumulados no corpo médio. Estes microtúbulos são os últimos a despolimerizar, o que sugere que estes correspondem a uma população de microtúbulos mais resistente ao nocadazole com a qual a proteína TBCCD1 variante 1-RFP pode interagir.

Nos ensaios realizados utilizando a linha celular hTERT RPE-1 TBCCD1-GFP observaram-se resultados semelhantes aos obtidos para as células HEK 293T e hTERT RPE-1.

Desta forma, estes resultados sugerem que a localização das proteínas TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP é independente dos microtúbulos assim como a localização centrossomal da proteína TBCCD1 variante 1-GFP. No entanto, a localização da proteína TBCCD1 variante 1-GFP no corpo médio parece ser dependente dos microtúbulos, uma vez que nas células tratadas com nocadazole, quando há despolimerização dos microtúbulos desta região, não se observa a proteína nesta estrutura. Assim, pode existir uma interação entre a proteína TBCCD1 variante 1 e os microtúbulos ou com uma subpopulação dos mesmos, ou seja, aqueles mais resistentes ao nocadazole presentes na estrutura do corpo médio.

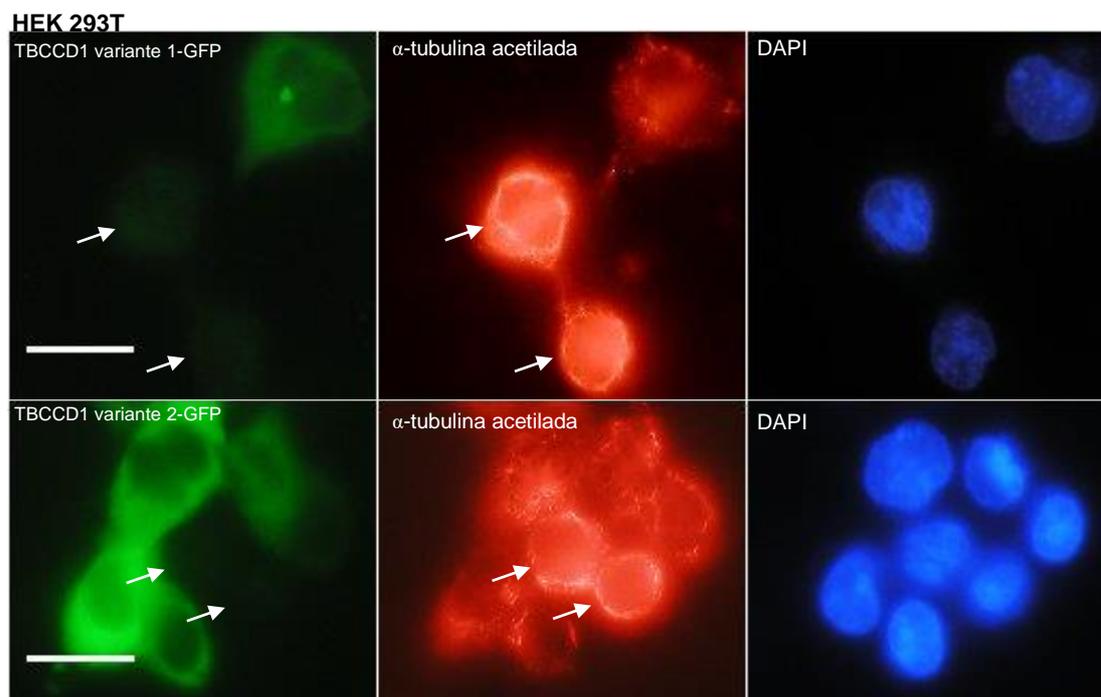
Existindo evidências que sugerem a interação das proteínas em estudo e os microtúbulos, colocou-se também a hipótese de a sobreexpressão de alguma das variantes afetar a resistência dos microtúbulos ao nocadazole. Assim, analisaram-se de novo estas experiências de modo a testar esta hipótese.

Observou-se então que as células com maiores níveis de sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP pareciam ter menor resistência ao nocadazole, ou seja, tinham menos microtúbulos polimerizados que as células não transfetadas quando sujeitas ao mesmo tempo de incubação com nocadazole (Figura 15, comparando E, F e G com D). Estas observações são relativas às células hTERT RPE-1 uma vez que nas células HEK 293T é difícil observar a rede de microtúbulos devido ao facto de estas células terem um pequeno volume de citoplasma em relação ao tamanho do núcleo. Apesar de não ter sido possível realizar uma análise quantitativa destas observações, colocou-se a hipótese de a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 ou TBCCD1 variante 3-GFP afetarem a estabilidade dos microtúbulos.

#### **4.3. Estudo do efeito da sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 na acetilação dos microtúbulos**

De modo a explorar a hipótese colocada a partir dos resultados das experiências com nocadazole, segundo a qual a sobreexpressão das proteínas variantes em estudo pode afetar a estabilidade dos microtúbulos, estudou-se o impacto da sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP nos níveis de microtúbulos acetilados na célula. Os microtúbulos da zona do corpo médio são enriquecidos em  $\alpha$ -tubulina acetilada assim como os microtúbulos mais estáveis que também são, geralmente, enriquecidos nesta modificação pós-traducional. De forma a testar se os níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada são afetados pela sobreexpressão de alguma das proteínas TBCCD1, transfetaram-se células HEK 293T com vetores de expressão de forma a promover a sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. Depois de fixadas, as células foram processadas para análise por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada. Nesta experiência utilizaram-se células HEK 293T por serem as células em que se obteve maior eficiência de transfeção e também por terem uma maior população de microtúbulos acetilados do que as células hTERT RPE-1 em condições fisiológicas de cultura.

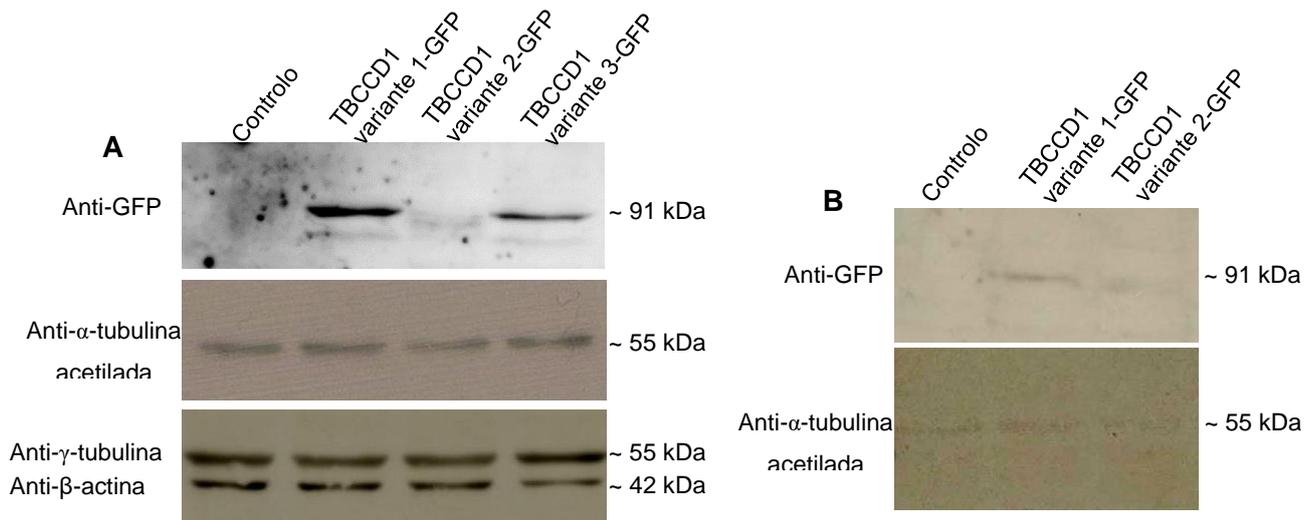
Através da análise destas preparações, observou-se que as células com maiores níveis de sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP parecem ter menores níveis de microtúbulos acetilados quando comparadas com células com menores níveis de expressão destas proteínas (Figura 17). Colocou-se então a hipótese de a sobreexpressão de cada uma das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP poder afetar os níveis de acetilação dos microtúbulos. Devido à dificuldade de realizar uma análise quantitativa a partir desta experiência, especialmente devido ao reduzido volume de citoplasma nestas células, foi necessário recorrer a outro método para testar a hipótese colocada.



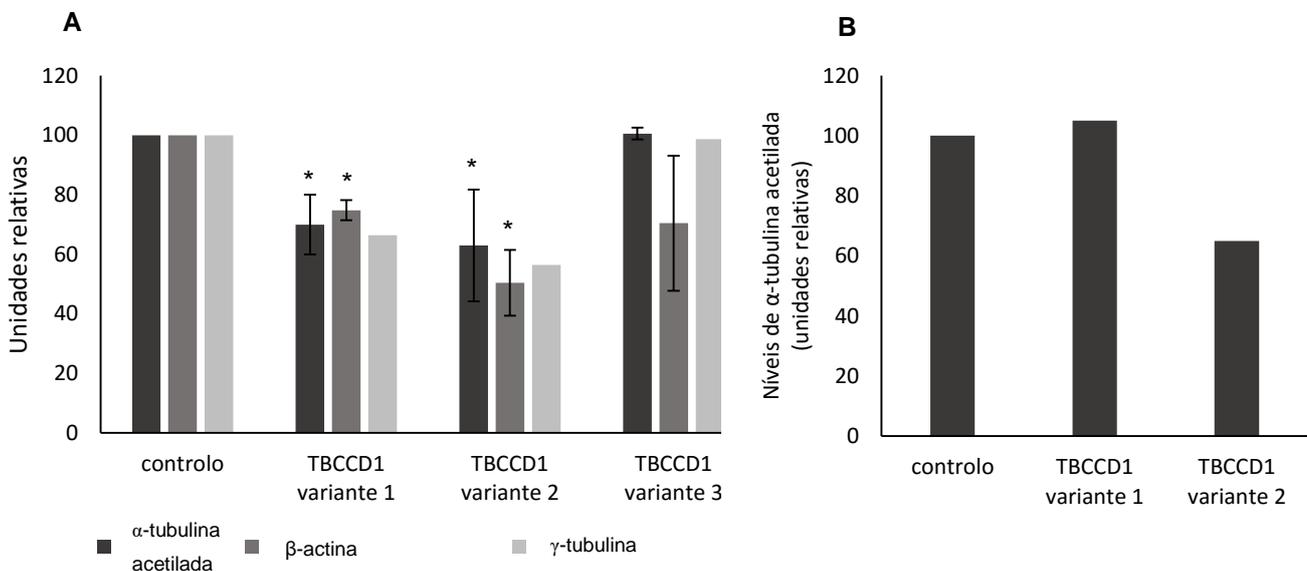
**Figura 17 – Marcação de  $\alpha$ -tubulina acetilada em células HEK 293T a sobreexpressarem TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP.** Células HEK 293T foram transfetadas de modo a sobreexpressarem a proteína TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP e 24 horas depois foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam as células com menores níveis de expressão da proteína TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP. As imagens são representativas de uma experiência independente. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

Assim, de forma a testar esta hipótese, prepararam-se extratos proteicos correspondentes à fracção citosólica de células HEK 293T transfetadas com cada um dos vetores contendo a sequência de cada uma das variantes identificadas. Como já referido, a eficiência de transfeção obtida para as células hTERT RPE-1 foi muito reduzida, o que limitou as diferentes abordagens, pelo que não foi possível realizar esta experiência utilizando esta linha celular.

Depois de preparados os extratos, estes foram quantificados pelo método de Bradford, de forma a todas as amostras apresentarem a mesma quantidade de proteína total, e analisados por SDS-PAGE 10 %. Depois de analisadas em gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi corada com Ponceau S. Esta coloração da membrana foi posteriormente utilizada como controlo da quantidade de proteína analisada em cada faixa (controlo de aplicação). A membrana foi depois processada para *Western blot*, utilizando anticorpos policlonais para a  $\alpha$ -tubulina acetilada e para a  $\gamma$ -tubulina. Como controlo, foram preparados extratos de células não transfetadas.



