UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E
BIOAGENTES PATOGÊNICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

SANTIAGO ANDRÉS GARCÍA ITURRALDE

**Participação da cadeia leve de dineína 2,
DYNLL2, na dinâmica de montagem e
desmontagem do cílio primário**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na
Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital
de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2021

SANTIAGO ANDRÉS GARCIA ITURRALDE

**Participação da cadeia leve de dineína 2, DYNLL2, na
dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de *Mestre em Ciências*.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Co-Orientador: Dr. Rui Silva Junior

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

García-Iturralde, Santiago Andrés

Participação da cadeia leve de dineína 2, DYNLL2, na dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário.

Ribeirão Preto, 2021

87p.;30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Espreadico, Enilza Maria.

1. Cílio primário. 2. Dinâmica do cílio primário 3. DYNLL2

Santiago Andrés García-Iturralde

Participação da cadeia leve de dineína 2, DYNLL2, na dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de *Mestre em Ciências*.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A mi família

AGRADECIMENTOS

A mi familia, mi padre, mi madre, mis hermanos Alan y Jean, mi tía Gloria, Andrea y Maya, por ser mi núcleo, a veces mi fortaleza, muchas otras mi debilidad, solo en ustedes crezco y en ustedes me fortalezco, sin su apoyo mi travesía por Brasil no se hubiera logrado, GRACIAS.

A mi orientadora Enilza Espreadico, por darme la oportunidad, por confiar en mí, por darme la oportunidad de demostrar lo que sé y lo que soy, a mi co-orientador Rui, sin ti no hubiera logrado esto, has estado ahí siempre y te agradezco por eso, te deseo lo mejor en tu travesía, te lo mereces.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Bárbara, Jackeline, Airton, les agradezco por enseñarme, esperarme, tenerme paciencia, acompañarme, son el mejor equipo que pude tener a mi lado, Johnny, Marcela, Lucas gracias por recibirme y por ayudarme, y mi querida Joana, la felicidad del laboratorio, gracias por estar ahí todas las mañanas, por estar pendiente de mí, por preguntarme como estoy, nunca les voy a olvidar, y en mí encontraran siempre un amigo.

A mis amigos que me acogieron Corina, Raúl, Alejandro, Daniel, Mariana son como mi familia en tierras extranjeras; Juliana, Sudi, Setti, Mauricio, Susana, Viviana hicieron mi travesía en Brasil mucha mas llevadera, gracias a todos por su presencia, buen ánimo, consejos y amistad.

Ao Julio e toda sua família, Gabriela e sua família pela hospitalidade, são o melhor exemplo do Brasil e sua gente.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), por todas as aulas e conhecimentos.

Às funcionárias do departamento Gabriela Bunhotto pela paciência, Elizabete e Roberta obrigado pela ajuda e pelos conhecimentos.

Aos órgãos de fomento como Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES), pela bolsa da Cota Institucional de Demanda Social, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Ampara à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento, ao Hemocentro de Ribeirão Preto pela infra-estrutura e auxílio, e seu pessoal.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e a Universidade de São Paulo pela oportunidade

RESUMO

García Iturralde, Santiago Andrés. **Participação da cadeia leve de dineína 2, DYNLL2, na dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário.** 2021. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

O cílio primário é uma organela sensorial da superfície celular, presente na maioria das células quiescentes ou diferenciadas em vertebrados. Estruturalmente semelhante aos cílios móveis e flagelos, o cílio primário é formado por um axonema central recoberto por um domínio da membrana plasmática e apoiado a um corpúsculo basal, o centríolo mãe. Defeitos nas proteínas que formam o cílio ou em sua maquinaria de montagem causam doenças denominadas ciliopatias. A dinâmica da montagem e desmontagem e a função sensorial do cílio primário requer uma atividade contínua do transporte intraciliar bidirecional, que é semelhante ao transporte intraflagelar e envolve os motores moleculares dineína citoplasmática e cinesinas. As proteínas DYNLLs são cadeias leves multifuncionais que interagem com diversas proteínas, incluindo a Miosina-Va. Recentemente nosso grupo identificou interação da Miosina-Va com a proteína centrossomal-ciliar RPGRIP1L localizadas no corpúsculo basal dos cílios primários. Sabendo da interação da DYNLL2 com Miosina-Va e desta com o cílio primário, o presente estudo teve como objetivo esclarecer o papel da DYNLL2 na dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário. Os objetivos específicos deste trabalho foram analisar a localização da DYNLL2 na estrutura do cílio primário e avaliar os efeitos do silenciamento e superexpressão da DYNLL2 na dinâmica e fenótipo do cílio primário. Para responder nossas hipóteses foram usadas as células do epitélio pigmentado da retina humana imortalizadas com o vetor pGRN145 hTERT (RPE-1 hTERT). Para a superexpressão, foi utilizado o vetor lentiviral FUGW-DYNLL2, e para o silenciamento, utilizamos o vetor FUG.12-shDYNLL2. Após a transdução dos vetores, as células foram separadas por sorting celular de acordo com a intensidade de fluorescência, a fim de homogeneizar a população das células. A modulação da expressão da DYNLL2 foi confirmada através do qPCR-RT e imunodeteção de proteínas (Western blot). A localização celular da DYNLL2 foi analisada através da imunocitoquímica seguida de visualização e registro por microscopia confocal. A dinâmica da montagem e desmontagem foi estudada calculando a porcentagem de células ciliadas e o comprimento ciliar. Nossos dados demonstram a localização da DYNLL2 no centrossomo e na base do cílio primário. As análises fenotípicas mostram que nem a superexpressão nem o silenciamento da DYNLL2 afetam o número de células ciliadas, mas em várias condições de cultivo, tanto a superexpressão como o silenciamento reduzem o comprimento ciliar e aumentam a porcentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular. Os dados do presente estudo nos levam a concluir que a proteína DYNLL2 participa na dinâmica de montagem e/ou desmontagem dos cílios primários em células epiteliais e retarda o ciclo celular.

Palabras-chave: Cílio Primário, DYNLL2, Dinâmica do cílio primário

ABSTRACT

García Iturralde, Santiago Andrés. **Participation of dynein 2 light chain, DYNLL2, in the dynamics of assembly and disassembly of the primary cilia** 2021. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

The primary cilium is a cell surface sensory organelle present in most quiescent or differentiated cells in vertebrates. Structurally similar to mobile cilia and flagella, the primary cilium is formed by a central axoneme covered by a domain of the plasma membrane and supported by a basal body, the mother centriole. Defects in the proteins that make up the cilium or in their assembly machinery cause diseases called ciliopathies. The dynamics of assembly and disassembly and sensory function of the primary cilium require a continuous activity of bidirectional intraciliary transport, which is similar to intraflagellar transport and involves the molecular motors of cytoplasmic dynein and kinesins. DYNLLs are multifunctional light chains that interact with several proteins, including Myosin-Va. Recently, our group identified an interaction of Myosin-Va with the centrosomal-ciliary protein RPGRIP1L located in the basal corpuscle of the primary cilia. Knowing the interaction of DYNLL2 with Myosin-Va and this with the primary cilia, the present study aimed to clarify the role of DYNLL2 in the dynamics of assembly and disassembly of the primary cilia. The specific objectives of this work were to analyze the location of DYNLL2 in the structure of the primary cilia and to evaluate the effects of silencing and overexpression of DYNLL2 on the dynamics and phenotype of the primary cilia. To answer our hypotheses, human retinal pigment epithelial cells immortalized with the vector pGRN145 hTERT (RPE-1 hTERT) were used. For overexpression, we used the lentiviral vector FUGW-DYNLL2, and for silencing, we used the vector FUG.12-shDYNLL2. After vector transduction, cells were sorted by cell sorting according to fluorescence intensity, in order to homogenize the cell population. Modulation of DYNLL2 expression was confirmed by qPCR-RT and protein immunodetection (Western blot). The cell location of DYNLL2 was analyzed through cellular immunocytochemistry followed by visualization and recording by confocal laser microscopy. The dynamics of assembly and disassembly was studied by calculating the percentage of hair cells and hair length. Our data demonstrate the centrosomal and ciliary localization of DYNLL2, and phenotypical analysis showed that either overexpression or silencing of DYNLL2 reduced the ciliary length, but did not affect the number of ciliated cells. Also, interfering with DYNLL2 expression increased the percentage of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. The data from the present study lead us to conclude that the DYNLL2 protein participates in the assembly and/or disassembly dynamics of primary cilia in epithelial cells and delays their cell cycle.

Key words: Primary cilia, DYNLL2, Dynamics of primary cilia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do cílio primário.	2
Figura 2. Esquema da disposição dos microtúbulos no cílio primário e motor.	3
Figura 3. Esquema da montagem e desmontagem do cílio primário no ciclo celular.	11
Figura 4. Estágios da montagem do cílio primário.	12
Figura 5. Estágios da desmontagem do cílio primário.	19
Figura 6. Estrutura da dineína	20
Figura 7. Esquema da sequência proteica da DYNLL1 e DYNLL2.	22
Figura 8. Células RPE-hTERT transduzidas com o vetor lentiviral FUGW carreando o construto EGFP-DYNLL2 ou EGFP.	34
Figura 9. Seleção de subpopulações celulares com diferentes intensidades de fluorescência reportada por EGFP em células RPE-hTERT transduzidas submetidas ao <i>sorting</i>	36
Figura 10. Células RPE-hTERT superexpressas submetidas ao <i>sorting</i> , divididas em intensidade baixa, média e alta de fluorescência.	38
Figura 11. Localização subcelular de DYNLL2 nas células.	39-40
Figura 12. Influência da superexpressão de DYNLL2 sobre a proporção de células RPE-hTERT ciliadas nas culturas, em fases de montagem e desmontagem do cílio primário.	42
Figura 13. Comprimento do cílio primário em células submetidas a superexpressão de DYNLL2.	44
Figura 14. Ensaios funcionais das células que foram submetidas a superexpressão de DYNLL2.	46
Figura 15. Células RPE-hTERT transduzidas com o vetor lentiviral FUG-12.	48
Figura 16. Células RPE-hTERT silenciadas submetidas ao <i>sorting</i> , divididas em intensidade alta e baixa de fluorescência.	49
Figura 17. Influência do silenciamento de DYNLL2 sobre a proporção de células RPE-hTERT ciliadas nas culturas, em fases de montagem e desmontagem do cílio primário.	51
Figura 18. Comprimento dos cílios primários durante a montagem, as células foram submetidas ao silenciamento de DYNLL2.	53

Figura 19. Comprimento do cílio primário durante a desmontagem, em células silenciadas para DYNLL2.	55
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos usados para qRT-PCR.	29
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MC- Centríolo mãe

PVC - Vesícula preciliar

BB - Corpúsculo basal

CV - Vesícula ciliar

MT - Microtúbulos

PMC - Material pericentriolar

PM - Membrana plasmática

DAP - Proteínas do apêndice distal

DAV - Vesículas do apêndice distal

TZ - Zona de transição

DAS - Apêndice subdistal

DA - Apêndice distal

CiPo - Bolsa ciliar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Cílio Primário	1
1.2. Estrutura e organização do cílio primário	1
1.2.1. Axonema ou compartimento ciliar	3
1.2.2. Subcompartimento da membrana ciliar	3
1.2.3. Subcompartimento da matriz celular	4
1.2.4. Subcompartimento da ponta ciliar	4
1.2.5. Subcompartimento do corpo basal	4
1.3. Maquinaria para o crescimento ciliar, direcionamento e transporte.....	5
1.3.1. A proteína CP110 e outros reguladores.....	5
1.3.2. Transporte intraflagelar IFT	6
1.3.3. Estrutura e composição dos trens IFT	6
1.3.4. GTPAsas Rab	8
1.3.5. Complexo multiprotéico BBSome.....	9
1.4. Dinâmica do cílio primário.....	9
1.4.1. Montagem do cílio primário	10
1.4.2. Desmontagem do cílio primário	16
1.5. A dineína citoplasmática	19
1.5.1. Estrutura da dineína	20
1.5.2. As cadeias leves de dineína citoplasmática DYNLL1 e DYNLL2	21
1.5.3. DYNLL1 e DYNLL2 e a relação com os motores moleculares de dineína-2 e miosina-Va no cílio primário.....	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Linhagens celulares e cultura.....	26
3.2. Superexpressão e silenciamento	26
3.3. Imunodeteção de proteínas – Western Blot.....	27
3.4. Purificação de RNA, cDNA e qRT-PCR	28

3.5.	Sorting	29
3.6.	Dinâmica de cílio primário.....	29
3.6.1.	Montagem	29
3.6.2.	Desmontagem	29
3.7.	Imunocitoquímica	30
3.8.	Microscopia Multifotom, confocal e fluorescência.	30
3.9.	Processamento de imagens	30
3.10.	Ensaio de proliferação.....	30
3.11.	Ensaio de morte celular.....	31
3.12.	Ensaio de ciclo celular por citometria	31
4.	RESULTADOS.....	33
4.1.	Transdução de células superexpressas	33
4.2.	Obtenção de populações homogêneas de células superexpressas divididas em faixa de intensidade de fluorescência	34
4.3.	Confirmação da superexpressão de DYNLL2 nas células RPE-hTERT	37
4.4.	Localização subcelular de DYNLL2 nas células RPE-hTERT	38
4.5.	Influência da superexpressão da DYNLL2 nos processos de montagem e desmontagem dos cílios primários em células RPE-hTERT.....	41
4.6.	Influência da superexpressão da DYNLL2 no comprimento do cílio primário nos processos de montagem e desmontagem em células RPE-hTERT.	43
4.7.	Ensaio funcionais das células superexpressas.....	44
4.7.1.	Ensaio de Proliferação celular.....	44
4.7.2.	Ensaio de Morte celular	45
4.7.3.	Ensaio de Ciclo celular	45
4.8.	Transdução de células silenciadas	47
4.9.	Obtenção de populações homogêneas de células silenciadas para DYNLL2	48
4.10.	Confirmação do silenciamento de DYNLL1 e DYNLL2 nas células RPE-hTERT	49
4.11.	Influência do silenciamento de DYNLL2 nos processos de montagem e desmontagem em células RPE-hTERT ciliadas.	50

4.12.	Influência do silenciamento de DYNLL2 no comprimento do cílio em células RPE-hTERT nos processos de montagem e desmontagem.	52
4.13.	Ensaio funcionais das células silenciadas para DYNLL2	53
4.13.1.	Ensaio de Proliferação celular	53
4.13.2.	Ensaio de Morte celular	54
4.13.3.	Ensaio de Ciclo celular	54
5.	DISCUSSÃO	56
5.1.	Localização da proteína DYNLL2 na ciliogênese	56
5.2.	Montagem do cílio primário	57
5.3.	Desmontagem do cílio primário	58
5.4.	Proliferação e ciclo celular.....	59
6.	CONCLUSÕES	60
7.	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cílio Primário

O cílio primário é uma organela que atua como “antenas celulares” nos vertebrados e que tem como papel receber estímulos do ambiente extracelular e traduzi-los em respostas celulares essenciais (Fry et al., 2014; Smith et al., 2020).

