UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAÍRA HARUME NAGAI

RIC-8B, uma GEF de sistema olfatório, é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso

Versão original da tese defendida

São Paulo
Data do depósito na SPG:
29/08/2014

MAÍRA HARUME NAGAI

RIC-8B, uma GEF de sistema olfatório, é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profª Drª. Bettina Malnic

São Paulo
2014

Humildemente, dedico a todos aqueles que,

através do seu legado inegável,

inspiram minha curiosidade pela vida

e seus mecanismos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo incentivo, pela compreensão e por permitir que a dedicação aos estudos fosse minha principal preocupação. À minha irmã, por tratar da minha saúde, por providenciar caronas nas noites chuvosas da USP e por me ensinar, na prática, sobre os dilemas da convivência; à minha mãe, por sua clareza, sua praticidade, sua habilidade emocional e seus lampejos de felicidade, que me são inspiradores; ao meu pai, por suas estranhas metáforas e parábolas, além do constante paralelo entre o micro e o macro.

À minha orientadora, profª Bettina Malnic, por ter confiado a mim a responsabilidade de um projeto de doutorado. Seu método me estimulou a arriscar, a ponderar, a investigar e a estudar constantemente, o que hoje me faz gostar mais de Ciência. Agradeço pela receptividade, por ser sempre acessível e por me incentivar a continuar na carreira acadêmica.

Aos amigos que nunca me deixam esquecer o mundo fora do laboratório. Gabriel, pelos incontáveis e indispensáveis cafés em intervalos de incubações, pelas conversas que descambam para um tema inusitado e pela paciência em ouvir relatos e crises. Laís, por sua combinação de delicadeza e pragmatismo que sempre apontam as coisas em um sentido macroscópico. Fábio Alves, que partilha da esperança de monólogos se encontrarem, um dia, no espaço.

Às amigas Adriana Domarques e Carolina Parga, pela animação, pelo medo comum em andar pelos corredores e pela naturalidade com que as coisas fluem em qualquer circunstância. À Angélica Sanchez, por inspirar confiança e tranquilidade desde sempre. À Luíza Barros, por compartilhar segredos e dicas que deixam nossa vida mais elegante.

Aos meus companheiros de laboratório, com quem sempre pude contar nos momentos de aperto. Em especial, à Dra. Lúcia Armelin-Correa, pelo entusiasmo, pelas muitas caronas cheias de confabulações e pelos ensinamentos valiosos, como o de ativamente simplificar as coisas. Ao Artur Guazzelli, por sua minúcia, seu interesse, sua pró-atividade, seu humor peculiar. Agradeço à Dra. Luciana Gutyiama, que admiro pela maneira de trabalhar e que me iniciou nos estudos da RIC-8B. À Dra. Daniela Gonzalez Kristeller, por ser um exemplo de organização e eficiência, além da gentileza de sempre levar bolos em meu aniversário. À Érica Michelle, pelos favores épicos e por sua capacidade de resolver “pepinos” de origens diversas. Aos companheiros mais recentes, João Batista e Cleiton Machado, pela convivência animada e o constante aprendizado. Ao técnico Edson Gomes, por ser sempre prestativo e piadista.

Ao Dr. Tiago Jonas, por sua vitalidade, sua paixão e sua energia, que me tocaram como o “elogio da impureza, que propicia as mudanças”. Por termos nos encontrado em um momento oportuno para quebrar paradigmas e preconceitos, por ter me feito conhecer o ponto sem volta, por ter mostrado tantas maravilhas que subverteram minhas estreitas perspectivas. Sua contribuição para esse trabalho é indistinguível do desejo em me lançar às coisas que floresceu nesse relacionamento.

Ao prof. Isaias Glezer, por ser uma referência no conhecimento de diversas técnicas, por ter sido paciente ao me ensinar clonagem e produção de lentivírus, por me estimular à boa prática de esmiuçar manuais. Aos seus alunos André Xavier, Raissa Ludwig e Umberto Crisafulli, com quem convivemos durante algum tempo. Especialmente, agradeço ao André pela ajuda e calma impagáveis enquanto eu me apavorava durante as cirurgias estereotáxicas, além da solidariedade em ter partilhado dúvidas e epifanias. E à Raissa, por nossos “rodízios” em cuidar dos camundongos.

À profª Irene Yan, por sempre estar disposta a dar sugestões e a discutir questões importantes para esse trabalho. Agradeço também à sua aluna Maraysa Melo pela gentileza em separar alíquotas de anticorpos, fornecer protocolos e ensinar técnicas para lidar com embriões.

Ao prof. José Garcia e sua aluna Alice Reis, pela colaboração no desenvolvimento desse estudo.

Ao prof. Ivan, por seu bom-humor e por ter desmistificado diversos aspectos da imunofluorescência.

Ao prof. Frederico Gueiros e seus alunos por disponibilizarem e auxiliarem no uso de seu microscópio.

Ao Héllio Nóbrega, por ter me dado as primeiras instruções na manipulação de embriões.

Ao prof. José Xavier, por ter nos recebido em seu laboratório e ter nos ensinado a dissecar embriões jovens. Ao motorista Reginaldo, pelas histórias durante todo o trajeto, além de ter me mostrado o belo romance "Maíra".

À Dra. Gabriela Filoso Barnabé, pela companhia sempre agradável durante os experimentos em datas comemorativas, os docinhos depois do almoço, e por ter me ajudado até mais que eu a ela.

Aos funcionários do Biotério, pela ajuda e pela orientação no manejo dos camundongos.

Aos colegas dos laboratórios do bloco 10 e blocos adjacentes, pelo constante empréstimo de reagentes, equipamentos, pela troca de protocolos, pela compreensão com os horários atípicos. Em especial, agradeço à Darlene Pena, Jussara Michaloski, Mateus Mori, Letícia Anderson e Dinar Yunusov. E também agradeço imensamente à querida Drª Maria Fernanda Forni por ter compartilhado seu vasto conhecimento em cultura celular e por ter respondido pacientemente mil vezes às minhas (mesmas) perguntas. Ao Dr. Renato Astorino Filho, por ter me ajudado em diversos momentos desesperadores. Ao Bruno Queliconi, por seu espírito científico, sua competência e sua obstinação.

E, muito especialmente, agradeço ao Lucas Ferreira, pela doçura que adiciona aos detalhes mais corriqueiros. Pelo seu senso de humor incontrolável, sua delicada atenção às sutilezas, sua encantadora capacidade de tornar tudo mais leve. Por sua companhia ser como um concerto no telhado, uma quimera de lula e homem, ou uma inesperada piscadela. Por renovar diariamente meu ânimo com seu afeto, sua paciência, seus cafunés e suas pequenas gentilezas. Certamente há muito dele e suas habilidades nessa tese.

Finalmente, agradeço à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

“O homem é um ser racional e, como tal, recebe da ciência o alimento e a nutrição apropriados – mas os limites do entendimento humano são tão estritos que, nesse particular, não se pode ter grande esperança de satisfação, por mais amplas e seguras que sejam as suas aquisições. O homem não é um ser menos sociável do que racional – mas tampouco pode ele ter constante prazer com as companhias, nem conservar o mesmo gosto para elas, por mais agradáveis e interessantes que sejam. O homem também é um ser ativo, e em virtude dessa disposição, assim como das várias necessidades da vida humana, deve dedicar-se aos negócios e às ocupações – mas a mente exige algum relaxamento, e não pode manter a sua tendência ao cuidado e ao trabalho. Parece, assim, que a natureza recomendou um tipo de vida misto como o mais adequado à raça humana, e secretamente advertiu os homens que não consentissem que nenhum desses pendores os absorvesse demasiadamente, de modo a incapacita-los para outras ocupações e entretenimentos. Acolhei vossa paixão pela ciência, diz ela, mas que vossa ciência seja humana, e tal que possa ter uma relação direta com a ação e a sociedade. Proíbo pensamentos abstrusos e inquirições profundas, e por eles vos punirei severamente com a pesarosa melancolia que provocam, com a incerteza sem fim em que vos envolvem, e com a fria recepção que vossas pretensas descobertas encontrarão quando comunicadas. Sede filósofo, mas, em meio a toda vossa filosofia, sede ainda homem.”
(Hume, *Investigação sobre o entendimento humano*)

One thought fills immensity.
(William Blake, *The Marriage of Heaven and Hell*)

RESUMO

Nagai, M. H. **RIC-8B, uma GEF de sistema olfatório, é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso.** 2014. 102p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIC-8B é um fator trocador de nucleotídeo de guanina (GEF) predominantemente expresso em neurônios olfatórios maduros de camundongos adultos. Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que RIC-8B interage com Gαolf e Gγ13, duas subunidades de proteína G que estão enriquecidas nos cílios dos neurônios olfatórios, onde participam da transdução do sinal de odorantes. *In vitro*, RIC-8B é capaz de amplificar a sinalização de receptores olfatórios através de Gαolf, no entanto, seu papel fisiológico ainda é desconhecido. Para determinar a função desempenhada por essa proteína *in vivo*, nós utilizamos a tecnologia de *Gene Trap* com o objetivo de produzir um camundongo *knockout* para *Ric-8B*. Apesar de a expressão de *Ric-8B* ser restrita a poucos tecidos no camundongo adulto, descobrimos que homozigotos para a mutação em *Ric-8B* são inviáveis e morrem por volta do dia embrionário E10,5. Além disso, são menores e apresentam evidente falha no fechamento do tubo neural na região cranial (exencefalia). Utilizamos o gene repórter *β-galactosidase* expresso pelo alelo mutado para determinar o padrão de expressão de *Ric-8B* em embriões durante o desenvolvimento. Observamos que, no estágio E8,5, *Ric-8B* é expresso nas pregas neurais da região cefálica e na notocorda. De E9,5 a E12,5, a expressão de *Ric-8B* é detectada predominante no assoalho da placa. Esse padrão de expressão se assemelha ao de outro gene importante para a embriogênese, *Sonic hedgehog (Shh).* SHH é um morfógeno diretamente responsável pela padronização dorsoventral do sistema nervoso central e sua sinalização depende de cílio primário. Cílio primário é uma organela baseada em microtúbulos que se projeta da superfície da maioria das células de mamíferos e funciona como um centro de sinalização intracelular. Nossos dados mostram que fibroblastos embrionários *Ric-8B*$^{-/-}$ formam cílios primários, assim como alguns tecidos do embrião. Além disso, não encontramos alterações na sinalização de *Shh* em embriões homozigotos mutantes. No entanto, observamos que esses embriões apresentam apoptose aumentada em células migratórias da crista neural cranial. *Shh* é importante para a sobrevivência de células da crista neural migratória, sugerindo um possível papel para *Ric-8B* a *downstream* da sinalização de SHH.

Palavras-chave: Ric-8B, GEF, *knockout*, embriogênese, exencefalia, assoalho da placa.

ABSTRACT

Nagai, M. H. **RIC-8B, an olfactory GEF, is essential for the development of the nervous system.** 2014. 102p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Ric-8B is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) which is predominantly expressed in mature olfactory sensory neurons in adult mice. We have previously shown that RIC-8B interacts with both $G\alpha_{olf}$ and $G\gamma_{13}$, two G protein subunits, which are enriched in olfactory cilia and are required for odorant signal transduction. *In vitro*, RIC-8B is able to amplify odorant receptor signaling through $G\alpha_{olf}$, however, its physiological role remains unknown. To determine the role played by RIC-8B *in vivo* we used the Gene trap technology to generate a *Ric-8B* knockout mouse. We found that, despite the limited distribution of *Ric-8B* gene expression in adult mice, *Ric-8B* homozygous mutants are not viable and die around the E10,5 stage. Mutant embryos are also smaller and fail to close the neural tube at the cranial region (exencephaly). We used the activity of the *β-galactosidase* reporter gene to determine the pattern of expression of the *Ric-8B* gene in heterozygous embryos. At E8,5 the *Ric-8B* gene is expressed in the notochord and neural folds of the cephalic regions. From E9,5 to E12,5 *Ric-8B* is predominantly expressed in the floor plate, in a pattern that strongly resembles the one shown by *Sonic hedgehog* (*Shh*). SHH is a morphogen directly responsible for the dorsoventral patterning of the central nervous system and its signaling depends on primary cilia. Primary cilia are microtubule-based organelles that protrude from the surface of mammalian cells and act as a signaling center. We show that *Ric-8B*$^{-/-}$ embryonic fibroblasts and some embryonic tissues grow primary cilia normally. In addition, we did not find alterations in the SHH signaling of homozygous mutants. Instead, we found an increased apopotosis in migratory cells of the cranial neural crest in these embryos. *Shh* is an important factor to survival of neural crest cells, suggesting a role for RIC-8B downstream of the SHH signaling.

Keywords: Ric-8B, GEF, knockout, embryogenesis, exencephaly, floor plate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIII – adenilil ciclase tipo 3

ATP – adenosina trifosfato

BMP (*bone morphogenetic protein*) – proteína morfogenética óssea

BrdU – bromodeoxiuridina

BSA – albumina bovina sérica

cAMP – monofosfato cíclico de adenosina

CNCCs (*cranial neural crest cells*) – células da crista neural cranial

cNGC (*cyclic nucleotide gated channel*) – canal ativado por nucleotídeos cíclicos

Ct (*threshold cycle*) – ciclo limiar

DAPI- diamino fenilindol

DLHP (*dorsolateral hinge point*) – ponto de dobradiça dorsolateral

dNTP – desoxirribonucleosídeos trifosfato

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle Medium*

DV - dorsoventral

E – dia embrionário

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GDP – guanosina difosfato

GAPs (*GTPase activating protein*) – proteína ativadora de GTPase

GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) – fator trocador de nucleotídeos de guanina

G_{olf} – proteína G olfatória

GPCR - receptores acoplados a proteína G

GTP – guanosina trifosfato

Gα – subunidade alfa de proteína G

Gβ - subunidade beta de proteína G

Gγ - subunidade gama de proteína G

IFT (*intraflagelar transport*) – transporte intraflagelar

KO - *knockout*

MEF (*mouse embryonic fibroblast*) – fibroblasto embrionário de camundongo

MHP, *medial hinge point*

MMRRC – *Mutant Mice Regional Resource Center*

MOB (*main olfactory bulb*) – bulbo olfatório principal

MOE (*main olfactory epithelium*) – epitélio olfatório principal

NTDs (*neural tube defects*) – defeitos de tubo neural

OE (*olfactory epithelium*) – epitélio olfatório

OR (*olfactory receptor*) – receptor olfatório

ORF (*open reading frame*)

OSN (*olfactory sensory neuron*) – neurônio olfatório

pb – pares de bases

PBS – tampão fosfato-salino

PBST – tampão fosfato-salino com Triton-X

PCR – reação em cadeia da polimerase

PCP (*planar cell polarity*) – polaridade planar celular

PFA – paraformaldeído

RGS - regulador de sinalização de proteína G

SA (*splicing acceptor*) – sítio aceptor de *splicing*

SEM *scanning electron microscopy*

TBST- tampão Tris-salino com Tween 20

TN – tubo neural

WT (*wild type*) - selvagem

β-geo – β- galactosidase em fusão com proteína de resistência à neomicina

X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 O sistema olfatório 15
1.2 A transdução de sinal em neurônios olfatórios 17
1.3 Proteínas RIC-8 e a regulação da atividade de proteínas G. 19
1.4 Ric-8B e a função ciliar 23
2 OBJETIVOS 27
2.1 Objetivo geral: 27
2.2 Objetivos específicos: 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 Camundongos da linhagem RRH188. 28
3.2 Manutenção da colônia de camundongos RRH188 29
3.3 Genotipagem da linhagem RRH188 30
3.4 Cruzamentos para coleta de embriões 31
3.5 Coloração com X-gal. 32
3.6 Extração de RNA e síntese de cDNA 32
3.7 RT-PCR 34
3.8 PCR em tempo real 35
3.9 Fixação de embriões para microscopia eletrônica de varredura 36
3.10 Cultura de fibroblastos embrionários murinos (MEF) 36
3.11 Hibridização *in situ* 37
3.12 Imunofluorescência 39
3.13 Western blot 41
4 RESULTADOS 44
4.1 RIC-8B é essencial para a embriogênese. 44
4.2 O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ não é nulo. 45
4.3 O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ apresenta falha no fechamento do tubo neural cranial. 48
4.4 *Ric-8B* é expressa no sistema nervoso dos embriões 53
4.5 *Ric-8B* é expresso na notocorda e no assoalho da placa. 55
4.6 MEFs de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ têm cílio primário. 57
4.7 A expressão de *Sonic Hedgehog* não está alterada no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$. 60
4.8 Busca da proteína G que interage com RIC-8B no desenvolvimento embrionário 65
4.9 Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentam apoptose aumentada. 67
4.10 A localização subcelular de Ric-8B 72
5 DISCUSSÃO 74

5.1 Proteínas RIC-8 e a letalidade no período embrionário 74
5.2 RIC-8B e proteínas G durante o desenvolvimento. 76
5.3 O padrão de expressão de *Ric-8B* é semelhante ao de *Sonic Hedgehog* no tubo neural 78
5.4 A sinalização de Shh está intacta nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ 79
5.5 *Ric-8B* e o fenótipo de exencefalia 80
5.6 RIC-8B e cílios 83
6 CONCLUSÕES 88
7 REFERÊNCIAS 90
8 ANEXOS 103
8.1 Anexo A – Súmula Curricular 103
8.2 Anexo B – Artigo em preparação, e submetido para a disciplina QBQ5749-9 (Redação Científica), realizada em maio de 2014. 105

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema da localização e composição do epitélio ofatório de camundongo. 15
Figura 2. Mecanismo hipotético de ação da proteína Ric-8B na via de transdução de sinal de odorantes.....19
Figura 3. Estrutura do cílio primário. 24
Figura 4. Micrografia eletrônica de neurônios olfatórios humanos.....25
Figura 5. Produção de camundongos *knockout* para Ric-8B usando gene trap.....29
Tabela 1. Análise de ninhadas de embriões pertencentes aos estágios embrionários de E7,5 a E12,5, com o número total de embriões observados para cada estágio e para cada genótipo.....44
Figura 6. PCR quantitativo da expressão de *Ric-8B* no período de E7,5 a E12,5. 45
Figura 7. RT-PCR para diferentes trechos de *Ric-8B* realizado com cDNAs de embrião E10.5 selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-). 46
Figura 8. PCR quantitativo da expressão de *Ric-8B* em embriões de uma ninhada no estágio E10,5.....47
Figura 9. Western Blot da expressão de RIC-8B em extratos de embrião E9.5 selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-), e OE adulto (OE). 48
Figura 10. Sequência de eventos rostrocaudais durante a neurulação do embrião de camundongo. .....
Figura 11. Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentam defeitos no fechamento do tubo neural cranial. 50
Figura 12. Imagem de SEM (*scanning electron microscopy*) da cabeça de embrião selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-) no estágio E9,5.....51
Figura 13. Embriões no estágio E9,5 pertencentes à mesma ninhada, após coloração com X-gal. 52
Figura 14. Exencefalia em embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ 52
Figura 15. *Ric-8B* é expresso no sistema nervoso de embriões no período de E7,5 a E10,5. 54
Figura 16. PCR quantitativo da expressão de *β-geo* em embriões de uma ninhada no estágio E10,5.....55
Figura 17. A localização da expressão de *Ric-8B* em cortes de embriões corados com X-gal. 56
Figura 18. *Ric-8B* é predominantemente expresso no assoalho da placa em embriões de E9,5 a E12,5.....57
Figura 19. Imunofluorescência em MEFs selvagens (+/+) e *Ric-8B*$^{-/-}$ (-/-) utilizando anticorpo para α-tubulina acetilada como marcador de cílio primário.....58

Figura 20. RT-PCR da expressão de *Ric-8B* em epitélio olfatório adulto (OE), embrião E10,5 selvagem (+/+), embrião E10,5 homozigoto mutante (-/-) e MEF selvagem (MEF).....59
Figura 22. Esquema simplificado da via de sinalização de SHH 61
Figura 23. Hibridização *in situ* em cortes de embrião E9,5 usando sondas antisenso para *Shh* e dois de seus alvos a *downstream*, *FoxA2* e *Ptch1*. 62
Figura 24. Western Blot para detectar as formas *full-lenght* (ativa) e clivada (repressora) de GLI3 em embriões selvagens (+/+), heterozigotos (+/-) e homozigotos mutantes (-/-) no estágio E9,5. 63
Figura 25. Imunofluorescência de Pax6 em cortes de embrião selvagem (+/+) e homozigoto mutante (-/-) no estágio E9,5. 64
Figura 26. O *loop* cardíaco em embriões da linhagem RRH188 não parece ser afetado pelos níveis reduzidos de RIC-8B.....65
Figura 27. Expressão de Gαolf e Gαs no tubo neural.....66
Figura 28. Modificações morfológicas da placa neural para formar o tubo neural.....68
Figura 29. Acúmulo de F-actina na região apical de células do neuroepitélio.....69
Figura 30. Dupla marcação com anticorpos para caspase-3 ativa e AP-2α em cortes da cabeça de embrião E9,5.....71
Figura 31. Apoptose e proliferação celular em fibroblastos embrionários.....72
Figura 32. A localização subcelular de RIC-8B. 73

1. INTRODUÇÃO

1.1 O sistema olfatório

O olfato, um dos sentidos mais ancestrais dos animais, é uma modalidade de quimiorrecepção que permite identificar uma imensa variedade de compostos químicos voláteis. Esses compostos, chamados de odorantes, fornecem constantemente informações sobre o ambiente, como a presença de comida, predadores ou parceiros reprodutivos. Para detectá-los e interpretá-los, os animais desenvolveram sistemas olfatórios bastante sofisticados, com uma organização funcional semelhante desde insetos até mamíferos (Su et al., 2009).

A detecção dos odorantes é iniciada com a ativação de receptores especializados expressos pelos neurônios sensoriais olfatórios (OSNs, *olfactory sensory neurons*). Esses neurônios, juntamente com alguns outros tipos celulares, compõem um neuroepitélio pseudoestratificado que recobre as turbinadas no interior da cavidade nasal e é denominado epitélio olfatório principal (MOE, *main olfactory epithelium*) (DeMaria and Ngai, 2010) (Figura 1).

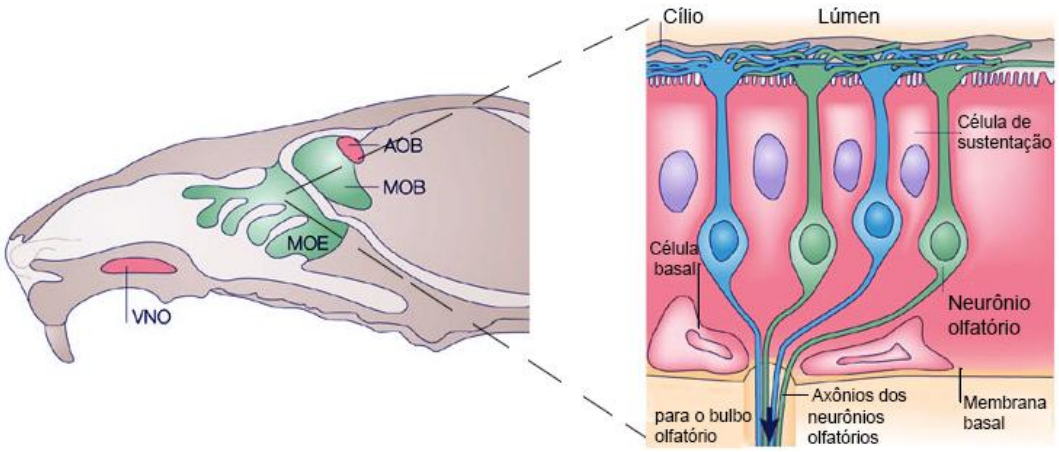

Figura 1. Esquema da localização e composição do epitélio ofatório de camundongo. À esquerda, um corte sagital da cabeça de um camundongo mostrando componentes do sistema olfatório. O sistema olfatório principal é composto pelo epitélio olfatório principal (MOE, *main olfactory epithelium*) e pelo bulbo olfatório principal (MOB, *main olfactory bulb*). O sistema olfatório acessório é formado pelo órgão vomeronasal (VNO, *vomeronasal organ*) e pelo bulbo olfatório acessório (AOB, *acessory olfactory bulb*). À direita, uma secção transversal do MOE, mostrando os diversos tipos celulares que se organizam para compor esse neuroepitélio. Os neurônios olfatórios estendem seu dendrito para a cavidade nasal e projetam seu axônio para o bulbo olfatório (modificado de Mombaerts, 2004).

Os OSNs são neurônios bipolares que estendem seu único dendrito para a superfície luminal do epitélio olfatório. Numerosos cílios se projetam da extremidade desse dendrito e penetram no muco nasal, onde ficam em contato com as moléculas de odor que são inaladas. Os odorantes interagem com os receptores olfatórios (OR, *olfactory receptor*), que se encontram enriquecidos nos cílios dos OSNs maduros (Buck and Axel, 1991; Buck, 2000; Mombaerts, 2001, 2004). ORs pertencem a uma grande família multigênica de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) da classe das rodopsinas, cuja estrutura predita exibe sete domínios hidrofóbicos transmembrana (Buck and Axel, 1991). ORs diferem em sua sequência de aminoácidos especialmente nos domínios transmemenbrana III, IV e V, sugerindo que essas regiões são responsáveis pela interação com odorantes (Mombaerts, 2004).

Camundongos possuem por volta de 1000-1200 genes codificadores de ORs com ORFs intactas (Young et al., 2002; Zhang and Firestein, 2002), porém apenas um deles é expresso por OSN maduro (Malnic et al., 1999; Serizawa et al., 2000; Touhara, 2001). Um único OSN responde a um determinado conjunto de odorantes e um único odorante pode estimular OSNs que expressam diferentes ORs (Firestein et al., 1993), portanto, a expressão monogênica dos ORs é importante para determinar a seletividade de cada OSN. Além disso, ORs exercem um papel crítico no direcionamento dos axônios para a formação dos glomérulos no bulbo olfatório (Feinstein and Mombaerts, 2004; Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998). Essa função é importante para a organização funcional do sistema olfatório, dado que OSNs que expressam o mesmo OR projetam seu axônio precisamente para um único par de glomérulos olfatórios (Mombaerts et al., 1996; Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). Dessa maneira, um estímulo olfatório é codificado no bulbo olfatório por um padrão espacialmente definido de atividade dos glomérulos. Como as posições topográficas dos glomérulos são fixas nos indivíduos da mesma espécie, o bulbo olfatório reproduz um mapa bidimensional de ativação dos receptores (Belluscio and Katz, 2001), a partir de onde a informação é transmitida para centros superiores de processamento, especificamente o córtex olfatório (Buck, 2004).

1.2 A transdução de sinal em neurônios olfatórios

Golf é uma proteína G heterotrimérica expressa em abundância no OE (Jones and Reed, 1989). Camundongos *knockout* para $G\alpha_{olf}$ (Belluscio et al., 1998) e $G\gamma_{13}$ (Li et al., 2013) são anósmicos, indicando que essas subunidades participam da transdução do sinal olfatório *in vivo*. A subunidade $G\beta_1$ é predominantemente expressa em OSN maduros (Kerr et al., 2008) e, provavelmente, compõe o heterotrímero responsável pela sinalização olfatória.

A via de sinalização olfatória já é bem descrita. No estado inativo, $G\alpha_{olf}$ se liga ao nucleotídeo GDP e forma um complexo com o dímero $G\beta\gamma$ na membrana celular. A estimulação do receptor olfatório por um odorante específico produz uma mudança conformacional que resulta na diminuição da afinidade de $G\alpha_{olf}$ por GDP. GTP está presente em vantagem estequiométrica no citoplasma e se liga a $G\alpha_{olf}$, que então se dissocia do complexo heterotrimérico e ativa a adenilil ciclase III. O aumento da concentração intracelular de cAMP provoca a abertura de canais de membrana regulados por nucleotídeos cíclicos (cNGCs), causando um rápido influxo de cálcio. Subsequentemente, a despolarização da membrana cíliar se propaga pelo corpo celular e dispara o potencial de ação no axônio, promovendo a liberação de neurotransmissores no terminal sináptico no bulbo olfatório (DeMaria and Ngai, 2010; Firestein, 2001; Ronnett and Moon, 2002).

A subunidade $G\alpha$ tem atividade GTPásica intrínseca e, dessa forma, o sinal de ativação é interrompido com a hidrólise de GTP e a reconstituição do complexo heterotrimérico inativo, formado por $G\alpha$-GDP/ $G\beta\gamma$.

Um ponto importante para a regulação da sinalização via proteína G é a conversão de $G\alpha$-GDP (estado inativo) a $G\alpha$-GTP (estado ativo). Essa conversão pode ser regulada negativamente por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs, *GTPase activating proteins*), que catalisam a hidrólise do GTP e, portanto, a formação de $G\alpha$-GDP. Por outro lado, fatores trocadores de nucleotídeos de guanina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors)* atuam

como reguladores positivos, estimulando a liberação de GDP e a formação de Gα-GTP. Para encontrar possíveis reguladores da sinalização olfatória, membros de nosso laboratório realizaram um ensaio de duplo-híbrido usando $G\alpha_{olf}$ como isca para varrer uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório (Von Dannecker et al., 2005). Esse trabalho identificou, pela primeira vez, a interação de $G\alpha_{olf}$ com a proteína RIC-8B. Através de hibridização *in situ*, a expressão de *Ric-8B* foi detectada em OSNs maduros do epitélio olfatório e em algumas regiões do cérebro (*striatum*, *nucleus accumbens*, tubérculo olfatório), mostrando uma colocalização bastante específica com $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker et al., 2005). Apesar de RIC-8B interagir com $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$ *in vitro* (Tall et al., 2003), esse dado de colocalização é um forte indicativo de que, em condições fisiológicas, RIC-8B interage preferencialmente com $G\alpha_{olf}$.

Alguns ensaios *in vitro* mostram que RIC-8B atua como uma GEF para subunidades Gα (Chan et al., 2011; Tall et al., 2003). De maneira condizente, a coexpressão de RIC-8B potencializa a produção de cAMP via $G\alpha_{olf}$ em células HEK293T (Von Dannecker et al., 2005) e promove a expressão funcional de receptores olfatórios em sistema heterólogo (Von Dannecker et al., 2006), sugerindo que essa proteína atua como uma GEF de $G\alpha_{olf}$ para amplificar a sinalização olfatória (Figura 2).

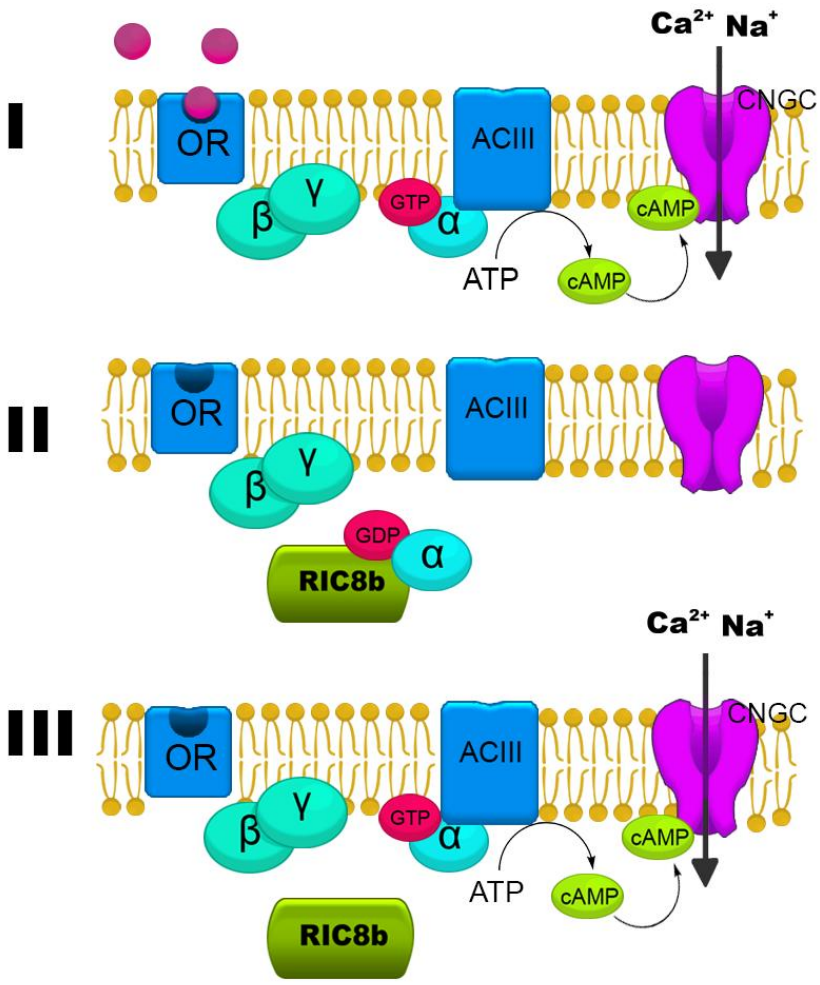

Figura 2. Mecanismo hipotético de ação da proteína Ric-8B na via de transdução de sinal de odorantes. (I) Após a ativação de um receptor (R) por um odorante, a subunidade α da proteína Golf é ativada (GTP ligada) e ativa por sua vez a adenilil ciclase III (ACIII) que produz cAMP. O cAMP ativa o canal dependente de nucleotídeos cíclicos (cNGC) o que resulta na entrada de Ca^{2+}. (II) A subunidade α hidrolisa o GTP, torna-se inativa (GDP ligada) e deveria voltar a se associar com as subunidades β/γ formando a proteína G heterotrimérica inativa, mas, segundo a nossa hipótese (II e III), ao invés disto, a Ric-8B interage com a subunidade α que se encontra na forma monomérica e age como uma GEF estimulando a troca de GDP por GTP. A subunidade α volta a ser ativa e inicia mais um ciclo de ativação da ACIII.

1.3 Proteínas RIC-8 e a regulação da atividade de proteínas G.

Atualmente, as proteínas RIC-8 são conhecidas por seu papel como reguladores da subunidade α de proteínas G heterotriméricas. A função clássica de proteínas G heterotriméricas é mediar a sinalização intracelular iniciada com a ativação de GPCRs (Gilman, 1987; Simon et al., 1991). O acoplamento de proteínas G a receptores permite que as respostas dos processos celulares sejam mais plásticas, específicas e reguladas. Em animais, cada uma das classes proteínas de Gα regula um determinado grupo de proteínas efetoras e

mensageiros secundários. Brevemente, proteínas G_s ativam adenilil ciclase para estimular a produção de cAMP; proteínas G_q ativam fosfolipase Cβ (PLCβ) para produzir diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), o qual promove liberação de Ca^{2+} intracelular; proteínas G_i inibem a adenilil ciclase, regulam canais iônicos e ativam algumas isoformas de PLCβ através do dímero Gβγ; proteínas G_{12} ativam uma pequena família de Rho GEFs, denominada RhoGEF(rg)RGS, para controlar a motilidade celular (Wilkie and Kinch, 2005).

O homólogo *ric-8* de *C. elegans* foi primeiramente identificado em um *screen* genético para encontrar mutantes com defeitos na neurotransmissão (Miller et al., 1996). Nesse estudo, os animais foram expostos ao inibidor de colinesterase *aldicarb*, que provoca um acúmulo tóxico de acetilcolina nas sinapses. Uma classe de mutantes que apresentavam um fenótipo de resistência à neurotoxicidade provocada pelo *aldicarb* foi denominada RIC (*resistant to inhibitors of cholinesterases*). Testes posteriores permitiram separar em subclasses distintas os mutantes RIC que possuíam defeitos colinérgico-específicos ou envolvendo múltiplos neurotransmissores. Entre esses últimos, também era possível observar defeitos na locomoção, flexão corporal e deposição de ovos. Uma análise das mutações envolvidas nesse fenótipo apontou genes que codificavam ou eram homólogos a genes codificadores de proteínas com funções definidas em eventos pré-sinápticos, tais como *egl-30* ($G\alpha_q$), *egl-8* (PLCβ) e *egl-10* (RGS) (Miller et al., 1996; Miller et al., 1999). Outros genes mutados nessa subclasse, como *ric-8,* ainda tinham funções desconhecidas, mas foi proposto que provavelmente também codificavam proteínas envolvidas na secreção de neurotransmissores (Miller et al., 1996). RIC-8 foi apontada como uma proteína nova, com tamanho predito de 63 kDa e de localização citoplasmática, expressa especificamente no sistema nervoso de *C. elegans* (Miller et al., 2000).

Estudos posteriores mostraram que a função de RIC-8 na neurotransmissão está relacionada à ativação da sinalização de EGL-30 ($G\alpha_q$) e GSA-1 ($G\alpha_s$) para produção de

diacilglicerol e cAMP em duas vias divergentes que contribuem para a formação de vesículas pré-sinápticas (Miller et al., 2000; Reynolds et al., 2005; Schade et al., 2005). A função de RIC-8 no sistema nervoso também foi associada à sinalização de $G\alpha_o$, que regula negativamente a via de $G\alpha_q$ (Hajdu-Cronin et al., 1999; Miller et al., 1999). Além do fenótipo na neurotransmissão, mutantes de *ric-8* apresentam letalidade embrionária parcial, que foi associada à função de RIC-8 na divisão celular assimétrica (Miller et al., 2000; Miller and Rand, 2000). Durante a embriogênese de *C. elegans,* RIC-8 interage com GOA-1($G\alpha_o$) e GPA-16, duas classes de $G\alpha_i$, para controlar movimentos do centrossomo e forças de microtúbulos que são importantes para o alinhamento do fuso mitótico. A geração de células-filhas com tamanhos diferentes é essencial para produzir diversidade de tipos celulares e depende do posicionamento assimétrico do fuso mitótico durante a divisão celular (Afshar et al., 2004; Couwenbergs et al., 2004; Hess et al., 2004; Miller et al., 2000; Miller and Rand, 2000). Devido a essa participação dupla na neurotransmissão e no desenvolvimento, RIC-8 foi também denominada *synembryn* (*syn* remetendo a sinapse e *embryn*, a embriogênese).

Diferentemente de invertebrados, mamíferos possuem dois homólogos de *ric-8*/*synembryn*, denominados *Ric-8A* e *Ric-8B* (Tall et al., 2003). As duas proteínas compartilham 40% de identidade em sequência de aminoácidos e apresentam nove domínios de *synembryn* bastante conservados (Von Dannecker et al., 2005). Apesar da semelhança, essas proteínas diferem quanto à especificidade por proteínas G: enquanto RIC-8A interage com subunidades $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{13}$ (Tall et al., 2003), RIC-8B interage com $G\alpha_s$ e $G\alpha_q$ (Klattenhoff et al., 2003; Tall et al., 2003). Experimentos *in vitro* mostram que tanto RIC-8A (Tall and Gilman, 2005; Tall et al., 2003) quanto RIC-8B (Chan et al., 2011) têm maior afinidade por Gα ligada a GDP e aceleram a taxa de ligação de GTP a Gα, evidenciando que essas proteínas podem atuar como GEFs.