**Figura 18 – Análise dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e  $\beta$ -actina em extratos proteicos de células HEK 293T em sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP.** Células HEK 293T foram transfectadas de modo a sobreexpressarem TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP e foram preparados extratos solúveis/citosólicos (A) ou totais (B). Foram aplicados 50  $\mu$ g de extrato proteico citosólico em cada poço (A) e nos extratos totais (B) aplicaram-se 20  $\mu$ L por poço para análise por SDS-PAGE 10%. Realizaram-se depois ensaios de *Western blot* com anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina acetilada, anti- $\gamma$ -tubulina e anti- $\beta$ -actina para analisar os níveis destas proteínas em relação aos níveis nas células não transfectadas (controlo) e anti-GFP como controlo de transfecção.



**Figura 19 – Níveis relativos de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina em células HEK 293T a sobreexpressar as proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP.** Células HEK 293T foram transfectadas de modo a sobreexpressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. Foram então preparados extratos citosólicos/solúveis (A) ou totais (B), aplicados num gel SDS-PAGE 10% e analisados por *western blot* utilizando os anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina acetilada, anti- $\gamma$ -tubulina e anti- $\beta$ -actina para analisar os níveis destas proteínas em relação às células não transfectadas. As bandas obtidas foram quantificadas e a normalização realizada utilizando a coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau S. Os resultados apresentados em (A) resultam de três ( $\alpha$ -tubulina acetilada), duas ( $\beta$ -actina) ou uma ( $\gamma$ -tubulina) experiências independentes e em (B) de uma experiência. \* -  $p < 0,05$ .

Nas Figuras 18 e 19 pode-se observar que os níveis de  $\gamma$ -tubulina diminuem quando há sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP, observando-se uma diminuição de 34 % no primeiro caso e de 43 % no segundo. A sobreexpressão de TBCCD1 variante 3-GFP não parece afetar os níveis de  $\gamma$ -tubulina. No entanto, estes resultados correspondem apenas a uma experiência, pelo que terá que se repetir a experiência para validar o resultado e para obter significado estatístico.

Quanto aos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada, observa-se que quando há sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 1-GFP o nível de  $\alpha$ -tubulina acetilada é  $69,89 \% \pm 10,01$ , em relação às células não transfetadas. No caso da sobreexpressão de TBCCD1 variante 2-GFP, o nível de  $\alpha$ -tubulina acetilada em relação às células não transfetadas é  $62,91 \% \pm 18,78$ . Já a sobreexpressão de TBCCD1 variante 3-GFP não parece afetar os níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada, uma vez que os níveis determinados são de  $100,50 \% \pm 2,00$ . Este resultado relativo aos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada é concordante com as observações das experiências realizadas por imunofluorescência, observando-se uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada nas células a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP.

Os níveis de actina, neste caso mais especificamente  $\beta$ -actina, foram também analisados devido à identificação do domínio CARP nas proteínas em estudo. Nas Figuras 18 e 19 encontram-se os resultados obtidos, nos quais se pode observar que a sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP ou de TBCCD1 variante 2-GFP provoca uma redução dos níveis de  $\beta$ -actina. No caso da sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP os níveis diminuem para  $74,79 \% \pm 3,34$  e com a sobreexpressão de TBCCD1 variante 2-GFP os níveis diminuem para  $50,38 \pm 11,08$ . Quanto à sobreexpressão de TBCCD1 variante 3-GFP, não parece afetar os níveis de  $\beta$ -actina, tendo-se determinado que os seus níveis neste caso são  $70,42 \% \pm 22,71$ , não sendo estatisticamente diferentes dos níveis obtidos para o controlo.

Esta experiência foi também realizada utilizando extratos totais (Figuras 18B e 19 B), na qual se analisaram os níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada. Observou-se também que a sobreexpressão de TBCCD1 variante 2-GFP leva a uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada. Os níveis determinados foram 105 % no caso da sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP e 65 % no caso da sobreexpressão de TBCCD1 variante 2-GFP. Quanto aos níveis em sobreexpressão de TBCCD1 variante 3-GFP, não foi possível determiná-los. Esta experiência foi realizada apenas uma vez, pelo que terá que ser repetida de forma a conferir significado estatístico.

Assim, estes resultados indicam que a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP e TBCCD1 variante 2-GFP levam a uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada. Para além disso, parecem também provocar uma diminuição nos níveis de  $\gamma$ -tubulina e de  $\beta$ -actina. Por sua vez, a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 3-GFP não parece afetar os níveis de nenhum dos componentes do citoesqueleto analisados.

Estes resultados sugerem também que as variantes em estudo devem ter diferentes funções celulares, uma vez que têm diferentes efeitos nos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e de  $\beta$ -actina.

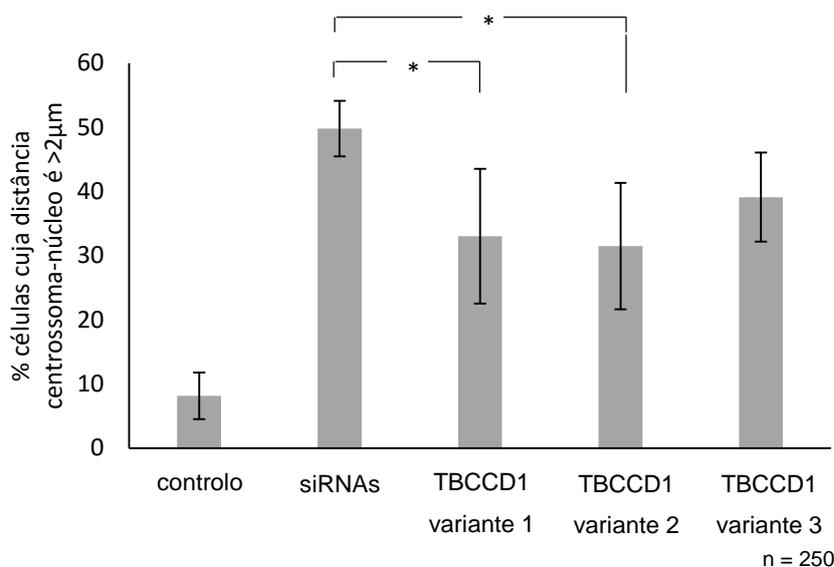
#### **4.4. Estudo de reversão de fenótipo do *knockdown* do *tbccd1***

Os resultados até agora apresentados neste estudo parecem sugerir que as três variantes identificadas e aqui estudadas podem ter diferentes funções celulares, por exemplo, por terem diferentes localizações celulares e diferentes efeitos nos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada. Estas observações em conjunto com o facto de atualmente se saber que os siRNAs utilizados no estudo anterior (Gonçalves *et al.*, 2010) provocam o *knockdown* não de uma mas das três variantes identificadas, levantou a questão de os fenótipos observados poderem ser provocados apenas por uma das variantes ou por uma combinação das mesmas.

Foram então realizados ensaios em células hTERT RPE-1 em que se realizou o *knockdown* utilizando os mesmos siRNAs, o que leva a uma diminuição dos níveis das três variantes, reproduzindo assim as experiências realizadas por Gonçalves *et al.*, 2010. De seguida, transfetaram-se as mesmas células com vetores de expressão, promovendo assim a sobreexpressão de uma das proteínas: TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. Depois de fixadas e processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-pericentrina ou anti- $\gamma$ -tubulina para marcação do centrossoma as preparações foram fotografadas e analisadas. Para esta análise, foi determinada a percentagem de células em que a distância centrossoma-núcleo era superior a 2  $\mu$ m. A percentagem de células com fenótipo nas preparações transfetadas com siRNAs foi determinada e utilizou-se como controlo da eficiência desta transfeção as preparações de células não transfetadas (nem com siRNAs nem com vetores de expressão).

A percentagem de células com distância centróssoma-núcleo superior a 2  $\mu\text{m}$  nas preparações de células transfetadas com os vetores de expressão após transfeção com siRNAs foi então comparada com a percentagem calculada para as células transfetadas apenas com siRNAs.

Desta forma, foi possível testar se a sobreexpressão de cada uma das variantes é capaz de reverter o fenótipo do aumento da distância centróssoma-núcleo.



**Figura 20 – Análise da distância centróssoma-núcleo em células com *knockdown* do *tbccd1*, após sobreexpressão das variantes TBCCD1.** Células hTERT RPE-1 foram transfetadas com siRNAs para o *tbccd1* e, 72 horas após a primeira transfeção foram transfetadas de modo a sobreexpressarem uma das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. Depois de fixadas e processadas para análise por microscopia de imunofluorescência para marcação do centróssoma, foi determinada a percentagem de células com uma distância centróssoma-núcleo superior a 2  $\mu\text{m}$ . Como controlo foram utilizadas células não transfetadas. Os resultados correspondem a três experiências independentes. \* -  $p < 0,05$ .

Na Figura 21 é possível observar que a experiência de *knockdown* do *tbccd1* através de siRNAs realizada em Gonçalves *et al.*, 2010 foi reproduzida com sucesso neste estudo, tendo-se obtido uma percentagem de células com fenótipo semelhante à obtida no estudo anterior (aproximadamente 50%).

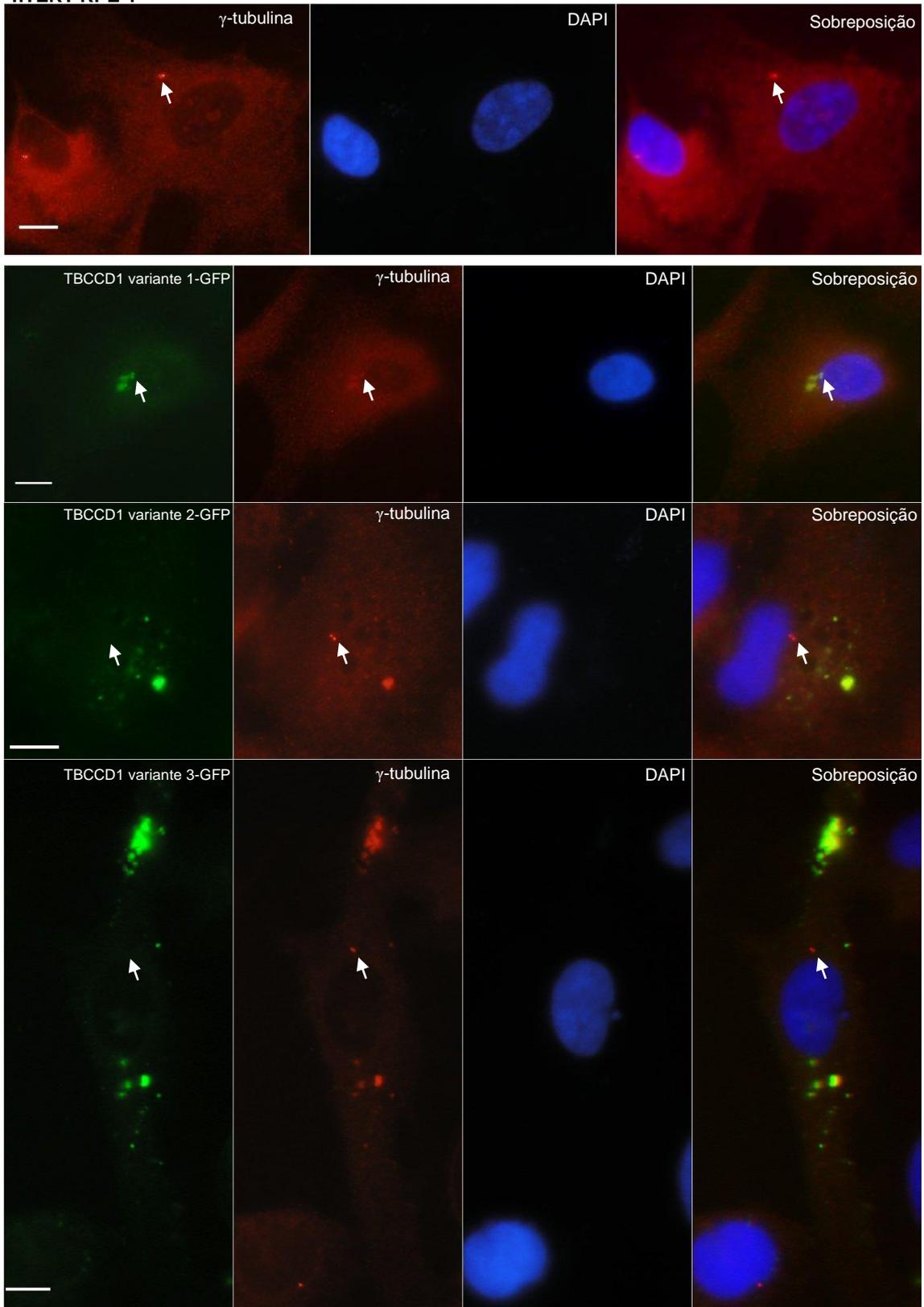
Após validada a eficiência da transfeção com os siRNAs, observa-se então que a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP ou TBCCD1 variante 2-GFP levam a uma diminuição da percentagem de células com uma distância centróssoma-núcleo superior a 2  $\mu\text{m}$  (Figura 21). Em ambos os casos, a percentagem de células com fenótipo é estatisticamente diferente do valor obtido nas células transfetadas apenas com siRNAs. Assim, estes resultados indicam que as proteínas TBCCD1 variante 1-

GFP e TBCCD1 variante 2-GFP são capazes de reverter parcialmente o fenótipo do aumento da distância centróssoma-núcleo.