Os estímulos podem ser de diferentes tipos, como: estímulos mecânicos, por exemplo a resposta ao fluxo de fluido que flete o cílio e desencadeia a abertura de proteínas do canal que permitem a passagem de Ca^{2+} , com os cílios nos rins; interação com ligantes, PTCH1, SMO da via Sonic Hedgehog (Shh) que envolve a inibição da via pela proteína Gli3 e ativação da Gli2 (Pala et al., 2017); e produtos químicos de baixo peso molecular, como a dopamina. Além disso, o cílio é um fotorreceptor que pode sentir e transduzir sinais em resposta à luz (Smith et al., 2020). Também podem regular a osmolaridade, temperatura e atuar como sensores de gravidade. As respostas dos cílios contribuem para o correto desenvolvimento e função da maioria dos órgãos do corpo (Fry et al., 2014; Hua & Ferland, 2018; Satir et al., 2010; Singla & Reiter, 2006; Smith et al., 2020)

1.2. Estrutura e organização do cílio primário

Os cílios são estruturas que se projetam da superfície celular, em sua base contêm um axonema formado por microtúbulos que se prolongam do corpúsculo basal (Figura 1). Dentre eles, temos os cílios motores e os cílios primários, estes últimos sendo imóveis e cumprem funções sensoriais (Fry et al., 2014; Hua & Ferland, 2018).

Figura 1. Esquema do cílio primário. O esquema mostra: a) Membrana ciliar, b) axonema, c) zona de transição, d) fibras de transição, e) pie basal, f) corpúsculo basal g) membrana plasmática (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017)

Os cílios motores apresentam a estrutura axonemal formada por nove pares de microtúbulos que rodeiam um único par central, cuja conformação é conhecida como 9+2 (Figura 2b e 2d) (Wallace F. Marshall & Nonaka, 2006), em mamíferos os cílios motores são numerosos na superfície apical do epitélio do trato respiratório e do oviduto, o batimento coordenado deles gera ondas com a função principal de mobilizar fluido ao longo da superfície desses órgãos. A motilidade ciliar é realizada pela ação coordenada dos braços de dineína axonemal, internos e externos, onde cada um dos nove pares adjacentes se desliza um em relação ao outro (Brooks & Wallingford, 2014; Satir et al., 2010).

Os cílios primários foram observados pela primeira vez em mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii*, sua conformação é conhecida como 9+0 (Figura 2a e 2c) porque apresentam um anel de nove pares de microtúbulos, mas carecem dos microtúbulos centrais encontrados nos cílios motores, além disso são desprovidos dos braços de dineína típicos dos cílios motores e que possibilita a mobilidade, estes se estendem diretamente para fora do corpo basal, que é derivado da centríolo mãe, e que contribui para a formação do centrosoma numa célula em divisão (Adams et al., 1981; Fry et al., 2014; Hua & Ferland, 2018).

Figura 2. Esquema da disposição dos microtúbulos no cílio primário e motor. a) Cílio primário que tem conformação 9+0, sem o par central de microtúbulos e sem os braços de dineína, b) cílio motor que tem uma conformação 9+2 (com o par central dos microtúbulos que possibilita a mobilidade) (Prevo, et al., 2017).

1.2.1. Axonema ou compartimento ciliar

O núcleo do compartimento ciliar é o axonema, uma matriz cilíndrica de nove microtúbulos duplos paralelos, cada dupla consiste em um microtúbulo completo, contendo 13 protofilamentos e denominado túbulo A, e um segundo microtúbulo incompleto, com 10 protofilamentos e denominado B que compartilha parte de sua parede com o túbulo A. À medida que o axonema se torna mais longo, geralmente o cílio tem um comprimento de 1-5 μm , os pares de microtúbulos se fundem num único túbulo, este túbulo também vai se perdendo gradualmente até que na ponta do cílio geralmente tem apenas alguns deles, por isso a largura inicial de 0,2 μm vai diminuindo à medida que progride para a ponta distal (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Hoey et al., 2012; W. F. Marshall & Nonaka, 2006; Morthorst et al., 2018).

1.2.2. Subcompartimento da membrana ciliar

A bicamada lipídica da membrana ciliar é uma continuação da membrana plasmática, mas contém vários complexos de lipídio-proteínas que são distintos da membrana celular remanescente. Os cílios primários recebem estímulos extracelular por meio de vários receptores na sua membrana (Hoey et al., 2012; Ke & Yang, 2014; Marshall & Nonaka, 2006).

Os cílios primários emergem da membrana celular de duas formas, na primeira, o cílio primário se projeta diretamente para a matriz extracelular conforme o corpo basal fica embaixo da membrana celular, na segunda ele está localizado parcialmente,

intracelularmente, e se projeta de uma invaginação da membrana chamada bolsa ciliar (Ke & Yang, 2014).

1.2.3. Subcompartimento da matriz celular

A matriz é a fase fluida entre o axonema e a membrana ciliar que contém a maquinaria de transporte intraflagelar ou IFT que é necessária para montar e manter os cílios e flagelos, como também as subunidades axonemais que serão transportadas por esta maquinaria (Marshall & Nonaka, 2006).

1.2.4. Subcompartimento da ponta ciliar

A ponta do cílio contém um complexo proteico especializado claramente visível por microscopia eletrônica. Foi demonstrado que várias proteínas se localizam nas pontas dos cílios, incluindo a proteína EB1 de ligação da extremidade (+) do microtúbulo e a proteína de sinalização de Shh, Smoothened (Marshall & Nonaka, 2006).

1.2.5. Subcompartimento do corpo basal

O corpúsculo basal é formado por um dos dois centríolos, o mais velho, modificado ou também chamado de centríolo mãe, servindo como base sobre o qual o axonema será projetado. Os corpúsculos basais, como os centríolos, são compostos de nove trios (tripletes) de microtúbulos, mas eles passam a ser pares (dubleτες) no momento que se forma o axonema ciliar, na região chamada zona de transição, os microtúbulos duplos são nucleados diretamente pelos microtúbulos encontrados no corpo basal, além disso o corpo basal parece atuar como um local de encaixe para proteínas envolvidas no transporte ciliar. (Fry et al., 2014; Hua & Ferland, 2018; Ke & Yang, 2014; Marshall & Nonaka, 2006; Satir et al., 2010).

O corpúsculo basal também inclui estruturas acessórias como fibras de transição, pés basais e radículas ciliares. As fibras de transição, que são nove, e os pés basais, apenas um ou dois, são ultraestruturalmente semelhantes aos apêndices distal e subdistal, do centríolo materno. As fibras de transição emergem do microtúbulo central de cada trinca do corpo basal pouco antes do final do microtúbulo mais externo e estão envolvidas na ancoragem do corpo basal à membrana plasmática, os pés basais, que ancoram os microtúbulos, e as radículas estriadas, que se projetam da extremidade proximal do corpo

basal e se estendem perto da base, fornecem suporte estrutural ao cílio (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

A zona de transição é diferenciada pela presença de estruturas semelhantes a vieiras na superfície ciliar e de estruturas internas conhecidas como ligações em Y. Ela cria uma barreira conhecida como porta ou portão ciliar, que ajuda a regular a passagem de proteínas para dentro e fora do cílio (Ke & Yang, 2014; Marshall & Nonaka, 2006; Morthorst et al., 2018).

1.3. Maquinaria para o crescimento ciliar, direcionamento e transporte.

Os cílios requerem um mecanismo geral para os processos de início da formação de cílios e o transporte de proteínas ao longo da membrana ciliar.

Essas tarefas são executadas pelos reguladores da proteína centriolar Cp110 e pela maquinaria de transporte intraflagelar (IFT), respectivamente. O complexo BBSome também é responsável pelo tráfego de certos receptores no cílio primário. As proteínas da família Rab controlam o tráfego de membrana durante a iniciação do cílio primário e o direcionamento da carga para a base ciliar após a formação do cílio (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

1.3.1. A proteína CP110 e outros reguladores

Cp110 localiza-se em ambos os centríolos, mãe e filha, bloqueando a formação do cílio primário. No início da ciliogênese, Cp110 é removido do corpo basal para permitir a extensão do axonema, mas permanece no centríolo filha (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

O regulador negativo Cp110 interage com a Cep290 na zona de transição, outro complexo, o CP97 também interage com o CP110 sendo essas interações essenciais para suprimir a formação de cílios primários. A remoção de Cp110 requer a atividade de reguladores ciliares positivos, um deles é a Tau tubulin quinase-2 (Ttbk2), que é recrutada para o corpo basal pela Cep164, presente nas fibras de transição. Outra proteína importante nesse processo é a proteína reguladora de afinidade de microtúbulos quinase 4 (Mark4), que se acumula no corpo basal conforme Cp110 é deslocado. Esses achados indicam que o desaparecimento de Cp110 do centríolo mãe é crucial para iniciar a biogênese do cílio primário (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

Paralelamente a proteína quinase Aurora A também inibe a ciliogênese, o mecanismo requer as ligases Cul3-RING E3 e a KCTD17 que ubiquitinam a tricopleina, que está ligada e ativa a Aurora A, esta ubiquitinação pelo proteossoma permite o início da extensão do axonema (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

1.3.2. Transporte intraflagelar IFT

A matriz extracelular não dispõe de proteínas próprias para montar e manter o axonema, o mecanismo de transporte intraflagelar é um componente crítico do mecanismo da ciliogênese. Blodgood e colaboradores foram os primeiros a observar como os grânulos de poliestireno podiam se mover, ao longo dos cílios móveis, de *Chlamydomonas*, de forma bilateral, independente do batimento celular (Bloodgood, 1977), os ensaios continuaram até que foi possível purificar as partículas responsáveis por transportar diversas frações ao longo do cílio (Morthorst et al., 2018; Prevo et al., 2017).

A visão atual é que os denominados trens IFT são de dois tipos, os primeiros, IFT anterógrados ou IFT-B que integram uma variedade de moléculas de carga que irão se incorporar no axonema ciliar, membrana e matriz; além das proteínas Arl13b e Smo. Eles são movidos da base para a ponta distal do cílio por complexos heterotriméricos e, em alguns casos, motores homodiméricos da família da cinesina-2. Por outro lado, os trens IFT retrógrados ou IFT-A, cumprem o papel de reciclar produtos de rotação da ponta para a base do cílio. Eles são movidos pela dineína IFT também conhecida como dineína-2 ou dineína classe dhc1b. (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Morthorst et al., 2018; Prevo et al., 2017).

Como tínhamos estabelecido anteriormente, os cílios têm um papel de sinalização intracelular em vários processos críticos das células, como as vias Shh, Wnt, Notch, ou polaridade celular planar, entre outros. Logo, acredita-se que o IFT tenha um papel importante nestes processos de sinalização, não apenas construindo o cílio primário (Prevo et al., 2017).

1.3.3. Estrutura e composição dos trens IFT

As *Chlamydomonas* são um dos organismos modelo para o estudo dos cílios e concomitantemente dos trens IFT, usando microscopia eletrônica e de luz se puderam observar trens de transporte intraflagelar, concluindo que o tamanho observado do trem

IFT varia drasticamente, nos trens mais longos tendo cerca de $\sim 0,7 \mu\text{m}$ de comprimento e exibindo uma periodicidade de 40 nm, enquanto os mais curtos com apenas $\sim 0,25 \mu\text{m}$ de comprimento e exibem uma periodicidade de 16 nm, outro estudo concluíram que o tamanho dos trens IFT está em escala inversa com o comprimento ciliar; significa que os trens são mais longos quando o cílio é mais curto e vice-versa, teorizando que a regulação do comprimento do trem IFT pode representar um mecanismo de controle do comprimento ciliar (Prevo et al., 2017), finalmente um estudo recente usando microscopia de luz e eletrônica correlativa mostrou que as partículas de IFT em flagelos se movem anterogradamente ao longo dos microtúbulos axonemais B, enquanto o movimento é retrógrado nos A (Morthorst et al., 2018).

1.3.3.1. Motores do IFT

Ensaio de mutações de perda de função nas subunidades IFT-B e IFT-A muitas vezes mutações em cinesina-2 heterotrimérica e dineína-2, levou à sugestão de que IFT-B e IFT-A tem função separada no transporte anterógrado e retrógrado ao longo do axonema, mas as vezes existem evidências científicas conflitantes, por exemplo em *Caenorhabditis elegans* a cinesina-2 heterotrimérica parece se ligar e transportar IFT-A, em contraste em ensaios de coimunoprecipitação em *Chlamydomonas* e camundongos a evidências que sugerem que a cinesina-2 heterotrimérica se liga diretamente a IFT-B, temos que destacar que as *Chlamydomonas* carecem de cinesina-2 homodimérica (Prevo et al., 2017). A bioquímica e as consequências funcionais da ligação dos motores IFT às subunidades dos trens IFT anterógrados e retrógrados tem que ser esclarecido em pesquisas adicionais.

1.3.3.2. Cinesina heterotrimérica-2

Os motores anterógrados são membros da família “Kinesin-2”, o primeiro que descreveremos é a cinesina heterotrimérica, conhecida como KIF3 em mamíferos, foi purificada a partir de ovos de ouriço do mar. É um motor que apresenta como trilhos os microtúbulos e consiste das subunidades 2α , 2β que são as subunidades motoras, e KAP que teria o papel de estabilizar o domínio *coiled-coil* espiral formado pelas subunidades motoras. A cinesina heterotrimérica se move em direção às extremidades (+) do microtúbulo a aproximadamente $0,4 \mu\text{m/s}$ (Prevo et al., 2017; Scholey, 2013).

1.3.3.3. Cinesina homodimérica-2

O segundo motor da família “Kinesin-2” é a cinesina homodimérica, descoberta mediante o fracionamento bioquímico de extratos de *C. elegans*, onde se puderam observar a cinesina heterotrimérica e a homodimérica. Ela apresenta duas subunidades motoras γ também nomeadas OSM-3. A cinesina homodimérica também se desloca na direção às extremidades (+) do microtúbulo a aproximadamente 1,0 $\mu\text{m/s}$ (Prevo et al., 2017; Scholey, 2013).

A cinesina homodimérica está envolvida na montagem do axonema em *C. elegans* na ausência da função da heterotrimérica (Prevo et al., 2017). Mas em camundongos a ausência da função da cinesina homodimérica não parece afetar a morfologia e funções ciliares e consequentemente seu papel na formação do axonema (Jiang et al., 2015).

1.3.3.4. Dineína IFT

Conhecida também como dineína-2, DYNC2 ou DHC1b é um motor mais complexo do que os motores de cinesina-2, consistindo em dois DYNC2 e normalmente dois de cada um dos três tipos de cadeias leves: LC8, TcTex, roadblock; duas cadeias intermediárias leves e duas cadeias intermediárias. Conduz o transporte retrógrado de trens IFT da ponta do axonema a taxas de um a alguns micrômetros por segundo (Prevo et al., 2017) mas ao contrário da dineína-1 citoplasmática as propriedades de motilidade *in vitro* são ainda desconhecidas, um estudo feito por Ichikawa e colaboradores evidenciou que uma dineína-2 recombinante se movia em direção a extremidades (-) do microtúbulo a aproximadamente 0,07 $\mu\text{m/s}$ *in vitro*, (Ichikawa et al., 2011). A função da dineína-2 é reciclar componentes da maquinária IFT anterógrado e produtos de rotação de volta para a base do cílio para exportação (Prevo et al., 2017).