Em muitos trabalhos dedicados a investigar o papel regulatório de proteínas RIC-8 também foi observado que essas proteínas influenciam positivamente a abundância de proteína G na célula e a localização membranar de Gα (Klattenhoff et al., 2003; David et al., 2005; Hampoelz et al, 2005; Wang et al., 2005; Von Dannecker, 2006). Como o aumento da sinalização de proteínas G promovido por RIC-8 poderia ser explicado, alternativamente, por uma regulação da expressão funcional de proteínas G e não pela atividade de GEF, o papel de proteínas RIC-8 na biossíntese de proteínas G também passou a ser investigado.

Um trabalho desenvolvido com células tronco murinas mostrou que o *knock out* de *Ric-8A* e *Ric-8B* reduz os níveis celulares de proteínas Gα, mas não dos transcritos correspondentes (Gabay et al., 2011). A abundância citoplasmática e membranar de $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{13}$ está reduzida em células *Ric-8A*$^{-/-}$, mas essa redução é observada apenas para $G\alpha_s$ em células *Ric-8B*$^{-/-}$. Além disso, em células *Ric-8A*$^{-/-}$, proteínas $G\alpha_q$ e $G\alpha_i$ nascentes permanecem solúveis no citoplasma e são rapidamente degradadas. Portanto, foi proposto que proteínas RIC-8 funcionam como chaperonas moleculares, promovendo a associação das subunidades Gα com a membrana celular (Gabay et al., 2011). Em concordância, um trabalho recente mostrou que RIC-8A é necessária para o correto dobramento de $G\alpha_q$ durante sua biossíntese *in vitro*; adicionalmente, RIC-8A e RIC-8B não têm influência sobre a taxa de tradução de $G\alpha_q$ e $G\alpha_{olf}$ (Chan et al., 2013).

Outra função de RIC-8B na regulação positiva dos níveis celulares de $G\alpha_s$ também foi proposta (Nagai et al., 2010). Em células NIH3T3, a atividade de GEF de RIC-8B não foi verificada, no entanto, essa proteína inibe a ubiquitinação da subunidade $G\alpha_s$, evitando que seja degrada pelo proteassoma (Nagai et al., 2010). Recentemente, o mesmo grupo mostrou que, em cardiomiócitos, RIC-8B participa do *cross-talk* entre as vias de sinalização de G_s e G_q. Nesse modelo, um excesso de $G\alpha_q$ “sequestra” RIC-8B, impedindo que ela se ligue e estabilize $G\alpha_s$ (Jenie et al., 2013).

1.4 Ric-8B e a função ciliar

Cílios são organelas formadas por microtúbulos que se projetam da superfície de quase todas as células de mamíferos (Ishikawa et al., 2012; Michaud and Yoder, 2006). Apesar de ser uma estrutura conservada entre várias espécies, seu aparecimento quase ubíquo é observado apenas em vertebrados. A maioria dos tipos celulares forma um único cílio (chamado de monocílio ou, geralmente, cílio primário), mas algumas células também podem ser multiciliadas (Fliegauf et al., 2007).

Embora possuam uma estrutura semelhante, os cílios podem exercer várias funções tecido-específicas importantes para o desenvolvimento, a morfogênese tecidual e a homeostase (El Zein et al., 2003; Fliegauf et al., 2007; Satir and Christensen, 2007). Cílios podem ser motores ou não motores. Funções não relacionadas à motilidade são associadas à percepção do meio externo, uma vez que a membrana ciliar se encontra enriquecida de receptores e moléculas sinalizadoras específicas, e a compartimentalização espacial dessa estrutura permite regular fortemente a transdução de sinal intracelular (Hsiao et al., 2012).

Diferente de outras organelas, o cílio primário de vertebrados é formado apenas em células quiescentes ou diferenciadas; da mesma maneira, a mitose é precedida da reabsorção do cílio. Esse caráter transiente ao longo do ciclo celular é explicado pelo duplo papel do centríolo na ciliogênese e na divisão celular: durante a intérfase, o centrossomo funciona como um centro organizador de microtúbulos (MTOC), que é importante para a formação do fuso mitótico na mitose; em células pós-mitóticas, o centríolo-mãe se diferencia no corpo basal que origina o cílio (Avasthi and Marshall, 2012; Fliegauf et al., 2007).

Como mostrado na Figura 3, a estrutura de um cílio primário consiste, basicamente, em um axonema que se prologa a partir do corpo basal e é envolvido pela membrana ciliar, uma porção especializada da membrana celular. Cílios primários são tipicamente não motores e seu axonema é formado por 9 pares de microtúbulos (estrutura “9 + 0”), enquanto cílios motores geralmente possuem um par adicional de microtúbulos no centro desse arranjo

(estrutura “9 + 2”) (Avasthi and Marshall, 2012; Hsiao et al., 2012). Cílios não possuem maquinaria de tradução; portanto, todas as proteínas necessárias para sua produção, manutenção e funcionamento são sintetizadas no corpo da célula e transportadas para o compartimento ciliar (Green and Mykytyn, 2010). O transporte bidirecional que carrega proteínas para dentro e para fora dos cílios depende de microtúbulos e motores proteicos, e é conhecido como transporte intraflagelar (IFT) (Pedersen and Rosenbaum, 2008; Silverman and Leroux, 2009).

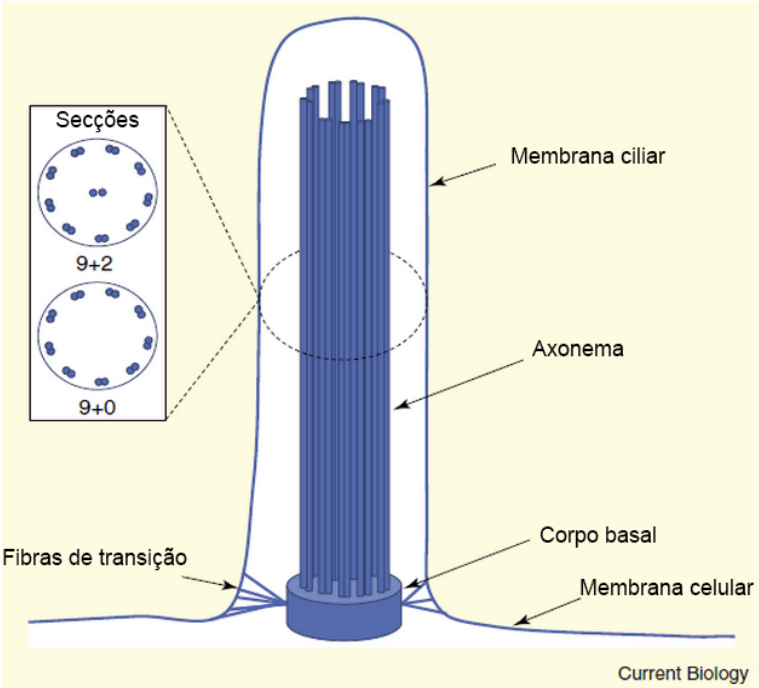

Figura 3. Estrutura do cílio primário. O axonema ciliar é composto por nove pares de microtúbulos periféricos, que se estendem a partir do corpúsculo basal. O axonema é revestido pela membrana cilliar, uma porção da membrana celular com um conteúdo particular de lipídios e proteínas. No detalhe, cortes transversais através do cílio mostram o arranjo característico de cílio motor (9+2) e cílio primário (9+0) (modificado de Berbari et al, 2009).

Mutações em genes codificadores de proteínas que participam da formação e da função ciliar provocam doenças conhecidas como ciliopatias (Adams et al., 2008; Lee and Gleeson, 2010). Como o cílio é ubíquo e importante para numerosas vias de sinalização, as ciliopatias possuem um amplo conjunto de manifestações clínicas, como rim policístico, degeneração da

retina, obesidade, defeitos de esqueleto, hipogonadismo, malformações cerebrais e, inclusive, anosmia (Hsiao et al., 2012).

Os cílios também são o centro de transdução do sinal olfatório. Os cílios olfatórios são formados a partir de múltiplos corpos basais encontrados no botão dendrítico, uma estrutura complexa nas terminações do dendrito do neurônio olfatório (Figura 4) (Menco, 1994).

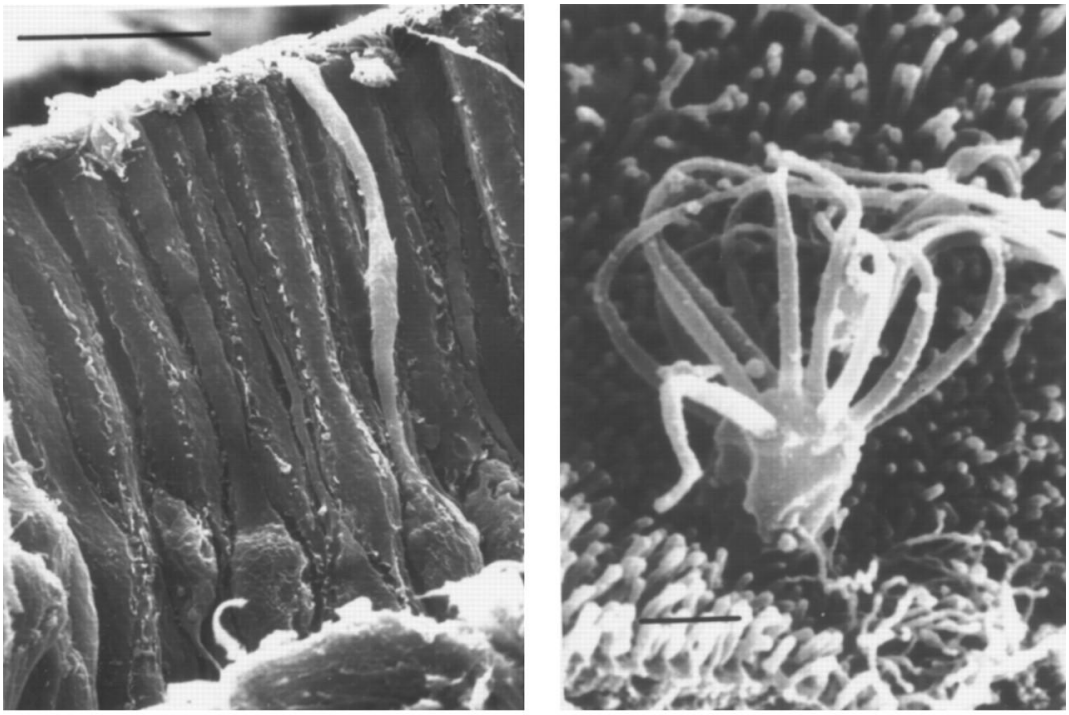

Figura 4. Micrografia eletrônica de neurônios olfatórios humanos. À esquerda, visão lateral do epitélio olfatório. Células com um dendrito longo e levemente proeminente são típicos neurônios olfatórios. Escala, 10 µm. À direita, visão da superfície do epitélio olfatório mostrando um botão dendrítico com 8 cílios. Escala, 1 µm. (Modificado de Schild and Restrepo, 1998).

Um trabalho publicado por alunos de nosso laboratório mostrou que, em ensaios *in vitro*, RIC-8B é capaz de interagir com $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$, duas subunidades de G_{olf} localizadas nos cílios olfatórios (Kerr et al., 2008). Em neurônios olfatórios, $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$ também interagem com CEP290, uma proteína da família das nefrocistinas que é encontrada nos botões dendríticos de OSNs (McEwen et al., 2007). Nefrocistinas são proteínas que atuam no carregamento de proteínas durante o transporte do corpúsculo basal para o axonema (Mollet et

al., 2005; Schermer et al., 2005; Winkelbauer et al., 2005; Wolf et al., 2005). Camundongos com mutação hipomórfica em *CEP290* são anósmicos, no entanto, possuem cílios olfatórios intactos (McEwen et al., 2007). ORs, ACIII e cNGC se encontram corretamente localizados nos cílios olfatórios desses mutantes, ao contrário de $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$, indicando que CEP290 é importante especificamente para o transporte ciliar de subunidades de proteína G em OSNs (McEwen et al., 2007). Como discutido nesse trabalho, a entrada de proteínas no compartimento ciliar é um processo fortemente regulado, que requer a atividade de proteínas que se ligam a GTP e GEFs. Uma GEF putativa, chamada $RPGR^{ORF15}$, interage com CEP290 e controla o transporte seletivo no cílio conector de fotorreceptores. Em OSNs, $RPGR^{ORF15}$ também interage com CEP290, porém os autores sugerem a possibilidade de que RIC-8B também desempenhe um papel semelhante no tráfego de proteínas ciliares (McEwen et al., 2007).

Atualmente, portanto, algumas funções relacionadas à regulação de proteínas G foram sugeridas para RIC-8B. Porém, sua função *in vivo* ainda não foi verificada. Em nosso laboratório, estabelecemos uma linhagem de camundongos mutantes para *Ric-8B* com a finalidade de estudar a função regulatória dessa proteína na via de sinalização olfatória, como uma possível GEF para $G\alpha_{olf}$. Verificamos que, apesar de seu padrão de expressão restrito e de sua colocalização específica com $G\alpha_{olf}$ no camundongo adulto, a deleção em homozigose de *Ric-8B* leva à morte do embrião ainda durante o desenvolvimento. Estes resultados mostram que RIC-8B apresenta também um papel fundamental durante a embriogênese, provavelmente diferente daquele desempenhado no animal adulto, e que ainda não é conhecido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Compreender a função da proteína RIC-8B durante o desenvolvimento.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar o período de letalidade do embrião homozigoto mutante.

- Caracterizar o fenótipo do embrião homozigoto mutante.

- Determinar o padrão de expressão do gene *Ric-8B* no embrião selvagem.

- Analisar possíveis vias/processos nas quais RIC-8B pode estar relacionada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos da linhagem RRH188.

A linhagem de camundongos mutantes para *Ric-8B* estabelecida em nosso laboratório deriva da linhagem de células-tronco RRH188, obtidas através do consórcio internacional da *BayGenomics* (Stryke et al., 2003). Os animais quiméricos foram gerados pelo serviço de microinjeção de células-tronco em blastocistos oferecido pela *Mutant Mouse Regional Resource Center* (MMRRC). Para fundação da colônia, as quimeras foram retrocruzadas com camundongos selvagens C57BL/6 com auxílio do Biotério do Conjunto das Químicas da USP.

A linhagem RRH188 foi produzida por *gene trap*, tecnologia que cria mutagênese em larga-escala no genoma através da inserção randômica de um vetor que carrega um cassete de *gene trap*. A linhagem RRH188 tem inserção do vetor pGT01 no íntron 3 do gene *Ric-8B*, conforme esquematizado na Figura 5. Esse vetor codifica para a β-geo, que consiste em um elemento de seleção (neomicina fosfotransferase II) fusionado a um gene repórter (β-galactosidase). A sequência de β-geo é flanqueada a 3' por um sítio aceptor de *splicing* (SA, *splicing acceptor*) e a 5' por um sítio de poliadenilação. O cassete de *gene trap* é transcrito quando o promotor endógeno de *Ric-8B* está ativo, produzindo um mRNA no qual os 3 éxons localizados a 5'do sítio de inserção sofrem *splicing* em fase com a sequência de β-geo (Stanford et al., 2001) (Figura 5). Como a transcrição é terminada prematuramente no sítio de poliadenilação, o transcrito processado codifica uma proteína RIC-8B truncada (e provavelmente não funcional) fusionada a β-geo. Portanto, a inserção do *gene trap* é capaz de inativar e, concomitantemente, reportar a expressão endógena de *Ric-8B*.

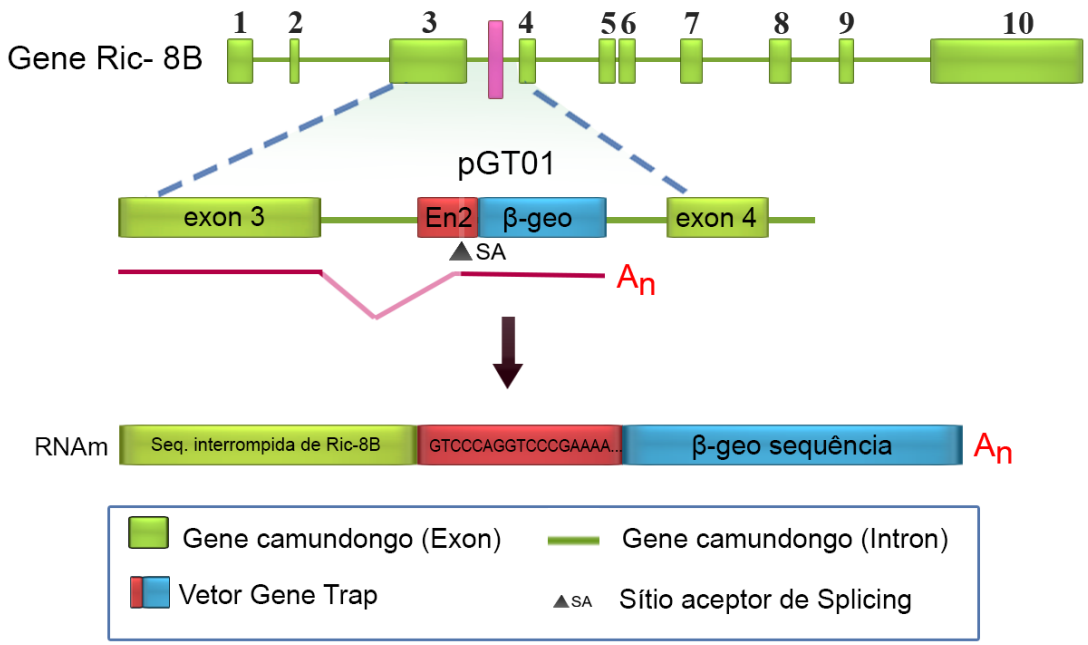

Figura 5. Produção de camundongos knockout para Ric-8B usando gene trap. Acima, estrutura gênica de *Ric-8B* de camundongo, mostrando seus 10 éxons. A inserção do vetor *gene trap* pGT01 no DNA da linhagem de células-tronco RRH188 está indicada com uma barra rosa no íntron 3 de *Ric-8B*. Abaixo, a expressão do promotor de *Ric-8B* produz um mRNA quimérico que contém os três primeiros éxons de *Ric-8B* em fase com a sequência do repórter β-geo.

3.2 Manutenção da colônia de camundongos RRH188

Os animais da linhagem RRH188 foram mantidos em gaioleiro com filtro de ar. Realizamos as trocas de gaiola e bebedouros semanalmente e, no último semestre, a alimentação dos animais foi complementada com uma ração que possui maior teor de proteínas e lipídios. Com 3-4 semanas de idade, os filhotes foram desmamados e separados de acordo com o sexo. Para identificá-los individualmente e coletar material para genotipagem, utilizamos um furador ou uma tesoura para obter um pequeno pedaço de orelha. A colônia de fundação foi mantida por pelo menos três casais (matriz) para cada geração. Selecionamos, preferencialmente, filhotes da 2ª ninhada do casal mais prolífico e com maior cuidado parental para iniciar a geração seguinte de produtores de matriz. Esses animais foram acasalados desde a 8ª semana de vida até o nascimento da 3ª ninhada, pelo menos. Para estabelecer a linhagem RRH188, inicialmente realizamos 10 gerações de retrocruzamento, com casais formados por machos heterozigotos e fêmeas selvagens da linhagem C57BL/6. Os

cruzamentos posteriores foram feitos entre animais heterozigotos da mesma ninhada, conforme recomendado pelo manual da The Jackson Laboratory para colônias de camundongos transgênicos em que o alelo mutado em homozigose causa letalidade. Os experimentos com embriões foram realizados com animais a partir da 6ª geração de retrocruzamento.

3.3 Genotipagem da linhagem RRH188

Um pequeno pedaço da orelha de cada filhote de camundongo foi coletado em um tubo de 1,5 ml. Adicionamos 300 µl de NaOH 50 mM a cada amostra, incubamos por 5 min a 95 °C e agitamos vigorosamente por 10 segundos. Incubamos a amostra por mais 5 min a 95 °C e agitamos novamente por 10 segundos. A solução foi neutralizada com 25 µl de tampão Tris 1M pH 8,0 e centrifugada por 5 minutos a 16000 x g para precipitar pedaços grandes de tecido. Parte da fração aquosa, que contém o DNA genômico, foi transferida para um tubo novo e mantida a 4° C ou a -20 °C até sua utilização.

Para extrair o DNA genômico de embriões E7,5, usamos partes do cone ectoplacentário e da ectoderme extraembrionária e, para embriões de E8,5 a E12,5, coletamos parte do saco amniótico. Os tecidos foram digeridos durante uma hora a 55 °C em 50 µl de uma solução de lise contendo: SDS 0,5%, NaCl 0,1 M, Tris 50 mM (pH 8), EDTA 2,5 mM e 100µg/ml de proteinase K. Precipitamos o DNA com 10 µg de glicogênio, 5 µl de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 500 µl de etanol, deixando durante 10 minutos em gelo seco. Centrifugamos a 14000 rpm durante 40 minutos a 4 °C, lavamos o precipitado com 200 µl de etanol 70% e centrifugamos por mais 20 minutos a 4 °C. Retiramos o etanol com uma pipeta e deixamos o precipitado secar a temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em 50 µl ou 100 µl de água, dependendo da viscosidade.

A reação de PCR da genotipagem foi realizada em uma mistura contendo tampão Rxn *Taq Platinum* 1x; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; *forward primer* 0,4 µM (RRH188F2);

reverse primer 0,4 µM (188íntronR2); *reverse primer* 0,4 µM (vectorR2); 0,5 U de Taq Platinum; 0,5 µl de DNA genômico e água q.s.p. 10 µl. As amostras foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: 5 minutos a 95 °C para a desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 68 °C e 1 minuto a 72 °C, seguidos por 10 minutos a 72 °C para a extensão final. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo, sendo esperada uma banda de 582 pb para alelo selvagem e uma banda de 320 pb para o alelo MUTANTE. Os *primers* usados na genotipagem foram:

188intronF2 5'- GAGCTCCAGCTATGCAGTGCTTACTC -3';

188intronR2 5'- GTGCTGTCACCAGAGACCTCTAGTC -3';

VectorR2 5'- AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG -3'.

3.4 Cruzamentos para coleta de embriões

Os casais foram formados por machos e fêmeas heterozigotos com até 6 meses de idade, sendo o macho sempre da mesma idade ou, preferencialmente, mais velho que a fêmea. Cada macho foi separado em uma gaiola e, após 24-72 horas, ele foi retirado e duas fêmeas foram então colocadas em seu lugar. Feromônios presentes na urina do macho podem induzir e sincronizar o estro das fêmeas, que entram no período fértil em 48 ou 72h após a exposição ("efeito Whitten"). Portanto, 2-3 dias depois de ficarem na gaiola usada pelo macho, essas fêmeas foram colocadas junto com o mesmo macho para o acasalamento. Na manhã seguinte, separamos o casal e checamos a presença do *plug* vaginal nas fêmeas. A presença do *plug* indica que houve cópula, mas não garante fecundação; por outro lado, sua ausência pode ser devida à absorção ou queda. Dessa forma, anotamos quais foram as fêmeas com e sem *plug* e consideramos esse o dia E0,5 da gestação. Como fêmeas prenhes exibem uma protuberância abdominal visível até E10, pesamos as fêmeas a cada 2-3 dias para obter embriões nos estágios anteriores. Fêmeas prenhes tiveram, geralmente, um aumento de peso progressivo

que atingiu, em média, 1,5 g até o estágio E9,5. Essa verificação permitiu reduzir o número de fêmeas com *plug* que eram sacrificadas mas não estavam prenhes. As outras fêmeas que também foram expostas ao macho, porém não foram sacrificadas para o experimento, ficaram em observação por, pelo menos, 12 dias antes de serem acasaladas novamente. No dia embrionário desejado, as fêmeas grávidas foram sacrificadas e o útero foi retirado e mantido em PBS. Usando pinças de relojoeiro, retiramos todas as camadas de tecidos maternos e extraembrionários, até deixar apenas o saco amniótico envolvendo o embrião. As pinças foram lavadas com etanol 70% antes de retirar, cuidadosamente, pedaços do saco amniótico para usar na genotipagem. Os embriões foram processados de acordo com o experimento em questão.

3.5 Coloração com X-gal.

Embriões nos estágios E7,5, E8,5, E9,5, E10,5 e E12,5 foram coletados em tampão 1 (tampão fosfato 100 mM pH 7,4; PFA 4%; $MgSO_4$ 2 mM; EGTA 5 mM) e incubados durante 30 minutos no gelo. Em seguida, foram lavados por 5 minutos no tampão A (tampão fosfato 100 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 2 mM; EGTA 5 mM) e incubados no mesmo tampão por 30 minutos à temperatura ambiente. Os embriões foram então lavados à temperatura ambiente, por duas vezes de 5 minutos cada, em tampão B (tampão fosfato 100 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 2 mM; desoxicolato de sódio 0,01%; NP-40 0,02%). Por fim, os embriões foram incubados em tampão C (tampão B mais ferricianeto de potássio 5 mM, ferrocianeto de potássio 5mM e X-gal 1 mg/ml) durante 16 h a 37 ºC, em local protegido da luz. Após a coloração, os embriões foram lavados em tampão A por 5 minutos e guardados em tampão 1 a 4 ºC.

3.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os embriões foram coletados em tubos contendo 1 ml de TRIZOL® *Reagent* (Invitrogen) e mantidos no gelo até o final da dissecação. Com auxílio de uma pipeta, os embriões foram

triturados e homogeneizados para a extração de RNA, que foi executada conforme o manual do TRIZOL®. Para os embriões E7,5 e E8,5 foram seguidas as instruções sugeridas para pequenas quantidades de material (utilização de 800 µl de TRIZOL® e adição de 10 µg de glicogênio na precipitação com isopropanol). 1-2 µl de RNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e a quantificação foi dada através da medição em NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Para preparar o cDNA de cada amostra, 600 ng ou 1 µg de RNA total foram incubados com 20 mM de Oligo (dT) (Invitrogen™) e água DEPC q.s.p. 13,5 µl durante 2 minutos a 70 °C. Após resfriar as amostras em gelo, foram adicionados ao tubo: tampão *First Strand* 1x (fornecido com a enzima transcriptase reversa), dNTPs 0,5 mM, $MgCl_2$ 3 mM, 20 U de RNaseOUT™ (Invitrogen™) e 200 U de SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). A reação transcorreu por 60 minutos a 42 °C, em seguida incubamos por 15 minutos a 70 °C para a inativação das enzimas. O volume final da reação foi diluído para 100 µl com água DEPC e armazenado a -80 °C.

Para os experimentos de PCR quantitativo que envolveram comparação com a expressão de β-galactosidase, utilizamos *primers* para uma região da β-galactosidase que não tem íntron. Portanto, tratamos as amostras de RNA com DNase I para eliminar a contaminação com DNA na seguinte reação: 1 µg de RNA total, 1 U de RQ1-RNase free DNAse (Promega), tampão RQ1 1x (Promega, fornecido com a enzima DNase) e água q.s.p. 10 µl, incubados durante 30 minutos a 37 °C. A reação foi parada com a adição de 1 µl de RQ1 DNase *stop solution* (Promega, fornecida com a enzima DNase), seguida de incubação a 65 °C por 10 minutos. A integridade do RNA foi verificada novamente em gel de agarose 1% (corado com brometo de etídeo 0,5 µg/µL).

3.7 RT-PCR

Verificamos a expressão de *Ric-8B* em embriões selvagens, heterozigotos e homozigoto mutante utilizando cDNAs preparados a partir de 1 µg de RNA total de embriões E9,5. A reação de PCR foi realizada em tampão Rxn *Taq Platinum* 1x; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; *forward primer* 0,2 µM; *reverse primer* 0,2 µM; 1,0 U de Taq Platinum; 1,25 µl de cDNA e água q.s.p. 12,5 µl, nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 28 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os pares de *primers* foram desenhados para hibridizar em exons diferentes, impedindo a amplificação a partir de DNA genômico contaminante. Para amplificação de *Ric-8B*, utilizamos: 1) Ric8B_Fexon3 *forward*: 5'-gagtatgagtcggccatagac-3' e Ric8B_Rexon5 *reverse*: 5'-cagttcatctagagttgctgc-3'; 2) Ric_RT_F *forward*: 5'-aagctggttcgtctcatgac-3' e Ric_RT_R *reverse*: 5'-gaccagctcggacacagactga-3'. Para amplificar o controle endógeno β-actina, utilizamos: ActB RTmus *forward* 5'– CATTGCTGACAGGATGCAGA–3' e ActB RTmus *reverse* 5'–TGTAAAACGCAGCTCAGTA –3'. Os produtos amplificados têm, respectivamente, 327 pb, 459 pb e 232 pb, e foram analisados após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/µL.

A expressão de *Ric-8B* em diferentes estágios do desenvolvimento foi verificada com embriões selvagens no período de E7,5 a E12,5. Aproximadamente 600 ng de RNA total foram utilizados como molde para sintetizar o cDNA correspondente a cada estágio embrionário, extraído de uma ninhada inteira nos estágios E7,5 e E8,5 (8-10 embriões), cinco embriões E9,5, um embrião E10,5 e um embrião E12,5. A reação de PCR foi realizada como descrito acima, com o par de *primers* Ric_RT_F e Ric_RT_R que, por amplificar um trecho que vai do exon 8 ao 10, permite também identificar as duas isoformas de *Ric-8B.*

3.8 PCR em tempo real

A reação foi realizada usando 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 600 nM de cada *primer* e diferentes quantidades de cDNA, consistindo em um volume final de 15 µl. Os parâmetros universais de ciclagem foram utilizados (50 °C por 2 minutos; 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min). Ao final de cada reação, foi adicionado um passo de dissociação para verificar a presença de contaminantes e dímeros de *primers*. Utilizou-se a plataforma ABI PRISM 7500 Sequence Detection System. Cada reação foi realizada em triplicata e o desvio padrão foi inferior a 0.3.

Os *primers* foram desenhados para amplicar trechos menores que 200 pb e, preferencialmente, em exons distintos (com exceção de β-galactosidase). Para determinar a eficiência dos *primers*, realizamos as reações com diferentes quantidades de DNA para obter o *slope* da curva do gráfico do log da quantidade de DNA vs Ct. Admitimos uma eficiência de amplificação de 90 a 100%. Também comparamos a eficiência de amplificação dos genes de interesse em relação ao calibrador através do gráfico de delta Ct vs log da quantidade de DNA, admitindo um valor máximo de 0,3 para a inclinação da linha de regressão. A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de acordo com Livak e Schmittgen (2001). Os genes analisados e os respectivos *primers* foram:

1) Ric-8B: Ric-8BF *forward* 5'-AGCTGGTTCGTCTCATGACAC-3' e Ric-8BR *reverse* 5'-CAGCGTTCCCATAGCCAGTG-3'.

2) Gαs: GasF *forward* 5'-GCTGCCTCGGCAACAGTAAG-3'e GasR *reverse* 5'-CGGTAGACCTGCTTGTCCTTC-3'.

3) Gαolf: GolfF *forward* 5'-TGTTTGGGCAACAGCAGCAAG-3' e GolfR *reverse* 5'-TTGTAAGCCAGGCGCTCTTTC-3'.

4) β-galactosidase: b-galF *forward* 5'-CGATCTTCCTGAGGCCGATAC-3' e b-galR *reverse* 5'-CGGATTGACCGTAATGGGATAG-3'.

5) β-actina (normalizador): ActBF *forward* 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3' e ActBR *reverse* 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATACA-3'.

3.9 Fixação de embriões para microscopia eletrônica de varredura

Os embriões foram dissecados em PBS gelado e fixados em tampão PBS 0,1 M, paraformaldeído 4%, Glutaraldeído 2,5%, ácido tânico 1% e cloreto de cálcio 5 mM. Os embriões foram incubados *a* 4° C *overnight* ou durante duas horas à temperatura ambiente, posteriormente, foram desidratados em série de etanol 20%, 50% e 70% e mantidos em etanol 70% até o momento de uso. Os embriões usados nessa análise foram fixados em nosso laboratório e enviados para a aluna Alice Helena dos Reis Ribeiro, do laboratório do professor José Garcia (ICB-UFRJ), que capturou as imagens.

3.10 Cultura de fibroblastos embrionários murinos (MEF)

Fêmeas prenhes foram dissecadas em 9,5 dpc (dias pós-coito) ou 10,5 dpc. Em seguida à retirada da tuba uterina, a dissecção dos embriões e o procedimento de isolamento de MEFs foram realizados em capela de fluxo laminar com reagentes estéreis. Os embriões foram, inicialmente, coletados em tubos contendo PBS (Vitrocell®) e mantidos à temperatura ambiente até o fim da dissecção. Em seguida, os embriões foram lavados duas vezes com PBS e submetidos a dissociação enzimática e mecânica por meio da adição de 250 µl de Tripsina-EDTA 0,25% e agitação a 37 °C e 400 rpm em termomixer, durante 15 (embriões normais) ou 10 minutos (embriões homozigotos mutantes, que são fenotipicamente distinguíveis dos demais e apresentam tamanho visivelmente reduzido). Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 2 minutos e a tripsina foi removida. Adicionamos meio de cultura completo (DMEM (Vitrocell®) contendo penicilina 0,05 mg/ml, estreptomicina 0,05 mg/ml e suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Vitrocell®) e, com uma pipeta, ressuspendemos e dissociamos gentilmente as células antes de contá-las e plaqueá-las em um

poço de placa de 24 poços (no caso de embriões normais) ou em um poço de placa de 48 poços (no caso de embriões homozigotos mutantes).

As células foram cultivadas em meio de cultura completo e mantidas em atmosfera umidificada a 37 °C e CO_2 5%. Ao atingir a confluência, as células foram lavadas uma vez com PBS (Vitrocell®) e descoladas da placa pela ação de Tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen) durante um minuto à temperatura ambiente. Acrescentamos meio completo em volume equivalente a, pelo menos, 5 vezes o de Tripsina-EDTA e desagregamos as células por pipetagem. As células foram transferidas para uma nova superfície na proporção de 1:3 a 1:5. Quando necessário para determinado experimento, a concentração das células foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer.

3.11 Hibridização *in situ*

3.11.1. Preparação das lâminas com cortes de embrião:

Embriões E9,5 ou E10,5 foram dissecados em PBS gelado livre de RNase e fixados em formaldeído 4% a 4° C *overnight*. Posteriormente, foram transferidos para uma solução de criopreservação (sacarose 15% e Tissue-Tek OCT (Sakura) 50%) e mantidos a 4 °C durante 2 horas. Os embriões foram embebidos em Tissue-Tek OCT (Sakura) e congelados em gelo seco. Com ajuda de um criostato (MICRON), o embrião emblocado em OCT foi seccionado na espessura de 14 ou 16 µm e os cortes foram coletados em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost®). Até o momento do uso, tanto o bloco quanto as lâminas contendo as secções foram mantidos a -80 °C.

3.11.2. Clonagem dos moldes para as sondas:

Regiões de 700-850 pb dos genes *Sonic Hedgehog (Shh), Patched 1 (Ptch1)* (NM_008957.1) e *FoxA2* (NM_010446.1) foram amplificadas e clonadas em vetor pCRII (TA Cloning® Kit, Invitrogen). Para a clonagem de *Ptch1* e *FoxA2*, usamos a sequência dos *primers* publicados em EMAGE gene expression database

(http://www.emouseatlas.org/emage/): Ptch1: Ptch1_F *forward* 5'-AAGCCCATCGACATTAGTCAGT-3', Ptch1_R *reverse* 5'-AGTCCATTGAGAACCCCCAAG-3'; FoxA2: FoxA2_F *forward* 5'-acatctcgctcatcaccatggc-3', FoxA2_R *reverse* 5'- gtgcatgacctgttcgtaggcc-3'. Para clonar Shh, desenhamos os *primers:* Shh_F *forward 5'*- agcaagtacggcatgctggc-3' e Shh_R *reverse* 5'-cagattgcgctgcagggatg-3'. As sondas de *Ric-8B*, $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$ foram sintetizadas a partir da sequência codificadora desses genes, conforme publicado anteriormente (Von Dannecker et al, 2005). Os plasmídeos foram linearizados com as enzimas de restrição adequadas e, em seguida, purificados com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

3.11.3. Síntese das sondas de RNA *sense* e *antisense* marcadas com digoxigenina*:*

Preparamos uma reação de transcrição reversa em solução contendo 1 µg de plasmídeo linearizado, tampão de transcrição 1x (Ambion), DIG *RNA labeling mix* 1x (Roche), 40 U de RNA polimerase T7 ou Sp6 (Ambion), 1 µl de inibidor de RNase (*RNase OUT*, Invitrogen). Essa solução foi incubada por 2 horas a 37 °C e, em seguida, filtrada em colunas de Sephadex-50 (*Quick Spin G-50*, GE Healthcare) e misturadas com 20 µl de formamida. Separamos 1-2 µl em gel de agarose 1,5% para a quantificação e armazenamos o restante a -80 °C.

3.11.4. Hibridização *in situ*:

Primeiramente, as lâminas foram secadas por 10 minutos a 50° C para ajudar na aderência dos cortes à lâmina. Os cortes foram então fixados por 10 minutos em formaldeído 4% pH 7,4 recém preparado, lavados duas vezes em PBS por 5 minutos e foram digeridos com proteinase K 10 µg/ml diluída em PBS durante 8,5 minutos. Após mais uma lavagem de 5 minutos com PBS, os cortes foram novamente fixados com formaldeído 4% pH 7,4 durante 15 minutos à temperatura ambiente e lavados com PBS por 5 minutos. As lâminas foram imersas em um béquer contendo 600 ml de água livre de RNases e 7 ml de trietanolamina e, sob agitação

leve, adicionamos 1,5 ml de anidrido acético. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 minutos por 3 vezes. A pré-hibridização foi realizada durante duas horas a 65 °C, incubando as lâminas em 500 µl de solução contendo formamida 50%, SSC 5X, Denhardt's *solution* 5x (Invitrogen) e 125 µg de RNA de levedura (*yeast tRNA*, Invitrogen). Nessa mesma solução, 200 ng de sonda foram diluídos e incubados com as lâminas durante pelo menos 16 horas a 65 °C. As lâminas foram, então, lavadas a 65 °C uma vez em SSC 5X por 10 minutos e duas vezes em SSC 0,2X por 30 minutos. Seguiu-se mais uma lavagem em SSC 0,2X, porém durante 5 min à temperatura ambiente. Os tecidos foram digeridos durante 30 minutos a 37 °C em solução de Tris pH 7,5 10 nM, NaCl 400 nM e RNase A 20 µg/ml. A detecção foi realizada com o *kit DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche), iniciando com uma lavagem em *Wash Buffer* 1x, seguida de bloqueio de uma a duas horas em ácido maleico 1x e reagente de bloqueio 1x. O anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (Roche, 1:500) foi diluído em solução de bloqueio e incubado por uma hora à temperatura ambiente. Realizamos 3 lavagens, de 20 minutos cada, em *Wash Buffer* 1x (ácido maléico 1x contendo 3% de Tween-20) e incubamos as lâminas durante 5 minutos em *Detection Buffer* 1x (Tris pH 9,5 100 mM, NaCl 100 mM). A solução de detecção foi preparada adicionando 2,4 mg de levamisole e 200 µl de NBT/BCIP a 10 ml de *detection buffer* 1x, depois a adicionamos às lâminas e incubamos *overnight* à temperatura ambiente. A reação da fosfatase alcalina foi parada com uma lavagem de 2 minutos em Tris 10 mM pH 8 e EDTA 1 mM, seguida de uma lavagem em água. Finalmente, as lâminas foram montadas com gelvatol.