Estes resultados sugerem então que o fenótipo do aumento da distância centróssoma-núcleo não deve ser provocado apenas por uma das variantes. Para além disso, colocam-se também duas hipóteses (i) apesar de as três variantes poderem ter funções celulares diferentes são capazes de se substituir, ou (ii) existe algum mecanismo regulatório entre as variantes no qual a sobreexpressão de uma variante provoca uma alteração nos níveis das restantes de modo a compensar o efeito do *knockdown*. Como já foi referido, não é possível definir siRNAs específicos para cada variante, devido à elevada semelhança das sequências, o que dificulta o estudo do efeito de cada uma das variantes através desta abordagem.

Durante a análise destas experiências foi também possível observar que nas células a sobreexpressar as proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP se observa a formação de agregados de  $\gamma$ -tubulina (Figura 22).

Por um lado, observa-se um aumento dos agregados de  $\gamma$ -tubulina, por outro lado observa-se que estes agregados parecem co-localizar com as diferentes proteínas TBCCD1. Assim, estas observações sugerem a presença das duas proteínas nos agregados e também que as proteínas TBCCD1 podem estar envolvidas no recrutamento da  $\gamma$ -tubulina, uma vez que se observa co-localização. Para além disso, no caso dos agregados formados pela proteína TBCCD1 variante 1-GFP, estes tendem a formar-se na região em torno do centróssoma.

**hTERT RPE-1**

**Figura 21 – Agregados de  $\gamma$ -tubulina em células a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP.** Células hTERT RPE-1 foram transfetadas com siRNAs para o *tbccd1e*, 72 horas após a primeira transfeção foram transfetadas de modo a sobreexpressarem TBCCD1 variante 1-GFP (B), TBCCD1 variante 2-GFP (C), ou TBCCD1 variante 3-GFP (D). Como controle foram transfetadas células com siRNAs mas não com vetores de expressão. Depois de fixadas foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina. O DNA foi corado com DAPI. As imagens são representativas de duas experiências independentes. As setas indicam o local do centrosoma e as barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

#### 4.5. Estudo da função regulatória da sobreexpressão de cada variante do TBCCD1

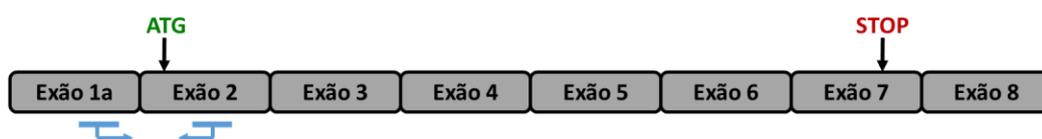
Pela análise da sequência do transcrito da variante 3, observa-se que este é semelhante ao transcrito da variante 1 à exceção da existência de uma pequena grelha de leitura aberta (uORF) na sua região 5'. Esta uORF é limitada a montante pelo ATG alternativo e uma região comum à variante 2, e a jusante por três codões *stop* antes do ATG designado canônico comum à variante 1, como se pode observar na Figura 23.

De modo a testar a existência de uma relação regulatória entre as variantes da TBCCD1, realizou-se um estudo recorrendo a RT-qPCR.

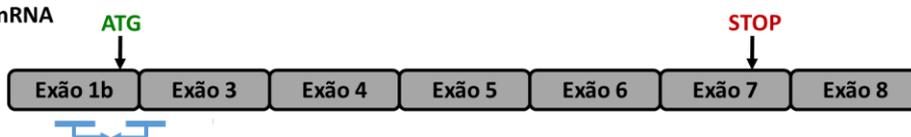
Assim, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços e transfetadas no dia seguinte. Vinte e quatro horas após a transfeção extraiu-se RNA total a partir do qual se preparou o cDNA utilizado nas experiências de RT-qPCR. Para isso, foram utilizados *primers* específicos para cada uma das três variantes que assim permitissem distinguir entre estas e de modo a que os níveis observados fossem relativos apenas aos transcritos endógenos uma vez que o *primer forward* de cada par foi desenhado de forma a emparelhar na região 5'UTR (Figura 23). Desta forma, foi possível perceber se a sobreexpressão de uma variante afeta os níveis de transcritos das outras variantes ou de si própria.

Para além disso, estudou-se também os níveis dos transcritos das três variantes, em células não transfetadas, nas linhas celulares hTERT RPE-1 e HeLa.

tbccd1 variante 1 - mRNA



tbccd1 variante 2 - mRNA



tbccd1 variante 3 - mRNA

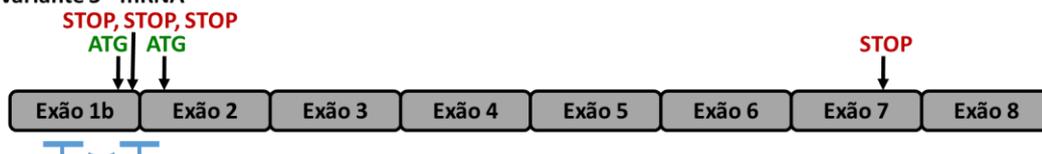


Figura 22 – Representação esquemática dos locais de emparelhamento dos *primers* nos exões constituintes de cada um dos três transcritos identificados para o *tbccd1*, resultantes de *splicing* alternativo, nas experiências de RT-qPCR. A azul estão representados os locais de emparelhamento dos *primers* utilizados e as setas indicam a sua orientação.

Quadro 14 – Quantidades relativas, obtidas por RT-qPCR, de cada um dos três transcritos do *tbccd1* identificados em células HEK 293T a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP e em células RPE e HeLa em relação aos níveis de células HEK 293T não transfetadas.

<i>Primers</i> <i>Células</i>		<i>tbccd1</i>	<i>tbccd1</i>	<i>tbccd1</i>
		variante 1	variante 2	variante 3
HEK 293T	Não transfetadas	1	1	1
	TBCCD1 variante 1-GFP	2,69	21,96	2,49
	TBCCD1 variante 2-GFP	1,25	0,84	0,76
	TBCCD1 variante 3-GFP	1,08	0,96	4206,29
hTERT RPE-1		4,78	2,74	10,65
HeLa		3,95	4,01	4,57

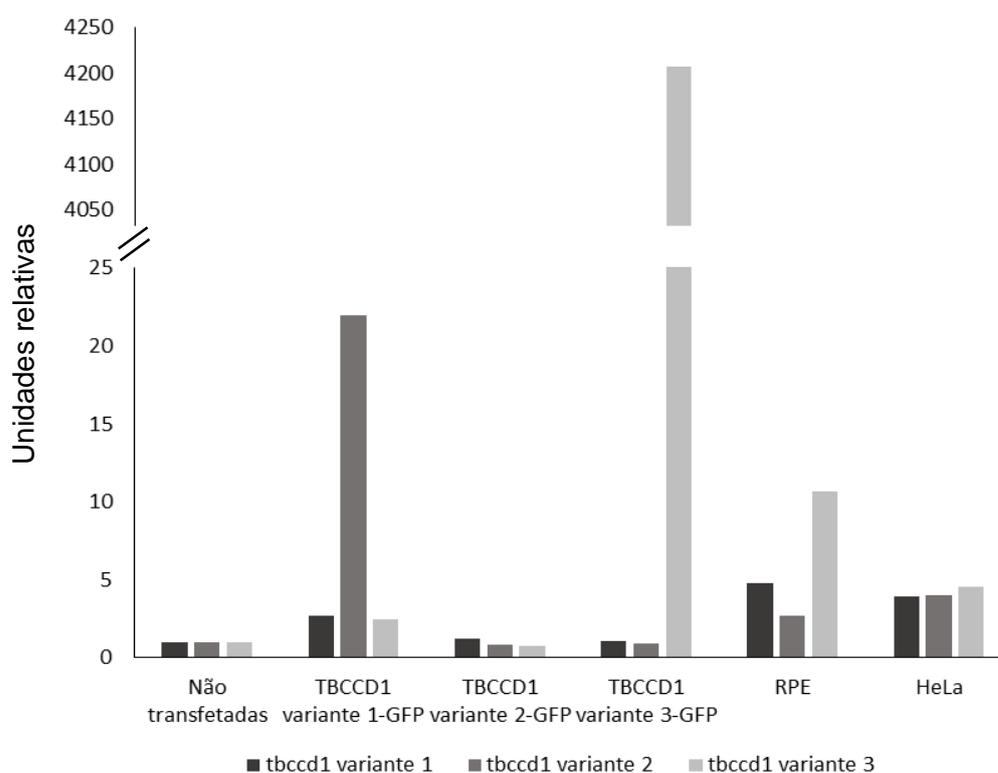


Figura 23 – Representação gráfica da quantidade relativa dos transcritos de cada variante do *tbccd1*, obtidos por RT-qPCR, em células HEK 293T a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP e em células RPE e HeLa, em relação aos níveis de células HEK 293T não transfetadas.

Pela análise do Quadro 14 e da Figura 23, pode-se observar que as células HEK 293T possuem os três transcritos (células não transfetadas). Observa-se também que

a sobreexpressão de TBCCD1 variante 1-GFP leva a um aumento dos níveis dos transcritos das três variantes identificadas, sendo que o aumento do transcrito da variante 2 é mais acentuado, aumentando 21,96 vezes. A sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 2-GFP leva a um aumento dos níveis do transcrito da variante 1 (1,25 vezes), e a uma diminuição dos níveis dos transcritos das variantes 2 (0,84 vezes) e 3 (0,76 vezes). Já a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 3-GFP não afeta os níveis dos transcritos das variantes 1 e 2, no entanto, aumenta os níveis dos seus próprios transcritos (4206,29 vezes).