1.3.4. GTPAsas Rab

As proteínas Rab8a, Rab17, Rab23, Rab11, Rab10 foram implicadas no processo de ciliogênese primária, dentre elas, a Rab8a é a única que se localiza no cílio, sendo recrutada para o centrossoma pela interação direta de Odf2/Cenexina. Em células RPE-1 as mesmas proteínas também regulam a associação das vesículas Rab11 positivas. A forma GTP-Rab11 interage diretamente com seu efetor Rabin8 que a sua vez interage com Rab8, o silenciamento de Rab11, Rabin8 ou Rab8 inibem a ciliogênese. (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

Estudos de coimunoprecipitação demonstraram a que a Kif17 precisa se ligar a proteínas regulatórias como Rab23 para seu transporte ciliar. Além disso as duas proteínas foram observadas colaborando com IFT-B para entregar receptores específicos dos cílios primários (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Morthorst et al., 2018).

1.3.5. Complexo multiprotéico BBSome

O complexo multiprotéico BBsome é formado por sete proteínas BBS altamente conservadas: BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9. E uma BBIP10. Em humanos os defeitos do BBsome resultam na síndrome Bardet-Biedl, de onde é originário o nome (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

A subunidade BBS1 interage diretamente com o Rabin8 e recruta o BBSome, também o silenciamento de BBS2 ou BBS4 reduz o número de cílios em células RPE-1.

A análise *in vivo* do transporte de cargas em neurônios sensoriais olfativos revelou que o complexo BBSome se move em associação com trens IFT e cargas através dos cílios, sugerindo que o BBsome atua como um adaptador de cargo entre a membrana e a maquinaria IFT.

O BBsome também regula a remoção de GPCRs, policistina-2 e proteínas associadas à membrana dos cílios (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

1.4. Dinâmica do cílio primário

Os processos de montagem e desmontagem do cílio primário estão intimamente relacionados com o ciclo celular. A montagem se dá em células em G1 privadas de mitógenos, ao desativarem a maquinaria do ciclo celular durante quiescência (G0) ou diferenciação. Ao reingressar a fase G1 e na transição G1-S e S, o cílio primário sofre um rápido e progressivo encurtamento e por fim desaparece, na fase G2 (Figura 3) (Sánchez & Dynlacht, 2016).

Figura 3. Esquema da montagem e desmontagem do cílio primário no ciclo celular. As células em quiescência G0 ou diferenciadas podem montar cílio primário, a montagem se dá em células em G1 privadas de mitógenos, ao ingressar a fase G1 e na transição G1/S e S o cílio sofre um rápido e progressivo encurtamento e por fim desaparece na fase G2 (Sánchez & Dynlacht, 2016)

1.4.1. Montagem do cílio primário

A montagem do cílio pode ser dividida em vários estágios (Figura 4), embora se precisem de passos anteriores à montagem.

Figura 4. Estágios da montagem do cílio primário. a) tráfego, encaixe e extensão da vesícula ciliar, b) migração do centróssomo, c) elongação do axonema (Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.1.1. Vias da ciliogênese primaria

Apesar da conservação evolutiva da estrutura ciliar e da maquinaria ciliar, os cílios podem apresentar fenótipos diferentes de acordo com o tipo de células e tecidos onde estão localizados. Sorokin e colaboradores, em 1968 estabeleceram que a ciliogênese primária procede por duas vias distintas, dependendo da posição do centrossoma na célula (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017). Em células de tecidos conjuntivo, ou epiteliais como as células do epitélio pigmentado da retina, o cílio primário está presente dentro da bolsa ciliar, enquanto em outros tipos de células ele se projeta diretamente da membrana plasmática. (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

A primeira rota ou via intracelular se inicia quando o centrossoma está próximo ao núcleo, a ciliogênese começa intracelularmente e termina na membrana plasmática, gerando uma bolsa. Enquanto a segunda rota ou via alternativa acontece quando o centrossoma está próximo à membrana plasmática, o processo da ciliogênese ocorre inteiramente na membrana plasmática e nenhuma bolsa aparece. A presença ou ausência da bolsa ciliar pode ser uma consequência da rota de montagem do cílio primário usada e, portanto, da posição do centrossoma (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017).

A rota intracelular é a mais clássica e a que acontece em células RPE-1, o modelo celular utilizado ao longo deste trabalho, assim, ela será revisada com maiores detalhes.

1.4.1.2. Maturação do centríolo mãe

Como primeiro passo, para montar um cílio primário é necessário um MC maduro e para maturação são necessários ao menos dois ciclos celulares consecutivos.

No primeiro ciclo, a centríolo filha é montada a partir de um centríolo pré-existente (centríolo mãe, e de um mais velho ou centríolo avó) acontecendo durante a transição G1 – S. Essas centríolos filhas são distinguidas pelo recrutamento de proteínas centríolares filhas, como a CEP120, centrobina e NEURL4. No segundo ciclo celular, a centríolo filha recém-formada em cada célula amadurece, se tornando uma MC, começando com a perda das proteínas centríolares filhas na fase G1- S e seguido pela aquisição de apêndices distais, DA, e apêndices subdistais e SDA, no final da fase G2 (Wang & Dynlacht, 2018).

Os DAs são essenciais para o encaixe da vesícula e para o recrutamento da maquinaria de transporte intraflagelar (IFT) durante o início da ciliogênese. Até o momento foram descobertas várias proteínas DAs, entre elas as CEP83, CEP89, SCLT1 e

CEP164 formam os raios do tipo cata-vento do DAs e a proteína FBF1 forma a matriz inter-raios (Wang & Dynlacht, 2018).

Os SDAs determinam o posicionamento dos cílios através da ancoragem dos centríolos à rede microtubular plasmática. Dez proteínas SDAs foram descobertas até agora, entre elas a C2CD3, OFD1, MAPK15, que recrutam as proteínas DAs, mutações nas proteínas C2CD3 e OFD1 em humanos produzem doenças ciliares ou ciliopatias com anormalidades no desenvolvimento, paralelamente tricopleina e CC2D2A recrutam as SDAs chamadas ODF2 e nineína, a ablação (depleção) de tricoplemina evita o recrutamento de nineína. (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.1.3. Tráfego, encaixe e extensão da vesícula ciliar

Continuando, o processo da ciliogênese necessita do acúmulo das PVCs na vizinhança dos centríolos, precisamos é importante ressaltar que os PCVs podem se originar do Golgi ou de endossomos de reciclagem e são transportadas para o MC maduro ao longo dos microtúbulos de uma maneira dependente de cinesina e dineína. As PCVs derivadas de Golgi provavelmente são transportadas por cinesinas, por exemplo com o silenciamento de KIFC1 as proteínas da membrana ciliar são incapazes de trafegar para o centríolo e se acumulam no Golgi. Dineínas como a dineína DYNC1H1 são necessárias para o tráfego das PCVs ao longo dos microtúbulos (Sánchez & Dynlacht, 2016; Shakya & Westlake, 2021; Wang & Dynlacht, 2018).

Depois, acontece o acoplamento de PCVs aos DAs que depende de uma rede de actina centrossômica ramificada, evidências sugerem que o centrossomo atua como um centro organizador de actina, além de seu papel estabelecido como organizador de microtúbulos. Os complexos nucleador de actina ARP2/3 e o promotor de nucleação WASH localizam-se perto dos centríolos promovem a montagem de uma rede de actina centrossomal. Paralelamente as proteínas de adesão focais também se concentram nos centríolos e ajudam a ancorá-los ao citoesqueleto de actina. Os fatores de remodelação do citoesqueleto de actina LIMK2 e TESK1 também foram visualizados na vizinhança dos centríolos, a depleção deles, que regulam a fosforilação da cofilina 1, um fator de despolimerização da actina e regulador positivo da ciliogênese, provoca aumento no número de cílios. Esses achados sugerem que um equilíbrio dinâmico entre a polimerização e a despolimerização da actina regula a ciliogênese (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

PCVs miosina Va positivas podem ser encontradas próximos aos centríolos 30 minutos após a privação de soro, e a depleção de miosina Va, leva ao bloqueio do encaixe das PCVs. Esta descoberta sugere que a miosina Va está entre os primeiros marcadores conhecidos de tráfico de PCV (Wu et al., 2018). É provável que as redes de microtúbulos e de actina colaborem durante o tráfego e acoplamento de PCV (Assis et al., 2017; Wang & Dynlacht, 2018).

Os componentes do ESCRT (complexo de classificação endossômica necessários para o transporte), são essenciais para o encaixe das PCVs, apoiando a implicação da via de tráfego de endossomo no crescimento de CV (Wang & Dynlacht, 2018).

Finalmente após o acoplamento das PCVs, começa a extensão da CV, a proteína EHD1 é recrutada para as PCVs para facilitar a sua fusão em uma vesícula ciliar, que cobre todas as extremidades distais dos MCs. Por outro lado, Rab11 e Rabin8, promovem o recrutamento da GTPase Rab8a para a CV facilitando sua extensão, ela também interage com um grupo de proteínas centriolares distais, incluindo CEP164, Chibby, AHI1 e Talpid3, facilitando o encaixe das PCVs ao DA (Wang & Dynlacht, 2018).

Existem outras proteínas nos satélites centriolares, que são grânulos citoplasmáticos que tem um papel importante no tráfego, fusão e extensão das PVC. As C2CD3 e OFD1, que se localizam nos satélites centríolos como na extremidade distal dos centríolos, mostraram ser necessárias para a montagem de DA. A proteína PCM1 interage com proteínas do complexo BBsome e auxilia no tráfego de BBsome, que por sua vez facilita a ativação da sinalização Rab11-Rabin8-Rab8a, e também pode regular os níveis centrossomais de Talpid3, uma proteína necessária para o recrutamento de Rab8a. Outra proteína a CEP290, que se localiza tanto nos satélites centriolares como na zona de transição ciliar, regula o recrutamento Rab8a e, portanto, a fusão e extensão das PCVs (Sánchez & Dynlacht, 2016; Shakya & Westlake, 2021; Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.1.4. Migração do centrossomo

Durante a ciliogênese, a montagem da membrana ciliar é acompanhada pela migração do centrossomo do centro em direção à superfície celular onde o corpo basal se ancora à membrana plasmática via DAs (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018). Este processo é impulsionado por forças mecânicas produzidas durante a remodelação do citoesqueleto, por exemplo os microtúbulos do entorno centrossomal têm um aumento na nucleação e estabilização, paralelamente à migração do centrossomo,

além disso a rede de actina também é remodelada (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

Num estudo de desenvolvimento neuronal de *C. elegans* se observou que o centríolo é transportado ao longo dos microtúbulos do corpo celular até a ponta do dendrito de maneira independente de dineína-1, esses achados sugerem que a actina e os microtúbulos podem promover cooperativamente a migração do centrosomo. (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

Finalmente o silenciamento de duas proteínas da SDA, a CEP128 e c-NAP leva à dissociação dos centrosomos do Golgi, promovendo a formação de cílios na superfície celular (Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.1.5. Mecanismo do controle de transição do corpo basal ao cílio

A capacidade de uma célula em apresentar cílios primários, depende das proteínas CP110 e CEP97 que são inibidores da ciliogênese, nas células em divisão se localizam no extremo distal da centríolo mãe e filha (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

O complexo inibidor CP110-CEP97 é removido pela TTBK2 que é recrutada pela CEP164, este recrutamento é mediado pelos níveis, no centrosomo/base ciliar, do fosfatidilinositol 4-fosfato, $\text{PtdIns}(4)P$, ele inibe a interação do TTBK2/CEP164 nas células em proliferação, por outro lado a proteína satélite centriolar, MCRS1, também regular a TTBK2 ligando-se diretamente e recrutando-a para o centrosomo e também a pequena GTPase, RSG1, é recrutada para o MC por TTBK2 e é necessária para iniciar o alongamento do axonema. Finalmente numa triagem de siRNAs para quinases que regulam a ciliogênese se identificou a MARK4 como outro catalisador da remoção de CP110 (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

Como já citado, a Aurora A também é necessária para a ciliogênese, a depleção do KCTD17 em células RPE-1 evita a remoção da tricopleina e a inativação da Aurora A, Nas células em ciclo celular, Ndel1 protege a tricopleina da degradação mediada pela CRL3/KCTD17, resultando no bloqueio da ciliogênese antes do alongamento do axonema (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.1.6. Elongação do axonema

A membrana ciliar e os microtúbulos dentro do axonema se alongam ainda mais após o corpo basal ser coberto por CV e se fundir com a membrana plasmática. Durante este processo de alongamento do axonema, grandes quantidades de tubulina entram no cílio a partir do citoplasma por difusão e via IFT, assim, a perturbação dos níveis de tubulina citoplasmática ou transporte de IFT pode afetar o alongamento do axonema e o comprimento do cílio (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

As moléculas de IFT estão concentradas dentro da matriz dos DAs, onde os complexos IFT são formados com ajuda do BBSome, o recrutamento de IFT-B para a base ciliar é mediado por TTBK2 e proteínas do DAs, a entrada no cílio é parcialmente mediada pela GTPase, RABL2B, que promove o ingresso, finalmente os complexos IFT-B são levados até a ponta ciliar, onde a tubulina é integrada no axonema pela cinesina-2. Na base ciliar o FLA8, uma subunidade da cinesina-2 não fosforilada, permite que o IFT-B se ligue à cinesina-2, enquanto que na ponta do cílio CrCDPK1 fosforila FLA8 e interrompe a interação da cinesina-2 com o IFT-B permitindo a liberação da carga (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

A IFT é conhecida por ser regulada por um grupo de proteínas quinases, incluindo DYF-5, DYF-18, PKG-1, GCK-2 e a via DLK-1/p38 MAPK, embora os mecanismos sejam desconhecidos (Sánchez & Dynlacht, 2016; Shakya & Westlake, 2021; Wang & Dynlacht, 2018).

A velocidade de transporte e o carregamento do IFT contribui na regulação do comprimento do cílio, no primeiro caso o aumento da velocidade de transporte anterógrado está associado a cílios alongados, enquanto a diminuição da velocidade está ligada a cílios curtos, no segundo caso um estudo recente sugere que o carregamento da carga axonemal em complexos IFT diminui com o aumento do comprimento ciliar (Wang & Dynlacht, 2018)

O alongamento do axonema também é coordenado com a extensão da membrana ciliar quando Rab8a ativa é superexpressa em células de mamíferos ou após a depleção de genes do IFT, em tripanossomas, a extensão anormal da membrana ciliar pode promover o alongamento do axonema e produzir cílios mais longos (Nachury et al., 2007; Wang & Dynlacht, 2018). Além disso, a rede de actina, ectocitose, e endocitose também estão envolvidas na regulação do comprimento do cílio, provavelmente regulando a composição da membrana ciliar e o transporte ou localização de proteínas (Wang & Dynlacht, 2018)

Uma vez montado e alongado por completo, o cílio retém sua composição única, em parte, em virtude de mecanismos de bloqueio: na base do cílio, uma barreira de proteína solúvel e a função de zona de transição para manter a composição proteica do cílio (Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.2. Desmontagem do cílio primário

Os mecanismos que estão por trás da desmontagem ou reabsorção dos cílios são menos conhecidos que os de montagem, a desmontagem do cílio primário é de forma bifásica, a primeira onda ocorre na fase G1, logo após a estimulação mitogênica das células quiescentes e uma segunda onda, na fase G2 prévio à mitose (Sánchez & Dynlacht, 2016).