3.12 Imunofluorescência

3.12.1. Para experimentos de marcação de cílio primário em MEF, foram plaqueadas 2 x 10^5 células de P1 ou 4 x 10^5 células de P0 em poço de Lab-Tek previamente tratado com Poly-L-Lysyne (Sigma). Acompanhamos o crescimento das células até atingirem, pelo menos, 80% de confluência. Substituímos o meio de cultura por DMEM suplementado com FBS 0,5%

durante 48 horas. Fixamos as células em PFA 4% por 20 minutos à temperatura ambiente e lavamos três vezes, de 5 minutos cada, com PBS. O bloqueio foi feito em PBS com FBS 10% e Triton-X 0,2% durante 30 min a temperatura ambiente. O anticorpo primário anti-α-tubulina acetilada (Abcam, 1:500) foi diluído em PBS com FBS 1% e Triton-X 0,2% e incubado *overnight* a 4°C. Lavamos as células três vezes, de 5 minutos cada, em PBS e incubamos com o anticorpo secundário alexa-fluor (Life Technologies,1: 300) em PBS com FBS 1% e Triton-X 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavamos uma vez de 5 minutos com PBS e incubamos com DAPI 0,5 μg/ ml por 15 minutos. Realizamos mais duas lavagens de 5 minutos com PBS e montamos a lâmina com 45 μl de Vectashield® *Mounting Medium* (Vector Labs).

3.12.2. Para experimentos de proliferação/apoptose em MEFs, 0,4-0,7 x 10^5 células em P1 foram plaqueadas por poço de Lab-Tek previamente tratado com Poly-L-Lysyne (Sigma) em DMEM suplementado com FBS 10%. No dia seguinte foi realizado um pulso de 1 hora com BrdU 10 μM diluído em meio de cultura completo. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por mais 24 horas em meio de cultura. Fixamos as células com PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Realizamos 3 lavagens de um minuto com PBS e incubamos as células, durante 20 minutos, em uma solução de HCl 1,5 M e Tween20 0,5%. Lavamos uma vez com tetraborato de sódio 0,1 M por 2 minutos e uma vez com PBS por 5 minutos. As células foram bloqueadas com Triton-X 0,2% e FBS 10% em PBS por 30 minutos. Os anticorpos primários anti-BrdU (Santa Cruz, 1:400) e anti-caspase-3-ativa (Cell Signaling, 1:250) foram diluídos em PBS contendo Triton-X 0,2% e FBS 1% e incubados *overnight* a 4°C. Lavamos as células 3 vezes, de 5 minutos cada, com PBS. Os anticorpos secundários (Life Technologies, 1:300) foram diluídos em PBS contendo Triton-X 0,2% e FBS 1% e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Lavamos uma vez de 5 minutos com PBS, incubamos com DAPI 0,5 μg/ ml por 15 minutos e lavamos mais duas vezes de 5

minutos com PBS. Fechamos as lâminas com 45 µl de Vectashield® *Mounting Medium* (Vector Labs).

3.12.3. Para experimentos em cortes de tecido: secamos as lâminas a temperatura ambiente por 15 minutos e lavamos uma vez com PBS. Bloqueamos em PBST 0,2% contendo NGS 10% por uma hora. Os anticorpos anti-caspase-3-ativa (Cell Signaling, 1:250), anti-AP2α (Santa Cruz, 1:50), anti-Pax6 (Covance, 1:250), anti-α-tubulina acetilada (Abcam, 1:500) foram diluídos em PBST 0,2% contendo NGS 1% e incubados *overnight* a 4 °C. Lavamos 3 vezes, de 10 minutos cada, com PBS. Os anticorpos secundários Alexa Fluor (Life Technologies, 1:300) foram diluídos em PBST 0,1% contendo NGS 1% e incubados a temperatura ambiente por uma hora e meia. Lavamos uma vez de 10 minutos em PBS, coramos com DAPI 5 µg/ ml por 15 min e lavamos uma vez em PBS por 10 minutos.

3.12.4. Para experimentos em MEFs para verficar a localização subcelular de Ric-8B: 2 x 10^5 células foram plaqueadas por poço de Lab-Tek e fixadas no dia seguinte com PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Realizamos 3 lavagens, de 5 minutos cada, com PBS. As células foram permeabilizadas em 3 incubações de 5 minutos com PBST 0,1%, em seguida, foram bloqueadas durante 30 minutos em PBS contendo FBS 4%. Os anticorpos anti-α-tubulina (Sigma, 1: 2000) e anti-Ric-8B (Atlas, 1:50 ou Sigma, 1:250) foram diluídos em solução de bloqueio e incubados *overnight* a 4 °C. As células foram lavadas 3 vezes, de 5 minutos cada, com PBS e incubadas durante uma hora com anticorpos secundários Alexa Fluor (Life Technologies, 1: 300). Seguiram-se uma lavagem de 5 minutos com PBS, coloração com DAPI 0,5 µg/ ml por 15 minutos e duas lavagens de 5 minutos com PBS.

3.13 Western blot

1.1.1. Preparação dos extratos proteicos de embrião:

Os embriões no estágio E9,5 foram dissecados em PBS gelado e coletados em um tubo contendo 30 µl de tampão de lise RIPA (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NP40 1%, deoxicolato de

sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) acrescido de coquetel de inibidores de proteases (SIGMA) na diluição de 1:10. Os embriões foram triturados no tampão de lise usando uma pipeta. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C para precipitar o material insolúvel. A fração aquosa, onde as proteínas estão solubilizadas, foi transferida para um novo tubo. Separamos uma alíquota de 1,5 µl do extrato para fazer a quantificação de proteínas e congelamos o restante a -80°C.

O conteúdo proteico das amostras foi determinado por ensaio de Bradford (BioRad), para o qual a alíquota de extrato foi diluída 20 vezes em água e preparamos uma curva padrão com diferentes quantidades de BSA (de 0,5 µg a 5 µg) diluídas em água contendo 1/20 de tampão RIPA.

3.13.2. SDS-PAGE, transferência e imunodetecção:

Para detectar RIC-8B, 20 µg dos extratos foram misturados com tampão de amostra (50 mM de Tris-HCL pH 6,8; 100 mM de DTT, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%) e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (10% de poliacrilamida no gel de resolução e 4% de poliacrilamida no gel de empilhamento). As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) durante 2 horas a 120 volts. Após a verificação da transferência pela coloração com Ponceau 0,1%, lavamos a membrana com tampão TBST (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 2%) até retirar completamente o corante e, em seguida, bloqueamos com 5% de leite desnatado em TBST durante 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-RIC-8B (SIGMA e Atlas) foram diluídos para a concentração final de 2 µg/ml em TBST contendo 5% de BSA, antes de serem incubados *overnight* a 4 °C. Esses dois anticorpos, ambos produzidos em coelho, reconhecem regiões distintas de RIC-8B, sendo que um deles reconhece um peptídeo codificado pelo exon 5 (SIGMA) e o outro, a região N-terminal codificada pelos 3 primeiros exons (Atlas). Lavamos a membrana com TBST por 3 vezes de 5 minutos cada e incubamos 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-

rabbit IgG HRP-linked, Cell Signaling) diluído 1:5000 em TBST contendo 5% de leite desnatado. A membrana foi então lavada novamente com TBST por 3 vezes de 5 minutos cada e revelada usando o sistema *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences). Em seguida, incubações, lavagens e detecção foram repetidas da mesma maneira com o anticorpo anti-α-actina (Millipore, 1:10000), utilizado como controle interno de carregamento de proteína. Para RIC-8B, esperamos encontrar uma banda na altura de 63 kDa e para α-actina, uma banda de 42 kDa.

Para detectar as formas clivada e não-clivada de Gli3, utilizamos 120 μg de extrato proteico, proveniente de 3 embriões diferentes com o mesmo genótipo. Os extratos foram misturados com tampão de amostra e separados em gel de empilhamento com 4% de poliacrilamida e gel de resolução com 7% de poliacrilamida. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita a 15 volts *overnight* em câmara fria. Após a coloração com Ponceau 0,1%, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em TBST durante 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-Gli3 (1:200, Proteintech) e anti-α-tubulina (1:40.000, SIGMA) foram diluídos em TBST contendo 5% de BSA e incubados *overnight* a 4 °C. O anticorpo para Gli3 reconhece as formas clivada e *full-lenght* da proteína, que são detectadas por bandas nas alturas de 80 kDa e 230 kDa, respectivamente. A α-tubulina foi usada como controle endógeno e é detectada na altura de 55 kDa. Após a lavagem da membrana com TBST por 3 vezes de 5 minutos cada, incubamos por 1 hora à temperatura ambiente os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (*goat* anti-*rabbit* IgG-HRP e *goat* anti-*mouse* IgG-HRP, Santa Cruz) diluídos 1:2000 em TBST contendo 5% de leite desnatado. A membrana foi lavada com TBST por 3 vezes de 5 minutos cada e revelada usando o sistema *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce).

4 RESULTADOS

4.1 RIC-8B é essencial para a embriogênese.

Apesar de a expressão de *Ric-8B* ser restrita a alguns tecidos no camundongo adulto, a presença do alelo mutado em homozigose leva à morte do animal ainda durante a gestação. Para determinar o momento em que a falta de *Ric-8B* passa a ser letal, os embriões de cruzamentos entre heterozigotos foram genotipados em diferentes estágios do desenvolvimento. A gestação de um camundongo dura de 18 a 21 dias e consideramos que o dia embrionário E0,5 corresponde à manhã seguinte à junção dos casais. As quantidades de embriões selvagens (*Ric-8B*$^{+/+}$), heterozigotos (*Ric-8B*$^{+/-}$) e homozigotos mutantes (*Ric-8B*$^{-/-}$) são apresentadas na Tabela 1. Podemos perceber que anormalidades fenotípicas do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ são perceptíveis desde o estágio E8,5, porém a redução no número desses embriões vivos ocorre a partir de E10,5. Alguns indícios foram usados como diagnóstico da morte do embrião, como pouco líquido no saco amniótico, irrigação sanguínea reduzida no embrião e na placenta, fragilidade do embrião e ausência de batimento cardíaco, que pode ser verificada mais claramente a partir de E9. O fato de encontrarmos apenas embriões em estado de degradação/reabsorção no estágio E12,5 confirma que a morte do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ocorre por volta de E10,5.

Tabela 1. Análise de ninhadas de embriões pertencentes aos estágios embrionários de E7,5 a E12,5, com o número total de embriões observados para cada estágio e para cada genótipo. Entre parênteses, a quantidade de embriões mortos ou anormais encontrados entre embriões daquele genótipo. Diferenças no fenótipo já são encontradas, pelo menos, desde o estágio E8,5 As diferenças fenotípicas em E7,5 não foram averiguadas. O número de embriões de cada genótipo segue distribuição mendeliana até E10,5, sugerindo que a letalidade do homozigoto mutante ocorre por volta desse estágio.

Estágio	+/+	+/-	-/-	Nº total de embriões
E7.5	12	27	12	51
E8.5	32	52	22 (19)	106
E9.5	33	63	32 (28)	118
E10.5	6	17	10 (8)	33
E12.5	7	12	1 (1)	20

A expressão de *Ric-8B* no período estudado foi verificada por PCR em tempo real, que mostra que esse gene é expresso de maneira semelhante em todos os estágios analisados (Figura 6).

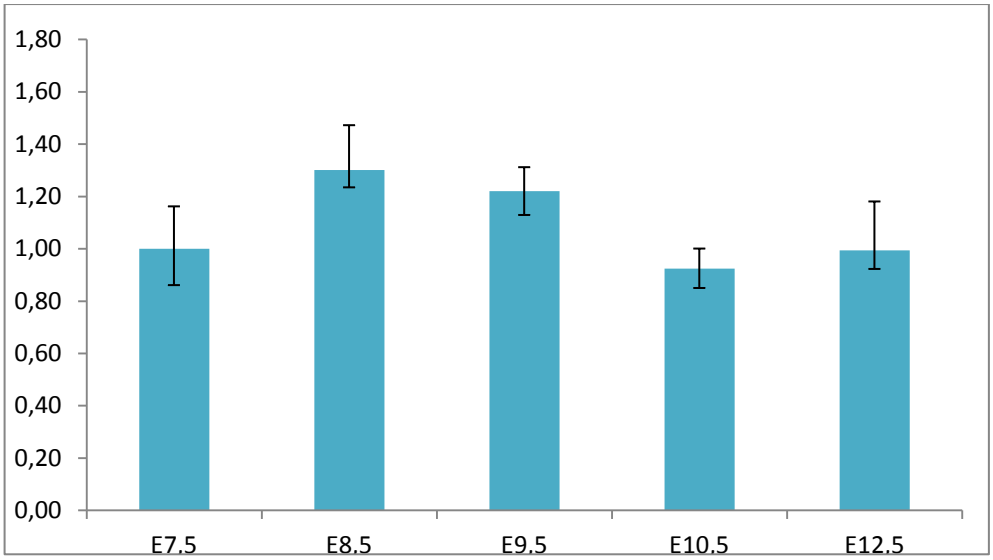

Figura 6. PCR quantitativo da expressão de *Ric-8B* no período de E7,5 a E12,5. A expressão de *Ric-8B* já é detectada em E7,5, quando o embrião se encontra em estágio tardio de gastrulação. O período de E8,5 a 12,5 compreende toda a neurulação primária. Os níveis de expressão de *Ric-8B* foram normalizados de acordo com a expressão de *β-actina* e calibrados de acordo com a expressão em E7,5.

4.2 O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ não é nulo.

Para confirmar o *knock out* de *Ric-8B*, realizamos RT-PCR a partir do cDNA de uma ninhada de embriões no estágio E10,5. Usamos *primers* para duas regiões diferentes de *Ric-8B*, como esquematizado na Figura 7A. Uma delas corresponde a um trecho do éxon 3 ao 5, que deve ser interrompido no alelo mutante pela inserção do *gene trap*, e a outra corresponde a um trecho mais a *downstream*, do éxon 7 ao 10. Portanto, ambas as regiões devem ser amplificadas apenas a partir do alelo selvagem. A reação de RT-PCR mostra que, embora detectáveis, os níveis de expressão de *Ric-8B* no embrião homozigoto mutante são bem menores que aqueles encontrados em embriões selvagens e heterozigotos (Figura 7B).

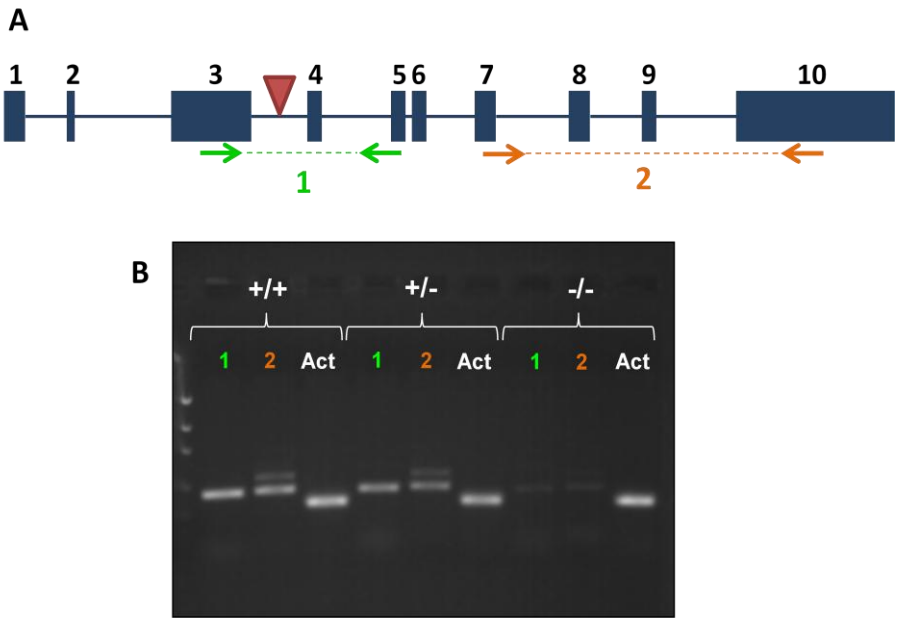

Figura 7. RT-PCR para diferentes trechos de *Ric-8B* realizado com cDNAs de embrião E10.5 selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-). A) A estrutura do gene *Ric-8B* está esquemetizada, indicando as regiões amplificadas por PCR. As setas representam os *primers* e o triângulo aponta o sítio de inserção do *gene trap.* B) Com 28 ciclos de PCR, é possível observar uma fraca expressão de Ric-8B no homozigoto mutante, que é bastante reduzida em relação ao selvagem e ao heterozigoto. Nesses dois últimos, Ric-8B é expressa em níveis semelhantes. A amplificação de duas bandas com o par de *primers* 2 corresponde à forma *full-lenght* de *Ric-8B* e uma isoforma que tem deleção do éxon 9. Act, amplificação de actina (controle endógeno).

Uma quantificação mais precisa da expressão de *Ric-8B* foi realizada através de PCR em tempo real, utilizando *primers* para um pequeno trecho do exon 7 ao 8. Utilizamos cDNAs de todos os embriões da ninhada. A Figura 8 mostra que embriões heterozigotos apresentam, como esperado, cerca de metade dos níveis expressos em embriões selvagens; em embriões *RIC-8B-/-*, no entanto, esses níveis atingem aproximadamente 10%.

Como a tecnologia de *gene trap* promove o *knockout* do gene-alvo durante o processamento de mRNA, é possível que ocorra a geração residual de algumas isoformas de transcritos que escapam ao *splicing* esperado.

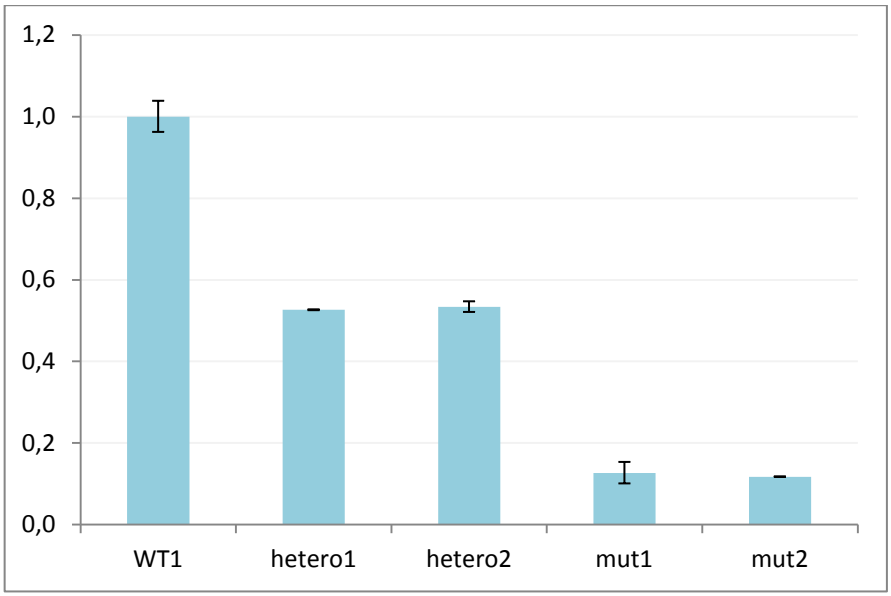

Figura 8. PCR quantitativo da expressão de *Ric-8B* em embriões de uma ninhada no estágio E10,5. Embriões heterozigotos (hetero) expressam *Ric-8B* em níveis que correspondem à metade dos níveis expressos no embrião selvagem (WT). Embriões homozigotos mutantes (mut) expressam *Ric-8B* em níveis reduzidos, aproximadamente 10% dos níveis expressos pelo embrião selvagem. A normalização foi feita de acordo com a expressão de *β-actina* e a calibração usou expressão dos embriões selvagens como referência.

Adicionalmente, os níveis de proteína RIC-8B presentes em extratos de embriões E9,5 foram analisados por Western blot (Figura 9). Utilizamos dois anticorpos para regiões distintas de RIC-8B, que produziram resultados semelhantes. Um deles reconhece a porção N-terminal codificada pelos três primeiros éxons de *Ric-8B*, enquanto o outro reconhece um peptídeo codificado pelo éxon 5. O tamanho predito para RIC-8B *full-lenght* é de 62 kDa e, em concordância, uma banda entre 50 e 70 kDa foi detectada com os dois anticorpos. Bandas de tamanhos diferentes do esperado também foram visualizadas e, provavelmente, correspondem a interações inespecíficas dos anticorpos. Considerando que apenas a banda entre 50 e 70 kDa corresponde a RIC-8B, observamos que os níveis de expressão dessa proteína são semelhantes em extratos de embriões selvagens e heterozigotos, mas estão reduzidos no embrião homozigoto mutante. Extratos de OE preparados a partir de camundongos selvagens adultos também foram analisados nesse experimento como controle positivo.

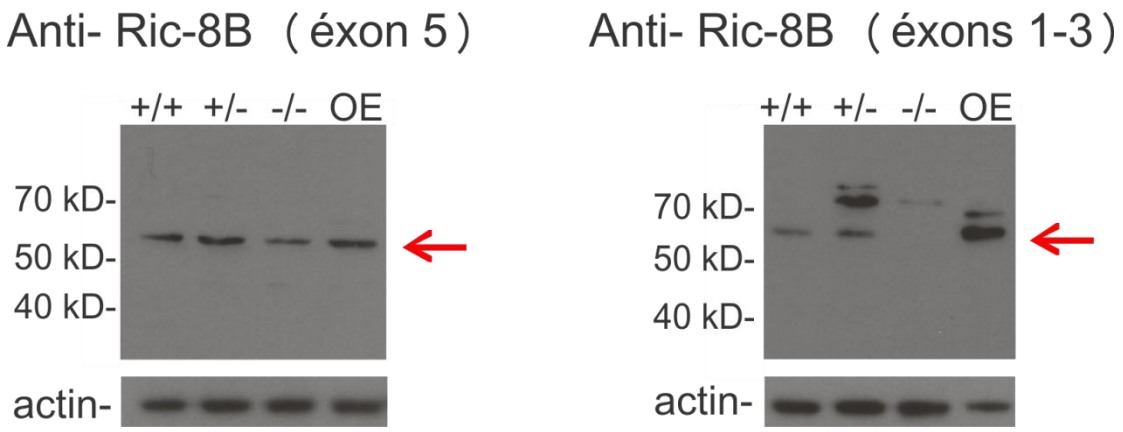

Figura 9. Western Blot da expressão de RIC-8B em extratos de embrião E9.5 selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-), e OE adulto (OE). A marcação para RIC-8B com anticorpo que reconhece peptídeo codificado pelo exon 5 (à esquerda) ou pelos exons 1-3 (à direita) apresenta bandas entre 50 e 70 kDa, que são correspondentes ao tamanho esperado para RIC-8B (setas). Os controles de carregamento foram realizados utilizando anticorpo anti-actina (42 kDa).

4.3 O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ apresenta falha no fechamento do tubo neural cranial.

A neurulação é um evento fundamental na embriogênese. Ela é iniciada por volta de E8,0, com a diferenciação da placa neural (ou neuroepitélio) a partir de um espessamento na região superfície dorsal do embrião. Através de uma série de eventos morfogenéticos, a placa neural sofre remodelamento e dobramento, originando pregas bilaterais que se elevam e fundem na linha média para produzir um tubo. A formação do tubo neural completamente fechado é um processo descontínuo (Figura 10), que se inicia com a fusão das pregas neurais no limite entre o rombencéfalo e a região cervical (sítio 1) em E8,5. O fechamento continua bidirecionalmente, tanto no sentido rostral quanto caudal. Em E9,0 outros sítios de fusão se formam na região cranial, um no limite prosencéfalo-mesencéfalo (sítio 2) e outro na extremidade mais rostral do prosencéfalo (sítio 3). As regiões entre os sítios de fusão 2 e 3 completam seu fechamento por volta de E9,5, enquanto a fusão iniciada no sítio 1 continua caudalmente e é completada em E10,0 (Copp et al., 2003; Greene and Copp, 2009).

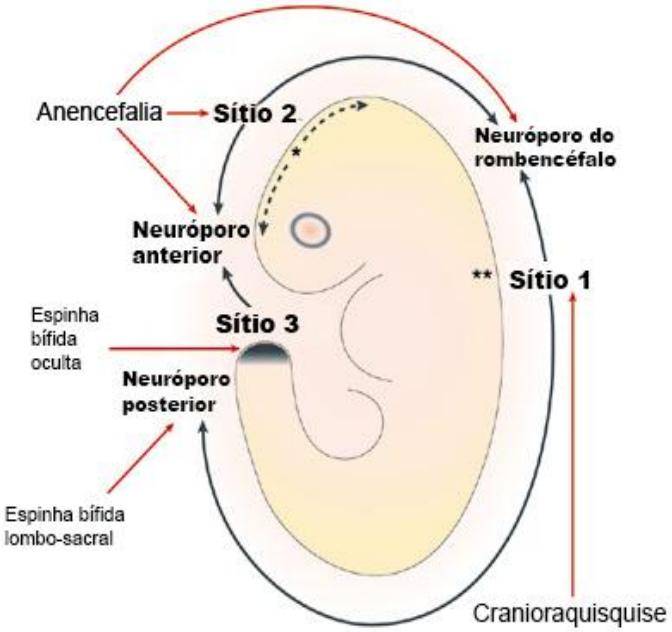

Figura 10. Sequência de eventos rostrocaudais durante a neurulação do embrião de camundongo. O fechamento do tubo neural começa no sítio 1, limite entre a região cervical e o rombencéfalo (**), e se propaga bidirecionalmente. Outros sítios de fechamento são formados *de novo* na região cranial, um no limite mesencéfalo/prosencéfalo (sítio 2,*) e outro na extremidade rostral do prosencéfalo (sítio 3). A fusão iniciada no sítio 3 se propagada caudalmente, encontrando as regiões fechadas pela propagação rostral da fusão iniciada no sítio 2. A região inicialmente aberta que é fechada nesse evento é chamada neuróporo rostral. De maneira semelhante, a propagação no sentido caudal da fusão iniciada no sítio 2 se encontra com aquela propagada rostralmente a partir do sítio 1, causando o fechamento do neuróporo do rombencéfalo. A fusão iniciada no sítio 1 se propaga no sentido caudal termina com o fechamento do neuróporo posterior. Os defeitos de tubo neural surgidos da falha desses eventos estão indicados (modificado de Copp et al, 2003).

Perturbações no processo normal de fechamento do tubo neural resultam em malformações congênitas conhecidas como defeitos de tubo neural (NTDs, *neural tube defects*) e também estão indicadas na Figura 10. Quando o fechamento do sítio 1 falha, quase todo o tubo neural do mesencéfalo até a medula espinhal permanece aberto, uma condição chamada raquisquise. Embriões que falham em fechar o tubo neural no sítio 2 têm exencefalia e, posteriormente, o tecido neural exposto se degenera, levando à anencefalia. Quando a falha ocorre especificamente no sítio 3, a exencefalia/anencefalia é restrita à região prosencefálica e, quando afeta parcialmente o sítio 1, com falha nas regiões mais caudais da medula espinhal, resulta em espinha bífida (Copp et al., 2003; Greene and Copp, 2009; Yamaguchi and Miura, 2013).

Observamos que o embrião *Ric-8B*$^{-/-}$, além do tamanho reduzido, é caracterizado por falha no fechamento do tubo neural cranial que se torna proeminente a partir de E9,5 (Figura 11). Essa falha no fechamento do tubo neural parece afetar, mais especificamente, o mesencéfalo e uma parte mais caudal do prosencéfalo. As demais regiões do tubo neural se encontram

completamente fechadas. Dessa forma, podemos dizer que o embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ tem falha no fechamento do sítio 2 e apresenta uma condição de exencefalia.

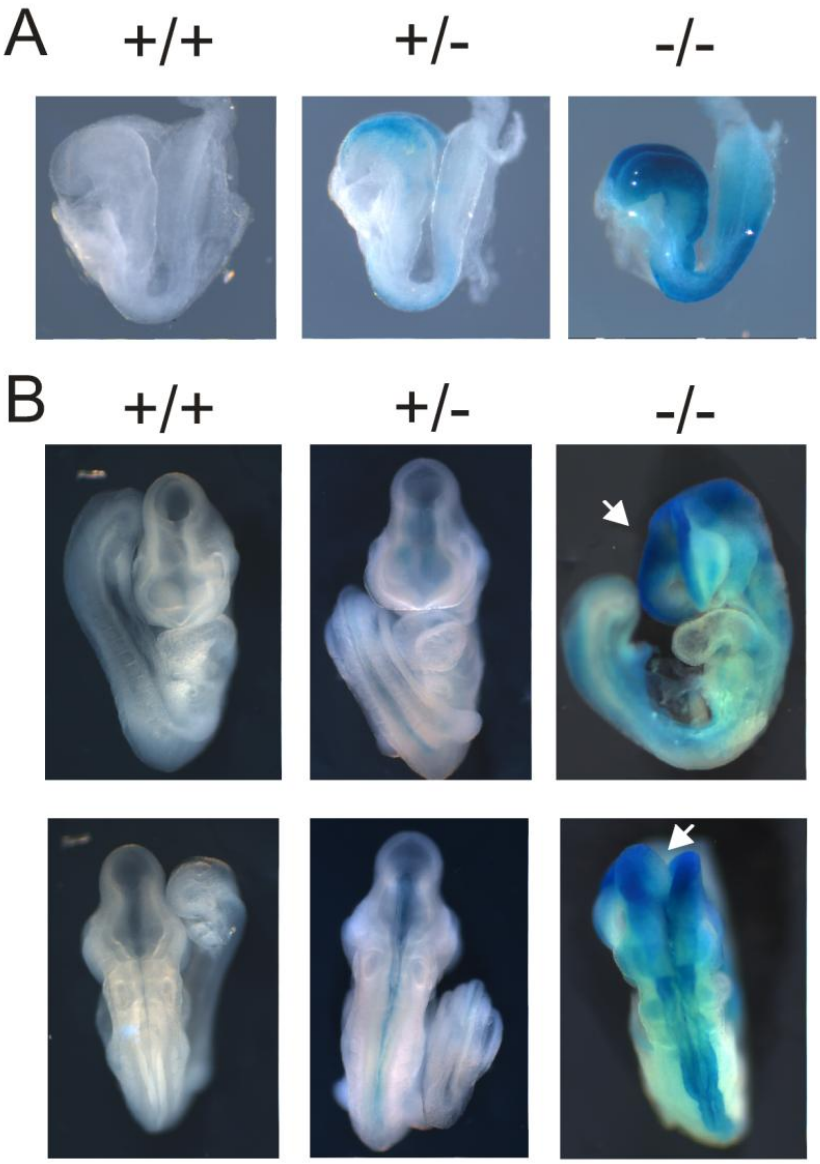

Figura 11. Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentam defeitos no fechamento do tubo neural cranial. Embriões selvagens (+/+), heterozigotos (+/-) e homozigotos mutantes (-/-) foram corados com X-gal nos estágios E8,5 (A) e E9,5 (B). *β-geo* é codificado pelo alelo mutado e foi usado como gene repórter da expressão de *Ric-8B.* Além da morfologia, a coloração com X-gal também fornece informação sobre o genótipo de cada embrião. Em (B), embriões são mostrados na perspectiva ventral (acima) ou rostral (abaixo). Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ não têm fusão das pregas neurais craniais (seta branca), enquanto as demais regiões do tubo neural são normalmente fechadas.

Em E9,5, embriões selvagens e heterozigotos apresentam tubo neural completamente fechado ou com as pregas neurais bastante aproximadas, como no momento que precede fusão. Na Figura 12, uma imagem de SEM (*scanning electron microscopy*) mostra com

detalhes o fenótipo de embriões E9,5, evidenciando o fechamento incompleto do tubo neural cranial no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.

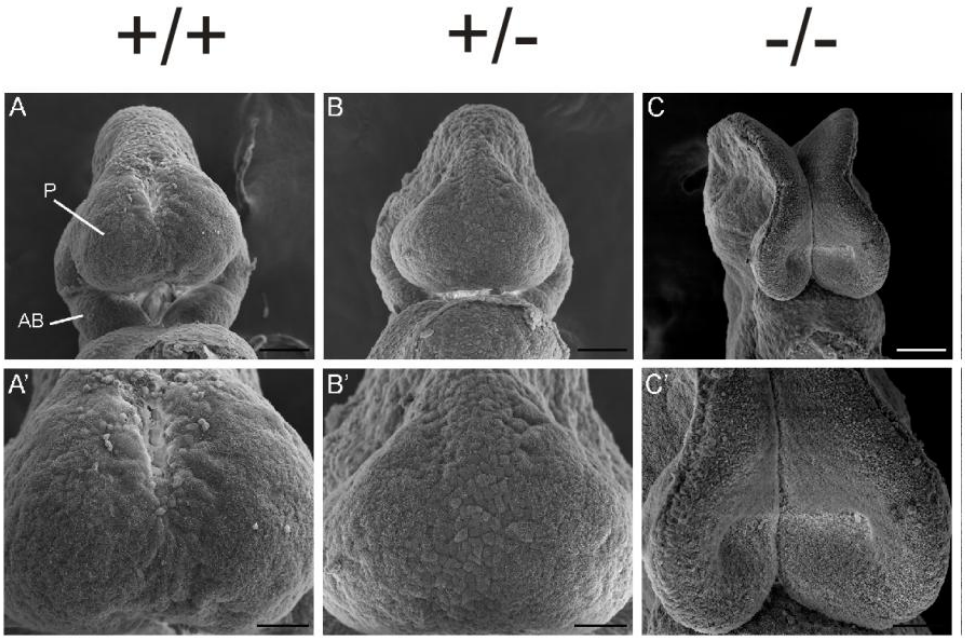

Figura 12. Imagem de SEM (scanning electron microscopy) da cabeça de embrião selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto mutante (-/-) no estágio E9,5. A diferença entre selvagem e heterozigoto pode ser devida à variação natural encontrada em embriões da mesma ninhada, podendo alguns estar ligeiramente mais avançados que outros. Ambos já possuem o tubo neural completamente fechado, enquanto o homozigoto mutante apresenta uma falha no fechamento do tubo neural que é bastante evidente. A', B' e C' são magnificações de A, B e C, respectivamente. P: prosencéfalo, AB: arco branquial. Barras de escala em A-C representam 100 µm; em A'-C', 50 µm.

A morte de embriões no período de fechamento do tubo neural é frequentemente acompanhada de atraso no desenvolvimento e pode, portanto, "mimetizar" NTDs (Copp et al., 2003). Apesar de ser evidente em alguns casos, o atraso no desenvolvimento de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ pode também ser indicado pelo número de somitos levemente reduzido em relação a embriões selvagens e heterozigotos em E9,5 (Figura 13). No entanto, nesse período, embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ geralmente já realizaram um movimento de rotação longitudinal característico do desenvolvimento normal, que resulta na reversão da curvatura do tronco do embrião para a posição fetal e é importante para iniciar a formação do intestino. Adicionalmente, a análise do fenótipo de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ do estágio E10,5 (Figura 14) também indica que a exencefalia é

causada pela mutação em *Ric-8B* e não pela morte do embrião antes de completar a neurulação.

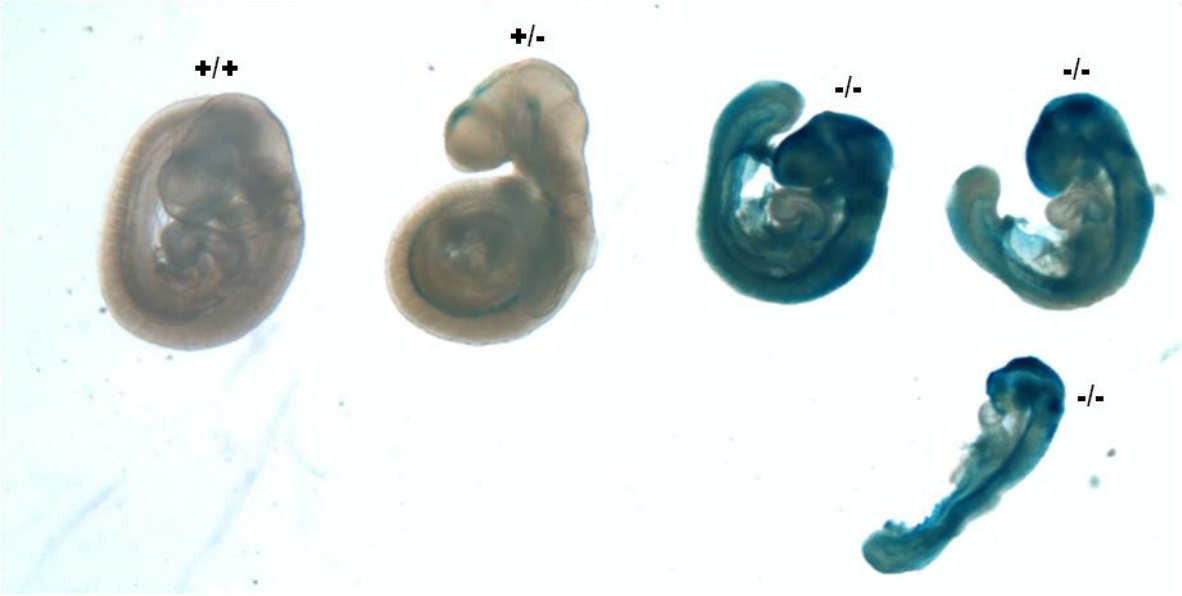

Figura 13. Embriões no estágio E9,5 pertencentes à mesma ninhada, após coloração com X-gal. Embriões selvagem (+/+) e heterozigoto (+/-) são bastante semelhantes, mas embriões homozigotos mutantes (-/-) são claramente distinguíveis tanto pela morfologia anormal da cabeça quanto pelo tamanho reduzido. O tamanho reduzido pode ser decorrente de um atraso no desenvolvimento, que pode ser mais ou menos pronunciado nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$da mesma ninhada. Assim como embriões selvagens, embriões *Ric-8B*$^{-/-}$geralmente realizam o movimento de rotação longitudinal que faz com que atinja a posição fetal, com a cabeça e a cauda sejam voltadas para a região ventral do embrião. Esse movimento indica que embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ se desenvolvem até estágios em que a neurulação cranial já deveria ter sido completada.