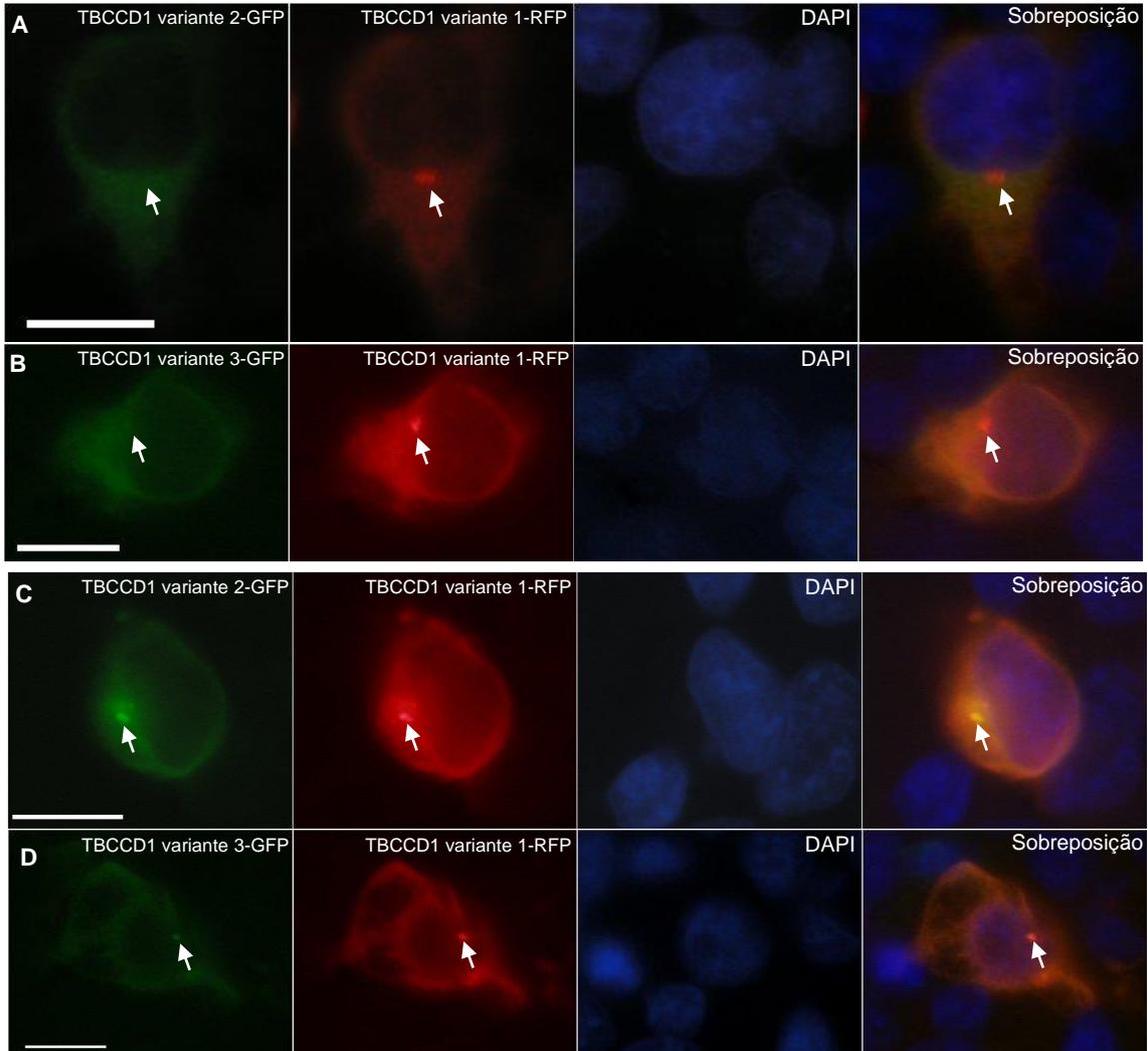
Para além disso, foi também possível observar que todas as linhas analisadas, nomeadamente, hTERT RPE-1 e HeLa possuem os três transcritos. No entanto, tanto as células hTERT RPE-1 como as células HeLa têm maiores níveis dos transcritos das três variantes em relação às células HEK 293T. Para além disso, as três linhas celulares têm também diferentes relações de abundância entre as três variantes, observando-se diferentes razões entre as quantidades relativas de cada uma.

Estes resultados correspondem apenas a uma experiência independente realizada em triplicado, pelo que será necessário repeti-la de forma a confirmar os resultados e a conferir significado estatístico. No entanto, estes resultados sugerem que existe uma relação regulatória entre as variantes, em que a sobreexpressão de uma das variantes leva a uma alteração dos níveis de transcritos das restantes ou de si própria.

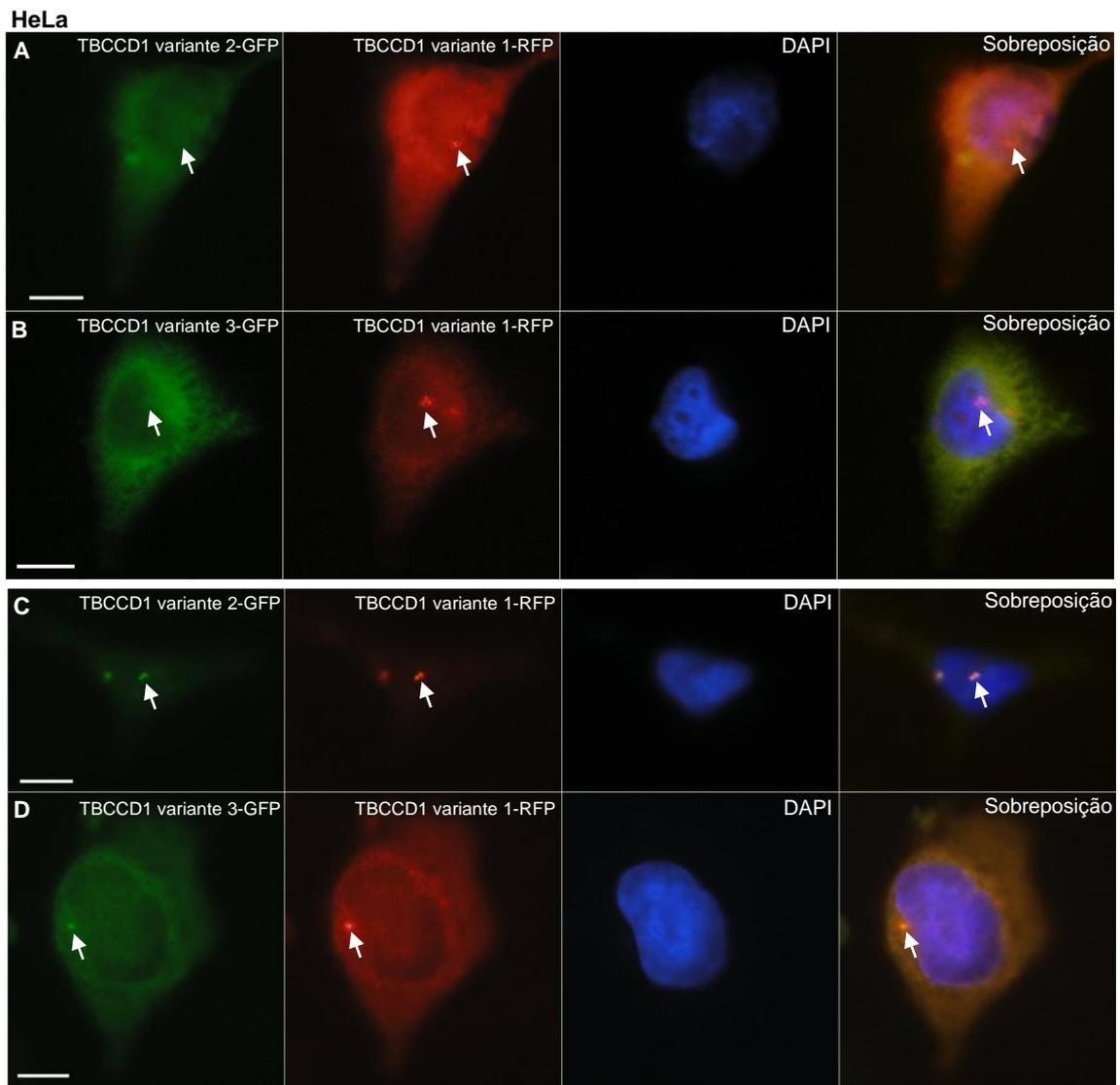
Assim, e tendo em conta que as três variantes identificadas têm diferentes localizações celulares colocou-se a hipótese de as variantes poderem ter uma função regulatória entre si, podendo a localização celular de cada uma das variantes ser afetada pela expressão das outras. De forma a testar esta hipótese, realizaram-se ensaios em que se co-transfetaram células HEK 293T e HeLa com duas das variantes de forma a sobreexpressar duas variantes em simultâneo (TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP). Como já foi referido, devido à reduzida eficiência de transfeção obtida para as células hTERT RPE-1 não foi possível realizar esta experiência nesta linha celular.

Na maioria das células co-transfetadas, nas duas linhas celulares, não se observou alteração da localização celular de nenhuma das variantes. No entanto, observaram-se em todas as preparações uma percentagem de células em que se detetava uma co-localização das duas proteínas em sobreexpressão, que parece corresponder à localização do centróssoma (Figuras 24 e 25).

### HEK 293T



**Figura 24 – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP em células HEK 293T co-transfetadas.** Células HEK 293T foram transfetadas de modo a sobreexpressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP (A e C) ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP (B e D). Depois de fixadas foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam a localização do centrôssoma. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.



**Figura 25 – Localização das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em células HeLa co-transfetadas.** Células HeLa foram transfetadas de modo a sobreexpressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP (A e C) ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP (B e D). Depois de fixadas foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam a localização do centrôssoma. As barras de escala correspondem a 10  $\mu\text{m}$ .

De modo a perceber se estas observações de co-localização das variantes no centrôssoma têm significado estatístico, tornou-se necessário realizar uma análise quantitativa dos resultados obtidos. No entanto, devido à baixa eficiência de transfeção obtida nas células HeLa não foi possível realizar esta análise para esta linha celular, pelo que os seguintes resultados são referentes à linha celular HEK 293T.

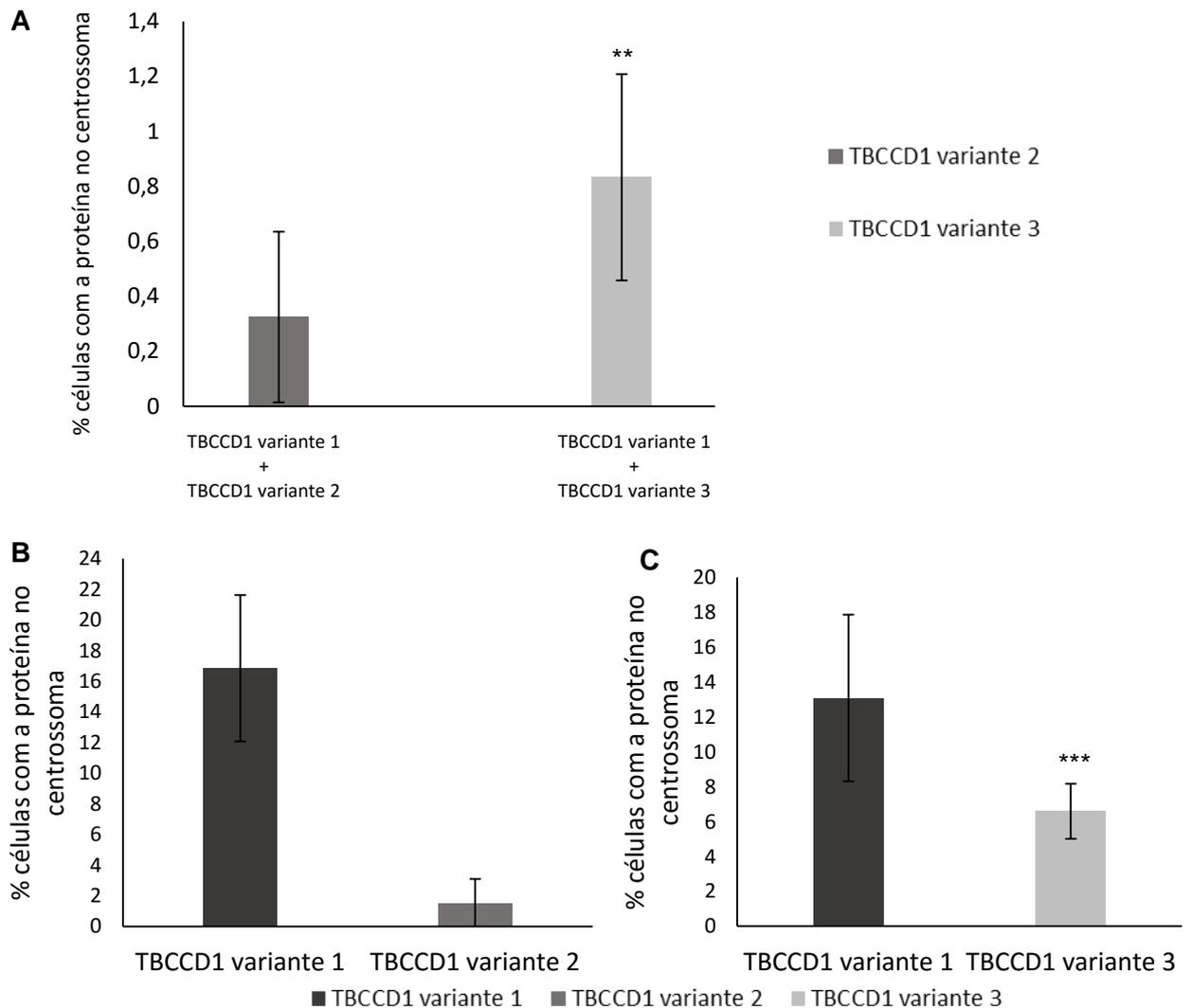
As células foram então contadas e agrupadas por categorias, nomeadamente, (i) células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 1-RFP no centrôssoma, (ii) células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 2-GFP no centrôssoma (ou