1.4.2.1. Desmontagem dos microtúbulos axonemais

A Aurora A parece desempenhar um papel fundamental no processo da desmontagem dos microtúbulos axonemais promovendo as duas ondas da desmontagem, ela é ativada em resposta a sinais de reentrada no ciclo celular, fosforila e estimula a histona desacetilase HDAC6, que desacetila e desestabiliza a tubulina do axonema, também desacetila a cortactina que acrescenta a polimerização da actina promovendo a desmontagem do cílio, finalmente interage com a Plk1 promovendo a desacetilação e reabsorção ciliar (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018). Outra histona desacetilase a HDAC2 regula positivamente a expressão da Aurora A, e sua depleção promove a montagem de cílios em células cancerosas.

Estudos mostram como os HDACs podem regular a desmontagem do cílio por meio de diferentes substratos e mecanismos, destacando o potencial de inibição do HDAC como uma estratégia terapêutica para reverter a perda de cílios (Wang & Dynlacht, 2018). Várias vias podem ativar a Aurora A, por exemplo a via de sinalização não canônica Wnt, o tratamento com Wnt5a induz a fosforilação de Dvl2 por CK1ε e a formação do complexo Dvl2-Plk1, que estabiliza NEDD9 que promove a ativação de Aurora A, Pitchfork ou Pifo, também ativa Aurora A promovendo a desmontagem do cílio.

Além disso, o INPP5E regula os níveis da proteína Aurora A por meio de mecanismos de transcrição que são mediados, pelo menos em parte, pela atividade de AKT (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018). Um ensaio de Hamze-Komaiha e colaboradores, mostrou que culturas celulares 3D desenvolvem um lúmen

com cílios e, neste contexto, a fosfatidil-inositol fosfatase SHIP2 se liga a Aurora A e NEDD9 e promove sua localização basolateral às custas de sua expressão luminal associada à reabsorção de cílios (Hamze-Komaiha et al., 2016). Finalmente, foi demonstrado que a estimulação por soro pode induzir a formação de um complexo de desmontagem do cílio (CDC), que consiste em Aurora A, CPAP, Nde1 e OFD1, e no qual o CPAP funciona como uma proteína-esqueleto que facilita a recrutamento desse complexo para a base ciliar (Gabriel et al., 2016).

Duas cinesinas são capazes de despolimerizar microtúbulos, a Kif2a e Kif24. A primeira é ativada por Plk1 durante a fase G2/M promovendo a despolimerização do microtúbulo ciliar e a desmontagem do cílio; em células quiescentes, ao contrário, Kif2a é degradada através do sistema ubiquitina/proteassoma mediado por APC/C para facilitar a ciliogênese. A segunda, Kif24, identificada por meio de sua associação com CP110, regula negativamente a montagem do cílio primário, sua atividade de despolimerização pode ser aumentada por sua fosforilação através de Nek2 que é expressa na fase S e G2.

A fase da Aurora A e das cinesinas Kif2, Kif24 e Nek2 são duas fases diferentes, podendo favorecer a irreversibilidade da desmontagem ciliar uma vez que a fase S se inicia (Figura 5) (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

Figura 5. Estágios da desmontagem do cílio primário A) desestabilização do cílio B) ativação da Aurora A, C) bloqueio da re-ciliogênese (Sanchez & Dynlacht, 2016).

1.4.2.2. A membrana ciliar é remodelada durante a desmontagem

A desmontagem do cílio requer a remodelação das membranas ciliares, a bolsa ciliar, CiPo, uma região rica em actina que rodeia a região proximal do axonema ciliar, é um centro dinâmico, após a reabsorção do cílio, a membrana CiPo sofre remodelação ativa, acompanhada por endocitose aumentada (Wang & Dynlacht, 2018). No nível molecular, a remodelação da membrana CiPo e o aumento da endocitose mediada por clatrin são dependentes da polimerização da actina e são regulados por Tctex1, também conhecido como Dynlt1, ou fosfo-Tctex1, a forma ativa do Tctex1, se liga diretamente à F-actina e interage com três reguladores de polimerização de actina, ANXA2, ARPC2 e Cdc42, se perturbada a expressão e/ou função de qualquer uma dessas três proteínas a reabsorção ciliar é interrompida, também o silenciamento de Tctex1 bloqueia a entrada na fase G1/S e mantém o cílio montado. (Sánchez & Dynlacht, 2016; Wang & Dynlacht, 2018).

A membrana ciliar distal do axonema também sofre remodelação ativa, em particular pela liberação das CVs, que removem preferencialmente o IFT-B em vez do IFT-A dos cílios primários, limitando o crescimento do cílio e promovendo a desmontagem (Wang & Dynlacht, 2018).

1.4.2.3. Outros fatores que regulam a desmontagem

O IFT é importante tanto na montagem como na desmontagem do cílio, na desmontagem o papel está restrito às redes locais de actina, a histona lisina desmetilase KDM3, que promove a formação de feixes de actina regulando a expressão de genes e ligando-se ao citoesqueleto de actina, na ausência dela a rede se despolimeriza, resultando em um retardo da absorção dos cílios e distribuição anormal de IFT dentro dos cílios (Wang & Dynlacht, 2018).

Nde1 é outro regulador negativo do comprimento ciliar e regula a desmontagem do cílio, está altamente expressa em células mitóticas e é esgotada, em células em G0, através da fosforilação da CDK5 que marca a Nde1 para a ubiquitinação pela proteína Fbxw7 do complexo F-box; durante a entrada no ciclo celular a atividade de CDK5 diminui permitindo que os níveis de Nde1 se acumulem e promovam a reabsorção ciliar (Sánchez & Dynlacht, 2016).

1.5. A dineína citoplasmática

As dineínas foram descobertas pela primeira vez como os motores que impulsionam o batimento flagelar em *Tetrahymena pyriformis*. Posteriormente, foram encontradas duas isoformas de dineína que são responsáveis pelo movimento no citoplasma, e cílios. (Reck-Peterson et al., 2018).

A dineína é essencial em vários organismos, por exemplo existem 16 genes da cadeia pesada da dineína no genoma humano e 26 na *Tetrahymena thermophila*, além disso mutações na maquinaria de transporte da dineína têm sido associadas a doenças neurológicas (Reck-Peterson et al., 2018; Roberts, 2018).

A dineína citoplasmática 1 foi isolada pela primeira vez como uma ATPase de alto peso molecular com propriedades bioquímicas, estruturais e móveis distintas da cinesina, depois constatou-se que a dineína-1 potencializa o movimento direcionado à extremidade negativa de uma ampla gama de componentes intracelulares. Para executar suas funções interage com uma ampla gama de reguladores incluindo dinactina, Lis1, NudE/NUDEL e adaptadores de carga que ligam o complexo dineína-dinactina (Roberts, 2018).

Já a primeira evidência para dineína-2 veio da análise de cDNA, Gibbons e colaboradores identificaram um transcrito em embriões de ouriço do mar que é regulado positivamente durante a regeneração dos cílios, mas cuja sequência apresentava mais semelhança com a dineína-1 do que com as isoformas axonemais (Roberts, 2018).

Existem várias diferenças entre a dineína-1 e 2. A primeira é que a dineína-1 envolve pequenos grupos de motores ligados à carga via dinactina, enquanto o transporte da dineína-2 ocorre no contexto de longos trens de IFT. A segunda é que muitas cargas de dineína-1 recrutam membros da família cinesina-1, 2 e 3 e alternam entre movimento direcionado para o lado mais ou menos, enquanto a dineína 2 opera de maneira coordenada como o motor IFT anterógrado. Terceira, a dineína-2 se move nos túbulos A ou no túbulo incompleto B do axonema, ficando confinada a um espaço bem menor entre a superfície externa do duplete de microtúbulos e a membrana ciliar enquanto a dineína-1 pode se mover pelos microtúbulos de toda a célula executando muitas funções e não confinada a um lugar (Roberts, 2018).

1.5.1. Estrutura da dineína

A dineína humana é um complexo de 1,4 MDa composto por seis polipeptídeos diferentes, todos presentes em duas cópias. Há uma única cadeia pesada de dineína, DHC, codificada por DYNC1H1, e duas isoformas de cada um dos outros componentes:

As cadeias intermediárias, DIC, são codificadas por DYNC1IC1 e DYNC1IC2.

As cadeias intermediárias leves, DLIC; são codificadas por DYNC1LI1 e DYNC1LI2.

Três famílias de cadeia leve de dineína, DLC: Roadblock, Robl; são codificadas por DYNLRB1 e DYNLRB2, LC8, é codificada por DYNLL1 e DYNLL2, e Tctex, codificada por DYNLT1 e DYNLT3 (Reck-Peterson et al., 2018).

A cadeia pesada tem um domínio motor no C-terminal e um domínio de dimerização no N-terminal, duas DHCs se ligam pelo NND, a cadeia intermediária tem um domínio WD40 que se liga aos feixes helicoidais da DHC 4 e 5, as duas DIC são mantidas juntas por dímeros das cadeias leves, finalmente as cadeias leves intermediárias tem um domínio semelhante a RaS que se contata com os pacotes helicoidais 6 e 7 da DHC. O domínio motor tem um *linker* de seis domínios AAA+ e um domínio C-terminal que se liga ao trilho pelo domínio de união ao microtúbulo MTDB (Reck-Peterson et al., 2018).

Pela presença do domínio motor, a dineína se move ao longo dos microtúbulos por meio do acoplamento de mudanças conformacionais induzidas pela ATP do anel AAA+ com a flexão e endereçamento do ligante (Reck-Peterson et al., 2018).

Figura 6. Estrutura da dineína (Reck-Peterson et al., 2018).

1.5.2. As cadeias leves de dineína citoplasmática DYNLL1 e DYNLL2

A família das cadeias leves de dineína citoplasmática inclui dois membros, anteriormente chamados de DLC1 e DLC2 (ou ainda LC8 e LC10) e agora anotados oficialmente como DYNLL1 e DYNLL2. São pequenas proteínas, de ~10 kDa, altamente conservadas evolutivamente e pelo menos um membro é expresso em todas as células eucariotas (Wilson *et al.*, 2001).

As proteínas DYNLL1 e DYNLL2 compartilham 93% de identidade de sequência proteica, diferindo em apenas 6 dos 89 aminoácidos. Estas 6 diferenciações entre aminoácidos (Cis2Ser, Glu16Asp, Ser21Alan, Glu23Asp, Lis29Met, His41Tir) são substituições relativamente conservadas (Figura 6), embora possam ter importância regulatória, como por exemplo, as posições 2, 21 e 41 que podem representar sítios de regulação diferencial por meio de fosforilação.

Figura 7. Esquema da sequência proteica da DYNLL1 e DYNLL2

DYNLL foi inicialmente identificada no complexo motor de dineína citoplasmática em *Chlamydomonas* (Pfister *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 2001), subsequentemente foi mostrado que DYNLL funciona como uma proteína inibidora de óxido nítrico sintase neuronal (Jaffrey & Snyder, 1996) e posteriormente que interage com a miosina-Va (Benashski *et al.*, 1997; Espindola *et al.*, 2000). Em 2000, Naisbitt e colaboradores estabeleceram a existência de dois parálogos de DYNLLs e mostraram que o membro que interage com a miosina-Va é a DYNLL2. Eles também mapearam o sítio de ligação entre DYNLL2 na cauda medial da miosina-Va. Além disso, mostraram que a DYNLL2 interage com GKAP, proteína associada a guanilato quinase, e postularam que a DYNLL2 serviria como adaptador de cargo para GKAP, conectando-a à miosina-Va (Naisbitt *et al.*, 2000).

Dados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que DYNLL2 está associada ao centróssomo, pólos do fuso mitótico e corpúsculo basal do cílio primário. O centróssomo é uma estrutura celular organizadora, composta por um par de centríolos associado a uma matriz proteica conhecida como material pericentrolar (PMC), que entre outras proteínas, contém centenas de anéis de α -tubulina, que atuam como sítios de nucleação para a polimerização dos microtúbulos (Purohit et al., 1999; Schnackenberg et al., 1998). O centróssomo cumpre múltiplas funções chave, entre as quais, serve para organizar a rede radial de microtúbulos na intérfase, duplica-se durante o ciclo celular para originar os pólos do fuso mitótico e em células quiescentes e diferenciadas desempenha papel na formação e manutenção do cílio primário.

Estudos realizados em *Chlamydomonas reinhardtii*, mostraram a presença do complexo dineína-2 e das cinco subunidades diferentes desta proteína no cílio, participando no transporte intraflagelar (IFT) (Patel-King et al., 2013; Rompolas et al., 2007). Em trabalhos já publicados por nosso grupo, foi demonstrado que a miosina-Va (MyoVa) se concentra no centróssomo, nos pólos do fuso mitótico e nas fibras do fuso, sendo uma proteína motora envolvida no transporte intracelular, localizada no citoplasma e núcleo de células eucarióticas. Sua presença foi descrita no centróssomo, o principal centro organizador dos microtúbulos e de onde nascem os cílios primários (Espreafico et al., 1998). Mais recentemente demonstramos que a MyoVa interage com a proteína centróssomo-ciliar RPGRIP1L, fornecendo as primeiras evidências do papel da MyoVa na ciliogênese, possivelmente regulada pelo centróssomo (Assis et al., 2017). E recentemente Kohli e colaboradores correlacionaram sua função com o processo de desmontagem dos cílios (Kohli et al., 2017).

1.5.3. DYNLL1 e DYNLL2 e a relação com os motores moleculares de dineína-2 e miosina-Va no cílio primário

Dois importantes trabalhos foram publicados por Goggolidou e seus colaboradores, descrevem o papel de DYNLL1 na ciliogênese, junto a ATMIN, um fator de transcrição necessário para a expressão do gene *DYNLL1*. Os autores descrevem a localização de DYNLL1 e DYNLL2, fusionadas a um tag, MYC ou HA, formando estruturas puntiformes ao longo dos cílios primários, distribuição que lembra muito à dineína citoplasmática 2, e ainda que o *knockdown* de ATMIN em cultura de células do rim e fibroblasto do camundongo, leva a redução no número de células ciliadas ou quando

presentes, os cílios são de tamanho muito reduzidos, fenótipo esse que é resgatado quando DYNLL1 ou DYNLL2 são superexpressas. Interessante notar que o fenótipo de silenciamento da DYNLL1 é idêntico ao do silenciamento da ATMIN permitindo concluir que a deficiência ciliar causada por mutação no gene ATMIN origina-se da falta de função de DYNLL1. Assim, esses dados fornecem evidências de uma via ATMIN-DYNLL1 capaz de controlar a ciliogênese (Goggolidou, Hadjirin, et al., 2014; Goggolidou, Stevens, et al., 2014). Além disso, de maior interesse para o presente projeto, esse trabalho demonstra que, embora a expressão do gene DYNLL2 não seja alterada com o *knockout* de ATMIN quando DYNLL2 é superexpressa ela é capaz de compensar a função de DYNLL1, resgatando a formação do cílio.

Estudos recentes desvendaram um modelo de sinalização em que as proteínas de moldagem da membrana, EHD1 e EHD3, e a cascata de sinalização Rab11–Rabin8-Rab8 atuam na ciliogênese (Lu et al., 2015; Sánchez & Dynlacht, 2016). Vesículas preciliares podem ser derivadas do Golgi e da reciclagem dos endossomos, e começam a se acumular nos DAs da centríolo mãe (Wu et al., 2018), as PCVs acumuladas se fundem para formar uma CV maior, a Myo-Va é necessária para o tráfego destas PCVs para os DAs da centríolo mãe, usando as vias intracelular e extracelular e pode ser útil para a marcação das PCVs/CVs. As vesículas preciliares PCVs e CVs associadas à Myo-Va podem ser detectadas durante os primeiros passos da ciliogênese (Wu et al., 2018).