Figura 14. Exencefalia em embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ E10,5 recém-dissecado. A linha tracejada indica a região da cabeça onde não houve fusão das pregas neurais, caracterizada como exencefalia. A seta aponta para um broto de membro.

Como NTDs não provocam letalidade em períodos iniciais ou mesmo durante todo o desenvolvimento *in utero* (Copp, 1995; Greene and Copp, 2009), a exencefalia do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ não é um motivo provável para a morte por volta de E10,5. Trabalhos com camundongos *KO*, inserções de transgenes e mutações espontâneas levando à morte pré-natal indicam que distúrbios cardiovasculares ou na hematopoese, assim como uma interação defectiva entre a mãe e o embrião (afetando a formação da placenta, por exemplo) são as principais causas da morte durante esse período da gestação (Copp, 1995). Dessa maneira, experimentos adicionais são necessários para que as causas da letalidade embrionária do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ sejam determinadas.

4.4 *Ric-8B* é expressa no sistema nervoso dos embriões

O alelo mutante expressa o gene repórter *β-geo* sob controle do promotor endógeno de *Ric-8B* (ver Material e Métodos, item 3.1.). Usando coloração com X-gal, localizamos a expressão de *Ric-8B* especificamente no epitélio olfatório e na região cerebral do *striatum* de camundongos heterozigotos adultos. Esse padrão é idêntico ao previamente determinado por hibridização *in situ* (Von Dannecker et al., 2005), o que valida o uso da β-galactosidase como repórter da atividade do promotor de *Ric-8B*. Portanto, a coloração com X-gal foi utilizada para identificar as estruturas embrionárias onde *Ric-8B* é expresso. A análise de embriões heterozigotos (Figura 15) mostra que, em E7,5, a coloração com X-gal marca toda a ectoderme, porém não foram realizadas análises mais detalhadas porque as observações nesse estágio requerem técnicas adequadas e conhecimento das estruturas presentes nesse período. Em E8,5, a expressão do promotor de *Ric-8B* pode ser identificada nas pregas neurais craniais e na região ventral do tubo neural. Em E9,5 a marcação permanece na região ventral do tubo neural e é mais fraca, porém ainda visível, nas regiões em que as pregas neurais cefálicas sofreram fusão, chamada teto da placa (*roof plate)*. Em E10,5, a atividade do promotor é

detectada principalmente na região ventral do tubo neural, mas no teto da placa é visível em apenas alguns embriões.

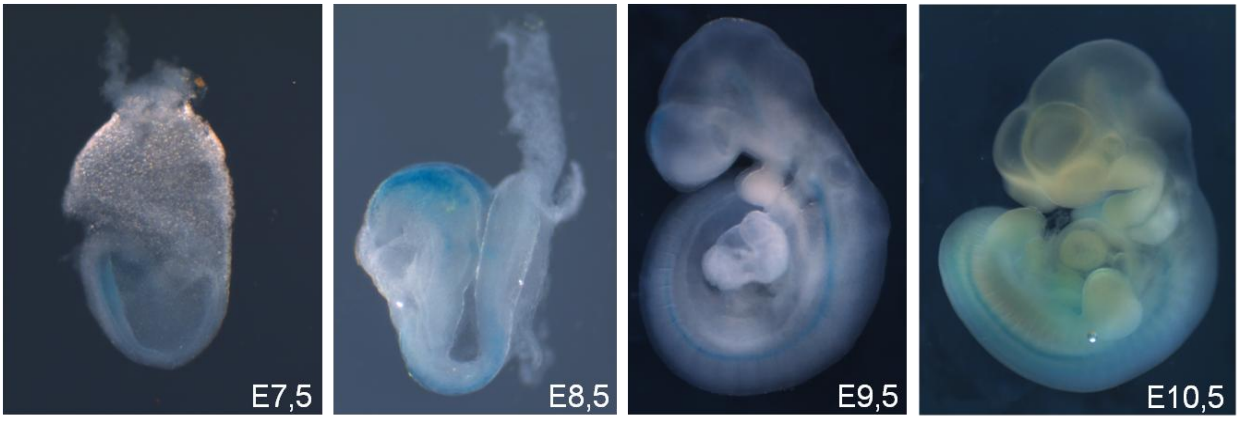

Figura 15. *Ric-8B* é expresso no sistema nervoso de embriões no período de E7,5 a E10,5. Através da coloração de embriões heterozigotos com X-gal, detectamos atividade do promotor de *Ric-8B* na neuroectoderme de embriões em E7,5; nas pregas neurais craniais e no tubo neural em E8,5; na região ventral do tubo neural e teto da placa em E9,5; e na região ventral do tubo neural em E10,5.

Notavelmente, os níveis de expressão de *β-galactosidase* parecem ser bem mais intensos em embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ quando comparados aos embriões heterozigotos (Figuras 11 e 13). Esses resultados são condizentes com o fato de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ carregarem duas cópias do gene repórter *β-geo*, enquanto embriões *Ric-8B*$^{+/-}$ têm apenas uma. Apesar de a marcação com X-gal ser muito mais intensa e mais ampla no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$, a quantificação através de PCR em tempo real (Figura 16) indica que os níveis de expressão de *β-galactosidase* nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ equivalem a aproximadamente o dobro do encontrado em embriões *Ric-8B*$^{+/-}$, como esperado. A incubação com X-gal é feita durante o mesmo tempo para embriões de todos os genótipos, portanto, é possível que as marcações nas outras regiões também aparecessem se tivéssemos incubado o embrião heterozigoto pelo dobro de tempo. Alternativamente, a atividade do promotor de *Ric-8B* no embrião homozigoto mutante poderia ser de fato, espacialmente mais ampla que a encontrada no heterozigoto.

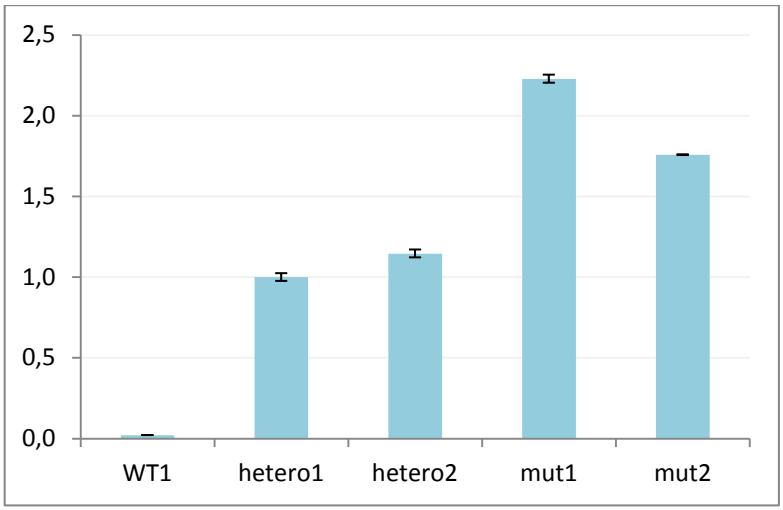

Figura 16. PCR quantitativo da expressão de *β-geo* em embriões de uma ninhada no estágio E10,5. Os níveis de expressão de *β-geo* nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ (mut) correspondem a aproximadamente o dobro do encontrado em embriões *Ric-8B*$^{+/-}$ (hetero). No embrião selvagem (WT), como esperado, a expressão de *β-geo* não é detectada. Os dados foram normalizados de acordo com a expressão de *β-actina* e calibrados tomando a expressão do hetero1 como referência.

4.5 *Ric-8B* é expresso na notocorda e no assoalho da placa.

Para determinar mais especificamente a extensão da expressão de *Ric-8B*, analisamos cortes transversais de embriões corados com X-gal (Figura 17). Nos heterozigotos do estágio E8,5, a expressão de *Ric-8B* pode ser observada nas pregas neurais da região cefálica e na parte ventral do sulco neural ao longo do seu eixo antero-posterior (Figura 17 A-D). É nessa região do sulco neural que se forma o ponto de dobradiça medial (MHP, *medial hinge point*), onde se localizam as células que darão origem o assoalho da placa (*floor plate*) após o fechamento do tubo neural. Pode-se também observar, mais intensa, a marcação da notocorda, logo abaixo do MHP (Figura 17 C). No homozigoto mutante, a marcação ocorre fortemente nas mesmas estruturas, mas também se estende mais fracamente por toda a extensão dorso-ventral do sulco neural (Figura 17 E-H). Em embriões E9,5 heterozigotos, a expressão do promotor de *Ric-8B* é visível, apesar de fraca, nas regiões do teto da placa onde as pregas neurais cefálicas sofreram fusão. No tubo neural do rombencéfalo e da porção truncal, a marcação é restrita ao assoalho da placa (Figura 17 I-N). No homozigoto mutante, as pregas da região cefálica não sofreram fusão e continuam fortemente marcadas nessas regiões e no

MHP (Figura 17 O-T). Também é possível observar marcação em regiões do mesênquima da cabeça. O tubo neural está marcado em toda sua extensão dorso-ventral, porém mais intensamente no assoalho da placa e na notocorda (Figura 17 O-T).

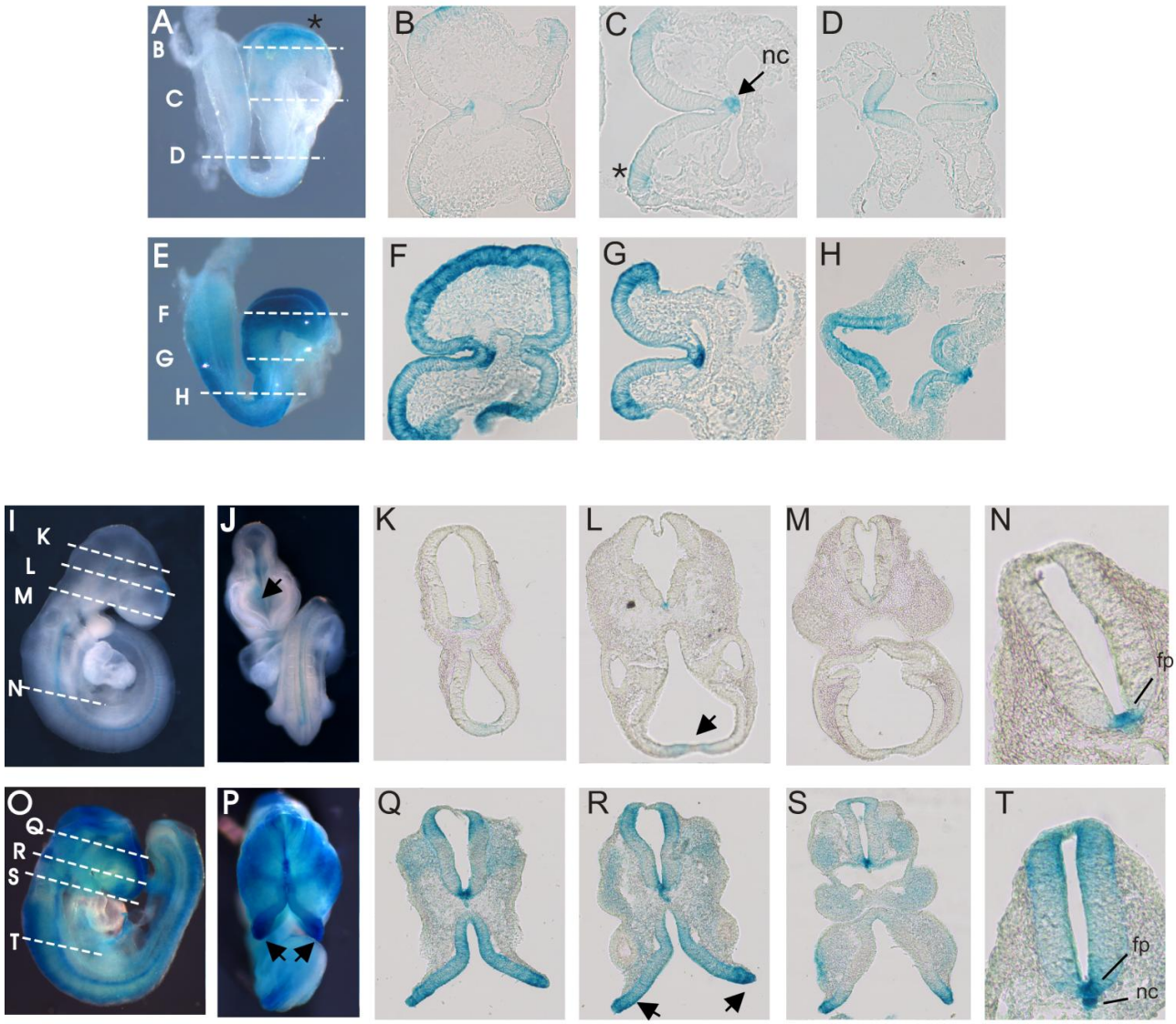

Figura 17. A localização da expressão de *Ric-8B* em cortes de embriões corados com X-gal. Acima, vista lateral de um embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ (A) ou *Ric-8B*$^{-/-}$ (E) em E8,5. As linhas indicam os níveis dos cortes transversais mostrados em B-D e F-H. No embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ (A-D), a marcação azul é detectada nas pregas neurais craniais (*) e na notocorda (nc). No embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ (F-H), a marcação azul é detectada nas mesmas regiões que em embriões heterozigotos, no entanto, ela é mais forte e se expande para outros domínios do tubo neural. Abaixo: vista lateral e ventral de embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ (I, J) ou *Ric-8B*$^{-/-}$ (O, P) no estágio E9,5. No embrião *Ric-8B*$^{+/-}$ (K-M), a marcação é detectada nas pregas neurais craniais em fusão (seta) e no assoalho da placa (fp). Em N, uma magnificação maior do tubo neural da região truncal mostra marcação intensa no assoalho da placa e, mais fraca, na notocorda. No embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ (Q-T), novamente, a marcação é detectada nas mesmas regiões que no embrião *Ric-8B*$^{+/-}$, no entanto, é mais intensa e se estende por todo o tubo neural e algumas regiões de mesênquima da cabeça. As pregas neurais não estão fechadas na região cranial (setas em P, R). Em T, uma maior magnificação do tubo neural truncal mostrando a marcação mais intensa no assoalho da placa (fp) e notocorda (nc).

Portanto, a expressão específica de *Ric-8B* na notocorda é predominante no estágio E8,5, enquanto nos estágios de E9,5 e E12,5 ela se localiza especificamente no assoalho da placa (Figura 18). Esse padrão é semelhante ao de outro gene essencial para o desenvolvimento embrionário, *Sonic Hedgehog* (*Shh*).

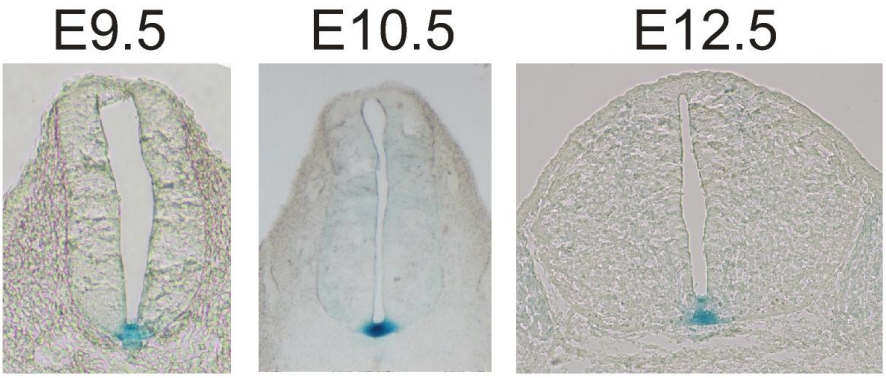

Figura 18. *Ric-8B* é predominantemente expresso no assoalho da placa em embriões de E9,5 a E12,5. Cortes transversais do tubo neural truncal de embriões *Ric-8B*$^{+/-}$ corados com X-gal em dias diferentes do desenvolvimento mostram que a atividade de β–geo é restrita ao assoalho da placa.

SHH é uma molécula sinalizadora que está relacionada ao estabelecimento da polaridade dorso-ventral no sistema nervoso central (Johnson and Tabin, 1995). SHH é inicialmente secretada pela notocorda, induzindo a formação do assoalho da placa na linha medial ventral, que se estende na direção rostro-caudal do tubo neural em formação (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Roelink et al., 1994). As células do assoalho da placa também passam a expressar *Shh*, gerando um gradiente de concentração de morfógenos importante para a determinação dos diferentes subtipos neuronais mais ventrais do tubo neural (Ericson et al., 1997; Roelink et al., 1995; Wijgerde et al., 2002).

4.6 MEFs de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ têm cílio primário.

Um *screen* de mutações que alteravam a formação dos eixos no embrião de camundongo foi a primeira evidência de que a sinalização de *Shh* é dependente de cílio primário (Huangfu et al., 2003). Alguns mutantes identificados nesse *screen* exibiam características consistentes

com alterações na via de SHH, como a perda de tipos celulares ventrais do tubo neural, mas os genes truncados codificam vários componentes da maquinaria IFT (Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003). Mutações nessa maquinaria podem inibir a formação do cílio ou resultar em cílios com morfologia alterada, que produzem diferentes efeitos na sinalização de *Shh* (Goetz and Anderson, 2010). Interessantemente, RIC-8B interage com Gαolf e Gγ13, duas subunidades de proteínas G que são localizadas no cíllio de neurônios olfatórios maduros (Kerr et al., 2008), sugerindo que o papel de RIC-8B nessas células pode estar relacionado a cílios (Kerr et al., 2008; Li et al., 2013). Portanto, nos perguntamos se os cílios de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ estavam intactos.

Essa análise foi realizada em culturas de MEF (*mouse embryonic fibroblast*), um sistema amplamente utilizado no estudo de cílios primários. A ciliogênese de vários tipos celulares em cultura é comumente induzida com meio carenciado de soro (Wheatley et al., 1996). A privação de soro leva MEFs a formar cílio primário em uma frequência de 70-90%, atingindo ciliação máxima geralmente após 24-48h (Marshall, 2013). O cílio primário pode ser detectado com um anticorpo contra α-tubulina acetilada, que se encontra bastante enriquecida nessa organela (Pedersen et al, 2012). Como mostra a Figura 19, cílios primários são formados tanto em MEFs selvagens quanto *Ric-8B*$^{-/-}$.

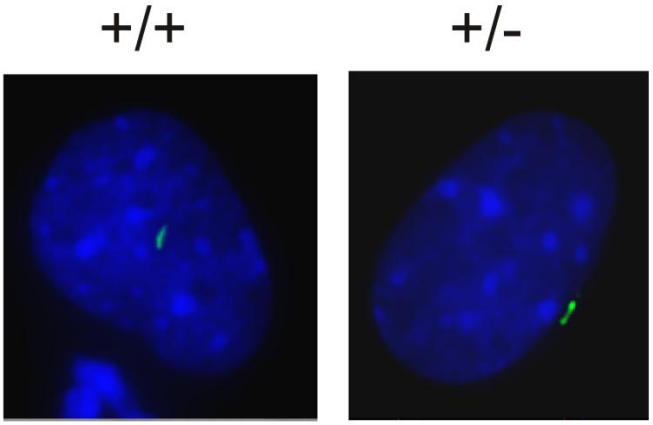

Figura 19. Imunofluorescência em MEFs selvagens (+/+) e *Ric-8B*$^{-/-}$ (-/-) utilizando anticorpo para α-tubulina acetilada como marcador de cílio primário. A presença dessa organela (em verde) nos dois tipos celulares é um indicativo de que o homozigoto mutante não tem defeitos na ciliogênese. Em azul estão representados os núcleos celulares, corados com DAPI.

Apesar de MEFs *Ric-8B*$^{-/-}$ formarem cílios primários, não podemos excluir a possibilidade de que embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ tenham defeitos ciliares em outros tipos celulares. Além disto, é possível que a expressão de *Ric-8B* nas MEFs *Ric-8B*$^{-/-}$ seja reduzida mas não nula, assim como nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ (Figura 20). Realizamos também uma imunofluorescência com anticorpo para α-tubulina acetilada em cortes de embriões E9,5. Como podemos observar na Figura 21, é possível observar cílios em células de tecidos mesenquimais e, embora não seja possível distinguir os cílios primários do tubo neural, a marcação se acumula na região apical dessa estrutura de maneira semelhante tanto no embrião selvagem quanto no *Ric-8B*$^{-/-}$. Esse é um indicativo de que os cílios primários responsáveis pela sinalização de *Shh* no tubo neural estão intactos.

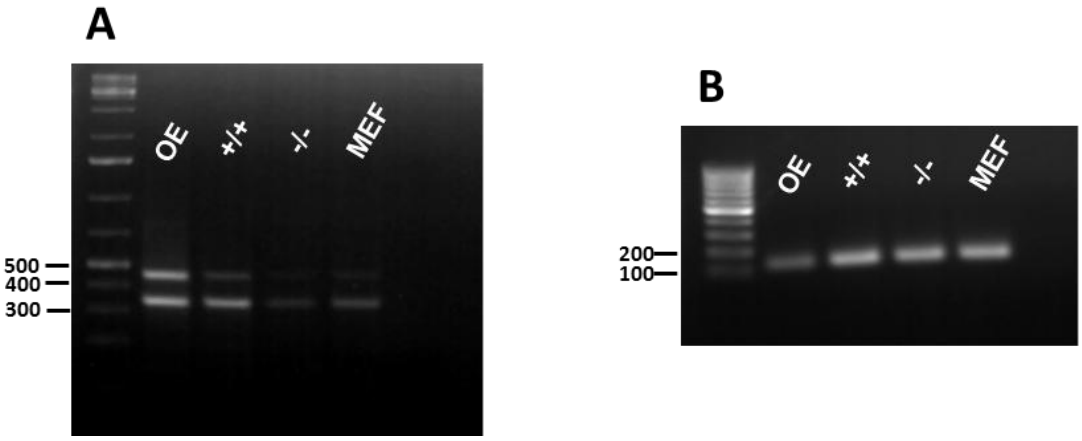

Figura 20. RT-PCR da expressão de *Ric-8B* em epitélio olfatório adulto (OE), embrião E10,5 selvagem (+/+), embrião E10,5 homozigoto mutante (-/-) e MEF selvagem (MEF). A) Após 28 ciclos de PCR, é possível observar que a expressão de *Ric-8B* é abundante em OE e em embriões selvagens no estágio E10,5. A expressão em células MEF é fraca, no entanto, um pouco mais forte que os níveis residuais do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$. O par de *primers* utilizado nessa reação amplifica trechos de *Ric-8B full-lenght* (462 pb) e da isoforma que não inclui o éxon 9 (342 op). B) *β-actina* foi usada como controle endógeno.

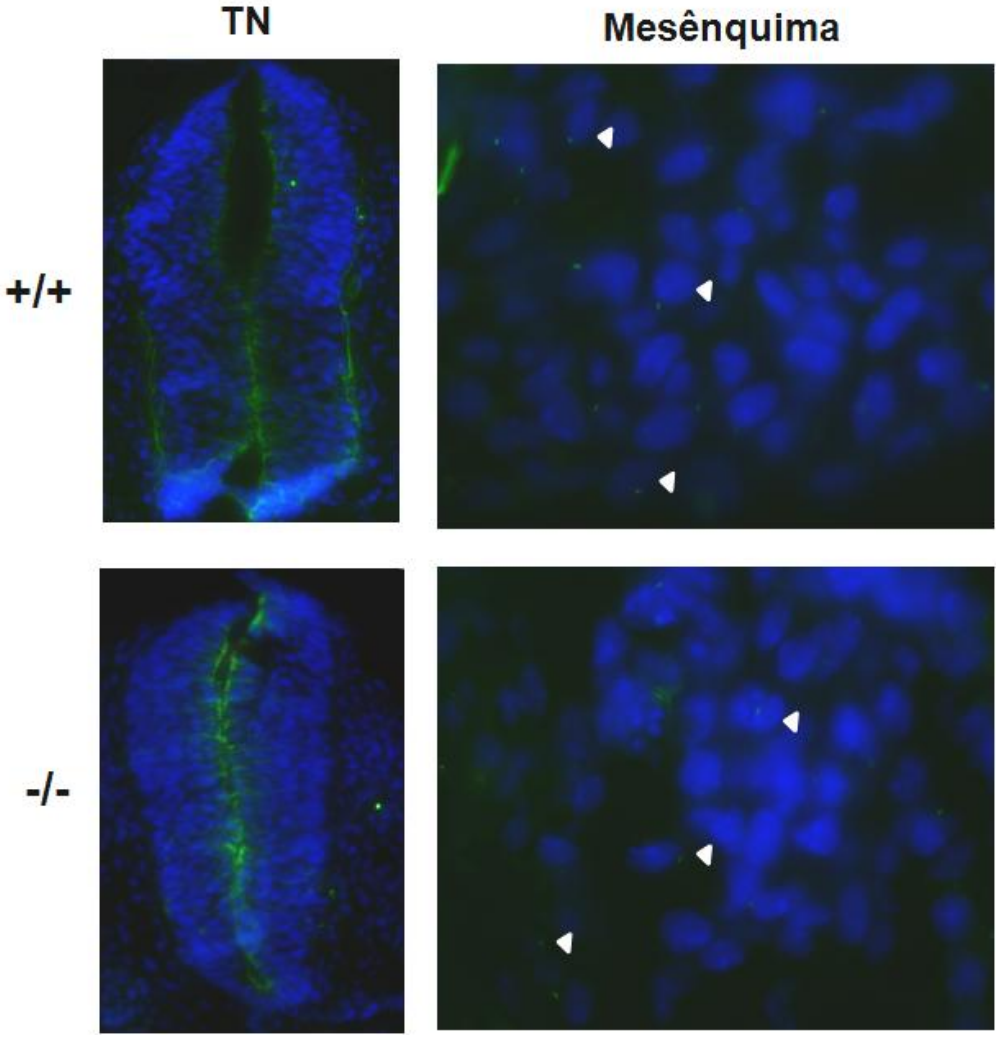

Figura 21. Imunofluorescência em cortes de embrião selvagem (+/+) e homozigoto mutante (-/-) utilizando anticorpo para α-tubulina acetilada como marcador de cílio primário. Nos dois embriões, é possível observar marcação na região apical do tubo neural (TN) e distinguir cílios primários de células do mesênquima que circunda o tubo neural, indicando que não apenas MEFs são capazes de formar cílios primários em embriões *Ric-8B*$^{-/-}$.

4.7 A expressão de *Sonic Hedgehog* não está alterada no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.

Apesar de células *Ric-8B*$^{-/-}$ formarem cílios primários, não podemos excluir a possibilidade de que a função ciliar esteja comprometida. Mutantes de *Kif7 (kinesin-like)*, por exemplo, apresentam defeitos na sinalização de SHH, embora possuam cílios normais (Liem et al, 2009 (Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009).

A Figura 22 ilustra, de maneira simplificada, a sinalização de SHH. Ela é composta primariamente pelo ligante SHH, o receptor com 12 domínios transmembrana Patched1

(PTCH1), a proteína com 7 domínios transmembrana Smoothened (SMO) e a família de fatores de transcrição GLI. Na ausência de SHH, PTCH1 se localiza na membrana ciliar e inibe a acumulação de SMO no cílio. Nessas circunstâncias, os fatores GLI são proteoliticamente processados na forma repressora (GLI_R), responsável pela inibição da transcrição dos genes-alvo da sinalização de SHH. Quando SHH está presente, liga-se a PTCH1 e promove seu deslocamento para fora do cílio primário, permitindo a acumulação ciliar de SMO. SMO desencadeia uma cascata de sinalização que produz Gli *full-lenght* na forma ativa (GLI_A), responsável por promover a expressão dos genes-alvo de *Shh* (Jiang and Hui, 2008; Kiefer, 2010; Simpson et al., 2009).

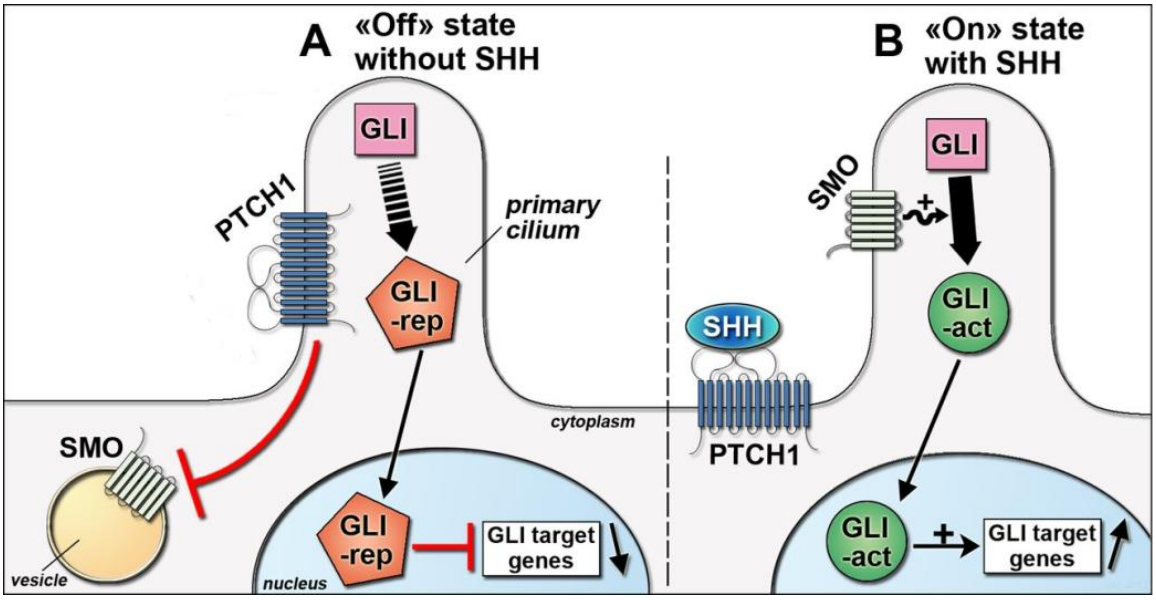

Figura 22. Esquema simplificado da via de sinalização de SHH (modificado de Mailleux et al, 2013). A) Quando não há ligante SHH, PTCH1 se encontra na membrana ciliar inibindo a ativação de SMO. Os fatores GLI são clivados à forma repressora, que é transportada para o núcleo para inibir a expressão dos genes alvo. B) Quando SHH se liga a PTCH1, ocorre translocação de PTCH1 para fora do cílio primário, permitindo acumulação ciliar de SMO. SMO promove a ativação de fatores GLI, que são transportados para o núcleo para ativar os genes alvo.

Alterações na via de SHH foram verificadas através de hibridização *in situ.* Sintetizamos sondas para *Shh* e dois de seus alvos diretos, *Ptch1* e *FoxA2* (Mullor et al., 2001; Sasaki et al., 1997; Yoon et al., 2002), que foram hibridizadas em cortes de embriões selvagens e *Ric-8B*$^{-/-}$

no estágio E9,5. Como mostrado na Figura 23, os domínios de expressão de *Shh*, *Ptch1* e *FoxA2* são bastante semelhantes em embriões selvagens e *Ric-8B*$^{-/-}$. Muitos mutantes de componentes essenciais da via de SHH apresentam evidente expansão ou redução das regiões em que esses genes são expressos (Goodrich et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 2013; Qin et al., 2011), portanto, temos o primeiro indício de que via de SHH está inalterada no homozigoto mutante.

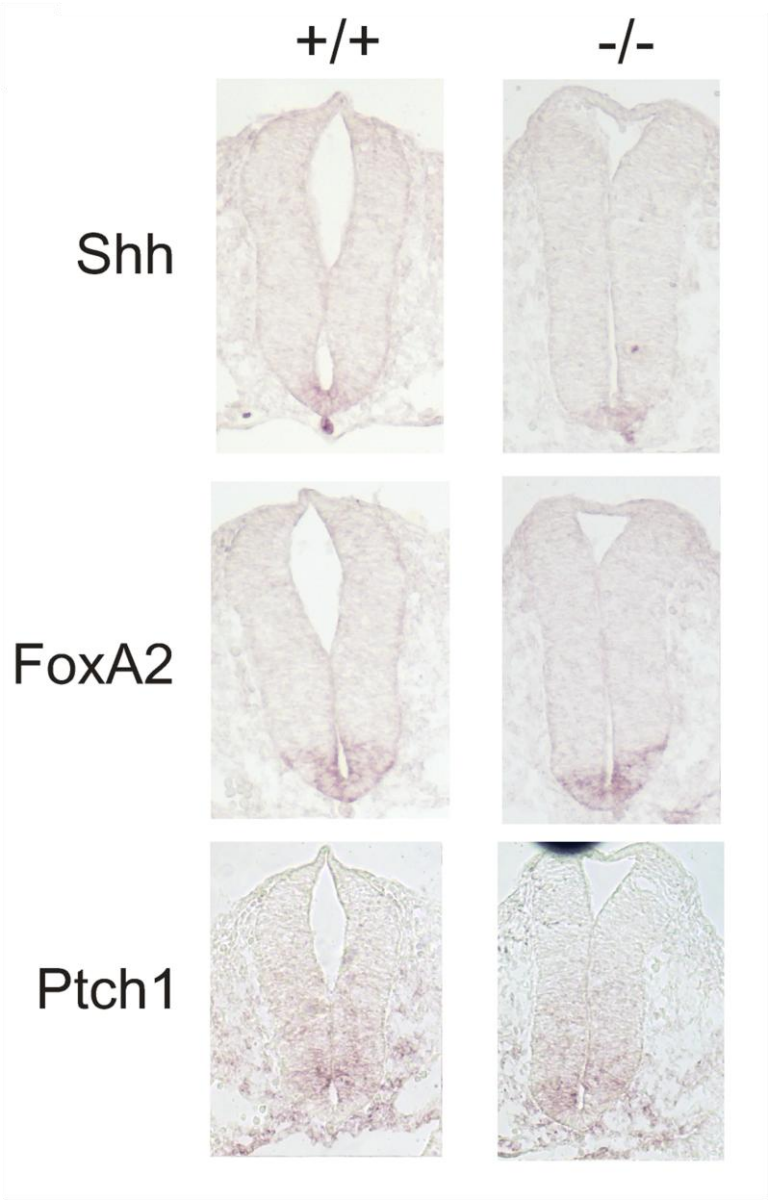

Figura 23. Hibridização *in situ* em cortes de embrião E9,5 usando sondas antisenso para *Shh* e dois de seus alvos a *downstream*, *FoxA2* e *Ptch1*. As regiões onde estes genes estão expressos é bastante semelhante em embrião selvagem (+/+) e homozigoto mutante (-/-) indicando que não há alteração nessa via no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.

GLI3 pode atuar como ativador ou repressor dos genes-alvo da via de SHH. Na ausência do ligante SHH, GLI3 clivada é o principal responsável pela atividade repressora (Litingtung and Chiang, 2000). Dessa forma, um segundo teste realizado para verificar o funcionamento da via de SHH no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ foi a comparação entre as quantidades de GLI3 *full-lenght* e GLI3 clivada presentes em extratos de embriões E9,5. A Figura 24, um dado de Western blot, mostra que não encontramos diferenças no processamento de GLI3 entre embriões selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes.

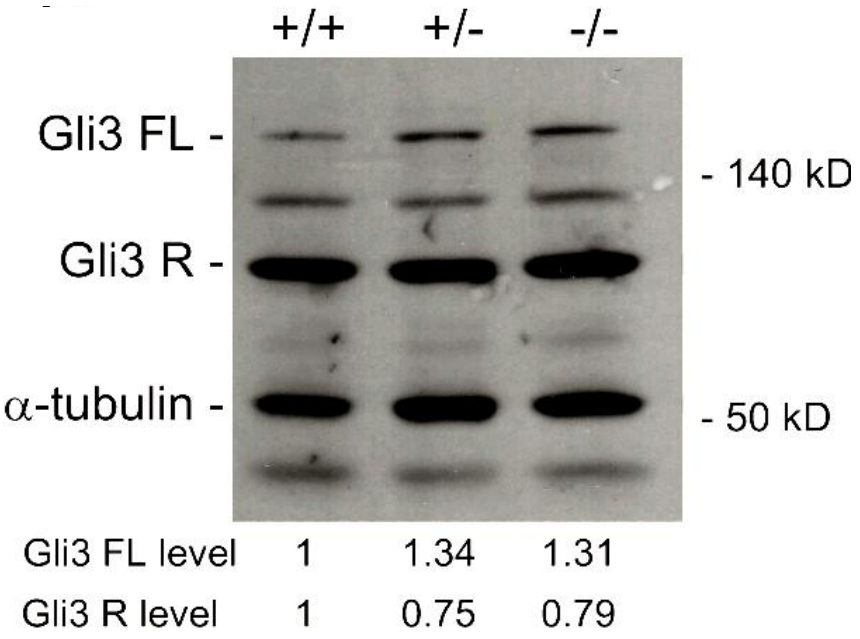

Figura 24. Western Blot para detectar as formas *full-lenght* (ativa) e clivada (repressora) de GLI3 em embriões selvagens (+/+), heterozigotos (+/-) e homozigotos mutantes (-/-) no estágio E9,5. O processamento de fatores GLI é dependente da sinalização de SHH. Mutantes da via de SHH geralmente apresentam diferenças evidentes nas quantidades de GLI3 *full-lenght* e clivada. A densitometria das bandas mostra valores bastante semelhantes para embriões dos três genótipos, sugerindo que não a via de transdução de SHH está intacta no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$. Gli3 FL: GLI3 *full-lenght,* Gli3 R: GLI3 clivada (repressora).

Mudanças no padrão dorso-ventral do tubo neural produzidas pelo desequilíbrio das concentrações de morfógenos são também prontamente detectadas na maioria dos mutantes da via de SHH. Mesmo no caso de inativação de *Kif7*, que não interfere na formação do cílio primário e não tem alterações evidentes na expressão de *FoxA2*, é possível observar uma redução no domínio dos progenitores dorsais (Goetz and Anderson, 2010). Realizamos uma

imunofluorescência com o marcador de tubo neural dorsolateral Pax6 (Ribes and Briscoe, 2009) em cortes de embriões selvagens e homozigotos mutantes no estágio E9,5 (Figura 25) e, no entanto, obtivemos mais uma evidência de que a sinalização de SHH está inalterada no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.