TBCCD1 variante 3-GFP nas células transfetadas com esta variante) ou (iii) células em que se observa ambas as proteínas em sobreexpressão no centróssoma. Não foram observadas células em que apenas a proteína TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP se encontrassem sozinhas no centróssoma. Quanto à proteína TBCCD1 variante 1-RFP, era quase sempre observada no centróssoma. O facto de nem sempre se observar esta proteína no centróssoma deve-se essencialmente a dois motivos, (i) quando os níveis de sobreexpressão são muito elevados não é possível distinguir o centróssoma uma vez que há formação de agregados da proteína nesta região, e (ii) nas células com níveis de expressão muito baixos estes podem não ser suficientes para que seja detetada a marcação. Para além disso, nas fotos existem células cujo centróssoma não aparece no plano de focagem.

No entanto, sabe-se que esta proteína é centróssomal uma vez que em Gonçalves 2010 foi utilizado um anticorpo anti-TBCCD1 e observou-se marcação do centróssoma em todas as células. Assim, por estes motivos, todos os valores apresentados nesta análise podem estar subestimados.

Determinou-se então a percentagem de células em que se observava ambas as proteínas em sobreexpressão (TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP) no centróssoma em relação ao número total de células co-transfetadas. Estes resultados encontram-se na Figura 27, em que a percentagem de células nas quais se deteta a proteína TBCCD1 variante 1-RFP no centróssoma é  $16,85 \% \pm 4,78$  no caso das células a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP, e  $13,09 \% \pm 2,92$  no caso das células a sobreexpressar TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP. No entanto, esta observação é justificada pelos motivos já referidos.

Assim, determinou-se a percentagem de células em que ambas as proteínas em sobreexpressão são detetadas no centróssoma, desta vez em relação ao número de células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 1-RFP no centróssoma (Figura 26). Esta quantificação é válida uma vez que não foram observadas células em que apenas as proteínas TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP se encontrassem no centróssoma.

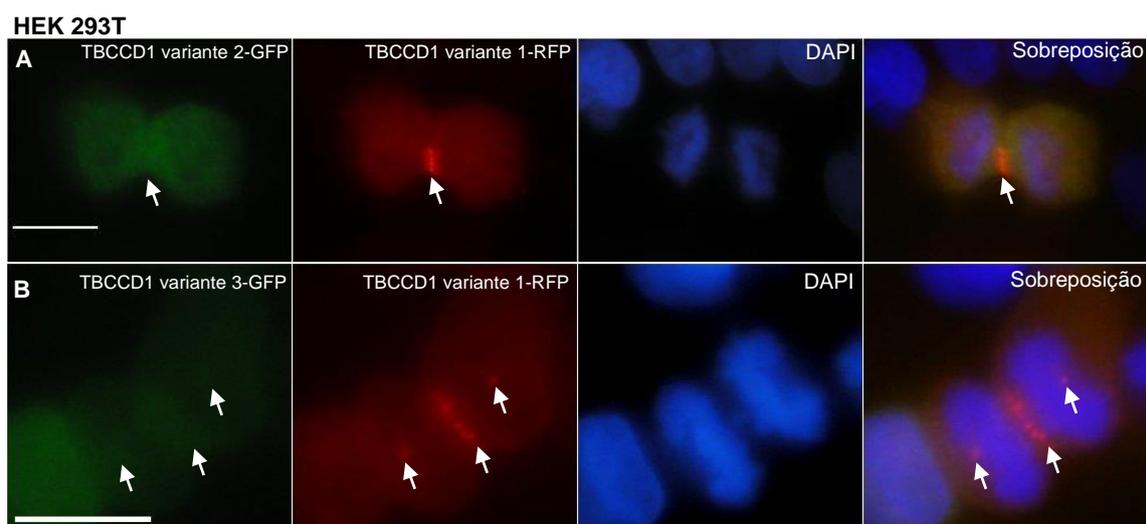


**Figura 26 – Percentagem de células com a proteína TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP no centróssoma.** Células HEK 293T foram transfetadas de modo a sobreexpressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP. Determinou-se então o número de células em que se observava cada uma das proteínas no centróssoma. (A) Percentagem de células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 2-GFP ou a proteína TBCCD1 variante 3-GFP no centróssoma em relação ao número total de células co-transfetadas. (B) Percentagem de células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 2-GFP no centróssoma em relação às células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 1-RFP no centróssoma. (C) Percentagem de células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 3-GFP no centróssoma em relação às células em que se observa a proteína TBCCD1 variante 1-RFP no centróssoma. (n = 400) \*\* -  $p < 0,01$  ; \*\*\*- $p < 0,005$ .

Através desta análise, no caso da transfeção simultânea com TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP, a percentagem de células em que se observa ambas as proteínas sobreexpressas no centróssoma é  $0,32\% \pm 0,31$  das células, pelo primeiro método aplicado, ou  $1,52\% \pm 1,57$ , pelo segundo método, não sendo este resultado estatisticamente significativo quando se compara com as células que sobreexpressam apenas a TBCCD1 variante 2-GFP. Nas células transfetadas simultaneamente com TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP a percentagem de células em que se observa ambas as proteínas em sobreexpressão no centróssoma é  $0,83\% \pm 0,38$ , pelo primeiro método, ou  $6,60\% \pm 2,35$ , pelo segundo método. Neste caso, o resultado é estatisticamente significativo, em ambos os métodos utilizados.

Os valores obtidos relativos à co-localização das variantes no centróssoma são baixos e apenas a observação da co-localização das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP é estatisticamente significativa. No entanto, esta co-localização foi observada em todas as preparações das duas linhas celulares estudadas.

Quanto à localização celular de cada uma das proteínas em células em mitose (Figura 27), observa-se que a sobreexpressão combinada de TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP não parece afetar a localização de nenhuma das variantes. Contudo, não é possível realizar uma análise quantitativa devido ao reduzido número de células em divisão co-transfetadas nestas experiências.



**Figura 27 – Localização celular das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP, TBCCD1 variante 2-GFP e TBCCD1 variante 3-GFP, em células HEK 293T co-transfetadas, em divisão.** Células HEK 293T foram transfetadas de modo a sobreexpressarem as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP (A) ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP (B). Depois de fixadas foram processadas para análise por microscopia de imunofluorescência. O DNA foi corado com DAPI. As setas indicam a localização do centróssoma ou do corpo médio. As barras de escala correspondem a 10  $\mu$ m.

Observou-se que quando se sobreexpressa simultaneamente as proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP, a última é também observada no centrossoma, apesar de isto ocorrer numa pequena percentagem das células. Assim, apesar de parecer existir uma relação de regulação entre as variantes em estudo, esta não parece afetar a localização celular das proteínas.

## 5. Discussão e conclusões

Nos estudos anteriores sobre o *tbccd1* humano foi identificada uma proteína (a proteína TBCCD1 variante 1) por ele codificada. Esta proteína tem uma localização centrossomal ao longo de todo o ciclo celular, encontra-se também nos corpos basais de cílios primários e possui uma *pool* citoplasmática. Para além disso, localiza-se também no corpo médio em células em divisão (Gonçalves *et al.*, 2010). A função celular desta proteína não está completamente esclarecida, no entanto, sabe-se que o *knockdown* do *tbccd1* provoca vários fenótipos descritos em Gonçalves *et al.*, 2010, nomeadamente, aumento da distância centrossoma-núcleo, fragmentação do complexo de Golgi, diminuição da velocidade de migração das células em ensaios de fecho da ferida, um atraso/paragem no ciclo celular e aumento do tamanho das células.

Com a identificação dos dois novos transcritos alternativos, tal como já foi descrito neste trabalho, e sabendo que os fenótipos descritos resultam do *knockdown* das três variantes resultantes de *splicing* alternativo identificadas, tornou-se necessário estudá-los de forma individual. Assim, o estudo da função celular de cada um dos transcritos foi o principal objetivo deste trabalho.

### 5.1. As proteínas variantes da TBCCD1 têm diferentes localizações celulares

Começou por se estudar a localização celular de cada uma das proteínas (TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3) codificadas pelos três transcritos identificados, em fusão com um gene repórter, GFP ou RFP, e observou-se que as variantes têm diferentes localizações celulares. A proteína TBCCD1 variante 1 localiza-se no centrossoma, no corpo médio e nos corpos basais de cílios primários, o que está de acordo com os resultados anteriores (Gonçalves *et al.*, 2010). Já as proteínas TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 têm uma localização citoplasmática tanto em células sem cílios como em células com cílios primários. As diferentes localizações na célula sugerem então que as três variantes podem ter diferentes funções celulares. Esta hipótese é também suportada pelos recentes resultados obtidos num estudo, desenvolvido no nosso grupo de investigação, de identificação das proteínas interatuantes das proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2. Nesse estudo, identificaram-se as proteínas interatuantes recorrendo ao sistema de BioID, tendo-se

observado que o conjunto de proteínas interatuantes com a proteína TBCCD1 variante 1 são diferentes do identificado para a proteína TBCCD1 variante 2 (Camelo, 2015). Para além disso, foram identificadas mais proteínas como possíveis interatuantes da proteína TBCCD1 variante 1 do que as identificadas para a TBCCD1 variantes 2, o que pode ser justificado pela diferente localização celular das duas proteínas, e pelo facto de a TBCCD1 variante 1 ter uma localização centrossomal e o centrossoma ser também uma plataforma de interação de proteínas (Elric and Etienne-Manneville, 2014).

## **5.2. As proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2 parecem afetar a dinâmica de microtúbulos**

Nos estudos de despolimerização de microtúbulos com nocadazole, observou-se que a localização da proteína TBCCD1 variante 1 no corpo médio é dependente dos microtúbulos, apesar de a sua localização centrossomal não o ser. Esta perda da localização do corpo medio observada nas células tratadas com nocadazole sugere uma interação da proteína TBCCD1 variante 1 com os microtúbulos ou com uma população destes. Para além disso, as células a sobreexpressar a proteína TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 ou TBCCD1 variante 3-GFP parecem ser mais sensíveis ao nocadazole, ou seja, para o mesmo tempo de exposição observa-se que perdem mais microtúbulos ou já não têm microtúbulos quando as não transfetadas ainda os têm (Figuras 15). No entanto, devido à dificuldade da quantificação desta observação, este fenótipo não está quantificado.

Assim, colocou-se a hipótese de a sobreexpressão das proteínas em estudo afetarem os microtúbulos acetilados uma vez que os microtúbulos da zona do corpo médio são enriquecidos nesta modificação e que estes estão também associados a microtúbulos mais estáveis e menos dinâmicos (Matsuyama *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2015). Realizaram-se então ensaios de *Western blot*, analisando extratos citosólicos e observou-se que a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP e TBCCD1 variante 2-GFP provocam uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada para 69,89 %  $\pm$  10,01 e 62,91 %  $\pm$  18,78, respetivamente.