A Myo-Va se liga aos domínios C2 de RPGRIP1L, uma proteína cílio-centrossomal que regula o posicionamento do corpúsculo basal e as vias de sinalização ciliar, como *Wnt* e *Sonic Hedgehog*. Além disso, ao superexpressar duas construções dominantes negativos de MyoVa em células RPE, foi mostrado que a perda da função de transporte da miosina Va suprime a ciliogênese (Assis, 2017). E finalmente o fato de que proteínas que regulam a montagem do cílio, Rab11, estabelecimento da zona de transição, RPGRIP1L, dinâmica do cílio, PTEN, ou composição do cílio, RILPL2, se ligam ao GTD da Myo-Va (Assis et al., 2017), confirmando assim um papel para Myo-Va em processos ciliares (Pedersen & Rosenbaum, 2008).

Tendo em vista que a estrutura ciliar final resulta do balanço entre os processos de montagem e desmontagem do cílio e que o cílio primário é uma estrutura crítica para o funcionamento da via de *Hedgehog*, consideramos relevante elucidar como a expressão e função dessas duas cadeias leves é coordenada e em que medida elas participam de

eventos opostos no interior do cílio e se a compensação funcional resulta de sobreposição funcional ou influência em eventos opostos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elucidar a participação da cadeia leve de dineína DYNLL2 na dinâmica de montagem e desmontagem do cílio primário.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a localização de DYNLL2 na estrutura do cílio primário de células de epitélio pigmentado da retina (RPE-1).
- Avaliar o efeito do silenciamento de DYNLL2 na dinâmica e fenótipo dos cílios primários.
- Avaliar o efeito da superexpressão de DYNLL2 na dinâmica e fenótipo dos cílios primários.

3. METODOLOGIA

3.1. Linhagens celulares e cultura

Para investigar os objetivos propostos utilizamos a linhagem celular derivada do epitélio pigmentado da retina humana, imortalizada com o vetor pGRN145 hTERT (RPE-1 hTERT - ATCC® CRL-4000™), esta linhagem é imortalizada pelo mecanismo de recuperação da telomerase, e é um modelo bem caracterizado na literatura para o estudo da ciliogênese.

As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbelcco's Modified Eagle Medium: Nutrient* misturado com *Ham's F-12* (Thermo Sisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro de fetal bovino *SFB - Thermo Fisher Scientific* inativado, e com 100 mg/ml penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pH 7,2. Todas as células serão mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Para o desprendimento das células para experimentos e manutenção utilizaremos a solução de Tripsina-EDTA 0,25% em PBS.

3.2. Superexpressão e silenciamento

Para avaliar o efeito da superexpressão de DYNLL2, utilizamos o vetor lentiviral FUGW, para transdução das células RPE-hTERT com os genes em estudo, a fim de estabilizar a superexpressão de DYNLL2 junto a um repórter da proteína verde fluorescente, EGFP.

Para avaliar o efeito do silenciamento de DYNLL1 e DYNLL2 iremos utilizar o vetor FUG.12, que também tem um repórter EGFP onde inseriremos as sequências que codificarão os shRNAs contra os alvos de interesse.

Para a produção lentiviral, as células HEK-293T, foram plaqueadas em placas de 6 poços, e transfectadas com Polietilenimina (PEI – Sigma-Aldrich) em meio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), com os seguintes plasmídeos:

Para a superexpressão: 10 µg de pFUGW, pFUGW-DYNLL2; 3,5 µg pVSV-G e 6,5 µg pΔ8.9.

Para o silenciamento: 10 µg de pFG.12-shLacZ, pFG.12-shDYNLL1, pFG12-shDYNLL2; 3,5 µg pVSV-G e 6,5 µg pΔ8.9.

Depois de 16 horas, o meio da transfecção foi trocado para DMEM suplementado com 30% de SFB. Após 48 e 72 horas o sobrenadante viral foi coletado, filtrado por uma membrana de 0,22 µm e adicionado às células de interesse para transdução viral.

3.3. Imunodeteccção de proteínas – Western Blot

As células foram plaqueadas em placas de 10 ml e no dia seguinte foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS 1X) e em seguida lisadas com tampão RIPA (20 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% (v/v) NP-40; 1% deoxicolato de sódio, diluição 1:100 de *HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free* – Thermo Fisher Scientific). Os lisados celulares foram centrifugados a $15000 \times g$ a 4°C por 15 min e várias amostras sonicadas 10 seg. por descansos de 20 seg. por 90 seg. numa cama de gelo. O sobrenadante foi recolhido e submetido à quantificação de proteína utilizando o kit Pierce BCA assay (Thermo Fisher Scientific). Quantidades iguais de lisados (de 10, 15 e 20 µg de proteína) foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE utilizando pre-cast 4–15% Mini-PROTEAN® TGX gels (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra), utilizando tampão de transferência.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brasil) em TBS-T (Tris HCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM, e Tween-20 0,05% (v/v)), durante 1 hora. E então, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-DLC2 em diferentes diluições, (este anticorpo foi produzido e puricado por Milene Moraes) por 14h a 4°C. Após esse período, a membrana foi incubada por mais 1 horas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Para a visualização das bandas de proteínas, a membrana foi incubada com soluções caseiras de revelação (*ECL - Enhanced chemiluminescence*), solução I (0,11M Tris/HCL pH 8,5; 2,78mM Luminol (3- aminophthalhydrazide – Sigma-Aldrich); 0,44mM ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich); 98,4% dH₂O) e solução II (0,02% H₂O₂; 0,1M Tris/HCL pH 8,5; 89,9% dH₂O) na proporção de 1:1 por 1 minuto e exposta para captura da imagem utilizando o sistema Image Quant (GE Life Sciences).

3.4. Purificação de RNA, cDNA e qRT-PCR

O RNA total foi extraído das células usando o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Os pellets de RNA foram suspensos em água DEPC e as amostras quantificadas a 260/280 nm em espectrofotômetro (NanoVue - GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

Para a RT-PCR quantitativa, todas as amostras de RNA (1 µg) foram convertidas em cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um volume de 10 µl de CDA e 10 µl do kit. A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos e a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 85°C por 5 minutos.

Para qRT-PCR foi usado o reagente *GoTaq® RT-PCR Systems* (Promega) foi usado em reações com um volume final de 12 µl contendo 6 µl de GoTaq Mix, 0,8 µl de uma mistura de *primer* senso e antisenso e 3,2 µl de água e finalmente 2 µL cDNA. As reações e análises de amplificação foram efetuadas utilizando o equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) utilizando o *software ABI 7500 Real-Time PCR SDS 1.2* (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão de mRNA foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os *primers* para os genes analisados foram projetados flanqueando as regiões do íntron para evitar a amplificação de produtos indesejados. Os genes GAPDH e TBP foram usados como genes de referência. As sequências dos iniciadores são apresentadas na tabela abaixo. Os dados da PCR em tempo real foram analisados pelo teste t não pareado, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Tabela 1. Sequencias dos *primers* usados para qRT-PCR

Gene	Sequência
Senso GAPDH	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
Antisenso GAPDH	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'
Senso TBP	5'-AGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3'
Antisenso TBP	5'-TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'
Senso DYNLL1	5'-GCTACTCAGGCGCTGGAGAAAT-3'
Antisenso DYNLL1	5'-GTGTCACATAACTACCGAAGTTCC-3'
Senso DYNLL2	5'-ACGCAGGCCATGGAGAAGTACA-3'
Antisenso DYNLL2	5'-TGTCTCGTGTGTGTGACGTAGCTG-3'

3.5. Sorting

As células superexpressas foram tripsinizadas e colocadas em meio DMEM/F12 com adição de antibióticos para evitar a contaminação, depois trasladadas ao Hemocentro RP ao laboratório de Citometria de Fluxo no citômetro Facs Fusion - Becton Dickinson (San José, CA, EUA).

Enquanto as células silenciadas foram tripsinizadas e colocadas em meio DMEM/F2 com adição de antibióticos e levadas ao laboratório de Citometria de Fluxo da FMRP-USP no citômetro Facs Melody – Becton Dickinson (San José, CA, EUA).

As linhagens foram devolvidas a caixas de 10 ml com meio DMEM/F-12 2% de antibiótico para evitar a contaminação e continuar a proliferação

3.6. Dinâmica de cílio primário

3.6.1. Montagem

As células foram divididas em 3 grupos e plaqueadas em lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços, no meio DMEM/F-12, ao dia seguinte foram lavadas com PBS e o primeiro grupo foram fixadas, com 2% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) (m/v) em PBS pH 7.4, por 10 minutos. Um segundo grupo foi mantido em meio sem soro por 24 horas, lavado com PBS e fixado. Finalmente as células do terceiro grupo foram mantidas sem soro 48h, depois lavadas e fixadas.

3.6.2. Desmontagem

As células foram divididas em 5 grupos e plaqueadas em lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços, no meio DMEM/F-12, ao dia seguinte foram lavadas com PBS 5 vezes e mantidas em meio sem soro por 72 horas, depois as células foram lavadas novamente e o primeiro grupo foi fixado com 2% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) (m/v) em PBS pH 7.4, por 10 minutos. Em todos os outros grupos foi colocado meio DMEM/F-12, 10% SFB e 1% antibióticos. Aos 45min o segundo grupo foi fixado. O terceiro grupo foi mantido meio por 2h e fixado. As células do quarto grupo foram fixadas 4h após ter colocado o meio. E finalmente o último grupo foi fixado as 8h seguindo a metodologia de Kohli e seus colaboradores (Kohli et al., 2017).

Os mesmos processos foram seguidos pelas células superexpressas e silenciadas.

3.7. Imunocitoquímica

As células fixadas foram permeabilizadas com 0,3% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), bloqueadas com 10 mM de glicina (Sigma-Aldrich), e finalmente bloqueadas com 2% (m/v) BSA (Sigma-Aldrich) em PBS em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário Arl13b (Thermo Fisher Scientific: PA5-61840), para marcar cílio primário, por 1h em temperatura ambiente. As células foram então incubadas por 1h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 Phalloidin (ThermoFisher Scientific: # A12381).

Entre cada etapa, as células foram lavadas 3 vezes, de 5 min cada, com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando *ProLong® Diamond Antifade Mountant medium with DAPI* (P36962 - Thermo Fisher Scientific).

3.8. Microscopia Multifotom, confocal e fluorescência.

A aquisição de imagens de microscopia de fluorescência foi feita no laboratório multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) e utilizamos o microscópio Leica DMI600B (Leica, Wetzlar, Alemanha), com uma objetiva 40x, usada para contar o número de cílios e o comprimento, paralelamente foi utilizado o Microscópio invertido Zeiss LSM 780 Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) do laboratório multiusuário de Microscopia Multifoton com objetiva 63x.

Todas as imagens adquiridas foram de planos focais únicos e adquiridas com os mesmos parâmetros para todas as linhagens

3.9. Processamento de imagens

Todas as imagens foram analisadas no Icy-Bioimage, usando os canais por separado para poder contar os cílios, além disso a cor, brilho e contraste foram iguais para todas as fotos sendo editadas só para melhorar a visualização quando necessário.

Todas as análises estatísticas e gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.10. Ensaio de proliferação

500 células foram plaqueadas em placas de 96 poços, e as análises foram realizadas nos tempos de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h. Para o ensaio o meio foi retirado e os poços foram lavados com 200µL PBS 1X, seguindo-se fixação das células

com 100 μ L etanol 70% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) por 10 minutos, e posteriormente adição de 40 μ L de 0,5% cristal violeta (Labsynth) por 30 minutos. Após esse período, os poços foram lavados por cinco vezes com 200 μ L de água ultrapura autoclavada e foi adicionado 100 μ L de ácido acético 10% (Sigma-Aldrich) para ocasionar a lise celular. As células ficaram incubadas por 30 minutos e a absorbância (540nm) foi analisada utilizando o leitor de ELISA (PowerWave, microplate scanning spectrophotometer-Biotech Incorporation) do laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da FMRP.

3.11. Ensaio de morte celular

Foram plaqueadas 500.000 células em placas de 6 poços, um poço por cada linhagem, depois foi coletado o meio e tripsinizadas as células, para desativar a tripsina foi usado o mesmo meio, separado com anterioridade, e centrifugamos. Logo resuspendimos o pellet com 1 mL de meio novo e colocamos num tubo de 2mL, centrifugamos, lavamos com PBS, e centrifugamos novamente. Finalmente resuspendemos em 200 μ L de PBS, e para a análise colocamos 2 μ L de iodeto de propídio 2mg/mol por cada 200 μ L de PBS e levamos ao laboratório de citometria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFR).

3.12. Ensaio de ciclo celular por citometria

Plaqueamos 500.000 células em placas de 6 poços, um poço por cada linhagem e diferentes placas para cada tratamento:

- 1 placa para linhagens mantidos em meio com soro
- 1 placa para linhagens em meio sem soro por 48 horas
- 1 placa para linhagens privados de meio soro por 48 horas e depois colocadas soro e mantidas com soro por 4h
- 1 placa para linhagens privados de meio soro por 48 horas e depois colocadas soro e mantidas com soro por 8h
- 1 placa para linhagens privados de meio soro por 48 horas e depois colocadas soro e mantidas com soro por 12h

Se tripsinizou cada linhagem dependendo do tempo do tratamento, se neutralizou a tripsina com 200 μ L de meio, se traspassou a um tubo de 2 mL para centrifugar 7 minutos a 1800 rpm, se descartou o sobrenadante e lavou o pellet com 1mL de PBS e se

centrifugou novamente, depois o pellet resuspendido em 150 μ L de PBS com 10mM EDTA e fixamos as células com 1350 μ L de etanol 70% diluído em PBS. Finalmente para o análise centrifugamos as células por 5 minutos a 1800 rpm e colocamos 1ml de PBS-EDTA (10mM) no pellet, adicionamos 200 μ L de PSSI (1,4 μ L de triton X-100 1%, 20 μ L RNAsa, 60 μ L de iodeto de propídio 2mg/mol em 10 ml de PBS), incubamos 30 minutos a temperatura ambiente e levamos ao laboratório de citometria da FCFRP.

4. RESULTADOS

Para que se tenha um melhor entendimento dos resultados obtidos os achados foram divididos em dois blocos, o primeiro aborda os resultados obtidos em células superexpressas e seu controle e no segundo os resultados em células silenciadas e seu controle.

4.1. Transdução de células superexpressas

Para cumprir nosso objetivo o primeiro passo foi transduzir as células RPE-hTERT com o vetor lentiviral FUGW nas células controle (chamaremos de EGFP) e o FUGW-DYNLL2 para as células alvo (chamaremos de EGFP-DYNLL2). É importante destacar que o construto tem como marcador fluorescente EGFP, e que se encontra fusionado à proteína de interesse DYNLL2.

Uma vez que os lentivirus foram montados carregando os construtos necessários, as células RPE-hTERT foram transduzidas, tendo como resultado diferentes populações divididas pela intensidade de fluorescência (Figura 8a e 8b).

Para demonstrar que o construto foi inserido corretamente utilizamos de dois métodos, o primeiro qRT-PCR para mostrar a expressão relativa do gene alvo (mRNA), resultando num aumento significativo da expressão de DYNLL2 em células EGFP-DYNLL2 em comparação com o controle EGFP (Figura 8c).