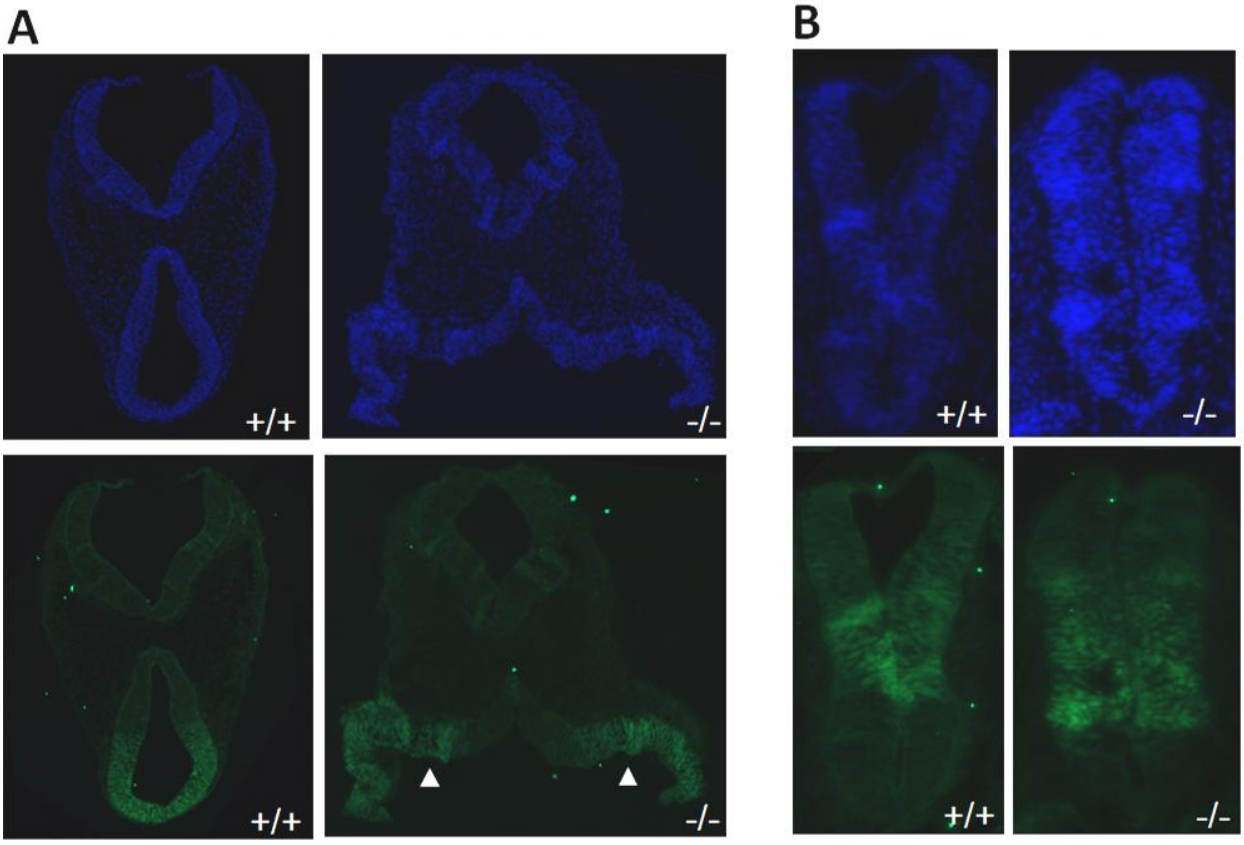

Figura 25. Imunofluorescência de Pax6 em cortes de embrião selvagem (+/+) e homozigoto mutante (-/-) no estágio E9,5. Pax6 é um marcador do domínio dorsolateral do tubo neural embrionário que frequentemente tem seu padrão alterado em mutantes da via de SHH. A) Cortes transversais na região da cabeça mostram que, apesar do tubo neural do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ estar aberto rostralmente (pontas de seta), o domínio de Pax6 é determinado em uma extensão do tubo neural que se assemelha à do embrião selvagem. B) O mesmo é verificado em cortes do tubo neural na região truncal desses embriões.

Alguns trabalhos mostram que a sinalização de SHH também está envolvida na determinação da assimetria direita-esquerda (LR) do plano corporal embrionário (Levin et al., 1995; Schneider and Brueckner, 2000; Zhang et al., 2001). O coração primitivo é um órgão tubular, que se transforma em um órgão com quatro câmaras durante um processo conhecido como *looping* cardíaco. No início do *looping*, a região ventricular primitiva se dobra e rotacional para a direita, dando origem a um coração em formato de C (Brand, 2003;

Moorman and Christoffels, 2003). O estabelecimento da assimetria LR é importante para orientar a morfogênese cardíaca, de modo que todos os embriões de camundongo selvagens têm corações com *loop* para a direita em E9,5 (Moorman and Christoffels, 2003; Brand, 2003). Embriões *Shh*$^{-/-}$têm uma incidência de 10% de *looping* cardíaco reverso e um adicional de 30% com posicionamento anormal do *loop* cardíaco (Cooper et al., 2005). Observamos o coração de cerca de 10 embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ no estágio E9,5 e todos apresentavam *loop* cardíaco normal, voltado para a direita (Figura 26). Apesar desse número de observações ser muito pequeno para ser conclusivo, notamos algumas diferenças no batimento cardíaco de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ em E9,5 e E10,5, cuja investigação pode ser importante para melhor caracterizar o fenótipo do embrião homozigoto mutante.

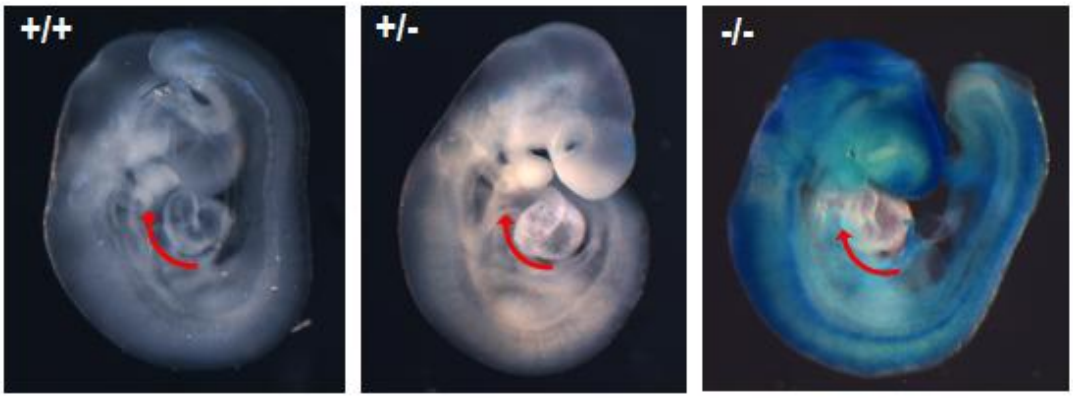

Figura 26. O *loop* cardíaco em embriões da linhagem RRH188 não parece ser afetado pelos níveis reduzidos de RIC-8B. Embriões selvagens (+/+) têm o dobramento do coração tubular sempre orientado para a direita (seta vermelha), que reflete um estabelecimento normal da assimetria direita-esquerda. Embriões heterozigotos (+/-) e homozigotos mutantes (-/-) parecem dobrar seus corações da mesma maneira.

4.8 Busca da proteína G que interage com RIC-8B no desenvolvimento embrionário

As proteínas G exercem funções fundamentais durante o desenvolvimento, sendo que sua ausência causa distúrbios na vasculogênese, organogênese e formação de diversos anexos embrionários (Offermanns, 2001). O papel essencial de RIC-8B durante a embriogênese suscita a questão de qual subunidade Gα é seu alvo fisiológico no embrião. A coexpressão específica de RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ em algumas regiões no camundongo adulto sugerem que essa

subunidade Gα é seu principal parceiro *in vivo* (Von Dannecker et al., 2005). Através de hibridização *in situ* em cortes de embriões E10,5 selvagens, observamos que Gαolf não é coexpressa com *Ric-8B* no assoalho da placa, enquanto $G\alpha_s$, que também interage com RIC-8B *in vitro*, é expressa de maneira ubíqua (Figura 27A). Através de PCR quantitativo, confirmamos que $G\alpha_{olf}$ não tem níveis de expressão detectáveis nesse período (dados não mostrados).

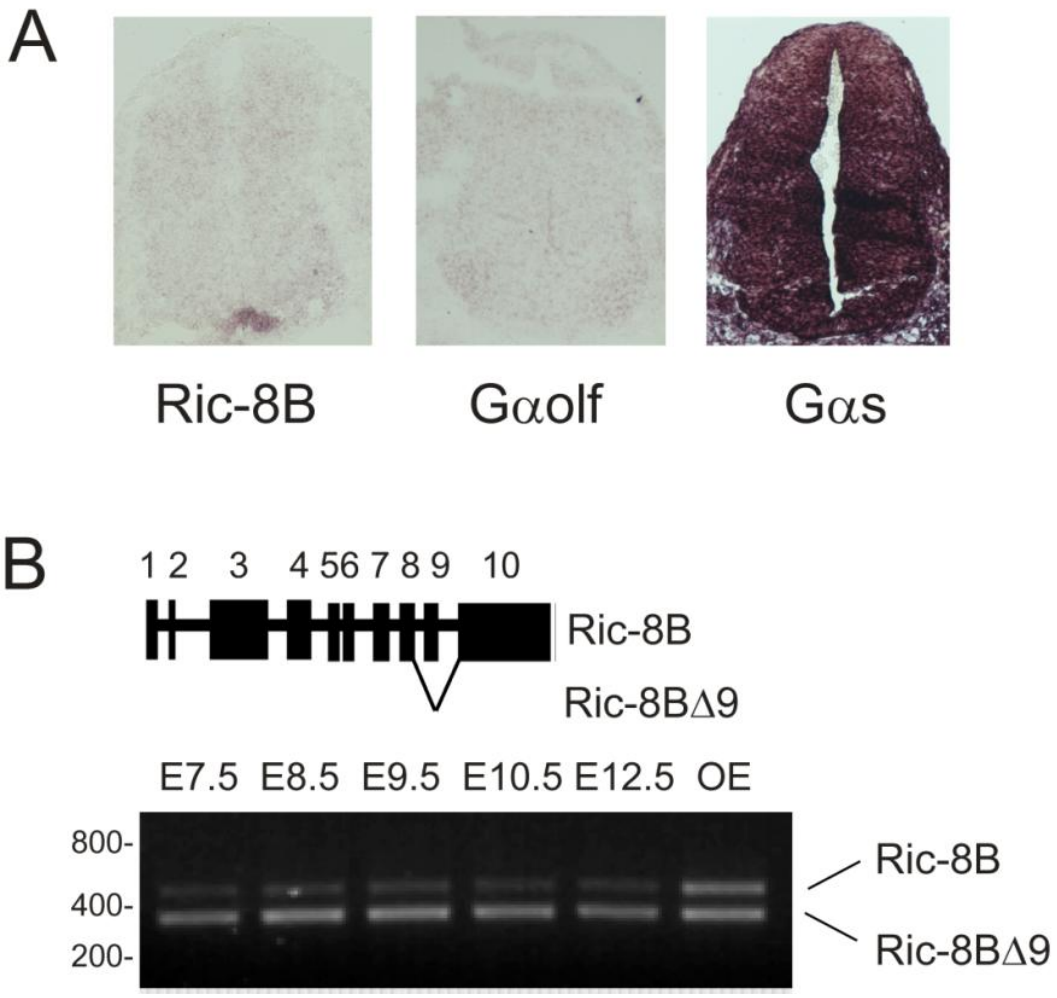

Figura 27. Expressão de Gαolf e Gαs no tubo neural. A) Cortes do tubo neural de embriões selvagens E10,5 foram hibridizados com sondas para *Ric-8B,* $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$. O tubo neural da região truncal é mostrado, com a expressão de *Ric-8B* restrita ao assoalho da placa e a expessão ubíqua de $G\alpha_s$. $G\alpha_{olf}$ não foi detectada. B) RT-PCR para amplificar *Ric-8B full-lenght* (462 pb) e a isoforma Ric-8BΔ9 (342 pb) em amostras de cDNA preparado a partir de RNA de embriões selvagens em diferentes estágios do desenvolvimento.

Em epitélio olfatório de camundongos adultos, tanto *Ric-8B full-lenght* quanto a isoforma *Ric-8BΔ9* estão presentes em quantidades equivalentes (Figura 27B e Von Dannecker et al, 2005). Interessantemente, nós observamos que *Ric-8BΔ9* é a isoforma predominantemente expressa em embriões no período de E7,5 a E12,5 (Figura 27B). Essa isoforma é produzida por *splicing* alternativo e não inclui o exon 9, que é importante para a interação com proteínas Gα e a atividade de GEF de RIC-8B (Von Dannecker, 2005; Chan et al, 2011). Dessa forma, nossos dados levantam a possibilidade de que o papel de RIC-8B durante a embriogênese pode não estar relacionado a uma proteína Gα.

4.9 Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentam apoptose aumentada.

4.9.1. Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentam apoptose em células da crista neural migratória.

O desenvolvimento do cérebro embrionário depende do completo fechamento do tubo neural cranial. Nesse processo (Figura 28), a placa neural é morfologicamente remodelada pela formação sequencial de pontos de dobradiça na região medial (MHP, *medial hinge point*) e na região dorsolateral (DLHP, *dorsolateral hinge point*). A formação do MHP divide a placa neural em duas regiões simétricas que são elevadas por movimentos celulares da neuroectoderme e expansão do mesênquima cranial adjacente, produzindo pregas neurais convexas. Subsequentemente, a formação de DHLPs aproxima as pontas das pregas neurais na linha média dorsal e permite que ocorra a fusão do epitélio para criar o tubo neural. O remodelamento dos tecidos na linha medial dorsal cria duas camadas distintas: externamente, a ectoderme não-neural (futura epiderme) e, internamente, o neuroepitélio (futuro sistema nervoso) (Copp, 2005; Copp et al., 1990; Yamaguchi and Miura, 2013).

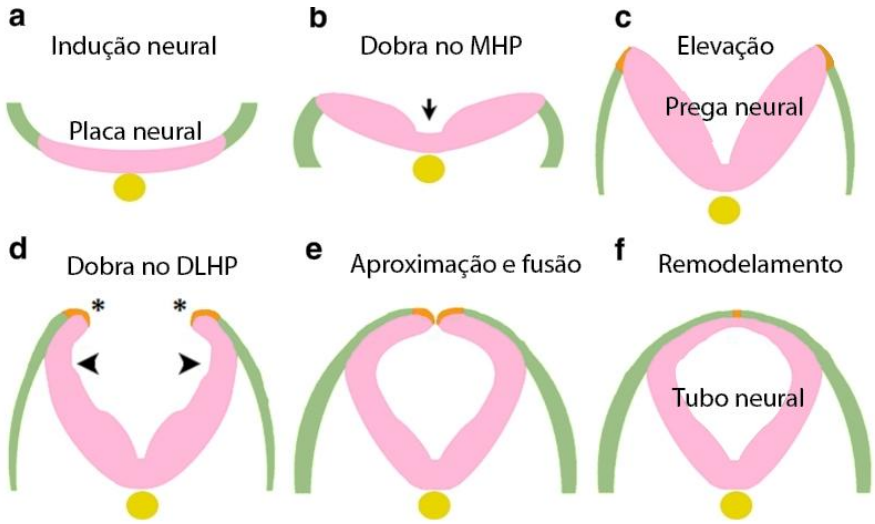

Figura 28. Modificações morfológicas da placa neural para formar o tubo neural. Depois da indução da placa neural na região dorsal da ectoderme (A), a placa neural se dobra no MHP (b) e é elevada para formar as pregas neurais levemente convexas (c). Posteriormente, as extremidades da placa neural (*) são revertidas através de dobras nos DLHPs, criando pregas neurais côncavas (d). Esse movimento resulta na aproximação e fusão das extremidades (e). O remodelamento da região de fusão separa a neuroectoderme da ectoderme de superfície (não-neural) (f). Neuroectoderme (placa neural, tubo neural): rosa. Ectoderme não-neural (ectoderme de superfície): verde. Região de limite entre ectoderme não-neural: laranja. Notocorda: amarelo (extraído de Yamaguchi and Miura, 2013).

O estudo de NTDs em modelos animais sugere que o fechamento das pregas neurais cefálicas é mecanisticamente diferente do fechamento no tubo neural espinhal (Copp et al., 2003). Diversos mutantes e animais *knockout* com exencefalia sugerem a perturbação da neurulação cranial é causada por fatores bastante heterogêneos, tais como: 1) função anormal do citoesqueleto de actina, 2) falhas na migração da crista neural, 3) apoptose neuroepitelial aumentada e 4) desequilíbrio entre proliferação e diferenciação celular no tubo neural (revisado em Copp, 2005).

Alguns desses fatores foram analisados nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$. A contração de microfilamentos subapicais de actina-miosina em células neuroepiteliais é o mecanismo intrínseco mais estudado no fechamento do tubo neural (Morriss-Kay and Tuckett, 1985; Sadler et al., 1982). Nos estágios finais da neurulação cranial, quando as pregas neurais côncavas são formadas, filamentos de actina (F-actina) se acumulam no córtex apical de todas

as células do neuroepitélio. Drogas que desestabilizam os microfilamentos de actina (como citocalasinas), assim como mutações em genes necessários para manter a função normal do citoesqueleto, causam distúrbios no fechamento do tubo neural cranial (Brouns et al., 2000; Hildebrand and Soriano, 1999; Morriss-Kay and Tuckett, 1985; Xu et al., 1998). Através da coloração com faloidina conjugada a fluoróforo, observamos a disposição desses microfilamentos em cortes do tubo neural cranial de embriões selvagens e *Ric-8B*$^{-/-}$. Como mostrado na Figura 29, em ambos os casos, observamos o acúmulo de actina na região apical das células neuroepiteliais, sugerindo que a ausência de RIC-8B não altera a função do citoesqueleto de actina.

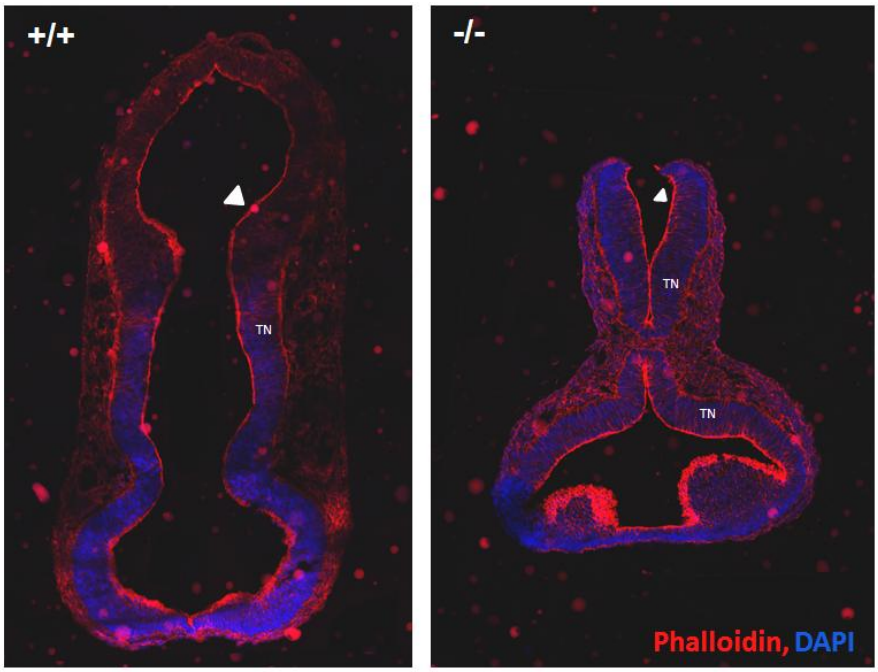

Figura 29. Acúmulo de F-actina na região apical de células do neuroepitélio. Utilizamos faloidina (Phalloidin) conjugada a rodamina para marcar cortes da cabeça de embriões selvagens (+/+) e homozigotos mutantes (-/-). Ambos possuem acúmulo de actina no ápice do tubo neural (TN), como apontado pela ponta de seta, que é característico nos movimentos de constrição apical.

Os níveis de apoptose no neuroepitélio foram verificados através de imunofluorescência com o anticorpo para a forma ativa da caspase-3 (clivada), que marca células em estágios iniciais de apoptose. No estágio E9,5, algumas células do neuroepitélio sofrem apoptose nos

pontos de dobradiça, nas pontas das pregas neurais e nas regiões de fusão (Copp, 2005; Massa et al., 2009). No entanto, no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ também observamos um grupo de células apoptóticas concentradas no mesênquima da cabeça, mais especificamente na região adjacente ao tubo neural do rombencéfalo.

Pela localização dessas células apoptóticas, nos perguntamos se elas poderiam corresponder à crista neural migratória. As células da crista neural cranial (CNCCs, *cranial neural crest cells*) são originadas na região dorsal do prosencéfalo caudal, mesencéfalo e rombencéfalo rostral. Durante a migração, essas células seguem caminhos bem definidos em direção à região ventrolateral da cabeça, populando o mesênquima do primórdio facial, como a proeminência frontonasal e os arcos branquiais (Kontges and Lumsden, 1996; Osumi-Yamashita et al., 1994). Uma vez posicionadas, as CNCCs proliferam e se diferenciam em elementos craniofaciais (Helms and Schneider, 2003; Santagati and Rijli, 2003).

Para verificar a origem das células positivas para caspase-3 ativa, usamos um anticorpo para o marcador molecular AP-2α, que é expresso em alguns domínios de epiderme, mas também em células da crista neural migratória (Arkell and Beddington, 1997; Mitchell et al., 1991). A colocalização das marcações para AP-2α e caspase-3 clivada (Figura 30) indica que células da crista neural migratória estão sofrendo apoptose no mesênquima da cabeça de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$. Além disso, como observamos marcação de AP-2α em regiões distantes do tubo neural, temos indícios de que nos animais *Ric-8B*$^{-/-}$ ocorre indução da crista neural e ela é capaz de migrar normalmente.

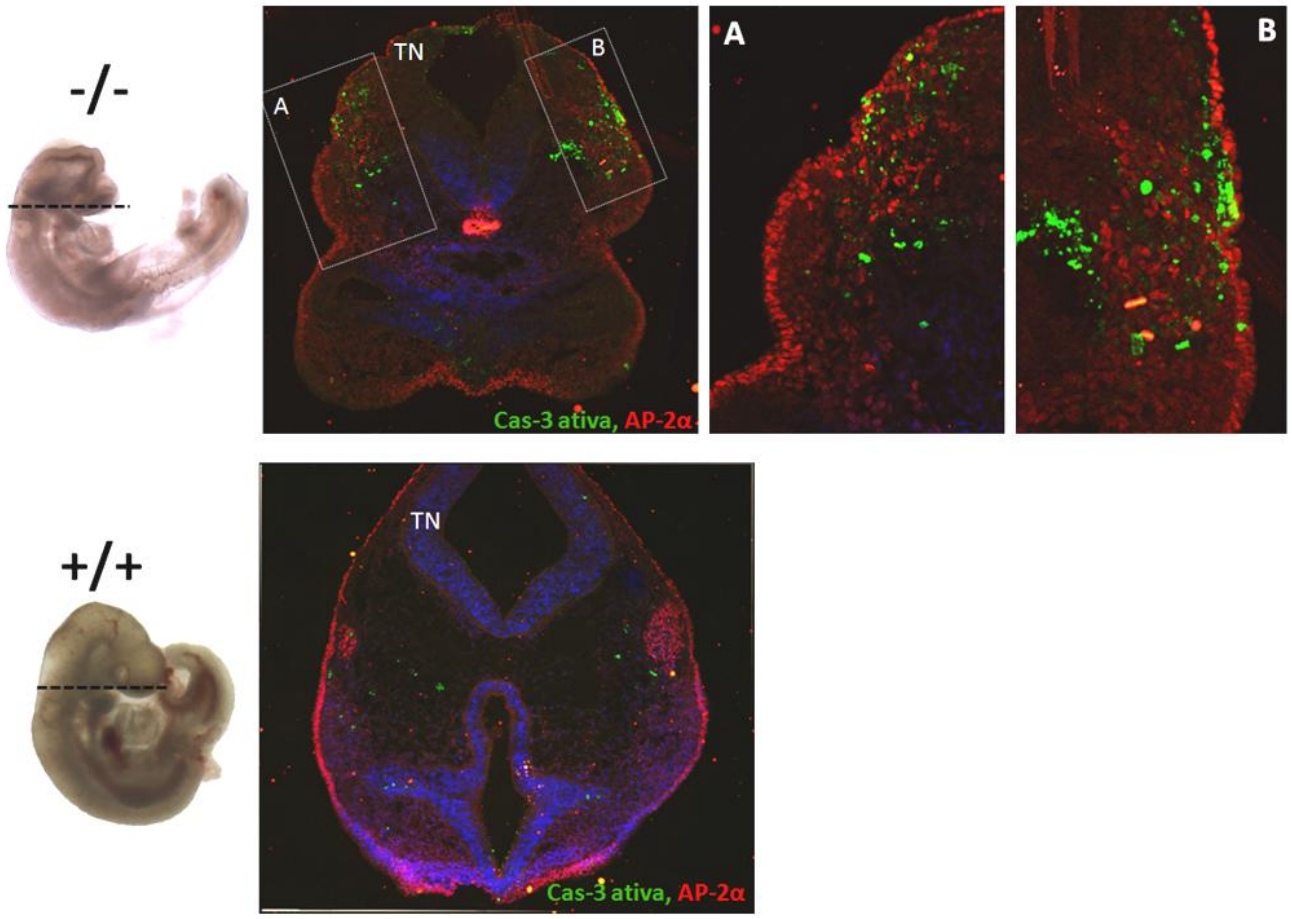

Figura 30. Dupla marcação com anticorpos para caspase-3 ativa e AP-2α em cortes da cabeça de embrião E9,5. À esquerda, a linha preta tracejada sobre o embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ (-/-) ou selvagem (+/+) indica a altura dos respectivos cortes mostrados à direita. Acima, corte do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ mostra grupos de células apoptóticas (cas-3 ativa) presentes dos dois lados do tubo neural (TN). As amplificações em A e B indicam a colocalização com marcador de crista neural migratória (AP-2α). Abaixo, corte de embrião selvagem mostrando grupo de células da crista neural migratória em região de mesênquima, porém não há marcação de células apoptóticas.

4.9.2. MEFs *Ric-8B*$^{-/-}$ sofrem mais apoptose.

Em nossos experimentos para induzir a ciliogênese em MEFs, observamos algumas diferenças em relação ao crescimento das culturas de células *Ric-8B*$^{-/-}$ e selvagem. Embora em passagem 0 (P0) seja possível obter até 5 vezes mais células de embrião selvagem e heterozigoto que de embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ (uma vez que esses são sempre menores), a diferença pode aumentar mais de 10 vezes em P1, após um ou dois dias de cultivo. Dessa maneira, MEFs *Ric-8B*$^{-/-}$ são mais difíceis de expandir, além de persistem em cultura por menor número de passagens. Portanto, realizamos um experimento de imunofluorescência com

anticorpos anti-BrdU e anti-caspase-3-ativa para verificar se essas células apresentam diferenças com relação à proliferação e à morte por apoptose, respectivamente. A quantificação das células marcadas com cada anticorpo foi feita pela contagem de, pelo menos, 10 campos diferentes de cada cultura.

Como mostra a Figura 31, foram observadas mais células marcadas para caspase-3-ativa na cultura de MEFs *Ric-8B*$^{-/-}$ que na cultura de MEFs *Ric-8B*$^{+/+}$, enquanto a incorporação de BrdU foi semelhante entre os dois tipos de células.

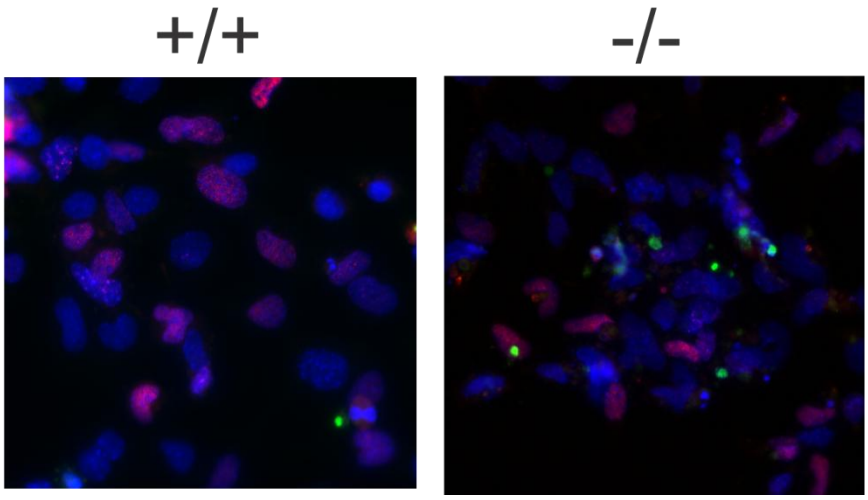

Figura 31. Apoptose e proliferação celular em fibroblastos embrionários. MEFs extraídas de embriões selvagens (+/+) e *Ric-8B*$^{-/-}$ (-/-) no estágio E9,5 foram marcadas para caspase-3 ativa (em verde) e incorporação de de BrdU (em vermelho).

4.10 A localização subcelular de Ric-8B

Como mencionado anteriormente, adquirimos dois anticorpos que reconhecem regiões distintas da proteína RIC-8B. Com a finalidade de verificar a localização subcelular de RIC-8B, realizamos experimentos de imunofluorescência em MEF selvagem com ambos os anticorpos. Encontramos uma marcação citoplasmática que é mais intensa ao redor do núcleo e tem um aspecto pontuado heterogêneo em tamanho, que se assemelha ao padrão de marcação vesicular (Figura 32). Futuros estudos poderão melhor caracterizar a localização de Ric-8B e correlacioná-la com sua função celular.

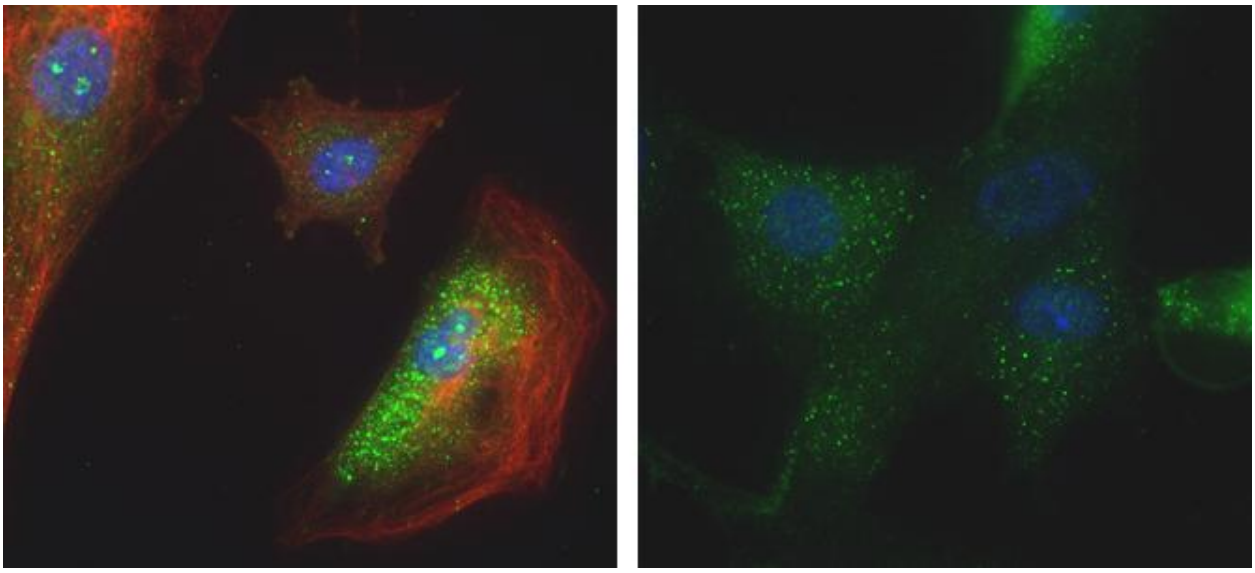

Figura 32. A localização subcelular de RIC-8B. Imunofluorescência em fibroblastos embrionários com anticorpos diferentes para Ric-8B produzem uma marcação semelhante, de localização predominantemente citoplasmática e com aspecto vesicular (em verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). À esquerda, utilizamos anticorpo anti-RIC-8B para um peptídeo do exon 5 e também marcamos α-tubulina (em vermelho); à direita, utilizamos apenas anticorpo para a região N-terminal de RIC-8B.

5 DISCUSSÃO

5.1 Proteínas RIC-8 e a letalidade no período embrionário

Além de mediar a sinalização de receptores na neurotransmissão, *ric-8* também é importante para a divisão celular assimétrica em invertebrados (David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Miller and Rand, 2000; Wang et al., 2005). Esse evento é fundamental para o estabelecimento dos eixos corporais e a diferenciação celular durante a embriogênese de muitos organismos. A importância de *ric-8* na divisão assimétrica reside em seu papel no posicionamento do fuso mitótico, migração nuclear e outros eventos mediados pelo centrossomo durante estágios iniciais do desenvolvimento de *C. elegans* (Afshar et al., 2004; Couwenbergs et al., 2004; Miller and Rand, 2000; Wilkie and Kinch, 2005) e na formação dos neuroblastos e células precursoras de órgãos sensoriais de *Drosophila* (David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Wang et al., 2005). Associado a essa função, mutações em *ric-8* causam um fenótipo parcialmente penetrante de desorganização dos tecidos e letalidade embrionária em *C. elegans* (Afshar et al., 2004; Couwenbergs et al., 2004; Miller and Rand, 2000) e, em *Drosophila*, resultam em defeitos na gastrulação que levam à morte no estágio larval (David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Wang et al., 2005). Embora essse papel essencial de *ric-8* seja conhecido, a função dos homólogos de vertebrados ainda é pouco caracterizada.

Assim como *ric-8* de *C. elegans* (Miller et al., 2000), os homólogos de camundongo também são expressos predominantemente em tecidos neurais do animal adulto. *Ric-8B* tem um padrão de expressão restrito ao epitélio olfatório e *striatum* (Von Dannecker et al., 2005), enquanto *Ric-8A* é expressa em diversas regiões cerebrais, como neocortex, córtex cingulado, corpo estriado, hipocampo, cerebelo e glândula pineal (Tonissoo et al., 2006; Tonissoo et al., 2003). *Ric-8A* tem função conhecida na regulação da memória e do comportamento emocional do adulto (Tonissoo et al., 2006) e, em 2010, foi publicada a primeira

demonstração de que ela também é essencial para o desenvolvimento (Tonissoo et al., 2010). RIC-8 de invertebrados participa da regulação dos movimentos do centrossomo através de uma via que inclui proteínas $G\alpha_i$, GPR (ou GoLoco) e RGS (regulador de sinalização de proteína G). Em células de mamíferos, um processo similar é regulado por um complexo formado por LGN (proteína que contém o domínio GoLoco), NuMa e $G\alpha_i$-GDP. Estudos *in vitro* sugerem que RIC-8A dissocia $G\alpha_i$-GDP desse complexo sinalizador, com a formação e liberação de $G\alpha_i$-GTP (Tall and Gilman, 2005; Woodard et al., 2010).

A expressão de *Ric-8A* é detectada em diferentes regiões durante o desenvolvimento: em E7,5 está presente em todas as camadas germinativas do embrião; em E8,5, na neuroectoderme, mesênquima da cabeça, coração e somitos; no período de E9,5 a E12,5, é predominante no tubo neural, gânglios nervosos, sistema simpático, olhos e ouvidos (Tonissoo et al., 2010; Tonissoo et al., 2003). Embriões *Ric-8A*$^{-/-}$ apresentam múltiplas malformações durante a gastrulação, que levam à morte em E6,5-E8,5 (Tonissoo et al., 2010).

Em nosso estudo com animais da linhagem RRH188, descobrimos que *Ric-8B* também é essencial para o desenvolvimento, apesar de seu padrão de expressão ser muito mais restrito no animal adulto do que *Ric-8A.* Além disso, RIC-8B não interage com $G\alpha_i$ *in vitro* (Chan et al., 2011; Tall et al., 2003) e não foram reportadas outras funções essenciais de *ric-8* relacionadas às demais proteínas G durante a embriogênese. A letalidade precoce do embrião murino *Ric-8B*$^{-/-}$ também foi relatada em um trabalho recente (Gabay et al., 2011), que utilizou a técnica Velocigene para produzir um animal *KO* cujos três primeiros éxons e parte do íntron 3 de *Ric-8B* foram substituídos por um cassete de expressão *LacZ.* Os autores mencionam que embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ morrem antes de E8,5, portanto todos os experimentos foram realizados *in vitro,* com células-tronco (ESCs) originárias de blastocistos (Gabay et al, 2011). Nesse trabalho, o fenótipo do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ não foi analisado, mas os experimentos *in vitro* mostram que apenas os níveis de $G\alpha_s$, e não de outros tipos de $G\alpha$, estão reduzidos nas células-tronco *Ric-8B*$^{-/-}$ (Gabay et al, 2011). A linhagem RRH188 utilizada no nosso

estudo foi produzida por *Gene Trap,* e mostramos através de RT-PCR e Western blot que o homozigoto mutante expressa níveis reduzidos de *Ric-8B.* Portanto, a atividade residual de RIC-8B na linhagem RRH188 pode ser o motivo de encontrarmos um período de letalidade mais tardio, por volta de E10,5.

Utilizando o repórter *β-geo,* mostramos que *Ric-8B* é expressa na notocorda e pregas neurais cefálicas em E8,5; posteriormente, de E9,5 a E12,5, é detectada essencialmente na região ventral do tubo neural. O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ tem tamanho reduzido e exibe defeitos visíveis na neurulação da região cranial. Não analisamos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ no estágio de gastrulação, apesar de esse ser um momento particularmente interessante. Durante a gastrulação, muitas decisões são tomadas para formar o plano de organização corporal, com o estabelecimento das camadas germinativas e a especificação da polaridade axial. Alguns indícios como a expressão de *FoxA2* no assoalho da placa e o correto posicionamento do *loop* cardíaco indicam que a polaridade do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ em alguns eixos foi estabelecida.