Estes resultados obtidos por *Western blot*, podem assim justificar os resultados obtidos nas experiências em que se induziu a despolimerização dos microtúbulos. A diminuição da acetilação da  $\alpha$ -tubulina sugere que a sobreexpressão das proteínas TBCCD1 variante 1 ou TBCCD1 variante 2 levam a uma alteração da dinâmica dos

microtúbulos, uma vez que níveis de acetilação mais baixos estão associados a uma menor dinâmica (Gold *et al.*, 2014, Yu *et al.*, 2015). Esta alteração pode então estar relacionada com a maior sensibilidade ao nocadazole observada nas células transfetadas, por existir uma diminuição da dinâmica e/ou estabilidade dos microtúbulos.

No estudo desenvolvido para a identificação das proteínas interatuantes das proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2, anteriormente referido, foram identificadas as proteínas Sirt1 e Sirt2 como interatuantes das proteínas TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 1, respetivamente (Camelo, 2015). Esta observação pode então estar relacionada com a diminuição da acetilação da  $\alpha$ -tubulina uma vez que as proteínas Sirt1 e Sirt2 são desacetilases (Davenport *et al.*, 2014, North *et al.*, 2003, Skoge *et al.*, 2014). A Sirt2 foi já descrita como tendo função de desacetilase da tubulina (North *et al.*, 2003, Skoge *et al.*, 2014). Quanto à Sirt1, como referido, está descrita como sendo uma desacetilase, no entanto, apesar de ainda não ter sido relacionada com a desacetilação dos microtúbulos, os resultados apresentados neste estudo apontam nesse sentido.

No mesmo estudo, foi também identificado um conjunto de proteínas mitocondriais e de ligação ao DNA como sendo interatuantes da proteína TBCCD1 variante 2. Este resultado pode também estar relacionado com a alteração dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada, por exemplo, porque os mitocôndrios se deslocam no citoplasma preferencialmente interagindo com microtúbulos acetilados (Friedman *et al.*, 2011). Para além disso, em *Trypanosoma brucei*, a proteína TBCCD1 parece interagir com o DNA mitocondrial, observando-se que o seu *knockdown* provoca a desorganização do cinotoplasto que corresponde a uma pilha de várias cópias do DNA (André *et al.*, 2013).

Sabe-se também que na região do complexo de Golgi há uma acumulação de microtúbulos acetilados e que estes estão implicados na organização do mesmo (Thyberg and Moskalewski, 1993, Ryan *et al.*, 2012). Está também descrito que os microtúbulos acetilados apresentam uma distribuição polarizada enriquecida no sentido do *leading edge* em células em migração (Yadav *et al.*, 2009). Assim, a alteração dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada e, conseqüentemente, da dinâmica dos microtúbulos, pode também estar relacionada com os fenótipos observados por Gonçalves *et al.*, 2010, segundo os quais o *knockdown* do *tbccd1* provoca a fragmentação do complexo de Golgi e uma diminuição da velocidade de migração das células.

Assim, estudar o efeito dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada em células transfetadas com siRNAs para o *tbccd1* poderá facilitar o estabelecimento de uma relação entre os níveis desta modificação pós-traducional e os fenótipos observados devido aos siRNAs.

No entanto, para que seja possível estabelecer esta relação, será necessário realizar os estudos dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada em células hTERT RPE-1 por serem as células em que foram observados os fenótipos descritos. Não foi possível realizar esta experiência neste estudo devido ao baixo rendimento obtido na preparação dos extratos proteicos destas proteínas, pelo que o protocolo necessitará de ser otimizado.

Foi também observada uma diminuição dos níveis de  $\gamma$ -tubulina na fração citosólica (ensaios de *Western blot*) quando uma das proteínas TBCCD1 variante 1 ou TBCCD1 variante 2 está sobreexpressa. Esta observação pode ser justificada pelo aumento de agregados de  $\gamma$ -tubulina observado nas células em sobreexpressão das proteínas variantes da TBCCD1, já que a diminuição nos níveis de  $\gamma$ -tubulina observados podem ser resultado de uma efetiva diminuição dos níveis desta proteína e/ou da formação de agregados com as proteínas em sobreexpressão. Esta formação de agregados pode então ser a causa, ou uma das causas, da diminuição dos níveis de  $\gamma$ -tubulina na fração solúvel.

No estudo de proteínas mutantes da TBCCD1 variante 1 (Pereira, 2011), observou-se que a sobreexpressão desta proteína com a mutação P24A provoca também uma diminuição dos níveis de  $\gamma$ -tubulina. Neste caso, foram analisados os níveis de  $\gamma$ -tubulina no centrossoma pela quantificação da intensidade de fluorescência nas imagens obtidas por microscopia de imunofluorescência. Este resultado está então de acordo com as observações apresentadas neste estudo segundo as quais as proteínas TBCCD1 afetam os níveis de expressão de  $\gamma$ -tubulina. Mais uma vez, será necessário repetir as experiências realizadas utilizando células hTERT RPE-1 para testar se a diminuição dos níveis de  $\gamma$ -tubulina quando há sobreexpressão das proteínas TBCCD1 também é observada nesta linha celular.

Quanto ao estudo dos níveis de  $\beta$ -actina em células a sobreexpressar a proteína TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 ou TBCCD1 variante 3, observou-se que há uma diminuição nos níveis de actina no caso da sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 1 ou da proteína TBCCD1 variante 2. Foi já observado que o *knockout* da  $\beta$ -actina em células de ratinho embrionário provoca uma diminuição na migração e também uma diminuição da dinâmica do *leading edge* (Bunnell *et al.*, 2011). Assim, a observação da diminuição dos níveis de  $\beta$ -actina nas células a sobreexpressar uma das proteínas a variantes da TBCCD1 pode estar relacionada com uma diminuição na velocidade de migração celular direcionada, uma vez que a  $\beta$ -actina tem um papel essencial neste processo (Bunnell *et al.*, 2011). No entanto, apesar de por vezes se considerar que em sobreexpressão se deve observar um fenótipo oposto ao observado

em *knockdown*, esta é uma análise demasiado simplista do metabolismo celular. Por exemplo, o *knockdown* pode provocar um efeito e, a resposta da célula no sentido de compensar a alteração provocada, pode resultar num fenótipo mais semelhante ao observado em sobreexpressão (Bernick *et al.*, 2010). Algumas proteínas podem também desempenhar a sua função apenas num intervalo de concentrações limitado, fora do qual se observa um determinado fenótipo (Bernick *et al.*, 2010).

Desta forma, a análise dos níveis de  $\beta$ -actina em células hTERT RPE-1 transfetadas com siRNAs para o *tbccd1* poderá também permitir estabelecer uma relação entre o *knockdown* do *tbccd1* e os níveis desta proteína e, conseqüentemente, ajudar a elucidar as causas dos fenótipos observados (nomeadamente, a diminuição da velocidade de migração direcionada).

Assim, os resultados obtidos, apoiam fortemente a hipótese colocada segundo a qual as proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 têm diferentes funções celulares uma vez que nem todas as variantes têm o mesmo efeitos nos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e  $\beta$ -actina.

### **5.3. As proteínas variantes da TBCCD1 revertem parcialmente o *knockdown* do *tbccd1***

Os fenótipos descritos relativos ao *knockdown* do *tbccd1* por Gonçalves *et al.* 2010, são resultado do *knockdown* das três variantes em simultâneo. Devido à impossibilidade de desenhar siRNAs que distingam as três variantes, por estas terem sequências muito semelhantes, realizaram-se neste estudo ensaios nos quais se testou se é possível reverter o fenótipo provocado pelos siRNAs através da sobreexpressão de uma das proteínas TBCCD1 variante 1-GFP, TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 3-GFP. O desenho deste protocolo teve em conta que segundo o método aplicado para a transfeção com siRNAs, são observados os fenótipos tanto às 72 horas após a primeira transfeção com siRNAs, como após 96 horas. Assim, tanto a transfeção com vetores de expressão como a fixação das células para análise por microscopia de imunofluorescência foram realizadas na janela temporal em que as células apresentam os fenótipos descritos (Gonçalves *et al.*, 2010).

A observação de que tanto a proteína TBCCD1 variante 1 como a proteína TBCCD1 variante 2 revertem parcialmente o fenótipo do aumento da distância

centrossoma-núcleo sugere que (i) estas proteínas têm a capacidade de se substituírem na sua função, e/ou (ii) existe uma função regulatória entre elas, que permite assim que a proteína em sobreexpressão modele os níveis das restantes variantes, ou de si própria, de forma a compensar o efeito provocado pelos siRNAs.

Apesar de neste estudo a reversão do fenótipo pela proteína TBCCD1 variante 3 não ser estatisticamente significativa, a repetição da experiência mais uma vez deverá ser capaz de esclarecer se esta observação é ou não significativa.

#### **5.4. Estudo da função regulatória entre as três variantes do *tbccd1* identificadas**

Cada vez mais os estudos sugerem que as diferentes variantes de um gene têm diferentes funções e diferentes padrões de expressão que muitas vezes são específicas de tecidos (Wang *et al.*, 2008). Para além disso, está também descrita a importância da razão entre as variantes, sendo que alterações nesta razão podem ser responsáveis por patologias como o cancro (Bates *et al.*, 2002).

Tendo isto em conta, e também o facto de serem conhecidas três variantes do *tbccd1*, colocou-se a hipótese de existir uma função regulatória entre as três variantes em estudo. Para isso, realizaram-se ensaios recorrendo a RT-qPCR, com o objetivo de detetar possíveis alterações nos níveis dos transcritos das três variantes resultantes da sobreexpressão de cada uma das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 ou TBCCD1 variante 3.

Observou-se então que o aumento dos níveis da proteína TBCCD1 variante 1 provoca um aumento dos níveis tanto do seu próprio transcrito (endógeno) como dos transcritos das variantes 2 e 3, sendo o aumento dos níveis da variante 2 mais acentuado (21,96 vezes). Por sua vez, a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 2 leva ao aumento dos níveis do transcrito da variante 1 e à diminuição dos níveis da variante 3 e da própria variante 2 (endógena). Já a sobreexpressão da proteína TBCCD1 variante 3 leva ao aumento dos níveis do próprio transcrito (endógeno). Apesar de, como já foi referido, os dados apresentados corresponderem apenas a uma experiência independente, os resultados obtidos sugerem que as variantes em estudo possuem uma função regulatória. Assim, esta relação regulatória pode ser uma das explicações para a reversão parcial do fenótipo observada nos ensaios de recuperação do fenótipo através da sobreexpressão de cada uma das variantes, uma vez que esta

sobreexpressão pode provocar alterações nos níveis das outras variantes, e estas serem suficientes para compensar o efeito provocado pelos siRNAs.

De forma a testar a hipótese de a função regulatória de uma variante poder também afetar a localização celular das outras, transfetaram-se células de modo a sobreexpressarem simultaneamente TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 2-GFP ou TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP. Os resultados obtidos sugerem então que a sobreexpressão combinada das proteínas TBCCD1 variante 1-RFP e TBCCD1 variante 3-GFP pode promover a localização da proteína TBCCD1 variante 3-GFP no centróssoma. No entanto, devido à reduzida percentagem de células em que se observou a co-localização das proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 3 no centróssoma, esta observação pode ser causada pela sobreexpressão e não ocorrer nos níveis fisiológicos de expressão destas proteínas.

Nas experiências em que se analisaram extratos proteicos, observou-se também que a proteína TBCCD1 variante 3 tem a mesma massa molecular que a proteína TBCCD1 variante 1.