Também observamos a imunodeteção indireta da proteína DYNLL2 por Western blot (Figura 8d) sendo confirmada a inserção do construto FUGW nas células controle (EGFP), seja que a banda de 27 kDa equivalente ao peso molecular da EGFP e nas células EGFP-DYNLL2, onde podemos verificar uma banda próxima aos 37 kDa representado a fusão das proteínas EGFP+DYNLL2, com 27kDa e 10kDa respectivamente. Nenhuma marcação foi observada nas células WT.

Figura 8. Células RPE-hTERT transduzidas com o vetor lentiviral FUGW carreando o construto **EGFP-DYNLL2** ou **EGFP**. a) Células RPE-hTERT carreando o construto **EGFP** em verde, em azul o núcleo (DAPI) e em vermelho o cílio primário marcado com o anticorpo α -Arl13b, b) Células RPE-hTERT carreando o construto **EGFP-DYNLL2** em verde na base do cílio primário, em azul o núcleo (DAPI) e em vermelho o cílio primário marcado com o anticorpo α -Arl13b c) Quantificação da expressão relativa do mRNA de **DYNLL2** mediante qPCR-RT, três experimentos independentes. d) *Western Blotting* das amostras do lisado total de células equivalentes as comparadas no qPCR-RT.

4.2. Obtenção de populações homogêneas de células superexpressas divididas em faixa de intensidade de fluorescência

Uma vez confirmada a transdução, decidimos realizar um *sorting* das linhagens celulares **EGFP** e **EGFP-DYNLL2** com o objetivo de manter somente células com o

repórter fluorescente EGFP, adicionalmente pudemos separar três diferentes clusters de intensidade de fluorescência, esperando que esses pudessem se relacionar com o nível de expressão de DYNLL2. O processo de *sorting* consiste em dois passos, no primeiro é realizado um *pre-sorting* onde as células são sondadas quanto ao nível de intensidade de sinal (EGFP) e diferentes intervalos específicos podem ser escolhidos para que células dentro de cada um dos parâmetros de intensidade sejam selecionadas e separadas das demais populações (Figura 9a esquerda acima) e EGFP-DYNLL2 (Figura 9a esquerda embaixo), selecionamos as populações com 3 níveis de intensidade de fluorescência para cada linhagem (Figura 9a centro acima e embaixo), P6 de intensidade baixa, P5 intensidade média e P4 intensidade baixa, representadas no histograma (Figura 9a direita acima e embaixo).

Ao fim desse processo uma segunda etapa de leitura de intensidade de sinal é realizada, constituindo a etapa de *pós-sorting*, onde cada uma das populações que foram obtidas no processo de pré-sorting é verificada quanto a consistência dos parâmetros estabelecidos (Figura 9b, 9c e 9d).

Figura 9. Seleção de subpopulações celulares com diferentes intensidades de fluorescência reportada por EGFP em células RPE-hTERT transduzidas submetidas ao *sorting*. a) Pré-sorting das células controle com o repórter EGFP (acima) e das células com o construto EGFP-DYNLL2 (abaixo), b) *Póst-sorting* da população de células com intensidade baixa (verde) das células controle (acima) e as células com o construto EGFP-DYNLL2 (abaixo), c) *Póst-sorting* da população de células com intensidade média (laranja) das células controle (acima) e as células com o construto EGFP-DYNLL2 (abaixo), d) *Póst-sorting* da população de células com intensidade alta (roxa) das células controle (acima) e as células com o construto EGFP-DYNLL2 (abaixo).

4.3. Confirmação da superexpressão de DYNLL2 nas células RPE-hTERT

Depois de ter sido separadas as populações em EGFP-DYNLL2 baixa, EGFP-DYNLL2 média e EGFP-DYNLL2 alta, procedemos com a verificação da expressão, procurando a correlação da expressão com a intensidade de sinal de EGFP obtido pelo processo de *sorting*, utilizamos para tal o qPCR-RT e o Western Blot. A superexpressão de DYNLL2 foi confirmada nas 3 populações obtidas mediante qPCR-RT (Figura 10a). Paralelamente, com o Western Blot, confirmamos a presença do construto EGFP-DYNLL2 dentro das 3 linhagens, as condições estabelecidas para esse WB não nos permitiram observar a banda referente a proteína DYNLL2 endógena, sendo necessário um processo específico para sondar essa proteína com peso molecular mais baixo (~10kDa) que as demais observadas (Figura 10b).

Neste ponto se estabelece uma hipótese adicional, tentamos mostrar uma correlação entre a intensidade de fluorescência e a superexpressão de DYNLL2, no entanto a hipótese não foi confirmada, já que às intensidades de fluorescência média e alta não tiveram relação direta com a expressão média e alta de DYNLL2, a única linhagem que guardou relação entre expressão e intensidade foi a EGFP-DYNLL2 baixo que paralelamente é a intensidade de fluorescência menor (Figura 10a). Adicionalmente no Western blot se normalizou a expressão das linhagens EGFP-DYNLL2 média e alta para a linhagem baixa com o objetivo de olhar a correlação, mas também não observamos nenhuma correlação (Figura 10c).

Descartada a hipótese de correlação entre as diferentes intensidades de fluorescência vs a expressão de DYNLL2, optamos por utilizar somente a linhagem EGFP-DYNLL2 média para continuar com os experimentos, já que independente da correlação, está apresenta-se superexpressando DYNLL2 tanto ao nível de mRNA quando proteínas, sendo então nomeada como EGFP-DYNLL2 nos experimentos que se seguem.

Figura 10. Células RPE-hTERT superexpressas submetidas ao *sorting*, divididas em intensidade baixa, média e alta de fluorescência. a) Quantificação da expressão relativa do *mRNA* de DYNLL2 mediante qPCR-RT, b) *Western Blotting* do lizado total das amostras de células equivalentes as comparadas no qPCR-RT, marcado com anticorpo α-Vinculina, utilizado como controle endógeno (acima), α-EGFP (abaixo), c) Expressão relativa da proteína EGFP-DYNLL2 por densitometria das bandas obtidas por WB. Três experimentos independentes

4.4. Localização subcelular de DYNLL2 nas células RPE-hTERT

As células EGFP controle apresentaram fluorescência verde, do EGFP, distribuída de forma difusa ao longo de toda a célula (Figura 11a, 11d) sem nenhuma sub-distribuição ou aglomeração especial que chamesse nossa atenção, especialmente próximo ao núcleo

(Figura 11b, 11e), ou regiões próximas ao cílio (Figura 11c, 11f), nossas regiões de interesse.

Já as células superexpressando EGFP-DYNLL2 apresentaram aglomerações verdes ao longo do citoplasma (Figura 11g, 11j) e próximo ao núcleo (Figura 11h, 11k), e após a privação de soro, quando as células montam o axonema, chama nossa atenção as aglomerações na base do cílio primário (Figura 11i, 11l). É importante reforçar que a privação do soro potencializa a visualização dos cílios primários, já que as células encontram-se sincronizadas em G0, possibilitando a maior concentração de cílios.

Figura 11 Localização subcelular de DYNLL2 nas células. Células controle com soro a) EGFP, b) EGFP+DAPI, c) EGFP+DAPI+ARL13b. Células controle sem soro por 48 h d) EGFP e) EGFP+DAPI f) EGFP+DAPI+ARL13b. Células superexpressas com soro g) EGFP, h) EGFP+DAPI i) EGFP+DAPI+ARL13b. Células superexpressas sem soro por 48 h j) EGFP, k) EGFP+DAPI l) EGFP+DAPI+ARL13b

4.5. Influência da superexpressão da DYNLL2 nos processos de montagem e desmontagem dos cílios primários em células RPE-hTERT.

Durante a fase de montagem dos cílios primários, estimulada por privação de soro fetal bovino na cultura, se evidenciou um ligeiro aumento na porcentagem de células contendo cílios, entre as células superexpressoras em relação às controle, nos tempos de 24 e 48 horas de privação de soro (Figura 12a e 12b), no entanto as diferenças não são estatisticamente significativas, pois os desvios padrões da média foram grandes entre as células controles.

Para verificar o papel de DYNLL2 no processo de desmontagem, primeiro as células foram submetidas privação de soro por 72h para estimular a montagem e estabilização dos cílios (Figura 12c). Nesse ponto, não observamos diferenças estatísticas entre as células controle e superexpressas. Vale ressaltar que a porcentagem de células ciliadas alcançou seu limite máximo em ambas as células nesta condição (72h).

Uma vez acionada a desmontagem, com a adição de soro que induz o ciclo celular, após um período de privação de 72h, não conseguimos observar diferenças nas porcentagens de células ciliadas controle e superexpressoras nas primeiras horas do processo (Figura 12d, e 12e). Chama nossa atenção como a porcentagem de células ciliadas em ambas as condições permanece ao redor de 80%, para as duas linhagens, antes da adição de soro (Figura 12c), e após o estímulo por 45 minutos (Figura 12d) e 2 horas (Figura 12e). Depois de 8 horas (Figura 12f) podemos observar a ligeira redução para próximo de 70% de células ciliadas, para as duas linhagens (DYNLL2 e EGFP), sugerindo que o experimento precisaria continuar por mais tempo, para que de fato fosse observado a desmontagem expressiva dos cílios primários, no entanto não foi possível realizar esse experimento reformulando o protocolo.

Figura 12. Influência da superexpressão de DYNLL2 sobre a proporção de células RPE-hTERT ciliadas nas culturas, em fases de montagem e desmontagem do cílio primário. As células estavelmente superexpressando DYNLL2 ou EGFP controle foram utilizadas nos ensaios. A contagem das células ciliadas foi realizada durante a fase de montagem dos cílios primários induzida por privação de soro, por a) 24 h, b) 48 h e c) 72 h / 0h; e durante a fase de desmontagem, a qual foi estimulada por exposição ao soro, por períodos de d) 45 minutos, e) 2 h, f) 8 h, das células previamente privadas de soro por 72 horas. Número de células contadas: 200 células/condição experimental, três experimentos independentes. Os gráficos representam a média da porcentagem de células ciliadas em cada condição experimental de três experimentos independentes e o desvio padrão.

4.6. Influência da superexpressão da DYNLL2 no comprimento do cílio primário nos processos de montagem e desmontagem em células RPE-hTERT.

Observamos que em células cultivadas na presença de soro, assim como nas condições subsequentes de privação de soro, o comprimento dos cílios é menor nas células EGFP-DYNLL2 quando comparadas às células controle EGFP (Figura 13a), adicionalmente em células EGFP-DYNLL2 privadas de soro por 48 e 72 horas existem diferenças estatísticas significativas no momento que as células estão em quiescência

Parecendo que existe uma perturbação ligada à superexpressão de DYNLL2 impedindo que o cílio atinja seu tamanho máximo.

Continuando com o objetivo, agora vamos a avaliarmos influência da superexpressão de DYNLL2 no comprimento do cílio durante a desmontagem (Figura 13b).

Como podemos visualizar a superexpressão atenua a capacidade de crescimento do cílio em células quiescentes (tempo 0), após o re-estímulo por soro também observamos diferenças estatísticas significativas as 2 e 8 horas do estímulo, além disso observamos uma redução gradativa dos comprimentos ciliares até as 2 horas, mas nas 8 horas não observamos uma redução maior como esperado.

De qualquer maneira o resultado sugere que a superexpressão de DYNLL2 tem uma influencia negativa no comprimento do cílio.

Figura 13. Comprimento do cílio primário em células submetidas a superexpressão de DYNLL2 a) durante o processo de montagem em células submetidas a privação de soro por 24h, 48h e 72h b) durante o processo de desmontagem após re-estimulação com soro ao tempo 0h, 0,75h, 2h e 8h. Número de cílios contados: 100 cílios/condição experimental, três experimentos independentes.

4.7. Ensaios funcionais das células superexpressas

4.7.1. Ensaio de Proliferação celular

O primeiro ensaio funcional feito foi de proliferação celular, as primeiras 48 horas não existem diferenças entre as duas linhagens, no entanto em 72 horas visualizamos como a proliferação das células superexpressas começa a diferir, sendo menor nas EGFP-DYNLL2 quando comparadas ao controle EGFP, a redução é observada nos tempos seguintes até as 168 horas, existindo diferenças estatísticas desde as 96 horas até o final do ensaio (Figura 14a).

A redução na proliferação pode estar relacionada com alterações no ciclo celular ou por um desbalanço do processo de morte/sobrevivência, sendo estes investigadas a seguir.

4.7.2. Ensaio de Morte celular

O segundo ensaio funcional realizado foi o relacionado aos processos de morte celular, investigamos por citometria de fluxo a presença de células marcadas para iodeto de propídio, sendo estes marcadores de morte celular, não observamos diferenças significativas entre a porcentagem de células mortas entre EGFP-DYNLL2 e EGFP, embora a células EGFP-DYNLL2 tenham uma tendência a serem mais resistentes a morte (Figura 14b).

4.7.3. Ensaio de Ciclo celular

Já que o processo de morte celular não pareceu contribuir expressivamente para explicar as diferenças encontradas na proliferação, seguimos com a investigação do ciclo celular. Como controle das culturas celulares mantivemos as mesmas em meio com soro, e quantificamos as diferentes fases do ciclo celular por citômetro de fluxo. Em condições normais de cultivo as células EGFP-DYNLL2 desenvolvem seu ciclo celular de forma semelhante as células controle, EGFP (Figura 14c).

Após a privação de soro por 48 horas, para a sincronização do ciclo celular, e seguido pela indução do ciclo celular com soro em que foram checados os tempos de 0h (equivalente a condição sem soro 48h), 4, 8 e 12h na presença de soro observamos um acentuado atraso no ciclo celular das células EGFP-DYNLL2 quando comparadas as células controle EGFP, representado por uma redução na porcentagem de células na fase S e aumento da população em fase G0/G1 (Figura 14d-g).

Figura 14. Ensaios funcionais das células que foram submetidas a superexpressão de DYNLL2 a) Ensaio de proliferação celular b) Ensaio de morte celular, ensaio do ciclo celular c) Sem privação de soro, adicionalmente, as células foram sincronizadas mediante a privação de soro por 48h e o ciclo induzido com adição de soro e avaliadas nos tempos d) 0h, e) 4h, f) 8h e g) 12h do re-estímulo de soro. Três experimentos independentes

4.8. Transdução de células silenciadas

Finalizada a superexpressão seguimos com o silenciamento de DYNLL2 e DYNLL1, o primeiro passo foi transduzir as células RPE-hTERT com o vetor lentiviral FUG.12-shLacZ nas células controle e os vetores FUG.12-shDYNLL1 e FUG.12-shDYNLL2 para as células alvo é importante destacar que o construto também tem como marcador fluorescente EGFP, no entanto, este é apenas uma marca de seleção, e não se encontra fusionado com o construto de shRNA.

Uma vez que os lentivirus foram montados carregando os construtos necessários, as células RPE-hTERT foram transduzidas, tendo como resultado as células com um repórter fluorescente EGFP (Figura 15a, 15b e 15c).

Para mostrar que o construto de shRNA foi inserido e se apresentava funcional, utilizamos o qRT-PCR para verificar a expressão relativa dos genes alvos, resultando numa diminuição da expressão relativa do gene DYNLL1 em células EGFP-shDYNLL1 (Figura 15d) e uma diminuição da expressão de DYNLL2 nas células EGFP-shDYNLL2 (Figura 15e).