5.2 RIC-8B e proteínas G durante o desenvolvimento.

Além das evidências que sugerem um papel na regulação de $G\alpha_{olf}$, ensaios bioquímicos mostram que, *in vitro,* RIC-8B interage primordialmente com $G\alpha_s$ e, em níveis bastante reduzidos, com $G\alpha_q$ e $G\alpha_{13}$ (Tall et al., 2003). $G\alpha_{olf}$ e $G\alpha_s$ possuem 88% de identidade na sua composição de aminoácidos (Jones and Reed, 1989) e ambas podem ser reguladas pela atividade de GEF de RIC-8B *in vitro* (Chan et al., 2011*)*. No entanto, $G\alpha_s$ é expressa ubiquamente nos tecidos embrionários e $G\alpha_{olf}$ não é expressa até o momento da morte do embrião. Esses dados são um indicativo de que a função de RIC-8B durante o desenvolvimento difere daquela desempenhada em neurônios olfatórios. Portanto, as proteínas G que interagem com RIC-8B durante o desenvolvimento ainda precisam ser determinadas. Em células-tronco embrionárias *Ric-8B*$^{-/-}$, foi observado que apenas os níveis de $G\alpha_s$ são

perturbados (Gabay et al, 2011), sugerindo que esse seja seu alvo fisiológico durante o desenvolvimento.

$G\alpha_s$ é um gene com função não redundante que participa de várias vias de sinalização e seu *knock out* é embrionário letal antes do período E10,5 (Yu et al., 1998). Os heterozigotos para a deleção de $G\alpha_s$ apresentam diferenças na forma e no peso corporal, na atividade locomotora e metabolismo (Liu et al., 2012; Yu et al., 1998). Dessa maneira, se *Ric-8B* estiver relacionado à regulação de proteínas $G\alpha_s$ durante a embriogênese, é possível que a expressão restrita de *Ric-8B* no embrião seja um fator importante para determinar uma função específica da subunidade $G\alpha_s$ apenas nessas regiões.

Interessantemente, observamos que a isoforma de *Ric-8B* predominantemente expressa no embrião corresponde à versão do transcrito que não possui o exon 9, denominada *Ric-8BΔ9*. A região de 40 aminoácidos codificada pelo éxon 9 parece ser responsável pela interação com subunidades Gα, pois RIC-8BΔ9 não interage com $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker et al, 2005; Chan et al, 2011) e, de maneira condizente, não mostra efeito significativo na produção de cAMP via ativação de $G\alpha_{olf}$ em sistema heterólogo. Por outro lado, RIC-8BΔ9 parece ter uma baixa e exclusiva afinidade por $G\alpha_s$, sem exercer uma atividade eficiente de GEF no entanto (Chan et al., 2011). Esses dados sugerem que RIC-8B pode ter alguma outra função não relacionada a proteínas Gα durante o desenvolvimento. De maneira condizente, um estudo de mutagênese em *zebrafish* mostrou que o *knock out* do gene *symbl* (homólogo a *Ric-8B* de mamíferos) produz um fenótipo característico de edema e agregação dos melanossomos, além de causar morte precoce durante o desenvolvimento (Nagayoshi et al., 2008). O tratamento com forskolina, um ativador da adenilil ciclase, foi capaz de reverter o fenótipo de pigmentação, indicando que *symbl* está envolvido na ativação de uma via de sinalização mediada por G_s. A letalidade, no entanto, não foi revertida (Nagayoshi et al., 2008). Como discutido pelos autores desse trabalho, a concentração de forskolina pode não ter sido suficiente ou a ativação

de outras proteínas G seria necessária para uma completa reversão do fenótipo. Alternativamente, esses resultados podem ser mais um indicativo de que RIC-8B tem funções não relacionadas a proteínas G durante o desenvolvimento.

5.3 O padrão de expressão de *Ric-8B* é semelhante ao de *Sonic Hedgehog* no tubo neural

A especificação de subtipos neuronais distintos no tubo neural de vertebrados é um dos exemplos mais bem estudados de formação de padrões embrionários. Essa padronização depende da atividade de várias moléculas sinalizadoras secretadas por células das regiões dorsal e ventral do tubo neural, que atuam de maneira concentração-dependente para regular a diferenciação dos progenitores neurais (Dessaud et al., 2008; Wilson and Maden, 2005). A indução de tipos neuronais mais dorsais requer a atividade de proteínas BMP (*bone morphogenetic proteins*) e membros da família Wnt que são produzidos na ectoderme circundante e no teto da placa do tubo neural (Liu and Niswander, 2005; Wilson and Maden, 2005). Em regiões ventrais, a molécula Sonic Hedgehog (SHH) atua como um morfógeno de longo-alcance que delimita os domínios espaciais distintos de progenitores (Ulloa and Marti, 2010). Os fatores GLI são efetores da via de SHH, cuja expressão combinatorial forma uma rede de sinalização que regula diversos genes envolvidos na determinação dos domínios ventrais de progenitores (Dessaud et al., 2008).

Shh é inicialmente expresso pela notocorda e, subsequentemente, pelas células do assoalho da placa (Marti et al., 1995a; Marti et al., 1995b; Roelink et al., 1995). Nossas análises do padrão de expressão de *Ric-8B* durante o período de E8,5 a E12,5 apontam para um padrão bastante semelhante ao de *Shh*.

5.4 A sinalização de Shh está intacta nos embriões *Ric-8B*$^{-/-}$

Além do papel na formação do eixo dorsventral (DV), há evidências de que a sinalização de *Shh* também influencia o remodelamento do neuroepitélio durante a neurulação. *Shh* atua como um inibidor dos pontos de dobradiça lateral (DLHPs), que são importantes para o completo fechamento do tubo neural nas porções espinhais mais superiores (Ybot-Gonzalez et al., 2002). Embora não tenha sido examinado em detalhes, provavelmente um mecanismo semelhante atua na região cranial, onde os pontos de dobradiça lateral são proeminentes. É interessante notar que, assim como o embrião *Ric-8B*$^{-/-}$, inúmeros mutantes que apresentam superativação da via de SHH também exibem tubos neurais abertos na região cranial (Cooper et al., 2005; Goodrich et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 2013; Murdoch and Copp, 2010). Em adição à exencefalia, esses mutantes apresentam expansão nos domínios ventrais da medula espinhal e redução dos marcadores dorsais (Caspary et al., 2007; Goodrich et al., 1997).

Em contraste, a perda da sinalização de SHH não resulta em defeitos de fechamento do tubo neural, mas sim em outros tipos de malformações como holoprosencefalia e ciclopia. Nesses defeitos, uma falha no desenvolvimento da linha média faz com que o prosencéfalo forme uma única estrutura, ao invés de dois hemisférios pareados (holoprosencefalia), e os campos oculares se situem anormalmente próximos ou fundidos (ciclopia) (Murdoch and Copp, 2010). Além disso, há um efeito dramático no padrão DV do tubo neural, com redução dos marcadores ventrais e dorsalização do tubo neural.

Apesar da semelhança no padrão de expressão de *Ric-8B* e *Shh*, além do fenótipo do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ ser sugestivo de um aumento na sinalização de *Shh*, temos indícios de que a sinalização de SHH está intacta em embriões *Ric-8B*$^{-/-}$: a expressão de dois genes regulados pela via de SHH, o domínio dorsolateral do tubo neural e a proteólise de GLI3 são semelhantes entre embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ e embriões selvagens. Uma possibilidade interessante é

que *Ric-8B* atue a *downstream* de SHH e dos fatores GLI, ao menos na região do assoalho da placa. Embora a importância de SHH e fatores GLI para a padronização DV do tubo neural esteja bem estabelecida, os alvos diretamente regulados por GLI são pouco conhecidos. Através de bioinformática e ensaios *in vitro*, sítios de ligação para proteínas GLI foram verificados em alguns genes que participam da determinação dos domínios ventrais no tubo neural, tais como *Nkx2.2* e *FoxA2* (Lei et al., 2006; Sasaki et al., 1997; Vokes et al., 2007). O sítio de início da transcrição de *Ric-8B* em neurônios olfatórios foi determinado (Von Dannecker et al, 2005), porém os fatores importantes para a regulação da expressão de *Ric-8B* não são conhecidos. Baseado em análises *in silico* disponibilizadas no banco de dados conhecido como DECODE (*Decipherment of DNA Elements*), há sítios para ligação de Foxa2 no promotor de *Ric-8B*. No entanto, essa evidência ainda carece de comprovação experimental. O *knock out* de *FoxA2* não é comparável com o de *Ric-8B*, pois a ausência de Foxa2 leva à não especificação da região ventral do tubo neural, assim como o *knock out* de *Shh*. Dessa maneira, podemos inferir que *Ric-8B*, se realmente controlado por Foxa2 ou outro fator a *downstream* de *Shh*, está envolvido em outras funções que não estão relacionadas à formação do padrão DV no tubo neural.

5.5 *Ric-8B* e o fenótipo de exencefalia

A região cranial é mais ampla e mais suscetível a falhas no fechamento do tubo neural que a medula espinhal (Copp, 2005). NTDs craniais podem existir na forma de exencefalia/anencefalia e cranioraquisquise. A maioria dos casos de cranioraquisquise em camundongos é produto de distúrbios em uma única cascata de sinalização molecular, a via de polaridade celular planar (PCP), também conhecida como sinalização não-canônica de Wnt (Copp et al., 2003). Em contraste, a exencefalia pode resultar de uma gama de distúrbios aparentemente não relacionados e, portanto, é uma condição heterogênea em termos de

mecanismos desenvolvimentais. Muitos camundongos mutantes e *knockout* servem como modelo de exencefalia (Copp et al., 2003), sugerindo que alguns mecanismos são relevantes apenas para o fechamento do tubo neural cranial.

Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ exibem aparente exencefalia, combinada ao fechamento normal do tubo neural nas regiões do rombencéfalo e medula espinhal. Analisando alguns dos mecanismos que estão relacionados à neurulação cranial, encontramos um grupo de células apoptóticas no mesênquima cranial de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ que são originadas da crista neural migratória. Camundongos com mutações em genes que afetam ou atrasam a migração da crista neural indicam que esse processo é importante para o completo fechamento do tubo neural cranial (Copp et al., 2003; Morriss-Kay and Tuckett, 1985), apesar de os mecanismos que relacionam os dois eventos não serem claros (Copp, 2005). Através de imunofluorescência para o marcador AP-2α, nós observamos que as células da crista neural são normalmente diferenciadas e conseguem migrar, no entanto, uma parte delas parece entrar em apoptose durante a migração na região mesenquimal adjacente ao rombencéfalo.

É interessante notar que a expressão de *Ric-8B* também foi detectada na região das pregas neurais cefálicas em E8,5 e no teto do tubo neural de E9,5, que se assemelha à localização de células prosptectivas da crista neural (Simoes-Costa and Bronner, 2013). Curiosamente, um trabalho com injeção de morfolinos em embriões de *Xenopus* mostrou que níveis normais de RIC-8A são críticos para a dispersão e a migração de células da crista neural cranial. Diferente do mutante *Ric-8B*$^{-/-}$ de camundongo, os defeitos de crista neural causados pelo *knock down* de *Ric-8A* em *Xenopus* não estão relacionados a apoptose, mas mais provavelmente à regulação da adesão celular (Fuentealba et al., 2013).

Interessantemente, um trabalho mostrou que *Shh* é importante para a sobrevivência e a proliferação de células migratórias da crista neural em embriões de galinha (Ahlgren and Bronner-Fraser, 1999). Diferentemente das células do tubo neural dorsal, as células migratórias da crista neural não expressam componentes importantes para a sinalização de

SHH, como *Ptch1* ou fatores *Gli* (Motoyama et al., 1998; Quirk et al., 1997; Stone et al., 1996). Embora *Smo* seja expresso em níveis reduzidos na maioria dos tecidos durante o desenvolvimento, sua deleção em células da crista neural cranial migratória não causa nenhum fenótipo (Jeong et al., 2004). Um trabalho posterior, realizado com embriões de camundongo *Shh*$^{-/-}$, também verificou que células da crista neural são especificadas e migram na ausência de SHH, porém têm localização incorreta e sofrem apoptose. Esse trabalho também sugere que a sinalização de SHH atua como um fator que guia (direta ou indiretamente) a migração da crista neural, restringindo os domínios que essas células podem popular (Washington Smoak et al., 2005). Células da crista neural encontram uma diversidade de sinais nos tecidos por onde elas se movem, que influenciam sua rota migratória, sua diferenciação e sobrevivência (Paratore et al., 2002). Dessa forma, é possível que as células da crista migratória de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ estejam entrando em apoptose devido à ausência de algum fator de sobrevivência como *Shh*, por exemplo.

Células originadas tanto da crista neural quanto da mesoderme cefálica paraxial formam o mesênquima da cabeça (Noden and Trainor, 2005). O fechamento do tubo neural cranial é dependente da expansão adequada do mesênquima da cabeça, como mostram alguns mutantes que apresentam falha na elevação das pregas neurais durante o fechamento do tubo neural (Chen and Behringer, 1995; Zhao et al., 1996; Zohn et al., 2007). Um fenótipo de exencefalia é produzido tanto pelo aumento na densidade do mesênquima (Zohn et al., 2007) quanto pela diminuição na densidade do mesênquima, que pode ser causada por redução na proliferação (Chen and Behringer, 1995) ou aumento na apoptose (Zhao et al., 1996). Dessa maneira, a apoptose de células da crista neural migratória no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ poderiam levar à formação anormal do mesênquima da cabeça e contribuir para o fenótipo de exencefalia. No entanto, essas células apoptóticas estão na região do rombencéfalo, que não tem o fechamento do tubo neural afetado, mas é possível que essa distribuição também acabe por influenciar no fechamento do tubo neural em regiões anteriores.

No entanto, não podemos descartar a possibilidade de *Ric-8B* estar envolvida em outras vias de sinalização que também são importantes para a neurulação. BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) compõem um grande subgrupo dentro da superfamília gênica de fatores de transformação de crescimento beta (TGF-β) (Kingsley, 1994; Zhao, 2003). Apesar de seu papel inicialmente identificado na habilidade de causar diferenciação dos ossos, atualmente muitos estudos mostram que BMPs apresentam outros papéis na embriogênese, como formação dos eixos dorsoventral e anterioposterior, além da neurulação em camundongos (Hogan, 1996; Mishina, 2003). Um modelo especialmente interessante de exencefalia é o mutante de BMP2 (Castranio and Mishina, 2009). BMP2 é expressa na linha média dorsal, especificamente no teto da placa do telencéfalo (Furuta et al., 1997). Assim como no homozigoto mutante de *Ric-8B,* embriões BMP2 nulos em E9,5 apresentam exencefalia, mas os padrões de expressão de Pax6 e *Shh* não são alterados. Esses embriões apresentam proliferação normal, porém a apoptose está aumentada especificamente no mesênquima próximo da ectoderme superficial e à porção dorsal do tubo neural (Castranio and Mishina, 2009). A origem dessas células não foi analisada, mas trabalhos mostram que BMP2 é importante também para a migração, mas não a indução, da crista neural (Correia et al., 2007), além de uma regulação de seus níveis ser importante para a sobrevivência de células da crista neural migratória (Anderson et al., 2006).

5.6 RIC-8B e cílios

Como relatado anteriormente, o padrão de expressão de *Ric-8B* no embrião é semelhante ao de *Shh.* A sinalização de SHH foi originalmente descrita em *Drosophila,* e muitos dos componentes essenciais dessa via são conservados entre as espécies (Goetz and Anderson, 2010 e Simpson et al., 2009). Diferente de *Drosophila,* no entanto, a sinalização de SHH em vertebrados é dependente de cílio primário (Eggenschwiler and Anderson, 2007; Huangfu and

Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003). Mutações nos componentes do complexo IFT-B/cinesina, responsável pelo transporte anterógrado da base para a ponta do cílio, bloqueiam a formação de cílio e levam à completa perda da sinalização de SHH. Em contraste, mutações nos membros do complexo IFT-A/dineína, responsável pelo transporte retrógrado, resultam em um cílio curto e bulbar e levam à ativação aberrante da via de SHH (Goetz and Anderson, 2010). Notavelmente, todos os componentes-chave da via de SHH estão enriquecidos no cílio primário, transportados por diferentes mecanismos (Corbit et al., 2005; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Mukhopadhyay et al., 2013).

Trabalhos em células de mamíferos sugerem que RIC-8B é importante para a associação de Gα com a membrana celular (Gabay et al, 2011), possivelmente através de uma função que envolve o dobramento e o transporte dessa proteína. Em neurônios olfatórios, RIC-8B interage com $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$, proteínas ciliares que são essenciais para a transdução do sinal olfatório (Kerr et al, 2008). Adicionalmente, RIC-8B e $G\alpha_{olf}$ são coexpressas na região cerebral do *striatum* em camundongos adultos (Von Dannecker et al, 2005). O receptor de dopamina do tipo D1 é um GPCR que sinaliza através de $G\alpha_{olf}$ (Zhuang et al., 2000) e, em sistema heterólogo, RIC-8B regula positivamente a sinalização do receptor D1 via $G\alpha_{olf}$ (Von Dannecker et al, 2006). Curiosamente, o receptor D1 se localiza nos cílios primários dos neurônios do *striatum* (Domire et al., 2011), sugerindo que a sinalização de dopamina também depende da função ciliar, na qual RIC-8B pode estar envolvida.

Dessa maneira, nos perguntamos se a função de RIC-8B estaria relacionada, de alguma maneira, a cílio primário. Essa questão foi abordada usando culturas de células MEF, um sistema já estabelecido que nos permitiria comparar a formação de cílios em células selvagens e *Ric-8B*$^{-/-}$. A indução da ciliogênese em MEFs mostrou que células *Ric-8B*$^{-/-}$ são capazes de formar cílio primário normalmente. Dessa maneira, podemos dizer que RIC-8B não está envolvida no transporte de moléculas que são importantes para a formação do cílio primário.

Cílios de diferentes tecidos têm funções e composições particulares, que talvez dependam de mecanismos específicos de ciliogênese. Como exemplo, Tectonic1 (TCTN1) participa de um complexo multiproteico formado na chamada zona de transição (Garcia-Gonzalo et al., 2011), uma região ao redor do corpo basal relacionada à regulação do processo de importação e exportação de moléculas ciliares (Craige et al., 2010; Deane et al., 2001; Gilula and Satir, 1972). TCNT1, assim como TCTN2, TMEM67 e CCD2D2A são essenciais para a ciliogêne de maneira tecido-específica (Garcia-Gonzalo et al, 2011). A expressão reduzida de RIC-8B em MEFs (se comparado com os níveis expressos no embrião selvagem) poderia explicar o fato de não termos encontrado diferenças na formação de cílio primário em células *Ric-8B*$^{-/-}$. No entanto, a semelhança da marcação com anti-α-tubulina acetilada no tubo neural de embriões selvagens e homozigotos mutantes indica que a formação de cílios primários também está intacta nas células do embrião onde *Ric-8B* é expresso em maior abundância.

Apesar de os cílios primários estarem intactos, não podemos descartar a possibilidade de que sua função esteja comprometida. CEP290, uma proteína localizada na zona de transição, não afeta a formação de cílios olfatórios, mas sim a localização das proteínas ciliares $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$ (McEwen et al, 2007). Proteínas que se ligam a GTP/GDP e GEFs participam do tráfego de proteínas para o cílio, portanto, o papel de RIC-8B com $G\alpha_{olf}$ e $G\gamma_{13}$ na função de transporte de proteínas ciliares em neurônios olfatórios já foi discutido (McEwen et al, 2007). No entanto, $G\alpha_{olf}$ não é expressa no embrião até, pelo menos, o estágio E12,5, indicando que a função de RIC-8B não está relacionada a essa proteína durante a neurulação. Por outro lado, RIC-8B também interage com a proteína $G\alpha_s$ (Chan et al, 2011), que é expressa ubiquamente durante o desenvolvimento e já foi identificada no proteoma de cílios da linhagem celular IMCD3 (Ishikawa et al., 2012). Como mostrou um trabalho recente, GPR161 é um GPCR órfão de localização ciliar que atua como regulador negativo da sinalização de SHH (Mukhopadhyay et al, 2013). Ensaios *in vitro* sugerem que a ativação constitutiva de GPR161

aumenta os níveis intracelulares de cAMP via sinalização de $G\alpha_s$ e, possivelmente, a inibição da sinalização de SHH ocorre pela ativação de PKA (Mukhopadhyay et al, 2013). RIC-8B atua como regulador positivo de $G\alpha_s$ *in vitro* e é expresso especificamente no assoalho da placa durante a embriogênese. Portanto, se RIC-8B estivesse envolvida na via de sinalização de SHH através da regulação de $G\alpha_s$, poderíamos esperar que *Ric-8B*$^{-/-}$ apresentasse um fenótipo semelhante ao do embrião *Gpr161*$^{-/-}$, pelo menos em alguns aspectos do tubo neural. Curiosamente, o *knock out* de *Gpr161* em camundongo também resulta em exencefalia e letalidade embrionária por volta de E10,5. No entanto, esse mutante apresenta típica sinalização de SHH aumentada, com ventralização do tubo neural e níveis reduzidos da forma repressora de GLI3 (Mukhopadhyay et al, 2013), que diferem evidentemente do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$. A participação de $G\alpha_s$ na inibição da via de SHH ainda carece de comprovações experimentais *in vivo*, mas não podemos descartar a possibilidade de que a expressão residual de *Ric-8B* na linhagem RRH188 seja suficiente para manter os níveis de $G\alpha_s$ necessários à sinalização de SHH. Alternativamente, é possível que a função de Ric-8B não esteja relacionada a $G\alpha_s$ no assoalho da placa. Em concordância, nossos dados que apontam que a isoforma mais expressa de RIC-8B durante o período de E7,5 a E12,5 corresponde uma proteína que interage apenas fracamente com subunidades Gα. Atualmente, nem a função dessa isoforma nem seus parceiros são conhecidos.

Curiosamente, um dos fenótipos produzidos pelo *knockout* de *Ric-8B* em *zebrafish* é a agregação dos melanossomos, que pode ser revertida através de um estímulo com forskolina (Nagayoshi et al, 2008). Melanossomos são organelas relacionadas a lisossomos, cujo transporte intracelular é realizado bidirecionalmente por motores moleculares baseados em microtúbulos (Barral and Seabra, 2004; Marks and Seabra, 2001; Skold et al., 2002). Dessa forma, *zebrafish* é capaz de alterar sua pigmentação através da dispersão (transporte anterógrado) e da retração (transporte retrógrado) dos melanossomos dentro dos melanóforos.

O transporte de melanossomos é um modelo geral de estudo do transporte de vesículas e organelas, portanto, é possível que RIC-8B de vertebrados esteja envolvida no transporte intracelular de algumas proteínas específicas. Condizente com essa função, nossos experimentos de imunofluorescência em MEFs mostram que RIC-8B tem uma distribuição citoplasmática semelhante ao padrão de marcação vesicular.

O tráfego vesicular polarizado é mediado por membros da superfamília de GTPases monoméricas Ras, que assistem o recrutamento de complexos de revestimento durante o brotamento, ancoragem e fusão de vesículas (Barr, 2009; Stenmark, 2009). Vários estudos demonstraram também a importância dessas proteínas para a ciliogênese (Caspary et al., 2007; Mukhopadhyay et al., 2008; Nachury et al., 2007). Proteínas Rab, que integram essa família, são críticas para regular o tráfego de organelas particulares. As transições dos estados ativo (ligada a GTP) ou inativo (ligada a GDP) coordenam a localização celular e a função dessas GTPases monoméricas, e são controladas por GEFs e GAPs (Hutagalung e Novick, 2011). Portanto, determinar os parceiros moleculares de RIC-8B durante a embriogênese é uma informação importante para relacioná-la a sua função.

A expressão majoritária de RIC-8BΔ9 durante a embriogênese sugere que esse gene também pode ter outras funções que não envolvem Gα. *In vitro,* foi mostrado que RIC-8BΔ9 interage com diferentes subunidades de Gγ (Kerr et al, 2008), embora a relação funcional entre essas duas proteínas não seja conhecida.

6 CONCLUSÕES

Resumidamente, o estudo dessa tese permite concluir que:

- *Ric-8B* é essencial para a embriogênese, quando desempenha uma função diferente daquela observada no olfato. Durante o desenvolvimento, a expressão de *Ric-8B* é importante para a formação normal do tubo neural, mais especificamente a região cranial.
- A linhagem de camundongos RRH188, usada nesse estudo, tem níveis residuais de expressão de *Ric-8B.*
- *Ric-8B* é expresso desde estágios iniciais do desenvolvimento e sua ausência leva à morte do embrião por volta de E10,5. Sua expressão é detectada na notocorda, nas pregas neurais craniais e na região ventral do neuroepitélio truncal de embriões E8,5. Em E9,5, a expressão persiste nas regiões onde as pregas neurais craniais se fundiram (teto da placa) e passa a ser observada mais intensamente na região da placa do assoalho. A expressão nessa última região persiste em embriões nos estágios E10,5 e E12,5.
- O embrião *Ric-8B*$^{-/-}$ tem tamanho reduzido, provavelmente decorrente de um atraso no desenvolvimento, e apresenta falha na neurulação da região cranial (exencefalia).
- O padrão de expressão de *Ric-8B* específico no assoalho da placa é semelhante à de *Sonic Hedgehog (Shh).* No entanto, não verificamos alterações nessa via no embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.
- Trabalhos anteriores e o padrão de expressão de *Ric-8B* no embrião sugerem um papel relacionado a cílios. Fibroblastos embrionários *Ric-8B*$^{-/-}$ em cultura formam cílios primários normalmente e temos indícios de que o mesmo acontece em células do tubo neural de embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ é expresso mais abundantemente. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que esses cílios tenham defeitos funcionais que não dependem diretamente da estrutura intacta.
- Embriões *Ric-8B*$^{-/-}$ têm apoptose aumentada na região mesenquimal da cabeça, que afeta

células da crista neural migratória. É possível que a função de RIC-8B esteja relacionada à percepção de algum fator que promove a sobrevivência dessas células, como SHH. A morte de células originária da crista neural que populam o mesênquima cranial também pode explicar o fenótipo de exencefalia do embrião *Ric-8B*$^{-/-}$.

- A localização subcelular de RIC-8B se assemelha ao de vesículas, sugerindo um possível papel no transporte intracelular.

7 REFERÊNCIAS

Adams, M., Smith, U.M., Logan, C.V., and Johnson, C.A. (2008). Recent advances in the molecular pathology, cell biology and genetics of ciliopathies. Journal of medical genetics *45*, 257-267.

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of C. elegans embryos. Cell *119*, 219-230.

Ahlgren, S.C., and Bronner-Fraser, M. (1999). Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. Current biology : CB *9*, 1304-1314.

Anderson, R.M., Stottmann, R.W., Choi, M., and Klingensmith, J. (2006). Endogenous bone morphogenetic protein antagonists regulate mammalian neural crest generation and survival. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *235*, 2507-2520.

Arkell, R., and Beddington, R.S. (1997). BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. Development *124*, 1-12.

Avasthi, P., and Marshall, W.F. (2012). Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. Differentiation; research in biological diversity *83*, S30-42.

Barr, F.A. (2009). Membrane traffic: Golgi stumbles over cilia. Current biology : CB *19*, R253-255.

Barral, D.C., and Seabra, M.C. (2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society *17*, 111-118.

Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. Neuron *20*, 69-81.

Belluscio, L., and Katz, L.C. (2001). Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *21*, 2113-2122.

Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Developmental biology *258*, 1-19.

Brouns, M.R., Matheson, S.F., Hu, K.Q., Delalle, I., Caviness, V.S., Silver, J., Bronson, R.T., and Settleman, J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. Development *127*, 4891-4903.

Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell *65*, 175-187.

Buck, L.B. (2000). The Molecular Architecture of Odor and Pheromone Sensing in Mammals. Cell *100*, 611-618.

Buck, L.B. (2004). Olfactory receptors and odor coding in mammals. Nutr Rev *62*, S184-S188.

Caspary, T., Larkins, C.E., and Anderson, K.V. (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. Developmental cell *12*, 767-778.

Castranio, T., and Mishina, Y. (2009). Bmp2 is required for cephalic neural tube closure in the mouse. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *238*, 110-122.

Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., and Tall, G.G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. The Journal of biological chemistry *286*, 19932-19942.

Chan, P., Thomas, C.J., Sprang, S.R., and Tall, G.G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein alpha subunits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 3794-3799.

Chen, Z.F., and Behringer, R.R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. Genes & development *9*, 686-699.

Cooper, A.F., Yu, K.P., Brueckner, M., Brailey, L.L., Johnson, L., McGrath, J.M., and Bale, A.E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. Development *132*, 4407-4417.

Copp, A.J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. Trends in genetics : TIG *11*, 87-93.

Copp, A.J. (2005). Neurulation in the cranial region--normal and abnormal. Journal of anatomy *207*, 623-635.

Copp, A.J., Brook, F.A., Estibeiro, J.P., Shum, A.S., and Cockroft, D.L. (1990). The embryonic development of mammalian neural tube defects. Progress in neurobiology *35*, 363-403.

Copp, A.J., Greene, N.D., and Murdoch, J.N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. Nature reviews Genetics *4*, 784-793.

Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. Nature *437*, 1018-1021.

Correia, A.C., Costa, M., Moraes, F., Bom, J., Novoa, A., and Mallo, M. (2007). Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *236*, 2493-2501.

Couwenbergs, C., Spilker, A.C., and Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by C. elegans RIC-8. Current biology : CB *14*, 1871-1876.

Craige, B., Tsao, C.C., Diener, D.R., Hou, Y., Lechtreck, K.F., Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2010). CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. The Journal of cell biology *190*, 927-940.

David, N., Martin, C., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaiche, Y. (2005). *Drosophila* Ric-8B regulates Gαi cortical localization to promote Gαi-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. Nature cell biology *7*, 1083-1090.

Deane, J.A., Cole, D.G., Seeley, E.S., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. Current biology : CB *11*, 1586-1590.

DeMaria, S., and Ngai, J. (2010). The cell biology of smell. The Journal of cell biology *191*, 443-452.

Dessaud, E., McMahon, A.P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. Development *135*, 2489-2503.

Domire, J.S., Green, J.A., Lee, K.G., Johnson, A.D., Askwith, C.C., and Mykytyn, K. (2011). Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. Cellular and molecular life sciences : CMLS *68*, 2951-2960.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell *75*, 1417-1430.

Eggenschwiler, J.T., and Anderson, K.V. (2007). Cilia and developmental signaling. Annual review of cell and developmental biology *23*, 345-373.

El Zein, L., Omran, H., and Bouvagnet, P. (2003). Lateralization defects and ciliary dyskinesia: lessons from algae. Trends in genetics : TIG *19*, 162-167.

Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J.W., Phamluong, K., Davis, M., Scales, S.J., Solloway, M.J., de Sauvage, F.J., *et al.* (2009). The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. Current biology : CB *19*, 1320-1326.

Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Jessell, T.M. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology *62*, 451-466.

Feinstein, P., and Mombaerts, P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. Cell *117*, 817-831.

Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. Nature *413*, 211-218.

Firestein, S., Picco, C., and Menini, A. (1993). The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. Journal of Physiology *468*, 1-10.

Fliegauf, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 880-893.

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J.P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M.V., *et al.* (2013). Ric-8A, a guanine

nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. Developmental biology *378*, 74-82.

Furuta, Y., Piston, D.W., and Hogan, B.L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. Development *124*, 2203-2212.

Gabay, M., Pinter, M.E., Wright, F.A., Chan, P., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., and Tall, G.G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein alpha subunit membrane association. Sci Signal *4*, ra79.

Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega, T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., *et al.* (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. Nature genetics *43*, 776-784.

Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annual review of biochemistry *56*, 615-649.

Gilula, N.B., and Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. The Journal of cell biology *53*, 494-509.

Goetz, S.C., and Anderson, K.V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nature reviews Genetics *11*, 331-344.

Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. Science *277*, 1109-1113.

Green, J.A., and Mykytyn, K. (2010). Neuronal ciliary signaling in homeostasis and disease. Cellular and molecular life sciences : CMLS *67*, 3287-3297.

Greene, N.D., and Copp, A.J. (2009). Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. Prenatal diagnosis *29*, 303-311.

Hajdu-Cronin, Y.M., Chen, W.J., Patikoglou, G., Koelle, M.R., and Sternberg, P.W. (1999). Antagonism between G(o)alpha and G(q)alpha in Caenorhabditis elegans: the RGS protein EAT-16 is necessary for G(o)alpha signaling and regulates G(q)alpha activity. Genes & development *13*, 1780-1793.

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., and Knoblich, J.A. (2005). Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. Nature cell biology *7*, 1099-1105.

Helms, J.A., and Schneider, R.A. (2003). Cranial skeletal biology. Nature *423*, 326-331.

Hess, H.A., Roper, J.C., Grill, S.W., and Koelle, M.R. (2004). RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in C. elegans. Cell *119*, 209-218.

Hildebrand, J.D., and Soriano, P. (1999). Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. Cell *99*, 485-497.

Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. Current opinion in genetics & development *6*, 432-438.

Hsiao, Y.C., Tuz, K., and Ferland, R.J. (2012). Trafficking in and to the primary cilium. Cilia *1*, 4.

Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 11325-11330.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature *426*, 83-87.

Ishikawa, H., Thompson, J., Yates, J.R., 3rd, and Marshall, W.F. (2012). Proteomic analysis of mammalian primary cilia. Current biology : CB *22*, 414-419.

Jenie, R.I., Nishimura, M., Fujino, M., Nakaya, M., Mizuno, N., Tago, K., Kurose, H., and Itoh, H. (2013). Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms *18*, 1095-1106.

Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A.H., and McMahon, A.P. (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. Genes & development *18*, 937-951.

Jiang, J., and Hui, C.C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. Developmental cell *15*, 801-812.

Johnson, R.L., and Tabin, C. (1995). The long and short of hedgehog signaling. Cell *81*, 313-316.

Jones, D.T., and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron-specific G-protein involved in odorant signal transduction. Science *244*, 790-795.

Kerr, D., Von Dannecker, L., Davalos, M., Michaloski, J., and Malnic, B. (2008). Ric-8B interacts with Gαolf and Gγ13 and co-localizes with Gαolf, Gβ1 and Gγ13 in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol Cell Neurosci *38*, 341-348.

Kiefer, J.C. (2010). Primer and interviews: Diverse connections between primary cilia and Hedgehog signaling. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *239*, 1255-1262.

Kingsley, D.M. (1994). What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. Trends in genetics : TIG *10*, 16-21.

Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzmán, L., Romo, X., García, M.L.A., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Hinrichs, M.V., and Olate, J. (2003). Human brain synembryn interacts with Gsα and Gqα and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol.

Kontges, G., and Lumsden, A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. Development *122*, 3229-3242.

Krauss, S., Concordet, J.P., and Ingham, P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. Cell *75*, 1431-1444.

Lee, J.H., and Gleeson, J.G. (2010). The role of primary cilia in neuronal function. Neurobiology of disease *38*, 167-172.

Lei, Q., Jeong, Y., Misra, K., Li, S., Zelman, A.K., Epstein, D.J., and Matise, M.P. (2006). Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube. Developmental cell *11*, 325-337.

Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. Cell *82*, 803-814.

Li, F., Ponissery-Saidu, S., Yee, K.K., Wang, H., Chen, M.L., Iguchi, N., Zhang, G., Jiang, P., Reisert, J., and Huang, L. (2013). Heterotrimeric G protein subunit Ggamma13 is critical to olfaction. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *33*, 7975-7984.

Liem, K.F., Jr., He, M., Ocbina, P.J., and Anderson, K.V. (2009). Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 13377-13382.

Litingtung, Y., and Chiang, C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. Nature neuroscience *3*, 979-985.

Liu, A., and Niswander, L.A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. Nature reviews Neuroscience *6*, 945-954.

Liu, J.J., Russell, E., Zhang, D., Kaplan, F.S., Pignolo, R.J., and Shore, E.M. (2012). Paternally inherited gsalpha mutation impairs adipogenesis and potentiates a lean phenotype in vivo. Stem cells *30*, 1477-1485.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L.B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. Cell *96*, 713-723.

Marks, M.S., and Seabra, M.C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. Nature reviews Molecular cell biology *2*, 738-748.

Marti, E., Bumcrot, D.A., Takada, R., and McMahon, A.P. (1995a). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. Nature *375*, 322-325.

Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H., and McMahon, A.P. (1995b). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. Development *121*, 2537-2547.

Massa, V., Savery, D., Ybot-Gonzalez, P., Ferraro, E., Rongvaux, A., Cecconi, F., Flavell, R., Greene, N.D., and Copp, A.J. (2009). Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 8233-8238.

McEwen, D., Koenekoop, R., Khanna, H., Jemkins, P., Lopez, I., Swaroop, A., and Martens, J. (2007). Hypomorphic CEP290/NPHP6 mutations result in anosmia caused by the selective loss of G proteins in cilia of olfactory sensory neurons. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 15917-15922.

Menco, B.P. (1994). Ultrastructural aspects of olfactory transduction and perireceptor events. Seminars in cell biology *5*, 11-24.

Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2006). The primary cilium in cell signaling and cancer. Cancer research *66*, 6463-6467.

Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 12593-12598.

Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., and Rand, J.B. (2000). RIC-8 (Synembrin): a novel conserved protein that is required for Gqα signaling in the *C.elegans* nervous system. Neuron *27*, 289-299.

Miller, K.G., Emerson, M.D., and Rand, J.B. (1999). Goalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in C. elegans. Neuron *24*, 323-333.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembrin) and GOA-1 (Goα) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Genetics *156*, 1649-1660.

Mishina, Y. (2003). Function of bone morphogenetic protein signaling during mouse development. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library *8*, d855-869.

Mitchell, P.J., Timmons, P.M., Hebert, J.M., Rigby, P.W., and Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. Genes & development *5*, 105-119.

Mollet, G., Silbermann, F., Delous, M., Salomon, R., Antignac, C., and Saunier, S. (2005). Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. Human molecular genetics *14*, 645-656.

Mombaerts, P. (2001). How smell develops. Nature Neurosc *4*, 1192-1198.

Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. Nat Reviews Neuroscience *5*, 263-278.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. Cell *87*, 675-686.

Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. Physiological reviews *83*, 1223-1267.

Morriss-Kay, G., and Tuckett, F. (1985). The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalasin D. Journal of embryology and experimental morphology *88*, 333-348.

Motoyama, J., Heng, H., Crackower, M.A., Takabatake, T., Takeshima, K., Tsui, L.C., and Hui, C. (1998). Overlapping and non-overlapping Ptch2 expression with Shh during mouse embryogenesis. Mechanisms of development *78*, 81-84.

Mukhopadhyay, S., Lu, Y., Shaham, S., and Sengupta, P. (2008). Sensory signaling-dependent remodeling of olfactory cilia architecture in C. elegans. Developmental cell *14*, 762-774.

Mukhopadhyay, S., Wen, X., Ratti, N., Loktev, A., Rangell, L., Scales, S.J., and Jackson, P.K. (2013). The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. Cell *152*, 210-223.