Pela análise da sequência do transcrito que codifica esta proteína, esta observação sugere que a proteína resultante pode ser igual à proteína TBCCD1 variante 1. Assim sendo, coloca-se a questão do porquê desta proteína não ser observada no centróssoma, uma vez que sendo igual à proteína TBCCD1 variante 1 possui o domínio de localização no centróssoma que é correspondente aos primeiros vinte resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 variante 1 (Pereira, 2011).

Sabe-se que muitas vezes as uORFs, encontradas em muitos mRNAs de eucariotas, regulam a tradução de proteínas tanto em condições normais como em situações de stresse (Calvo *et al.*, 2009, Spriggs *et al.*, 2010), e que podem codificar pequenos péptidos (Bastide *et al.*, 2008). Assim, uma das hipóteses que se coloca é de a uORF observada no transcrito da variante 3 codificar um péptido que tem uma função regulatória, que impede/inibe a migração/o recrutamento da proteína para o centróssoma. Esta hipótese poderia também justificar a observação da proteína TBCCD1 variante 3 no centróssoma quando se sobreexpressa simultaneamente esta proteína e a proteína TBCCD1 variante 1. Assumindo que o péptido se liga à proteína ou de alguma forma impede a sua ida para o centróssoma, numa situação de sobreexpressão há competição e, por isso, aumenta a probabilidade de o péptido se ligar a outras moléculas da proteína TBCCD1 variante 1 que não a que está a ser traduzida a partir do mesmo transcrito, aumentando a probabilidade desta proteína ir para o centróssoma. A função regulatória do péptido pode também ser a de manter a

razão entre as *pools* centrossomal e citoplasmática da proteína TBCCD1 variante 1 que, caso esta hipótese seja verdadeira, é a mesma que a proteína TBCCD1 variante 3. Esta hipótese pode também explicar a maior dificuldade da TBCCD1 variante 3 reverter o fenótipo do aumento da distância centrossoma-núcleo nos ensaios de *knockdown* do *tbccd1*, caso o péptido impeça a interação com algumas proteínas.

Resumindo, os resultados obtidos mostram que as três variantes têm diferentes localizações celulares, sendo a proteína TBCCD1 variante 1 centrossomal e as proteínas TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3 citoplasmáticas. Os resultados sugerem também que as proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2 têm um papel na dinâmica de microtúbulos através da regulação dos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada e, possivelmente, também nos níveis de  $\gamma$ -tubulina e de  $\beta$ -actina. Para além disso, os resultados indicam que as variantes têm uma função de regulação entre elas e, pela análise conjunta dos vários resultados, as três variantes parecem ter diferentes funções celulares.

## 6. Perspetivas

Os resultados obtidos neste estudo, deram algumas indicações importantes sobre as possíveis funções celulares das proteínas TBCCD1 variante 1, TBCCD1 variante 2 e TBCCD1 variante 3, sugerindo que estas proteínas têm um papel na dinâmica de microtúbulos e também que as variantes têm uma função regulatória entre elas. No entanto, existem algumas questões que necessitam ser respondidas de modo a se esclarecer a função biológica de cada uma das variantes.

Assim, por exemplo, devem também ser realizados estudos do efeito da sobreexpressão de cada variante da TBCCD1 e do *knockdown* do *tbccd1* nos níveis de  $\alpha$ -tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina e  $\beta$ -actina devem também ser realizados utilizando células hTERT RPE-1. Poderá então estabelecer-se uma relação entre os níveis destas proteínas e os fenótipos observados nestas células resultantes do *knockdown* do *tbccd1*.

Devido à falta de dados sobre a proteína codificada pelo transcrito da variante 3 do *tbccd1*, dever-se-á realizar-se uma experiência para conhecer a sequência da proteína por ele codificada. Para isso, poderão realizar-se experiências recorrendo a espectrometria de massa. Este conhecimento poderá então esclarecer se esta proteína é efetivamente igual à proteína TBCCD1 variante 1 ou não.

Poder-se-á também clonar a uORF que se encontra na região 5' do transcrito da variante 3, em fusão com um gene repórter de modo a perceber se esta região é realmente traduzida e qual o efeito da sua sobreexpressão. Ou seja, seria interessante clarificar se, no caso de o transcrito correspondente à variante 3, codificar para uma proteína igual à proteína TBCCD1 variante 1, se a uORF ou a sobreexpressão do péptido por ela codificado, impede de algum modo a localização centrossomal desta proteína.

Para além disso, à semelhança dos estudos que foram desenvolvidos para as proteínas TBCCD1 variante 1 e TBCCD1 variante 2, podem também realizar-se estudos para identificação das proteínas interatuantes da proteína TBCCD1 variante 3, por exemplo através de BioID. Os resultados poderão facilitar o desenho de novas experiências com o objetivo de estudar a função celular desta proteína.

Relativamente aos estudos de *knockdown*, uma vez que não é possível desenhar siRNAs que distingam as três variantes identificadas, poder-se-á repetir os estudos de recuperação do fenótipo através da sobreexpressão de cada uma das variantes, desta

vez, para outros fenótipos descritos. Para além disso, como alternativa ao desenho de siRNAs específicos para cada uma das variantes, que já se sabe não ser possível, poder-se-á tentar utilizar o sistema CRISPR/Cas de modo a identificar os fenótipos associados a cada variante.

Seria também interessante analisar os níveis dos transcritos de cada variante do *tbccd1* em diferentes tecidos, de forma a perceber em que tipo de tecidos cada uma das variantes é mais expresso e relacionar com as funções específicas desses tecidos.

## 7. Bibliografia

Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature*. 2010;467(7312):218-222.

Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015.

Akhshi TK, Wernike D, Piekny A. Microtubules and Actin Crosstalk in Cell Migration and Division. *Cytoskeleton*. 2014;23:1-23.

Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing , stability and translation : a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(17):7997-8010.

Arquint C, Gabryjonczyk A, Nigg EA. Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc B*. 2014;369.

Bartolini F, Bhamidipati A, Thomas S, Schwahn U, Lewis SA, Cowan NJ. Functional Overlap between Retinitis Pigmentosa 2 Protein and the Tubulin-specific Chaperone Cofactor. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14629-14634.

Bastide A, Hieblot C, Karaa Z, Touriol C, Lacazette E. An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(7):2434-2445.

Bates DO, Cui T, Doughty JM, et al. VEGF 165 b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is Down-Regulated in Renal Cell Carcinoma 1. *Cancer Res*. 2002;62:4123-4131.

Bernick EP, Zhang P, Du S. Knockdown and overexpression of Unc-45b result in defective myofibril organization in skeletal muscles of zebrafish embryos. *BMC Cell Biol*. 2010;11.

Bettencourt-Dias M, Hildebrandt F, Pellman D, Woods G, Godinho SA. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet*. 2011;27(8):307-315.

Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol Rev.* 2014;94(1):235-263.

Block J, Schroeder V, Pawelzyk P, Willenbacher N, Köster S. Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(11):3053-3064.

Bobinnec Y, Khodjakov A, Mir LM, Rieder CL, Bornens M. Centriole Disassembly In Vivo and Its Effect on Centrosome Structure and Function in Vertebrate Cells. *J Cell Biol.* 1998;143(6):1575-1589.

Bornens M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:25-34.

Bulinski JC, Richards JE, Piperno G. Posttranslational Modifications of  $\alpha$  Tubulin: Detyrosination and Acetylation Differentiate Populations of Interphase Microtubules in Cultured Cells. *J Cell Biol.* 1988;106:1213-1220.

Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM, Forscher P.  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell.* 2011;22:4047-4058.

Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are. *PNAS.* 2009;106(18):7507-7512.

Câmara AI. Estudo de padrões de expressão de transcritos alternativos do gene *tbccd1* em tecidos humanos e linhas celulares cancerígenas. 2013.

Camelo C. TBCCD1, uma proteína chave na ligação do centróssoma ao núcleo, estudo das proteínas interatuantes. 2015.

Chan E, Saito A, Honda T, Guglielmo GM Di. The Acetylenic Tricyclic Bis (cyano enone), TBE-31 Inhibits Non – Small Cell Lung Cancer Cell Migration through Direct Binding with Actin. *Cancer Prev Res.* 2014;9(11):727-738.

Christodoulou J. MeCP2 deficiency is associated with reduced levels of tubulin acetylation and can be restored using HDAC6 inhibitors. *J Mol Med.* 2014:63-72.

Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(5):319-332.

Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Publ Gr*. 2015.

Davenport AM, Huber FM, Hoelz A. Structural and Functional Analysis of Human Sirt1. *J Mol Biol*. 2014;426(3):526-541.

Dompierre JP, Godin JD, Charrin C, Cordelie FP, King SJ, Humbert S. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington ' s Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci*. 2007;27(13):3571-3583.

Downing KH, Nogales E. Tubulin structure: Insights into microtubule properties and functions. *Curr Opin Struct Biol*. 1998;8(6):785-791.

Elric J, Etienne-manneville S. Centrosome positioning in polarized cells : Common themes and variations. *Exp Cell Res*. 2014;328(2):240-248.

Ersfeld K, Web J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K. Characterization of the Tubulin-Tyrosine Ligase. *J Cell Biol*. 1993;120(3):725-732.

Evans RJ, Schwarz N, Nagel-wolfrum K, Wolfrum U, Hardcastle AJ, Cheetham ME. The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum Mol Genet*. 2010;19(7):1358-1367.

Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485-492.

Fourest-lieuvin A, Peris L, Gache V, et al. Microtubule Regulation in Mitosis : Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*. 2006;17:1041-1050.

Friedman JR, Lackner LL, West M, Dibenedetto JR. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*. 2011;334(6054):358-362.

Friedman JR, Webster BM, Mastronarde DN, Verhey KJ, Voeltz GK. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol*. 2010;190(3):363-375.

Fu J, Hagan IM, Glover DM. The Centrosome and Its Duplication Cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015.

Garcia-mayoral MF, Fanarraga ML, Zabala JC, Rico M, Castano R, Bruix M. The Solution Structure of the N-Terminal Domain of Human Tubulin Binding Cofactor C Reveals a Platform for Tubulin Interaction. *PLoS One*. 2011;6(10).

Gomez-ferreria MA, Bashkurov M, Helbig AO, et al. Novel NEDD1 phosphorylation sites regulate  $\gamma$ -tubulin binding and mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*. 2012;125:3745-3751.

Gonçalves et al. J. TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning. *EMBO Rep*. 2010;11(3).

Gonçalves J b, Tavares A, Carvalhal S, Soares H. Revisiting the tubulin folding pathway : new roles in centrosomes and cilia. *BioMol Concepts*. 2010;1:423-434.

Gonçalves J. Caracterização da proteína centrossomal TBCCD1, em linhas celulares humanas e durante o desenvolvimento de *Danio rerio*. 2010.

Green BKJ, Gocken ÀT, Bo M, À JCRJ. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem*. 2005;70(04):143-202.

Hage-sleiman R, Herveau S, Matera E, Laurier J, Dumontet C. Tubulin binding cofactor C ( TBCC ) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cell Biol*. 2010;10.

Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:71-76.

Haren L, Stearns T, Lu J. Plk1-Dependent Recruitment of  $\gamma$ -Tubulin Complexes to Mitotic Centrosomes Involves Multiple PCM Components. *PLoS One*. 2009;4(6).

Harrison S, Towers K, Qi X, Vaughan S, Mckean PG, Ginger ML. The tubulin cofactor C family member TBCCD1 orchestrates cytoskeletal filament formation. *J Cell Sci*. 2013;126:5350-5356.

Hubbert C, Guardiola A, Shao R. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417:455-458.

Jana SC, Marteli G, Bettencourt-Dias M. Mapping molecules to structure : unveiling secrets of centriole and cilia assembly with near-atomic resolution. *Curr Opin Cell Biol*. 2014:10-13.

Khodiyar VK, Maltais LJ, Sneddon KMB, et al. A revised nomenclature for the human and rodent  $\alpha$ -tubulin gene family. *Genomics*. 2007;90(2):285-289.

Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by  $\gamma$  - tubulin complexes. *Nat Publ Gr*. 2011;12(11):709-721.

Lafanechère L, Courtay-cahen C, Kawakami T, Jacrot M. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci*. 1998;181:171-181.