Figura 15. Células RPE-hTERT transduzidas com o vetor lentiviral FUG-12. Células silenciadas e privadas de soro por 48h a) shLacZ, b) shDYNLL1, c) shDYNLL2, d) Quantificação da expressão relativa do mRNA de DYNLL1 em células shDYNLL1 e) Quantificação da expressão relativa do mRNA de DYNLL2 em células shDYNLL2. Três experimentos independentes.

4.9. Obtenção de populações homogêneas de células silenciadas para DYNLL2

Uma vez confirmada a transdução seguimos os mesmos passos realizados nas células EGFP-DYNLL2, porém com a obtenção de 2 subpopulações com diferentes intensidades de fluorescência do repórter EGFP, nas células controle EGFP-shLacZ, EGFP-shDYNLL1 e EGFP-shDYNLL2 resultando na separação em por intensidade de

fluorescência para cada linhagem, obtendo uma subpopulação de intensidade alta e outra de intensidade baixa.

4.10. Confirmação do silenciamento de DYNLL1 e DYNLL2 nas células RPE-hTERT

Após a obtenção das populações homogêneas por intensidade de fluorescência do repórter EGFP, buscamos confirmar a eficiência e correlação do shRNA inserido nas linhagens, a expressão de mRNA de DYNLL1 e DYNLL2 foi verificada por qPCR-RT, os resultados para expressão de DYNLL1 nas células EGFP-shDYNLL1 não foram satisfatórios (figura 16a). Já nas células EGFP-shDYNLL2 observamos considerável redução na expressão relativa de DYNLL2 principalmente para a população com menor intensidade de fluorescência de EGFP (figura 16b).

Mediantes esses resultados, optamos por seguir somente com a subpopulação de EGFP-shDYNLL2 baixa, sendo nomeada de EGFP-shDYNLL2 nos experimentos que se seguem. Não incluímos os ensaios com a linhagem EGFP-shDYNLL1, já que não conseguimos validar um silenciamento bem-sucedido.

Figura 16. Células RPE-hTERT silenciadas submetidas ao sorting, divididas em intensidade alta e baixa de fluorescência. a) Quantificação da expressão relativa do silenciamento do mRNA de DYNLL1 mediante qPCR-RT, b) Quantificação da expressão relativa do silenciamento do mRNA de DYNLL2 qPCR-RT.

4.11. Influência do silenciamento de DYNLL2 nos processos de montagem e desmontagem em células RPE-hTERT ciliadas.

No processo de montagem não evidenciamos alterações estatisticamente significativas no número de células ciliadas na condição shDYNLL2 em relação ao controle LacZ nas células submetidas a privação de soro por 24h (Figura 17a), 48h (Figura 17b) ou 72h (Figura 17c).

Uma vez acionada a desmontagem, pela indução do ciclo com soro, também não conseguimos verificar diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de cílios entre as células silenciadas e controles nos primeiros 45 minutos do processo (Figura 17d), 2h (figura 17e) ou 8h (Figura 17f), muito embora as células EGFP-shDYNLL2 apresentem uma tendência a ter uma maior porcentagem de células ciliadas em 2 e 8h quando comparadas as células controles EGFP-shLacZ.

Curiosamente, o fato mais relevante neste experimento é que a porcentagem de células ciliadas na condição shDYNLL2 não se altera ao longo dos tratamentos, indicando que os cílios não estão passando pelo processo correto de dinâmica, quando comparados as células controles. Já que as células silenciadas nunca diminuem a porcentagem de células ciliadas mesmo após passadas 8 horas do começo da desmontagem do cílio (Figuras 12c, 12d, 12e, 12f).

Figura 17. Influência da silenciamento de DYNLL2 sobre a proporção de células RPE-hTERT ciliadas nas culturas, em fases de montagem e desmontagem do cílio primário. As células estavelmente silenciadas para DYNLL2 ou LacZ como controle foram utilizadas nos ensaios. A contagem das células ciliadas foi realizada durante a fase de montagem dos cílios primários induzida por privação de soro, por 24 h (a), 48 h (b) e 72 h (c); e durante a fase de desmontagem, a qual foi estimulada por exposição ao soro, por períodos de 45 minutos (d), 2 h (e), 8 h (f), das células previamente privadas de soro por 72 horas. Número de células contadas: 200 células/condição experimental, três experimentos independentes. Os gráficos representam a média da porcentagem de células ciliadas em cada condição experimental de três experimentos independentes e o desvio padrão.

4.12. Influência do silenciamento de DYNLL2 no comprimento do cílio em células RPE-hTERT nos processos de montagem e desmontagem.

Embora não observemos diferenças estatisticamente significativas no comprimento dos cílios nas células cultivadas em soro (0h), de modo geral parece haver uma tendência ao ter redução do tamanho dos cílios nas células silenciadas.

Existindo diferenças estatisticamente significativas nos tempos de 24 e 72 horas após privação de soro (Figura 18a).

Finalmente para terminar de avaliar a influência do silenciamento no comprimento do cílio, queríamos saber que acontecia na desmontagem, aqui, confirmamos um efeito de redução no comprimento do cílio pelo silenciamento durante a reentrada no ciclo celular encontrando diferenças estatísticas para todos os tempos exceto o último (Figura 18b)

Figura 18. Comprimento do cílio primário em células submetidas ao silenciamento de DYNLL2 a) durante o processo de montagem em células submetidas a privação de soro por 24h, 48h e 72h b) durante o processo de desmontagem após re-estimulação com soro ao tempo 0h, 0,75h, 2h e 8h. Número de cílios contados: 100 cílios/condição experimental, três experimentos independentes.

4.13. Ensaios funcionais das células silenciadas para DYNLL2

4.13.1. Ensaio de Proliferação celular

No ensaio funcional de proliferação celular não observamos diferenças significativas no ensaio, embora as células EGFP-shDYNLL2 pareçam apresentar uma

ligeira tendência a proliferar mais que o controle só no final do ensaio às 168h (Figura 19a).

4.13.2. Ensaio de Morte celular

No ensaio de morte celular também não observamos diferenças significativas entre as condições analisadas, muito embora as células EGFP-shDYNLL2 apresentem uma maior porcentagem de células mortas quando comparadas as células controle EGFP-shLacZ (Figura 19b).

4.13.3. Ensaio de Ciclo celular

No ensaio de ciclo celular, de as células EGFP-shDYNLL2 apresentam um considerável atraso no ciclo, já nas condições basais com soro, e após sua sincronização por ausência de soro (48h) e na liberação do ciclo com a adição de soro e avaliação do ciclo celular nos tempos de 0h, 4h 8h e 12h, é notável que as células EGFP-shDYNLL2 apresentam redução na porcentagem de células da fase S com consequente incremento da fase G0/G1 (Figura 19c-g).

Figura 19. Ensaio funcionais das células que foram submetidas ao silenciamento de DYNLL2 a)

Ensaio de proliferação celular b) ensaio de morte celular, ensaio do ciclo celular c) sem privação de soro, adicionalmente, as células foram sincronizadas mediante a privação de soro por 48h e avaliadas em d) 0h, e) 4h, f) 8h, g) 12h do reestímulo com soro

5. DISCUSSÃO

5.1. Localização da proteína DYNLL2 na ciliogênese

Rapali e colaboradores propuseram as proteínas DYNLL como um eixo de interação proteica (Rapali et al., 2011), a sua localização está intimamente relacionada com os processos associados a suas funções ou a localização subcelular em um momento específico da vida da célula por exemplo na mitose, onde as DYNLL se ligam ao Astrim e SKAP para biorientar os cinetoros (Schmidt et al., 2010).

Se nos concentramos nas interações de proteínas poderíamos inferir a localização subcelular de DYNLL2, no estudo realizado por Assis e colaboradores, mediante um ensaio de ligação de proximidade encontrou evidência que os domínios C2 da proteína RPGRIP1L recrutam a Myo-Va, a interação direta deste complexo pode ser olhado na vizinhança do corpúsculo basal, além que foi a primeira evidência do papel da Myo-Va no desenvolvimento do cílio primário (Assis et al., 2017), adicionalmente outro estudo evidencio que a Myo-Va pode estar associada às vesículas preciliares, que quando alcançam a vizinhança dos apêndices distais do centríolo mãe o motor da Myo-Va caminha ao longo dos filamentos de actina centrossômica (Wu et al., 2018), paralelamente encontramos muitas evidências da interação da MyoVa e DYNLL2, as primeiras foram de Benashski e colaboradores que identificaram uma cadeia leve que era compartilhada entre a MyoVa e a dineína (Benashski et al., 1997), posteriormente se viu que a cauda era o lugar de associação da proteína de cadeia leve, DYNLL2, com a MyoVa (Hódi et al., 2006), depois se evidenciou como a Bmf é regulada pela MyoVa e que por sua vez faz parte desse complexo de interação a DYNLL2 (Izidoro-Toledo et al., 2013; Puthalakath et al., 2001; Puthalakath et al., 1999)

Finalmente Goggolidou e colaboradores em 2014, confirmaram a presença das proteínas LC8 (DYNLL1 e DYNLL2) na base do cílio e especificamente o construto myc-DYNLL2 foi localizado na base do cílio igual ao nosso construto EGFP-DYNLL2, confirmando a localização subcelular encontrada em nosso estudo (Goggolidou, et al., 2014)

Com todas as evidências apresentadas, a localização de EGFP-DYNLL2 observada neste estudo é corroborada pela literatura, e muito embora outros complexos e sublocalizações foram identificadas, nos atemos a caracterizar o seu papel na ciliogênese, e conseqüentemente a sublocalização centrossomal e ciliar.

5.2. Montagem do cílio primário

Tendo evidência da localização subcelular da DYNLL2 na região do corpúsculo basal, lugar onde os complexos de montagem e extensão dos cílios primários se concentram, podemos sugerir que a proteína DYNLL2 apresenta funções relevantes para a dinâmica de *turnover* do cílio. A presença ou ausência de cílios na célula se dá por modificações das interações das proteínas relacionadas com o IFT anterógrado, num estudo de Goggolidou e colaboradores, em 2014, conseguiram demonstrar o efeito do silenciamento da proteína homóloga DYNLL1 tendo uma diminuição na porcentagem de células ciliadas, diferente ao que observamos em nossos resultados onde o silenciamento da DYNLL2 de forma geral, não afeta a porcentagem das células ciliadas, mas existe redução da população de cílios maiores e um incremento nos de menor comprimento. Outras evidências demonstram que as proteínas que fazem parte do complexo IFT anterógrado regulam a porcentagem de células ciliadas e alterações na expressão destas diminuem a porcentagem dos cílios, assim como o que acontece com a proteína IFT20 onde seu silenciamento diminui significativamente a porcentagem de células ciliadas. (Yoshimura et al., 2007) também demonstram evidências em estudos realizados com a proteína Rab8 onde o seu silenciamento regula negativamente a porcentagem de células ciliadas (Westlake et al., 2011; Yoshimura et al., 2007). Em outro estudo, realizado com a proteína EHD1, *upstream* da Rab8, e responsável pela formação das vesículas nas primeiras etapas da ciliogênese, observou-se que o silenciamento também diminui a porcentagem de cílios também em células RPE (Lu et al., 2015).

Apesar de não encontrarmos diferenças significativas na porcentagem de células ciliadas nas células EGFP-DYNLL2, o comprimento dos cílios dessas células se mostraram consistentemente menores quando comparados aos das células EGFP. Dados prévios do nosso grupo, utilizando células tumorais de melanoma humano superexpressando EGFP-DYNLL2 demonstrou que a superexpressão de EGFP-DYNLL2 promove a redução no número de células ciliadas, assim como a redução no comprimento destes cílios (Silva-Júnior, 2016).

Nem sempre um maior número de células ciliadas representa cílios de maior comprimento, em nossos resultados observamos que ante uma alteração da expressão de DYNLL2 o cílio se torna menor, sugerindo que de fato a DYNLL2 tenha um papel importante na dinâmica de *turnover* dos cílios primários. DYNLL2 é também um componente estrutural das dineínas citoplasmáticas, uma outra proteína a WDR34 uma cadeia da dineína-2, a dineína que comanda o transporte retrógrado, tem um estado de

auto-inibição essencial para a regulação durante a IFT, após a sua dimerização no citoplasma, a dineína-2 adota sua conformação desligada permitindo que seja carregada pelos trens IFT anterógrados na base ciliar e transportando à ponta pela cinesina-2 sem resistência, na ponta os domínios motores tem que ser ativados para começar o processo de IFT retrógrada (Roberts, 2018). Esta interação parece refletir num acople funcional entre a dineína-2 e a cinesina-2 na montagem de partículas IFT anterógradas, a perda de WDR34 leva ao acúmulo de partículas IFT na base do cílio, isso produz defeitos no transporte de carga ciliar, por exemplo tubulina α ou β , através da zona de transição (Vuolo et al., 2018), desta forma, por analogia, poderíamos inferir que o acúmulo de partículas IFT anterógradas produz um atraso na elongação do cílio mas não é suficiente para reduzir a porcentagem de células ciliadas, assim como o observado em nosso estudo.

5.3. Desmontagem do cílio primário

Em contraste com a montagem do cílio, sabe-se muito menos da desmontagem e seus mecanismos subjacentes, por isso vamos começar nossa discussão com o que é mais bem conhecido, o comprimento ciliar.

Como já citado, os trens IFT retrógrados ou IFT-A, cumprem o papel de reciclar produtos de rotação da ponta para a base do cílio (Bernabé-Rubio & Alonso, 2017; Morthorst et al., 2018; Prevo et al., 2017), a desmontagem do cílio primário é desenvolvido pela dineína-2, nossa proteína DYNLL2 faz parte da sua estrutura e o silenciamento dela poderia afetar toda a proteína. Tsurumi e colaboradores fizeram diferentes linhagens de células com a proteína WDR34-KO, cada um deles produzindo diferentes fenótipos ciliares, mas colocando nossa atenção na linhagem WDR34 Δ 80-93 que tem o sítio de ligação para a DYNLL2 truncada conseguindo fenótipos com cílios curtos em relação ao controle, (Tsurumi et al., 2019; Vuolo et al., 2018) semelhante ao observado em nossos resultados quando de silenciemos a DYNLL2, paralelamente nas células superexpressas também existem cílios menores que o controle, inferindo como no processo da montagem, a variação da expressão da DYNLL2, e não só o silenciamento, afeta o comprimento ciliar negativamente.

É importante lembrar que a dinâmica de *turnover* dos cílios primários está relacionada com a progressão no ciclo celular, e a continuação veremos a influência do silenciamento e superexpressão da DYNLL2 neste processo.

5.4. Proliferação e ciclo celular

A superexpressão de EGFP-DYNLL2 promove uma menor proliferação celular, a explicação não está ligada à porcentagem de células mortas, porque não existem diferenças entre as duas linhagens, logo os resultados obtidos no ensaio de ciclo celular parecem contribuir com a explicação desse efeito, onde EGFP-DYNLL2 promove um atraso no ciclo celular. As células controle apresentam uma porcentagem inicialmente maior de células na fase G2/M que as superexpressas, mas aquela porcentagem se reflete numa maior proliferação no transcurso dos dias até ter uma marcada diferença ao final do sétimo dia. Temos que lembrar que a proliferação celular tem uma tendência exponencial e uma pequena diferença no início poderia produzir uma marcada diferença no final.