Mullor, J.L., Dahmane, N., Sun, T., and Ruiz i Altaba, A. (2001). Wnt signals are targets and mediators of Gli function. Current biology : CB *11*, 769-773.

Murdoch, J.N., and Copp, A.J. (2010). The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology *88*, 633-652.

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., *et al.* (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. Cell *129*, 1201-1213.

Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N., and Itoh, H. (2010). Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. The Journal of biological chemistry *285*, 11114-11120.

Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., and Kawakami, K. (2008). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: tcf7 and synembryn-like. Development *135*, 159-169.

Noden, D.M., and Trainor, P.A. (2005). Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. Journal of anatomy *207*, 575-601.

Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Doi, H., and Eto, K. (1994). The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. Developmental biology *164*, 409-419.

Paratore, C., Hagedorn, L., Floris, J., Hari, L., Kleber, M., Suter, U., and Sommer, L. (2002). Cell-intrinsic and cell-extrinsic cues regulating lineage decisions in multipotent neural crest-derived progenitor cells. The International journal of developmental biology *46*, 193-200.

Pedersen, L.B., and Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. Current topics in developmental biology *85*, 23-61.

Qin, J., Lin, Y., Norman, R.X., Ko, H.W., and Eggenschwiler, J.T. (2011). Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 1456-1461.

Quirk, J., van den Heuvel, M., Henrique, D., Marigo, V., Jones, T.A., Tabin, C., and Ingham, P.W. (1997). The smoothened gene and hedgehog signal transduction in Drosophila and vertebrate development. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology *62*, 217-226.

Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. Cell *79*, 1245-1255.

Reynolds, N.K., Schade, M.A., and Miller, K.G. (2005). Convergent, RIC-8-dependent Galpha signaling pathways in the Caenorhabditis elegans synaptic signaling network. Genetics *169*, 651-670.

Ribes, V., and Briscoe, J. (2009). Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. Cold Spring Harbor perspectives in biology *1*, a002014.

Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., *et al.* (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. Cell *76*, 761-775.

Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., and Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. Cell *81*, 445-455.

Ronnett, G.V., and Moon, C. (2002). G proteins and olfactory signal transduction. Annu Rev Physiol *64*, 189-222.

Sadler, T.W., Greenberg, D., Coughlin, P., and Lessard, J.L. (1982). Actin distribution patterns in the mouse neural tube during neurulation. Science *215*, 172-174.

Santagati, F., and Rijli, F.M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. Nature reviews Neuroscience *4*, 806-818.

Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. Development *124*, 1313-1322.

Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. Annual review of physiology *69*, 377-400.

Schade, M.A., Reynolds, N.K., Dollins, C.M., and Miller, K.G. (2005). Mutations that rescue the paralysis of Caenorhabditis elegans ric-8 (synembryn) mutants activate the G alpha(s) pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. Genetics *169*, 631-649.

Schermer, B., Hopker, K., Omran, H., Ghenoiu, C., Fliegauf, M., Fekete, A., Horvath, J., Kottgen, M., Hackl, M., Zschiedrich, S., *et al.* (2005). Phosphorylation by casein kinase 2 induces PACS-1 binding of nephrocystin and targeting to cilia. The EMBO journal *24*, 4415-4424.

Schneider, H., and Brueckner, M. (2000). Of mice and men: dissecting the genetic pathway that controls left-right asymmetry in mice and humans. American journal of medical genetics *97*, 258-270.

Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., *et al.* (2000). Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. Nature Neurosc *3*, 687-693.

Silverman, M.A., and Leroux, M.R. (2009). Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia. Trends in cell biology *19*, 306-316.

Simoes-Costa, M., and Bronner, M.E. (2013). Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. Genome research *23*, 1069-1080.

Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. Science *252*, 802-808.

Simpson, F., Kerr, M.C., and Wicking, C. (2009). Trafficking, development and hedgehog. Mechanisms of development *126*, 279-288.

Skold, H.N., Aspengren, S., and Wallin, M. (2002). The cytoskeleton in fish melanophore melanosome positioning. Microscopy research and technique *58*, 464-469.

Stanford, W.L., Cohn, J.B., and Cordes, S.P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. Nature reviews Genetics *2*, 756-768.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nature reviews Molecular cell biology *10*, 513-525.

Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., *et al.* (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. Nature *384*, 129-134.

Stryke, D., Kawamoto, M., Huang, C.C., Johns, S.J., King, L.A., Harper, C.A., Meng, E.C., Lee, R.E., Yee, A., L'Italien, L., *et al.* (2003). BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. Nucleic acids research *31*, 278-281.

Su, C.Y., Menuz, K., and Carlson, J.R. (2009). Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. Cell *139*, 45-59.

Tall, G.G., and Gilman, A.G. (2005). Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galphai-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galphai-GDP complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 16584-16589.

Tall, G.G., Krumins, A.M., and Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Gα protein guanine nucleotide exchange factor. The Journal of biological chemistry *278*, 8356-8362.

Tonissoo, T., Koks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., and Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. Behavioural brain research *167*, 42-48.

Tonissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., and Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *239*, 3404-3415.

Tonissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., and Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. Gene expression patterns : GEP *3*, 591-594.

Touhara, K. (2001). Functional cloning and reconstitution of vertebrate odorant receptors. Life sciences *68*, 2199-2206.

Ulloa, F., and Marti, E. (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *239*, 69-76.

Vassar, R., Chao, S., Sitcheran, R., Nunez, J., Vosshall, L., and Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. Cell *79*, 981-991.

Vokes, S.A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W.J., Davidson, E.H., Wong, W.H., and McMahon, A.P. (2007). Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. Development *134*, 1977-1989.

Von Dannecker, L., Mercadante, A., and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Gaolf. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *25*, 3793-3800.

Von Dannecker, L., Mercadante, A., and Malnic, B. (2006). Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. Proc Natl Acad Sci USA *103*, 9310-9314.

Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. Cell *93*, 47-60.

Wang, H., Ng, K., Qian, H., Siderovski, D., Chia, W., and Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. Nature cell biology *7*, 1091-1098.

Washington Smoak, I., Byrd, N.A., Abu-Issa, R., Goddeeris, M.M., Anderson, R., Morris, J., Yamamura, K., Klingensmith, J., and Meyers, E.N. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. Developmental biology *283*, 357-372.

Wheatley, D.N., Wang, A.M., and Strugnell, G.E. (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. Cell biology international *20*, 73-81.

Wijgerde, M., McMahon, J.A., Rule, M., and McMahon, A.P. (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. Genes & development *16*, 2849-2864.

Wilkie, T.M., and Kinch, L. (2005). New roles for Galpha and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. Current biology : CB *15*, R843-854.

Wilson, L., and Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Developmental biology *282*, 1-13.

Winkelbauer, M.E., Schafer, J.C., Haycraft, C.J., Swoboda, P., and Yoder, B.K. (2005). The C. elegans homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. Journal of cell science *118*, 5575-5587.

Wolf, M.T., Lee, J., Panther, F., Otto, E.A., Guan, K.L., and Hildebrandt, F. (2005). Expression and phenotype analysis of the nephrocystin-1 and nephrocystin-4 homologs in Caenorhabditis elegans. Journal of the American Society of Nephrology : JASN *16*, 676-687.

Woodard, G.E., Huang, N.N., Cho, H., Miki, T., Tall, G.G., and Kehrl, J.H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. Molecular and cellular biology *30*, 3519-3530.

Xu, W., Baribault, H., and Adamson, E.D. (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. Development *125*, 327-337.

Yamaguchi, Y., and Miura, M. (2013). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. Cellular and molecular life sciences : CMLS *70*, 3171-3186.

Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D., and Copp, A.J. (2002). Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. Development *129*, 2507-2517.

Yoon, J.W., Kita, Y., Frank, D.J., Majewski, R.R., Konicek, B.A., Nobrega, M.A., Jacob, H., Walterhouse, D., and Iannaccone, P. (2002). Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. The Journal of biological chemistry *277*, 5548-5555.

Young, J.M., C., F., Williams, E.M., Ross, J.A., Tonnes-Priddy, L., and Trask, B.J. (2002). Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. Human molecular genetics *11*, 535-546.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H., and Weinstein, L.S. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Gsalpha) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the gsalpha gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 8715-8720.

Zhang, X., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat Neurosci *5*, 124-133.

Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M., and McMahon, A.P. (2001). Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. Cell *105*, 781-792.

Zhao, G.Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. Genesis *35*, 43-56.

Zhao, Q., Behringer, R.R., and de Crombrugghe, B. (1996). Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene. Nature genetics *13*, 275-283.

Zhuang, X., Belluscio, L., and Hen, R. (2000). G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *20*, RC91.

Zohn, I.E., Anderson, K.V., and Niswander, L. (2007). The Hectd1 ubiquitin ligase is required for development of the head mesenchyme and neural tube closure. Developmental biology *306*, 208-221.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A – Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Maíra Harume Nagai
Local e data de nascimento: 20/01/1987

EDUCAÇÃO

Março de 2009 - atual
Doutorado Direto em Bioquímica e Biologia Molecular
Orientadora: Profª Drª Bettina Malnic
Projeto de pesquisa: RIC-8B, uma GEF de sistema olfatório, é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso.
Instituição: Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP).

Maio de 2007 a Setembro de 2007
Estágio em Neuroanatomia de Comportamentos Motivados
Supervisor: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras
Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas III, Universidade de São Paulo (USP).

Novembro de 2007 a Dezembro de 2008
Estágio de Iniciação Científica em Genética Molecular
Orientador: Profª Drª Lygia da Veiga Pereira
Projeto: Importância da enzima DNMT1 para a metilação global em fibroblastos humanos.
Instituição: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP).

2005 – 2008
Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura).
Instituição: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP).

2002 - 2004
Ensino Médio, Sistema anglo de ensino.

OCUPAÇÃO

Doutorado Direto
Bolsa concedida pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2009 a julho de 2009.
Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), de agosto de 2009 a maio de 2014.

Programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE)
2º semestre de 2012 - Monitoria na disciplina QBQ 2453 (Biologia Molecular), sob supervisão de Bianca Zingales e Daniela Basseres.

2º semestre de 2010 – monitoria na disciplina QBQ 2463 (Bioquímica Experimental), sob supervisão de Sandro R. Marana e Maria Terêsa M. de Miranda.

2º semestre de 2009 – monitoria na disciplina QBQ 2457 (Tecnologia do DNA recombinante), sob supervisão de Bettina Malnic.

Iniciação Científica
Bolsa concedida pela FAPESP, de julho de 2008 a dezembro de 2008.

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos
Michaloski JS, Galante PAF, Nagai MH, Armelin-Correa L, Chien M-S, Matsunami H and Malnic B. (2011) Common promoter elements in odorant and vomeronasal receptor genes. *PlosOne*, 6(12): e29065.

Anamaria Camargo, Érico Costa, Gabriela Barnabé, Ming Li, Adriana Dias, Tamara Machado, Paula Asprino, Felícia Cavalher, Elisa Ferreira, Maria Del Mar Inda, Maíra Nagai, Bettina Malnic, Dirce Carraro, Roger Chammas, Katia Leite, Alfredo Barros, Hugo Armelin, Webster Cavenee, Frank Furnari, and Mariana Duarte. Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LGI4 and nitric oxide signals. *Oncogene*. 2014 Mar 24;0. doi: 10.1038/onc.2014.70.

Maíra Harume Nagai, Luciana Mayumi Gutiyama, Cleiton Fagundes Machado, Alice Helena dos Reis Ribeiro, Jose Garcia Ribeiro Abreu Junior, and Bettina Malnic. The guanine nucleotide exchange factor Ric-8B is essential for mouse embryogenesis. Em preparação.

Resumos em Congressos
Nagai MH, Glezer I, Malnic B. Analysis of the regulatory mechanisms of odorant receptor gene expression. XLII Reunião Anual da SBBq, Foz do Iguaçu, Brazil, 2010.

Nagai MH, Gutiyama LM, Almeida TJ, Malnic B. Ric-8B is essential for mouse embryogenesis. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, Stockholm, Sweden, 2012.

Barnabé GF, Costa ET, Asprino PF, Nagai MH, Malnic B, Chammas R, Carmargo AA. Intratumoral Societies - Subpopulations of Tumor Cells Expressing Different Levels of ADAM23 Seems Responsible for Different Aspects of Malignancy. In: 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012, Barcelona, Spain.

Nagai MH, Gutiyama LM, Malnic B. The guanine nucleotide exchange factor Ric-8B is essential for mouse embryogenesis. “Developmental Biology” Gordon Research Conference, Barga, Italy, 2013.

8.2 Anexo B – Artigo em preparação, e submetido para a disciplina QBQ5749-9 (Redação Científica), realizada em maio de 2014.

The guanine nucleotide exchange factor Ric-8B is essential for mouse embryogenesis

Maíra Harume Nagai[1], Luciana Mayumi Gutiyama[1], Cleiton Fagundes Machado[1], Alice Helena dos Reis Ribeiro[2], Jose Garcia Ribeiro Abreu Junior[2] and Bettina Malnic[1]

[1]Department of Biochemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[2]Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Corresponding author: Bettina Malnic (bmalnic@iq.usp.br)

Adress: Av. Prof. Lineu Prestes, 748 – Bloco 10 sup, sala 104.

Cidade Universitária, São Paulo, SP

CEP 05508-000

25 pages

7 figures

2 tables

Abstract: 195 words

Introduction: 377 words

Discussion: 1172 words

Conflict of interests: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments: We thank FAPESP, CNPq and Capes for the financial support

Abstract

Ric-8B is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) which is predominantly expressed in mature olfactory sensory neurons in adult mice. We have previously shown that Ric-8B interacts with both Gαolf and Gγ13, two G protein subunits, which are required for odorant signal transduction in the cilia of olfactory sensory neurons. *In vitro*, Ric-8B is able to amplify odorant receptor signaling through Gαolf, however, its physiological role remains unknown. To determine the role played by Ric-8B *in vivo* we generated a Ric-8B knockout mouse. We found that, despite the limited distribution of Ric-8B gene expression in adult mice, Ric-8B homozygous mutants are not viable. Mutant embryos do not develop normally and fail to close the neural tube at the cranial region. In wild type embryos the Ric-8B gene is expressed in the neural folds of the cephalic regions. Within the neural tube, expression is restricted to the floor plate, in a pattern that strongly resembles the one shown by Sonic hedgehog (Shh), a signaling molecule which plays important roles in the developing nervous system. Our data show that Ric-8B is essential for the embryogenesis and suggest that the role played by Ric-8B is related to ciliary functions.

INTRODUCTION

Odorants are detected by a large family of G protein coupled receptors, the odorant receptors, expressed in the olfactory sensory neurons of the nose (Buck and Axel, 1991; Malnic et al., 2010). The cilia of olfactory neurons are highly specialized sensory organelles and contain all of the molecules necessary for odorant signal transduction. Odorant receptors signal through an olfactory specific G protein, termed Gαolf, which is restrictedly expressed in the olfactory neurons and also in a few regions of the brain, such as the striatum (Belluscio et al., 1998; Zhuang et al., 2000). Once activated, Gαolf stimulates adenylyl cyclase III to produce cAMP, which in turn triggers the opening of cyclic nucleotide gated channels and ultimately membrane depolarization. It has been shown that mice that are knockout for Gαolf are anosmic (they lack the sense of smell) (Belluscio et al., 1998), what is consistent with a

fundamental and central role for this G protein subunit in odorant signal transduction. In addition, it has been recently shown that Gγ13 is also required for odorant signal transduction.

We have previously found that Ric-8B, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) interacts with Gαolf (Von Dannecker et al., 2005) and is able to amplify odorant receptor signal transduction through Gαolf *in vitro* (Von Dannecker et al., 2006). Ric-8B expression in adult mice is highly restricted to the same tissues where Gαolf is expressed indicating that these two proteins are functional partners (Von Dannecker et al., 2005). Ric-8B interacts with the Gαolf subunit and catalyzes the exchange of GDP for GTP (Chan et al., 2011) and therefore has been considered to work as a positive regulator for G protein signaling. However, there is no direct evidence so far that Ric-8B plays such a role *in vivo*.

In order to address this question, we generated Ric-8B knockout mice. Surprisingly, these mice are not viable, despite their restricted pattern of expression in adult mice. We analyzed embryos from the embryonic day 7.5 to 12.5 and found that Ric-8B gene expression is restricted to the nervous system, more specifically to the ventral neural tube. Knockout embryos die around E10.5 and show a failure of the cranial neurulation, indicating that Ric-8B is essential for mouse embryogenesis and is involved in the development of the nervous system.

MATERIALS AND METHODS

Animal procedures

All procedures undertaken in this study were approved by the University of São Paulo Chemistry Institute's Animal Care and Use Committee, under the protocol number 01/2013.

Gene trap mice

The Baygenomics ES cell lines RRH188 and RRA103 derived from the 129P2Ola/HSD strain were used. The insertion of the gene trap vectors (pGT01xf and pGT11xf, respectively) in the Ric-8B gene was confirmed by RT-PCR, using the vector primer β-geo R together with primer RRH188F in exon 3 or primer RRA103F in exon 7, to detect the corresponding

chimeric mRNAs. The cells were injected into C57BL/6 strain blastocysts at the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) at the University of California, Davis (http://www.mmrrc.org) to produce chimeric mice. Chimeric male mice showing high percent chimerism were crossed to C57BL/6 females and the resulting agouti offspring was genotyped by PCR on ear genomic DNA using primers that recognize the gene trap vector (vector F2, and β–geo R). Primer sequences are shown in Table 1.

Heterozygous mice were intercrossed and the resulting mice were genotyped by a multiplex PCR using three primers: the forward primer 188intronF2 in intron 3 and two reverse primers, the VectorR2 primer in the gene trap vector for the Ric-8B KO allele (312 bp PCR product), and the 188intronR2 primer in intron 3 for the WT allele (582 bp PCR product). PCR reactions started with a denaturation step of 95°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 45 s, 68°C for 45 s and 72°C for 1 minute.

X-gal staining of tissues and embryos

X-gal staining was performed as described in (Mombaerts et al., 1996). Briefly, for whole mounts, tissues were dissected and incubated on ice for 30 minutes with 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 4% PFA, 2 mM $MgSO_4$, 5 mM EGTA, washed once with 100 mM phosphate buffer (pH7.4), 2 mM $MgCl_2$, 5mM EGTA at room temperature and further incubated for 30 minutes with the same buffer. Tissues were then washed twice for 5 minutes at room temperature with 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2 mM $MgCl_2$, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40 and incubated for 16 hours in the dark at 37°C with 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2 mM $MgCl_2$, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 1mg/ml X-gal. For sections, whole mount embryos stained with X-gal were frozen in OCT and sectioned using a cryostat.

***In situ* hybridization**

In situ hybridization experiments were performed as described in (Von Dannecker et al., 2005).

Western blot

Whole E9.5 embryos were lysed with cold RIPA buffer and 7% SDS-PAGE was used to fractionate proteins. Western blotting was performed by using anti-Gli3 (1:100, Proteintech) and anti-α-tubulin (1:40000, Sigma) antibodies.

RT-PCR

RNA was purified from mouse embryos and cDNA synthesis was performed as previously described (Von Dannecker et al., 2005). The pair of primers Ric-8BFexon3 and Ric-8BRexon5, or RicRTF and RicRTR (see Table 1) were used to amplify different regions of the Ric-8B cDNA. The PCR reaction was carried out for 28 cycles, and the PCR products were analyzed in 1% agarose gels.

Cell culture

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from E9.5 embryos and cultured in growth medium of High Glucose DMEM, 0.05 mg/ml penicillin, 0.05 mg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). At confluence, cells were split at 1:5 and kept for up to 3 passages. To induce primary cilia formation, growth medium was replaced for High Glucose DMEM containing 0.5% FBS for 48 hours.

Immunofluorescence

MEFs were plated in eight-well LabTek microscope slides and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. To detect primary cilia, cells were blocked with 10% NGS and 0.1% Triton X-100 for 30 minutes. Then, cells were incubated at 4°C overnight with a primary antibody against acetylated α-tubulin (Abcam, 1:500) diluted in 1% NGS and 0.1% Triton X-100. After washing 3 times in PBS, Alexa-488 secondary antibody (Life Technologies, 1:300) was added in the incubation solution for 1 h at room temperature. Nuclei were counterstained with DAPI.

For the apoptosis/proliferation experiment, MEFs were treated with 10 μM BrdU for 1 h and fixed after 24 h. Fixed cells were washed in PBS, then incubated with 1,5 M HCl and 0.5% Tween 20 for 20 minutes. Cells were washed once in 0.1 M sodium tetraborate and once in PBS before the incubation with blocking solution (10% FBS and 0.2% Triton-X) for 30 minutes. Primary antibodies against cleaved caspase-3 (Cell Signaling, 1:250) and BrdU

(Santa Cruz, 1:400) were diluted in 1% FBS and 0.1% Triton X-100 and incubated at 4°C overnight. After washing 3 times in PBS, cells were incubated for 1 h with Alexa-488 and Alexa-546 secondary antibodies (Life Technologies, 1:300) diluted in 1% FBS and 0.1% Triton X-100. Nuclei were stained with DAPI.

Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in 15% sucrose and 50% Tissue-Tek OCT (Sakura) at 4°C for 1 h, frozen in Tissue-Tek OCT (Sakura) and cryostat-sectioned at 14 μm. Immunofluorescence was performed as described above for apoptosis experiments with MEFs.

Scanning electron microscopy

Embryos were dissected in cold PBS and fixed overnight at 4°C in PBS containing 4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid and 5 mM calcium chloride. Then, embryos were dehydrated in 20%, 50% and 70% ethanol and kept in 70% ethanol until the analysis.

RESULTS

Generation of Ric-8B gene trap mice

In order to generate mice that are deficient for Ric-8B we obtained two Baygenomics ES cell lines (Stryke et al., 2003) which contain a gene trap vector in the Ric-8B gene. In the RRH188 cell line, the vector is inserted in the intron between exons 3 and 4, and in the RRA103 cell line the vector is inserted in the intron between exons 7 and 8 (Figure 1A). The two ES cell lines were used to produce chimeric mice, but mice showing high percent chimerism were obtained only for the RRH188 cell line. The insertion of the gene trap vector leads to the expression of a chimeric mRNA containing exons 1, 2 and 3 in frame with the β-geo sequence (Stanford et al., 2001). The resulting Ric-8B fusion protein is likely to be nonfunctional, because it only contains amino acids 1-246 from Ric-8B, and it was shown that Ric-8B that lacks exon 9 does not bind to Gαolf and does not show GEF activity (Von Dannecker et al., 2005; Chan et al.). Chimeric males were crossed with C57BL/6 females and the agouti-colored offspring were analyzed for transmission of the gene trap vector. As

expected, approximately 50% of these mice were heterozygous for the gene trap insertion (Figure 1B). These mice develop normally with no evident signs of olfactory or any other deficits, when compared to their wild type siblings.

Ric-8B gene expression in the adult mouse

We have previously shown by using *in situ* hybridization experiments that the Ric-8B gene is predominantly expressed in the olfactory epithelium and in the striatum of adult mice (Von Dannecker et al., 2005). We used the β-geo gene reporter, which is expressed under the control of the Ric-8B promoter, to monitor the Ric-8B gene expression in the heterozygous RRH188 mice. Whole-mount X-gal staining of the nasal cavity and brain are shown in Figure 2. Strong blue staining is detected in the olfactory epithelium, but not in the olfactory bulb, vomeronasal organ or brain (Figure 2A). Staining can also be detected in the septal organ of Masera, an isolated small patch of sensory epithelium located at the ventral base of the nasal septum (Munger et al., 2009), which is known to contain olfactory sensory neurons that express Gαolf as well as other canonical OSNs genes (Ma et al., 2003). Although no staining was observed in the medial view of the brain (Figure 2A), when the brain is cut in a parasagittal plane, blue staining of the striatum is revealed (Figure 2B). X-gal staining of sections cut through the nasal cavity shows that β-galactosidase activity is present throughout the olfactory epithelium and in the region where the neurons of the septal organ are located (Figure 2C, D and F). These results are in agreement with analysis of Ric-8B gene expression by *in situ* hybridization (Von Dannecker et al., 2005), and indicate that the expression of the β-geo reporter is indistinguishable from that of the endogenous Ric-8B gene.

We also examined the Ric-8B gene expression in different tissues of the heterozygous RRH188 mice. No staining was observed in any of the several analyzed tissues (data not shown). It is important to note that we also detected endogenous β-galactosidase activity in the olfactory epithelium of wild type mice, as previously described (Liberles and Buck, 2006), however, it was observed only after one overnight incubation with X-gal while staining of the

olfactory epithelium from heterozygous RRH188 mice is visible after a few hours. Altogether, these results confirm the previous findings that the expression of the Ric-8B gene is predominantly restricted to a few tissues in the adult mouse.

Ric-8B homozygous mutant mice are embryonic lethal

Heterozygous RRH188 mice were intercrossed to generate homozygous RRH188 mice. Genotyping of the offspring revealed the absence of mice homozygous for *Ric-8B* gene mutation (Table 2). In order to determine the time of embryonic death, embryos from heterozygous intercrosses were genotyped at different developmental stages (Figure 1C). We found that homozygous embryos die around embryonic day 10.5 (Table 2), showing that Ric-8B expression is essential for mouse embryogenesis. RT-PCR analysis demonstrated that even though detectable, the levels of Ric-8B mRNA are much lower in the homozygotes than in the wild type or heterozygous embryos (Figure 1D). Because the gene knock out technology we used in this study occurs at the level of mRNA splicing, it is possible that there is a residual generation of some transcript isoforms, which escape the expected splicing (shown in Figure 1A).

Ric-8B is required for the normal development of the nervous system

We next analyzed the morphologies of the mutant embryos. We found that Ric-8B$^{-/-}$ embryos show phenotypic abnormalities when compared to WT or heterozygous embryos. These embryos are usually smaller, and they exhibit a failure to close the neural tube in the rostral cranial region (Figure 3A-C).

Analysis of the heterozygous embryos showed that expression from the *Ric-8B* gene promoter is restricted to the region of the cranial neural folds (at E8.5) or roof plate (at E9.5) and to the ventral region of the neural tube (Figure 3A and B). Notably, the levels of β-galactosidase expression are significantly higher in the *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos when compared to heterozygote embryos. These results should be expected, since the *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos carry two copies of the β-geo reporter gene while the *Ric-8B*$^{+/-}$ embryos have only one copy of the

reporter gene. Indeed, quantitative PCR experiments showed that the level of β-galactosidase activity in the Ric-8B$^{-/-}$ embryos is 2 fold higher than the ones from Ric-8B$^{+/-}$ mice (data not shown).

To determine the extent of distribution of the *Ric-8B* gene expression we analyzed transverse sections cut through the X-gal stained E8.5 and E9.5 embryos. In the *Ric-8B*$^{+/-}$ embryos expression is highly restricted to the neural folds in the brain region and to the ventral region of the neural tube (Figure 4 A-D and I-N). In the mutant *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos, expression is detected in the same regions, but the staining is stronger and more widespread, including regions of the adjacent mesenchyme (Figure 4 E-H and O-T). Note that, as mentioned above, while the neural folds are normally closed in the *Ric-8B*$^{+/-}$ embryos, they fail to close in the brain region in *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos (arrows in Figures 4L and R). As mouse embryos do not die *in utero* because of neural tube defects (Copp, 1995), the causes of embryonic lethality of Ric-8B knockout remain unknown. Mouse gene knockouts, transgene insertions and spontaneous mutations leading to prenatal death indicate that disturbances such as failure to establish and maintain a vascular circulation or haematopoiesis, as well as defective maternal-embryonic interactions, are the main causes of the death at midgestation (Copp, 1995). Accordingly, further investigation are needed to determine why *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos die at this stage.

Ric-8B is expressed in the floor plate of the neural tube

We found that *Ric-8B* gene expression is highly restricted to the floor plate (and notochord) regions of the embryonic neural tube (Figure 5A). This pattern of expression is highly reminiscent of the one shown by *Sonic hedgehog* (*Shh*), a signaling secreted protein that plays important roles during development. We therefore analyzed whether *Shh* signaling is altered in the mutant embryos. *Shh* acts in a concentration-dependent manner to specify the neuronal fates in the ventral neural tube (Roelink et al., 1995; Wijgerde et al., 2002). We therefore analyzed the ventral patterning of the neural tube of Ric-8B$^{-/-}$ mice. In order to do this, we examined the expression patterns of the floor plate markers *Shh* and *FoxA2*, and of

the direct target of the *Shh* signaling pathway, *Ptch1*. We found that the expression pattern of these genes in the neural tube of the mutant embryos, as detected by *in situ* hybridization, was indistinguishable from that of the wild type mice (Figure 5B), indicating that the ventral neural types are normally specified in these embryos.

The Gli3 protein is one of the major transcription factors that mediate the transcriptional effects of Shh signaling. In the absence of Shh signaling, Gli3 is proteolytically processed to produce a form that acts as a transcriptional repressor (Wang et al., 2000). We next tested the effect of *Ric-8B* mutation on Shh signaling by monitoring the extent of proteolytic processing of Gli3 in protein extracts from mutant embryonic tissues. We found that in Ric-8B$^{-/-}$ embryos processing of Gli3 is similar to the one of wild type or heterozygous embryos (Figure 5C).

As mentioned above, Ric-8B interacts with Gαolf and Gγ13, two G protein subunits which localize to the cilia of mature olfactory neurons (Kerr et al., 2008). These results suggest that the role played by Ric-8B in these neurons could be related to cilia (Kerr et al., 2008; Li et al., 2013). Interestingly, it has been shown that cilia are required for the vertebrate Shh pathway signaling (Huangfu et al., 2003; Eggenschwiler and Anderson, 2007; Rohatgi et al., 2007; Corbit et al., 2005). To analyze whether ciliary defects are responsible for the Ric-8B mutant phenotype we examined primary cilia in MEFs prepared from wild type or *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos. Primary cilia were detected by using antibodies to α-acetylated tubulin. As shown in Figure 5D primary cilia were clearly detected in both types of MEFs, indicating that MEFs from *Ric-8B*$^{-/-}$ mice have normal cilia. We can however not exclude the possibility that the *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos have ciliary defects in other cell types. Altogether, these results indicate that Shh signaling is not grossly altered in the Ric-8B mutant embryos.

Is there a G protein partner for Ric-8B during embryogenesis?

Ric-8B works *in vitro* as a GEF for Gαs and Gαolf (Chan et al., 2011). The fundamental role played by *Ric-8B* during embryogenesis raises two important questions. First, which Gα subunit is the target for Ric-8B in the embryo (if there is one)? As described above, in the

adult mouse *Ric-8B* is highly co-expressed with Gαolf in the same few regions, strongly indicating that this Gα subunit is the major target for Ric-8B (Von Dannecker et al., 2005). *In situ* hybridization on sections of an E10.5 WT embryo shows that Gαolf is not co-expressed with Ric-8B in the floor plate, while Gαs, which is also able to interact with Ric-8B in vitro, is highly expressed all over the neural tube (Figure 6A). Interestingly, we found that Ric-8BΔ9, the alternatively spliced version of Ric-8B which lacks exon 9, is the predominant form of Ric-8B cDNA in the embryo, while both forms, full length Ric-8B and Ric-8BΔ9 are present in equivalent amounts in the adult olfactory epithelium (Figure 6B and Von Dannecker et al., 2005). Since Ric-8BΔ9, differently from Ric-8B, binds only weakly to Gαs, and does not work as an efficient GEF for the Gαs subunit (Von Dannecker et al., 2005; Chan et al., 2011), our results raise the possibility that the role played by Ric-8B during development could be unrelated to a Gα protein.

Increased apoptosis in mutant embryos

As shown in Figure 3, the homozygous mutant embryos show a failure to close the neural tube at the cranial region. The fact that the β-geo reporter gene is expressed at the neural folds and roof plate at the time of normal neural tube closure (embryonic days E8.5-E9.5, Fig. 4) strongly indicates that this defect results from the deficiency of Ric-8B gene expression in this region. Previous analysis of mouse mutants indicate that different types of embryonic disturbances may cause this type of neural tube defect (Copp et al., 2003; Copp, 2005). For example, a series of mouse mutants exhibit increased apoptosis of neuroepithelial cells in association with failure of neural tube closure at the cranial region (Ikeda et al., 2001; Ruland et al., 2001; Migliorini et al., 2002). To determine if the mutant Ric-8B mice show altered levels of apoptosis, we analyzed the distribution of apoptotic cells by immunostaining for activated caspase-3 in E9.5 embryo sections. Though we found that mutant embryos show increased numbers of apoptotic cells, they are located in the cranial mesenchyme, particularly in the region that surrounds the hindbrain neural tube, instead of the neuroepithelium (Figure 7A). In agreement with these results, we also found that MEFs

prepared from mutant embryos are more susceptible to apoptosis, when compared to MEFs from wild type embryos (Figure 7B). Neural tube defects can also be due to abnormalities in the cell proliferation/differentiation ratios (Copp, 2005). No significant differences between wild type and mutant MEFs for BrdU incorporation were observed, suggesting no differences in cell proliferation (Figure 7B).

DISCUSSION

Ric-8B is highly conserved between vertebrates, indicating a conservation of function during evolution. Accordingly, disruption of the *Ric-8B* gene in zebrafish also caused embryonic lethality (Nagayoshi et al., 2008). In addition, the *Ric-8B* mutant zebrafish showed a small pigment spots phenotype, which could be rescued by addition of forskolin, an activator of adenylyl cyclase, indicating that Ric-8B activates the Gαs pathway to induce dispersal of melanosomes (Nagayoshi et al., 2008). The embryonic lethality was however not rescued by forskolin treatment, as a result of insufficient forskolin concentration or failure in the activation of other G proteins. Also, these data indicate that *Ric-8B* may play a role in the development other than the GEF activity. Alignment of zebrafish and mouse Ric-8B shows that these homologs share 51% of protein identity. To better understand the function of Ric-8B it would be interesting to analyze the presence of conserved domains or binding motifs that suggest additional roles for this gene. Until now, only the interactions with G protein subunits have been described. Interestingly, a proposed structural model for xRIC-8 is composed of 10 armadillo folding motifs (Figueiroa et al., 2009). Armadillo proteins, such as β-catenin, are known to interact with multiple protein partners and participate in distinct cellular processes, which raises the possibility of finding new partners for Ric-8 with different functions.

In agreement with our findings, it has been previously shown that the knockout of Ric-8B gene results in embryonic lethality of mice (Gabay et al., 2011). In this work, however, the phenotype of *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos was not analyzed. Instead, they used embryonic stem cells to demonstrate that *Ric-8B* knockout leads to reduced amounts of Gαs protein in the cell

membrane while the levels of mRNA remain intact. These results indicate that Ric-8B acts as a molecular chaperone for Gα subunits, which is important for Gαs association with membrane (Gabay et al., 2011). By contrast, we found that the Ric-8BΔ9 isoform is more abundant than full length Ric-8B in mouse embryos, suggesting that the main role of Ric-8B during the development may be unrelated to Gα proteins. Besides, as Gαs is ubiquitously expressed and Gαolf is not expressed at this stage, the Ric-8B partner (or partners) during the development remains to be determined.

The establishment of the dorso-ventral axis of the embryonic neural tube depends on several different pathways which are tightly regulated. They generate a gradient of morphogens that patterns the neural tube. Induction of the dorsal cell fates in the spinal cord requires the activity of BMPs produced in the overlying ectoderm and roof plate, and the Wnt proteins produced in the roof plate. The most ventral cell fates are specified by higher levels of Shh, which is initially produced by the notochord and subsequently by cells of the floor plate (reviewed in Wilson and Maden, 2005; Dessaud et al., 2008). Here we show that Ric-8B expression at E8.5 is located in the notochord (Figure 4C), and then is restricted to the ventral neural tube from E9.5 to E12.5 (Figures 4N, 5A). This pattern of expression strongly resembles the one exhibited by Shh.

Moreover, there are evidences that Shh can regulate neural tube closure by shaping the neuroepithelium bends (Ybot-Gonzalez et al., 2002). Interestingly, as it happens with Ric-8B$^{-/-}$ embryos, some mutants that overexpress Shh also show open cranial neural tubes (Cooper et al., 2005; Mukhopadhyay et al., 2013). However, no differences of expression were observed between wild type and mutat embryos in our *in situ* hybridization experiments using probes for Shh and for two of its downstream targets, FoxA2 and Ptch1. In addition, Gli3 proteolysis, which is regulated by Shh signaling, is very similar in wild type and knockout embryos. These results indicate that the *Ric-8B* mutation does not disturb Shh signaling.

In genetic screens to identify genes required for patterning of the mid-gestation mouse embryo, it was discovered that Shh signaling depends on the primary cilia (Huangfu et al., 2003). Many of the mouse mutants for genes coding intraflagellar transport (IFT) proteins

lack cilia and show disruption of the Shh pathway. Further experiments showed that core components of the Shh signaling are enriched in the cilia.

As Ric-8B interacts with ciliary proteins in the olfactory neurons, we asked if its function is related to cilia. We addressed this question using MEFs as an *in vitro* system for ciliogenesis and show that Ric-8B$^{-/-}$ cells can normally grow primary cilia. As cilia have also been shown to be involved in the regulation of other pathways than Shh signaling during the development, such as PDGFRa (Schneider et al., 2005; Christensen et al., 2007) and Wnt signaling (May-Simera and Kelley, 2012; Wallingford and Mitchell, 2011), we cannot discard the possibility of Ric-8B function in other cilia signaling pathways. *Wnt-1* and *Wnt-3a* genes are coexpressed at the dorsal midline of the embryonic neural tube, coincident with dorsal patterning. Homozygous mouse embryos for mutants Wnt-1 alleles also exhibit neural tube defects, with absence of most of the midbrain and some rostral metencephalon at E9.5 (McMahon and Bradley, 1990). However, it is important to note that the Ric-8B mutant which we analyzed in this study is not a null mutant, and it is possible that the residual amounts of Ric-8B may hamper the detection of some of the resulting phenotypes.