Li L, Yang X, Hdac MÁ, Mechanosensing ÁSÁ. Tubulin acetylation : responsible enzymes , biological functions and human diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015.

Llorca O, Martí J, Ritco-vonsovici M, Willison KR, Carrascosa L, Valpuesta M. Analysis of the Interaction between the Eukaryotic Chaperonin CCT and Its Substrates Actin and Tubulin. *J Struct Biol*. 2001;218:205-218.

Lüders J, Patel UK, Stearns T. GCP-WD is a  $\gamma$ -tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*. 2006;8(2):137-147.

Lüders J. The amorphous pericentriolar cloud takes shape. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1126-1128.

Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, et al. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*. 2002;21(24):6820-6831.

Nogales E. Structural Insights Into Microtubule Function. *Annu Rev Biochem*. 2001;69:277-302.

Normoyle KPM, Briehner WM. Cyclase-associated Protein ( CAP ) Acts Directly on F-actin to Accelerate Cofilin-mediated Actin Severing across the Range of Physiological pH. *J Biol Chem*. 2012;287(42):35722-35732.

North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E, Francisco S. Is an NAD<sup>+</sup> - Dependent Tubulin Deacetylase. *Mol Cell*. 2003;11:437-444.

Ozols J, Caron JM. Posttranslational Modification of Tubulin by Palmitoylation : II . Identification of Sites of Palmitoylation Peptide. *Mol Biol Cell*. 1997;8:637-645.

Pereira I. Estudo da proteína humana centrossomal TBCCD1: determinação de domínios funcionais. 2011.

Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2010;67(10):630-634.

Petry S, Vale RD. Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nat Cell Biol*. 2015;17(9):1089-1093.

Piel M, Nordberg J, Euteneuer U, Bornens M. Centrosome-Dependent Exit of Cytokinesis in Animal Cells. *Science*. 2001;291:1550-1554.

Prognosis P, Mialhe A, Lafaneche L, et al. Tubulin Detyrosination Is a Frequent Occurrence in Breast Cancers of. *Cancer Res*. 2001;61:5024-5027.

Razafsky D, Hodzic D. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoskeletal connections. *J Cell Biol*. 2009;186(4):461-472.

Reed NA, Cai D, Blasius TL, et al. Report Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Curr Biol*. 2006;16:2166-2172.

Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J*. 2009;28(8):1016-1028.

Rogowski K, Dijk J Van, Magiera MM, et al. A Family of Protein-Deglutamylating Enzymes Associated with Neurodegeneration. *Cell*. 2010;143(4):564-578.

Rogowski K, Dorsselaer A Van, Gaertig J, Janke C, Thomas D. Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell*. 2009:1076-1087.

Roubin R, Acquaviva C, Chevrier V, et al. Myomegalin is necessary for the formation of centrosomal and Golgi-derived microtubules. *Biol Open*. 2013;2(2):238-250. doi:10.1242/bio.20123392.

Ryan SD, Bhanot K, Ferrier A, et al. Microtubule stability, Golgi organization, and transport flux require dystonin- $\alpha$ 2-MAP1B interaction. *J Cell Biol*. 2012;196(6):727-742.

Salisbury JL. Centrosomes: Coiled-coils Organize the Cell Center. *Curr Biol*. 2003;13(03):88-90.

Salpingidou G, Smertenko A, Hausmanowa-petruciewicz I, Hussey PJ, Hutchison CJ. A novel role for the nuclear membrane protein emerin. *J Cell Biol.* 2007;178(6):897-904.

Schwarz N, Hardcastle AJ, Cheetham ME. Arl3 and RP2 mediated assembly and traffic of membrane associated cilia proteins. *Vision Res.* 2012;75:2-4.

Shagieva GS, Domnina L V, Chipysheva TA, Ermilova VD, Chaponnier C, Dugina VB. Actin Isoforms and Reorganization of Adhesion Junctions in Epithelial to Mesenchymal Transition of Cervical Carcinoma Cells. *Biochem.* 2012;77(11):1266-1276.

Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol.* 2014.

Skoge RH, Dölle C, Ziegler M. Regulation of SIRT2-dependent  $\alpha$ -tubulin deacetylation by cellular. *DNA Repair (Amst).* 2014:2-7.

Soppina V, Herbstman JF, Skiniotis G, Verhey KJ. Luminal Localization of  $\alpha$ -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS One.* 2012;7(10):1-9.

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Mol Cell.* 2010;40(2):228-237.

Sun B, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Reports.* 2015:603-610.

Thyberg J1, Moskalewski S., Relationship between the Golgi complex and microtubules enriched in deetyrosinated or acetylated alpha-tubulin: studies on cells recovering from nocodazole and cells in the terminal phase of cytokinesis. *Cell Tissue Res.* 1993 Sep;273(3):457-66.

Tollenaere MAX, Mailand N, Bekker-jensen S. Centriolar satellites : key mediators of centrosome functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014.

Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, et al. Prefoldin , a Chaperone that Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin. *Cell.* 1998;93:863-873.

Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 2008;456.

Wang G, Chen Q, Zhang X, et al. PCM1 recruits Plk1 to the pericentriolar matrix to promote primary cilia disassembly before mitotic entry. *J Cell Sci.* 2013;1:1355-1365.

Wloga D, Levilliers N, Webster DM, et al. Article TTLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. *Dev Cell.* 2009;16:867-876.

Wloga D, Rogowski K, Sharma N, et al. Glutamylation on  $\alpha$ -Tubulin Is Not Essential but Affects the Assembly and Functions of a Subset of Microtubules in *Tetrahymena thermophila*. *Eucaryotic Cell.* 2008;7(8):1362-1372.

Wozniak MJ, Bola B, Brownhill K, Yang Y, Levakova V, Allan VJ. Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J Cell Sci.* 2009;122:1979-1989.

Xie R, Nguyen S, Mckeehan WL, Liu L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol.* 2010;11(1):89. doi:10.1186/1471-2121-11-89.

Yadav S, Puri S, Linstedt AD. A Primary Role for Golgi Positioning in Directed Secretion, Cell Polarity, and Wound Healing. *Mol Biol Cell.* 2009;20:1728-1736.

Yamashita YM, Fuller MT. Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *J Cell Biol.* 2008;180(2):261-266.

Yamashita YM, Mahowald AP, Perlin JR, Fuller MT. Asymmetric Inheritance of Mother Versus Daughter Centrosome in Stem Cell Division. *Science (80- )*. 2007;315:518-522.

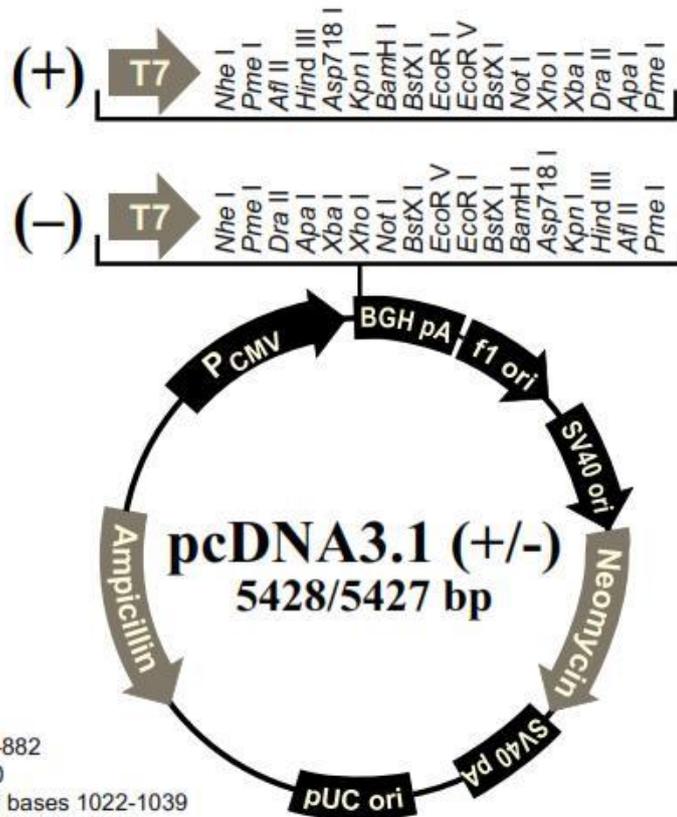
Yoon J, Qiu J, Cai S, et al. The retinitis pigmentosa-mutated RP2 protein exhibits exonuclease activity and translocates to the nucleus in response to DNA damage. *Exp Cell Res.* 2005;2:1323-1334.

Yu I, Garnham CP, Roll-mecak A. Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem.* 2015;290(28):17163-17172.

Yuan X, Serra RA, Yang S. Review Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. *New York Acad Sci.* 2015;1335:78-99.

## 8. Anexos

### 8.1. pcDNA3.1 (Invitrogen) – vetor de expressão em mamífero



#### Comments for pcDNA3.1 (+) 5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252

f1 origin: bases 1298-1726

SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074

Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930

SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234

pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)

Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)

ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)

Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)

*bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)



### 8.3. pIC112 (6xHis-PreScission-GFP) – vetor construído no vetor pcDNA3.1+ (Invitrogen) – vetor de expressão em mamífero

(Cheeseman & Desai, 2005)

```

GAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAATTATATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGCT
      ▲
      HindIII
NheI  PmeI  AflII  HindIII  KpnI      BamHI  SpeI  BstXI      EcoRI      EcoRV  BstXI
GGCTAGCGTTTAAACTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGATTCTGCAGATATCCAGCAC
▶ A F K L K L G T E L G S T S P V W W N S A D I Q H
      NotI  SacII
AGTGGCGGCCGCggcagcagcccaatacaatacaatacaatacaacagcagcgccctggaagtctctgctccaggggccccgggaagt
▶ S G G R G S S H H H H H S S G L E V L F Q G P L E V
      BspEI
ctctgctccaggggccccTCCGGAGGGatgggtgagcaagggcgaggagaaataacatggccgcaatacaaggagttcaatgctct
▶ L F Q G P S G G M V S K G E E N N M A V I K E F M R
tcaaggtagcctatggagggctccgtgaacggccacagattcgagatcgagggcgagggcgagggcgcccccacaggggc
▶ F K V R M E G S V N G H E F E I E G E G E G R P Y E G
accagaccgccaagctgaaggtagcaagggtggccccctgcccctgcccctgggacaatctgctccccctagttcaatgta
▶ T Q T A K L K V T K G G P L P F A W D I L S P Q F M Y
cggtcccaaggccctagctgaagcaccgcccgcacataccccgacctctgaagctgtctctccccgagggctcaagtggg
▶ G S K A Y V K H P A D I P D Y L K L S F P E G F K W
agcggctgatagaactctgaggaagggcgctgggtgacgctgacccaggacctctctctgacaggaagggagttcaatctac
▶ E R V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D G E F I Y
aaggtagaagctgcccggcaccacactccccctcgcagcggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggccctctc
▶ K V K L R G T N F P S D G P V M Q K K T M G W E A S S
cgagcggaatgtaaccgaggaagcggcgcccctgaagggcgagatacaagatgagcctgaagctgaaggaagcggcgccacatag
▶ E R M Y P E D G A L K G E I K M R L K L K D G G H Y
      BstXI
acgcagagctcaagaaccaccatactgcccagaagcggctgacgctgcccggcgccctacaagaccgacatacaagctggac
▶ D A E V K T T Y M A K K P V Q L P G A Y K T D I K L D
ataccctccccacaacagaggacctacaccactgctggaacagctacgagcggcgccgagggcgcccccacataccggggcctgga
▶ I T S H N E D Y T I V E Q Y E R A E G R H S T G G M D
      XbaI  ApaI  PmeI
cgagctgtacaagtaataCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
▶ E L Y K ●
TTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTCTAATAAATGAGGAATT

```

Laranja – 6 resíduos de His

Verde – PreScission “cleavage site” (2x)

Azul – RFP

Seta – Local de iniciação da transcrição

Nota: os locais de restrição, à exceção de BstXI, são únicos no vetor