A proliferação não se vê afetada nas células silenciadas, nos primeiros dias parece existir um retardo na proliferação celular, embora sem haver diferenças estatísticas, paralelamente à superexpressão, os resultados do ensaio de ciclo celular ajudam a explicar o efeito, as células silenciadas promovem um atraso no ciclo apresentando inicialmente uma maior porcentagem de células em G0/G1

No trabalho de Kim e seus colaboradores foi observado como o silenciamento de DYNLL1 afeta a expressão da Nde1 e retarda a absorção do cílio (Kim et al., 2011) um efeito similar poderia acontecer com a DYNLL2, suas alterações da expressão retarda a absorção do cílio, uma variante interessante de analisar é que nas alterações de Nde1 se observaram cílios de maior tamanho, em nosso caso os cílios são menores mas persistentes, dando-nos a ideia de que a presença do cílio é suficiente para um retardo no ciclo celular.

Por outro lado, estudos nas proteínas Nde1 e TcTex1 (Kim et al., 2011; Li et al., 2011) deram as primeiras premissas de uma relação entre o cílio e o ciclo celular, a proteína Nde1 em zebrafish parece influenciar na progressão correta de G1/S, e a TcTex1, acelera a entrada para G1/S, além de influenciar na decisão de proliferar ou diferenciar células do neurocortex de camundongo. Em nosso caso, o silenciamento atrasa a absorção do cílio, produzindo uma maior porcentagem de células na fase G0/G1, que o controle. Finalmente no ensaio de desmontagem, vemos como sempre, que as células silenciadas ou superexpressas possuem uma maior porcentagem em células G0/G1, reafirmando a ideia de que a presença do cílio retarda o ciclo celular. Inferimos que aquela persistência de cílios se dá pela influência da expressão da DYNLL2.

6. CONCLUSÕES

- A partir de extensivas análises de microscopia, identificamos a localização da DYNLL2 no centrossomo e na base do cílio primário.
- O silenciamento e a superexpressão não afetam o número de células ciliadas, mas causam diminuição no comprimento dos cílios.
- A variação da expressão da DYNLL2 afeta a dinâmica dos processos de montagem e desmontagem do cílio primário, sugerindo um atraso na montagem ou favorecimento da desmontagem, resultando em cílios mais curtos.
- O silenciamento da DYNLL2 retarda o ciclo celular na fase G0/G1. Não foi possível determinar se este efeito tem relação com a dinâmica do cílio primário.
- A superexpressão de EGFP-DYNLL2 diminui a taxa de proliferação celular.

7. REFERÊNCIAS

- Adams, G. M. W., Huang, B., Piperno, G., & Luck, D. J. L. (1981). Central-pair microtubular complex of *Chlamydomonas* flagella: Polypeptide composition as revealed by analysis of mutants. *Journal of Cell Biology*, 91(1), 69–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.69>
- Assis, L. H. P., Silva-Junior, R. M. P., Dolce, L. G., Alborghetti, M. R., Honorato, R. v., Nascimento, A. F. Z., Melo-Hanchuk, T. D., Trindade, D. M., Tonoli, C. C. C., Santos, C. T., Oliveira, P. S. L., Larson, R. E., Kobarg, J., Espreadico, E. M., Giuseppe, P. O., & Murakami, M. T. (2017). The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43692>
- Benashski, S. E., Harrison, A., Patel-King, R. S., & King, S. M. (1997). Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20929–20935. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20929>
- Bernabé-Rubio, M., & Alonso, M. A. (2017). Routes and machinery of primary cilium biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(22), 4077–4095. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2570-5>
- Bloodgood, R. A. (1977). Motility occurring in association with the surface of the *Chlamydomonas* flagellum. *Journal of Cell Biology*, 75(3), 983–989. <https://doi.org/10.1083/jcb.75.3.983>
- Brooks, E. R., & Wallingford, J. B. (2014). Multiciliated Cells. *Current Biology*, 24(19), R973–R982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>
- Espindola, F. S., Suter, D. M., Partata, L. B. E., Cao, T., Wolenski, J. S., Cheney, R. E., King, S. M., & Mooseker, M. S. (2000). The light chain composition of chicken brain myosin-Va: Calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 47(4), 269–281. [https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200012\)47:4<269::AID-CM2>3.3.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200012)47:4<269::AID-CM2>3.3.CO;2-7)
- Espreadico, E. M., Coling, D. E., Tsakraklides, V., Krogh, K., Wolenski, J. S., Kalinec, G., & Kachar, B. (1998). Localization of myosin-V in the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8636–8641. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8636>
- Fry, A. M., Leaper, M. J., & Bayliss, R. (2014). The primary cilium: Guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis*, 10(1), 62–68. <https://doi.org/10.4161/org.28910>

- Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L. M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I., Noack, F., Telugu, N. S., Calegari, F., Šarić, T., Hescheler, J., Hyman, A. A., Gottardo, M., Callaini, G., Alkuraya, F. S., & Gopalakrishnan, J. (2016). CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *The EMBO Journal*, *35*(8), 803–819. <https://doi.org/10.15252/embj.201593679>
- Goggolidou, P., Hadjirin, N. F., Bak, A., Papakrivopoulou, E., Hilton, H., Norris, D. P., & Dean, C. H. (2014). Atmin mediates kidney morphogenesis by modulating Wnt signaling. *Human Molecular Genetics*, *23*(20), 5303–5316. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu246>
- Goggolidou, P., Stevens, J. L., Agueci, F., Keynton, J., Wheway, G., Grimes, D. T., Patel, S. H., Hilton, H., Morthorst, S. K., Dipaolo, A., Williams, D. J., Sanderson, J., Khoronenkova, S. v., Powles-Glover, N., Ermakov, A., Esapa, C. T., Romero, R., Dianov, G. L., Briscoe, J., ... Norris, D. P. (2014). Atmin is a transcriptional regulator of both lung morphogenesis and ciliogenesis. *Development (Cambridge)*, *141*(20), 3966–3977. <https://doi.org/10.1242/dev.107755>
- Hamze-Komaiha, O., Sarr, S., Arlot-Bonnemains, Y., Samuel, D., & Gassama-Diagne, A. (2016). SHIP2 Regulates Lumen Generation, Cell Division, and Ciliogenesis through the Control of Basolateral to Apical Lumen Localization of Aurora A and HEF 1. *Cell Reports*, *17*(10), 2738–2752. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.033>
- Hódi, Z., Németh, A. L., Radnai, L., Hetényi, C., Schlett, K., Bodor, A., Perczel, A., & Nyitray, L. (2006). Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry*, *45*(41), 12582–12595. <https://doi.org/10.1021/bi060991e>
- Hoey, D. A., Downs, M. E., & Jacobs, C. R. (2012). The mechanics of the primary cilium: An intricate structure with complex function. *Journal of Biomechanics*, *45*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.08.008>
- Hua, K., & Ferland, R. J. (2018). Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(9), 1521–1540. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2740-5>
- Ichikawa, M., Watanabe, Y., Murayama, T., & Toyoshima, Y. Y. (2011). Recombinant human cytoplasmic dynein heavy chain 1 and 2: Observation of dynein-2 motor activity in vitro. *FEBS Letters*, *585*(15), 2419–2423. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.026>
- Izidoro-Toledo, T. C., Borges, A. C., Araujo, D. D., Leitão Mazzi, D. P. S., Junior, F. O. N., Sousa, J. F., Alves, C. P., Paiva, A. P. B., Trindade, D. M., Patussi, E. v., Peixoto, P. M., Kinnally, K. W., & Espreafico, E. M. (2013). A myosin-Va tail fragment sequesters

- dynein light chains leading to apoptosis in melanoma cells. *Cell Death and Disease*, 4(3), 1–14. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.45>
- Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (1996). PIN : An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase Author (s): Samie R . Jaffrey and Solomon H . Snyder Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2891752> JSTOR is a n. *Science*, 274(5288), 774–777.
- Jiang, L., Wei, Y., Ronquillo, C. C., Marc, R. E., Yoder, B. K., Frederick, J. M., & Baehr, W. (2015). Heterotrimeric Kinesin-2 (KIF3) mediates transition zone and axoneme formation of mouse photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12765–12778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.638437>
- Ke, Y. N., & Yang, W. X. (2014). Primary cilium: An elaborate structure that blocks cell division? *Gene*, 547(2), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.050>
- Kim, S., Zaghloul, N. A., Bubenshchikova, E., Oh, E. C., Rankin, S., Katsanis, N., Obara, T., & Tsiokas, L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nature Cell Biology*, 13(4), 351–362. <https://doi.org/10.1038/ncb2183>
- Kohli, P., Höhne, M., Jüngst, C., Bertsch, S., Ebert, L. K., Schauss, A. C., Benzing, T., Rinschen, M. M., & Schermer, B. (2017). The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. *EMBO Reports*, 18(9), 1521–1535. <https://doi.org/10.15252/embr.201643846>
- Li, A., Saito, M., Chuang, J. Z., Tseng, Y. Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., & Sung, C. H. (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nature Cell Biology*, 13(4), 402–411. <https://doi.org/10.1038/ncb2218>
- Lu, Q., Insinna, C., Ott, C., Stauffer, J., Pintado, P. A., Rahajeng, J., Baxa, U., Walia, V., Cuenca, A., Hwang, Y. S., Daar, I. O., Lopes, S., Lippincott-Schwartz, J., Jackson, P. K., Caplan, S., & Westlake, C. J. (2015). Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nature Cell Biology*, 17(3), 228–240. <https://doi.org/10.1038/ncb3109>
- Marshall, W. F., & Nonaka, S. (2006). Cilia: Tuning in to the Cell's Antenna. *Current Biology*, 16(15), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.012>
- Marshall, Wallace F., & Nonaka, S. (2006). Cilia: Tuning in to the Cell's Antenna. *Current Biology*, 16(15), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.012>

- Morthorst, S. K., Christensen, S. T., & Pedersen, L. B. (2018). Regulation of ciliary membrane protein trafficking and signalling by kinesin motor proteins. *FEBS Journal*, 285(24), 4535–4564. <https://doi.org/10.1111/febs.14583>
- Nachury, M. v., Loktev, A. v., Zhang, Q., Westlake, C. J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D. C., Scheller, R. H., Bazan, J. F., Sheffield, V. C., & Jackson, P. K. (2007). A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*, 129(6), 1201–1213. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053>
- Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D. W., Sala, C., Kim, E., Craig, A. M., Weinberg, R. J., & Sheng, M. (2000). Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *Journal of Neuroscience*, 20(12), 4524–4534. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-12-04524.2000>
- Patel-King, R. S., Gilberti, R. M., Hom, E. F. Y., & King, S. M. (2013). WD60/FAP163 is a dynein intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport in cilia. *Molecular Biology of the Cell*, 24(17), 2668–2677. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-05-0266>
- Pedersen, L. B., & Rosenbaum, J. L. (2008). Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT). Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 85, Issue 08). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00802-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00802-8)
- Pfister, K. K., Fay, R. B., & Witman, G. B. (1982). Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from chlamydomonas flagella. *Cell Motility*, 2(6), 525–547. <https://doi.org/10.1002/cm.970020604>
- Prevo, B., Scholey, J. M., & Peterman, E. J. G. (2017). Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *FEBS Journal*, 284(18), 2905–2931. <https://doi.org/10.1111/febs.14068>
- Purohit, A., Tynan, S. H., Valle, R., & Doxsey, S. J. (1999). Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization. *Journal of Cell Biology*, 147(3), 481–491. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.481>
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C. S., & Strasser, A. (2001). Bmf: A proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, 293(5536), 1829–1832. <https://doi.org/10.1126/science.1062257>

- Puthalakath, Hamsa, Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell*, 3(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80456-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80456-6)
- Rapali, P., Szenes, Á., Radnai, L., Bakos, A., Pál, G., & Nyitray, L. (2011). DYNLL/LC8: A light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS Journal*, 278(17), 2980–2996. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08254.x>
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D., & Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 382–398. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3>
- Roberts, A. J. (2018). Emerging mechanisms of dynein transport in the cytoplasm versus the cilium. *Biochemical Society Transactions*, 46(4), 967–982. <https://doi.org/10.1042/BST20170568>
- Rompolas, P., Pedersen, L. B., Patel-King, R. S., & King, S. M. (2007). Chlamydomonas FAP133 is a dynein intermediate chain associated with the retrograde intraflagellar transport motor. *Journal of Cell Science*, 120(20), 3653–3665. <https://doi.org/10.1242/jcs.012773>
- Sánchez, I., & Dynlacht, B. D. (2016). Cilium assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*, 18(7), 711–717. <https://doi.org/10.1038/ncb3370>
- Satir, P., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2010). The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(4), 499–503. <https://doi.org/10.1242/jcs.050377>
- Schmidt, J. C., Kiyomitsu, T., Hori, T., Backer, C. B., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores. *Journal of Cell Biology*, 191(2), 269–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006129>
- Schnackenberg, B. J., Khodjakov, A., Rieder, C. L., & Palazzo, R. E. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9295–9300. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9295>
- Scholey, J. M. (2013). Kinesin-2: A family of heterotrimeric and homodimeric motors with diverse intracellular transport functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 443–469. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122335>
- Shakya, S., & Westlake, C. J. (2021). Recent advances in understanding assembly of the primary cilium membrane. *Faculty Reviews*, 10(16). <https://doi.org/10.12703/r/10-16>

- Silva-Júnior, R. M. (2016). Cadeia leve de dineína-2: localização subcelular, dinâmica e influência na ciliogênese, via de Hedgehog e crescimento tumoral (Tese de doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tsurumi, Y., Hamada, Y., Katoh, Y., & Nakayama, K. (2019). Interactions of the dynein-2 intermediate chain WDR34 with the light chains are required for ciliary retrograde protein trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 30(5), 658–670. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0678>
- Vuolo, L., Stevenson, N., Heesom, K., & Stephens, D. (2018). Dynein-2 intermediate chains play crucial but distinct roles in primary cilia formation and function. *Dynein-2 Intermediate Chains Play Crucial but Distinct Roles in Primary Cilia Formation and Function*, 251694. <https://doi.org/10.1101/251694>
- Wang, L., & Dynlacht, B. D. (2018). The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development (Cambridge)*, 145(18). <https://doi.org/10.1242/dev.151407>
- Westlake, C. J., Baye, L. M., Nachury, M. v., Wright, K. J., Ervin, K. E., Phu, L., Chalouni, C., Beck, J. S., Kirkpatrick, D. S., Slusarski, D. C., Sheffield, V. C., Scheller, R. H., & Jackson, P. K. (2011). Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPP II) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2759–2764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018823108>
- Wilson, M. J., Salata, M. W., Susalka, S. J., & Pfister, K. K. (2001). Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: Identification and characterization of a family of LC8 light chains. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 49(4), 229–240. <https://doi.org/10.1002/cm.1036>
- Wu, C. T., Chen, H. Y., & Tang, T. K. (2018). Myosin-Va is required for preciliary vesicle transportation to the mother centriole during ciliogenesis. *Nature Cell Biology*, 20(2), 175–185. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0018-7>
- Yoshimura, S. I., Egerer, J., Fuchs, E., Haas, A. K., & Barr, F. A. (2007). Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. *Journal of Cell Biology*, 178(3), 363–369. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703047>