The factors disturbing cranial neurulation are highly heterogeneous (Copp et al., 2003), such as abnormal apoptosis of neuroepithelial cells, dynamics of actin filaments, neural crest emigration and proliferation/differentiation balance (Copp, 2005). Here we show that both knockout MEFs and knockout E9.5 embryos have higher numbers of apoptotic cells. In the *Ric-8B*$^{-/-}$ embryos sections we observed increased apoptosis at the cranial region, but it is pronounced in the head mesenchyme and not found in the neuroepithelium. In addition, the weak expression of *Ric-8B* in the neural folds of E8.5 embryo and in the roof plate of E9.5 embryo raises the possibility of *Ric-8B* involvement in the neural crest migration. *Ric-8A* has been shown to participate in this event during mouse and frog development (Fuentealba et al., 2013; Maldonado-Agurto et al., 2011). Interestingly, the double disruption of *Wnt-1* and *Wnt-3a* genes leads to a deficiency in the neural crest derivatives, and a marked reduction in dorsolateral neural precursors within the neural tube. These phenotypes do not seem to be related to the mechanisms responsible for establishing normal dorsoventral pattern of the

neural tube, but with a role of Wnt signalling in regulating the expansion of dorsal neural precursors (Ykeya et al., 1997). In addition, it has been shown that canonical Wnt-1/β-catenin signaling promotes cell survival in various cell types, both inhibiting apoptosis (Chen et al., 2001) and activating the transcription of *c-Myc* proto-oncogene (You et al., 2002). Wnt-1 is expressed in many human cancer cell lines and tissues, and blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in some human cancer cells. A study developed in mesothelioma cell line showed that, at least in part, blockade of Wnt-1 signaling can inhibit apoptosis through the Wnt-1/JNK noncanonical pathway (You et al., 2004). As the Ric-8B homozygous embryos exhibit increased apoptosis in mesenchyme cells and failure of the cranial neural tube closure, it would be interesting to verify if Wnt signaling, as well as the neural crest migration, is intact in these embryos. These data could help to comprehend the role played by *Ric-8B* during the development, especially in the process of neural tube closure.

References:

Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. Neuron 20:69-81.

Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65:175-187.

Chan P, Gabay M, Wright FA, Tall GG (2011) Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. J Biol Chem 286:19932-19942.

Chen S, Guttridge DC, You Z, et al. (2001) Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T-cell factor-mediated transcription. J Cell Biol 152:87–96.

Christensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P (2007) Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. Traffic 8:97-109.

Cooper AF, Yu KP, Brueckner M, Brailey LL, Johnson L, McGrath JM, Bale AE (2005) Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. Development 132:4407-4417.

Copp AJ (1995) Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. Trends in Genetics 11: 87-93.

Copp AJ (2005) Neurulation in the cranial region--normal and abnormal. J Anat 207:623-635.

Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN (2003) The genetic basis of mammalian neurulation. Nat Rev Genet 4:784-793.

Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. Nature 437:1018-1021.

Dessaud E, McMahon AP, and Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. Development 135: 2489-2503.

Eggenschwiler JT, Anderson KV (2007) Cilia and developmental signaling. Annu Rev Cell Dev Biol 23:345-373.

Figueiroa M, Hinrichs MV, Bunster M, Babbitt P, Martinez-Oyanedel J and Olate J (2009) Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. Protein Science 18: 1139-1145.

Fuentealba J, Toro-Tapia G, Arriagada C, Riquelme L, Beyer A, Henriquez JP, Caprile T, Mayor R, Marcellini S, Hinrichs MV, Olate J, Torrejon M (2013) Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. Developmental biology 378:74-82.

Gabay M, Pinter ME, Wright FA, Chan P, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Tall GG (2011) Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein alpha subunit membrane association. Sci Signal 4:ra79.

Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature 426:83-87.

Ikeda A, Ikeda S, Gridley T, Nishina PM, Naggert JK (2001) Neural tube defects and neuroepithelial cell death in Tulp3 knockout mice. Hum Mol Genet 10:1325-1334.

Ikeya M, Lee SMK, Johnson JE, McMahon AP and Takada S (1997) Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature 389: 966-970

Kerr D, Von Dannecker L, Davalos M, Michaloski J, Malnic B (2008) Ric-8B interacts with Gaolf and Gg13 and co-localizes with Gaolf, Gb1 and Gg13 in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol Cell Neurosci 38:341-348.

Li F, Ponissery-Saidu S, Yee KK, Wang H, Chen ML, Iguchi N, Zhang G, Jiang P, Reisert J, Huang L (2013) Heterotrimeric G protein subunit Ggamma13 is critical to olfaction. J Neurosci 33:7975-7984.

Liberles S, Buck L (2006) A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. Nature 442:645-650.

Ma M, Grosmaitre X, Iwema CL, Baker H, Greer CA, Shepherd GM (2003) Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. J Neurosci 23:317-324.

Maldonado-Agurto R, Toro G, Fuentealba J, Arriagada C, Campos T, Albistur M, Henriquez JP, Olatea J, Hinrichs MV, Torrejón MV (2011) Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in Xenopus embryogenesis. Gene Expression Patterns 11: 401–408.

Malnic B, Gonzalez-Kristeller DC, Gutiyama LM (2010) Odorant Receptors. In: The Neurobiology of Olfaction (Menini A, ed), pp 181-202. Boca Raton, FL: CRC Press.

May-Simera HL and Kelley MW (2012) Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton. Cilia 1:7.

McMahon AP, Bradley A (1999] The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. Cell 62(6):1073-85.

Migliorini D, Lazzerini Denchi E, Danovi D, Jochemsen A, Capillo M, Gobbi A, Helin K, Pelicci PG, Marine JC (2002) Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. Mol Cell Biol 22:5527-5538.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao S, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. Cell 87:675-686.

Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, Jackson PK (2013) The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. Cell 152:210-223.

Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2009) Subsystem organization of the mammalian sense of smell. Annu Rev Physiol 71:115-140.

Nagayoshi S, Hayashi E, Abe G, Osato N, Asakawa K, Urasaki A, Horikawa K, Ikeo K, Takeda H, Kawakami K (2008) Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: tcf7 and synembryn-like. Development 135:159-169.

Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. Cell 81:445-455.

Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. Science 317:372-376.

Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW (2001) Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. Cell 104:33-42.

Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, Pazour GJ, Hoffmann EK, Satir P, Christensen ST (2005) PDGFRalphaalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. Current biology : CB 15:1861-1866.

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. Nat Rev Genet 2:756-768.

Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, Johns SJ, King LA, Harper CA, Meng EC, Lee RE, Yee A, L'Italien L, Chuang PT, Young SG, Skarnes WC, Babbitt PC, Ferrin TE (2003) BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. Nucleic Acids Res 31:278-281.

Von Dannecker L, Mercadante A, Malnic B (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Gaolf. J Neurosci 25:3793-3800.

Von Dannecker L, Mercadante A, Malnic B (2006) Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. Proc Natl Acad Sci USA 103:9310-9314.

Wallingford JB and Mitchell B (2011) Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. Genes Dev. 25: 201-213

Wang B, Fallon JF, Beachy PA (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. Cell 100:423-434.

Wijgerde M, McMahon JA, Rule M, McMahon AP (2002) A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. Genes Dev 16:2849-2864.

Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Developmental Biology 282: 1-13.

Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ (2002) Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. Development 129:2507-2517.

You L, He B, Uematsu K, Xu Z, Mazieres J, Lee A, McCormick F, and Jablons DM (2004). Inhibition of Wnt-1 signaling induces apoptosis in b-catenin-deficient mesothelioma cells. Cancer Research 64: 3474-3478.

You Z, Saims D, Chen S, et al (2002) Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. J Cell Biol 157:429–40.

Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) Golfa mediates dopamine D1 receptor signaling. J Neurosci 20:RC91.

FIGURE LEGENDS

Figure 1- Generation of Ric-8B gene trap mice. (A) The genomic structure of the Ric-8B gene is shown, with its ten exons (1-10) and nine introns (between the exons) and the insertion sites of the gene trap vector in the ES cell lines RRH188 and RRA103. The insertion of the gene trap vector in intron 3 in the RRH188 cell line leads to the expression of a chimeric mRNA containing exons 1, 2 and 3 in frame with the β-geo sequence. The locations of the primers used for PCR-based genotyping are indicated. SA: splice acceptor

site. B) Germ line transmission of the targeted allele. Chimeric mice obtained from RRH188 ES cells were crossed to C57BL/6 mice and the agouti offspring was genotyped by PCR using primers VectorF2 and β-geoR. Results obtained for ten agouti mice are shown. Four out of these contain the gene trapped allele (lanes 3, 6, 7 and 8). (C) Multiplex PCR-based genotyping of the embryos obtained from intercrossing of heterozygous mice using one forward primer (188intronF2) and two reverse primers (VectorR2 and 188intronR2. A 312 bp PCR product is expected for the the Ric-8B KO allele, and a 582 bp PCR product is expected for the WT allele. Samples analyzed in lanes 1, 3, and 5 are wild type; samples analyzed in lanes 2 and 4 are heterozygotes, and samples analyzed in lanes 6 and 7 are homozygous mutants. (D) RT-PCR was conducted to amplify the regions between exon3 and exon5 (1) and exon7 and exon10 of Ric-8B (2) and actin (3) from embryos with different genotypes as indicated.

Figure 2- Ric-8B expression in the adult Ric-8B $^{+/-}$ mouse as revealed by β-galactoside staining. (A) Sagittal whole-mount view of the nasal cavity and brain stained with X-gal. Blue staining can be detected in the olfactory epithelium (OE) and septal organ (SO). (B) The brain region is cut in a parasagittal plane, revealing blue staining of the striatum. (C-G) X-gal staining of sections cut through the nasal cavity of Ric-8B $^{+/-}$ mice (C, D and F) or Ric-8B $^{+/+}$ mice (E and G). X-gal staining is present throughout the olfactory epithelium (C, D and F), and in the septal organ region (D). In the same experimental conditions, no staining is observed in the wild type tissues. VNO, vomeronasal organ; OB, olfactory bulb.

Figure 3- Ric-8B mutant embryos show defective neural tube closure in the brain. Wild type (+/+), heterozygous (+/-) or homozygous (-/-) *Ric-8B* embryos at E8.5 (A) or E9.5 (B) stained with X-gal are shown. In (B), ventral (upper row) and dorsal (lower row) views of the embryos are shown. In the *Ric-8B*$^{-/-}$ mice, the cranial neural folds are not closed (white arrows) but the other regions of the neural tube are normally closed. (C) Wild type (+/+), heterozygous (+/-) or homozygous (-/-) *Ric-8B* were examined by SEM at E9.5. A', B1 and C'

are magnified regions from A, B and C, respectively. P (prosencephalon), AB (first branchial arch). Scale bars in A- C represent 100 μm, in A'-C', 50 μm.

Figure 4- Ric-8B expression in the embryo is highly restricted. Upper panels: sagittal views of a Ric-8B$^{(+/-)}$ embryo (A) or a Ric-8B$^{(-/-)}$ embryo (E) at E8.5. The lines indicate the levels at which the transverse sections in (B-D) and (F-H) were cut. In the Ric-8B$^{+/-}$ embryo (B-D), blue staining is detected in the neural folds in the brain region (asterisk) and in the notochord (nc). In the Ric-8B$^{-/-}$ embryo (F-H) blue staining is detected in the same regions as in the Ric-8B$^{+/-}$ embryo, however the staining is stronger and expanded.
Lower panels: sagittal and ventral views of Ric-8B$^{(+/-)}$ embryo (I and J) or a Ric-8B$^{(-/-)}$ embryo (O and P) at E9.5. In the Ric-8B$^{+/-}$ embryo (K-M), blue staining is detected in the neural folds in the brain region (arrows) and in the floor plate region (fp). Note that the neural folds are closed (arrow in L). (N) Higher magnification of the neural tube in the Ric-8B$^{+/-}$ embryo showing strong blue staining in the floor plate region and weaker staining in the notochord. In the Ric-8B$^{-/-}$ embryo (Q-T) blue staining is detected in the same regions as in the Ric-8B$^{+/-}$ embryo, however the staining is stronger and expanded. Note that the neural folds are not closed in the anterior region of the head (arrows in R), but are normally closed at the more caudal regions. (T) Higher magnification of the neural tube in the Ric-8B$^{-/-}$ embryo showing strong blue staining in both the floor plate (fp) and notochord (nc) regions.

Figure 5 - Shh signaling in Ric-8B-/- embryos. (A) Transverse sections cut through the neural tubes of X-gal stained Ric-8B$^{+/-}$ embryos at different developmental stages shows that β –galactosidase activity is restricted to the floor plate**. (B)** Neural patterning of neural tubes from E9.5 Ric-8B$^{-/-}$ mice. Transverse section cut through the neural tubes were hybridized with antisense probes specific for Shh, FoxA2 and Ptch1. **(C)** Western blotting with antibody against Gli3 was used to analyze total protein extracts prepared from E9.5 whole embryos. The amounts of both the activator (Gli3 FL, 190 kD) and repressor (Gli3 R, 83kD) forms of Gli3 in Ric-8B$^{-/-}$ embryos are not different from the ones shown by wild type or heterozygous

embryos. Quantification of relative amounts of Gli3 FL and Gli3 R normalized to respective α-tubulin levels is shown at the bottom of the blot. Gli3 FL (Gli3 full length); Gli3 R (Gli3 repressor). (D) Immunofluorescence of Ric-8B$^{+/+}$ or Ric-8B$^{-/-}$ MEFs using antibodies against α-acetylated tubulin to label primary cilia. Nuclei are visualized with DAPI staining (blue).

Figure 6 – Expression of Gαolf and Gαs subunits in the neural tube. (A) Sections cut through the neural tube of an E10.5 wild type embryo were hybridized with digoxigenin-labeled probes for Ric-8B, Gαolf and Gαs, as indicated. (B) RT-PCR was conducted to amplify Ric-8B and Ric-8BΔ9 from RNA prepared from wild type mouse embryos at different developmental stages. The PCR product sizes expected for Ric-8B using the pair of primers that flank the ninth exon (upper panel) are 462 bp (Ric-8B) and 342 bp (Ric-8BΔ9).

Figure 7 – Apoptosis and cell proliferation in homozygous mutant embryos. (A) Sections cut through wild type and homozygous mutant embryos were stained with antibodies recognizing the activated form of caspase-3. Note the increased number of apoptotic cells in the cranial mesenchyme of the mutant embryo (arrows). **(B)** MEFs extracted from wild type and homozygous mutant E9.5 embryos were stained for activated caspase-3 (in green) and BrdU incorporation (in red). As it was observed for sections, there are more apoptotic cells in knockout culture.

Table 1 - Primer sequences.

Primer name	**Primer sequence**
RRH188F	gtgacggtagacagttggaaggtgc
βgeoR	gacagtatcggcctcaggaagatcg
Vector R	cgtgtcctacaacacacactccaacc
Vector R2	ttacacctggccagtgaggcttctag

RRH188R	aatggcgaaggacagctgccatgac
Vector F2	ttatcgcagatctggactctagagg
188intronF1	ctgtaagtcatgaggcagttagtgctg
188intronF2	gagctccagctatgcagtgcttactc
188intronF3	ttctgccatgcgcatatggacagttg
188intronF4	tcaagaactgtctggtgtagaaggaag
188intronR2	gtgctgtcaccagagacctctagtc
RRA103F	cggagtcaagcagattgctgctgag
Ric-8BFexon3	gagtatgagtcggccatagac
Ric-8BRexon5	cagttcatctagagttgctgc
RicRTF	aagctggttcgtctcatgac
RicRTR	gtctgtgtccgagctggtc

Table 2. Analysis of offspring and embryos from intercrosses of heterozygous mice. Genotypes were determined by PCR. The number of abnormal or dead KO embryos is shown in parenthesis.

Stage	WT	Het.	KO (abnormal)	Total #
E7.5	12	27	12	51
E8.5	32	52	22(19)	106
E9.5	33	63	32(28)	118
E10.5	6	17	10(8)	33
E12.5	7	12	1(1)	20
Post natal	29	53	0	82

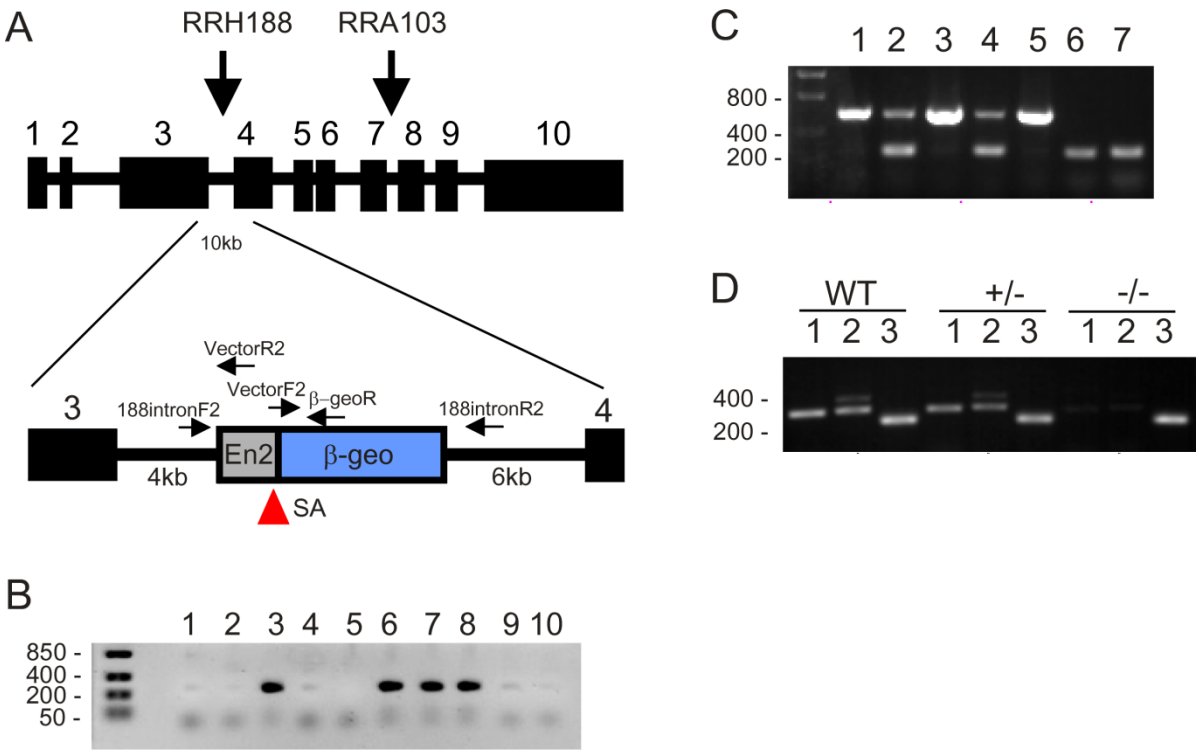
A
RRH188
RRA103
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
10kb
VectorR2
VectorF2
β-geoR
3
188intronF2
188intronR2
4
En2
β-geo
4kb
6kb
SA
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
850 -
400 -
200 -
50 -
C
1 2 3 4 5 6 7
800 -
400 -
200 -
D
WT
+/-
-/-
1 2 3 1 2 3 1 2 3
400 -
200 -

Figure 1.

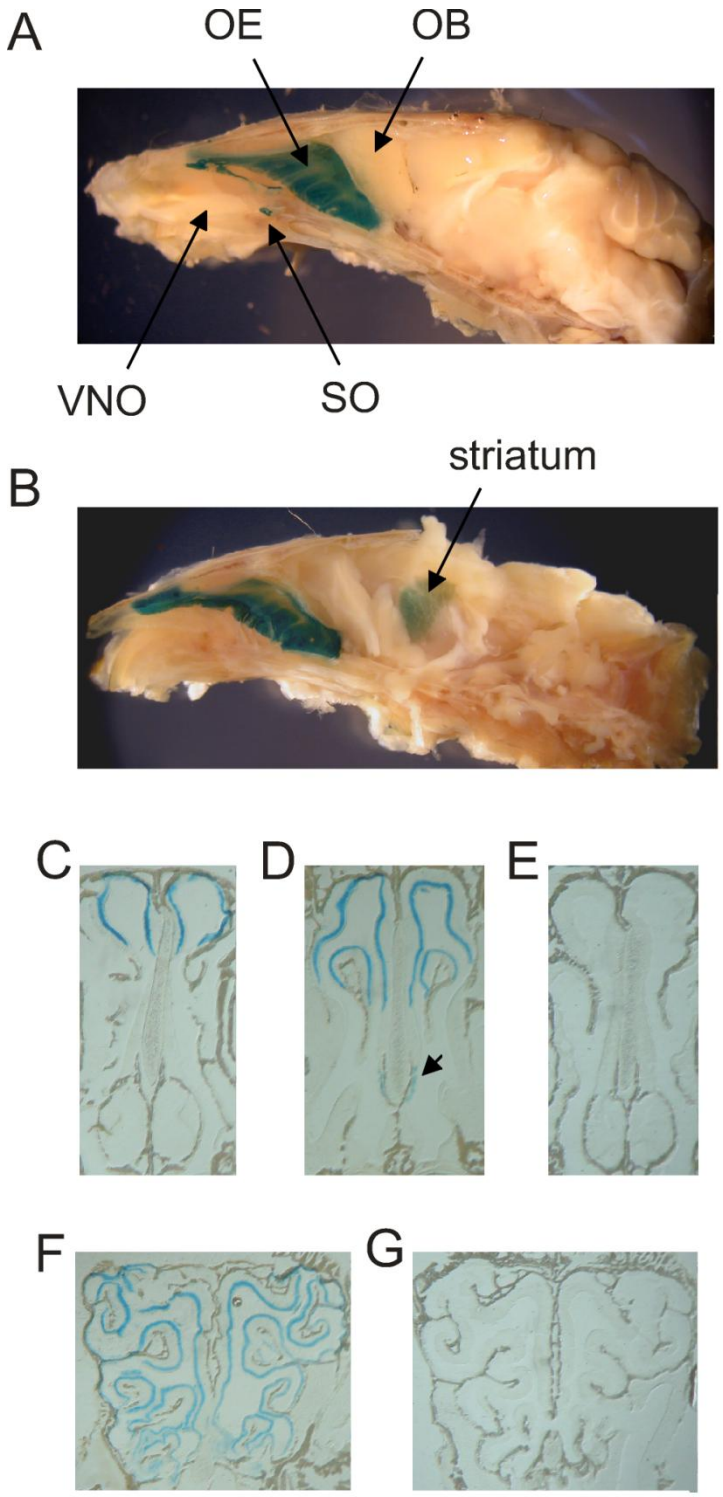

Figure 2.

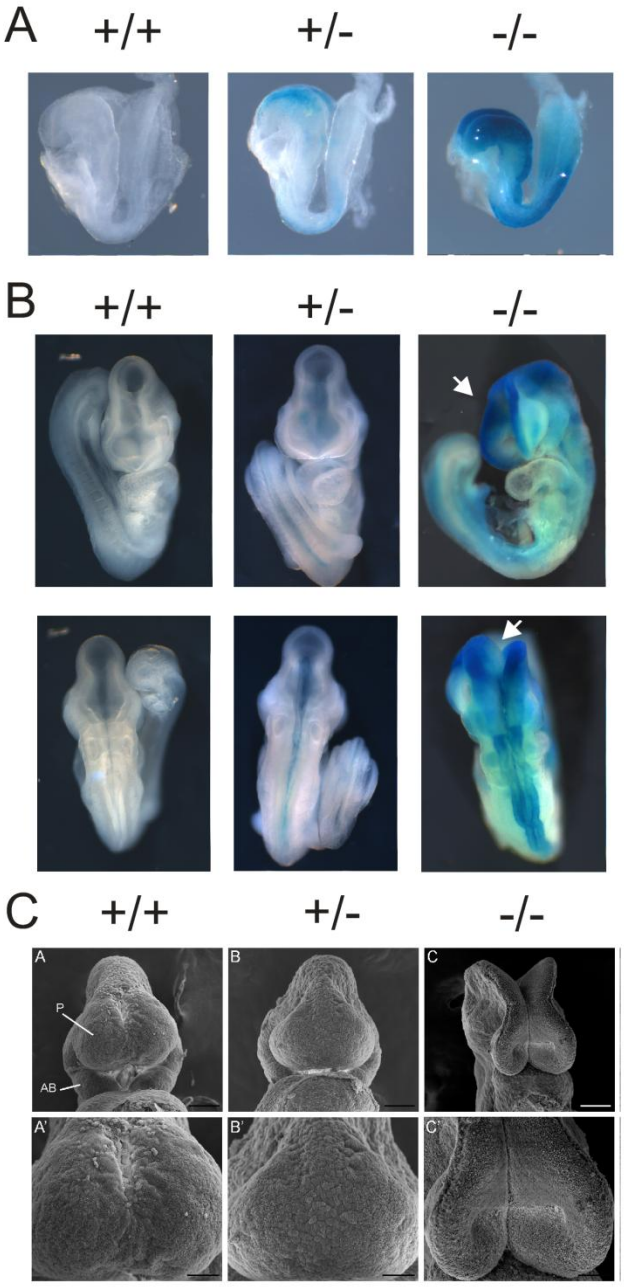

Figure 3.

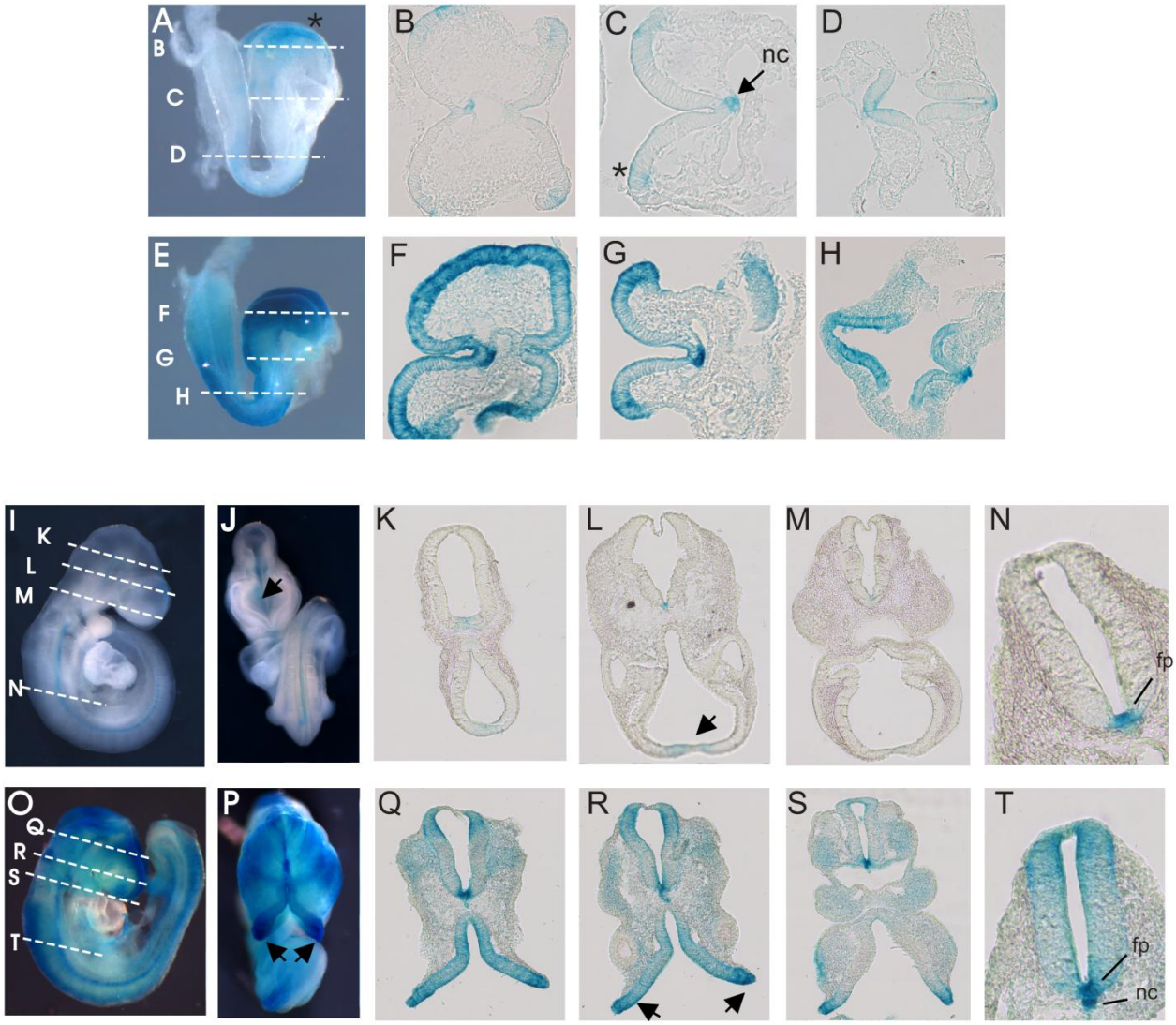

Figure 4.

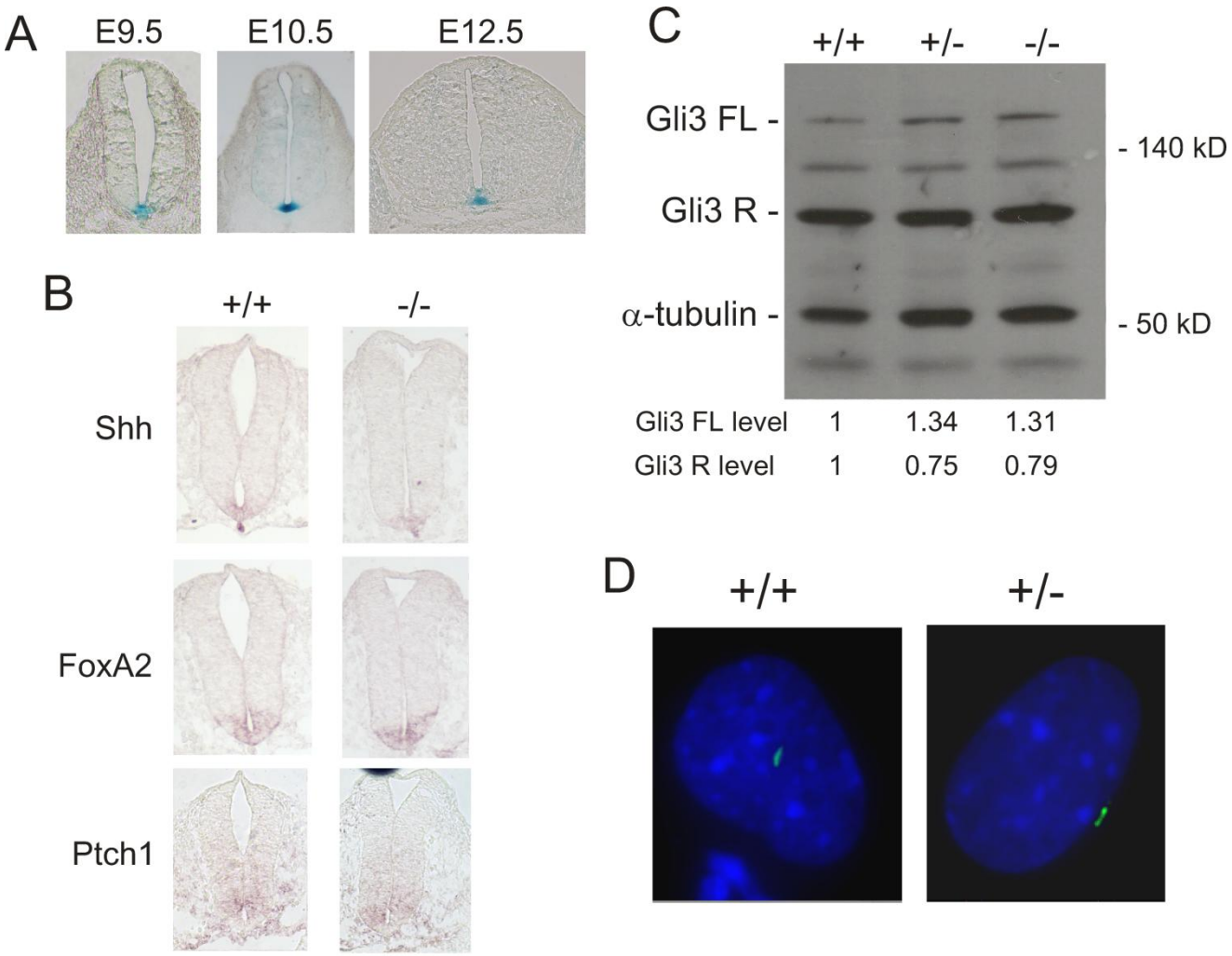
A
E9.5
E10.5
E12.5
B
+/+
-/-
Shh
FoxA2
Ptch1
C
+/+
+/-
-/-
Gli3 FL -
Gli3 R -
α-tubulin -
- 140 kD
- 50 kD
Gli3 FL level 1 1.34 1.31
Gli3 R level 1 0.75 0.79
D
+/+
+/-

Figure 5.

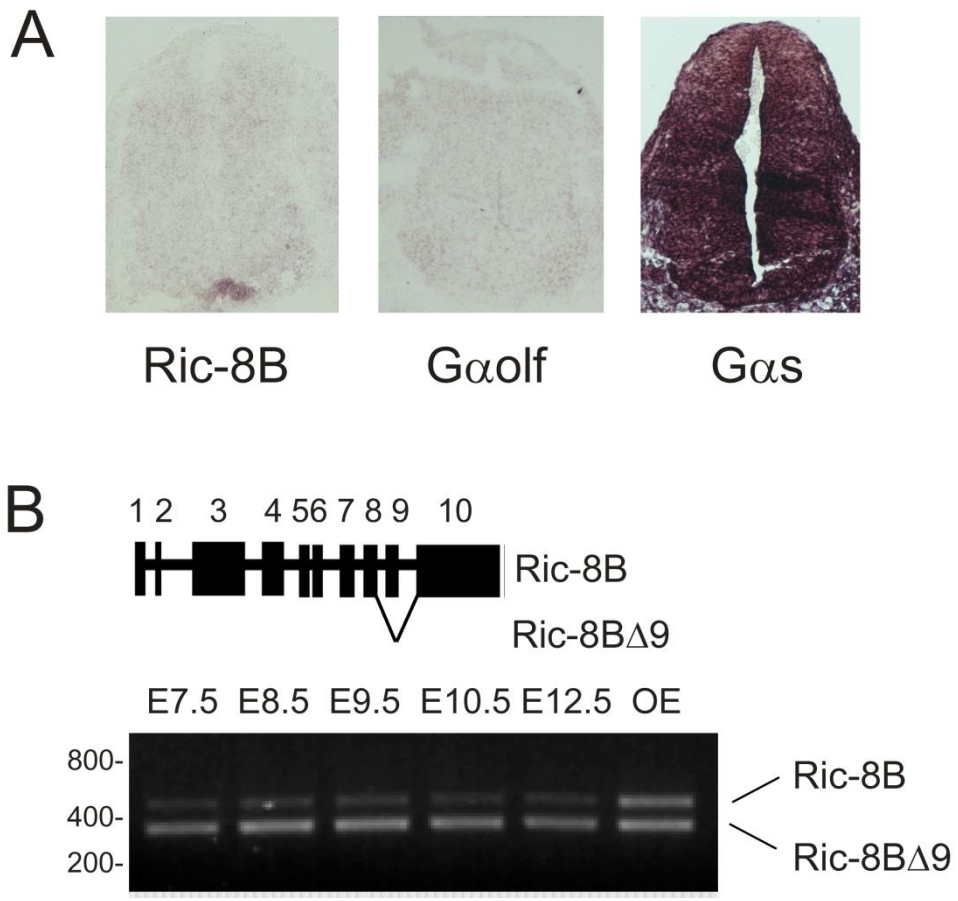
A
Ric-8B
Gαolf
Gαs
B
1 2 3 4 56 7 8 9 10
Ric-8B
Ric-8BΔ9
E7.5 E8.5 E9.5 E10.5 E12.5 OE
800-
400-
200-
Ric-8B
Ric-8BΔ9

Figure 6.

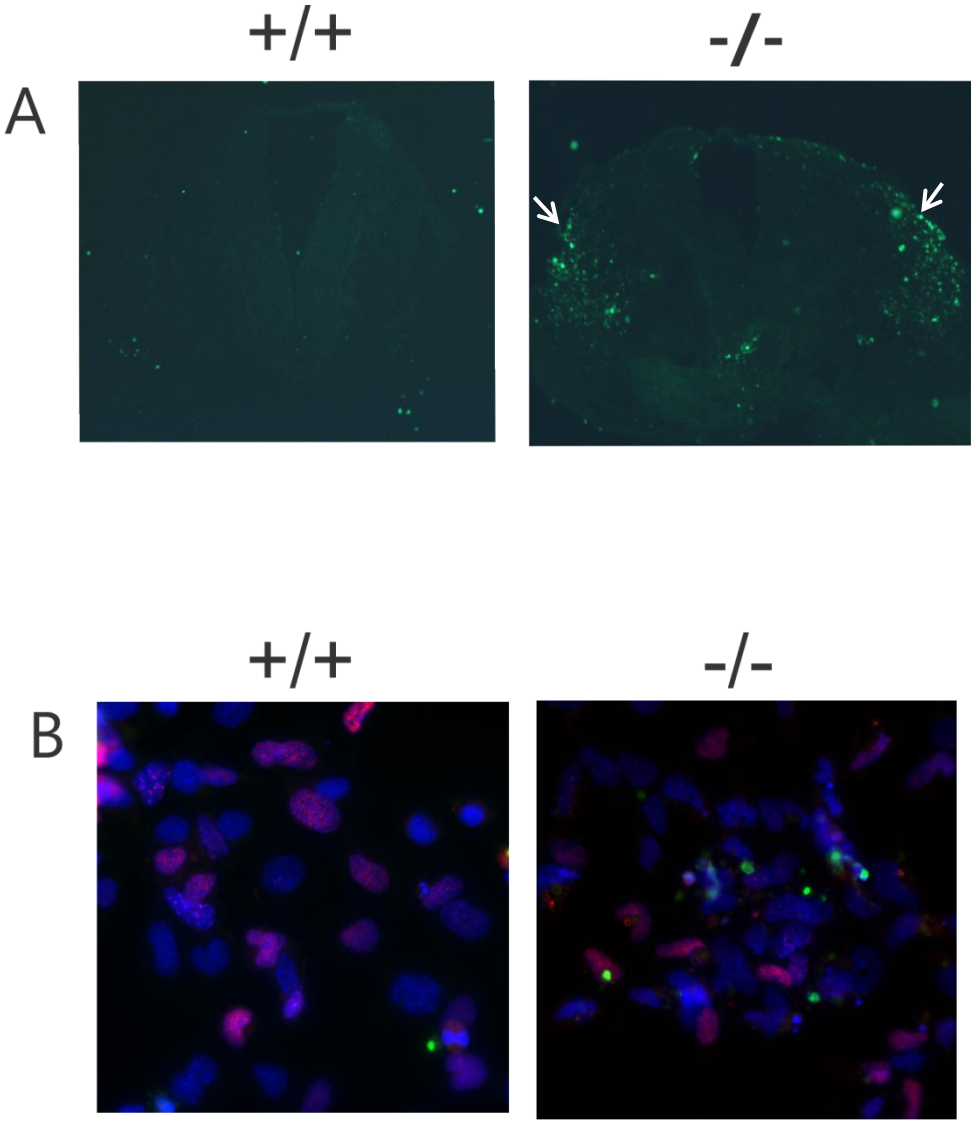

Figure 7.